



I I M T

**ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES DE TERAPIA
FARMACOLÓGICA Y CELULAR EN RATAS CON DOLOR
NEUROPÁTICO**

**EXPERIMENTAL STRATEGIES OF PHARMACOLOGICAL AND
CELLULAR THERAPY IN RATS WITH NEUROPATHIC PAIN**

BIOQ. MAILÍN CASADEI

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Tesis presentada para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biomédicas por la Universidad Austral

Director: Dr. Pablo R. Brumovsky
Co-Director: Dr. Alejandro Montaner

**Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT)
CONICET – Universidad Austral Pilar, Buenos Aires, Argentina, 2022**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Austral por brindarme el espacio para desarrollarme como becaria doctoral y como docente, y que junto con el CONICET financiaron mi beca doctoral.

Al Dr. Pablo Brumovsky por darme la valiosa oportunidad de formar parte de su equipo y por dirigir mi proyecto de tesis, y al Dr. Alejandro Montaner por su co-dirección.

Al Dr. Esteban Fiore por enseñarme y ayudarme en esta etapa de formación.

A las Dras. Patricia Setton, Vanina Usach, Florencia Coronel y a los Dres. Luis Constandil, Alfonso Romero-Sandoval, Diego Mengelle y Roberto Guerri Guttenberg por colaborar en el desarrollo de esta tesis.

A la Sra. Norma Montalbetti y a la Lic. Paula Roselló por hacer posible la experimentación, y a todo el personal de bioterio que cuidó con responsabilidad a los animales.

A mis compañeros del Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT) por compartir el valor del trabajo en equipo.

A las Dras. Ana Sancovich y Selva Cigorruga, y a todos los integrantes de la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biomédicas, por formarme con tanto cariño en la docencia.

A mi familia, a Francisco y a mis amigos por el apoyo incondicional.

RESUMEN

El dolor neuropático es una condición médica preocupante que afecta a alrededor del 10% de la población mundial. Si bien existe un pequeño número de fármacos específicamente recetados para su tratamiento, los mismos no están libres de efectos adversos indeseados. Peor aún, una cantidad relevante de pacientes con dolor neuropático no responde a la terapéutica existente. En el presente trabajo de tesis doctoral, y utilizando modelos robustos de dolor neuropático en la rata, abordamos esta problemática con una perspectiva traslacional, y nos enfocamos en caracterizar el potencial terapéutico de dos agentes experimentales: 1) el oligodeoxinucleótido (ODN) no-codificante IMT504 y 2) las células mononucleares de médula ósea (BMMC, por sus siglas en inglés). Para inducir dolor neuropático, empleamos 3 modelos animales de lesión mecánica del nervio ciático, incluyendo la lesión selectiva de las ramas del nervio (SNI, por sus siglas en inglés), la axotomía completa, o la compresión aguda o “crush”. Estos modelos fueron utilizados en tres proyectos definidos, a saber: 1) análisis del rol anti-nociceptivo del IMT504 en ratas con SNI y comenzar a exponer los posibles mecanismos de acción involucrados, con particular énfasis en la modulación de las células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) endógenas; 2) estudiar el rol preventivo del IMT504 sobre la autotomía en ratas con axotomía del nervio ciático y determinar posibles mecanismos de acción; 3) comprobar el valor terapéutico de la administración sistémica tardía de las BMMC en ratas con dolor neuropático inducido por crush o por SNI del nervio ciático. También analizamos el rol pro-regenerativo de las BMMC en ratas con crush del nervio ciático. Todos los proyectos incluyeron estudios de las respuestas conductuales compatibles con la presencia de dolor en la rata y la evaluación de varios biomarcadores asociados a la inflamación o la regeneración.

El Proyecto I de la presente tesis confirma el rol anti-nociceptivo y anti-inflamatorio de larga duración del IMT504 en un modelo de lesión neuropática persistente (SNI) en la rata. Demostramos que una sola administración subcutánea de IMT504 bloquea (si es administrado el mismo día de la lesión) o revierte (si es administrado 7 días después de la lesión) la alodinia mecánica y fría durante al menos 5 semanas después del tratamiento. Este evento se correlaciona con un aumento persistente en el porcentaje de MSC en sangre periférica y los nervios ciáticos lesionados, en un proceso aparentemente influenciado por modificaciones en el eje CXCL12-CXCR4. El análisis *in vitro* de MSC de rata o humano pre-tratadas con IMT504 revela que estas células tienen la capacidad de internalizar el ODN y confirma los efectos pro-migratorios del IMT504. Mediante experimentación *in vitro* y *ex vivo* demostramos que

el IMT504 induce la expresión de citoquinas anti-inflamatorias en las MSC y modula la expresión de diversas citoquinas en los nervios, lo que favorecería un estado anti-inflamatorio en el sitio de lesión. En conjunto, revelamos por primera vez una asociación directa entre las acciones anti-alodínicas del IMT504, sus efectos pro-migratorios sobre MSC, su capacidad moduladora de la secreción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, condicionando en última instancia la homeostasis inflamatoria en los nervios lesionados.

En el Proyecto II de la presente tesis determinamos el efecto preventivo del IMT504 sobre el desarrollo de autotomía en la pata lesionada de ratas con axotomía del nervio ciático, el cual se correlaciona con un aumento en el porcentaje de MSC en el nervio lesionado y en los ganglios anexos a la raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés) L4-L6 asociados. Además, mostramos que la reducción de la gliosis ganglionar y espinal, así como la modulación de varias citoquinas pro- y anti-inflamatorias directamente involucradas en la respuesta inflamatoria, forman parte de los mecanismos de acción que estarían asociados al efecto anti-inflamatorio del ODN. Estos resultados, sumados a los obtenidos en el análisis hecho en ratas con SNI, proveen mayor soporte a la hipótesis de que el efecto anti-nociceptivo del IMT504 se fundamenta en la regulación del microambiente inflamatorio inducido por la lesión, favoreciendo el establecimiento de un estado anti-inflamatorio a nivel periférico y central, con posible impacto sobre la transmisión de impulsos dolorosos hacia niveles superiores del neuroeje.

El Proyecto III confirma el potencial terapéutico de la administración de BMMC en ratas con neuropatía periférica. Así, demostramos que el trasplante de BMMC durante la primera semana de lesión en ratas con crush del nervio ciático bloquea la alodinia mecánica y térmica, y mejora la apariencia morfológica de los nervios dañados en los animales tratados. Expusimos también que el trasplante de BMMC durante la primera semana posterior a la lesión da como resultado la mayor cantidad de células anidadas en el nervio ciático lesionado, sugiriendo el carácter de ventana terapéutica de tal período de tiempo. Asimismo, comenzamos a caracterizar el valor de las BMMC en ratas con neuropatía periférica instalada, como es el caso de ratas con SNI, demostrando que dos trasplantes cercanos en el tiempo revierten marcadamente, y por varias semanas, la conducta de dolor.

En suma, la presente tesis doctoral presenta resultados novedosos, basados en dos estrategias terapéuticas experimentales con alto potencial traslacional. La demostración de los efectos anti-nociceptivos y parte de los mecanismos de acción asociados del IMT504 en ratas con dolor neuropático persistente, y la confirmación de algunos de estos hallazgos en células humanas, son evidencia fuerte de una posible

utilidad en la terapia en humanos. Por otro lado, la caracterización y profundización de los efectos sobre el dolor neuropático de la administración exógena de BMMC en la rata representan también una oportunidad terapéutica prometedora, sobre todo si se toma en consideración que los trasplantes pueden ser autólogos y no requieren de complejos procedimientos *in vitro*, habitualmente utilizados para la obtención y trasplante de MSC.

Finalmente, varios de los resultados obtenidos en la presente tesis, y otros en curso en el laboratorio, han permitido la presentación de una patente de uso del IMT504, actualmente en evaluación en Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos (USPTO).

ABSTRACT

Neuropathic pain is a concerning medical condition that affects around 10% of the general population. Although there is a small number of drugs specifically prescribed for its treatment, they are not free of unwanted side effects. Worse yet, a significant number of patients with neuropathic pain do not respond to existing therapy. In this PhD thesis, and using robust models of neuropathic pain in the rat, we approach this problem from a translational perspective, and we focus on characterizing the therapeutic potential of two experimental agents: 1) the non-coding oligodeoxynucleotide (ODN) IMT504 and 2) bone marrow mononuclear cells (BMMC). To induce neuropathic pain, we used 3 animal models of mechanical sciatic nerve injury, including spared nerve injury (SNI), complete axotomy, or acute compression or "crush". These models were used in three defined projects: 1) analysis of the anti-nociceptive role of the IMT504 in rats with SNI and begin to expose the possible mechanisms of action involved, with particular emphasis on the modulation of endogenous mesenchymal stem cells (MSC); 2) study the preventive role of IMT504 on autotomy in rats with axotomy of the sciatic nerve and to determine possible mechanisms of action; 3) verify the therapeutic value of delayed systemic administration of BMMC in rats with neuropathic pain induced by sciatic nerve crush or by SNI. We also analyzed the pro-regenerative role of BMMC in rats with sciatic nerve crush. All projects included studies of behavioral responses consistent with the presence of pain in rats and the evaluation of several biomarkers associated with inflammation or regeneration.

Project I of this thesis confirms the long-lasting anti-nociceptive and anti-inflammatory role of IMT504 in a model of persistent neuropathic injury (SNI) in the rat. We demonstrate that a single subcutaneous administration of IMT504 blocks (if administered on the same day as injury) or reverses (if administered 7 days after injury) mechanical and cold allodynia for at least 5 weeks after treatment. This event correlates with a persistent increase in the percentage of MSC in peripheral blood and injured sciatic nerves, in a process apparently influenced by changes in the CXCL12-CXCR4 axis. *In vitro* analysis of MSC from rat or human pre-treated with IMT504 reveals that these cells have the ability to internalize the ODN and confirms the pro-migration effects of IMT504. Through *in vitro* and *ex vivo* experimentation, we show that IMT504 induces the expression of anti-inflammatory cytokines in MSC and modulates the expression of several cytokines in nerves, which would favor an anti-inflammatory state at the site of injury. Taken together, we reveal for the first time a direct association between the anti-allodynic actions of IMT504, its pro-migratory

effects on MSC, its ability to modulate the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines, ultimately conditioning inflammatory homeostasis in injured nerves.

In the Project II of this thesis, we determined the preventive effect of IMT504 on the development of autotomy in the injured paw of rats with axotomy of the sciatic nerve, which correlates with an increase in the percentage of MSC in the injured nerve and in the associated dorsal root ganglia (DRG) L4-L6. In addition, we show that the reduction of ganglion and spinal gliosis, as well as the modulation of several pro- and anti-inflammatory cytokines directly involved in the inflammatory response, are part of the mechanisms of action that would be associated with the anti-inflammatory effect of ODN. These results, added to those obtained in the analysis carried out in rats with SNI, provide further support to the hypothesis that the anti-nociceptive effect of IMT504 is based on the regulation of the inflammatory microenvironment induced by the injury, favoring the establishment of an anti-inflammatory state at peripheral and central level, with a possible impact on the transmission of pain impulses to higher levels of the neuraxis.

The Project III confirms the therapeutic potential of BMMC administration in rats with peripheral neuropathy. Thus, we demonstrate that BMMC transplantation during the first week of injury in rats with sciatic nerve crush blocks mechanical and thermal allodynia, and improves the morphological appearance of damaged nerves in treated animals. We also showed that BMMC transplantation during the first week after the injury results in the largest number of cells nested in the injured sciatic nerve, suggesting the character of therapeutic window of such period of time. Likewise, we began to characterize the value of BMMC in rats with established peripheral neuropathy, as is the case of rats with SNI, showing that two transplants close in time markedly reverse pain behavior, for several weeks.

In sum, this PhD thesis presents novel results, based on two experimental therapeutic strategies with high translational potential. The demonstration of the anti-nociceptive effects and some of the associated mechanisms of action of IMT504 in rats with persistent neuropathic pain, and the confirmation of some of these findings in human cells, are strong evidence of a possible therapeutic utility in humans. On the other hand, the characterization and deepening of the effects on neuropathic pain of the exogenous administration of BMMC in the rat also represent a promising therapeutic opportunity, especially if one takes into consideration that the transplants can be autologous and do not require *in vitro* complex procedures, usually used to obtain and transplant BMMC.

Finally, several of the results obtained in this thesis, and others in progress in the laboratory, have allowed the presentation of a patent for the use of IMT504, currently under evaluation in the United States Patent and Trademark Office (USPTO).

Publicaciones, manuscritos bajo revisión o en preparación y patentes en los que se basa la presente tesis

IMT504 blocks allodynia in rats with spared nerve injury by promoting the migration of mesenchymal stem cells and by favoring an anti-inflammatory milieu at the injured nerve. Casadei M, Fiore E, Rubione J, Domínguez LM, Coronel MF, Leiguarda C, García M, Mazzolini G, Villar MJ, Montaner A, Constandil L, Romero-Sandoval EA, Brumovsky PR. *Pain*, 2021. *Ahead of print*.

Late Bone Marrow Mononuclear Cell transplantation in rats with sciatic nerve crush. Analysis of a potential therapeutic window. Usach V, Casadei M, Piñero G, Vence Tech M, Brumovsky PR, Setton-Avruj P. *American Journal of Transplantation*. *Under review*.

Bone Marrow-Derived Cells and Peripheral Nerve Injury: Translational Implications for Pain and Regeneration Treatments. Usach V, Coronel MF, Malet M, Piñero G, Leiguarda C, Casadei M, Villar MJ, Setton-Avruj P, Brumovsky PR. *Clinical Pharmacology and Translational Medicine*, 2018;2:112-124. *Review*.

Modulation of mesenchymal stem cells, glial cells and the immune system by oligodeoxynucleotides as a novel multi-target therapeutic approach against chronic pain. Brumovsky PR, Casadei M, Leiguarda C, Coronel MF, Rubione J, Montaner A, Villar MJ. *Frontiers in Clinical Drug Research*, 2022;10: 226-268. *Book chapter*.

IMT504 modulates the inflammatory environment in the human neuroma and prevents autotomy in rats – Analysis of effects on mesenchymal stem cells and glial cells. Casadei M, Fiore E, Miguel B, Leiguarda C, Rubione J, Mengelle D, Guerri-Guttemberg R, Constandil-Córdova L, Romero-Sandoval A, Montaner A, Villar MJ, Brumovsky PR. *Manuscript in preparation*

Patent Application N° US 2020/0155592 A1 – 2019 – USE OF OLIGONUCLEOTIDES FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF PAIN. Inventors: Alejandro Daniel Montaner, Marcelo Javier Villar, Pablo Rodolfo Brumovsky, Candelaria Leiguarda, María Florencia Coronel, Inelia Mailín Casadei, Sandra Sbrascini. Titularidad: 100% CONICET. *Pending*.

Asimismo, durante la realización del presente doctorado, la aspirante a Doctora ha participado como colaboradora en las siguientes publicaciones:

Etv4 regulates nociception by controlling peptidergic sensory neuron development and peripheral tissue innervation. Rios AS, De Vincenti AP, Casadei M, Aquino JB, Brumovsky PR, Paratcha G, Ledda F. *Development*. *Under review*.

Transcript Expression of Vesicular Glutamate Transporters in Rat Dorsal Root Ganglion and Spinal Cord Neurons: Impact of Spinal Blockade during Hindpaw Inflammation. Leiguarda C, McCarthy CJ, Casadei M, Lundgren KH, Coronel MF, Trigoso-Venario H, Seal RP, Seroogy KB, Brumovsky PR. *ACS Chemical Neuroscience*, 2020;11(17):2602-2614.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS EMPLEADAS	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1 EL DOLOR	3
1.1 Dolor agudo vs dolor crónico	4
1.2 Dolor nociceptivo vs dolor neuropático	5
2 ANATOMÍA Y FISIOPATOLOGÍA DEL DOLOR	7
2.1 Vías periféricas del dolor.....	7
2.1.1 Ganglio anexo a la raíz dorsal.....	7
2.2 Vías centrales del dolor	10
2.2.1 Médula espinal	10
2.2.2 Vías espinales ascendentes.....	15
2.2.3 Tronco encefálico	19
2.2.4 Tálamo y otras estructuras sub-corticales y corticales	20
3 TRÍADA DEL DOLOR NEUROPÁTICO: NEURONA-SISTEMA INMUNE-GLÍA.....	25
3.1 Sistema inmune	28
3.1.1 Inmunidad innata	28
3.1.2 Inmunidad adaptativa	31
3.2 Células gliales.....	32
3.3 Citoquinas	36
3.3.1 Citoquinas pro-inflamatorias.....	36
3.3.2 Citoquinas anti-inflamatorias	38
4 MODELOS ANIMALES DE DOLOR NEUROPÁTICO.....	39
4.1 Axotomía (sección completa) del nervio ciático (AXT)	39
4.2 Lesión reversible del nervio ciático (o crush del nervio ciático)	40
4.3 Lesión persistente del nervio ciático	40
5 TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO	42
5.1 Terapias utilizadas actualmente en la clínica.....	42
5.2 Terapia farmacológica en etapa experimental: oligodeoxinucleótidos y su potencial terapéutico	43
5.2.1 El oligodeoxinucleotido no-CpG IMT504.....	44
5.3 Terapia celular: células madre y su potencial terapéutico	47
5.3.1 Células madre neurales (CMN).....	47
5.3.2 Células madre mesenquimales (MSC).....	48
5.3.3 Células mononucleares de médula ósea (BMMC).....	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS	60
1 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	61
2 ANIMALES.....	62
3 MODELOS DE LESIÓN DEL NERVIPO CIÁTICO	63
3.1 Lesión selectiva de las ramas del nervio ciático (SNI) (Proyectos I y III.3).....	63
3.2 Axotomía completa del nervio ciático (Proyecto II).....	63
3.3 Crush del nervio ciático (Proyectos III.1 y III.2).....	64

4	DROGAS EXPERIMENTALES (Proyectos I y II).....	67
5	TERAPIA CELULAR (Proyectos II y III).....	67
6	ENSAYOS CONDUCTUALES.....	68
7	ESTUDIOS ELECTROMIOGRÁFICOS (Proyecto III.2).....	84
8	CITOMETRÍA DE FLUJO (Proyectos I y II).....	84
9	RECUESTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE FIBROBLASTOS (CFU-F) (Proyecto I).....	93
10	MIGRACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MSC DE RATAS Y HUMANAS (Proyecto I).....	93
10.1	Medio condicionado de nervio ciático.....	93
10.2	Ensayo de migración <i>in vitro</i>	94
11	ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DE LA INTERNALIZACIÓN DE IMT504 EN MSC DE RATAS Y HUMANAS (Proyecto I).....	94
12	ELISA (Proyectos I y II).....	95
13	CO-CULTIVO DE MSC DE RATAS Y NERVIOS LESIONADOS (Proyecto I).....	96
14	RT-qPCR (Proyecto I).....	96
15	WESTERN BLOT (Proyecto III.2).....	100
16	INMUNOFUORESCENCIA (Proyectos II y III.2).....	100
17	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	103
	RESULTADOS.....	105
1	Proyecto I: Efectos y mecanismos de acción del ODN IMT504 en ratas con dolor neuropático crónico por el modelo de SNI.....	106
1.1	Diseño experimental.....	107
1.2	IMT504 previene o bloquea la alodinia mecánica y al frío inducida por SNI, durante un período prolongado, sin afectar la respuesta nocifensiva regular.....	110
1.3	IMT504 potencia la movilización y migración de MSC hacia el nervio periférico lesionado, involucrando la modulación del eje CXCL12-CXCR4.....	120
1.4	La exposición <i>in vitro</i> a IMT504 aumenta los niveles de expresión del transcrito de <i>cxcr4</i> en MSC y estimula la migración de las células hacia medios condicionados de nervio ciático.....	126
1.5	IMT504 modula el microambiente inflamatorio del nervio lesionado de ratas con SNI.....	134
1.6	IMT504 modula <i>ex vivo</i> a las MSC de la rata, promoviendo un perfil anti-inflamatorio y cambios en el ambiente inflamatorio de nervios lesionados.....	137
2	Proyecto II: Efectos y mecanismos de acción del ODN IMT504 en ratas con axotomía completa del nervio ciático.....	141
2.1	Diseño experimental.....	142
2.2	IMT504 previene la autotomía en ratas con axotomía completa del nervio ciático.....	145
2.3	IMT504 potencia la movilización y migración de MSC hacia el nervio y DRG lesionados.....	149
2.4	IMT504 reduce la gliosis ganglionar y espinal en ratas axotomizadas.....	152
2.5	El IMT504 modula el microambiente inflamatorio en el nervio lesionado y en la médula espinal ipsilateral de ratas con axotomía.....	159

3	Proyecto III: Tratamiento tardío con BMMC en ratas con lesión del nervio ciático .	162
3.1	Diseño experimental	163
3.1.1	Evaluación de la ventana temporal en la cual se observa un mayor arribo de BMMC, administradas de forma exógena y a distintas sobredosis, en el nervio lesionado de ratas con crush (Proyecto III.1)	163
3.1.2	Análisis del efecto del trasplante sistémico tardío de BMMC sobre la conducta del dolor, sobre la locomoción y sobre la velocidad de conducción y regeneración del nervio en ratas con crush del nervio ciático (Proyecto III.2)	163
3.1.3	Administración sistémica de BMMC en ratas con lesión selectiva de las ramas del nervio ciático (Resultados preliminares) (Proyecto III.3)	163
3.2	Estudio de la ventana temporal terapéutica para la administración de BMMC en ratas con crush del nervio ciático	168
3.2.1	Cinética de migración de las BMMC al nervio lesionado	168
3.3	Efecto terapéutico de BMMC en ratas con crush del nervio ciático	171
3.3.1	La administración tardía de BMMC bloquea la alodinia mecánica y al frío en ratas con crush del nervio ciático	171
3.3.2	El tratamiento tardío con BMMC mejora parcialmente la superficie de apoyo de la pata lesionada, pero no la funcionalidad del nervio, en ratas con crush del nervio ciático	174
3.3.3	La administración tardía de BMMC incrementa la cantidad y organización de MBP y β III-tubulina en el nervio lesionado	178
3.4	Efecto terapéutico de BMMC en ratas con lesión persistente (SNI) del nervio ciático – RESULTADOS PRELIMINARES	186
3.4.1	Una única administración tardía de BMMC bloquea, temporalmente, la alodinia mecánica y al frío inducida por SNI.	186
3.4.2	Una doble administración tardía de BMMC bloquea la alodinia mecánica y al frío inducida por SNI por un período prolongado	190
	DISCUSIÓN	193
1	PROYECTO I	194
2	PROYECTO II	198
3	PROYECTO III	203
	CONCLUSIÓN	208
	BIBLIOGRAFÍA	219

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AINE	Anti-inflamatorios no-esteroideo
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA	Analysis of Variance (Análisis de la varianza)
ATP	Adenosín trifosfato
AXT	Axotomy (Axotomía)
BMMC	Bone Marrow Mononuclear Cells (Células mononucleares de médula ósea)
CCI	Chronic constriction injury (Lesión por compresión crónica)
CF	Citometría de flujo
CFU-F	Colony forming units-fibroblast (Unidades formadoras de colonia de fibroblastos)
CGRP	Calcitonin gene-related peptide (Péptido relacionado con el gen de la calcitonina)
CMAP	Compound muscle action potential (Potencial de acción muscular compuesto)
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMN	Células madre neurales
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CPN	Common peroneal nerve (Nervio peróneo común)
CSF	Factor estimulante de colonias
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand (Quimioquina con motivo CXC)
CXCR	C-X-C chemokine receptor (Receptor de quimioquina CXC)
DAMP	Damage associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados al daño)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (4 ',6-diamidino-2-fenilindol)
DRG	Dorsal root ganglion (Ganglio anexo a la raíz dorsal)
DRt	Dorsal reticular nucleus (Núcleo reticular dorsal)
EGFP	Enhanced green fluorescent protein (Proteína fluorescente verde mejorada)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
FACS	Flow cytometry staining buffer (Buffer de tinción para citometría de flujo)
GABA	Gamma-aminobutyric acid (Ácido γ -aminobutírico)
GAL	Galanina
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor (Factor estimulante de colonia granulocítica)
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor (Factor neurotrófico derivado de la glía)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (Proteína ácida fibrilar glial)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)
GRP	Gastrin-releasing peptide (Péptido liberador de gastrina)
GSK3	(Glycogen synthase kinase-3) Quinasa 3 de la glucógeno sintasa
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía líquida de

	alta eficacia)
IASP	International Association for the Study of Pain (Asociación internacional para el estudio del dolor)
IBA1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Proteína adaptadora de unión a calcio 1)
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IR	Inmunoreactividad
L4-L6	Lumbar 4 - Lumbar 6
LC	Locus coeruleus
LI	Lámina I
LII	Lámina II
LIII	Lámina III
LIV	Lámina IV
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Proteína quinasa activadas por mitógenos)
MBP	Myelin basic protein (Proteína básica de la mielina)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (Proteína quimioattractante de monocitos-1)
MIP	Macrophage inflammatory protein (Proteína inflamatoria de macrófagos)
MSC	Mesenchymal stem cells (Células madre mesenquimales)
NCF	Núcleo cuneiforme
NF- κ B	Nuclear factor kappa B (Factor nuclear kappa B)
NGF- β	Factor de crecimiento nervioso- β
NK	Natural killer
NK1	Neurokinin 1 (Neuroquinina 1)
NKB	Neurokinin B (Neuroquinina B)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Nitric oxide synthase (Óxido nítrico sintasa)
NPY	Neuropeptide Y (Neuropéptido tirosina)
NTS	Núcleo del tracto solitario
ODN	Oligodeoxynucleotide (Oligodeoxinucleótido)
PAG	Periaqueductal gray (Sustancia gris periacueductal)
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos)
PBS	Phosphate buffered saline (Buffer fosfato salino)
PFA	Paraformaldehyde (Paraformaldehído)
PRR	Pattern Recognition Receptors (Receptores de reconocimiento de patrones)
PSL	Partial sciatic nerve ligation (Ligadura parcial del nervio ciático)
PV	Parvalbúmina
RVM	Rostral ventromedial medulla (Médula ventromedial rostral)
SGC	Satellite glial cells (Células gliales satélite)
SNC	Sistema nervioso central
SNI	Spared nerve injury (Lesión selectiva de las ramas del nervio ciático)
SNL	Spinal nerve ligation (Ligadura del nervio espinal)
SNP	Sistema nervioso periférico
SpV	Spinal trigeminal nucleus (Núcleo espinal del trigémino)
TLR	Toll-like receptor (Receptores tipo-Toll)
TN	Tibial nerve (Nervio tibial)
TNF	Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)

TRP	Transient receptor potential (Receptor de potencial transitorio)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Factor de crecimiento del endotelio vascular)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLM	Ventrolateral medulla (Médula ventrolateral)
WB	Western blot
WDR	Wide dynamic range (Rango dinámico amplio)

INTRODUCCIÓN

La presente tesis se centra en el estudio del dolor neuropático, desde las perspectivas morfológica, farmacológica, conductual y terapéutica, y se basa en resultados obtenidos mediante experimentación realizada en la rata y sus tejidos, así como en células madre mesenquimales (MSC) humanas.

Para establecer el marco de referencia en el cual se discutirán todas las consideraciones mencionadas, la presente Introducción se encuentra organizada en el siguiente orden: 1) Introducción al dolor; 2) Presentación de los sistemas neuronales sensitivos periféricos y centrales involucrados en la transmisión del dolor; 3) Mecanismos involucrados en la interacción entre el sistema inmune y las células gliales con el sistema nervioso ante el dolor; 4) Modelos experimentales en animales para el estudio de dolor neuropático; 5) Introducción a la terapia farmacológica con oligonucleótidos y a la terapia celular con células madre de médula ósea.

1 EL DOLOR

Hasta la década de 1970, el dolor se consideraba una respuesta sensorial inevitable al daño tisular. La *International Association for the Study of Pain* (IASP, por sus siglas en inglés) lo definía como una “experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”. Esta definición, ampliamente aceptada por los profesionales de la salud y los investigadores en el campo del dolor, y adoptada por varias organizaciones gubernamentales y no gubernamentales, incluida la Organización Mundial de la Salud, no tenía en consideración la dimensión afectiva de esta experiencia ubicua, y ninguno en absoluto para los efectos de las diferencias genéticas o experiencias pasadas. En los últimos años, los expertos en el campo han razonado que los avances en nuestra comprensión del dolor justificaban una re-evaluación de la definición y han propuesto modificaciones. La última versión revisada de la definición de dolor por las IASP dice: "El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada o similar a la asociada, a una lesión tisular real o potencial" [243] y se acompaña de la siguiente lista de notas aclaratorias, que incluye además la etimología:

- “El dolor es siempre una experiencia personal que está influenciada en diversos grados por factores biológicos, psicológicos y sociales”.
- “El dolor y la nocicepción (proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos contra los tejidos), son fenómenos diferentes. El dolor no se puede inferir únicamente a partir de la actividad de las neuronas sensoriales”.
- “Las personas, a través de sus experiencias de vida, aprenden el concepto de dolor”.
- “La manifestación de una persona sobre una experiencia que considera dolorosa debe ser respetada”.
- “Aunque el dolor suele tener un rol adaptativo, puede tener efectos adversos sobre la función y el bienestar social y psicológico de quien lo padece”.
- “La descripción verbal es solo uno de los varios comportamientos para expresar dolor; la incapacidad para comunicarse no niega la posibilidad de que un ser humano o un animal no humano experimente dolor”.

“Etimología: Del anglo-francés *peine* (dolor, sufrimiento), del latín *poena* (pena, castigo), a su vez del griego *poinē* (pago, pena, recompensa)”.

1.1 Dolor agudo vs dolor crónico

El dolor cumple una función vital como señal de advertencia de la existencia o amenaza de daño tisular, debido a trauma, infección o inflamación, desencadenando diversas reacciones reflejas para prevenir o limitar un daño mayor. Por lo general, el dolor agudo resultante de una enfermedad o lesión específica, tiene un propósito biológico útil y es auto-limitado. La terapia del dolor agudo tiene como objetivo tratar la causa subyacente e interrumpir las señales nociceptivas. Sin embargo, el dolor puede persistir a pesar del manejo exitoso de la afección que lo causó inicialmente, o porque la afección médica subyacente no se pudo tratar con éxito, convirtiéndose así en un estado patológico [17].

El dolor crónico es un dolor que persiste o se repite durante más de tres meses y que a menudo se convierte en el problema clínico único o predominante en algunos pacientes [158]. También puede surgir de estados psicológicos, en el cual el dolor no tiene ningún propósito biológico ni punto final reconocible. Sin embargo, el dolor crónico se trata de una “epidemia silenciosa”, que se estima que afecta al 30% de las personas en todo el mundo, del cual hay poca conciencia de su prevalencia y de los costos sociales y económicos que representa para el paciente y la sociedad [258]. Estas consecuencias socioeconómicas incluyen la reducción de la calidad de vida del paciente, el impacto negativo en sus relaciones, la pérdida del trabajo o la reducción de las responsabilidades laborales, el manejo ineficaz del dolor y el aumento de las tasas de depresión. En la última revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD, por sus siglas en inglés) por la Organización Mundial de la Salud, se incluye por primera vez una clasificación de dolor crónico [24]. Esta clasificación (ICD-11) distingue los síndromes de dolor crónico primario y secundario, integra los diagnósticos de dolor existentes y proporciona definiciones precisas y características adicionales de los diagnósticos respectivos, incluida la gravedad del dolor, su curso temporal y evidencia de factores psicológicos y sociales. En consonancia con la nueva definición, la clasificación ICD-11 reconoce que el dolor crónico puede o no estar asociado con el daño tisular.

La nueva definición de dolor y la clasificación de dolor crónico en la ICD-11 son dos pasos importantes y alineados con el objetivo de mejorar su comprensión y tratamiento. En este sentido, se hace cada vez más clara la necesidad de abordar al dolor crónico con un enfoque multidisciplinario e involucrando más de una modalidad terapéutica.

1.2 Dolor nociceptivo vs dolor neuropático

Según su etiología, el dolor se puede clasificar en nociceptivo y neuropático [218]. El dolor nociceptivo es aquel que surge de un daño real o potencial en el tejido no-neural y es consecuencia de la activación de los nociceptores, nombre que se da a las terminaciones axonales periféricas de las neuronas aferentes primarias [12] (ver más abajo para mayores detalles). Los nociceptores reaccionan a tres tipos de estímulos dentro del tejido diana: térmico (temperatura), mecánico (por estiramiento o tensión) y químico (sustancias nocivas). El dolor nociceptivo actúa como un importante sistema de alarma para evitar el daño tisular y sólo continúa mientras se mantenga el estímulo nocivo. La importancia de este sistema de alarma se ve reflejado en pacientes con insensibilidad congénita al dolor que, en ausencia de dolor, sufren lesiones repetidas, infecciones y otras afecciones que normalmente manifiestan dolor [231].

Por otro lado, el dolor neuropático es causado por una lesión o disfunción del sistema somatosensorial, incluyendo alteraciones morfológicas y/o funcionales de fibras nerviosas y neuronas sensitivas periféricas o centrales [64]. A diferencia del dolor nociceptivo, el dolor neuropático a menudo carece de una función protectora y puede persistir mucho después de la lesión que lo causó inicialmente, e incluso ser provocado por estímulos inocuos u ocurrir espontáneamente, sin un desencadenante identificable.

El dolor neuropático afecta del 7 al 10% de la población general [37], siendo más frecuente en mujeres (8% frente a 5,7% en hombres) y en pacientes mayores de 50 años (8,9% frente a 5,6% en los menores de 49 años) [38]. Dependiendo de la ubicación de la lesión o enfermedad, el dolor neuropático se puede clasificar en central, periférico o mixto [155].

El dolor neuropático central se debe a una lesión o enfermedad del cerebro y/o la médula espinal. Los trastornos neuronales que a menudo causan dolor neuropático central son: enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cerebrovasculares que afectan a las vías somatosensoriales centrales, patologías asociadas a la lesión de la médula espinal y enfermedades desmielinizantes [310].

Por el contrario, las patologías que causan dolor neuropático periférico involucran predominantemente la lesión de nervios periféricos [90]. A su vez, los trastornos de dolor neuropático periférico se pueden subdividir en los que tienen una distribución generalizada (generalmente simétrica) y los que tienen una distribución focal [64]. Las neuropatías periféricas dolorosas generalizadas más importantes clínicamente incluyen las asociadas con diabetes mellitus y otras disfunciones metabólicas, lesiones mecánicas de nervios periféricos, enfermedades infecciosas (infección por HIV y

lepra), quimioterapia, trastornos inflamatorios e inmunes (síndrome de Guillain-Barré), neuropatías hereditarias y las canalopatías (alteración en la fisiología de canales iónicos/catiónicos).

La neuropatía periférica altera las propiedades eléctricas de los nociceptores y de las neuronas aferentes primarias que los producen, generando una ganancia de excitación y facilitación, así como pérdida de inhibición a nivel periférico, lo que conduce a un desequilibrio entre la señalización excitatoria e inhibitoria a nivel central, desplazando a las vías sensoriales a un estado de hiperexcitabilidad, que, de mantenerse a lo largo del tiempo, contribuye a que el estado de dolor neuropático se vuelva crónico [40].

La hipersensibilidad desencadena en el paciente una combinación de diferentes síntomas y signos, como dolor punzante o ardiente, hormigueo y entumecimiento, dolor espontáneo, hiperalgesia (dolor exacerbado ante un estímulo que normalmente provoca dolor nociceptivo), alodinia (respuesta dolorosa ante un estímulo inocuo que en condiciones normales no provoca dolor), dificultad para dormir o descansar y problemas emocionales derivados de la condición [64].

El dolor neuropático es una condición compleja, difícil de tratar y continúa siendo un desafío médico no resuelto. La fisiopatología del dolor neuropático apenas comienza a descifrarse y se generan nuevos conocimientos críticos que pueden aprovecharse para el desarrollo de estrategias terapéuticas farmacológicas y celulares. Teniendo en cuenta el aumento de la incidencia del dolor neuropático debido al envejecimiento de la población, el aumento de la incidencia de la diabetes mellitus y la mejora en la supervivencia de pacientes con cáncer, es imperativo que comprendamos los obstáculos y desafíos en la traslación entre estudios en animales y humanos que permitan el desarrollo exitoso de terapias específicamente diseñadas contra el dolor crónico. Entonces, el desafío terapéutico actual debe ser re-convertido en un desafío científico, basado en una mejor estratificación de pacientes con dolor y el diseño de ensayos clínicos mejorados, el aprovechamiento de la tecnología avanzada de secuenciación genética, los estudios de asociación de genoma completo, el uso de tejidos humanos y la validación de evaluaciones conductuales del dolor en animales etiológicamente relevantes, los cuales allanarán el camino para una mejor comprensión de la fisiopatología y, finalmente, la prevención y el tratamiento del dolor [19,109,296].

2 ANATOMÍA Y FISIOPATOLOGÍA DEL DOLOR

El dolor es un fenómeno biopsicosocial complejo que surge de la interacción de múltiples sistemas neuroanatómicos y neuroquímicos con una serie de procesos cognitivos y afectivos [63]. Esta respuesta implica cuatro procesos principales:

- **Transducción:** activación de los nociceptores por estímulos dañinos o potencialmente dañinos, y generación de la señal nociceptiva (a modo de potenciales de acción).
- **Transmisión:** envío de la señal nociceptiva a través de los nociceptores, desde el sitio de la lesión hacia el sistema nervioso central (SNC; en concreto, el asta dorsal de la médula espinal).
- **Transformación o plasticidad:** modulación o inhibición de la señal nociceptiva a través de las vías ascendentes, descendentes o de facilitación e inhibición (ver más adelante).
- **Percepción:** interpretación de los estímulos nociceptivos que el cerebro recibe como dolor, integrando respuestas cognitivas y afectivas (emocionales).

Para comprender cada uno de estos pasos, se describirán a continuación los actores principales involucrados.

2.1 Vías periféricas del dolor

2.1.1 Ganglio anexo a la raíz dorsal

La nocicepción es la detección de estímulos dolorosos, y las primeras estructuras neurales que participan en tal detección son las neuronas aferentes primarias presentes en los ganglios de la raíz dorsal (DRG). A su vez, los DRG se localizan en el foramen de conjunción de las vértebras y se designan según el segmento vertebral en el que se encuentren: cervical (C), torácico (T), lumbar (L) y sacro (S) [5].

Las neuronas de los DRG son de estructura pseudo-unipolar, es decir, poseen un axón corto que se bifurca muy pronto en dos ramas separadas dando como resultado una proyección distal que se dirige hacia los tejidos periféricos, y una proyección proximal que se dirige hacia la médula espinal [126]. A su vez, las proyecciones periféricas transcurren por vía de los nervios periféricos, mientras que las proyecciones centrales alcanzan la médula espinal por vía de las raíces dorsales. Los cuerpos celulares de las neuronas aferentes primarias están separados entre sí por capas de células gliales satélite (SGC, por sus siglas en inglés), las cuales no sólo aportan soporte estructural en los DRG, sino que además participan en fenómenos de modulación directa de los somas a los que engloban.

La función más importante de las neuronas aferentes primarias es la transmisión de la información aferente (incluyendo el dolor) desde la periferia hacia los centros de integración sensorial del SNC [20]. Así, estas neuronas se encuentran especialmente capacitadas para detectar señales mecánicas, térmicas y químicas en los tejidos que inervan, alertando así al cuerpo de peligros potenciales [5].

Neuronas aferentes primarias – nociceptores

Los nociceptores son terminaciones nerviosas libres que surgen de los cuerpos celulares de las neuronas aferentes primarias, los cuales son capaces de transducir y codificar estímulos nocivos [81]. La nocicepción se produce a través de la activación de receptores y apertura de canales iónicos insertos en la membrana del nociceptor (en muchos casos el receptor de membrana y el canal iónico son la misma estructura). A esto le sigue la conversión de esa señal en un potencial de acción y su propagación al asta dorsal de la médula espinal, a través de la liberación de neurotransmisores específicos que están asociados con el dolor, como el glutamato y la sustancia P. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia, el cual interacciona con receptores de membrana, dentro de los que se encuentran los de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y no-NMDA. Por su parte, neuropéptidos excitatorios como la sustancia P interactúan con los receptores acoplados a proteína G con 7 segmentos trans-membrana, y en este caso particular se encuentran representados por el receptor denominado neurokinina-1 (NK1) [32,340].

Una manera convencional de categorizar a los nociceptores es de acuerdo con sus propiedades de conducción eléctrica. Así, los axones que transmiten información dolorosa son clasificadas como mielinizados finos o de tipo A δ (conducen potenciales de acción a velocidades entre 5 y 40 m/s), o amielínicos o de tipo C (conducen potenciales de acción a velocidades entre 0,5 y 2 m/s). También existen neuronas aferentes primarias que producen axones con vaina de mielina gruesa, llamadas A β (conducen potenciales de acción a velocidades entre 35 y 75 m/s). Sin embargo, estas neuronas son de bajo umbral mecánico y normalmente transmiten información no-dolorosa, táctil o propioceptiva hacia la médula espinal.

Los nociceptores A δ responden normalmente a estímulos mecánicos (pinchazos, pellizcos aplicados a la piel o penetraciones con objetos punzantes) o mecanotérmicos peligrosamente intensos, mientras que los nociceptores amielínicos tienden a responder a estímulos térmicos (temperaturas mayores a 42°C o menores a 5°C), mecánicos y químicos (sustancias tóxicas externas que pueden provocar lesiones tisulares, como la capsaicina del pimiento picante y la acroleína del tabaco, o por sustancias endógenas liberadas por el daño tisular, como iones potasio, bradicinina,

histamina y acetilcolina). Finalmente, la presencia de estos dos tipos de fibras (A δ y C) ha sido asociada a las dos sensaciones de dolor secuencial típicamente percibidos frente a un estímulo doloroso, conocido como el fenómeno de "doble sensación de dolor" [238]. El primero es inmediato, de alta intensidad pero corta duración (segundos), y transmitido por fibras A δ ; el segundo es un dolor menos intenso, sordo, pero de duración prolongada, y del cual es responsable la acción de las fibras C.

Activación específica de nociceptores por temperatura

La detección de temperaturas nocivas (por encima de 43°C), depende de la activación de receptores de potencial transitorio (TRP, por sus siglas en inglés), proteínas de membrana que se localizan en las fibras C y A δ "sensibles al calor". Los estudios en modelos de dolor en ratones han demostrado que uno de estos canales, el TRPV1, es necesario para la detección de calor nocivo. La capsaicina, sustancia que hace que los chiles sean picantes, también activa directamente al TRPV1 y se usa en el manejo del dolor crónico para agotar (mediante un fenómeno de desensibilización) fibras dolorosas de neurotransmisores pronociceptivos [244]. Hay varios miembros de la familia TRP que se activan a distintas temperaturas, por lo que se cree que estos canales funcionan junto con TRPV1 para detectar señales de calor nocivas. Por el contrario, la sensación de frío está mediada por un conjunto distinto de proteínas que normalmente responden a temperaturas inferiores a 25°C. Un nociceptor de frío ampliamente caracterizado es el TRPM8 que media gran parte de la sensación de frío entre 10°C y 30°C. Los ratones que carecen de TRPM8, sin embargo, no pierden toda la sensación de frío, especialmente a temperaturas mucho más bajas, por lo que todavía se están caracterizando sensores de frío adicionales [95]. Es pertinente mencionar que el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del 2021 fue otorgado al investigador David Julius, por su descubrimiento de los receptores TRP.

Activación específica de nociceptores por estímulo mecánico

Similar a la nocicepción por calor y frío, la nocicepción mecánica está mediada por las terminaciones nerviosas libres de las fibras A δ y C. Por su parte, la mecanosensibilidad inocua está controlada por fibras A β de gran diámetro que terminan en los corpúsculos de Pacini, las células de Merkel y los folículos pilosos. Los receptores moleculares que responden a los estímulos mecánicos nocivos se han identificado recientemente como PIEZO1 y PIEZO2 [3]. Nuevamente, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del 2021 fue otorgado a un segundo investigador, el Dr. Ardem Patapoutian, por su descubrimiento de los receptores PIEZO.

Activación específica de nociceptores por estímulo químico

Los estímulos químicos abarcan una variedad de moléculas, que incluyen alimentos (chiles, wasabi), toxinas ambientales (humo, formalina) y, lo que es más importante, daño tisular. Los canales TRP, especialmente TRPA1, detectan un amplio rango de estos estímulos químicos [135]. En el sitio de daño o inflamación tisular, también se produce la liberación de prostaglandinas, bradisininas, neuropéptidos y varios neurotransmisores, los cuales, actuando sobre una variedad de receptores asociados, median fenómenos de hiperalgesia y la alodinia, que se experimentan en los sitios del tejido dañado o inflamación [170]. La nocicepción química no solo sirve como una alarma para dañar al agente infeccioso o a las sustancias inflamatorias, sino que también juega un papel activo en la propia respuesta inmune [247].

2.2 Vías centrales del dolor

2.2.1 Médula espinal

La médula espinal se ubica en el interior del conducto vertebral formado por la columna vertebral, extendiéndose desde la primera vértebra cervical hasta la primera vértebra lumbar. En cortes transversales de la médula espinal se observan dos áreas bien definidas: la sustancia blanca, de localización periférica, y rodeando a la sustancia gris, de localización central. La sustancia blanca está formada principalmente por fibras nerviosas que comunican los segmentos medulares entre sí y a la médula con el encéfalo o con estructuras localizadas fuera del SNC. Por su parte, la sustancia gris está formada por los somas de las neuronas de proyección (sus axones se proyectan hacia diferentes partes del SNC o, como es el caso de las motoneuronas, emergen de la médula espinal para recorrer los nervios periféricos del SNP), las interneuronas (sus axones permanecen en la médula espinal y participan de complejas redes interneuronales), la neuroglia y por las terminales nerviosas provenientes de neuronas supraespinales (tractos piramidales y extrapiramidales) y de neuronas de los DRG [73]. En cada mitad medular, la sustancia gris, presenta tres expansiones o astas: dorsal (de función sensitiva), ventral (de función motora) y lateral (origen del sistema nervioso autónomo). Las astas dorsales y ventrales se proyectan hacia el borde anterior y posterior, respectivamente, de cada hemimédula desde donde se originan las raíces dorsales y ventrales de los nervios raquídeos. Las astas laterales son especialmente evidentes en los segmentos torácicos de la médula. Asimismo, en cada hemimédula se observan tres cordones, dorsal (entre ambas astas dorsales), lateral (entre el asta dorsal y ventral unilateral) y anterior (entre ambas astas ventrales).

La sustancia gris se divide anatómicamente en 10 capas o láminas (láminas de Rexed), las láminas I a VI están en el asta dorsal, las láminas VII a IX en el asta ventral y la X (también denominada área X) rodea al canal central, cada una de las cuales recibe tipos específicos de fibras aferentes nerviosas. La mayoría de las fibras C y A δ nociceptivas (estimulación nociva) terminan superficialmente en las láminas I-II, con un menor número que alcanza láminas más profundas, mientras que las fibras A β (estimulación inocua) inervan predominantemente las láminas III -VI [81] **(Figura I1)**.

Las neuronas de proyección presentes en el asta dorsal de la médula espinal, también llamadas de segundo orden, reciben contacto sináptico de las terminales aferentes primarias, y responden a diferentes tipos de información sensitiva [314]. En las láminas más superficiales de la médula espinal es dónde se encuentra una concentración particularmente densa de neuronas nociceptivas, llamadas también de segundo orden, y que reciben numerosos contactos sinápticos de fibras A δ y C. Estas neuronas se activan ante la ocurrencia de un estímulo doloroso detectado en la periferia. Por el contrario, las neuronas espinales que reciben información exclusivamente de las fibras A β , ubicadas normalmente en láminas más profundas del asta dorsal, son propioceptivas y solo responden al tacto suave. Un tercer tipo de neurona, denominado de rango dinámico amplio (WDR, por sus siglas en inglés), recibe información de los tres tipos de fibras sensoriales, y por lo tanto responden a la gama completa de estimulación, desde un tacto suave a pellizcos, calor y sustancias químicas nocivas.

A las neuronas de proyección nociceptivas, se suma un número muy grande de interneuronas, las cuales representan el 99% de todas las neuronas del asta dorsal espinal y desempeñan un papel fundamental en la modulación de la información sensitiva para, en última instancia, afectar la percepción del dolor. Las interneuronas se pueden dividir en dos clases funcionales: interneuronas inhibitorias e interneuronas excitatorias [284].

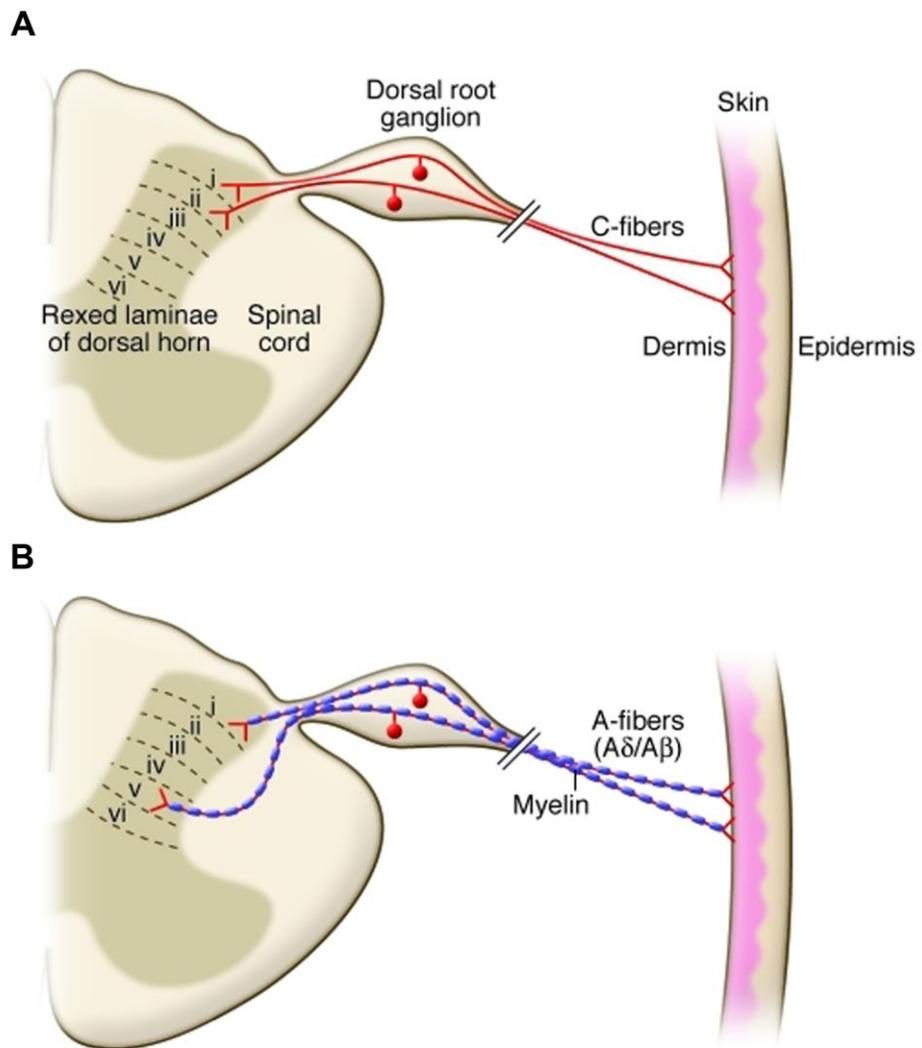
Las interneuronas inhibitorias utilizan el ácido γ -aminobutírico o ácido gamma-aminobutírico (GABA) y/o glicina como su principal neurotransmisor [199,285]. Sin embargo, estudios de doble marcación han identificado subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas que expresan el neuropéptido tirosina (NPY), galanina (GAL), parvalbúmina (PV) o la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn, por sus siglas en inglés) [239,253]. En el asta dorsal profunda (láminas III-VI), las interneuronas inhibitorias están involucradas en la supresión del dolor agudo y patológico. Entre estas células, las que expresan parvalbúmina parecen ser particularmente importantes para prevenir la alodinia mecánica [131]. Por el contrario, las interneuronas inhibitorias

que expresan dinorfinas (y que están restringidas a las láminas superficiales) pueden suprimir el dolor mecánico, pero no térmico [284].

Finalmente, las interneuronas excitatorias son un grupo heterogéneo de neuronas que pueden expresar glutamato, somatostatina, neurotensina, péptido liberador de gastrina (GRP, por sus siglas en inglés), neuroquinina B (NKB), sustancia P o colecistoquinina [305]. Su activación o pérdida de inhibición contribuye tanto al desarrollo de dolor agudo como crónico.

Figura I1. Organización laminar del asta dorsal de la médula espinal y el ingreso de las aferencias primarias. Las neuronas somatosensoriales se ubican en los ganglios periféricos ubicados a lo largo de la columna vertebral. Las neuronas aferentes se proyectan centralmente hacia el asta dorsal de la médula espinal y de manera periférica hacia la piel y otros órganos. **(A)** La mayoría de los nociceptores son amielínicos y presentan axones de pequeño diámetro (fibras C, rojo). Su aferente periférico inerva la piel (dermis y/o epidermis; aunque también otros tejidos y órganos (no mostrado)) y el proceso central se proyecta a las láminas superficiales I y II del asta dorsal. **(B)** Los nociceptores de fibra A están mielinizados y se proyectan a las láminas superficiales I y V (Tomado de [81]).

Figure I1. Laminar organisation of the dorsal horn and primary afferent inputs. Somatosensory neurons are located in peripheral ganglia located alongside the spinal column. Afferent neurons project centrally to the dorsal horn of the spinal cord and peripherally to the skin and other organs. **(A)** Most nociceptors are unmyelinated with small diameter axons (C-fibers, red). Their peripheral afferent innervates the skin (dermis and/or epidermis; but also other tissues and organs (not shown)) and central process projects to superficial laminae I and II of the dorsal horn. **(B)** A-fiber nociceptors are myelinated and project to superficial laminae I and V (Taken from [81]).



2.2.2 Vías espinales ascendentes

Las vías espinales que transmiten la información sensitiva (aférente) a través de la médula espinal hacia el cerebro se denominan vías ascendentes, y son producidas por las neuronas secundarias caracterizadas en la sección anterior. Así, una gran proporción de las neuronas de proyección de la médula espinal envía sus axones a centros supraespinales, bulbares y talámicos: el complejo medular reticular, el complejo reticular mesencefálico, la sustancia gris periacueductal (PAG, por sus siglas en inglés) y el núcleo ventral posterior lateral del tálamo [58,319]. La mayor parte de la información se transmite por vías cruzadas ascendentes situadas en la región anterolateral de la médula espinal, aunque también existen fibras que ascienden homolateralmente.

Los fascículos ascendentes mejor descritos anatómicamente en la vía de dolor son (**Figura I2**):

- Espinotalámico
- Espinoreticular
- Espinomesencefálico

Tracto espinotalámico

El tracto espinotalámico está ubicado en la sustancia blanca de la médula espinal y asciende hacia el tálamo. Este tracto consta de dos partes: los tractos espinotalámico lateral y espinotalámico anterior. El tracto espinotalámico lateral transmite principalmente sensaciones de dolor y temperatura hacia el tálamo, mientras que el tracto espinotalámico anterior transmite información relacionada con el tacto crudo y la sensación de presión firme, aunque tiene una función en dolor según la intensidad del estímulo [6,325].

Tracto espinoreticular

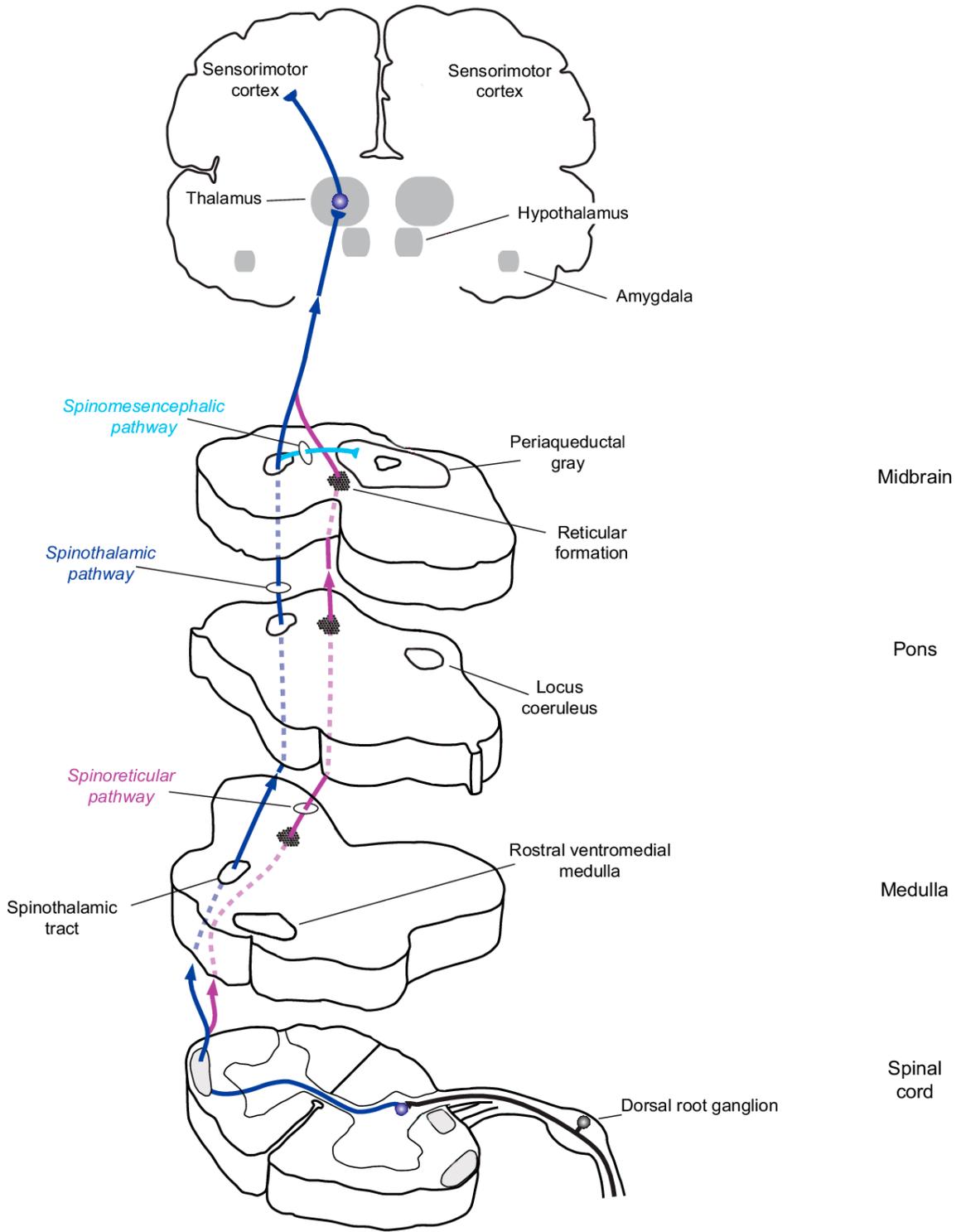
Las fibras del tracto espinoreticular viajan entremezcladas con las fibras del tracto espinotalámico lateral, en la médula espinal y el tronco del encéfalo. En contraposición a las fibras espinotalámicas laterales, las del tracto espinoreticular no alcanzan el tálamo, sino que se desprenden hacia el tronco del encéfalo para hacer sinapsis con núcleos asociados a dolor en esa región. Estas conexiones hacen que la vía espinoreticular esté relacionada al control de la modulación descendente y al componente afectivo-motivacional del dolor, que condicionan la percepción y las respuestas motoras y neurovegetativas al dolor [39].

Tracto espinomesencefálico

El tracto espinomesencefálico asciende desde la médula espinal junto con el tracto espinotalámico lateral y el tracto espinoreticular para hacer sinapsis en la PAG. Las neuronas que participan en este tracto son de carácter nociceptivo y están asociadas al componente afectivo-motivacional del dolor [329].

Figura I3. Vías espinales ascendentes. El tracto espinotalámico (azul) es un tracto sensorial que transmite la información desde la periferia hasta el tálamo. Se compone de dos vías adyacentes: anterior y lateral. El tracto espinotalámico lateral transporta información sobre el dolor y la temperatura, mientras que el tracto espinotalámico anterior transporta información sensorial sobre el tacto crudo. Las neuronas del tracto espinoreticular (violeta) también se localizan en el asta dorsal y la sustancia gris intermedia. Un grupo de estos axones termina en la formación reticular medular y otro asciende a la formación reticular pontina. El tracto espinomesencefálico (celeste) asciende desde la médula espinal al mesencéfalo donde termina en la sustancia gris periacueductal. Esta vía tiene un rol importante en el control e inhibición del dolor (Modificado de [137]).

Figure I3. Ascending spinal pathways. The spinothalamic tract (blue) is a sensory tract that transmits information from the periphery to the thalamus. It composed of two adjacent pathways: anterior and lateral. The lateral spinothalamic tract carries information about pain and temperature, while the anterior spinothalamic tract carries sensory input about crude touch. The neurons of the spinoreticular tract (violet) are also located in the dorsal horn and intermediate gray matter. One group of these axons terminates in the medullary reticular formation and another ascends to the pontine reticular formation. The spinomesencephalic tract (light-blue) ascends to the midbrain where they terminate in periaqueductal gray, a region surrounding the cerebral aqueduct. This pathway plays an important role in the control and inhibition of pain (Modified from [137]).



2.2.3 Tronco encefálico

El tronco encefálico es un área crítica para la nocicepción y el procesamiento del dolor, así como para transmitir y coordinar la señalización entre el cerebro, el cerebelo y la médula espinal [198]. Se compone de 3 subregiones distintas: el bulbo raquídeo (o médula *oblongata*), la protuberancia y el mesencéfalo. Se sabe que múltiples núcleos de la formación reticular del tronco encefálico están involucrados en el procesamiento del dolor, e incluyen al núcleo rostral ventromedial bulbar (RVM, compuesto principalmente por el núcleo *reticularis gigantocellularis* (NGc) y núcleo rafe magnus), al núcleo ventrolateral bulbar (VLM) y al núcleo dorsal reticular (DRt) en el bulbo raquídeo; los núcleos del rafe dorsal y núcleos del rafe mediano, el núcleo parabraquial y el locus coeruleus (LC) en la protuberancia; la PAG y núcleo cuneiforme (NCF) en el mesencéfalo. Cabe mencionar que, a diferencia del resto del cuerpo, el ingreso de información nociceptiva de la cara y las vísceras ingresa al tronco del encéfalo y termina en los núcleos espinal del trigémino (SpV, por sus siglas en inglés) y del tracto solitario (NTS). Estos núcleos sensitivos también juegan un papel importante tanto en la nocicepción como en el procesamiento del dolor agudo y crónico [215].

Entre los núcleos mencionados, la PAG y el RVM son dos núcleos claves involucrados en redes de integración que involucran estructuras espinales y supraespinales, las cuales conducen a su vez a la integración de respuestas conductuales más complejas frente a estímulos nocivos. Ambos núcleos son particularmente importantes en lo que se conoce como mecanismos de control descendente del dolor, pudiendo ejercer funciones tanto facilitadoras como inhibitorias del mismo. Así, la activación de ciertas áreas de la PAG puede producir una potente analgesia, mediante la modulación de la entrada de información nociceptiva en el asta dorsal y en el SpV. Esto se logra a través de contactos sinápticos con el RVM, que a su vez proyecta hacia el asta dorsal espinal, modulando la interacción entre las terminales centrales de las neuronas aferentes primarias y las neuronas de proyección espinal (algo similar ocurre con los sistemas sensitivos trigeminales). Sin embargo, la interacción de la PAG y ciertas áreas del RVM también pueden conducir a efectos facilitadores de la actividad de neuronas nociceptivas espinales y troncoencefálicas, siendo esto base de algunas condiciones de dolor crónico, que se manifiestan por un aumento de la respuesta PAG-RVM durante los estímulos nocivos evocados [204].

Además del bien descrito sistema modulador del dolor PAG-RVM, otros núcleos del tronco encefálico se han visto implicados en la regulación de la entrada nociceptiva: el DRt y la VLM caudal. El DRt es fundamental para la modulación

condicionada del dolor, una respuesta analgésica mediante la cual la respuesta del SNC a un estímulo nocivo se inhibe mediante la aplicación de un segundo estímulo nocivo, a través de la inhibición de las entradas nociceptivas dentro de las astas dorsales espinales y el SpV a nivel troncoencefálico. Además, el VLM caudal está claramente involucrado en el control descendente de los reflejos nociceptivos, así como también en la regulación de la presión arterial [94,181].

Actualmente, se continúa ahondando nuestro conocimiento sobre el rol de estos núcleos troncoencefálicos en el inicio y/o mantenimiento de diversas condiciones de dolor crónico en humanos.

2.2.4 Tálamo y otras estructuras sub-corticales y corticales

El tálamo, ubicado por encima del mesencéfalo en una región denominada diencefalo, es una estructura clave en la funcionalidad del cerebro. Se encuentra dividido en un número importante de núcleos, los cuales reciben proyecciones de múltiples orígenes y con varias y distintas connotaciones funcionales. Entre ellas, las vías ascendentes nociceptivas son un componente relevante; sin embargo, el tálamo no es simplemente un centro de retransmisión, sino que participa en el procesamiento de la información nociceptiva antes de ser reenviada a varias regiones de la corteza cerebral. Además, el tálamo es parte de una red que en última instancia también se proyecta hacia el asta dorsal de la médula espinal y modula la información nociceptiva ascendente [331].

Las vías nociceptivas ya mencionadas terminan en subdivisiones discretas de núcleos talámicos conocidos como núcleo ventral posterior lateral y núcleo ventral posterior medial [103]. Desde estos núcleos, la información nociceptiva se transmite a varias regiones corticales y subcorticales, incluidas la amígdala, el hipotálamo, la PAG, los ganglios basales y regiones corticales clave como la corteza de la ínsula y la corteza cingulada anterior [286].

Actualmente, se entiende a las vías del dolor como un sistema dual, donde la sensación de dolor que llega al sistema nervioso central está compuesta por el componente sensitivo discriminativo del dolor (primer dolor), y el componente afectivo-motivacional del dolor (segundo dolor). En ambos componentes, están involucrados los núcleos talámicos [1]. La vía espinotalámica antes mencionada, relacionada con las cualidades sensitivo-discriminativas del estímulo, se origina principalmente en las neuronas de la lámina I en el asta dorsal, las cuales se proyectan ampliamente al complejo ventrobasal (ventral posterior lateral y ventral posterior medial) y a los núcleos talámicos del grupo posterior. Las neuronas nociceptivas del complejo

ventrobasal se proyectan principalmente a la corteza somatosensorial primaria y esta vía constituye el sistema de dolor lateral que juega un papel importante en la discriminación de estímulos. La segunda vía (afectivo-motivacional), que es más extensa, se deriva principalmente de las neuronas de la lámina I del asta dorsal que expresan el receptor NK1 de la sustancia P y termina en el área parabraquial y gris periacueductal. Estas áreas, a su vez, se proyectan sobre los núcleos talámicos intralaminares y la cara posterior de los núcleos talámicos ventromediales, que se asocian con la corteza somatosensorial y las estructuras límbicas (corteza del cíngulo, corteza insular, corteza somatosensorial secundaria, amígdala), constituyendo la vía medial del dolor [11]. En particular, la ínsula y la corteza cingulada anterior aumentan su actividad frente a la activación de los nociceptores, asociándose esta respuesta a la experiencia subjetiva del dolor. A su vez, estas estructuras integradas talamocorticales y corticolímbicas, que en conjunto han sido denominada "neuromatriz" del dolor, procesan impulsos neuronales de entrada y salida somatosensoriales que influyen en la nocicepción y la percepción del dolor [196] (en particular por modulación de las estructuras troncoencefálicas encargadas del control descendente del dolor).

En última instancia, la integración de los componentes sensitivo-discriminativo, afectivo-motivacional y un tercero denominado cognitivo-evaluativo contribuyen a la emergencia de la sensación de dolor en el individuo, y sus respuestas conductuales al mismo. Los aspectos sensitivo-discriminativos incluyen el procesamiento de la ubicación y la intensidad del estímulo doloroso, mientras que el componente afectivo-emocional del dolor comprende el carácter desagradable de la percepción del dolor. El componente cognitivo-evaluativo está involucrado en la atención, anticipación y memoria de experiencias pasadas y este componente puede interactuar con los otros dos, dando lugar a la modulación del dolor antes caracterizada [70].

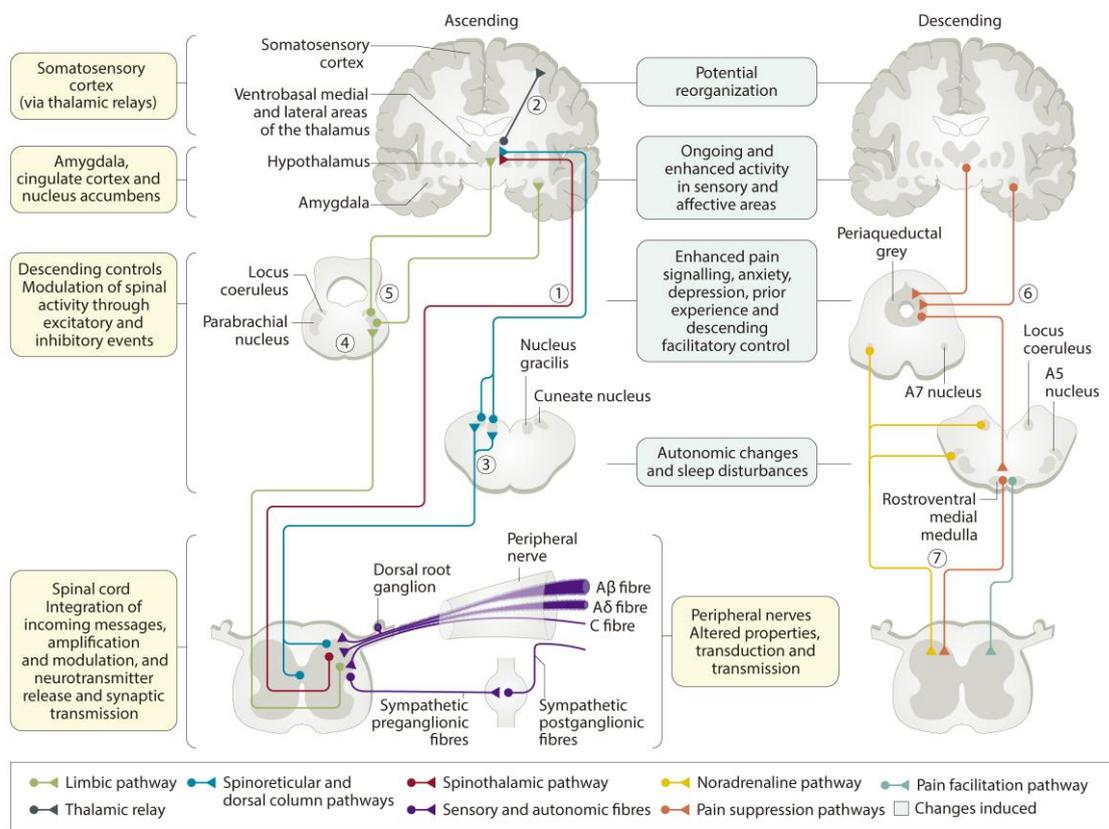
En resumen, y tomando en cuenta las diferentes estructuras mencionadas hasta aquí, la sensación de dolor está asociada con la activación de los receptores en las terminales periféricas de las neuronas aferentes primarias, en particular, de aquellas productoras de fibras C no mielinizadas y fibras A δ levemente mielinizadas [90]. Ambos nociceptores permanecen silenciosos durante la homeostasis en ausencia de dolor y se activan cuando hay un potencial de estímulo nocivo. Las proyecciones centrales de las neuronas aferentes primarias (neuronas de primer orden) ingresan al asta dorsal de la médula espinal, donde al mismo nivel, o luego de ascender 1 o 2 niveles mediante una vía especializada llamada tracto de Lissauer, hacen sinapsis con neuronas espinales nociceptivas de proyección (neuronas de segundo orden). Las fibras C hacen sinapsis principalmente en las láminas I y II, mientras que las fibras A δ hacen sinapsis en las láminas I y V. Asimismo, en la lámina II, las terminales aferentes

primarias establecen contacto sináptico con interneuronas excitatorias o inhibitorias que a su vez retransmiten la información a neuronas de proyección de segundo orden presentes en las láminas IV, V y VI, las cuales también reciben inervación directa de las neuronas de primer orden [93]. Las proyecciones axonales de las neuronas de segundo orden, una vez procesados todos los tipos de información nociceptiva recibida, se organizan en los tractos espinotalámicos anterior y lateral, cruzan hacia el lado anterolateral de la médula espinal y ascienden por la misma, pasando por el tronco del encéfalo (haciendo sinapsis en varios núcleos locales mediante colaterales) y continuando su ascenso para hacer sinapsis con neuronas del tálamo (neuronas de tercer orden), cuyos axones se proyectan hacia un número de regiones de la corteza cerebral, proporcionando así información sobre la intensidad, ubicación y modalidad del estímulo nocivo, confiriéndole además carácter cognitivo y emocional que completa la experiencia dolorosa (**Figura I3**).

Figura I3. Esquema de las principales estructuras neurales relevantes para el dolor.

La secuencia de eventos que lleva a la percepción del dolor comienza con la transducción, en la que un estímulo nocivo activa las neuronas aferentes primarias. La información es transmitida por las fibras A β , A δ y C al asta dorsal de la médula espinal. En las vías aferentes ascendentes, los componentes sensoriales del dolor se dirigen a través de la vía espinotalámica a las áreas ventrobasal medial y lateral (1), que luego se proyectan a la corteza somatosensorial, lo que permite percibir la ubicación y la intensidad del dolor (2). La médula espinal también tiene proyecciones espinoreticulares y de la columna dorsal hacia el núcleo cuneiforme y el núcleo grácil (3). Otras proyecciones límbicas retransmiten en el núcleo parabraquial (4) antes de contactar con el hipotálamo y la amígdala, donde se alteran la función autonómica central, el miedo y la ansiedad (5). Las vías eferentes descendentes de la amígdala y el hipotálamo (6) se proyectan sobre la sustancia gris periacueductal, el locus coeruleus, los núcleos A5 y A7 y la médula medial rostroventral. Estas áreas del tronco encefálico luego se proyectan hacia la médula espinal (7) (Tomada de [64]).

Figure I3. Outline of the major neural structures relevant to pain. The sequence of events that leads to pain perception begins with transduction, in which a noxious stimulus activates primary afferent neurons. Information is transmitted by A β , A δ , and C fibers to the dorsal horn of the spinal cord. The spinal cord also has spinoreticular projections and the dorsal column pathway to the cuneate nucleus and nucleus gracilis (3). Other limbic projections relay in the parabrachial nucleus (4) before contacting the hypothalamus and amygdala, where central autonomic function, fear and anxiety are altered (5). Descending efferent pathways from the amygdala and hypothalamus (6) drive the periaqueductal grey, the locus coeruleus, A5 and A7 nuclei and the rostroventral medial medulla. These brainstem areas then project to the spinal cord (7) (Taken from [64]).



3 TRÍADA DEL DOLOR NEUROPÁTICO: NEURONA-SISTEMA INMUNE-GLÍA

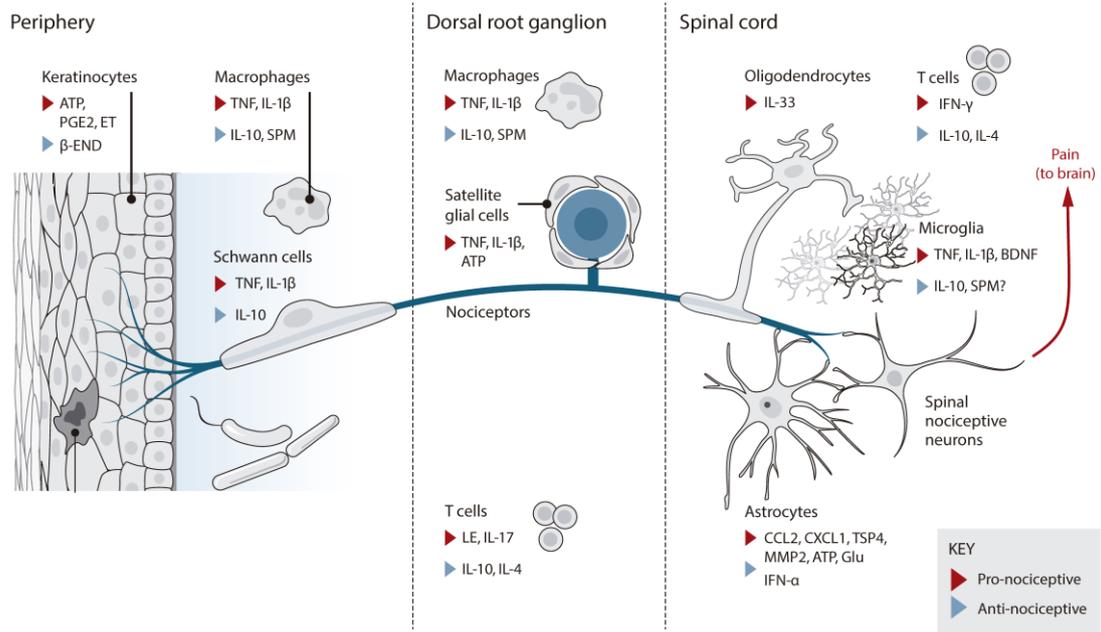
La lesión del SNC y -P, conduce a una respuesta de fase aguda, que se caracteriza por la presencia de dolor, inflamación y restricción del funcionamiento normal. Por lo general, después de esta fase aguda, hay un período de recuperación, con disminución de la inflamación, reducción del dolor, curación de la lesión y retorno a la función normal. Sin embargo, en alrededor del 7% al 18% de la población general el dolor persiste a pesar de la cicatrización de la lesión, lo que resulta en un estado de dolor neuropático crónico [38].

En la última década ha habido una gran cantidad de estudios que han proporcionado evidencia convincente de que la patogenia del dolor neuropático no se limita solamente a los cambios en la actividad de los sistemas neuronales, sino que implica complejas interacciones entre las neuronas, el sistema inmune, la glía periférica (células de Schwann en los nervios periféricos y células gliales satélite en los DRG) y central (oligodendrocitos, microglía y astrocitos), así como las citoquinas y las quimioquinas inflamatorias, derivadas principalmente de las células inmunitarias y gliales [127,144,145] (**Figura I4**).

Así, la lesión de un nervio periférico provoca una reacción del sistema inmunológico (por ejemplo, la infiltración de células inflamatorias, activación de células inmunitarias residentes), no sólo en el nervio lesionado, sino también en los DRG, en la médula espinal y en varios sitios supraespinales asociados con la transmisión del dolor. Más aún, un factor importante en la duración del dolor después de una lesión nerviosa es el equilibrio entre el sistema inmunitario pro-inflamatorio y los mecanismos anti-inflamatorios. Lo que es interesante en un escenario como este es que poder inclinar la balanza en favor de los procesos anti-inflamatorios y potencialmente neuroprotectores podría proporcionar una nueva oportunidad terapéutica para interrumpir el desarrollo de dolor neuropático crónico.

Figura I4. Interacción entre las distintas partes de un nociceptor con diferentes tipos de células no neuronales. Los queratinocitos, las células de Schwann, las células gliales satelitales, los oligodendrocitos y los astrocitos, así como las células inmunitarias (macrófagos y células T) y la microglía, producen mediadores pro-nociceptivos y anti-nociceptivos, que pueden unirse a sus respectivos receptores expresados por el nociceptor, modulando su sensibilidad y excitabilidad. La terminal central del nociceptor forma una sinapsis nociceptiva con una neurona post-sináptica en el asta dorsal de la médula espinal para mediar la transmisión del dolor en el SNC (Modificada de [145]).

Figure I4. Interactions between distinct parts of a nociceptor with different types of non-neurons cells. The keratinocytes, Schwann cells, satellite glial cells, oligodendrocytes, and astrocytes, as well as immune cells (macrophages and T cells) and microglia, produce both pro-nociceptive and anti-nociceptive mediators, which can bind their respective receptors on the nociceptor to modulate its sensitivity and excitability. The central terminal of the nociceptor forms a nociceptive synapse with a postsynaptic neuron in the spinal cord dorsal horn to mediate pain transmission in the CNS (Modified from [145]).



3.1 Sistema inmune

El sistema inmune es una red compleja de células y procesos biológicos que protegen al organismo de las enfermedades. Detecta y responde a una amplia variedad de patógenos, desde virus hasta parásitos, así como a células cancerosas y lesiones tisulares. Hay dos subsistemas dentro del sistema inmune, conocidos como sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. Ambos subsistemas están estrechamente relacionados y funcionan juntos cuando un agente patógeno o una sustancia dañina desencadenan una respuesta inmunitaria [219].

3.1.1 Inmunidad innata

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del huésped contra los gérmenes y objetos extraños que ingresan al organismo. Posee mecanismos pre-existentes que se activan de manera rápida y que preceden a la inmunidad adaptativa en la respuesta defensiva. Sin embargo, esta respuesta es de especificidad limitada, es decir, responde de la misma manera a todos los patógenos, sin hacer distinción entre ellos [7].

Las superficies epiteliales y su estado íntegro en conjunto forman una barrera física que protege al organismo. Los epitelios además de constituir una capa protectora, poseen otras características inmunológicamente importantes, tales como la síntesis de péptidos antibióticos (defensinas) y la presencia de subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales y células dendríticas.

La activación del sistema inmune innato desencadena inflamación [287]. Este es un complejo proceso en el cual existe un aumento de la permeabilidad capilar y migración de las células del sistema inmune (leucocitos) desde la sangre hacia la zona afectada. Esto se logra a través de cambios estructurales en los capilares sanguíneos y liberación de citoquinas y quimioquinas, que permiten el reclutamiento de los leucocitos desde la sangre al tejido. Durante la primera fase de la inflamación, son los neutrófilos los que actúan y luego acuden los macrófagos. Los neutrófilos y macrófagos son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (también conocidos como PAMPs, por sus siglas en inglés) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), que se expresan en sus superficies celulares, y que también pueden reconocer patrones asociados a peligro (DAMPs; por lo general, componentes intracelulares que se liberan o se expresan tras el daño tisular) [28]. Una vez reconocido el patógeno, los neutrófilos y macrófagos se activan, desencadenándose cascadas de señalización intracelular, cuya respuesta final es la migración de las células al sitio de la infección y la fagocitosis. Finalmente,

las células dendríticas, los mastocitos, los basófilos, los eosinófilos, las células NK (natural killer) y las células linfoides de respuesta innata son reclutados en el sitio de infección o lesión.

El fin de la inflamación es localizar a la infección a un solo sitio, impidiendo que esta se propague y afecte a otros tejidos. Durante la inflamación se liberan muchas otras citoquinas que estimulan a la inmunidad adaptativa, para poder finalmente erradicar al patógeno, debido a que, en ausencia de este mecanismo de defensa, la inmunidad innata no puede controlar completamente la infección.

Receptores de tipo Toll

Los receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) son una familia de PRR expresados en diversas células del sistema inmune innato y en células gliales.

Luego de una lesión de nervios periféricos, los TLR son activados por los axones lesionados y componentes de la matriz extracelular. Específicamente, los TLR2, TLR3 y TLR4 participan del proceso de degeneración Walleriana y la regeneración nerviosa, mediada por células de Schwann y macrófagos [282].

En ratones knock-out de TLR2 (- / -) y TLR4 (- / -), se observó una reducción en la expresión de IL-1 β y de la proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1), provocando una reducción en el reclutamiento de macrófagos al muñón distal del nervio ciático afectado por crush. Estos ratones deficientes en TLR presentaban además un deterioro en el proceso de degeneración y regeneración, así como también se veía comprometida la función locomotora. Por el contrario, los animales que recibieron una única inyección de ligandos TLR2 y TLR4 en el sitio de la lesión, tuvieron una eliminación más rápida de la mielina degenerada y una recuperación motora acelerada [34].

En ratones con compresión crónica del nervio ciático, la administración repetida de un potente antagonista de TLR4, FP-1, resultó en el alivio de la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica [26]. En línea con estos resultados, se demostró que en ratones lesionados con el modelo de SNL, tanto TLR2 como TLR3 median la activación glial en la médula espinal generando neuroinflamación espinal, además de inducir hipersensibilidad al dolor [234].

Neutrófilos

Aunque no se encuentran en nervios sanos, los neutrófilos (o leucocitos polimorfonucleares) migran rápidamente hacia el sitio de lesión, alcanzando su punto máximo de infiltración a las 24 h de la lesión y participando en las primeras etapas del proceso inflamatorio. El reclutamiento de neutrófilos es mediado por la liberación de

quimioattractantes, como el factor de crecimiento nervioso- β (NGF- β , por sus siglas en inglés), CXCL1, la proteína quimiotáctica de monocitos1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) y el leucotrieno-B4. A pesar del número decreciente de neutrófilos después de su pico inicial, el proceso inflamatorio es perpetuado por la liberación de mediadores quimiotácticos para macrófagos, incluidas la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α y 1 β (MIP-1 α y MIP-1 β), IL-1 β y defensinas [220].

Los neutrófilos contribuyen a la respuesta inflamatoria temprana mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno como el superóxido, y citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IL-6, capaces de generar toxicidad celular y excitación neuronal. Así, por ejemplo, en ratas con lesión neuropática, se observó que la infiltración de neutrófilos en el sitio de lesión genera hiperalgesia, debido al aumento exacerbado de producción de superóxido [232].

La evidencia sugiere que interferir en la migración e infiltración de neutrófilos en el sitio de lesión, al menos en las etapas iniciales, podría disminuir el dolor y la inflamación en curso. Sin embargo, a pesar de los prometedores hallazgos pre-clínicos, no ha habido intentos clínicos de bloquear la respuesta de los neutrófilos en dolor neuropático, posiblemente debido a una falta de agentes farmacológicos específicos.

Macrófagos

Los macrófagos son leucocitos fagocíticos que se generan a partir de la diferenciación de los monocitos. Es común encontrar un número de macrófagos denominados residentes en la mayoría de los tejidos, en donde generalmente fagocitan patógenos. En el contexto de lesiones nerviosas periféricas juegan un papel central en la degeneración Walleriana, fagocitando células de Schwann muertas o lesionadas y axones seccionados [55].

Luego de una lesión nerviosa, los macrófagos residentes (que por sí mismos no proliferan significativamente), son asistidos en la eliminación de desechos celulares por una gran afluencia de macrófagos derivados de la sangre. El proceso de invasión, que es considerado esencial para la regeneración de los nervios periféricos, comienza lentamente, por lo general alrededor de las 24 h (ya que probablemente depende de quimioquinas derivadas de neutrófilos), continuando hasta 3 días, y extendiéndose a zonas más alejadas del sitio de la lesión. Además, los macrófagos también están implicados en el comportamiento relacionado con el dolor. De hecho, los macrófagos secretan muchas citoquinas que median mecanismos de hiperalgesia, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como también especies reactivas del oxígeno y prostaglandinas [333].

La falta de estrategias clínicas para bloquear la infiltración de nervios lesionados con macrófagos, podría deberse a la falta de fármacos específicos que puedan bloquear selectivamente su acción pro-inflamatoria y algésica, dejando su función fagocítica intacta.

Mastocitos

Los mastocitos generalmente se consideran células efectoras críticas en trastornos alérgicos, sin embargo, también son importantes efectores de la inmunidad innata. Los mastocitos residen en muchos tejidos, incluidos los nervios, donde luego de una lesión, podrían activarse a través del daño mecánico o por el aumento de los niveles de adenosina o bradicinina en el sitio de daño. Como células inmunes residentes en los nervios periféricos, los mastocitos tienen un rol clave en las etapas iniciales de la inflamación y el establecimiento del dolor por hipersensibilidad que acompaña a la lesión del nervio periférico [118].

Al activarse, los mastocitos se degranulan, liberando mediadores como histamina, serotonina, proteasas, prostaglandinas y citoquinas. Alguno de estos mediadores, como la histamina, el TNF- α y la serotonina, promoverían la hiperalgesia por activación directa de los nociceptores [268].

3.1.2 Inmunidad adaptativa

El sistema inmune adaptivo es específico para distintas moléculas y se caracteriza por mejorar la capacidad defensiva frente exposiciones sucesivas. Posee dos tipos de respuestas: inmunidad humoral e inmunidad celular [8].

La inmunidad celular es mediada por linfocitos T, los cuales se dividen en dos subpoblaciones principales: linfocitos T CD4⁺ cuya principal función es la secreción de citoquinas y los linfocitos T CD8⁺ que eliminan células infectadas y tumorales. La subpoblación de linfocitos T CD4⁺ antígeno específico secretan citoquinas que activan a los macrófagos para eliminar los microorganismos fagocitados e inducen al linfocito B a diferenciarse y secretar anticuerpos que se unen a los antígenos. Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ efectores antígenos específicos (también activados por las citoquinas secretadas por el linfocito T CD4⁺) destruyen células infectadas o tumorales que expresan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I) [35].

La inmunidad humoral es mediada por anticuerpos o inmunoglobulinas que son secretados por los linfocitos B, constituyendo el principal mecanismo de defensa frente a infecciones bacterianas. Las inmunoglobulinas reconocen y neutralizan los

microorganismos, activando posteriormente diferentes mecanismos efectores para su eliminación (activación del complemento, opsonización) [50].

Linfocitos T

Los linfocitos T son un grupo muy heterogéneo de células, subdivididos en células T auxiliares (Th), T reguladoras (Treg) y T citotóxicas (Tc), siendo en su conjunto, uno de los principales componentes de la inmunidad adaptativa [35].

A partir de los 3 días de ocurrida la lesión de un nervio periférico, los linfocitos T infiltran el sitio dañado, alcanzando su punto máximo en el día 21, y disminuyendo a partir de entonces [99]. El rol de los linfocitos T en dolor neuropático comenzó a estudiarse en ratas atímicas (que carecen de células T funcionales), lesionadas con el modelo de constricción crónica del nervio ciático (CCI, por sus siglas en inglés) [202]. Se observó que estos animales desarrollan significativamente menos alodinia mecánica e hiperalgesia térmica después de la lesión, en comparación con ratas con timo. Desde entonces, estos datos han sido confirmados en diferentes modelos de lesión neuropática periférica, donde además se observó infiltración de linfocitos T en los DRG y en la médula espinal [43,69]. La infiltración espinal de células T alcanza su punto máximo después de 7 días, potencialmente un momento clave en el desarrollo de la cronicidad del dolor, con células T que interactúan con la glía activada para exacerbar la inflamación y sensibilizar a las neuronas [43].

Las funciones de las subpoblaciones de células Th1, Th2 y Th17 se basan en sus perfiles distintivos de citoquinas [35]. Las células Th1 producen predominantemente citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- γ y TNF- α , que median la inmunidad celular, mientras que las células Th2 secretan citoquinas anti-inflamatorias, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que median la inmunidad humoral. En ratas recién nacidas (21 días de vida) lesionadas con el modelo de SNI, se observó que la falta de infiltración espinal de células T se asocia con ausencia de hiperalgesia térmica, que por el contrario sí se observa en ratas adultas.

En resumen, estos hallazgos indican que las células T tienen un rol importante en el desarrollo del dolor neuropático en varios niveles del sistema nervioso, particularmente en el establecimiento de la cronicidad del dolor (días 3-21).

3.2 Células gliales

Las células gliales rodean a las neuronas y sus terminales axonales, a las cuales le proporcionan sostén físico y nutrientes. Según su ubicación dentro del sistema nervioso, las células gliales se clasifican en dos grandes grupos: glía central en el SNC

(astrocitos, oligodendrocitos, microglía, células endoteliales y glía interlaminar de la corteza cerebral) y glía periférica en el SNP (células de Schwann y SGC) [241].

Células de Schwann

Las células de Schwann son las células gliales de los nervios periféricos que, en condiciones fisiológicas, proporcionan apoyo trófico y una vaina de mielina a los axones mielinizados. Sin embargo, en los nervios lesionados, las células de Schwann experimentan un cambio fenotípico, proliferan y segregan numerosos mediadores que contribuyen a la degeneración Walleriana y regeneración nerviosa [104]. De hecho, durante las primeras 24 h posteriores a la lesión, antes de la llegada de los macrófagos derivados de la sangre, las células de Schwann controlan la desmielinización, a través de una metaloproteinasa de matriz extracelular, degradando la proteína básica de la mielina (MBP, por sus siglas en inglés), lo que contribuye a la hipersensibilidad temprana al dolor [313]. Además, secretan otros mediadores que incluyen citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), prostaglandinas, ATP y quimioquinas, que promueven la neuroinflamación por el reclutamiento de macrófagos [185]. En condiciones normales, las células de Schwann secretan factores tróficos cuya liberación se exagera luego de una lesión nerviosa, como sucede con el factor de crecimiento nervioso- β . Se ha demostrado que este factor modula la expresión, en neuronas aferentes primarias, de una multitud de neurotransmisores, receptores y canales iónicos relacionados con el dolor, como la sustancia P, TRPV1 y canales de sodio [18]. La administración de NGF- β puede inducir hiperalgesia y alodinia, tanto en ratas como en humanos [193]. Por el contrario, los antagonistas de NGF- β no solo previenen el desarrollo de la alodinia e hiperalgesia en ratas con lesión de nervio periférico, sino que además es capaz de revertir completamente el dolor [318].

Es necesario aclarar, sin embargo, que si bien las células de Schwann parecen contribuir al dolor causado por la neuropatía, al sensibilizar o activar los axones de los nociceptores a través citoquinas inflamatorias y el factor trófico NGF- β , su contribución no siempre es deletérea, con posibles influencias anti-nociceptivas y protectoras, a través de la secreción de la eritropoyetina y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, por sus siglas en inglés) [252].

Células gliales satélite

Las SGC son células gliales periféricas que envuelven los somas de las neuronas aferentes primarias alojadas en los DRG y los ganglios sensitivos craneales. Clásicamente, su función ha sido siempre asociada al mantenimiento de la homeostasis iónica y metabólica [229]. Sin embargo, se ha observado que después de

una lesión nerviosa, el ATP liberado por las neuronas dañadas se convierte en un mediador crítico de la activación de SGC, a través de la estimulación de receptores purinérgicos expresados en estas últimas. Es así como las SGC se activan y proliferan, aumentando la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés) y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-1 β [122]. Este patrón de activación de las SGC tiene un rol emergente en el establecimiento del dolor neuropático, al promover la excitabilidad neuronal a través de mecanismos directos (IL-1 β) e indirectos (potasio y glutamato) [68,105].

Astroцитos

Los astroцитos son las células más abundantes en el SNC y desempeñan funciones vitales en el mantenimiento de la homeostasis mediante la regulación de iones y neurotransmisores en el microambiente neuronal. Sin embargo, después de una lesión nerviosa, el fenotipo, la función y la expresión génica de los astroцитos pueden sufrir un cambio significativo, conocido como astrogliosis reactiva [334]. La activación de los astroцитos se caracteriza morfológicamente por la hipertrofia y el aumento de producción de GFAP, de vimentina y/o nestina y de citoquinas pro-inflamatorias [309].

Recientemente, se ha propuesto que la neuroinflamación y la isquemia inducen dos tipos diferentes de astroцитos reactivos, que se denominaron astroцитos reactivos A1 y astroцитos reactivos A2 [179]. La neuroinflamación induce la activación de la microglía, la cual transforma a los astroцитos naïve en astroцитos A1, mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Los astroцитos A1 pierden la capacidad de promover la supervivencia neuronal, la sinaptogénesis y la fagocitosis, e inducen la muerte de neuronas y oligodendrocitos [177]. Por el contrario, la isquemia induce la activación de astroцитos A2, los cuales promueven la supervivencia neuronal y la reparación de tejidos mediante la liberación de la citoquina anti-inflamatoria TGF- β 1 [197].

Estudios recientes han demostrado que la lesión de nervios periféricos conduce a la activación de los astroцитos A1, lo que estimula la liberación de mediadores como óxido nítrico, prostaglandinas, aminoácidos excitatorios y ATP, que o bien reducen el umbral de activación o excitan directamente a las neuronas nociceptivas [147]. Además, los astroцитos reactivos A1 se han relacionado con el mantenimiento de la hipersensibilidad al dolor y con los aspectos afectivos-motivacionales de dolor neuropático, debido a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en el asta dorsal de la médula espinal y en las regiones del cerebro relacionadas con la regulación de las

emociones (la corteza somatosensorial primaria, la corteza cingulada anterior, la corteza prefrontal medial y el hipocampo) [83,146].

Microglía

La microglía es una población de macrófagos residentes, normalmente inactivos, que realizan la vigilancia inmunológica en el SNC [159].

En el contexto del dolor neuropático, la microglía es una de las primeras células de la médula espinal que se activa luego de una lesión nerviosa [42]. La activación de la microglía se denomina microgliosis y se caracteriza por la inducción de la proliferación o hipertrofia celular [136]. La microgliosis se manifiesta como cambios morfológicos profundos, donde la microglía pasa de formas ramificadas a ameboides con cuerpos celulares agrandados y procesos acortados. Además, la microglía activada presenta un aumento en la expresión de varios marcadores, como el receptor CD11b (OX42), la proteína adaptadora de unión a calcio (IBA1, por sus siglas en inglés) y el receptor TLR4 [152].

Múltiples moléculas de señalización liberadas de las neuronas aferentes primarias dañadas juegan un papel crucial en la inducción y el desarrollo de la microgliosis espinal, la cual es concomitante con el desarrollo de la hipersensibilidad al dolor [242]. Así, la lesión del nervio periférico induce un rápido aumento en la expresión del factor estimulante de colonias 1 (CSF1, por sus siglas en inglés), la quimioquina CCL2 y la metaloproteinasa-9 (MMP-9) en las neuronas lesionadas [117], los cuales actúan sobre la microglía espinal para inducir comportamientos de microgliosis.

Estudios recientes sugieren una activación coordinada de la microglía y la astrogliosis, luego de una lesión neuropática [281,311]. Así, la activación temprana de la microglía induciría un aumento del receptor TLR4 en su superficie celular y un incremento en la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α , que impulsarían la activación de los astrocitos. Además, estos mediadores pro-inflamatorios actuarían sobre las fibras aferentes primarias y las neuronas nociceptivas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal, lo cual le da a la microglía un papel fundamental como potenciador del dolor [136].

Se ha demostrado en diferentes modelos de dolor neuropático que la activación microglial no solo se observa en el asta dorsal de la médula espinal [22], sino que también ocurre en regiones superiores como la corteza cingulada anterior [200] y la corteza frontal [322]. Estos hallazgos sugieren una posible contribución de la microglía no sólo al inicio y mantenimiento de la sensibilización central y dolor persistente, sino también a los síntomas de depresión asociados al dolor neuropático.

3.3 Citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas producidas por varios tipos celulares, principalmente por las células del sistema inmune. Las citoquinas tienen dos fenotipos opuestos: las pro-inflamatorias, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-15, IL-17 e IFN- γ ; y las anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β [25].

Los efectos algésicos de las citoquinas pro-inflamatorias pueden ser directos o indirectos, a través de la expresión de otros mediadores, como NO y PGE₂, que sensibilizan a los nociceptores. Además, las citoquinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 se retroalimentan positivamente. Por el contrario, las citoquinas anti-inflamatorias sirven como reguladores de retroalimentación negativa, para mantener una respuesta inmunitaria equilibrada. Por ejemplo, IL-10 suprime la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias, inhibiendo su traducción y/o la de sus receptores [292].

El resultado general del estado de dolor crónico se correlaciona fuertemente con el equilibrio entre las citoquinas pro y anti-inflamatorias. Apoyando esta noción, los pacientes con síndrome de dolor regional complejo, neuropatía dolorosa y lesión crónica de médula espinal, tienen niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, mientras que las citoquinas anti-inflamatorias, IL-10 y TGF- β están disminuidas [75,288].

Por lo tanto, la modulación de la señalización de citoquinas mediante el bloqueo de ciertas citoquinas pro-inflamatorias y/o la potenciación de citoquinas anti-inflamatorias pueden considerarse estrategias de tratamiento para el dolor neuropático crónico.

3.3.1 Citoquinas pro-inflamatorias

TNF- α

TNF- α es una importante citoquina pro-inflamatoria que se relaciona con el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático crónico [175].

El daño a los nervios periféricos se asocia con una respuesta inmune rápida caracterizada por la liberación endógena de TNF- α de las células de Schwann, macrófagos residentes y mastocitos. Posteriormente, la infiltración de neutrófilos y macrófagos derivados de la sangre, también liberan TNF- α adicional, resultando en un segundo pico alrededor de 3 a 5 días post-lesión. Ambos picos de la proteína TNF- α corresponden con picos en la disminución de los umbrales del dolor [265]. La lesión nerviosa también conduce a una mayor secreción de TNF- α por las SGC del DRG, células neuronales y macrófagos infiltrantes, así como también en zonas más

distantes, como el asta dorsal de la médula espinal, el RVM, el locus coeruleus y el hipocampo, presumiblemente proveniente de astrocitos activados y microglía [82,133].

TNF- α actúa a través de dos receptores distintos, TNFR1 que se expresa constitutivamente y el TNFR2 cuya expresión es inducible. En animales con lesiones nerviosas tanto la activación de TNFR1 como de TNFR2 conduce a hipersensibilidad al dolor y activación ectópica de los nociceptores, los cuales se expresan en los axones de nervios periféricos, células de Schwann, neuronas del DRG y las SGC. Es evidente, por lo tanto, que, en el sistema nervioso, en condiciones fisiológicas, TNFR1 es capaz de mediar la excitación de neuronas sensoriales e hipersensibilidad al dolor, mientras que después de una lesión nerviosa hay una inducción de TNFR2, que junto con la presencia continua de TNFR1, contribuye a la excitación continua de las neuronas sensoriales asociadas con la neuropatía [82].

La unión de TNF- α a sus receptores en los DRG y en el asta dorsal espinal activa el factor nuclear kappa B (NF- κ B, por sus siglas en inglés), quien a su vez induce la transcripción de genes que codifican citoquinas proinflamatorias y por lo tanto, juega un papel en la facilitación del dolor [312]. Además, esta unión desencadena la activación intracelular de las quinasas ERK, JNK, p38-MAPK y PI3K [175]. A través de la vía de p38-MAPK, el TNF- α promueve el ingreso de sodio en las neuronas aferentes primarias de los DRG, lo que contribuye a la disminución de los umbrales de excitación y la descarga ectópica durante la neuropatía dolorosa [72]. En la médula espinal, el TNF- α promueve un aumento de las corrientes postsinápticas excitatorias a través de los receptores AMPA y NMDA, lo que puede explicarse ya que el TNF- α inhibe la expresión y actividad de los transportadores de glutamato aumentando así el glutamato extracelular disponible para estimular los receptores [157].

IL-1 β

La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria clave, involucrada en la patogenia del dolor crónico [246], el déficit de memoria [108] y la depresión [236], a través de activación del receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1R1).

Inmediatamente después de la lesión de un nervio periférico, las células de Schwann se activan y se reclutan macrófagos en el sitio de la lesión y ambos tipos celulares secretan IL-1 β . El aumento de IL-1 β , no solo se ha encontrado en la periferia, sino también en la médula espinal y áreas del cerebro, incluido el hipocampo, el tronco encefálico y la corteza prefrontal [255].

En los últimos años, se ha demostrado un nuevo mecanismo de dolor neuropático que involucra una vía compleja con metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9) e IL-1 β . En

el modelo de CCI, la activación de IL-1 β por proteólisis, mediada por diferentes subtipos de MMP contribuyó a diferentes fases del comportamiento del dolor neuropático. Después de la lesión nerviosa, MMP-9 indujo dolor neuropático a través de la activación por proteólisis de IL-1 β y la activación microglial en tiempos tempranos, mientras que MMP-2 mantuvo el dolor neuropático a través de la escisión de IL-1 β y la activación de astrocitos en tiempos posteriores [149]. Además, se demostró que IL-1 β , en médula espinal, fue capaz de aumentar las corrientes excitatorias inducidas por AMPA y NMDA, mientras que disminuyó las corrientes inhibitorias espontáneas de GABA y glicina [157].

3.3.2 Citoquinas anti-inflamatorias

IL-10

La IL-10 es secretada por las células T activadas, las células B, los macrófagos, mastocitos, células gliales y células madre [206], y generalmente se considera que es una potente citoquina anti-inflamatoria, que inhibe la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 β , IL-6 y TNF- α [292].

Después de la lesión de un nervio periférico, hay un aumento temprano en la expresión de IL-10, 1 h después de la lesión en el nervio ciático y 24 h después de la lesión en los DRG. Con el transcurso del tiempo, parece haber un aumento gradual en la expresión que alcanza su punto máximo después de 6 semanas, y puede estar asociado con la cicatrización de lesiones [290].

En lesiones crónicas del nervio ciático, el mecanismo de acción de la IL-10 es predominantemente a través de la supresión de citoquinas pro-inflamatorias y la disminución resultante en el reclutamiento y la activación de células gliales tanto en el sitio de la lesión como en la médula espinal, a través de la inhibición de la vía JAK-STAT3, así como la inhibición de la transcripción del factor, NF- κ B [206,210,332]

TGF- β 1

TGF- β 1 es miembro de una familia de citoquinas pleiotrópicas, que tienen una amplia variedad de funciones que, dependiendo del contexto, pueden promover la supervivencia celular o inducir la apoptosis, estimular la proliferación celular o inducir la diferenciación [315]. Sus funciones inmunitarias, sin embargo, son en su mayoría anti-inflamatorias.

TGF- β 1 es un mediador relevante de la nocicepción y tiene efectos protectores contra el desarrollo de dolor neuropático crónico, mediante la inhibición de las respuestas neuroinmunes de las neuronas y la glía, y promoviendo la liberación de

opioides endógenos en la medula espinal [169]. En este contexto, se ha observado que la administración intratecal de TGF- β 1 en ratas con ligadura parcial del nervio ciático, no solo es efectiva para prevenir, sino también para revertir la hipersensibilidad provocada por el daño al nervio periférico. Además, la administración de TGF- β 1 ejerció un potente efecto neuroprotector, que minimizó el daño neuronal después de la lesión, inhibió la activación astrocítica y microglial espinal y disminuyó la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 dentro de la médula espinal, inducida por la neuropatía [87].

4 MODELOS ANIMALES DE DOLOR NEUROPÁTICO

Uno de los mayores retos para descubrir fármacos más eficaces para el control del dolor neuropático ha sido la diversidad de etiologías causantes de dolor crónico en humanos. Es por eso, que se han establecido más de 40 diferentes tipos de modelos animales para estudiar las diversas etiologías y en consecuencia las diversas manifestaciones de la neuropatía, los cuales incluyen modelos de lesión del SNP y del SNC. A continuación, nos enfocaremos en aquellos modelos de dolor neuropático de causa periférica, varios de los cuales hemos utilizado o se discuten en la presente tesis. Para una revisión de los muchos otros modelos disponibles, pueden consultarse las revisiones de referencia [48,140,154].

4.1 Axotomía (sección completa) del nervio ciático (AXT)

Este es el modelo más antiguo de dolor neuropático en animales e implica la sección completa del nervio ciático a nivel de la mitad del muslo [299]. Luego de la lesión, se desarrolla un neuroma en el muñón del nervio lesionado que consta de nervios en regeneración brotando en todas las direcciones. El modelo produce anestesia dolorosa, es decir, dolor en el miembro lesionado en ausencia de un estímulo sensitivo [300].

Además, los animales lesionados presentan autotomía de la pata lesionada, un fenómeno de auto-mutilación del miembro denervado, la cual es considerada un marcador de dolor neuropático [156]. Este modelo de lesión es de relevancia clínica, ya que busca replicar en animales el dolor que experimentan pacientes con amputación de un miembro, y que se manifiesta como dolor en miembro fantasma (a pesar de no poseer más el miembro) o dolor en el muñón [142].

4.2 Lesión reversible del nervio ciático (o crush del nervio ciático)

Se trata de uno de los primeros modelos de lesión de un nervio periférico generado en roedores para el estudio de dolor neuropático y la regeneración axonal espontánea [85]. Se sabe que la inflamación en el sitio de la lesión del nervio es un desencadenante esencial de los cambios patológicos que tiene un impacto crítico en la reparación y regeneración del nervio; así como también en la pérdida de la función sensorial y generación de dolor neuropático persistente [274]. A diferencia de los modelos de sección del nervio ciático, el crush del nervio ciático es menos grave, ya que la membrana basal de las células de Schwann que cubren los fascículos y las fibras nerviosas están anatómicamente intactas, lo que permite que estas células proporcionen vías para guiar la regeneración axonal. La reparación y recuperación sensorial y motora luego de una compresión del nervio ciático ocurre a los 21 días después de producida la lesión [85]

4.3 Lesión persistente del nervio ciático

Lesión selectiva de las ramas del nervio ciático (SNI)

Este modelo animal de dolor neuropático fue desarrollado por Decosterd y Woolf, en el cual se expone el nervio ciático y sus tres ramas terminales: la sural, la peronea común y la tibial [76]. A partir de entonces, la rama tibial y peronea común se ligan fuertemente y luego se seccionan, removiendo además los 2 mm distales al punto de ligado. Se tiene un enorme cuidado para evitar cualquier contacto o estirar el nervio sural y, por lo tanto, el nervio sural permanece intacto. Este modelo es ampliamente utilizado para el estudio del dolor neuropático debido a que los cambios en la sensibilidad mecánica y térmica que desencadena son robustos, sustanciales, prolongados (más de 6 meses) y parecidos en muchas características al dolor neuropático clínico [61].

Lesión por compresión crónica (CCI)

El modelo de CCI desarrollado por Bennett y Xie [23] se basa en exponer el nervio ciático a la altura de la mitad del muslo de la pata trasera y realizar tres ligaduras sueltas (aproximadamente 1 mm de espacio), hasta que se observa una breve compresión nerviosa, sin interrumpir la circulación epineural. Esta constricción del nervio ciático se asocia con edema intraneural, isquemia focal y degeneración Walleriana. El daño parcial al nervio conduce a la sensibilización de las fibras A y C, y por lo tanto juegan un papel en la iniciación y manteniendo del comportamiento de

dolor. Se ha observado que la alodinia se desarrolla dentro de una semana, persistiendo hasta 7 semanas después de la lesión [297].

El modelo de CCI se ha utilizado ampliamente para la investigación sobre dolor espontáneo dolor, alodinia e hiperalgesia [16]. Sin embargo, se ha observado cierto grado de variación en los estudios comportamentales de los animales lesionados, que puede complicar los análisis cuantitativos de las respuestas de dolor. Estas variaciones pueden introducirse debido a la variabilidad en la tensión con la que se ejercen las compresiones, el tipo de material de sutura y las cepas de ratas [195,248].

Ligadura parcial del nervio ciático (PSL)

En el modelo de PSL se expone el nervio en la parte superior del muslo y se liga firmemente el nervio ciático con una sutura de seda, distal al punto en el que se ramifica el nervio bíceps semitendinoso posterior [257]. Las alteraciones conductuales como la alodinia al frío, hiperreactividad química e hiperalgesia mecánica se ha observado que ocurre dentro de la primera semana después de la cirugía y la mayoría de los cambios persisten durante 6 semanas [214,257]. El modelo PSL representa el dolor simpáticamente independiente en la primera semana después de la operación y luego se transforma en dolor dependiente del sistema simpático en semanas posteriores [161]. La magnitud y la duración de las respuestas al dolor varían considerablemente dependiendo de la tensión de la sutura y el material de esta.

Ligadura del nervio espinal (SNL)

El modelo de SNL se basa en disecar cuidadosamente los nervios espinales lumbares izquierdos L5 y L6 y luego, realizar una ligadura distal a los DRG. En este modelo, las alteraciones conductuales como la alodinia mecánica, la alodinia al frío, la hiperalgesia térmica y el dolor espontáneo se desarrollan dentro de las 24-48 h y persisten durante aproximadamente 10 a 16 semanas [125]. Se ha demostrado que la simpatectomía reduce los signos conductuales del dolor neuropático [321]; por lo tanto, este modelo ha sido descrito como un modelo animal de dolor mediado por el sistema simpático.

5 TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO

5.1 Terapias utilizadas actualmente en la clínica

El enfoque tradicional para el manejo de un paciente con dolor neuropático es iniciar el tratamiento con terapias farmacológicas conservadoras antes de utilizar estrategias intervencionistas, como bloqueos nerviosos y neuromodulación [89].

Los pacientes con dolor neuropático generalmente no responden a los analgésicos como el paracetamol, los anti-inflamatorios no-esteroides (AINEs) o los opioides débiles como la codeína [207,317]. Por otro lado, es curioso observar que, hasta el momento, no existen fármacos “anti-dolor neuropático” per se. Y más curioso es que, como alternativas, se recomiendan como tratamientos de primera línea a los anti-epilépticos pregabalina y gabapentina (ambos, moduladores de canales de calcio voltaje dependientes, y que en consecuencia bloquean el acceso de información aferente a nivel espinal), la duloxetina (un inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina) y varios antidepresivos tricíclicos [164]. Por su parte, el uso de parches de capsaicina de alta concentración (el componente activo de los chiles), y los parches de lidocaína y el tramadol (un opioide con efectos de inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina) tienen poca evidencia que respalde su uso y se recomiendan como tratamientos de segunda línea. Los opioides fuertes y la toxina botulínica A (administrada por especialistas) tienen recomendaciones débiles para su uso como tratamientos de tercera línea. La mayoría de estos tratamientos tienen una eficacia moderada, siendo efectivos en <50% de los pacientes y pueden estar asociados con efectos adversos que limitan su utilidad clínica [64].

Los antidepresivos y antiepilepticos han sido los fármacos más estudiados en el dolor neuropático. Por sus mecanismos de acción, y de manera circunstancial, se observó que además de su eficacia en dos desórdenes neurológicos mayores como la depresión y la epilepsia, sirven además para controlar, al menos en parte, al dolor neuropático. Entre los primeros, los antidepresivos tricíclicos, como la amitriptilina, y los inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, como la duloxetina, han confirmado su eficacia en diversas formas de dolor neuropático. Su eficacia analgésica parece mediada en gran medida por su acción sobre los controles inhibitorios moduladores descendentes, pero se han propuesto otros mecanismos (incluida una acción sobre los adrenoceptores β_2) [89,324]. Entre los antiepilepticos, la eficacia de la pregabalina y la gabapentina, está mejor establecida para el tratamiento del dolor neuropático periférico. Los efectos analgésicos de estos fármacos se relacionan principalmente con una disminución de la sensibilización central a través de la unión a la subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio dependientes de voltaje

[189,230]. Sin embargo, el uso de crónico de estos fármacos desencadena efectos adversos considerables, como son los mareos, la somnolencia, la fatiga y la visión borrosa [317].

Respecto de los fármacos de segunda línea, la lidocaína actúa sobre las descargas neuronales ectópicas a través de sus propiedades de bloqueo de los canales de sodio, mientras que la capsaicina activa inicialmente los canales TRPV1 en las fibras nociceptivas, lo que lleva a la desensibilización y desfuncionalización de TRPV1 [10,14]. Si bien la aplicación de parches de lidocaína y parches de capsaicina de alta concentración carecen de evidencia de eficacia de alta calidad, tienen perfiles de seguridad más favorables y, por lo general, son bien tolerados.

La toxina botulínica A es una neurotoxina potente que se usa comúnmente para el tratamiento de la hiperactividad muscular focal y ha demostrado eficacia en administraciones repetidas durante 6 meses en pacientes con dolor neuropático periférico, inhibiendo la liberación de mediadores inflamatorios y neurotransmisores periféricos de los nervios sensoriales [13]. Sin embargo, no hay pautas clínicas que determinen cual es la vía de administración y la dosis mínima efectiva, por lo que se necesitan ensayos clínicos grandes y bien diseñados para abordar estos problemas. Respecto de los agonistas opioides, como la oxiconona y la morfina, son ligeramente efectivos, pero existe preocupación sobre la sobredosis, la muerte, el desvío, el uso indebido y la morbilidad relacionados con los opioides recetados [221].

Como ya fuera adelantado previamente, hace ya varios años que viene confirmándose la importancia de las interacciones entre neuronas sensoriales y células no neuronales en la producción y mantenimiento del dolor, en particular con respecto al papel de las células inmunes que se acumulan en un área inflamada después de la lesión, así como los procesos neuro-inflamatorios que ocurren tanto en el SNC y -P en varias patologías de dolor neuropático crónico [148]. Por lo tanto, es posible que, para optimizar los enfoques farmacológicos del tratamiento del dolor, sea necesario modular no solo a los procesos de neurotransmisión desde una perspectiva exclusivamente neuronal, sino también las complejas interacciones entre neuronas y otros tipos de células. Más aún, es posible que una acción concertada sobre eventos no-neuronales (y eventualmente también neuronales), sean la base de la siguiente generación de fármacos analgésicos exitosos.

5.2 Terapia farmacológica en etapa experimental: oligodeoxinucleótidos y su potencial terapéutico

Los oligodeoxinucleótidos inmunomoduladores (ODN) son moléculas sintéticas con capacidad de inducir la activación y proliferación de células del sistema inmune,

así como la liberación de inmunoglobulinas. Dos clases de ODN inmunoestimuladores han sido identificados de acuerdo con su contenido de CpG [295]: ODN CpG y ODN no-CpG. Algunos de los blancos identificados para ambas clases de ODNs incluyen a las células B y/o las células dendríticas plasmocitoides [88,165].

Los ODN CpG son moléculas monocatenarias cortas sintéticas de ADN que contienen motivos de dinucleótidos CpG no metilados. Esta clase de ODN, modula tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. Se ha demostrado, *in vitro*, que los ODN CpG tienen la capacidad de activar a las células B y a las células dendríticas plasmocitoides a través del receptor TLR9, estimulando la secreción de IFN- α por las células dendríticas plasmocitoides [21,166].

Dentro del grupo de los ODNs no-CpG, en los últimos años se ha reportado una nueva familia llamada PyNTTTTGT, por su motivo activo (donde Py: pirimidina, N: adenina, citosina, guanina o timina, T: timina, G: guanina). Esta clase de ODN induce la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), mediante la acción sobre las células NK y NK-T, aunque sólo en presencia de IL-2 [249]. Los ODNs no-CpG también inducen la proliferación y migración de MSC [124]. Estas características se encuentran ausentes o se manifiestan pobremente en el caso de los ODNs CpG. Es interesante observar que el IFN- α inhibe la secreción de GM-CSF, inducida por el ODN PyNTTTTGT, mientras que esta clase de ODN inhiben la secreción TLR9-dependiente de IFN- α resultante de la estimulación de células dendríticas plasmocitoides por ODNs CpG [249]. La interferencia mutua entre ambas clases de ODNs sugiere entonces que podrían estimular vías de respuesta del sistema inmune diferentes e incompatibles [338].

5.2.1 El oligodeoxinucleotido no-CpG IMT504

El IMT504 es el prototipo de los ODN sintéticos de tipo no-CpG, con uniones fosforotioato resistentes a nucleasas y cuya secuencia es: 5'-TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCATT-3' [88]. *In vitro*, el IMT504 induce la activación de linfocitos B y de células dendríticas plasmocitoides, causando activación, proliferación, y secreción de inmunoglobulinas y expresión de moléculas co-activadoras [88].

El IMT504 es un fármaco con una fórmula bien definida, altamente soluble y de una buena estabilidad térmica, por lo que no son necesarias condiciones extremas de transporte y almacenamiento. Además, una vez inyectado a través de diferentes vías, el IMT504 tiene una distribución rápida y amplia [97]. Estudios pre-clínicos de toxicidad han demostrado que la administración de una dosis intraperitoneal de 20 mg/kg del

ODN en ratas preñadas, no altera el desarrollo embrionario, y que la administración subcutánea de IMT504 en el rango de 10 a 50 mg/kg en ratas no produce daños histológicos en el hígado, el bazo, el páncreas, la médula espinal, el fémur y los ganglios mesentéricos, ni altera los valores de las transaminasas hepáticas [97,123]. Por lo tanto, 50 mg/kg se definió tentativamente como la "dosis máxima tolerada" para el IMT504 administrado por vía subcutánea en ratas. En conclusión, estos estudios indican que el IMT504 es un fármaco muy seguro, con pocos efectos secundarios y bien tolerados dentro del rango terapéutico de este agente.

Además de las acciones descritas, el IMT504 aumenta la auto-renovación y proliferación de MSC en cultivos de médula ósea y sangre periférica de ratas, efecto que no es observado con ODNs tipo CpG [124]. Más aún, el ODN acelera la reparación tisular en modelos de lesión ósea [123] y Diabetes tipo 1 [29,30]. Y en un modelo de sepsis en ratas, se encontró que el suministro de IMT504 resulta en la protección de la totalidad de animales infectados con *Pseudomonas aeruginosa* [47].

En cuanto al potencial terapéutico del IMT504 en el campo del dolor, estudios previos ha demostrado que la administración subcutánea, tanto temprana como tardía, de IMT504 en ratas con dolor neuropático auto-limitante (crush del nervio ciático) y dolor inflamatorio crónico, reduce la alodinia mecánica y térmica en animales lesionados [65,172,173]. En el modelo de dolor neuropático, el efecto de IMT504 fue inclusive comparable con aquel observado luego de la administración exógena de MSC. Así, la administración temprana de IMT504 o MSC previno el desarrollo de alodinia mecánica de manera comparable entre ambos grupos, y redujo significativamente el número de respuestas nociceptivas al frío [65]. Es importante destacar que, en el modelo de dolor inflamatorio crónico, se encontró que los efectos anti-nociceptivos de la administración sistémica IMT504 se asocian con una acción moduladora sobre el infiltrado celular de las poblaciones de células B, macrófagos y células T CD8+, en el sitio de inflamación, disminuyendo la expresión de proteínas de adhesión de leucocitos, quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias, así como de β -endorfina y un aumento de la citoquina anti-inflamatoria, IL-10 [173]. Además, en este modelo de dolor crónico se estudió la administración intratecal del ODN. Así, se observó que IMT504 tiene la capacidad de reducir significativamente la alodinia e hipersensibilidad mecánica, al menos 24 h después de su administración y de disminuir significativamente la activación glial espinal [174].

Respecto de sus mecanismos de acción, se demostró que el IMT504 modula la secreción de varias citoquinas esenciales por las células CD56⁺NK, estimulando a su vez la capacidad de las MSC de inducir el switch en la actividad de macrófagos, linfocitos T y otras células del sistema inmune, desde un fenotipo pro-inflamatorio a

uno anti-inflamatorio y de reparación tisular [249]. Más aún, las mismas MSC pueden adquirir un fenotipo pro- o anti-inflamatorio, similar a lo que ocurre con los macrófagos, y siendo esto dependiente del tipo de receptor TLR (TLR4: fenotipo pro-inflamatorio; TLR3: fenotipo anti-inflamatorio) [308].

Dado que los ODNs PyNTTTTGT y los ODNs CpG comparten parte de su vía de señalización, el IMT504 también podría actuar a través de la vía de la DNA-proteína-quinasa (DNA-PKs, por sus siglas en inglés), reguladora de la producción de IL-10 [36]. Esta vía de transducción universal podría explicar los efectos del IMT504 sobre tipos celulares como las MSC y las células del sistema inmune.

También se ha sugerido, mediante ensayos de co-localización ligando-receptor, que el IMT504 actúa sobre linfocitos B por unión a las proteínas de superficie CD19 y receptor de células B (resultados no publicados) iniciando dos posibles cascadas de señalización intracelular, similar a lo descrito para los ODNs CpG [208]. Una cascada de carácter pro-inflamatoria involucraría la activación de la PI3K/AKT, conduciendo a la activación de linfocitos B y la secreción de las citoquinas IL-6, IL-8, TNF- α , entre otras [88]. Por el contrario, la cascada de carácter anti-inflamatoria llevaría al linfocito B hacia un perfil anti-inflamatorio al inhibir a la quinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK3, por sus siglas en inglés), aumentando la expresión de Wnt y la secreción de IL-10 [341]. Es interesante notar que en el sistema inmune la GSK3 ha sido recientemente descrita como un factor crucial que regula el balance entre la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias. Cuando GSK3 está activa, predominan las citoquinas pro-inflamatorias; y cuando está inactiva, predominan las anti-inflamatorias y ejercería sus efectos a través de la regulación de factores de transcripción críticos como NF- κ B, el factor nuclear activador de células T y los factores de transcripción STATs [27]. Finalmente, es interesante observar que en el análisis del rol del IMT504 sobre el dolor inflamatorio en ratas inyectadas con el ODN por la vía intratecal, se observó una importante disminución en la vía pro-inflamatoria que involucra a TLR4 y a NF- κ B [174], apoyando los estudios previamente referenciados.

Sin embargo, y pese a la información disponible actualmente, los mecanismos de acción anti-nociceptivos del IMT504 aún son incompletos. Originalmente, el IMT504, así como varios otros miembros de la familia de ODNs no-CpG, fueron desarrollados con el fin de actuar como adyuvantes en la producción de vacunas, debido a sus capacidades potenciadoras del sistema inmune [97]. Por ende, las acciones anti-nociceptivas observadas hasta el momento son, a primera vista, incompatibles con el fin original de estos ODNs. Asimismo, se desconoce si los efectos son meramente de injerencia periférica, o podrían darse también a nivel central. En este sentido, es

importante destacar que existe un número de ODNs resistentes a enzimas, capaces de cruzar la barrera hematoencefálica en cantidades suficientes como para modular la función del SNC [106,139,254]. Por ende, el efecto anti-alodínico del IMT504 también podría depender de acciones centrales.

5.3 Terapia celular: células madre y su potencial terapéutico

El trasplante de células madres es uno de los desarrollos más recientes en la búsqueda de opciones terapéuticas para promover la regeneración nerviosa y el tratamiento del dolor neuropático [184]. En la actualidad, existen tres tipos principales de células madres que se utilizan experimentalmente para el tratamiento del dolor neuropático: células madre neurales, células madre mesenquimales y células mononucleares de la médula ósea.

5.3.1 Células madre neurales (CMN)

Las CMN son precursores multipotenciales que crecen y se autorenewan en cultivo durante un extenso período de tiempo como neuroesferas, al tiempo que conservan una capacidad estable para generar células cerebrales maduras y funcionales. Estas células se aislaron por primera vez en el año 1992 y en la actualidad se utilizan líneas de CMN derivadas del hipocampo, el bulbo olfativo, la zona subventricular, la zona subcallosa subyacente al cuerpo calloso y la médula espinal de roedores fetales, embrionarios, neonatales y adultos [107,115,294].

La administración sistémica de CMN murinas para el tratamiento del dolor neuropático fue utilizada por primera vez en un modelo de CCI en ratones [96]. Aunque la eficacia del trasplante fue baja, se observó la localización específica de las CMN en el nervio lesionado, desde el día 1 hasta el día 7 después de la inyección. En cuanto a sus efectos sobre el alivio del dolor, las CMN inyectadas cuando la patología ya estaba establecida, indujeron una reducción significativa de la alodinia y la hiperalgesia 3 días después de la administración, demostrando un efecto terapéutico que se prolongó durante al menos 28 días. El alivio del dolor estaría asociado a la disminución de los niveles de IL-1 β en el sitio de lesión y a una reducción de la expresión de c-fos en las láminas I-VI de la médula espinal. Además, se observó una mejoría en la morfología de los nervios dañados, aunque desfasada en el tiempo, cuando el dolor ya estaba controlado por el tratamiento con CMN. En concordancia con estos resultados, la administración intratecal de CMN, 3 días después de la lesión del nervio ciático por CCI, pudo atenuar significativamente la hiperalgesia mecánica y térmica con un marcado aumento de los niveles del factor neurotrófico derivado de la

línea celular glial en el asta dorsal espinal y DRG [323]. Por el contrario, la administración de CMN en modelos de lesión de médula espinal, promovió el desarrollo de alodinia mecánica y térmica en los animales lesionados, lo cual podría deberse a que los precursores neurales trasplantados se diferencian principalmente en astrocitos, desencadenando un brote aberrante de fibras peptidérgicas positivas para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés) [192].

A pesar del amplio uso de las CMN en diferentes modelos experimentales de dolor crónico, una de las grandes limitaciones para su uso clínico es la baja eficiencia en su trasplante, y una pobre tasa de supervivencia de las CMN a largo plazo [60].

5.3.2 Células madre mesenquimales (MSC)

Las MSC son una población heterogénea de células multipotentes con capacidad de auto-renovarse, así como también de diferenciarse a múltiples linajes [237]. Inicialmente, las MSC fueron aisladas del estroma de médula ósea del adulto, donde participan en la producción de señales que modulan la maduración de las células hematopoyéticas. Actualmente, se sabe que las MSC además de residir en la médula ósea del adulto se pueden aislar de diferentes tejidos en los distintos estadios de desarrollo [130]. Así, es posible encontrar MSC en tejido adiposo, sangre periférica, pulpa dental, ligamentos amarillos, sangre menstrual, endometrio y leche materna. Durante el desarrollo embrionario, se encuentran en el líquido amniótico, placenta y cordón umbilical.

Debido a su alto potencial clonogénico, su estabilidad genética y fenotípica y sus propiedades inmunosupresoras, las MSC pueden ser utilizadas en trasplantes autólogos y heterólogos, sin requerir de la administración de fármacos inmunosupresores. Los marcadores de superficie son usualmente utilizados para distinguir las MSC de las células hematopoyéticas, ya que su fenotipo se caracteriza por la presencia de los marcadores CD90 y CD29 y carecen de la expresión de marcadores como CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79a y CD19 [79,183].

Inicialmente, las MSC fueron utilizadas con el objetivo de reconstruir tejidos dañados o enfermos, debido al potencial que presentan estas células de diferenciarse *in vitro* a células de los tres linajes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo), dando origen a osteocitos, adipocitos, condrocitos, neuronas y hepatocitos [237]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las MSC pueden modular una amplia variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos,

incluyendo la respuesta inmune e inflamatoria, a través de la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento [44].

In vitro las MSC tienen la capacidad de interactuar y regular la función de las células efectoras que participan en los procesos de respuesta inflamatoria de inmunidad innata y adquirida [301]. Dentro de los efectos inmunomoduladores se incluye la inhibición de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, el bloqueo de la apoptosis de neutrófilos activados, así como también la disminución del número de neutrófilos adheridos a las células del endotelio vascular, limitando así, la movilización de estas células al área de lesión [150]. Además, las MSC limitan la degranulación de los monocitos, así como también, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la migración de estas células hacia factores quimioattractantes [74]. Las MSC tienen la capacidad de bloquear la proliferación de células NK y de reducir su actividad citotóxica [271]. Inhiben la diferenciación de células CD34⁺ de médula ósea o monocitos de sangre periférica en células dendríticas inmaduras, a través del contacto directo con estas o a través de la secreción paracrina de factores. Inhiben la maduración de células dendríticas inmaduras y la movilización hacia los tejidos [337]. Bajo su influencia, los macrófagos M1 (pro-inflamatorios) se diferencian a células de tipo M2 con fenotipo anti-inflamatorio, las cuales secretan IL-10 inhibiendo la proliferación de células T [53]. Estudios *in vitro* han demostrado que MSC tienen un efecto inmunomodulador directo sobre los linfocitos. Durante el co-cultivo de MSC con linfocitos, se suprime la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y linfocitos B. Además, las MSC reducen los niveles de secreción de citoquinas pro-inflamatorias sintetizadas por los linfocitos T, como TNF- α , INF- γ y aumentan la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 [84]. Las MSC además tienen la capacidad de limitar la producción y secreción de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA por linfocitos B activos, así como también bloquear la diferenciación de estas células a plasmocitos [98].

Otra propiedad interesante de las MSC es su capacidad de migrar y anidar en diferentes tejidos y órganos. Se ha encontrado que varios factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas estimulan la movilización de dichas células [306]. La quimioquina CXCL12, también conocida como SDF-1, y su receptor CXCR4 se han puesto en el foco de atención, al presentarse como un eje neuromodulador en patologías dolorosas [187,261]. El eje CXCL12-CXCR4 se encuentra ampliamente distribuido en estructuras nociceptivas del SNP y del SNC. En DRG no lesionados, CXCL12 y CXCR4 comparten el mismo patrón de expresión, se localizan en neuronas de diámetro pequeño y mediado, peptidérgicas (que sintetizan neuropéptidos como el CGRP) y no-peptidérgicas, así como también se expresan en proyecciones nerviosas

periféricas [245]. CXCR4 se ha encontrado también en células de Schwann del nervio ciático [167].

La capacidad de las MSC de modular el ambiente inflamatorio, ha hecho de ellas una estrategia terapéutica atractiva para el tratamiento de una amplia variedad de patologías dolorosas, como ser el dolor inflamatorio [227,233,328], el dolor neuropático [162,211,266] y el dolor asociado al cáncer [86]. Afortunadamente, una amplia variedad de trabajos ha reportado el alivio del dolor en distintos modelos de lesión en animales, a través la administración de MSC en el sitio de lesión (intraganglionar, intraespinal o intracraneal) o por vía intratecal o sistémica. En el modelo de SNL, se observó que la inyección intraganglionar de MSC en el DRG L4 ipsilateral, resulta en una migración y anidación selectiva de las células en los DRG lesionados (L4-L6 ipsilateral), mientras que al inyectar MSC en el DRG L4 contralateral, no lesionado, las células migraban específicamente hacia los ganglios ipsilaterales L4-6, mostrando así un tropismo selectivo por los ganglios lesionados [67]. Además de migrar hacia el sitio de la lesión, las células mostraron un efecto analgésico, previniendo el desarrollo de alodinia mecánica y térmica, así como también del aumento de los péptidos galanina, NPY y su receptor, inducidos por la lesión [66]. Estudios recientes demostraron que en modelos de CCI y de SNI en ratones, la administración intratecal de células madre mesenquimales alivió de forma prolongada el dolor neuropático, incluyendo la alodinia y la hiperalgesia [52]. En estos animales lesionados, las MSC se movilizaron específicamente a los DRG lesionados a través de la vía CXCL12-CXCR4, sobreviviendo en ellos varios meses, sin diferenciarse.

IL-10 y TGF- β 1 se encuentran en el centro de atención como las principales citoquinas inmunoreguladoras secretadas por las MSC. En el modelo de PSL, la administración de MSC o de medio condicionado obtenido del cultivo de estas células, indujo un efecto anti-nociceptivo de larga duración, disminuyendo la expresión de IL-1 β , TNF- α e IL-6, y aumentando los niveles de IL-10 en el nervio ciático y en los segmentos L4-5 de la médula espinal [100]. Reforzando el concepto del rol de TGF- β 1 e IL-10 en el mecanismo de acción de las MSC, un estudio en ratas con SNL demostró que la administración intratecal de MSC pre tratadas con IL-1 β , fue capaz de revertir la activación microglial y el dolor neuropático, a través de la secreción de IL-10 [176], mientras que en el modelo de CCI, las MSC tuvieron un rol neuroprotector a través de la secreción de TGF- β 1 [52].

En conclusión, la administración de MSC induce un efecto anti-nociceptivo de larga duración en modelos animales de dolor neuropático, a través de la modulación de mediadores inmunes y neuroquímicos en el sitio de la lesión. El efecto de las MSC parecería depender de su capacidad de migrar al sitio de la lesión, donde funcionarían

como “bombas biológicas”, secretando moléculas anti-nociceptivas y factores tróficos que actúan en el sitio de la lesión o en centros de procesamiento del dolor, mediando sus efectos terapéuticos.

5.3.3 Células mononucleares de médula ósea (BMMC)

Las BMMC comprenden una fracción celular heterogénea que incluye MSC, células hematopoyéticas, precursores hematopoyéticos y células endoteliales [302]. Las BMMC se han convertido recientemente en el foco de atención, no solo por su fácil obtención, sino también porque no requieren pasar por protocolos de cultivo para su expansión y/o diferenciación, evitando así los reordenamientos fenotípicos que pueden ocurrir al manipular CMN y MSC [151].

En ratas lesionadas con los modelos de crush y de CCI del nervio ciático, la administración sistémica de BMMC de rata, el mismo día de la lesión, fue capaz de prevenir el desarrollo de dolor neuropático [162,291]. En particular, en el modelo de compresión aguda, el nervio lesionado de las ratas tratadas con BMMC exhibió una apariencia morfológica más conservada que los de las ratas no tratadas, mejorando así su funcionalidad [291]. También se utilizaron BMMC recién aisladas para contrarrestar la neuropatía diabética inducida por estreptozocina en ratas [216]. Así, las células inyectadas en los músculos esqueléticos de las extremidades traseras dos semanas después de la administración de estreptozocina pudieron mejorar la hiperalgesia mecánica y la alodinia al frío en el lado inyectado con BMMC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar distintas estrategias experimentales para el tratamiento del dolor neuropático en ratas, incluyendo un abordaje farmacológico (ODN IMT504) y otro celular (BMMC). Asimismo, estudiar los mecanismos de acción anti-nociceptivo y anti-inflamatorio del IMT504, con foco en la modulación de células madre mesenquimales (MSC), y los mecanismos anti-nociceptivo y pro-regenerativo de las BMMC en ratas con lesión del nervio ciático.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Proyecto I: “Efectos y mecanismos de acción del ODN IMT504 en ratas con dolor neuropático crónico por el modelo de SNI”.

Hipótesis:

I.1 Tanto la administración sistémica temprana como tardía de IMT504 reducirán la respuesta alodínica observada en animales con dolor neuropático por lesión crónica del nervio ciático.

I.2 El IMT504 potenciará la movilización de MSC desde médula ósea hacia el nervio lesionado, estimulando la secreción de citoquinas anti-inflamatorias.

I.3 Los efectos anti-alodínicos observados luego de la administración del IMT504 se asociarán a la regulación de la inflamación en el nervio dañado.

Objetivos específicos:

I.1 Analizar el grado y duración del efecto analgésico derivado de la administración sistémica temprana (mismo día de la lesión) o tardía (7 días después de la lesión) de una única dosis IMT504 (6 mg/kg) en ratas con lesión mecánica total de dos ramas del nervio ciático del animal (SNI).

I.2 Estudiar si los efectos observados se relacionan, al menos en parte, con la migración y anidamiento de MSC endógenas en el sitio de lesión y cambios en su perfil de secreción de citoquinas.

I.3 Evaluar si el tratamiento con IMT504 modula el microambiente inflamatorio del nervio lesionado.

Proyecto II: “Efectos y mecanismos de acción del ODN IMT504 en ratas con axotomía completa del nervio ciático”.

Hipótesis:

II.1 La inyección sistémica de IMT504 o de MSC reducirá el grado de autotomía observado en animales con dolor neuropático por axotomía completa del nervio ciático.

II.2 Los efectos sobre la autotomía observados luego de la administración de IMT504 en el modelo propuesto se correlacionarán con la migración de MSC endógenas hacia el sitio de lesión.

II.3 El efecto preventivo de la autotomía del IMT504 se asociará a la modulación de los niveles de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, y de la activación glial en el sitio de lesión y en la médula espinal ipsilateral.

Objetivos específicos:

II.1 Analizar el grado y duración del efecto de la autotomía de la pata posterior derecha de ratas con axotomía del nervio ciático tratadas con dos dosis consecutivas de IMT504 (6mg/kg). Comparar el efecto terapéutico del ODN con el efecto de la administración exógena de MSC de médula ósea de rata.

II.2 Evaluar el efecto del IMT504 sobre la migración de MSC endógenas hacia el nervio dañado y los DRG asociados.

II.3 Determinar posibles mecanismos involucrados en las acciones protectoras del IMT504, con foco en la influencia sobre el ambiente inflamatorio local (nervio dañado) y espinal.

Proyecto III: “Tratamiento tardío con BMMC en ratas con lesión del nervio ciático”.

Hipótesis:

III.1 Se observará la migración de BMMC administradas de manera exógena, aun días después de realizada la lesión. Sin embargo, el efecto se perderá conforme pasa el tiempo.

III.2 El trasplante de BMMC revertirá la alodinia mecánica y térmica observada en ratas con crush del nervio ciático, y promoverá la regeneración morfológica y funcional del nervio lesionado.

III.3 El trasplante de BMMC será capaz de revertir la alodinia mecánica y térmica observada en ratas con SNI.

Objetivos específicos:

III.1 Determinar la ventana temporal en la cual se observa un mayor arribo de BMMC, administradas de forma exógena y a distintas sobrevidas, en el nervio lesionado.

III.2 Analizar el efecto del trasplante sistémico tardío de BMMC sobre la conducta del dolor, sobre la locomoción y sobre la velocidad de conducción y regeneración del nervio en ratas lesionadas.

III.3 Iniciar la caracterización del efecto anti-nociceptivo de la administración exógena y tardía de BMMC en ratas con SNI.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

GENERAL OBJECTIVE

Evaluate different experimental strategies for the treatment of neuropathic pain in rats, including a pharmacological (ODN IMT504) and a cellular (BMMC) approach. Likewise, to study the anti-nociceptive and anti-inflammatory mechanisms of action of the IMT504, with a focus on the modulation of MSC, and the anti-nociceptive and pro-regenerative mechanisms of BMMC in rats with sciatic nerve injury.

SPECIFIC OBJECTIVES AND HYPOTHESIS

Project I: “Effects and mechanisms of action of ODN IMT504 in rats with chronic neuropathic pain by the SNI model”.

Hypothesis:

- I.1 Both early and late systemic administration of IMT504 will reduce the allodynic response observed in animals with neuropathic pain from chronic sciatic nerve injury.
- I.2 The IMT504 will enhance the mobilization of mesenchymal stem cells from the bone marrow to the injured nerve, stimulating the secretion of anti-inflammatory cytokines.
- I.3 The anti-allodynic effects observed after the administration of IMT504 will be associated with the restoration of homeostasis in the damaged nerve, which in such a state has a pro-inflammatory character.

Specific objectives:

- I.1 Analyze the degree and duration of the analgesic effect derived from the early systemic administration (same day of the injury) or late (7 days after the injury) of a single dose of IMT504 (6 mg/kg) in rats with spared nerve injury (SNI).
- I.2 Study whether the observed effects are related, at least in part, to the migration and nesting of endogenous MSC at the site of injury and changes in their cytokine secretion profile.
- I.3 Assess whether treatment with IMT504 modulates the inflammatory microenvironment of the injured nerve.

Project II: “Effects and mechanisms of action of ODN IMT504 in rats with complete axotomy of the sciatic nerve”.

Hypothesis:

I.1 Systemic injection of IMT504 or MSC will reduce the degree of autotomy observed in animals with neuropathic pain from complete axotomy of the sciatic nerve.

I.2 The effects on autotomy observed after the administration of IMT504 in the proposed model will correlate with the migration of endogenous MSC towards the site of injury.

I.3 The preventive effect of IMT504 autotomy will be associated with the modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine levels and glial activation at the site of injury and in the ipsilateral spinal cord.

Specific objectives:

I.1 Analyze the degree and duration of the effect of autotomy of the right hind paw in rats with axotomy of the sciatic nerve treated with two consecutive doses of IMT504 (6mg/kg). Compare the therapeutic effect of the ODN with the effect of exogenous administration of MSC from rat bone marrow.

I.2 Evaluate the effect of IMT504 on the migration of endogenous MSC towards the damaged nerve and the DRG directly affected by the injury, and that could justify a direct action on such tissues that modulates pain.

I.3 Determine possible mechanisms involved in the protective actions of IMT504, with a focus on the influence on the local (damaged nerve) and spinal inflammatory environment.

Project III: “Late treatment with BMBC in rats with sciatic nerve injury”.

Hypothesis:

III.1 Migration of exogenously administered BMBC will be observed, even days after the injury. However, the effect will wear off over time.

III.2 BMBC transplantation will reverse the mechanical and thermal allodynia observed in rats with sciatic nerve crush, and will promote morphological and functional regeneration of the injured nerve.

III.3 BMBC transplantation will be able to reverse the mechanical and thermal allodynia observed in rats with SNI.

Specific objectives:

III.1 Determine the time window in which a greater arrival of BMMC is observed, administered exogenously and at different survival times, in the injured nerve.

III.2 Analyze the effect of late systemic BMMC transplantation on pain behavior, on locomotion, and on nerve conduction and regeneration speed in injured rats.

III.3 Start the characterization of the anti-nociceptive effect of exogenous and delayed administration of BMMC in rats with SNI.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Nuestro laboratorio aborda el estudio de los mecanismos de dolor con la finalidad de profundizar el conocimiento sobre su complejidad biológica y con la visión traslacional de contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los pacientes que sufren esta patología. Los modelos experimentales de lesión neuropática propuestos en esta tesis doctoral inducen dolor en los animales involucrados. Si bien esta situación es inevitable al perseguir una mejor comprensión del dolor de causa neuropática, se implementaron una serie de medidas aceptadas a nivel nacional e internacional que permitieron minimizar el sufrimiento de los animales experimentales, a saber:

a) Aprobación de los protocolos con animales de experimentación por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (21-04) y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (1488/19), luego del análisis exhaustivo de los estudios propuestos y las medidas a tomar para minimizar el sufrimiento de los animales en estudio.

b) Adherencia a las normas bioéticas Nacionales: Disposición ANMAT 5330/97 e Internacionales: Código de Nüremberg, declaración de Helsinki y sus modificaciones, así como a las indicaciones y recomendaciones emitidas por la Society of Neuroscience y la International Association for the Study of Pain, dos organizaciones científicas internacionales que velan constantemente por la práctica adecuada de neurociencia y experimentación sobre dolor en animales.

c) El cuidado y trato humanitario de los animales desde el momento de su recepción, durante su estadía en el bioterio y hasta su sacrificio para subsiguientes estudios, ofreciendo constantemente ciclos de día/noche de 12 horas, con acceso ad libitum a agua y alimento.

d) Previo a cualquier intervención quirúrgica, los animales fueron anestesiados utilizando anestésico inhalatorio (Isoflurano, 5% para inducción, 2.5% para mantenimiento, 0.8L/min O₂; Piramidal Healthcare, Londres, UK) o inyectable (mezcla de ketamina (75 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg); Laboratorio Richmond, Buenos Aires, Argentina). Con el motivo de brindar analgesia pre-quirúrgica, los animales recibieron una dosis subcutánea (s.c.) de dexketoprofeno trometamol (5 mg/kg, Lab Argentina, Buenos Aires, Argentina) o meloxicam (2 mg/kg, Roemmers, Buenos Aires, Argentina). Finalizada la cirugía, se aplicó de forma tópica, en el sitio de lesión, lidocaína en gel al 2% (AstraZeneca, Buenos Aires, Argentina).

En el caso de la perfusión transcárdica, los animales fueron sedados usando una dosis terminal de hidrato de cloral (300 mg/kg, BioPack, Buenos Aires, Argentina) o una mezcla de ketamina (75 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) (Laboratorio Richmond), inyectadas por la vía intraperitoneal (i.p.). Para la disección de tejidos de interés, los animales fueron sacrificados en una cámara cerrada de CO₂ y decapitados rápidamente. En cuanto al sacrificio de animales que no implicaron recolección de tejido post mortem, fueron sacrificados en una cámara cerrada de CO₂, hasta la completa y definitiva desaparición de movimientos respiratorios.

Si por razón del tratamiento recibido, cualquier animal perdiera más del 10% de su peso corporal o manifestara alteraciones en la conducta que indicaran estrés recurrente, se tuvo presente un protocolo de aislamiento y sacrificio en cámara cerrada de CO₂ con posterior dislocación cervical. Es importante aclarar que estos casos fueron inexistentes.

e) La práctica de las pruebas funcionales para analizar la conducta del dolor, en el modo en que está descrita, fueron desarrolladas de acuerdo con los estándares y métodos establecidos (publicaciones, recomendaciones societarias, regulaciones locales) e interrumpiendo el estudio en caso de evidenciarse un grado innecesario de sufrimiento.

f) Utilización de un número ajustado de animales que permitan la obtención de resultados con significado biológico (de 6 animales por grupo experimental, siendo este número mayor sólo en los casos en que el número de secciones de tejido a estudiar no alcancen para analizar todas las moléculas de interés; estudios de conducta, 8 animales por grupo, para compensar por la variabilidad inter-animal existente).

2 ANIMALES

Proyecto I: Ratas macho Sprague-Dawley ($n= 194$) de 7 semanas de vida (peso 250g; obtenidas en Biofucal, Buenos Aires, Argentina).

Proyecto II: Ratas macho Sprague-Dawley ($n= 99$) de 7 semanas de vida (peso 250g; obtenidas en Biofucal).

Proyecto III: Ratas macho ^{WT}Wistar, fenotipo salvaje, ($n= 175$) de 3 semanas de vida (peso 270-300g; obtenidas en Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina), ratas macho transgénicas ^{EGFP}Wistar, con proteína fluorescente verde mejorada, ($n= 10$) de 3 semanas de vida (peso 300-350g;

obtenidas en Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) y ratas macho Sprague-Dawley ($n= 38$) de 7 semanas de vida (peso 250g; obtenidas en Biofucal).

3 MODELOS DE LESIÓN DEL NERVIPO CIÁTICO

3.1 Lesión selectiva de las ramas del nervio ciático (SNI) (Proyectos I y III.3)

Bajo condiciones asépticas, se realizó en un grupo de ratas anestesiadas (Isoflurano, 5% inducción, 2.5% mantenimiento, O₂ 0.8 L/min; Piramal Healthcare) una incisión en la piel de la superficie lateral del muslo derecho posterior, para luego separar los músculos glúteos y bíceps femoral y así exponer el nervio ciático derecho y sus tres ramas principales: sural, perónea común y tibial. La lesión selectiva involucró la ligadura, usando hilo de sutura de seda 4.0 no reabsorbible (Ethicon, NJ, USA), y axotomía distal (removiendo 2-4 mm del segmento distal) de las ramas tibial y perónea común, dejando al nervio sural intacto (**Figura M1A**). Posteriormente, el músculo y la piel fueron suturados usando hilos Vicryl 4.0 (Ethicon) y Prolene 4.0 (Ethicon), respectivamente. Previo a la cirugía, los animales fueron inyectados con dexketoprofeno trometamol (5 mg/kg, Lab Argentia) por vía subcutánea, y posterior a la cirugía se les aplicó gel de lidocaína al 2% (AstraZeneca) en la zona de incisión. Los animales fueron dejados en reposo, en un ambiente cálido y tranquilo, hasta mostrar signos visibles de recuperación de la anestesia. Seguidamente, los animales fueron relocalizados en sus respectivas jaulas y retornados a la sala de ratas del bioterio.

3.2 Axotomía completa del nervio ciático (Proyecto II)

En un grupo de ratas anestesiadas y cuyo nervio ciático fue expuesto según se describiera más arriba, se procedió a la ligadura del nervio en dos sitios separados por 1 cm, usando hilo de sutura de seda 4.0 no reabsorbible (Ethicon). Esto se siguió de la sección completa del nervio entre el par de ligaduras (lo cual incluyó la remoción de 5 mm del mismo; tal procedimiento fue empleado para evitar la regeneración nerviosa y la posible reunión de los extremos seccionados) (**Figura M1B**). Posteriormente, el músculo fue suturado usando hilo Vicryl 4.0 (Ethicon) así como también la piel, utilizando hilo Prolene 4.0 (Ethicon). Los animales recibieron analgesia post-operatoria de 24 h y analgesia tóptica, como se describió previamente. Una vez recuperados, los animales fueron retornados a la sala de ratas del bioterio.

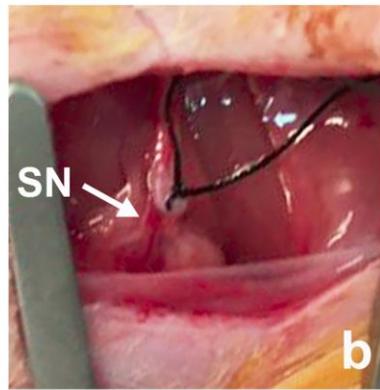
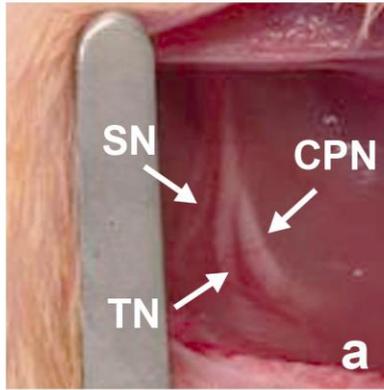
3.3 Crush del nervio ciático (Proyectos III.1 y III.2)

En ratas anestesiadas con Isoflurano (según se describiera más arriba), se expuso el nervio ciático derecho y se procedió a la compresión del nervio ciático. Esto fue logrado usando una pinza de joyero, a la altura de la mitad del muslo, y presionando al nervio durante 8 s (**Figura M1C**). Posteriormente, el músculo y la piel fueron suturados, usando hilo Vicryl 4.0 (Ethicon) e hilo Prolene 4.0 (Ethicon), respectivamente. Luego de la administración de la analgesia correspondiente y una vez recuperados, los animales fueron retornados a la sala de ratas del bioterio.

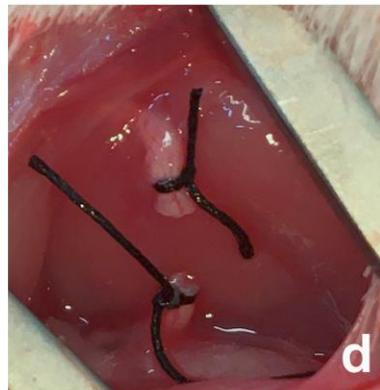
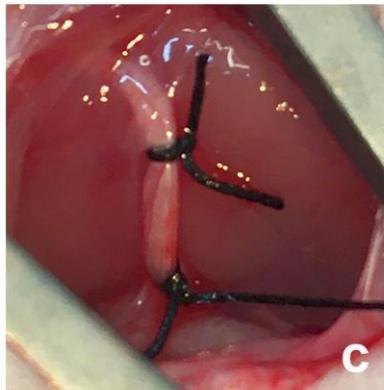
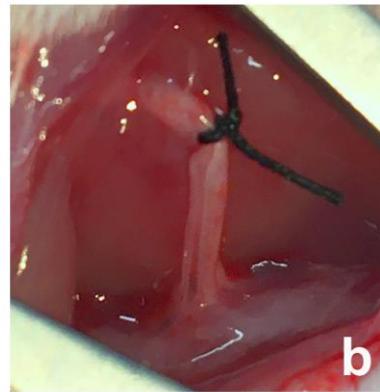
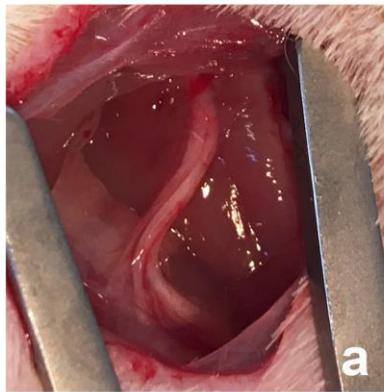
Figura M1. Modelos de lesión del nervio ciático en ratas. (A) Procedimiento quirúrgico empleado para la lesión selectiva de las ramas del nervio ciático. Exposición del nervio ciático y sus ramas periféricas: nervio peróneo común (CPN), nervio tibial (TN) y nervio sural (SN) (Aa). Luego de pasar una sutura de nylon 4.0 por debajo de los nervios tibial y peróneo común, los mismos fueron ligados. Posteriormente, las ramas ligadas fueron seccionadas distalmente y se removió un segmento de 2-4 mm para evitar la regeneración del nervio (Ab). Se tuvo cuidado de no tocar el nervio sural. **(B)** Procedimiento quirúrgico empleado para la axotomía completa del nervio ciático. Luego de exponer al nervio ciático (Ba), el mismo fue ligado fuertemente en dos puntos con 1 cm de diferencia (Bb-c), y posteriormente, se removieron 5 mm entre ligaduras (Bd). **(C)** Procedimiento quirúrgico empleado para el crush del nervio ciático. Luego de exponer el nervio ciático derecho (Ca), el mismo fue fuertemente comprimido durante 8 s a la altura de la mitad del muslo, mediante el uso de una pinza de joyero (Cb).

Figure M1. Sciatic nerve injury models in rats. (A) Surgical procedure used for the spared nerve injury. Exposure of the sciatic nerve and peripheral branches: common peroneal (CPN), tibial (TN) and sural nerves (SN) (Aa). After passing a nylon suture under the common peroneal and tibial nerves, both nerves were ligated. The ligated branches were transected distally and a 2-4 mm section was removed to prevent nerve regeneration (Ab). Care was taken to avoid contact with the sural nerve. **(B)** Surgical procedure used for complete sciatic nerve transection. After exposure of the sciatic nerve (Ba), it was strongly ligated in two points separated by 1 cm (Bb-c), followed by removal of 5 mm of the nerve in between ligatures (Bd). **(C)** Surgical procedure used for sciatic nerve crush in rats. After exposure of the right sciatic nerve (Ca), it underwent an 8 s crushing at mid-thigh level by use of a jeweler's forceps (Cb).

A



B



C



4 DROGAS EXPERIMENTALES (Proyectos I y II)

Para el desarrollo de los proyectos I y II, se utilizaron las siguientes drogas experimentales, según se tratara de experimentos *in vivo* o *in vitro*:

Experimentos in vivo: ODNs IMT504 y PolyC

Se utilizó el ODN IMT504, con secuencia 5'-TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCATT-3' (originalmente diseñado por Immunotech, S.A.), provisto de uniones fosforotioato (FT) y de grado HPLC (Biosynthesis Inc., Texas, USA), el cual fue re-suspendido en solución salina estéril (0.9% NaCl; 20 mg/ml; concentración de almacenamiento) y evaluado para contaminación por LPS.

La administración sistémica de IMT504 se realizó por vía s.c., a una concentración de 6 mg/kg (disolviendo el ODN en solución salina estéril, hasta un volumen de 250 μ l), siguiendo diferentes esquemas de administración (múltiple o única), según el protocolo experimental de tratamiento. La administración se realizó utilizando una jeringa de 1 ml provista de una aguja 25G.

En el Proyecto I, además, se empleó un ODN control de 24 bases PolyC, el cual fue re-suspendido, almacenado y utilizado con el mismo esquema de tratamiento que IMT504, durante los ensayos que evaluaron el efecto anti-alodínico de IMT504.

Experimentos in vitro: ODNs IMT504 y PolyC

Se utilizó el ODN IMT504 de grado HPLC, IMT504 de grado HPLC conjugado con los fluoróforos Alexa Flúor 488 (IMT504-Alexa 488) o Texas Red (IMT504-Texas Red) (Biosynthesis Inc.; 1 μ g/ μ l, concentración de almacenamiento) y el ODN PolyC (Biosynthesis Inc.; 1 μ g/ μ l, concentración de almacenamiento). Durante los experimentos, cualquiera de las cuatro formulaciones de ODN fue utilizada en concentración de trabajo de 7 μ g/ml en el medio de cultivo celular.

5 TERAPIA CELULAR (Proyectos II y III)

Luego de sacrificar ratas naïve ($n= 15$) en cámara cerrada de CO₂ con posterior dislocación cervical, se procedió a disecar el fémur y la tibia de ambas patas traseras. Los huesos así disecados fueron recolectados en tubos Falcon de 50 ml con medio de cultivo celular DMEM (Dulbecco modified Eagles minimal essential medium, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) suplementado con penicilina (100 U/ml; Sigma-Aldrich, Misuri, USA) y sulfato de estroptomicina (100 μ g/ml; Sigma-Aldrich). Posteriormente, bajo flujo laminar, se procedió a extraer la médula ósea, introduciendo una aguja 25G conectada a jeringa de 10 ml con DMEM suplementado en la epífisis

del hueso. La médula ósea de cada animal así obtenida fue recolectada en tubos Falcon de 15 ml, centrifugada 5 minutos a 1500 rpm, y resuspendida en 6 ml de DMEM suplementado. Esto se siguió de la realización de un gradiente de densidad, utilizando 3 ml de Ficol (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) por cada 6 ml de suspensión de médula ósea y centrifugado, por 30 min a 1400 g, lo cual permitió aislar la banda mononuclear (BMMC) utilizando una pipeta Pasteur estéril de 3 ml. Las BMMC fueron lavadas con PBS 1X (buffer fosfato salino) para eliminar restos de Ficol y resuspendidas en DMEM suplementado a una densidad de 4×10^7 células/ml para realizar los ensayos *in vivo* de tratamiento con BMMC.

Obtención de MSC de rata y humanas

Las BMMC de rata, cuya forma de obtención fue descripta previamente, fueron resuspendidas en DMEM suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino, Natocor, Córdoba, Argentina) y sembradas a una densidad de 4×10^5 células/cm² en placa de Petri de 100mm (superficie total 55 cm²) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). El cambio de medio y eliminación de células no adherentes se realizó cada 4 días. A los 15 días de iniciado el cultivo, las células adheridas a la placa fueron repicadas utilizando Tripsina-EDTA (0.05%–0.02%; Sigma-Aldrich) y plaqueadas a una densidad de 10^4 células/cm² (pasaje 1). Este procedimiento se repitió hasta el pasaje cuatro, con el fin de obtener una población enriquecida de MSC.

Las MSC humanas se obtuvieron a partir de médula ósea de donantes sanos (Hospital Naval Pedro Mallo, Buenos Aires, Argentina), luego de informar su consentimiento. Brevemente, las células mononucleares (BMMC) recolectadas de la interfaz del gradiente de densidad de Ficol (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) se sembraron en placas en DMEM suplementado con 20% de SFB (Natocor). Después de 2 h de incubación, las células no adherentes se eliminaron por lavado con PBS 1X y las MSC adherentes fueron cultivadas y utilizadas para diferentes experimentos en pasajes 4 a 6. Las MSC humanas fueron caracterizadas de acuerdo a los lineamientos de la Sociedad Internacional para el uso de Terapia Celular, como se publicó previamente [102].

6 ENSAYOS CONDUCTUALES

Evaluación de la alodinia mecánica (Proyectos I, III.2 y III.3)

Se determinó la sensibilidad al estímulo mecánico según el método de Chaplan [49]. Las ratas fueron colocadas en domos de acrílico de 20 cm por 7 cm por 10 cm, apoyadas sobre una malla de alambre tejido con hueco de 3 mm por 3 mm, todo

sobre-elevado a una distancia de 50 cm desde la superficie de apoyo. Luego de 15 min de habituación, se procedió a la estimulación plantar usando una serie de filamentos de Von Frey (1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 26g; Stoelting Co, Illinois, USA), empezando por el filamento de 6 g. Toda estimulación se realizó en la región lateral (SNI) o central (crush del nervio ciático) de la superficie plantar de la pata posterior derecha del animal (ipsilateral) y de la izquierda (contralateral) (**Figura M2**). Se aplicó el filamento con una presión suficiente como para curvarlo al hacer contacto con la superficie plantar del animal.

En ausencia de una respuesta de retirada frente al filamento seleccionado inicialmente, se aplicó el filamento de mayor estímulo siguiente; en el caso de presentarse una respuesta de retirada, se aplicó el estímulo débil más próximo. Según Dixon y cols. (1980), el cálculo del umbral óptimo mediante este método, requiere de 6 respuestas en las inmediaciones más cercanas al umbral del 50% [78]. En consecuencia y dado que el umbral es desconocido, el conteo de los 6 valores no comienza hasta no observar la primera respuesta de retirada. En ese punto, el conteo de 6 respuestas comienza 1 valor antes del filamento con el que se generó la primera respuesta de retirada y se completa la serie realizando 4 estimulaciones más, ya sea en dirección ascendente o descendente. Por ende, utilizando este paradigma, el número total de respuestas registradas puede variar entre un mínimo de 4 (en el caso de que se observen respuestas de retirada con los 4 primeros pelos de manera descendente) a un máximo de 9 (en el caso de que se observe la primera respuesta de retirada en el pelo de 26 g).

El patrón resultante de respuestas positivas y/o negativas se tabuló, por convención, de la siguiente manera: X es retirada (positivo); 0 es no retirada (negativo), y el umbral de retirada del 50% se interpoló usando la fórmula:

$$\text{Umbral de retirada del 50\%} = (10(X_f + \kappa\delta)/10000)$$

Donde X_f es el valor (en unidades logarítmicas (log)) del último filamento de Von Frey aplicado; κ es el valor de la tabla según el patrón de respuestas positivas/negativas; y δ es la diferencia promedio (en unidades log) entre estímulos [49].

Lo descripto fue realizado tanto en ratas lesionadas tratadas con MSC (Proyecto III) y ratas tratadas con IMT504 o PolyC y naïve (Proyecto I). También se incluyeron ratas naïve y lesionadas tratadas con vehículo.

Figura M2. Representación del método de Von Frey con umbral del 50%. (A) Se destaca el área testeada durante el análisis de alodinia mecánica, la cual es compatible con la zona afectada dependiendo del modelo de lesión neuropática. **(B)** Se esquematiza la curvatura del filamento al ejercer la fuerza correcta de estimulación, junto con una fotografía representativa de la estimulación manual. **(C)** Ejemplos del método para evaluar el umbral de retirada para un animal con dolor (alodínico, izquierda) y otro sin dolor (no alodínico, derecha). Se inicia la estimulación con el filamento de 6 g, si el animal no responde entonces se aumenta el gramaje utilizando el filamento de 8 g, y así sucesivamente, hasta lograr una respuesta alodínica. Desde este momento, tomando además la estimulación previa a la primera respuesta, se completan las 6 iteraciones (o: no responde, x: responde).

Figure M2. Representation of 50% threshold Von Frey method. (A) The area was mechanical allodynia is tested is shown, which is compatible with the affected region, depending on the nerve injury model. **(B)** Schematic drawing of the curvature that the filament undergoes when the correct force is applied for stimulation, along with a representative image for manual stimulation. **(C)** Examples of the method used to study the withdrawal threshold for an animal with pain (allodynic, left) and one with no pain (non-allodynic, right). The stimulation starts with 6 g filament, if the rat does not respond, then the weight is increased to the 8 g filament, and so on until an allodynic response is manifested. From that point and taking into consideration the stimulation previous to the first response, the 6 iterations are completed (0: no response, x: responds).

A

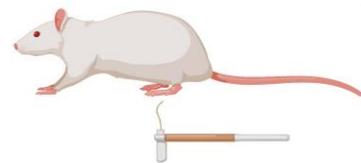


Área de testeo
(SNI)



Área de testeo
(CRUSH)

B



C

Alodínico

o x x x x x
6-8-6-4-2-1,4

No alodínico

o x o o o o
6-8-6-8-10-15

Evaluación de la alodinia térmica (Proyectos I, III.2 y III.3)

Luego de aclimatar a las ratas a los domos mencionados más arriba durante 15 min, se procedió a determinar la sensibilidad de las patas posteriores al estímulo frío, utilizando una versión modificada del método de Choi [59]. Así, se aplicó desde abajo del animal una gota de acetona formada en el extremo de una jeringa de 5 ml sobre la superficie plantar lateral (SNI) o central (crush) de la pata posterior derecha (ipsilateral) e izquierda (contralateral) del animal (**Figura M3**). La falta de retirada de la pata se calificó con valor 0, y la presencia de retirada con valor 1. Siguiendo este método, se obtuvo la frecuencia de retirada de la pata frente al estímulo frío. Cada valor de frecuencia se calculó a partir de 5 iteraciones (1 cada 5 min). Además, la respuesta frente al estímulo con acetona se graduó usando una escala de 4 puntajes: (0) ausencia de respuesta; (1) presencia de retira rápida, sacudida o estampida de la pata sobre el domo; (2) respuesta de retirada prolongada o sacudida repetida (≥ 2) de la pata; (3), sacudida repetida de la pata con lamido dirigido hacia el lado ventral de la pata [92]. Luego de las 5 iteraciones, se calculó el puntaje total generado, siendo el puntaje mínimo 0 (ausencia de respuesta en cada una de las 5 iteraciones) y el puntaje máximo 15 (sacudida repetida y lamida de la pata en cada una de las 5 iteraciones).

La alodinia al frío fue calculada en estado basal (previo a la lesión), y a diferentes tiempos de sobrevida post-lesión y post-tratamiento.

Una vez finalizados los experimentos conductuales, los animales fueron profundamente sedados en cámara de CO₂, decapitados y los tejidos de interés disecados en fresco; o profundamente anestesiados y perfundidos por vía cardíaca, para la obtención de tejidos fijados (ver más adelante procedimientos específicos).

Figura M3. Representación del método de Choi. (A) Se destaca el área testeada durante el análisis de alodinia al frío, la cual es compatible con la zona afectada, dependiendo del modelo de lesión neuropática. **(B-C)** Imágenes que caracterizan el procedimiento utilizado para la estimulación con la gota de acetona sobre la superficie plantar.

Figure M3. Representation of Choi method. (A) Indication of the tested area during cold allodynia analysis, which is compatible with the region affected, depending on the nerve injury model. **(B-C)** Representative images characterizing the procedure employed for the stimulation with a drop of acetone on the plantar surface.

A

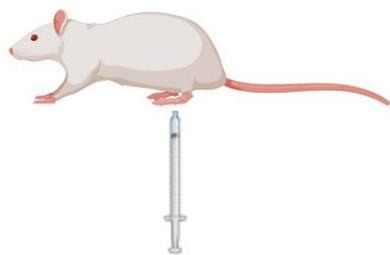


Área de testeo
(SNI)



Área de testeo
(CRUSH)

B

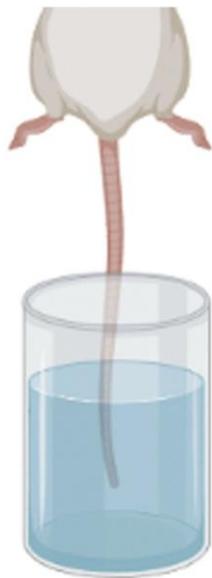


Evaluación de la respuesta nocifensiva al dolor agudo (Proyecto I)

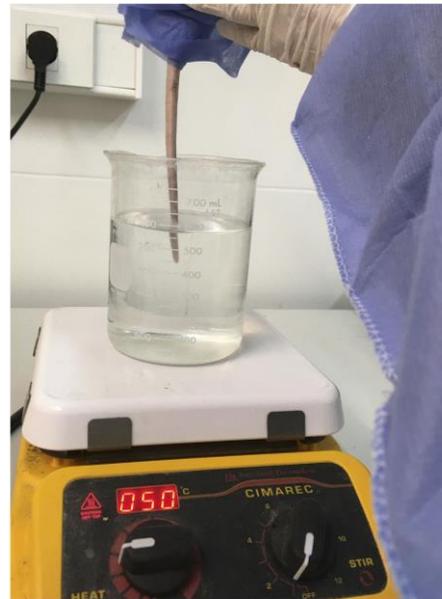
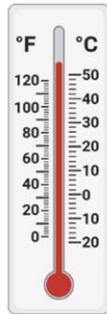
El estudio de respuesta nocifensiva (reflejo de retirada) al estímulo térmico agudo se llevó a cabo en ratas naïve o ratas lesionadas con el modelo de SNI, que recibieron vehículo, PolyC o IMT504 (6 mg/kg; s.c.), 7 días después de la lesión. Las ratas fueron testeadas, previamente a la lesión (conducta basal) y 3 y 21 días después de la administración del tratamiento. En estos grupos experimentales, se registró la latencia del movimiento de la cola, desde el momento de la inmersión en un baño de agua caliente (50°C) de los 3 cm distales de la misma [339] (**Figura M4**). El tiempo fue medido con un cronómetro (resolución 0.01s). Las mediciones se realizaron por triplicado, con intervalos de 10 s entre medición, y calculando el promedio de la respuesta obtenida.

Figura M4. Representación del estudio de nocicepción a un estímulo térmico aguda. La porción distal de la cola es sumergida en agua a 50°C, y se registra el tiempo de latencia de retirada de la cola. La línea interrumpida muestra el nivel de líquido, y la marca roja, hasta dónde se sumerge el extremo de la cola.

Figure M4. Representation of the acute thermal nociceptive method. The distal portion of the tail is submerged in water at 50°C, and the latency for the tail withdrawal is registered. The broken line shows the level of solution, and the red mark the extent of tail being immersed.



50°C



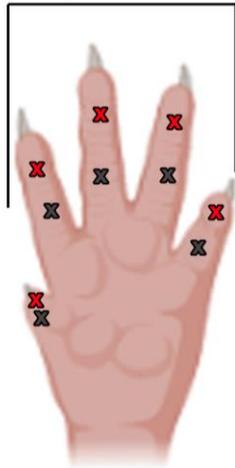
Evaluación del grado de autotomía (Proyecto II)

Se evaluó el grado de autotomía en los animales lesionados con el modelo de axotomía completa del nervio ciático y tratados con vehículo, MSC o IMT504 a intervalos regulares de 7 días, hasta los 28 días luego de la lesión. En cada observación asignamos un puntaje para indicar el grado de autotomía [91]. Se otorgó un puntaje de 1 por la eliminación de 1 o más uñas del pie. Dado que las uñas crecen rápidamente, fue posible que este signo apareciera y más tarde desapareciera. Se agregó un puntaje adicional de 1 por cada medio dígito distal atacado. Se agregó un puntaje adicional de 1 por cada medio dígito proximal atacado. Por lo tanto, si las uñas y todas las partes de los dedos de los pies fueran atacados, el puntaje final sería de 11 (**Figura M5**). Aquellos animales que llegaron a un puntaje de 11 o evidenciaban lesión de la superficie plantar del miembro lesionado, fueron sacrificados en cámara cerrada de CO₂ (esto nunca fue necesario).

Figura M5. Representación esquemática del sistema de puntaje de autotomía. En el modelo de axotomía del nervio ciático, se realizaron observaciones periódicas de la presencia de lesiones, úlceras y mutilaciones en el miembro afectado. Se asignó 1 punto por la eliminación de una o más uñas, 1 punto por la lesión de cada mitad distal de un dedo del pie, y 1 punto por la lesión de cada mitad proximal de un dedo del pie. La puntuación máxima para cada miembro trasero fue de 11.

Figure M5. Schematic representation of the autotomy scoring system. In the sciatic nerve axotomy model, periodic observations of the presence of injuries, ulcers and mutilations in the affected limb were made. 1 point was assigned for removal of one or more nails, 1 point for injury to each distal half of a toe, and 1 point for injury to each proximal half of a toe. The maximum score for each hind limb was 11.

1 punto (una o más uñas)



X 1 punto (mitad distal de cada dedo del pie)

X 1 punto (mitad proximal de cada dedo del pie)

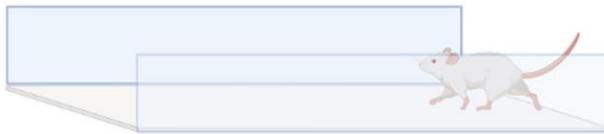
Evaluación de la locomoción (Proyecto III.2)

Los animales fueron ubicados en un sendero de 120 cm de largo por 15 cm de ancho, dentro de una caja de 20 cm de ancho por 20 cm de alto [128]. El fondo de este sendero fue cubierto completamente usando papel absorbente, cortado en las dimensiones apropiadas. Todos los animales fueron primero expuestos a tres ensayos de acondicionamiento previo **(M6A)**. Luego de sumergir las patas traseras de los animales en una tinta no tóxica, se les permitió caminar a lo largo del sendero, dejando las huellas de sus patas traseras marcadas en el papel. Se obtuvieron al menos 3 impresiones de huella de cada una de las patas, por sesión de locomoción. Las impresiones fueron medidas de diferentes maneras, usando el software ImageJ, a saber **(Figura M6B)**: (i) distancia desde el talón hasta el tercer dedo (PL); (ii) distancia desde el primero al quinto dedo del pie (TS); y (iii) distancia del segundo al cuarto dedo del pie (ITS). Las tres medidas fueron tomadas del lado ipsi- y contralateral y se calculó el índice funcional del nervio ciático (SFI, por sus siglas en inglés) [77,304]. Un valor de 0 indica que el nervio ciático está sano completamente, mientras que un valor de -100 indica un deterioro total de la función del nervio ciático. El área de pisada se delineó manualmente y se cuantificó usando el software ImageJ. Posteriormente, se calculó la relación entre el área de los lados ipsi- y contralateral.

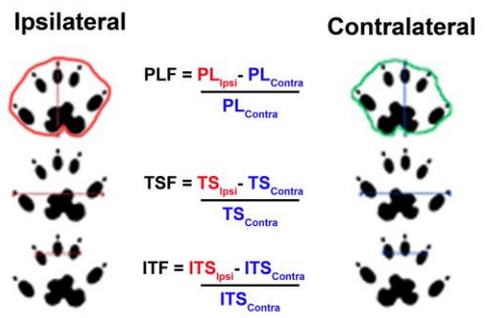
Figura M6. Análisis de locomoción. (A) Se permitió que las ratas caminaran en una pasarela acrílica con las patas traseras pintadas para determinar el índice funcional del nervio ciático (SFI). **(B)** En la huella obtenida se midió la distancia entre el primer y quinto dedo del pie (TS), entre el segundo y cuarto dedo (ITS) y la longitud de la huella desde el tercer dedo hasta el final de los pies (PL) tanto en el lado ipsilateral como contralateral. En verde, un ejemplo que muestra cómo se determinó cada área de pisada.

Figure M6. Walking Track analysis. (A) Rats were allowed to walk in an acrylic walkway with their hind feet painted in order to determine sciatic functional index (SFI). **(B)** In the footprint obtained, the distance between the first and fifth toe (TS), between the second and fourth toes (ITS) and the length of the footprint from the third toe to the end of the feet (PL) were measured in the ipsilateral and contralateral side. In green, an example showing how each area was determined manually.

A



B



$$SFI = 38,3xPLF + 109,5xTSF + 13,3xITF - 8,8$$

7 ESTUDIOS ELECTROMIOGRÁFICOS (Proyecto III.2)

La evaluación funcional de la denervación y reinervación de la pata trasera lesionada se realizó a través del registro de la latencia distal y la amplitud del complejo del potencial de acción del músculo (CMAP), con un equipo de electromiografía portátil (Cadwell Wedge Sierra II, Cadwell Labs, Washington, USA), a diferentes sobrevidas después de la lesión (0, 7, 14, 21,28 y 35). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (75 mg/kg i.p.) y xilacina (10 mg/kg i.p.) (Laboratorio Richmond), manteniendo la temperatura corporal del animal a 37°C con una almohadilla eléctrica. El electrodo de registro se colocó en el músculo soleo de la pata trasera, y el electrodo de tierra en la cola de la rata. Se expuso el nervio ciático ipsilateral y se estimuló el área proximal y distal a la compresión. El mismo procedimiento se llevó a cabo en el nervio contralateral y en el nervio de animales naïve. La intensidad del estímulo fue de 30 mA, que cuando indujo una pequeña contracción de la pata trasera, fue interpretado como estímulo positivo.

8 CITOMETRÍA DE FLUJO (Proyectos I y II)

El análisis de movilización y migración *in vivo* de MSC se realizó a través de la determinación del porcentaje de esta población celular en los distintos tejidos estudiados.

Para el Proyecto I, los tejidos analizados fueron médula ósea, sangre periférica y nervio ciático ipsilateral de ratas naïve y de ratas lesionadas que recibieron vehículo (SNI+VEH-L) o tratamiento con IMT504 (SNI+IMT504-L), obtenidos 3 y 21 días postratamiento. Los animales fueron sedados con Isoflurano, obteniéndose 5 ml de sangre periférica por punción cardíaca, que fue recolectada en un tubo conteniendo el anticoagulante heparina. Posteriormente, se armó un gradiente de densidad utilizando 5 ml de sangre por cada 3 ml de Ficol (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich), el gradiente se centrifugó a 1400 g durante 30 min. La fracción mononuclear fue separada con pipeta Pasteur de 3 ml y lavada dos veces con PBS 1X. La suspensión de células mononucleares de sangre periférica fue centrifugada durante 5 min a 1500 rpm y el pellet celular fue resuspendido en 1 ml de PBS 1X para su posterior análisis. La obtención de BMMC se realizó a partir de un gradiente de densidad (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) de médula ósea, la cual fue obtenida a partir de los huesos femorales y tibiales, como se describió previamente (Sección 5). Las BMMC se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X para su posterior análisis. Para el procesamiento de los nervios ipsilaterales se procedió a extraer un segmento proximal al sitio de la lesión (o del nervio ciático derecho en animales naïve) de 1 cm de extensión, teniendo cuidado al

remover previamente la sutura y se lo colocó en PBS 1X. Los nervios fueron disgregados enzimáticamente con solución de Papaina (15 U/ml) y DNasa (10 µg/ml); (Papaina, Roche, Thermo-Fisher; DNasa, Sigma-Aldrich) a 37°C por 30 min y disgregados mecánicamente con un homogeneizador de teflón. Las muestras fueron resuspendidas en PBS 1X y filtradas utilizando una malla de nylon con poros de 40 µm (AP-Biotech, Buenos Aires, Argentina), para su posterior análisis. Los nervios contralaterales fueron tomados 21 días postratamiento y procesados de la misma forma que los nervios ipsilaterales.

Para el Proyecto II, los tejidos analizados fueron nervio ciático y DRG L4-L6 ipsi- y contralaterales de ratas naïve, o lesionadas que recibieron vehículo (AXT+VEH) o tratamiento con IMT504 (AXT+IMT504), y obtenidos 14 y 28 días posteriores a la lesión. Los animales fueron sacrificados en cámara cerrada de CO₂ y dislocados. Rápidamente, los nervios y ganglios fueron disecados en fresco y colocados en PBS 1X. Se siguió el mismo protocolo (disgregación enzimática y mecánica) para ambos tejidos, como se describió previamente para el procesamiento de los nervios del Proyecto I. Las células provenientes de los nervios y ganglios fueron resuspendidas en PBS 1X y las suspensiones celulares filtradas utilizando una malla de nylon con poros de 40 µm (AP-Biotech) para su posterior análisis.

Para ambos proyectos, se determinó la concentración celular de las muestras obtenidas de los distintos tejidos a través de la utilización del colorante vital Trypan Blue (Sigma, USA). De cada una de las muestras se tomaron 10⁶ células y se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X. Las células fueron fijadas con PFA 4% (paraformaldehído, Bio-pack, Buenos Aires, Argentina) durante 20 min, lavadas 2 veces con PBS 1X y resuspendidas en 1 ml de buffer FACS (buffer de tinción para citometría de flujo, 1 % albúmina sérica bovina y 0.05 % azida de sodio (NaN₃) en PBS 1X). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios monoclonales que caracterizan fenotípicamente a las MSC [119]: (ver **Tabla M1**): anti-CD45-Alexa Flúor 488 (1:200, clone OX-1; BioLegend, California, USA), anti-CD90-PE (1:100, clone KW322; BioLegend) y anti-CD29- Alexa Flúor 647 (1:50, clone HMβ1-1; BioLegend). Como controles negativos se utilizaron células incubadas sin anticuerpos (auto-fluorescencia) y células incubadas con los anticuerpos de isotipo control de la misma especie que los anticuerpos primarios (anti-IgG1κ-Alexa Flúor 488 o PE de ratón y anti-IgG-Alexa Flúor 647 Armenian hamster; BioLegend). Luego de la incubación por 30 min con los anticuerpos primarios o los controles de isotipo correspondientes, las muestras se lavaron 2 veces con solución FACS, se centrifugaron 5 min a 1500 rpm, se fijaron en PFA 4% durante 20 min, se lavaron dos veces con solución FACS y se dejaron en 20 µl de FACS. La estrategia de análisis se basó en seleccionar la población celular de

interés según los parámetros de tamaño y complejidad (Forward Scatter vs Side Scatter), excluyendo células no viables y sus restos. Posteriormente se seleccionó la población CD45⁻ del panel FSC vs CD45 y de esta población pre-seleccionada, se analizó la población doblemente positiva del panel CD90 vs CD29 (**Figuras M7-8**).

La citometría de flujo se llevó a cabo en un equipo FACS Aria II (BD Biosciences, NJ, USA) y los resultados fueron analizados en el software FlowJo v10 (BD Biosciences). La población de MSC (células CD45⁻CD90⁺CD29⁺) se expresa como porcentaje de valores absolutos (células totales).

Tabla M1. Lista y características de los anticuerpos utilizados en esta tesis. CF, citometría de flujo; IF, inmunofluorescencia; WB, Western blot.

Table M1. List and characteristics of the antibodies used in this thesis. CF, flow cytometry; IF, Immunofluorescence; WB, Western blot.

Inmunomarcador	Catálogo	Especie	Dilución	Aplicación	Referencia
Anticuerpos primarios					
CD45 Alexa Flúor 488	202210	Ratón	1:200	Proyectos I y II: CF	Biolegend, California, USA
CD90 PE	205903	Ratón	1:100	Proyectos I y II: CF	
CD29 Alexa Flúor 647	102214	Hamster armenio	1:50	Proyectos I y II: CF	
Vimentina	ab45939	Conejo	1:1000	Proyecto I : IF	Abcam, Cambridge, UK
GFAP	G3893	Ratón	1:2000	Proyecto II: IF	Sigma-Aldrich, Misuri, USA
CD11b/c	CBL1512	Ratón	1:2000	Proyecto II: IF	Millipore, Massachusetts, USA
MBP	800403	Conejo	1:1500	Proyecto III.1: WB, IF	Biolegend, California, USA
β III-tubulina	802001	Conejo	1:7500	Proyecto III.1: WB, IF	
GAPDH	ab8245	Ratón	1:5000	Proyecto III.1: WB, IF	
Anticuerpos secundarios					
anti-conejo FITC	711-095-152	Burro	1:200	Proyecto I: IF	Jackson Immuno Research, Pensilvania, USA
anti-conejo Rodamina	711-085-152	Burro	1:200	Proyecto I: IF	
anti-ratón HRP	715-035-150	Burro	1:200	Proyecto II: IF	
anti-conejo HRP	115-035-146	Cabra	1:8000	Proyecto III.1: WB	
anti-ratón HRP	111-035-003	Burro	1:8000	Proyecto III.1: WB	
anti-conejo Alexa Flúor 546	115-165-166	Cabra	1:200	Proyecto III.1: IF	
anti-ratón Alexa Flúor 488	111-165-144	Cabra	1:500	Proyecto III.1: IF	

Figura M7. Estrategia de análisis para la identificación de MSC (células CD45⁻CD90⁺CD29⁺) en el modelo de SNI. (A-F) En el nervio ciático ipsilateral (A y D), sangre periférica (B y E) y médula ósea (C y F), de ratas naïve (A-F superior), SNI+VEH-L (A-F medio) o SNI+IMT504-L (A-F inferior), 3 (A-C) o 21 (D-F) días después del tratamiento. (A-F izquierda) Los dot-plots representan la distribución de células CD45⁻. (A-F derecha) Los dot-plots representan la distribución de células CD90⁺CD29⁺a partir de la pre-selección de células CD45⁻. **(G)** En el nervio ciático contralateral de ratas SNI+VEH-L (G izquierda) y SNI+IMT504-L (G derecha), 21 días después del tratamiento. Metodología utilizada para la obtención de la Figura 6 en sección resultados.

Figure M7. Flow cytometry gating strategy to identify MSC (CD45⁻CD90⁺CD29⁺ cells) in SNI model. (A-F) In the ipsilateral sciatic nerve (A and D), peripheral blood (B and E) and bone marrow (C and F), from naïve (A-F upper), SNI+VEH-L (A-F center) or SNI+IMT504-L (A-F bottom) rats, 3 (A-C) or 21 (D-F) days after treatment. (A-F left) Dot-plots show representative distribution of CD45⁻ cells. (A-F right) Dot-plots show representative signal distribution of CD90⁺CD29⁺ cells identified from CD45⁻ pre-selected cells. **(G)** In the contralateral sciatic nerve from SNI+VEH-L (G left) and SNI+IMT504-L (G right) rats, 21 days after treatment. Methodology used to obtain the Figure 6 in the results section.

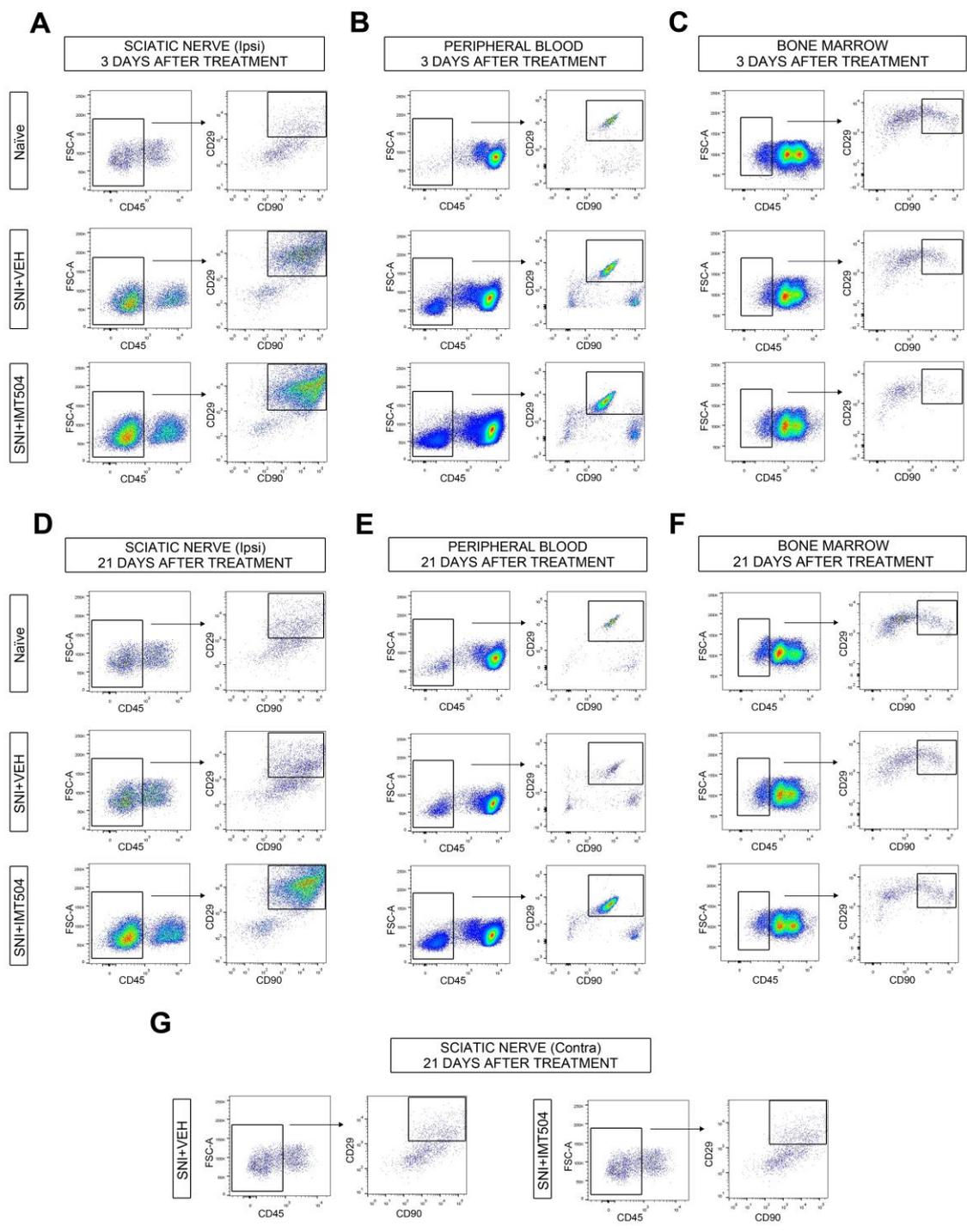
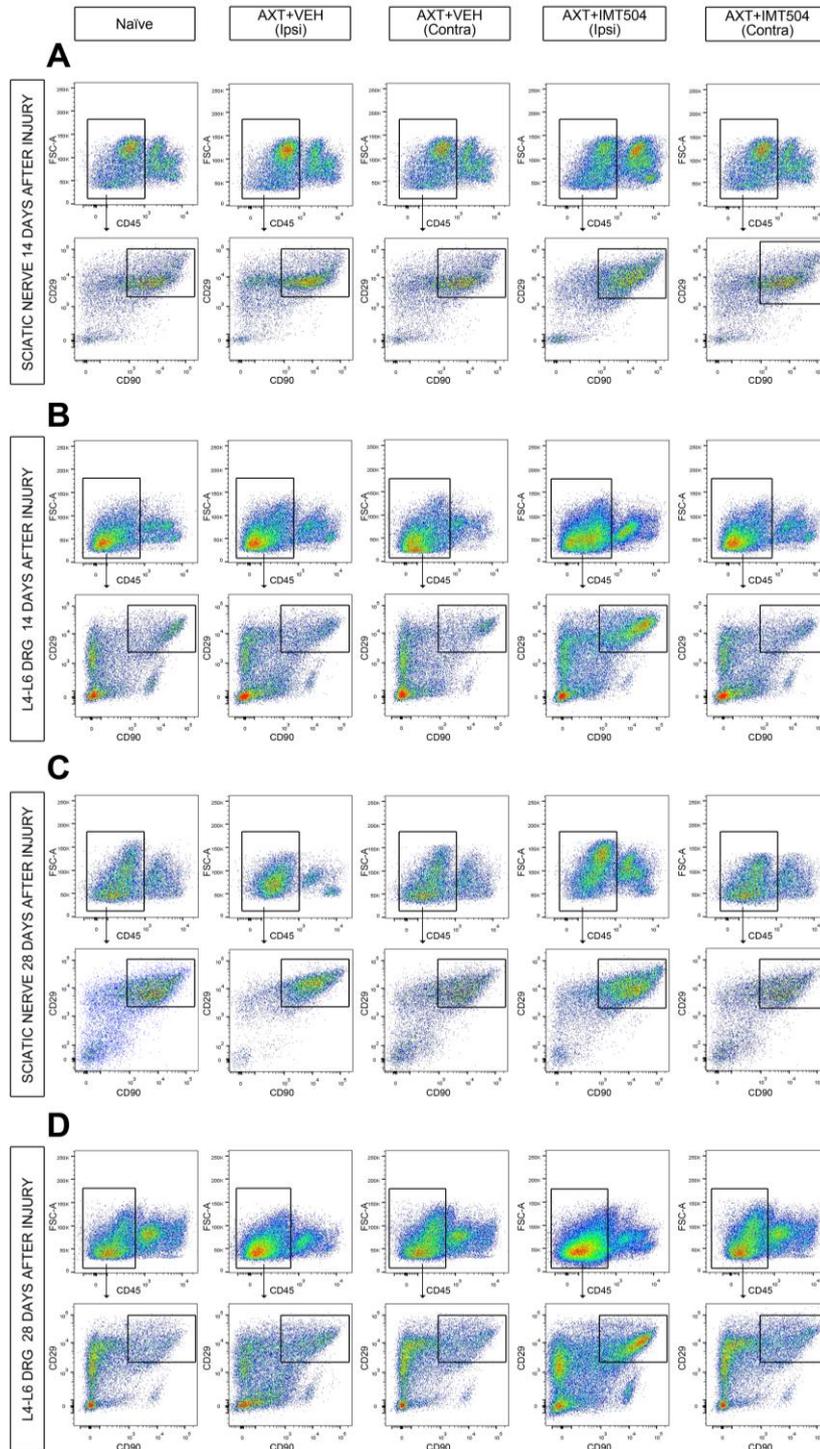


Figura M8. Estrategia de análisis para la identificación de MSC (células CD45⁻CD90⁺CD29⁺) en el modelo de axotomía completa del nervio ciático. (A-D) En los nervios ipsi y contralaterales (A y C) y en los DRG L4-L6 ipsi- y contralaterales (B y D), de ratas naïve, AXT+VEH, o AXT+IMT504, 14 (A-B) o 28 (C-D) días después de la lesión. (A-D superior) Los dot-plots representan la distribución de células CD45⁻. (A-D inferior) Los dot-plots representan la distribución de células CD90⁺CD29⁺ a partir de la pre-selección de células CD45⁻. Metodología utilizada para la obtención de la Figura 15 en sección resultados.

Figure M8. Flow cytometry gating strategy to identify MSC (CD45⁻CD90⁺CD29⁺ cells) in the complete transection sciatic nerve model. (A-D) In ipsi- and contralateral nerves (A and C) and ipsi and contralateral (B and D) DRG L4-L6, from naïve, AXT+VEH or AXT+IMT504 rats, 14 (A-B) or 28 (C-D) days after treatment. (A-D upper) Dot-plots show representative distribution of CD45⁻ cells. (A-D bottom) Dot-plots show representative signal distribution of CD90⁺CD29⁺ cells identified from CD45⁻ pre-selected cells. Methodology used to obtain the Figure 15 in the results section.



9 RECUENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE FIBROBLASTOS (CFU-F) (Proyecto I)

Ratas naïve y lesionadas tratadas con vehículo (SNI+VEH-L) o IMT504 (SNI+IMT504-L) fueron sacrificadas, 3 y 21 días postratamiento, en cámara de CO₂ y decapitadas rápidamente. Esto se siguió del procesamiento de la médula ósea de fémur y tibia, como se describió anteriormente, para la obtención de BMMC (Sección 5). Se resuspendieron 2x10⁶ BMMC en 3 ml de medio DMEM (Gibco) suplementado con glutamina (2 mM; Gibco), penicilina (100 U/ml; Sigma-Aldrich), sulfato de estreptomincina (100 µg/ml; Sigma-Aldrich) y 10% SFB (Natocor) y se cultivaron en placas de 6 pocillos (Greiner Bio-One), a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Las células no adherentes se removieron lavando la placa con PBS 1X y cambiando el medio de cultivo cada 4 días. A los 14 días de iniciado el cultivo, las células adheridas a la placa fueron fijadas con PFA 4% (Bio-pack) durante 20 min, lavadas dos veces con PBS 1X, teñidas con colorante Giemsa (Bio-pack) durante 20 min y lavadas 2 veces con PBS 1X. Se cuantificó el número de CFU-F (colonias con al menos 50 células) por placa, usando un microscopio de luz blanca (Eclipse E-800, Nikon, Tokio, Japón) con un objetivo de magnificación de 10X. Los resultados se expresan como la media de CFU-F por cada 2x10⁶ BMMC plaqueadas.

10 MIGRACIÓN *IN VITRO* DE MSC DE RATAS Y HUMANAS (Proyecto I)

El ensayo de migración fue diseñado para determinar el efecto del pre-tratamiento con IMT504 sobre la capacidad de las MSC de migrar hacia medios condicionados obtenidos de nervios de ratas naïve y ratas lesionadas.

10.1 Medio condicionado de nervio ciático

Para la obtención de los medios condicionados, se sacrificaron animales naïve y animales con 7 días de lesión, en cámara cerrada de CO₂ seguida por una decapitación rápida. Luego, se procedió a la disección de los nervios ipsi- (derecho en animales naïve) y contralateral (izquierdo en animales naïve), tomándose segmentos de 1 cm de extensión, proximal al sitio de lesión o trifurcación. Cada uno de los segmentos fue colocado en 1 ml de DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con penicilina (100 U/ml; Sigma-Aldrich) y sulfato de estreptomincina (100 µg/ml; Sigma-Aldrich), por 30 minutos, en hielo, hasta su procesamiento. Posteriormente, los nervios pertenecientes a cada grupo experimental fueron transferidos de a pares a una placa de cultivo de 6 pocillos con 2 ml de DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado (sin suero

fetal bovino) e incubados a 37°C en atmosfera de 5% CO₂, durante 16 h. El sobrenadante de cada uno de los grupos experimentales fue recolectado y centrifugado a 13000 rpm durante 10 min, para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido (medio condicionado) se guardó a -80°C hasta su utilización.

10.2 Ensayo de migración *in vitro*

El ensayo de migración fue llevado a cabo en cámaras de quimiotaxis de 48 pocillos (Neuroprobe Inc., Maryland, USA). Las células de rata y humanas fueron pre-tratadas con IMT504 (7 µg/ml IMT504 en DMEM suplementado, sin SFB; 16 h) o no, y plaqueadas a una densidad de 1.2×10^3 células/pocillo en la cámara superior, separada de la cámara inferior por una membrana de policarbonato de 8 µm de poro (Nucleopore membrane, Neuroprobe Inc.). En la cámara inferior se colocaron 28 µl de DMEM (Sigma-Aldrich) o medio condicionado de nervio. La cámara de quimiotaxis fue incubada durante 5 h a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, se removió cuidadosamente la membrana de policarbonato y las células adheridas al lado de abajo de la membrana fueron fijadas con PFA 2% (Bio-pack) durante 20 min y lavadas 3 veces con PBS 1X. Las células presentes en el lado superior de la membrana fueron removidas, raspando la membrana con una cuchilla. Las células adheridas se tiñeron con colorante nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 1 µg/ml; Sigma-Aldrich) y la membrana se montó sobre un portaobjeto con DABCO 2.5% (1,4-diazobis[2.2.2]-octano; Sigma-Aldrich) en glicerol. Los núcleos celulares se contaron con microscopio de epi-fluorescencia (Eclipse Ni, H-600L, Intensilight C-HGFIE, Nikon) con un objetivo de magnificación de 10x. Se realizaron tres experimentos independientes, y para cada experimento, se analizaron cada una de las condiciones por cuatriplicado. Para la cuantificación se tomaron 3 campos visuales por cada pocillo, siendo un total de 12 campos por cada grupo experimental, por experimento, utilizando el programa Cell Profiler. Los resultados se expresan como la media de células migrantes por campo.

11 ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA INTERNALIZACIÓN DE IMT504 EN MSC DE RATAS Y HUMANAS (Proyecto I)

Para el análisis de internalización de IMT504, las MSC obtenidas como se describió previamente (Sección 5 de la Metodología), fueron cultivadas sobre cubreobjetos contenidos dentro de placas de cultivo de 6 pocillos, en DMEM (Sigma) suplementado (sin suero) durante 16 h. Posteriormente, el medio se removió y se

reemplazó por DMEM (Sigma) suplementado con 7 µg/ml de IMT504 conjugado con Alexa Flúor 488 o Texas Red (Biosynthesis). Luego de 16 h de incubación, los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con PBS 1X, fijados con PFA 4% (Bio-pack) durante 20 min y lavados dos veces con PBS 1X. Las células se permeabilizaron con Triton-X100 (0,2% v/v, Sigma) por 5 min y se lavaron 2 veces con PBS 1X. Esto fue seguido de una incubación con BSA (albumina sérica bovina, 5% p/v en PBS, solución de bloqueo (Sigma)) por 1 h a temperatura ambiente, para bloquear uniones no específicas. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-vimentina (1:1000, Abcam, Cambridge, UK) diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS 1X, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-conejo IgG-FITC (1:200; Jackson Immuno Research, Pensilvania, USA) o el anticuerpo anti-conejo IgG-rodamina (1:200; Jackson Immuno Research), diluidos en solución de bloqueo (ver **Tabla M1**). Los núcleos celulares fueron visualizados por su tinción con colorante nuclear DAPI (1 µg/ml, 20 min de incubación; Sigma-Aldrich), seguido de 2 lavados con PBS 1X. El montaje de los cubreobjetos se realizó con DABCO 2.5% (Sigma-Aldrich) en glicerol. Las microfotografías de las MSC incubadas con IMT504-Alexa Flúor 488 fueron tomadas con un microscopio de epi-fluorescencia (Eclipse Ni, H-600L, Intensilight C-HGFIE, Nikon) y capturadas con una cámara digital (DS-Qi2, Nikon) objetivos de magnificación 20x (Plan Apoλ 0.75, OFN25, DIC N2) y 40x (Plan Apoλ0.95, 0.11-0.23, WD 0.25-0.17). Todas las imágenes fueron tomadas con la misma intensidad de fluorescencia y los mismos parámetros de exposición. Adicionalmente, las células cultivadas con IMT504-Texas Red fueron fotografiadas utilizando el microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000, con objetivo de magnificación de 60x (Olympus, Tokio, Japón). El procesamiento y análisis de imágenes se realizó con los programas FV10-ASW Fluoview (Olympus) e ImageJ (NIH, Maryland, USA).

12 ELISA (Proyectos I y II)

Para el Proyecto I, ratas naïve y lesionadas que recibieron vehículo (SNI+VEH-L) o IMT504 (SNI+IMT504-L) fueron sacrificadas, 3 y 21 días después del tratamiento, en cámara de CO₂ y rápidamente decapitadas. Los nervios ipsilaterales (o el nervio ciático derecho en animales naïve) fueron disecaron en fresco y se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

Para el Proyecto II, ratas naïve y lesionadas que recibieron vehículo (AXT+VEH-L) o IMT504 (AXT+IMT504-L) fueron sacrificadas, 28 días luego de la lesión, en cámara de CO₂ y rápidamente decapitadas. La disección de los nervios ipsilaterales (o el

nervio ciático derecho en animales naïve) y de las médulas espinales ipsilaterales (mitad derecha de la médula espinal en animales naïve) se realizó en fresco. Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su procesamiento.

Para ambos proyectos, la cuantificación de proteínas totales y de citoquinas pro- (TNF- α e IL-1 β) y anti- (IL-10 y TGF- β 1) inflamatorias se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Abcam, Cambridge, UK). Los resultados se expresan como picogramo de citoquina por miligramo de proteínas totales (pg/mg).

13 CO-CULTIVO DE MSC DE RATAS Y NERVIOS LESIONADOS (Proyecto I)

Las MSC resuspendidas en medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con glutamina (2 mM; Sigma-Aldrich), penicilina (100 U/ml: Sigma-Aldrich), sulfato de estreptomicina (100 μ g/ml: Sigma-Aldrich) y 10 % SFB (Natocor) fueron cultivadas en placas de 6 pocillos e incubadas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Cuando las MSC se adhirieron a la placa y ocuparon un 80% de la superficie total, fueron pre-tratadas con 7 μ g /ml de IMT504 o 7 μ g/ml de PolyC (en DMEM suplementado, sin suero) durante 16 h. Transcurrido este tiempo, las células adheridas a la placa fueron lavadas dos veces con PBS 1X e incubadas con DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado. En cada uno de los 6 pocillos de la placa y por sobre las células, se colocó un transwell con inserto de membrana de policarbonato de 0.4 μ m de poro (Millipore, Massachusetts, USA). Sobre el transwell se colocaron dos segmentos de nervio ciático ipsilateral obtenidos de ratas con 7 días de lesión (extensión de 1 cm proximal a la ligadura). Los co-cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 16 h. Adicionalmente, se cultivaron MSC o nervios ipsilaterales, por separado, con IMT504 (7 μ g /ml), PolyC (7 μ g /ml), o DMEM (sin ningún tratamiento), en las mismas condiciones de temperatura y atmósfera que los co-cultivos. Se realizaron 4 experimentos independientes para cada una de las condiciones evaluadas.

14 RT-qPCR (Proyecto I)

Para los estudios *in vivo*, animales naïve y lesionados tratados con vehículo (SNI+VEH-L) o IMT504 (SNI+IMT504-L) fueron sacrificados en cámara de CO₂ y decapitados rápidamente, 3 y 21 días postratamiento. Se disecaron los nervios ipsilaterales (lado derecho en animales naïve), se colocaron en 1 ml de Trizol (Invitrogen, Maryland, USA) y se guardaron a -80°C hasta su procesamiento. Para los estudios *in vitro* a partir de co-cultivos, los nervios fueron retirados de la placa,

colocados en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y guardados a -80°C hasta su procesamiento. Luego, se descartó el transwell y el medio de cultivo, y las MSC se lavaron 2 veces con PBS 1X y se disgregaron con 1 ml de Trizol (Invitrogen), guardándose a -80°C hasta su procesamiento. Para los cultivos simples de nervios o MSC se procedió de la misma forma.

La extracción de ARN de cada una de las muestras, se realizó por disgregación mecánica en Trizol y adicionalmente el ARN se limpió y concentró, usando el kit comercial RNA clean and concentrator (ZymoResearch, California, USA – Donado por el Profesor Tomas Hökfelt del Instituto Karolinska) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La concentración de ARN total y su pureza fueron determinadas usando espectrofotometría (NanoDrop™ OneMicrovolume, Thermo-Fisher). La transcripción reversa se llevó a cabo a partir de 2 µg de ARN total usando la transcriptasa reversa Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Promega, Wisconsin, USA). Los niveles de ARN mensajero de *Cxcl-12*, *Cxcr4*, *Tnf-α*, *Il-1β*, *Il-10* y *Tgf-β1* se cuantificaron usando SYBR® Green (Bio-rad, California, USA), relativizándose al control interno β-actina. Las secuencias nucleotídicas utilizadas se describen en la **Tabla M2**.

Los resultados obtenidos se calcularon como $2(\Delta\Delta Ct)$ y se expresan como incremento relativo al control correspondiente (experimentos *in vivo*: nervio de animales naïve; experimentos *in vitro*: MSC cultivadas en DMEM o nervio ipsilateral de animales de 7 días de lesión cultivados en DMEM, según corresponda). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, utilizando un control negativo (sin primers) por cada ensayo.

Tabla M2. Secuencia de cebadores utilizados en esta tesis.

Table M2. Sequence of the primers used in this thesis.

Secuencia		
Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (3'-5')
<i>β-actin</i>	TACCATGCCAACTTCTGTCTGGGA	TACCATGCCAACTTCTGTCTGGGA
<i>Tnf-α</i>	TCGTAGCAAACCACCAAGCA	CCCTTGAAGAGAACCTGGGAGTA
<i>Il-1β</i>	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGTTCCATGGTGAAGTCAAC
<i>Il-10</i>	TACCATGCCAACTTCTGTCTGGGA	TACCATGCCAACTTCTGTCTGGGA
<i>Tgf-β1</i>	TACCATGCCAACTTCTGTCTGGGA	TACCATGCCAACTTCTGTCTGGGA
<i>Cxcl12</i>	TGCATCAGTGACGGTAAGCCA	ATCCAATTTAATTTTCGGGTCAA
<i>Cxcr4</i>	TCCTGCCCAACCATCTATTTTATC	ATGATATGCACAGCCTTACAT

15 WESTERN BLOT (Proyecto III.2)

Se disecaron los nervios de animales naïve y de animales lesionados (segmento distal al sitio de la lesión) tratados, 7 días después de la lesión, con vehículo o BMMC. Las muestras se obtuvieron 14, 21 y 28 días después de la lesión. El tejido fue homogeneizado en buffer TOTEX (20 mM Hepes, pH 7.9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 20% glycerol, 1% NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas (set III; Sigma-Aldrich). La cuantificación de proteínas se realizó a través del método de Bradford.

Las proteínas fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida-SDS al 12.5% y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45 µm de poro. La unión de las proteínas a sitios no específicos se bloqueó por incubación con solución de leche descremada al 5% en PBS y Tween 20 0,1%, durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con buffer TBS-T 1X (buffer salino TRIS con Tween 20) para luego incubar las membranas durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-MBP de ratón, proteína utilizada para evaluar re-mielinización (1:1500, clone SMI 99, Biolegend) y anti-βIII-tubulina de conejo, proteína de citoesqueleto involucrada en el guiado y mantenimiento axonal, utilizada para evaluar integridad axonal (1:7500, clone 18020, Biolegend). El anticuerpo primario anti-GAPDH de ratón (1:5000, clone 6C5, Abcam, USA) fue utilizado como control. Luego, se repitieron los lavados con buffer TBS-T 1X y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con peroxidasa y anti-ratón (1:8000, Jackson Immuno Research) durante 90 min a temperatura ambiente (ver **Tabla M1**). Finalmente, las membranas fueron incubadas en solución de quimioluminiscencia para el revelado (Biolumina, Kalium Technologies, Buenos Aires, Argentina) y la señal obtenida fue detectada con un escáner (LAS 500, GE Healthcare, Illinois, USA). La intensidad relativa de los ensayos de inmunotransferencia fue cuantificada con el programa ImageJ. La intensidad de fluorescencia integrada (IOD) de las bandas de MBP y βIII-tubulina fueron relativizadas a los valores de GAPDH.

16 INMUNOFLUORESCENCIA (Proyectos II y III.2)

Análisis de marcadores de astrogliá y microglía (Proyecto II)

Ratas naïve y lesionadas que recibieron vehículo (AXT+VEH) o IMT504 (AXT+IMT504), fueron anestesiadas profundamente con hidrato de cloral (350 mg/kg; Biopack) y perfundidas 14 y 28 días después de la lesión. La perfusión se realizó por

vía de la arteria aorta ascendente usando 20 ml de buffer Tyrode (37°C), seguido por 20 ml de una solución fijadora compuesta por PFA 4% y ácido pícrico 0.2% en buffer fosfato 0.16 M (pH 6.9, 37°C) y 50 ml de la misma solución fijadora a 4°C [335]. Seguidamente, se procedió a la disección de los DRG L4-L6 (ipsi- y contralateral en animales lesionados; derecho e izquierdo en animales naïve) y la médula espinal a nivel del ensanchamiento lumbar, colocándose los tejidos en la misma solución fijadora a 4°C durante 90 min, seguido por 24 h de inmersión en sacarosa 10% y 20% disuelta en PBS 1X (pH 7.4) a 4°C. Luego, para el armado de los tacos, los DRG y los segmentos espinales fueron embebidos en el medio de montaje OCT Cryoplast (Biopack), congelados en nitrógeno líquido y seccionados transversalmente (DRG grosor 14 µm; médula espinal grosor 16 µm) usando un crióstato (HM525 NX, Thermo-Fisher), para ser finalmente montados en portaobjetos.

La marcación por inmunofluorescencia se realizó utilizando un kit comercial basado en la amplificación de la señal por tiramida [4] (TSA™ Plus, NEN Life Science Products Inc., Massachusetts, USA). Las secciones fueron lavadas en PBS 1X (15 min) e incubadas en 0.02% peróxido de hidrógeno diluido en PBS 1X durante 30 min, seguido de incubación con anticuerpos de ratón anti-rata: anti-CD11b/c para la detección de la microglía (Integrina αM/OX42, 1:2000, Millipore) en los cortes de médula espinal y anti-GFAP (Proteína ácida fibrilar glial, 1:2000; Sigma-Aldrich) en los cortes de DRG y médula espinal, durante la noche. Al día siguiente, las secciones fueron lavadas en buffer TNT (0.1M Tris-HCl, pH 7.5; 0.15M NaCl; 0.05% Tween 20) dos veces durante 10 min, e incubadas en buffer TNB (kit; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 M NaCl; 0.5% Reactivo de Bloqueo Dupont; NEN) por 30 min a temperatura ambiente, seguido por una incubación de 60 min con anticuerpo secundario HRP de burro anti-ratón (diluido 1:200 en buffer TNB, Jackson Immuno Research) (ver **Tabla M1**). Seguidamente, se realizaron dos lavados en buffer TNT y se procedió a la incubación con un conjugado de Isotiocianato de fluoresceína y tiramida biotinilada (BT-FITC) (kit; NEL741, NEN), diluido 1:700 en diluyente de amplificación (kit; NEN) durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con DAPI (Sigma-Aldrich) durante 30 min para la marcación de núcleos celulares, seguido por dos lavados en PBS 1X de 15 min cada uno. Finalmente, las secciones fueron montadas con cubreobjeto utilizando DABCO 2.5% (Sigma-Aldrich) en glicerol, y guardadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio de epi-fluorescencia (Eclipse Ni, H-600L, Intensilight C-HGFIE, Nikon) y capturadas con una cámara digital (DS-Qi2, Nikon) objetivos de magnificación 20x (Plan Apoλ 0.75, OFN25, DIC N2) y

40x (Plan Apoλ 0.95, 0.11-0.23, WD 0.25-0.17). Todas las imágenes fueron tomadas bajo los mismos parámetros de intensidad lumínica y exposición.

Para el análisis de glía reactiva (gliosis), se utilizaron 6 secciones de cada DRG separadas por 84 μm y 6 secciones de cada médula espinal separadas por 96 μm. En los DRG se analizó el % de neuronas rodeadas por células gliales satélites (SGC) positivas para GFAP. Las neuronas y las SGC se distinguieron fácilmente usando DAPI, ya que los núcleos neuronales son más grandes y más pálidos en comparación con los núcleos de las SGC. Las neuronas que estaban rodeadas de SGC positivas para GFAP en más del 50% de su circunferencia fueron contadas y el resultado se expresó como un porcentaje del número total de neuronas presentes en los campos analizados [307]. Cuatro campos seleccionados al azar fueron analizados y promediados para cada animal. El análisis de la inmunoreactividad de la astrogliá (GFAP) y microglía (CD11b/c) en médula espinal se realizó dentro de los límites de las láminas superficiales (I-II) y las láminas profundas (III-IV) del engrosamiento lumbar del asta dorsal [57], evaluando el cambio en la expresión de GFAP y CD11b/c mediante el análisis del área ocupada. Se tomaron microfotografías de alta resolución a una magnificación de 40x en el área media de las láminas superficiales y profundas del asta dorsal. La fracción de área ocupada se cuantificó estableciendo el mismo umbral de señal basal para todas las microfotografías usando el software FIJI ImageJ. El área porcentual relativa se obtuvo del promedio de las fracciones de área obtenidas de cada sección, de cada animal y por grupo, y todos los valores fueron relativizados con aquellos del grupo control (naïve).

Estudio de marcadores de regeneración axonal (Proyecto III.2)

Ratas naïve y ratas lesionadas tratadas 7 días después con vehículo (CRUSH+VEH) o BMMC (CRUSH+Late BMMC), fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (75 mg/kg, Laboratorio Richmond) y xilacina (10 mg/kg, Laboratorio Richmond), administrada por la vía i.p. Se inició la perfusión a través de la aorta ascendente, con PBS 1X a 37°C seguido de una solución fijadora de PFA 4% (pH 7), a 4°C. Seguidamente los nervios ipsi- y contralaterales (derecho e izquierdo en animales naïve) fueron disecados rápidamente y sumergidos en el mismo fijador durante 90 min a 4°C y posteriormente en sacarosa 10-20% disuelta en PBS 1X, pH 7,2, por no menos de 24 h. El tejido así preparado fue congelado en bloques y seccionado usando un crióstato (Microm, HM 505E, NJ, USA) a 12 μm de grosor. Las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, secadas durante 1 h y lavadas dos veces con solución de PBS 1X, dos veces con en PBS-Tritón X-100 al 0,1%, y posteriormente incubadas en SFB al 5% en PBS por al menos 2 h, a temperatura ambiente. Las

secciones fueron incubadas durante toda la noche, en cámara húmeda a 4°C, con los anticuerpos primarios: anti-MBP de ratón (Biolegend) y anti-βIII-tubulina de conejo (Biolegend), diluidos en solución de lavado. Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS 1X durante 10 min e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios: Alexa Flúor 546 anti-ratón (1:200, Biolegend) o Alexa Flúor 488 anti-conejo (1:200, Biolegend), más DAPI (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) (ver **Tabla M1**). Las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS1X y montadas con solución comercial Mowiol (Sigma-Aldrich) para el análisis por microscopía de epi-fluorescencia. En todos los casos, se realizó un control negativo de marca, incubando las muestras sin anticuerpo primario.

Las microfotografías fueron tomadas usando un microscopio confocal FV1000 (Olympus) y capturadas con una cámara digital BX100 (Olympus) con un objetivo de magnificación 20x.

17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron analizados estadísticamente usando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, USA). Todo resultado fue evaluado para definir normalidad. En todos los experimentos los datos fueron expresados con la media ± SEM, con un valor de alpha de 0.05. La significancia de P se definió de la siguiente manera: *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

Proyecto I

En el estudio de administración sistémica de una única dosis de IMT504 en animales con lesión selectiva de las ramas del nervio ciático, los experimentos conductuales fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de 2-factores, seguido por el test post-hoc de Tukey (alodinia mecánica y térmica o respuesta a estímulo de calor agudo (respuesta nocifensiva)). Los resultados de citometría de flujo, ensayo de CFU-F, migración *in vitro*, ELISA y RT-qPCR fueron analizados mediante ANOVA de 1-factor, seguido por el test post-hoc de Dunnett al realizar comparaciones con el grupo control, o por ANOVA de 1-factor, seguido por el test post-hoc de Sidak al realizar comparaciones entre múltiples grupos.

Proyecto II

En la evaluación del efecto terapéutico de IMT504 en animales con axotomía completa del nervio ciático, los resultados del grado de autotomía fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de 2-factores, seguido por el test post-hoc de

Tukey. Los datos de citometría de flujo, inmunohistoquímica y ELISA fueron analizados mediante ANOVA de 1-factor, seguido por el test post-hoc de Dunnett al realizar comparaciones con el grupo control, o mediante ANOVA de 1-factor, seguido por el test post-hoc de Sidak al realizar comparaciones entre múltiples grupos.

Proyecto III.1

Los resultados de la cinética de migración de las BMMC al nervio lesionado, administradas a diferentes días luego de la lesión, fueron analizados mediante ANOVA de 1-factor, seguido por el test post-hoc de Dunnett al realizar comparaciones con el grupo naïve.

Proyecto III.2

Los experimentos conductuales, electromiográficos y de WB fueron estadísticamente analizados mediante ANOVA de 2-factores, seguido por el test post-hoc de Bonferroni.

Proyecto III.3

Los experimentos conductuales de administración de BMMC, en animales con lesión selectiva de las ramas del nervio ciático, fueron estadísticamente analizados mediante ANOVA de 2-factores, seguido por el test post-hoc de Bonferroni.

RESULTADOS

Proyecto I

**Efectos y mecanismos de acción del ODN IMT504
en ratas con dolor neuropático crónico por el
modelo de SNI**

1.1 Diseño experimental

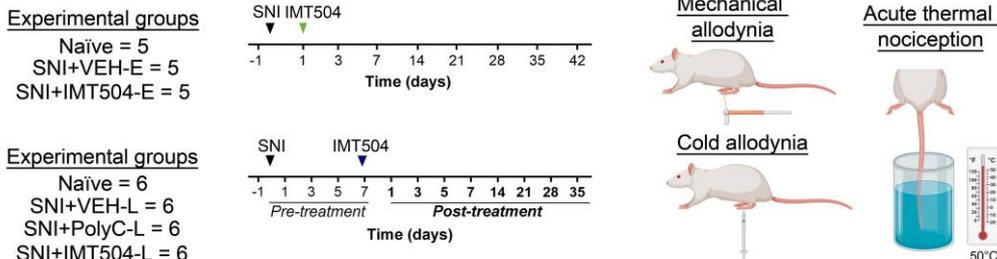
En este proyecto se evaluó el efecto anti-alodínico y anti-inflamatorio de una única administración sistémica (s.c.) de IMT504 a una concentración de 6 mg/kg, aplicada en una etapa temprana (el mismo día de inducida la lesión; SNI+IMT504-E) o en una etapa tardía (7 días luego de inducida la lesión; SNI+IMT504-L). Además, se incluyeron en este estudio animales no-lesionados y no-tratados (naïve), animales lesionados y tratados con solución salina estéril (SNI+VEH), o animales lesionados y tratados con el ODN PolyC (SNI+PolyC-L).

El efecto anti-alodínico se estudió a través de ensayos conductuales de evaluación de alodinia mecánica y al frío. También se evaluaron los posibles efectos secundarios del IMT504 (alteración de la respuesta nocifensiva). El rol anti-inflamatorio de IMT504 se examinó a través de ensayos de ELISA de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en el nervio ciático. Además, se correlacionó el efecto anti-inflamatorio de IMT504 con la movilización e inmunomodulación de MSC, a través de ensayos de citometría de flujo, migración *in vitro* y RT-qPCR (**Figura 1**).

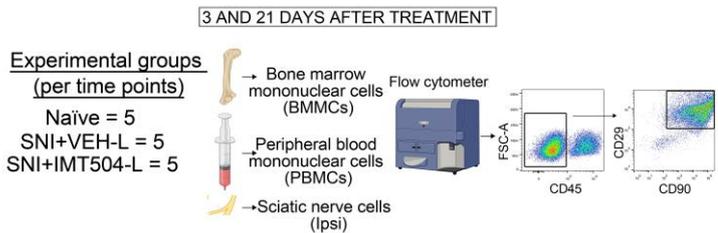
Figura 1. Diseño experimental para el estudio del efecto anti-alodínico y los mecanismos de acción de IMT504 en ratas con lesión selectiva del nervio ciático. (A) Caracterización temporal de la alodinia mecánica y térmica, y de la respuesta nocifensiva a un estímulo térmico, en una etapa de tratamiento temprano: naïve, SNI+VEH-E y SNI+IMT504-E ($n= 5$ ratas por grupo); y en una etapa de tratamiento tardío: naïve, SNI+VEH-L, SNI+PolyC-L y SNI+IMT504-L ($n= 6$ ratas por grupo). **(B)** Cuantificación de las MSC (células CD45⁻CD90⁺CD29⁺) en nervio ciático, sangre periférica y médula ósea por citometría de flujo ($n= 5$ ratas por grupo, por sobrevida evaluada). **(C)** Las BMMC colectadas de fémur y tibia de ratas naïve, SNI+VEH-L y SNI+IMT504-L y cultivadas por 14 días fueron utilizadas para cuantificar el número de CFU-F ($n= 6$ ratas por grupo, por sobrevida evaluada). **(D)** MSC de rata y humano, pre-tratadas *in vitro* con IMT504 (7µg/ml) o no, fueron co-cultivadas con medio condicionado de nervio ciático (de ratas naïve o del lado ipsilateral o contralateral de ratas con 7 días-SNI) para realizar el ensayo de migración ($n= 4$). **(E)** Para el análisis de internalización de IMT504, las MSC fueron cultivadas con IMT504-Alexa Fluor 488 o Texas Red. **(F)** Los ensayos de ELISA fueron llevados a cabo para analizar cambios en los niveles de citoquinas pro- (TNF- α e IL-1 β) y anti- (IL-10 y TGF- β 1) inflamatorias en nervios lesionados ($n= 3$ ratas por grupo, por sobrevida evaluada). **(G)** Análisis de los niveles de expresión del transcripto de cxcl12 y cxcr4 en el nervio ciático de ratas naïve, SNI+VEH-L y SNI+IMT504-L, y de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en MSC y nervios obtenidos de ratas con 7 días-SNI y co-incubados *ex vivo*, mediante RT-qPCR. Figura creada utilizando BioRender.com.

Figure 1. Experimental design to study the anti-allodynic effects and the mechanisms of action of IMT504 in rats with spared nerve injury. (A) Characterization of the time course of mechanical and cold allodynia and acute thermal nociception effects, in an early treatment stage: naïve, SNI+VEH-E and SNI+IMT504-E-treated rats ($n= 5$ rats per group); and in a late treatment stage: naïve, SNI+VEH-L, SNI+PolyC-L y SNI+IMT504-L ($n= 6$ rats per group). **(B)** Quantification of MSC (CD45⁻CD90⁺CD29⁺ cells) in sciatic nerve, peripheral blood and bone marrow were done by flow cytometry ($n= 5$ rats per group, per time-point). **(C)** BMMC were collected from femur and tibia of naïve, SNI+VEH-L and SNI+IMT504-L rats and cultured during 14 days to quantify the number of CFU-Fs ($n= 6$ rats per group, per time-point). **(D)** Rat and human MSC *in vitro*, pre-treated or not with IMT504 (7µg/ml), were co-cultured with sciatic nerve conditioned medium (from naïve rats or ipsilateral and contralateral from 7-day SNI rats) for the assessment of migration behavior ($n= 4$). **(E)** For analysis of IMT504 internalization, MSC were cultured with IMT504-Alexa Fluor 488 or Texas Red. **(F)** ELISA analysis was performed to address changes in pro- (TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10 and TGF- β 1) cytokines in injured nerves ($n= 3$ rats per group, per time-point). **(G)** Analysis of cxcr4 and cxcl12 expression levels in ipsilateral sciatic nerve from naïve, SNI+VEH-L and SNI+IMT504-L rats and analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines expression levels in MSC and *ex vivo* 7 day-SNI nerves obtained from co-cultures, by RT-qPCR. Figure was created using BioRender.com.

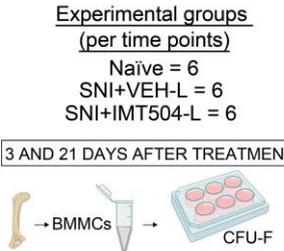
A. BEHAVIORAL TESTING



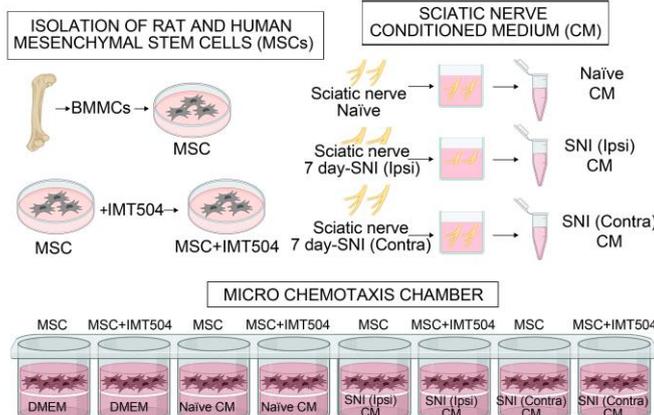
B. FLOW CYTOMETRY



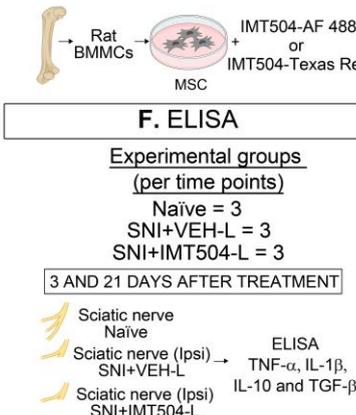
C. CFU-F ASSAY



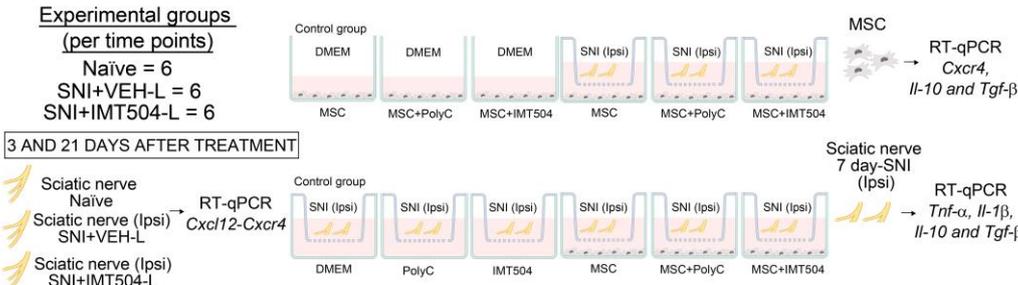
D. IN VITRO MIGRATION ASSAY



E. IMT504 INTERNALIZATION



G. RT-qPCR



1.2 **IMT504 previene o bloquea la alodinia mecánica y al frío inducida por SNI, durante un período prolongado, sin afectar la respuesta nocifensiva regular**

Debido a que ni la eficacia anti-alodínica de IMT504, ni su capacidad para prevenir el dolor o restaurar los umbrales de alodinia en modelos de rata con dolor neuropático persistente se habían abordado previamente, comenzamos nuestro análisis determinando si la administración de IMT504 en ratas con dolor neuropático crónico inducido por SNI era eficaz en reducir o bloquear la alodinia mecánica y térmica al frío, utilizando los protocolos de tratamiento temprano (SNI+IMT504-E) y tardío (SNI+IMT504-L) abordados previamente, y siguiendo el diseño experimental que se aprecia en la **Figura 1**.

La administración de una dosis única de IMT504 el mismo día de la lesión previno el desarrollo de alodinia mecánica y al frío en ratas con SNI, en comparación con ratas tratadas con vehículo, SNI+VEH-E. Así, las ratas SNI+IMT504-E solo mostraron una modesta disminución en los umbrales de retirada ante estímulos mecánicos, siempre alejada de niveles alodínicos, y notablemente comparables con lo observado en ratas naïve desde el día 3 después del tratamiento y sobrevidas subsiguientes (**Figura 2A**). Además, las ratas mostraron una atenuación significativa de la frecuencia e intensidad de la alodinia al frío, comenzando 3 días después del tratamiento y volviéndose prácticamente basales hacia las últimas semanas de evaluación del comportamiento (**Figura 2B**).

El análisis de la administración tardía de IMT504 también mostró notables efectos anti-alodínicos. Por un lado, todas las ratas lesionadas, antes de la administración de IMT504, VEH o PolyC, mostraron signos claros de alodinia mecánica ipsilateral, así como un aumento en la frecuencia e intensidad de respuesta frente al estímulo frío, comenzando 3 días después de la lesión y manteniéndose así hasta el día 7, momento en el que se dio inicio al tratamiento experimental tardío (**Figura 3**). Como era de esperar, las ratas SNI+VEH-L y SNI+PolyC-L permanecieron alodínicas durante al menos 42 días después de la lesión (**Figura 3**). Por otra parte, la administración de una única dosis de IMT504 en ratas SNI, 7 días después de la lesión, indujo una rápida recuperación del umbral basal de retirada frente a estímulos mecánicos, en comparación con las ratas SNI+VEH-L o SNI+PolyC-L (**Figura 3A**). El efecto anti-alodínico fue evidente ya un día después del tratamiento, y alcanzó umbrales de retirada comparable con los de ratas naïve, 2 semanas después del tratamiento, y de allí en adelante (**Figura 3A**). Además, la administración de IMT504 en animales lesionados, disminuyó significativamente la frecuencia y la intensidad de respuesta al

estímulo con acetona, desde el primer día después del tratamiento y acercándose a valores basales de respuesta, comparables con los observados en animales naïve, y por varias semanas (**Figura 3B**). Las patas traseras contralaterales de todas las ratas lesionadas no mostraron cambios significativos en los umbrales o frecuencias basales (datos no mostrados).

El análisis de la respuesta frente a un estímulo térmico (calor) agudo, previo a la lesión, y 3 y 21 días después del tratamiento en ratas SNI+VEH-L, SNI+PolyC-L y SNI+IMT504-L, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la latencia de retirada de la cola (**Figura 4**). Esto apoya la idea de que los efectos anti-alodínicos de IMT504 detectados hasta ahora no interfieren con las respuestas nocifensivas regulares a la estimulación térmica caliente.

Y para completar esta parte del análisis, evaluamos en un grupo reducido de animales, la duración del efecto de IMT504 siguiendo el protocolo de tratamiento tardío, previamente descrito (**Figura 5**). Se observó que la respuesta inicial de las ratas tratadas con IMT504, con un aumento en el umbral de retirada frente al estímulo mecánico, se mantuvo hasta los 42 días de iniciado el tratamiento, momento desde el cual se produjo una gradual caída del umbral, hasta alcanzar nivel alodínico desde los 70 días en adelante (**Figura 5A**). De modo similar, el efecto anti-alodínico térmico del IMT504 mostró una disminución notoria desde los 56 días posteriores a la administración de IMT504 y en adelante (**Figura 5B**).

Figura 2. La administración temprana *in vivo* de IMT504 previene la alodinia mecánica y térmica en ratas con SNI. (A-B) Umbral de retirada mecánica (A) y frecuencia de retirada (B superior) o score de retirada (B inferior) al frío, expresado como la media \pm SEM, de la pata trasera derecha de ratas naïve (cuadrado negro, línea negra) y pata ipsilateral de ratas SNI+VEH-E (círculo negro, línea negra) y SNI+IMT504-E (triángulo negro, línea verde). Los resultados representan un $n= 5$ ratas por grupo. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos-factores seguido por el test post-hoc de Tukey: $P < 0.0001$ entre grupos; $***P < 0.001$ y $****P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-E vs ipsilateral SNI+IMT504-E; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, $\###P < 0.001$ y $\####P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-E o ipsilateral SNI+IMT504-E vs naïve.

Figure 2. *In vivo* early administration of IMT504 prevents mechanical and cold allodynia in rats with SNI. (A-B) Mechanical withdrawal thresholds (A) and cold withdrawal frequencies (B upper) or cold withdrawal scores (B lower), expressed as mean \pm SEM, from naïve rats (black squares, black line) and ipsilateral hindpaws of SNI+VEH-E (black circles, black line) and SNI+IMT504-E (black triangle, green line) rats. Data represents an $n= 5$ per group. Statistical significance was established by means of two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $P < 0.0001$ among groups; $***P < 0.001$ and $****P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-E vs ipsilateral SNI+IMT504-E; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, $\###P < 0.001$ and $\####P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-E or ipsilateral SNI+IMT504-E vs naïve.

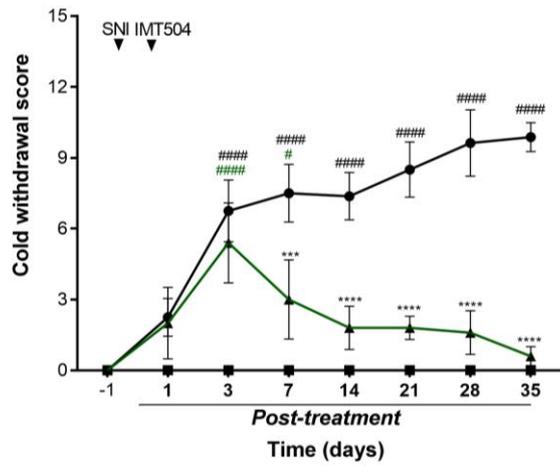
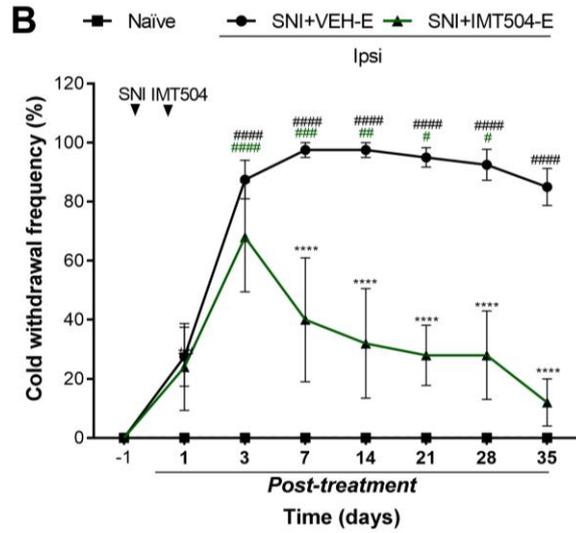
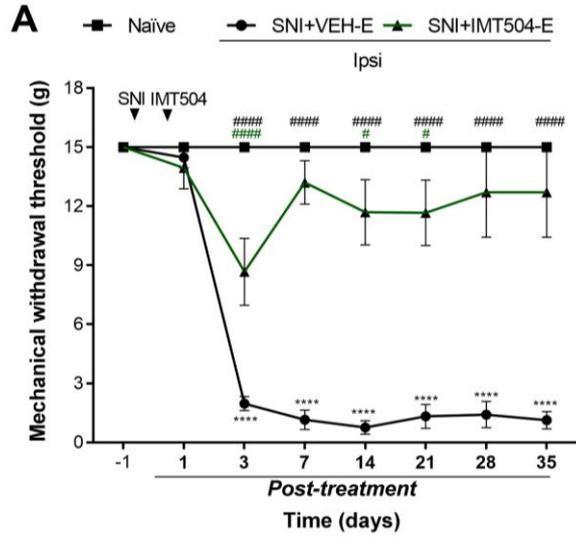


Figura 3. La administración tardía *in vivo* de IMT504 bloquea la alodinia mecánica y térmica. (A-B) Umbral de retirada mecánica (A) y frecuencia de retirada (B superior) o score de retirada (B inferior) al frío, expresado como la media \pm SEM, de la pata trasera derecha de ratas naïve (cuadrado negro, línea negra) y pata ipsilateral de ratas SNI+VEH-L (círculo negro, línea negra), SNI+PolyC-L (rombo negro, línea marrón) y SNI+IMT504-L (triángulo negro, línea azul). Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos-factores seguido por el test post-hoc de Tukey: $P < 0.0001$ entre grupos; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $****P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-L o ipsilateral SNI+PolyC-L vs ipsilateral SNI+IMT504-L; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, $\###P < 0.001$ y $\####P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-L, ipsilateral SNI+PolyC-L o ipsilateral SNI+IMT504-L vs naïve.

Figure 3. *In vivo* late administration of IMT504 blocks mechanical and cold allodynia. (A-B) Mechanical withdrawal thresholds (A) and cold withdrawal frequencies (B upper) or cold withdrawal scores (B lower), expressed as mean \pm SEM, from the right hindpaws of naïve rats (black squares, black line) and ipsilateral hindpaws of SNI+VEH-L (black circles, black line), SNI+PolyC-L (black rhombus, brown line) and SNI+IMT504-L (black triangle, blue line) rats. Data represents an $n= 6$ rats *per* group. Statistical significance was established by means of two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $P < 0.0001$ among groups; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $****P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-L or ipsilateral SNI+PolyC-L vs ipsilateral SNI+IMT504-L; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, $\###P < 0.001$ and $\####P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH-L, ipsilateral SNI+PolyC-L or ipsilateral SNI+IMT504-L vs naïve.

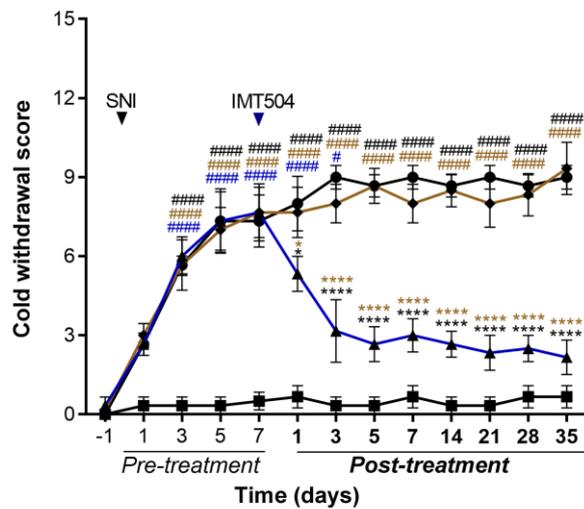
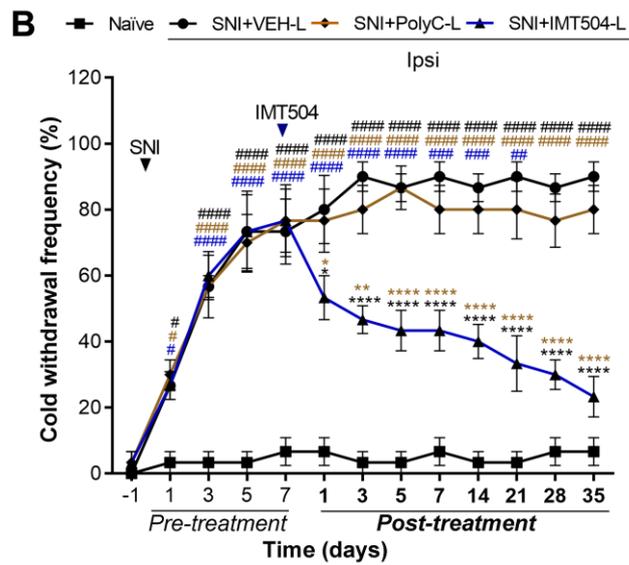
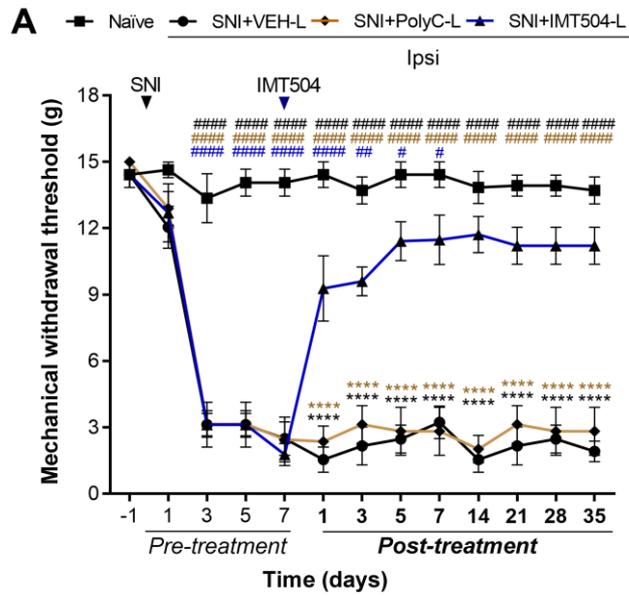


Figura 4. IMT504 no altera la respuesta nocifensiva al calor en ratas lesionadas con SNI. El dolor agudo al calor fue evaluado usando el test de inmersión de la cola de ratas naïve (columnas grises), SNI+VEH-L (columnas negras), SNI+PolyC-L (columnas marrones) y SNI+IMT504-L (columnas azules), 1 día antes de la lesión y 3 y 21 días después del tratamiento. Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos-factores seguido por el test post-hoc de Bonferroni: $P > 0.05$.

Figure 4. IMT504 does not alter heat nocifensive responses in SNI-injured rats. Acute heat pain was evaluated using the tail immersion test in naïve (gray columns), SNI+VEH-L (black columns), SNI+PolyC-L (brown column) and SNI+IMT504-L (blue columns), 1 day before injury and 3 and 21 days after treatment. Data represents an $n= 6$ per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test: $P > 0.05$.

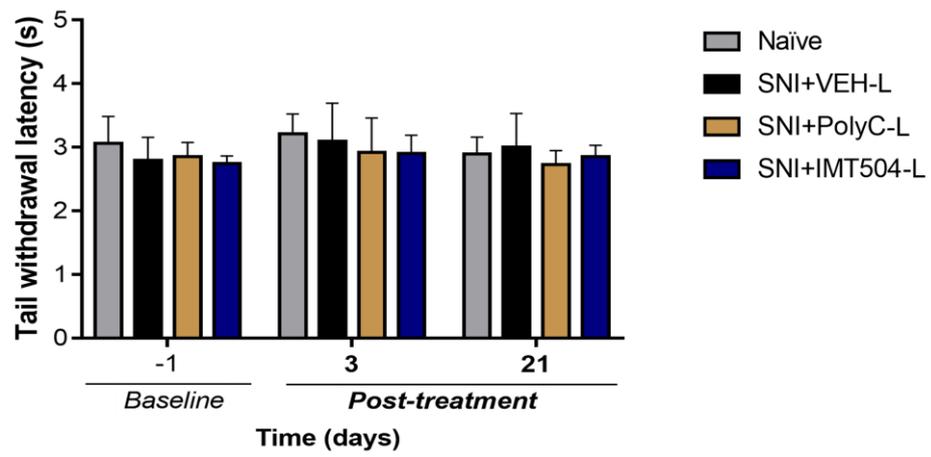
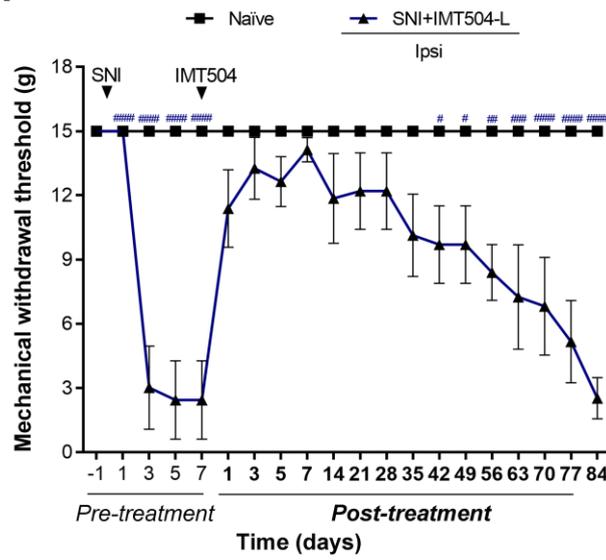
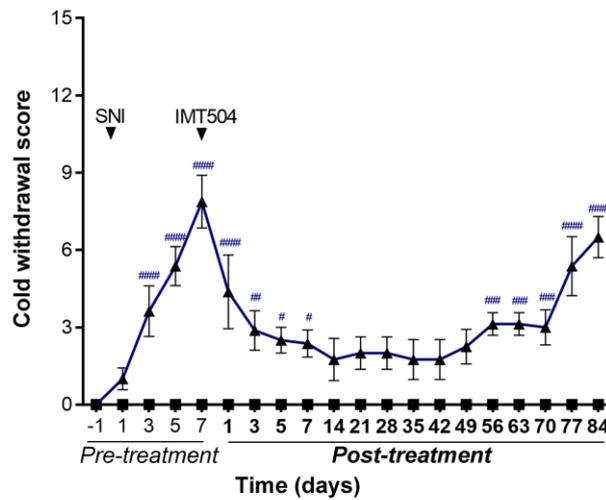
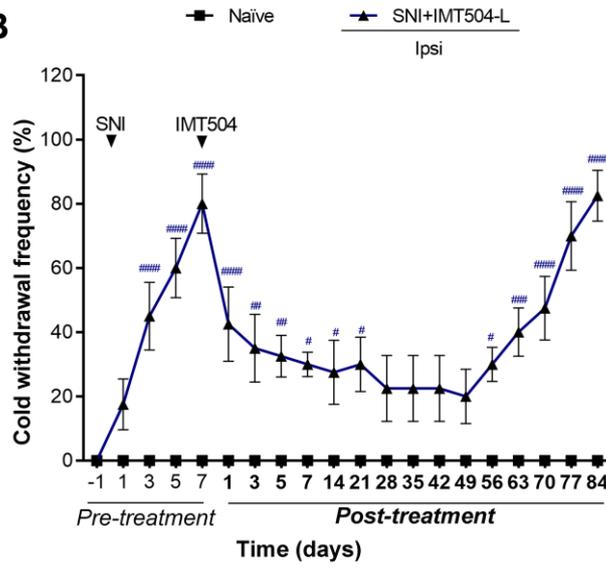


Figura 5. Efecto anti-alodínico prolongando de IMT504 en ratas con lesión por SNI. (A-B) Umbral de retirada mecánica (A) y frecuencia de retirada (B superior) o score de retirada (B inferior) al frío, expresado como la media \pm SEM de la pata trasera derecha de ratas naïve (cuadrado negro, línea negra) y de la pata ipsilateral (triángulo negro, línea azul) de ratas SNI+IMT504-L. Los resultados representan un $n= 8$ ratas por grupo. Las diferencias significativas se establecieron por análisis ANOVA de dos-factores seguido por el test post-hoc de Tukey: $P < 0.0001$ entre grupos, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ y $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$ naïve vs ipsilateral SNI+IMT504-L.

Figure 5. Long-lasting anti-allodynic effects of IMT504 in rats with SNI. (A-B) Mechanical withdrawal thresholds (A) and cold withdrawal frequencies (B upper) or cold withdrawal scores (B lower), expressed as mean \pm SEM from the right hindpaws of naïve rats (black squares, black line) and ipsilateral (black triangle, blue line) hindpaw of SNI+IMT504-L rats. Data represents an $n= 8$ rats *per* group. Statistical significance was established by means of two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc: $P < 0.0001$ among groups, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ y $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$ naïve vs ipsilateral SNI+IMT504-L.

A**B**

1.3 **IMT504 potencia la movilización y migración de MSC hacia el nervio periférico lesionado, involucrando la modulación del eje CXCL12-CXCR4**

Habiendo establecido que la administración de una única dosis de IMT504 modula eficientemente la alodinia mecánica y térmica en ratas con dolor neuropático persistente, en protocolos de tratamiento temprano y tardío, decidimos enfocarnos en el último para comenzar a determinar el correlato mecanístico de tales acciones. Así, evaluamos si los efectos terapéuticos del ODN estaban asociados a la movilización y migración de MSC endógenas hacia el nervio ciático. Esta especulación se basaba en nuestros trabajos previos, en donde habíamos demostrado que el importante efecto anti-alodínico resultante de la administración de múltiples dosis de IMT504 en ratas con crush del nervio ciático era muy similar al observado en ratas lesionadas y tratadas con MSC exógenas [65]. Más aún, sabíamos que, en animales naïve, la administración de IMT504 inducía la proliferación de MSC en médula ósea y sangre periférica [124].

Elegimos 3 y 21 días después del tratamiento (10 y 28 días después de la lesión, respectivamente), como sobrevidas de muestreo para evaluar la presencia de MSC mediante citometría de flujo en el nervio ciático, sangre periférica y médula ósea de ratas naïve, SNI+VEH-L y SNI+IMT504-L, y los posibles efectos dependientes del tiempo (ver **Figura M7** para conocer la estrategia de análisis para la identificación de MSC por citometría de flujo). Este análisis se complementó con una cuantificación *in vitro* del número de CFU-F generadas por la médula ósea de los tres grupos experimentales, y una evaluación *in vivo* de los niveles de expresión de los transcritos *cxcl12* y *cxcr4* en los nervios lesionados, en ambas sobrevidas (**Figura 6**).

El análisis 3 días después del tratamiento en ratas SNI+VEH-L mostró un aumento considerable en el porcentaje de MSC endógenas presentes en el nervio ciático ipsilateral (**Figuras 6A y M7A**) y sangre periférica (**Figuras 6B y M7B**), en comparación con ratas naïve. Esto fue acompañado por una reducción en el porcentaje de MSC en el principal reservorio de estas células, la médula ósea (**Figura 6C**), un resultado que se confirmó a través del análisis de CFU-F *in vitro*, donde el número de colonias en ratas SNI+VEH-L fue menor en comparación con las ratas naïve (**Figura 6D**). Los efectos observados en ratas SNI+VEH-L se vieron potenciados con el tratamiento con el ODN. Así, las ratas SNI+IMT504-L exhibieron un mayor porcentaje de MSC detectables en el nervio ciático ipsilateral (**Figura 6A**) y sangre periférica (**Figura 6B**) que el observado en ratas SNI+VEH-L, y también resultó en una

reducción significativa del porcentaje de MSC y del recuento de UFC- F en la médula ósea (**Figura 6C, D**).

La evaluación 21 días después del tratamiento reveló que el porcentaje de MSC (**Figura 6E-G**) y los recuentos de CFU-F (**Figura 6H**) en ratas SNI+VEH-L volvieron a valores comparables a los observados en ratas naïve, en todos los tejidos analizados (**Figura 6E- H**). Por el contrario, las ratas SNI+IMT504-L mostraron un mayor porcentaje de MSC en el nervio ciático ipsilateral y en la sangre periférica, comparado con lo observable en las ratas SNI+VEH-L (**Figura 6E, F**). Además, se observó un modesto aumento en el porcentaje de MSC en la médula ósea de ratas SNI+IMT504-L, aunque aun siendo menor que los observados en ratas SNI+VEH-L o ratas naïve (**Figura 6G**). El recuento de CFU-F confirmó esta observación (**Figura 6H**).

El análisis en los nervios contralaterales de ratas SNI+VEH-L y SNI+IMT504-L, 21 días después del tratamiento, no reveló cambios significativos en el porcentaje de MSC, siendo comparables a los observados en ratas naïve (comparar la **Figura 6E**), lo que sugiere que los efectos pro-migratorios de IMT504 se focalizan en el sitio de la lesión nerviosa.

Finalmente, la evaluación de los niveles de los transcritos de *cxcl12* y *cxcr4* en nervios lesionados, 3 días después del tratamiento, mostró un aumento en la expresión de la quimioquina y su receptor asociado, tanto en ratas tratadas con vehículo como con IMT504; sin embargo, las ratas tratadas con el ODN exhibieron el mayor aumento de expresión (**Figura 7A, B**). Por el contrario, el análisis realizado 21 días después del tratamiento reveló que mientras que las ratas tratadas con vehículo mantuvieron un aumento en la expresión del transcritos de *cxcl12* (aunque menor que lo observado 3 días después del tratamiento con vehículo), las ratas SNI+IMT504-L mostraron un retorno a niveles comparables a ratas naïve. Por otro lado, los niveles de expresión del transcritos de *cxcr4* permanecieron aumentados en ambos grupos experimentales, 21 días después del tratamiento, aunque las ratas tratadas con vehículo exhibieron un aumento en la expresión más alto que las ratas tratadas con IMT504 (**Figura 7C, D**).

Figura 6. La administración *in vivo* de IMT504 promueve la movilización y anidamiento de las MSC en el nervio ciático lesionado. (A-C y E-G) Cuantificación de MSC (células CD45⁻CD90⁺CD29⁺) en el nervio ciático ipsilateral (A y E) y contralateral (E), sangre periférica (B y F) y médula ósea (C y G), y análisis de CFU-F (**D y H**) en ratas naïve (columnas grises), SNI+VEH-L (columnas negras) o SNI+IMT504-L (columnas azules), 3 (A-D) o 21 (E-H) días después del tratamiento. Los resultados representan un $n=5$ (A-C y E-G) o $n=6$ (D y H) ratas por grupo, por sobrevida evaluada y se expresa como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P<0.0001$ entre grupos; $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ y $****P<0.0001$ naïve vs SNI+VEH-L o SNI+IMT504-L, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P<0.0001$; $\#P<0.05$, $\##P<0.01$, $\###P<0.001$ y $\####P<0.0001$ SNI+VEH-L vs SNI+IMT504-L.

Figure 6. *In vivo* administration of IMT504 promotes the mobilization and homing of MSC into injured sciatic nerves. (A-C and E-G) Quantification of MSC (CD45⁻CD90⁺CD29⁺ cells) in ipsilateral sciatic nerve (A and E), peripheral blood (B and F) and bone marrow (C and G), and analysis of CFU-F units in bone marrow (**D and H**) from naïve (gray columns), SNI+VEH-L (black columns) or SNI+IMT504-L (blue columns) rats, 3 (A-D) or 21 (E-H) days after treatment. Data represents an $n=5$ (A-C and E-G) or $n=6$ (D and H) rats *per group, per time-point* and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P<0.0001$ among groups; $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ and $****P<0.0001$ naïve vs SNI+VEH-L or SNI+IMT504-L, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P<0.0001$ among groups; $\#P<0.05$, $\##P<0.01$, $\###P<0.001$ and $\####P<0.0001$ SNI+VEH-L vs SNI+IMT504-L.

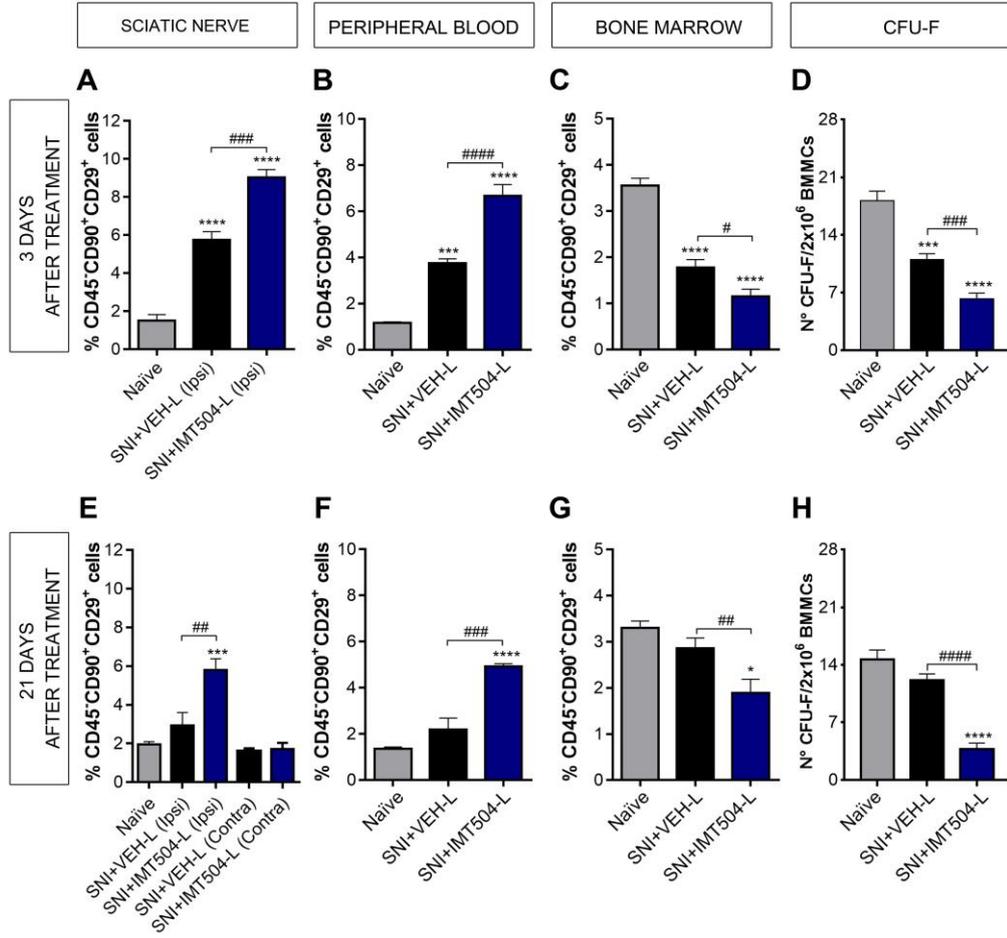
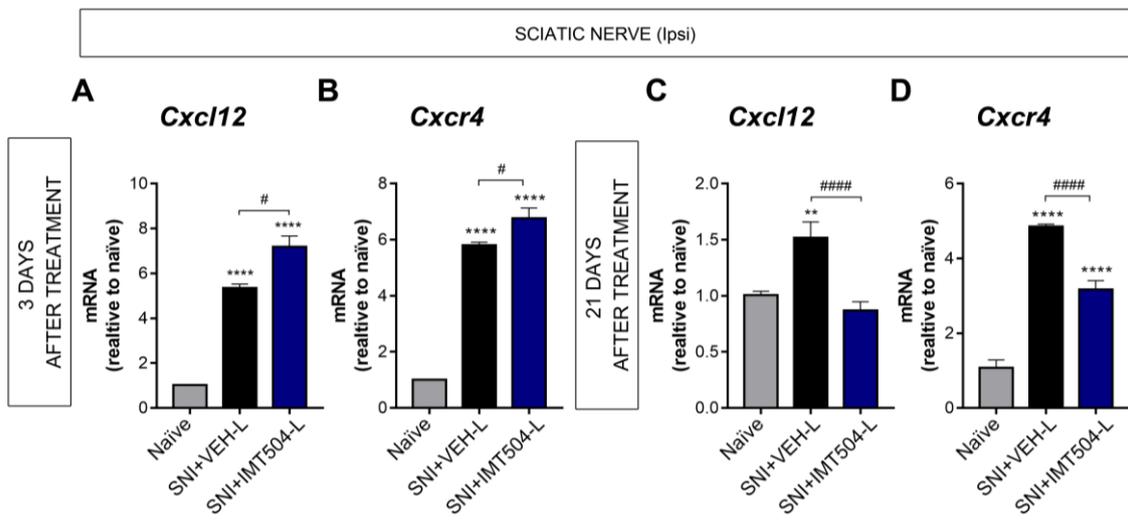


Figura 7. La administración *in vivo* de IMT504 modula el eje CXCL12-CXCR4, en los nervios lesionados. (A-D) Los niveles de ARNm de *cxcl12* (A y C) y *cxcr4* (B y D) fueron medidos en ratas naïve (columnas grises), SNI+VEH-L (columnas negras) y SNI+IMT504-L (columnas azules), 3 (A y B) y 21 (C y D) días después del tratamiento. Los resultados representan un $n=6$ ratas por grupo, por sobrevida evaluada y se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ naïve vs SNI+VEH-L o SNI+IMT504-L, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ y #### $P < 0.0001$ SNI+VEH-L vs SNI+IMT504-L.

Figure 7. *In vivo* administration of IMT504 modulates the CXCL12-CXCR4 axis in injured nerves. (A-D) *Cxcl12* (A and C) and *Cxcr4* (B and D) mRNA levels were measured in naïve (gray columns), SNI+VEH-L (black columns) and SNI+IMT504-L (blue columns) rats, 3 (A and B) and 21 (C and D) days after treatment. Data represents an $n=6$ rats *per* group, *per* time-point and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ naïve vs SNI+VEH-L or SNI+IMT504-L, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ and #### $P < 0.0001$ SNI+VEH-L vs SNI+IMT504-L.



1.4 La exposición *in vitro* a IMT504 aumenta los niveles de expresión del transcripto de *cxcr4* en MSC y estimula la migración de las células hacia medios condicionados de nervio ciático

A continuación, se evaluó mediante experimentación *in vitro* y *ex vivo*, si la expresión del transcripto de *cxcr4* está modulada por el pre-tratamiento *in vitro* con IMT504 en MSC de rata, y si existe alguna influencia de los nervios lesionados sobre células así pre-tratadas. Esto fue seguido por el análisis del efecto del pre-tratamiento *in vitro* con IMT504 sobre la capacidad de migración de las MSC de rata y humana hacia medios condicionados derivados de nervios de rata obtenidos en diferentes condiciones.

Si bien los niveles de expresión del transcripto *cxcr4* en MSC de rata fueron normalmente bajos, estuvieran pre-tratadas o no con el ODN no inmunomodulador PolyC, el pre-tratamiento con IMT504 resultó en una inducción muy significativa de su expresión (**Figura 8A**). Se obtuvo un valor de expresión comparable cuando las MSC no-tratadas o pre-tratadas con PolyC se expusieron a nervios lesionados. Curiosamente, la exposición de las MSC pre-tratadas con IMT504 a nervios lesionados dio como resultado el mayor aumento en los niveles de expresión de *cxcr4* (**Figura 8A**). En conjunto, estos resultados concuerdan con el aumento de expresión de *cxcr4* observado en muestras de nervios diseccionados *in vivo*, 3 días después del tratamiento (**Figura 7B**), apoyando el origen, al menos en parte, de este aumento en las MSC inducidas por el tratamiento con IMT504.

El análisis del ensayo de migración *in vitro* mostró que sólo un pequeño número de MSC de rata (**Figura 8B**) o humanas (**Figura 8C**), pre-tratadas o no con IMT504, migran hacia el DMEM. Por el contrario, las MSC de rata (**Figura 8B**) o humanas (**Figura 8C**) exhibieron una tendencia natural a migrar hacia el medio condicionado de nervios naïve, ipsilaterales y contralaterales (esta observación, aparentemente contradictoria en el caso de nervios naïve y contralaterales de ratas lesionadas, podría explicarse atendiendo al hecho de que el medio condicionado de estos nervios, estrictamente hablando, representa a nervios con 1 día de lesión, ya que al ser disecados son seccionados y cultivados durante 16 h en medio de cultivo celular, lo cual podría explicar el efecto quimio-atractivo de estos medios condicionados). El pre-tratamiento con IMT504 incrementó la migración de las MSC de rata (**Figura 8B**) y humanas (**Figura 8C**) hacia el medio condicionado obtenido en diferentes condiciones (**Figura 8B, C**). Sin embargo, y lo que es más importante, el efecto pro-migratorio más fuerte del IMT504 se observó cuando las MSC de rata (**Figura 8B**) o humanas (**Figura 8C**) fueron expuestas al medio condicionado de nervios ipsilaterales de ratas con 7 días de lesión por SNI.

Finalmente, el análisis de MSC de rata (**Figura 9a-h**) y humano (**Figura 9i-p**) incubadas 16 h con 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IMT504-Alexa Flúor 488 reveló que la mayoría de las células tienen la capacidad de internalizar el ODN, apareciendo como gránulos fluorescentes positivos distribuidos por todo el citoplasma. El análisis de imágenes confocales de las MSC de rata y humano incubadas durante 16 h con 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IMT504-Texas Red confirmó la distribución citoplasmática del ODN (**Figura 10a, b**).

Figura 8. La exposición *in vitro* con IMT504 induce la expresión del transcrito *cxcr4* en MSC de rata y promueve la quimiotaxis de las MSC de rata y humano. (A) Los niveles de ARNm de *cxcr4* se midieron en MSC de rata no tratadas (columna gris), pre-tratadas con PolyC (columna ocre) y pre-tratadas con IMT504 (columna celeste) cultivadas en DMEM, así como también en MSC de rata no-tratadas (columna negra), pre-tratadas con PolyC (columna marrón) o pre-tratadas con IMT504 (columna azul) y co-cultivadas con nervios ipsilaterales de ratas con 7 días-SNI (las MSC no tratadas de ratas, cultivadas en DMEM fueron utilizadas como control). Los resultados representan un $n=4$ réplicas y se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; **** $P < 0.0001$ MSC de ratas no tratadas, cultivadas en DMEM vs otros grupos y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ y #### $P < 0.0001$ entre todos los grupos testeados. **(B-C)** Ensayo de quimiotaxis *in vitro* de MSC de rata (B) o humano (C) no tratadas (columnas negras) o pre-tratadas con IMT504 (columnas azules) hacia medio condicionado de nervio de rata naïve o ipsilateral con 7 días-SNI o contralateral con 7 días-SNI. Los resultados se expresan como la media de células migrantes por campo \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ MSC vs MSC+IMT504. Además, se comparó el efecto entre los grupos de MSC o MSC+IMT504 expuestas a distintos medios condicionado de nervios por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y #### $P < 0.0001$.

Figure 8. *In vitro* IMT504 exposure induces the expression of *Cxcr4* transcript in rat MSC and promotes rat or human MSC chemotaxis. (A) *Cxcr4* mRNA levels were measured in untreated (gray column), PolyC pre-treated (light-brown column) and IMT504 pre-treated (light-blue column) rat MSC cultured in DMEM, as well as in untreated (black column), PolyC pre-treated (brown column) or IMT504 pre-treated (blue column) rat MSC co-cultured with 7 day-SNI ipsilateral nerves (untreated rat MSC cultured in DMEM served as control). Data represents an $n=4$ and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; **** $P < 0.0001$ between control (untreated MSC cultured in DMEM) and other groups, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ and #### $P < 0.0001$ between all groups tested. **(B-C)** *In vitro* chemotaxis assay of untreated (black columns) or IMT504 treated- rat (B) or human (C) MSC (blue columns) towards injured nerve conditioned media (CM) derived from naïve nerves, 7 day-SNI ipsilateral or contralateral nerves. Results are expressed as the mean of migrating cells/field \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ MSC vs MSC+IMT504. Additional analysis comparing the effect on MSC or MSC+IMT504 groups to different CM exposures was analyzed by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and #### $P < 0.0001$.

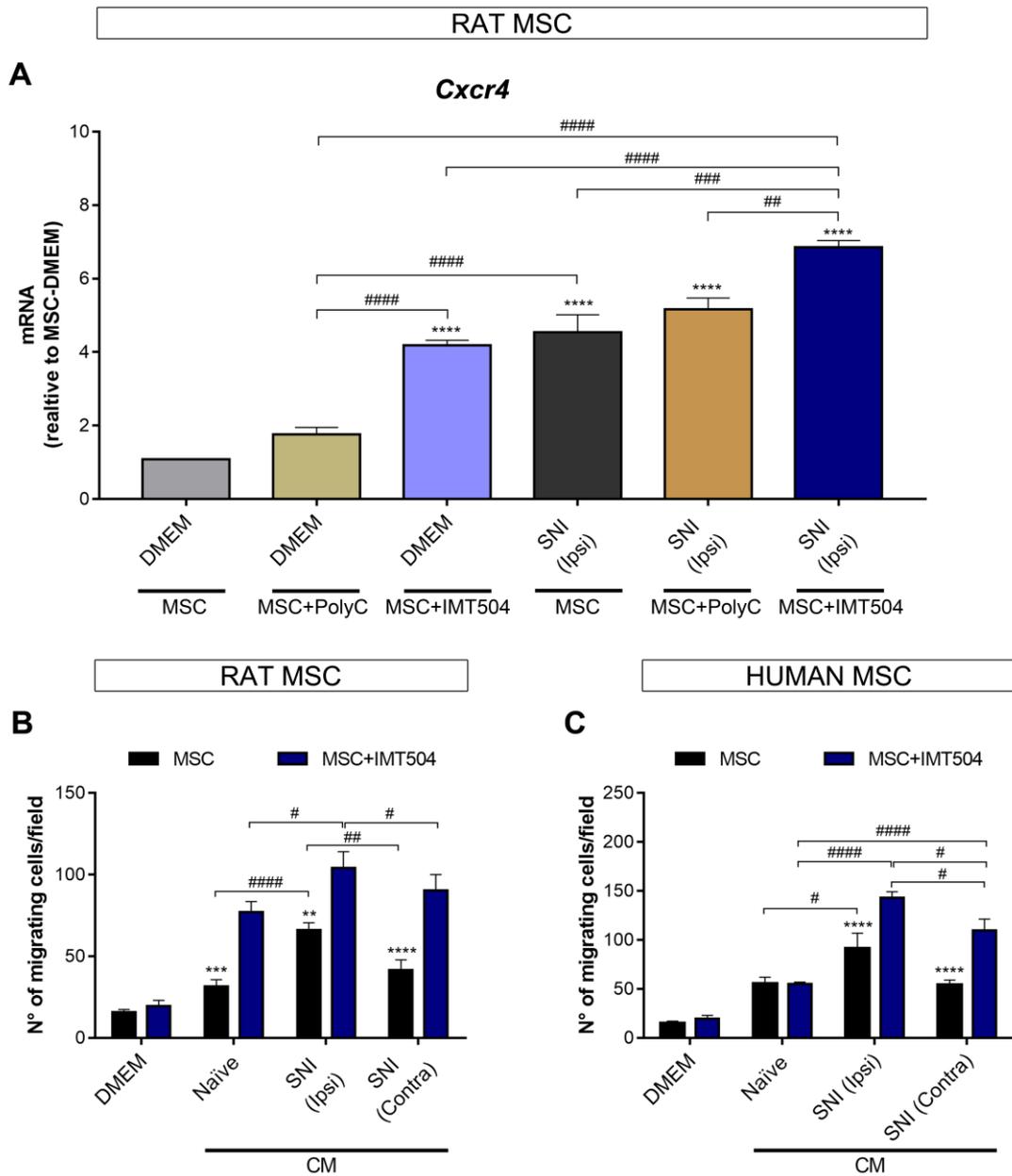


Figura 9. La exposición *in vitro* de MSC de rata o humano revela la internalización celular del ODN. (a-p) Microfotografías de MSC de rata (a-h) o humano (i-p). En verde, señal fluorescente IMT504-Alexa Fluor 488 fluorescente (a, e, i, m); en rojo, señal inmunofluorescente de vimentina (b, f, j, o) y en azul, señal fluorescente DAPI (c, g, k, o) (d, h, l, p muestran imágenes combinadas). Las cabezas de flecha indican la presencia de gránulos intracelulares IMT504-Alexa Fluor 488-positivos en las MSC. Escalas de magnificación: 100 μm (d=a-c, i-l); 50 μm (h=e-g, m-p).

Figure 9. *In vitro* exposure of rat or human MSC to IMT504 reveals cellular internalization of the ODN. (a-p) Photomicrographs of rat (a-h) and human (i-p) MSC. In green, IMT504-Alexa Fluor 488 fluorescent signal (a, e, i, m); in red, vimentin immunofluorescent signal (b, f, j, o) and in blue, DAPI fluorescent signal (c, g, k, o) (d, h, l, p shows merged images). Arrowheads point to MSC exhibiting presence of IMT504-Alexa Fluor 488-positive intracellular granules. Scale bars: 100 μm (d=a-c, i-l); 50 μm (h=e-g, m-p).

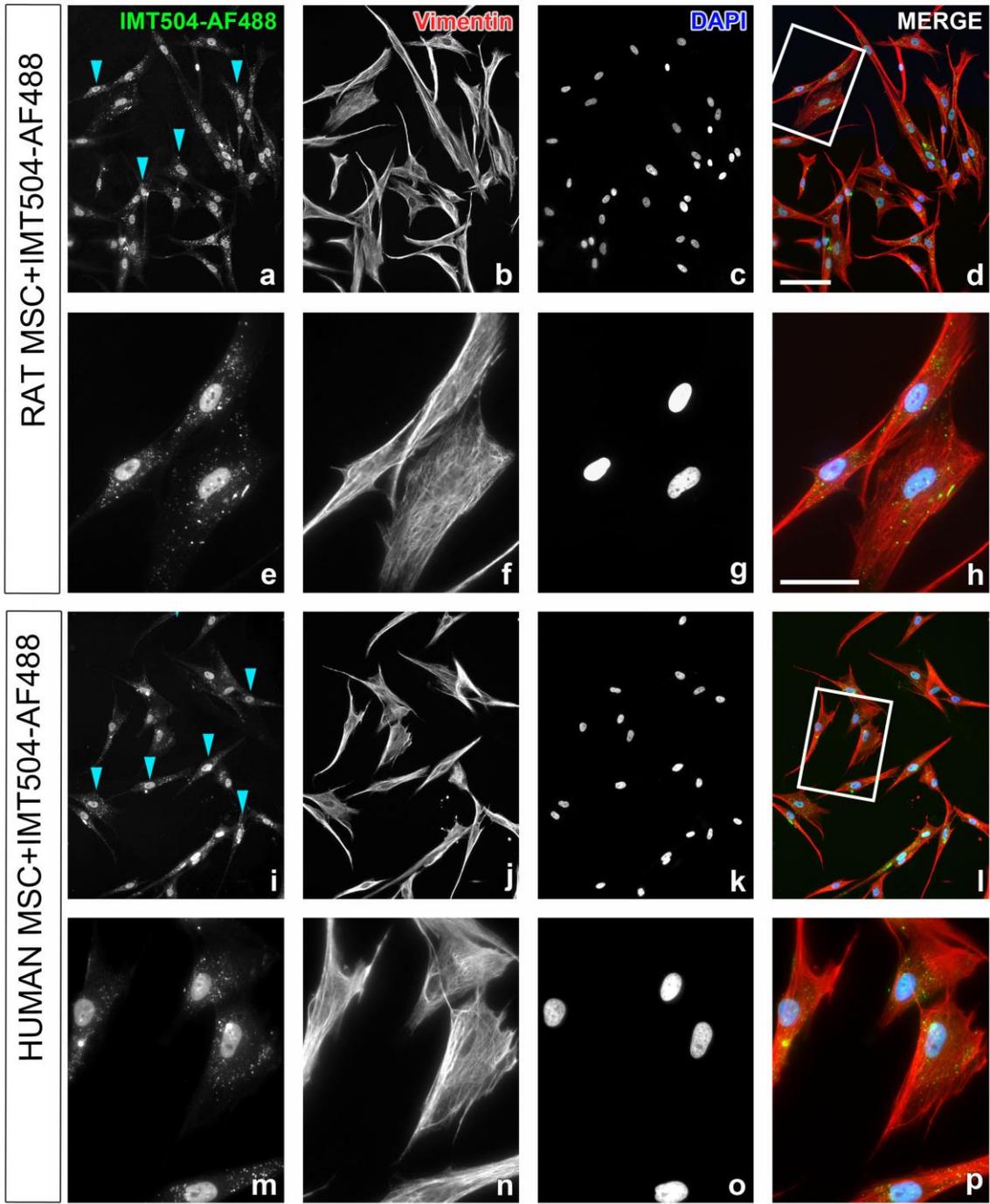
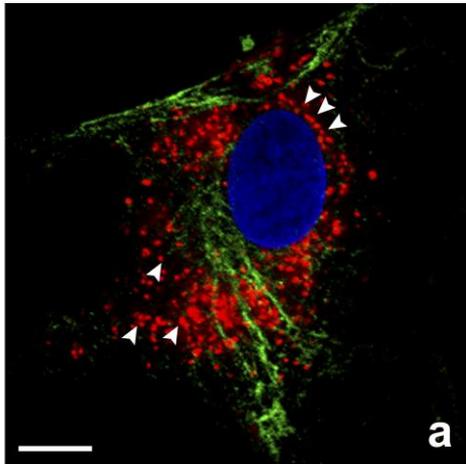


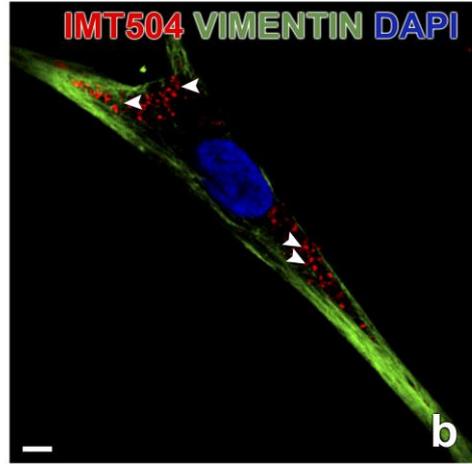
Figura 10. Visualización confocal de las MSC de rata y humano expuestas a IMT504. (a-b) Microfotografías de MSC de rata (a) y humano (b). En rojo, señal fluorescente de IMT504-Texas Red; en verde, señal fluorescente de vimentina, y en azul, señal fluorescente de DAPI. Las cabezas de flecha indican los gránulos intracelulares IMT504-Texas Red positivos. Escala de magnificación: 10 μ m.

Figure 10. Confocal visualization of rat and human MSC expose to IMT504. (a-b) Photomicrographs of rat (a) and human (b) MSC. In red, IMT504-Texas Red fluorescent signal; in green, vimentin immunofluorescent signal, and in blue DAPI fluorescent signal. Arrowheads indicate IMT504-Texas Red-positive intracellular granules. Scale bars: 10 μ m.

Rat MSC+IMT504



Human MSC+IMT504



1.5 **IMT504 modula el microambiente inflamatorio del nervio lesionado de ratas con SNI**

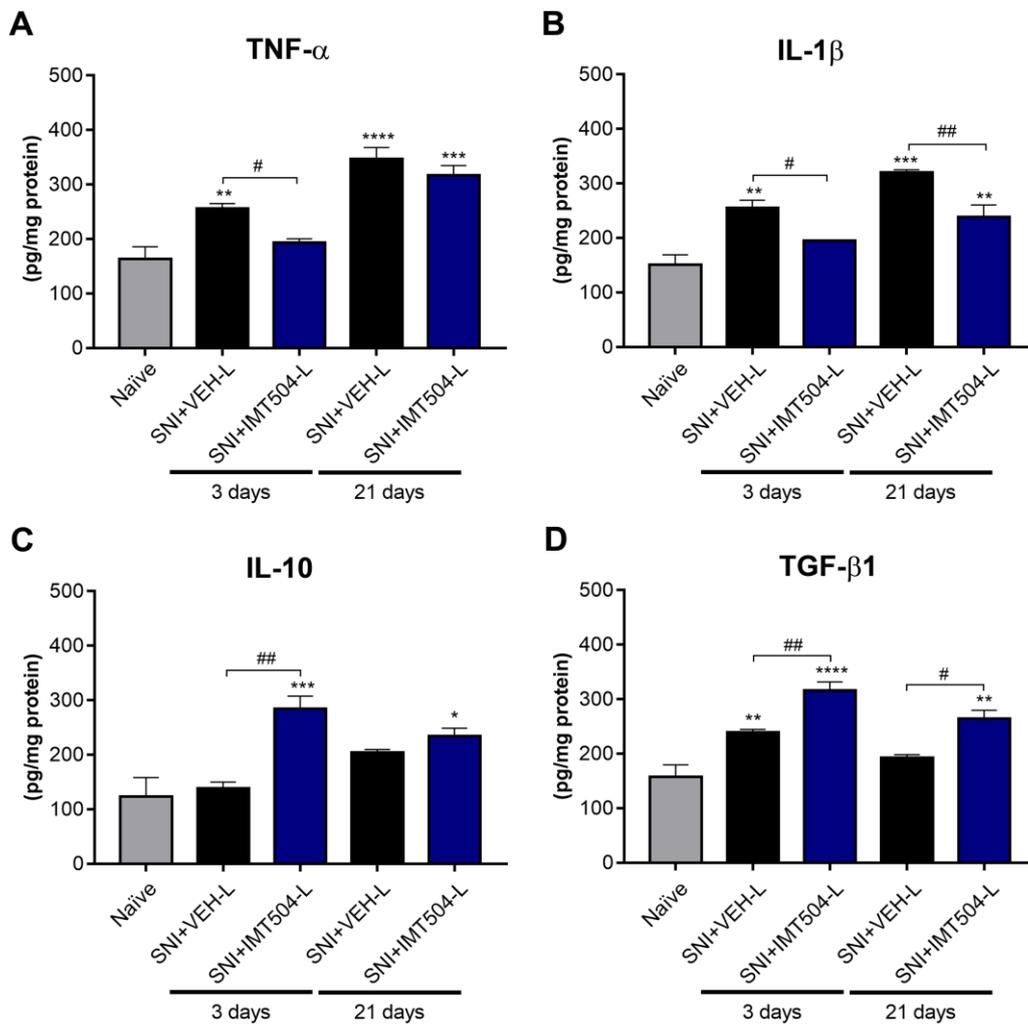
Para abordar la hipótesis de que los efectos anti-alodínicos y pro-migratorios del IMT504 están asociados con la modulación de los procesos inflamatorios que tienen lugar durante la lesión por el modelo de SNI, evaluamos los niveles de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en los nervios lesionados. Los niveles de citoquinas se midieron 3 y 21 días después del tratamiento, en los nervios ipsilaterales de ratas SNI+VEH-L y SNI+IMT504-L, y también en ratas naïve (**Figura 11**).

El análisis en ratas SNI+VEH-L mostró un marcado aumento en los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias, TNF- α (**Figura 11A**) e IL-1 β (**Figura 11B**), en ambas sobrevividas evaluadas, en comparación con ratas naïve. Por otro lado, el análisis de las citoquinas anti-inflamatorias en estos animales mostró una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, hacia el aumento de IL-10, 21 días después de la lesión (**Figura 11C**). Y TGF- β 1 solo mostró niveles aumentados 3 días después del tratamiento, volviendo a valores cercanos a los basales 21 días después del tratamiento (**Figura 11D**).

A diferencia de las ratas SNI+VEH-L, el análisis de las ratas SNI+IMT504-L 3 días después del tratamiento con el ODN no mostró un aumento en los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α and IL-1 β (**Fig. 11A, B**). De hecho, los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias presentes en las ratas tratadas con el ODN fueron comparables a las observadas en los animales naïve en la sobrevivida analizada. Por el contrario, 21 días después del tratamiento, se observó un aumento en los niveles de TNF- α en ratas SNI+IMT504-L comparable con el observado en animales SNI+VEH-L (**Figura 11A**); los niveles de IL-1 β también experimentaron un ligero aumento comparado con lo observado 3 días después del tratamiento con el ODN, aunque significativamente menor que en las ratas SNI+VEH-L (**Figura 11B**). Finalmente, en cuanto a las citoquinas anti-inflamatorias, los niveles de IL-10 se encontraron fuertemente aumentados 3 y 21 días después del tratamiento en ratas que recibieron ODN, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre las ratas SNI+VEH-L y SNI+IMT504-L, 3 días después del tratamiento. Por otro lado, los niveles de TGF- β 1 no sólo aumentaron significativamente en ratas tratadas con IMT504 en ambas sobrevividas evaluadas, sino que además mostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación con las ratas SNI+VEH-L (**Figura 11C, D**).

Figura 11. La administración *in vivo* de IMT504 modula los niveles proteicos de citoquinas pro- y anti-nflamatorias en el nervio lesionado de ratas con SNI. (A) La cantidad de TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-10 y (D) TGF- β 1 fue medida en ratas naïve (columnas grises), SNI+VEH-L (columnas negras) o SNI+IMT504-L (columnas azules), 3 y 21 días después del tratamiento. Los resultados representan un $n= 3$ ratas por grupo, por sobrevivida evaluada y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ naïve vs SNI+VEH-L o SNI+IMT504-L, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; # $P < 0.05$ y ## $P < 0.01$ SNI+VEH-L vs SNI+IMT504-L.

Figure 11. *In vivo* administration of IMT504 modulates the protein levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured nerve of SNI rats. (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IL-10 and (D) TGF- β 1 were measured in naïve (gray columns), SNI+VEH-L (black columns) or SNI+IMT504-L (blue columns) rats, 3 and 21 days after treatment. Data represents an $n= 3$ rats per group, per time-point and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ naïve vs SNI+VEH-L or SNI+IMT504-L, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ SNI+VEH-L vs SNI+IMT504-L.



1.6 IMT504 modula *ex vivo* a las MSC de la rata, promoviendo un perfil anti-inflamatorio y cambios en el ambiente inflamatorio de nervios lesionados

A continuación, determinamos si el IMT504 modula, en ensayos *ex vivo*, los niveles de expresión de las principales citoquinas inmunoreguladoras secretadas por las MSC de rata, *Tgf-β1* e *Il-10*, y el impacto que estos cambios podrían tener en el entorno inflamatorio del nervio ciático lesionado, obtenido a partir de ratas SNI. Para ello, llevamos a cabo experimentos de cultivo y co-cultivo de MSC pre-tratadas con IMT504 y nervios ipsilaterales de ratas con 7 días de lesión por SNI.

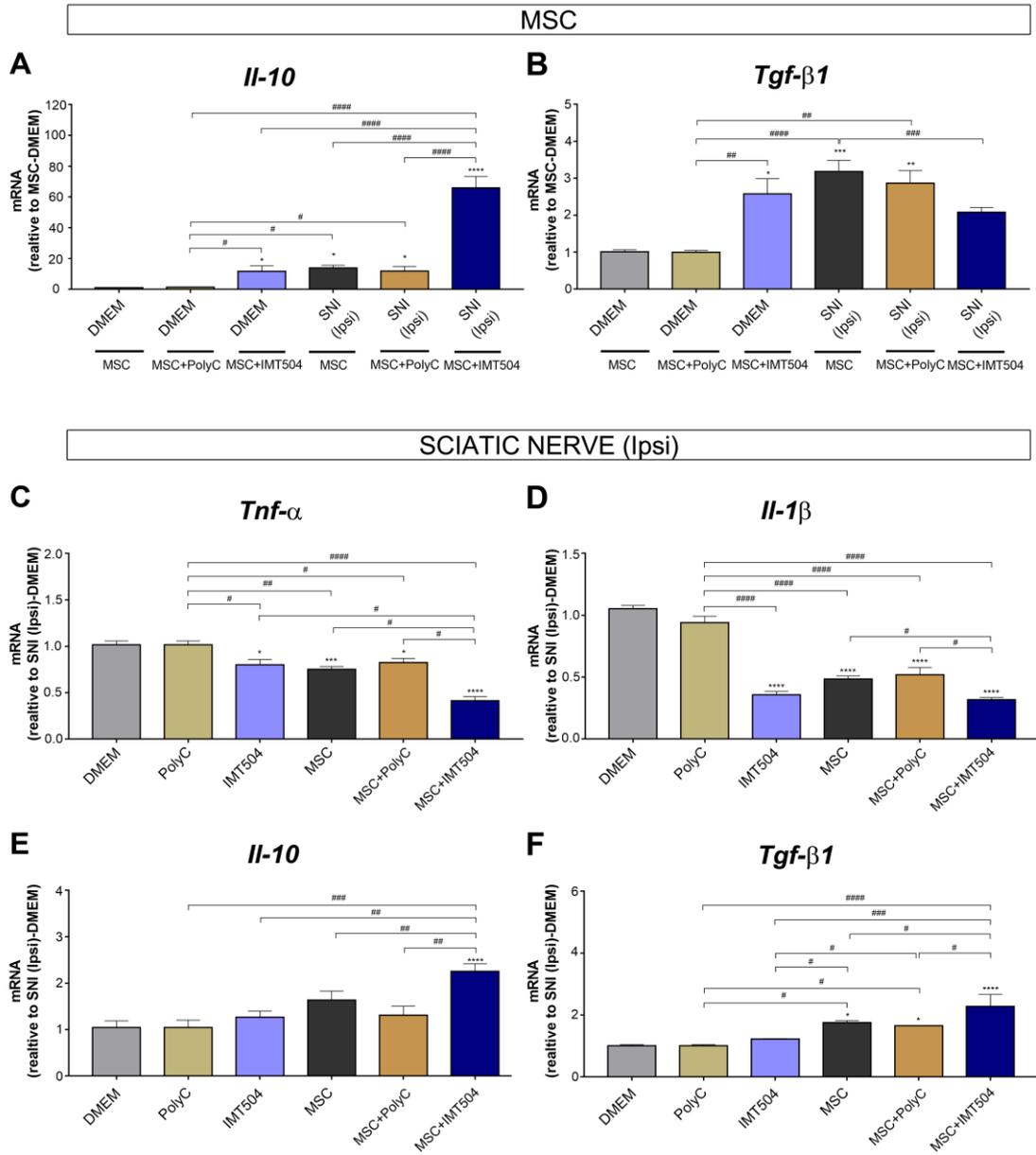
Primero, evaluamos si el pre-tratamiento de MSC con IMT504 induce cambios en los niveles de expresión de las citoquinas anti-inflamatorias en dichas células. Encontramos que la incubación con IMT504 aumentó significativamente la expresión de *Il-10* y *Tgf-β1* en MSC, en comparación con las células expuestas a DMEM o PolyC (**Figura 12A, B**). A continuación, evaluamos si la exposición de MSC no tratadas o pre-tratadas con PolyC, y expuestas a nervios lesionados obtenidos de ratas SNI altera los cambios mencionados anteriormente en la expresión de *Il-10* y *Tgf-β1*. Ambas condiciones dieron como resultado aumentos en la expresión de *Tgf-β1* e *Il-10*, similar a lo que se observó en MSC pre-tratadas con IMT504 y cultivadas en DMEM (**Figura 12A, B**). Finalmente, las MSC pre-tratadas con IMT504 expuestas a nervios lesionados mostraron el aumento más pronunciado en la expresión de *Il-10*, mientras que el mismo protocolo de incubación resultó en una disminución en la expresión de *Tgf-β1* (**Figura 12A, B**).

Aprovechando la interacción bi-direccional que se presenta en los cultivos “transwell”, también evaluamos los efectos sobre los nervios lesionados. Se incluyeron en el análisis nervios ipsilaterales cultivados solamente con DMEM, PolyC o IMT504. En comparación con los nervios cultivados en DMEM o PolyC, su incubación con IMT504 dio como resultado una disminución de los niveles de *Tnf-α* (**Figura 12C**) y de *Il-1β* (**Figura 12D**), pero sin cambios en la expresión de *Il-10* (**Figura 12E**) o de *Tgf-β1* (**Figura 12F**). El co-cultivo de nervios lesionados con MSC no tratadas o pre-tratadas con PolyC también dio como resultado una disminución en la expresión de *Tnf-α* e *Il-1β* (**Figura 12C, D**) y un aumento significativo en la expresión de *Tgf-β1*; los niveles de *Il-10* permanecieron sin cambios (**Figura 12E, F**). Finalmente, el co-cultivo de nervios lesionados con MSC pre-tratadas con IMT504 dio como resultado una disminución significativa de *Tnf-α* (**Figura 12C**) e *Il-1β* (**Figura 12D**), y un aumento significativo en la expresión de *Il-10* (**Figura 12E**) y de *Tgf-β1* (**Figura 12F**). De hecho, en comparación con los otros grupos experimentales, la última condición dio como

resultado la menor expresión de *Tnf- α* y la mayor expresión de *Il-10* y *Tgf- β 1* (**Figura 12C-F**).

Figura 12. IMT504 actúa sobre las MSC y en el nervio lesionado promoviendo un medio anti-inflamatorio. (A-B) Los niveles de ARNm de *Il-10* (A) y *Tgf-β1* (B) fueron medidos en MSC no tratadas (columnas grises), pre-tratadas con PolyC (columnas ocre) y pre-tratadas con IMT504 (columnas celestes) y cultivadas en DMEM, y en MSC no tratadas (columnas negras), pre-tratadas con PolyC (columnas marrones) o pre-tratadas con IMT504 (columnas azules) co-cultivadas con nervios ipsilaterales de ratas con 7 días de lesión por SNI (las MSC no tratadas de ratas y cultivadas en DMEM fueron utilizadas como control). **(C-F)** Los niveles de ARNm de *Tnf-α* (C), *Il-1β* (D), *Il-10* (E) y *Tgf-β1* (F) se midieron en los nervios ipsilaterales de ratas con 7 días de lesión por SNI y cultivados en DMEM (columnas grises), PolyC (columnas ocre) o IMT504 (columnas celestes) o co-cultivados con MSC no-tratadas (columnas negras), pre-tratadas con PolyC (columnas marrones) o pre-tratadas con IMT504 (columnas celestes) (los nervios de ratas de 7 días de lesión por SNI, cultivados en DMEM fueron utilizados como control). Los resultados se expresan como la media ± SEM. Las diferencias significativas se establecieron por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: P < 0.0001 entre grupos; *P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001 y ****P < 0.0001 entre el control (MSC no tratadas cultivadas en DMEM o nervios ipsilaterales de ratas con 7 días de lesión por SNI cultivados en DMEM, según corresponda) y los demás grupos, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: P < 0.0001; #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 y ####P < 0.0001 entre todos los grupos evaluados.

Figure 12. IMT504 acts on MSC and the injured nerve to promote an anti-inflammatory milieu. (A-B) *Il-10* (A) and *Tgf-β1* (B) mRNA levels were measured in untreated (gray columns), PolyC-pre-treated (light-brown columns) and IMT504-pre-treated (light-blue columns) MSC cultured in DMEM, and in untreated (black columns), PolyC-pre-treated (brown columns) or IMT504-pre-treated (blue columns) MSC co-cultured with 7 day-SNI ipsilateral nerves (MSC cultured in DMEM served as control). **(C-F)** *Tnf-α* (C), *Il-1β* (D), *Il-10* (E) and *Tgf-β1* (F) mRNA levels were measured in 7 day-SNI ipsilateral nerves cultured in DMEM (gray columns), PolyC (light-brown columns) or IMT504 (light-blue columns), or in 7 day-SNI ipsilateral nerves co-cultured with untreated (black columns), PolyC-pre-treated (brown columns) or IMT504 pre-treated (light-blue columns) MSC (nerves incubated in DMEM served as control). Data are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: P < 0.0001 among groups; *P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001 between control (untreated MSC cultured in DMEM or 7 day-SNI ipsilateral nerves cultured in DMEM, as appropriate) and other groups, and followed by the Sidak's multiple comparison test: P < 0.0001; #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 and ####P < 0.0001 between all groups tested.



Proyecto II

Efectos y mecanismos de acción del ODN IMT504 en ratas con axotomía completa del nervio ciático

2.1 Diseño experimental

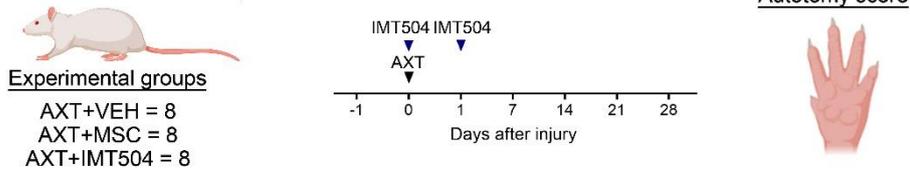
Se estudió el efecto de una doble administración sistémica (s.c.) de IMT504 a una concentración de 6 mg/kg en animales con axotomía completa del nervio ciático (AXT+IMT504). La administración de IMT504 se llevó a cabo inmediatamente después de la cirugía y al día posterior. Asimismo, en grupos experimentales independientes, se evaluó además el efecto de la administración sistémica de MSC, inyectadas por la vena de la cola a una densidad de 1×10^6 células (resuspendidas en 250 μ l de DMEM suplementado) utilizando una jeringa de 1 ml provista de una aguja 25G.

En los animales así tratados, se evaluó el grado de autotomía del miembro lesionado a intervalos regulares de 7 días en animales lesionados tratados con IMT504, BMMC o con solución salina estéril (AXT+VEH). Seguidamente, y sólo en ratas tratadas con IMT504 o vehículo, se evaluó: 1) la movilización y migración de MSC endógenas hacia el nervio lesionado y los DRG L4-L6 asociados, mediante citometría de flujo; 2) el grado de activación de las SGC en los DRG L4-L6 ipsi- y contralaterales, y el grado de gliosis espinal en el asta dorsal de la médula espinal, 14 y 28 días después de la lesión, usando ratas naïve como control. Además, se estudió la expresión de citoquinas pro- (TNF- α e IL-1 β) y anti-(IL-10 y TGF- β 1) inflamatorias por ELISA, en el nervio ciático lesionado y en médula espinal, 28 días después de la lesión en animales lesionados tratados y animales naïve (**Figura 13**).

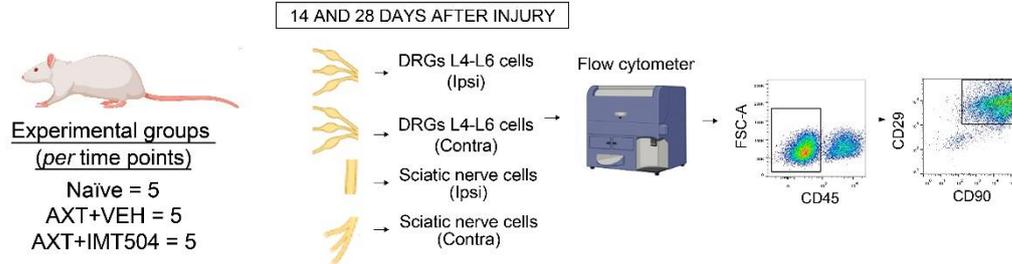
Figura 13. Diseño experimental para el estudio del efecto terapéutico de IMT504 en ratas con axotomía completa del nervio ciático. (A) Marco temporal del diseño experimental y evaluación del grado de autotomía en ratas AXT+VEH, AXT+MSC y AXT+IMT504 ($n=8$ ratas por grupo). **(B)** Cuantificación de MSC (células CD45-CD90+CD29+) en nervio ciático y DRG L4-L6 por citometría de flujo ($n= 5$ ratas por grupo, por sobrevida evaluada). **(C)** Evaluación de los efectos del IMT504 sobre la gliosis ganglionar y espinal inducida por axotomía del nervio ciático ($n= 6$ ratas por grupo, por sobrevida evaluada), mediante inmunofluorescencia (expresión glial). **(D)** Los ensayos de ELISA fueron llevados a cabo para analizar cambios en los niveles de citoquinas pro- (TNF- α e IL-1 β) y anti- (IL-10 y TGF- β 1) inflamatorias en nervios lesionados y médula espinal ipsilateral ($n= 3$ ratas por grupo). Figura creada por BioRender.com.

Figure 13. Experimental design for the study of the therapeutic effect of IMT504 in rats with complete sciatic nerve transection. (A) Experimental design time frame and evaluation of the axotomy score in AXT+VEH, AXT+MSC and AXT+IMT504 rats ($n=8$ rats per group). **(B)** Quantification of MSC (CD45-CD90+CD29+ cells) in sciatic nerve and DRG L4-L6 by flow cytometry ($n= 5$ rats per group, per time-point). **(C)** Study of the effects of IMT504 on sciatic nerve axotomy-induced ganglial and spinal gliosis ($n=$ rats per group, per time-point), using immunofluorescence (glial expression). **(D)** ELISA analysis was performed to address changes in pro- (TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10 and TGF- β 1) cytokines in injured nerves and ipsilateral spinal cord ($n= 3$ rats per group). Figure was created using BioRender.com.

A. BEHAVIORAL TESTING



B. FLOW CYTOMETRY



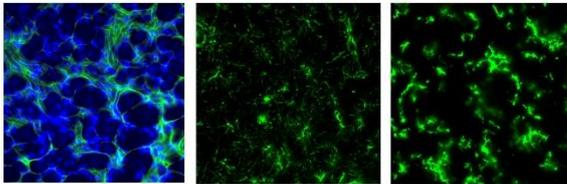
C. IMMUNOFLUORESCENCE



Experimental groups (per time points)
 Naive = 6
 AXT+VEH = 6
 AXT+IMT504 = 6

14 AND 28 DAYS AFTER INJURY

DRG astroglia Spinal cord astroglia Spinal cord microglia

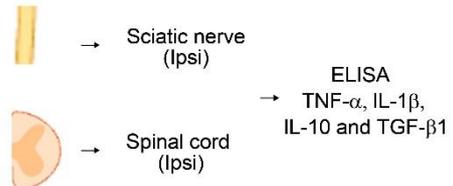


D. ELISA



Experimental groups (per time points)
 Naive = 3
 AXT+VEH = 3
 AXT+IMT504 = 3

28 DAYS AFTER INJURY



2.2 IMT504 previene la autotomía en ratas con axotomía completa del nervio ciático

Habiendo estudiado el efecto terapéutico y el mecanismo de acción de IMT504 en un modelo de dolor neuropático por lesión selectiva de las ramas del nervio ciático, donde solo permanece intacta la rama sensitiva sural, decidimos analizar el efecto de IMT504 en ratas con axotomía completa del nervio ciático, siguiendo el diseño experimental que se aprecia en la **Figura 13**. El uso de este modelo de lesión está reservado para el estudio de condiciones clínicas como la amputación del miembro inferior, dolor neuropático asociado a neuroma hipersensible y el síndrome de miembro fantasma.

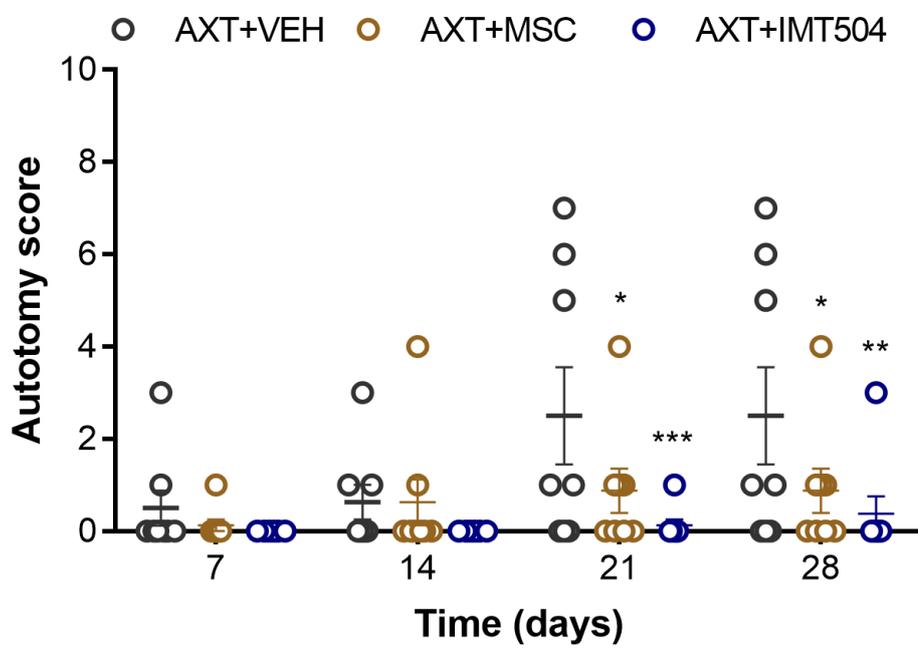
Luego de una sección completa del nervio ciático en roedores, se desarrolla un neuroma en el sitio de la lesión neural, y se observa con frecuencia la auto-mutilación de la pata denervada, comportamiento conocido como autotomía y que se interpreta como signo de dolor neuropático. En base a esto, se decidió evaluar el grado de autotomía en ratas con lesión completa del nervio ciático a intervalos regulares de 7 días, durante 28 días. El experimento fue diseñado utilizando 3 grupos experimentales: 1) animales lesionados que recibieron una doble administración de IMT504 (6 mg/kg) (AXT+IMT504). La primera dosis fue administrada inmediatamente después de la cirugía y la segunda al día posterior; 2) animales lesionados que, siguiendo el diseño experimental anteriormente mencionado, recibieron una doble administración de solución salina estéril (AXT+VEH); 3) animales lesionados que fueron inyectados con MSC (1×10^6 células) de forma sistémica (por la vena de la cola), inmediatamente después de la lesión (AXT+MSC). La elección de este último grupo experimental se basó en querer comparar el efecto de IMT504 a través de la movilización de MSC endógenas con el efecto de estas mismas células, pero administradas en forma exógena.

Al final de la primera semana luego de la lesión, 2 ratas AXT+VEH presentaron autotomía en la pata lesionada. A esta misma sobrevida, sólo un animal tratado con MSC presentó lesiones, mientras que los animales tratados con IMT504 no evidenciaron signos de auto-mutilación. El análisis al final de la segunda semana resultó en 3 ratas AXT+VEH y 2 ratas AXT+MSC con autotomía, y todas las ratas AXT+IMT504 sin signos de auto-mutilación. Sólo al final de las semanas 3 y 4 luego de la lesión, se observó una rata en el grupo AXT+IMT504 con signos de auto-mutilación, lo cual contrastó claramente, y con niveles de significancia estadística, con la autotomía observada en 5 ratas con AXT+VEH.

El análisis de la severidad de la autotomía observada en los grupos experimentales también expuso diferencias significativas entre los tratamientos. La puntuación de autotomía más alta registrada en cada grupo fue de 7 para 1 rata AXT+VEH, 4 para 1 rata AXT+MSC y 3 para 1 rata AXT+IMT504. Asimismo, el porcentaje de ratas en cada grupo que presentó autotomía >1 durante el período de 4 semanas fue del 75% para ratas AXT+VEH, 50% para ratas AXT+MSC y 13% para ratas AXT+IMT504. Finalmente, el porcentaje de ratas en cada grupo que presentó autotomía severa (puntuación de autotomía >5) durante el período de 4 semanas fue 38% para ratas tratadas con vehículo, y 0% para ratas tratadas con MSC o IMT504. En suma, la menor frecuencia y grado de autotomía, en cada sobrevida evaluada, se observó en el grupo AXT+IMT504 (**Figura 14**).

Figura 14. IMT504 previene la autotomía en ratas con axotomía completa del nervio ciático. Evaluación del grado de autotomía en ratas AXT+VEH (círculos negros), AXT+MSC (círculos marrones) y AXT+IMT504 (círculos azules), durante 28 días post-lesión. Los resultados representan un $n=8$ ratas por grupo y se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos vías seguido por el test post-hoc de Tukey: $P < 0.0001$ entre grupos; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$ AXT+MSC o AXT+IMT504 vs AXT+VEH.

Figure 14. IMT504 prevents autotomy in rats with complete axotomy of the sciatic nerve. Autotomy scores in AXT+VEH (black circles), AXT+MSC (brown circles) and AXT+IMT504 (blue circles) treated rats, during 28 days. Data represents an $n=8$ rats *per* group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $P < 0.0001$ among groups; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ AXT+MSC or AXT+IMT504 vs AXT+VEH.



2.3 **IMT504 potencia la movilización y migración de MSC hacia el nervio y DRG lesionados**

Del mismo modo en que analizamos el potencial de IMT504 como movilizador de MSC desde médula ósea hacia el sitio de lesión, en el modelo de SNI (Proyecto I), procedimos a cuantificar, mediante citometría de flujo, el porcentaje de MSC en el nervio ciático y DRG L4-L6 asociados al sitio de la lesión (ver **Figura M8** para conocer la estrategia de análisis para la identificación de MSC por citometría de flujo), de ratas naïve y ratas lesionadas tratadas con vehículo (AXT+VEH) o IMT504 (AXT+IMT504), 14 y 28 días después de la lesión (**Figura 15**)

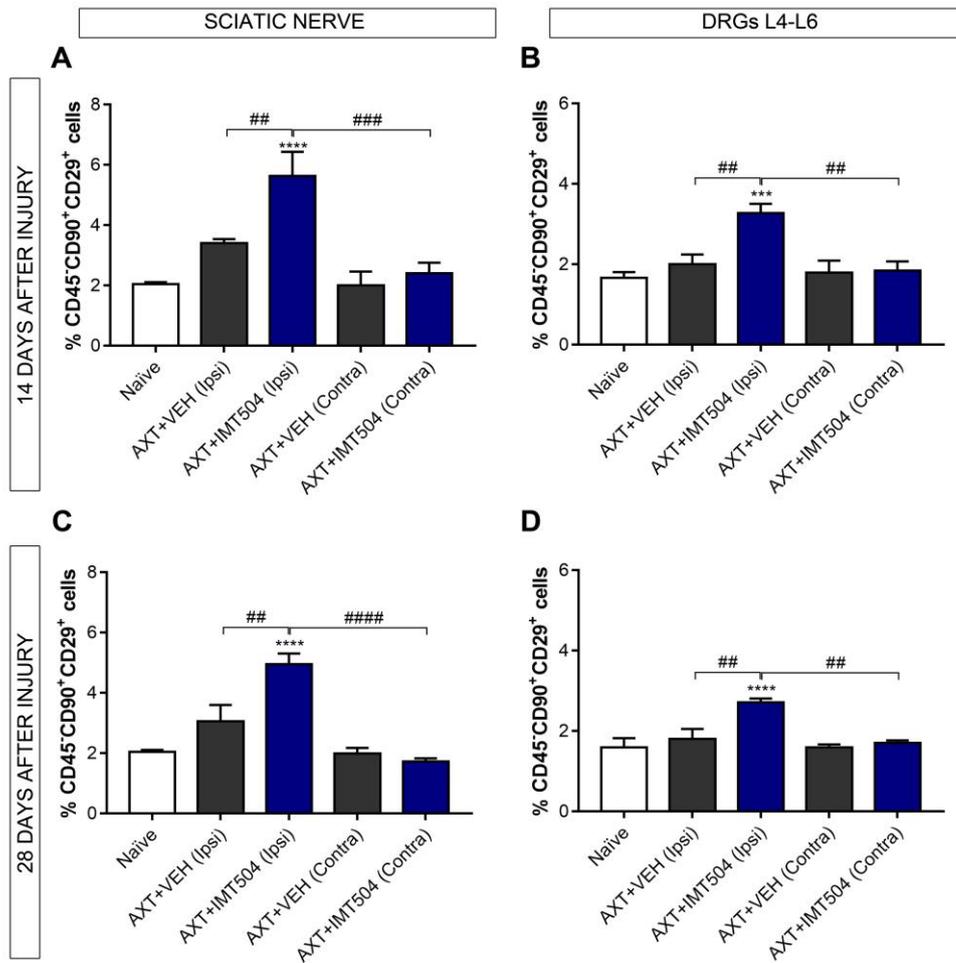
Los animales AXT+VEH no mostraron diferencias en el porcentaje de MSC en el nervio ciático lesionado (**Figura 15A**) y en los DRG (**Figura 15B**), 14 días después del tratamiento, al ser comparados con animales naïve; sólo se observó una tendencia hacia el aumento en el porcentaje de MSC en los nervios dañados y a ambas sobrevidas, aunque sin alcanzar significancia estadística. Por el contrario, los animales AXT+IMT504 presentaron un incremento importante en el porcentaje de MSC en estos tejidos, respecto de lo observado en animales AXT+VEH y naïve (**Figura 15A, B**). Al analizar los nervios y ganglios contralaterales de los diferentes grupos experimentales, no se evidenciaron diferencias significativas (**Figura 15A, B**).

El análisis del porcentaje de MSC 28 días después del tratamiento mostró resultados similares a los observados a los 14 días post-lesión (**Figura 15C, D**). En otras palabras, sólo las ratas AXT+IMT504 mantuvieron porcentajes elevados de MSC en el nervio dañado y los DRG ipsilaterales, en comparación con los animales AXT+VEH y naïve. El análisis de los nervios y ganglios contralaterales tampoco arrojó cambios significativos respecto del grupo naïve (**Figura 15C, D**).

En suma, los resultados obtenidos enfatizan el rol de IMT504 como movilizador de MSC endógenas hacia el sitio de lesión, con un posible rol en los efectos anti-alodínicos observados en ratas con axotomía completa del nervio ciático.

Figura 15. La administración *in vivo* de IMT504 induce el aumento de MSC en el nervio lesionado y los DRG asociados. (A-D) Cuantificación de MSC (células CD45⁻CD90⁺CD29⁺) en el nervio ciático (A y C) y DRG L4-L6 (B y D) ipsilaterales y contralaterales, en ratas naïve (columnas blancas), AXT+VEH (columnas grises) y AXT+IMT504 (columnas azules), 14 (A-B) y 28 (C-D) días después del tratamiento. Los resultados representan un $n= 5$ ratas por grupo, por sobrevivida evaluada y se expresa como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; $***P < 0.001$ y $****P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$; $##P < 0.01$, $###P < 0.001$ y $####P < 0.0001$ SNI+VEH vs SNI+IMT504.

Figure 15. *In vivo* administration of IMT504 induces an increase in MSC in the injured nerve and associated DRG. (A-D) Quantification of MSC (CD45⁻CD90⁺CD29⁺ cells) in ipsilateral and contralateral sciatic nerve (A and C) and DRG L4-L6 (B and D) from naïve (white columns), AXT+VEH (grey columns) and AXT+IMT504 (blue columns) rats, 14 (A-B) and 21 (C-D) days after treatment. Data represents an $n= 5$ rats *per group, per time-point* and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $***P < 0.001$ and $****P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $##P < 0.01$, $###P < 0.001$ and $####P < 0.0001$ SNI+VEH vs SNI+IMT504.



2.4 IMT504 reduce la gliosis ganglionar y espinal en ratas axotomizadas

Una vez demostrada la acción preventiva del IMT504 sobre la autotomía del miembro lesionado, así como también el efecto potenciador del ODN sobre la migración de MSC hacia el sitio de lesión, nos propusimos estudiar si los mismos se asociarían a la modulación de la gliosis ganglionar (**Figura 16**) y espinal (**Figuras 17-18**), generada por la lesión de nervios periféricos.

Las ratas AXT+VEH mostraron un aumento en el porcentaje de neuronas rodeadas por un anillo GFAP-inmunoreactivo de SGC, en los DRG L4-L6 ipsilaterales, 14 y 28 días después de la lesión, en comparación con ratas naïve (**Figura 16Aa, Ab, Ca, Cb, B y D**). La administración sistémica de IMT504 resultó en una reducción modesta de este aumento, en comparación con las ratas AXT+VEH; sin embargo, el ODN no logró eliminar por completo la astrogliosis ganglionar reactiva, la cual permaneció por encima de los niveles control observados en ratas naïve (**Figura 16Ac, Cc, B y D**). Por su parte, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de neuronas rodeadas por SGC GFAP-inmunoreactivo en los DRG L4-L6 contralaterales de ratas lesionadas tratadas con vehículo o IMT504, según se compara con animales naïve, en ambas sobrevividas (**Figura 16Ad, Ae, Ce y Cd, B y D**).

El análisis de la gliosis espinal en los diferentes grupos experimentales, 14 días después de la lesión, mostró que los animales AXT+VEH presentaron un incremento en el área ocupada por inmunoreactividad al GFAP en las láminas superficiales y profundas del asta dorsal ipsilateral, en comparación con los animales naïve, manteniéndose tal aumento hasta inclusive los 28 días después de la lesión (**Figuras 17Aa-f y B; 18Aa-f y B**). Por el contrario, el tratamiento con IMT504 de los animales lesionados resultó en niveles de inmunoreactividad al GFAP comparables a lo observado en ratas naïve (**Figuras 17Aa-f y B; 18Aa-f y B**). A destacar, y para todos los animales lesionados y tratados, el área ocupada por marca GFAP en las láminas superficiales fue mayor que en las láminas más profundas.

Finalmente, los resultados obtenidos del análisis del área ocupada por inmunoreactividad al Cd11b/c correlacionaron con lo observado para la astrogliosis en el asta dorsal espinal. Así, en comparación con los incrementos observados en el asta dorsal ipsilateral de ratas AXT+VEH 14 y 28 días después de la lesión (**Figuras 17Ad-f y B; 18Ad-f y B**), la administración de IMT504 bloqueó el aumento en la expresión de Cd11b/c, lo cual resultó en valores similares a los observados en ratas naïve (**Figuras 17Aa-c, g-i y B; 18A a-c, g-i y B**).

Figura 16. La administración de IMT504 reduce la gliosis ganglionar y espinal en ratas con axotomía completa del nervio ciático. (A) Microfotografías representativas de secciones de DRG L4-L6 de ratas naïve (Aa), AXT+VEH ipsilateral (Ab), AXT+IMT504 ipsilateral (Ac), AXT+VEH contralateral (Ad) y AXT+IMT504 contralateral, 14 días después de la lesión, incubadas con anticuerpo contra GFAP. Escalas de magnificación: 100 μ m. **(B)** Cuantificación del porcentaje de neuronas rodeadas por SGC GFAP-IR en DRG L4-L6, en los diferentes grupos experimentales, 14 días después de la lesión. Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; **** $P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; ## $P < 0.01$ AXT+VEH vs AXT+IMT504. **(C)** Microfotografías representativas de secciones de DRG L4-L6 de ratas naïve (Ca), AXT+VEH ipsilateral (Cb), AXT+IMT504 ipsilateral (Cc), AXT+VEH contralateral (Cd) y AXT+IMT504 contralateral, 28 días después de la lesión, incubadas con GFAP-antisuero. Escalas de magnificación: 100 μ m. **(D)** Cuantificación del porcentaje de neuronas rodeadas por SGC GFAP-IR en DRG L4-L6, en los diferentes grupos experimentales, 28 días después de la lesión. Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; **** $P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; # $P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.

Figure 16. IMT504 administration reduces ganglionic and spinal gliosis in rats with complete axotomy of the sciatic nerve. (A-B) Representative photomicrographs of DRG L4-L6 sections of naïve (Aa), AXT+VEH ipsilateral (Ab), AXT+IMT504 ipsilateral (Ac), AXT+VEH contralateral (Ad) and AXT+IMT504 contralateral, 14 days after injury, incubated with GFAP antiserum. Scale bar: 100 μ m. **(B)** Quantification of the percentage of neurons surrounded by GFAP-IR SGCs, in the different experimental groups, 14 days after injury. Data represents an $n= 6$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; **** $P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; ## $P < 0.01$ AXT+VEH vs AXT+IMT504. **(C)** Representative photomicrographs of DRG L4-L6 sections of naïve (Ca), AXT+VEH ipsilateral (Cb), AXT+IMT504 ipsilateral (Cc), AXT+VEH contralateral (Cd) and AXT+IMT504 contralateral, 28 days after injury, incubated with GFAP-antisera. Scale bar: 100 μ m. **(D)** Quantification of the percentage of neurons surrounded by GFAP-IR SGCs, in the different experimental groups, 28 days after the injury. Data represents an $n= 6$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; **** $P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; # $P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.

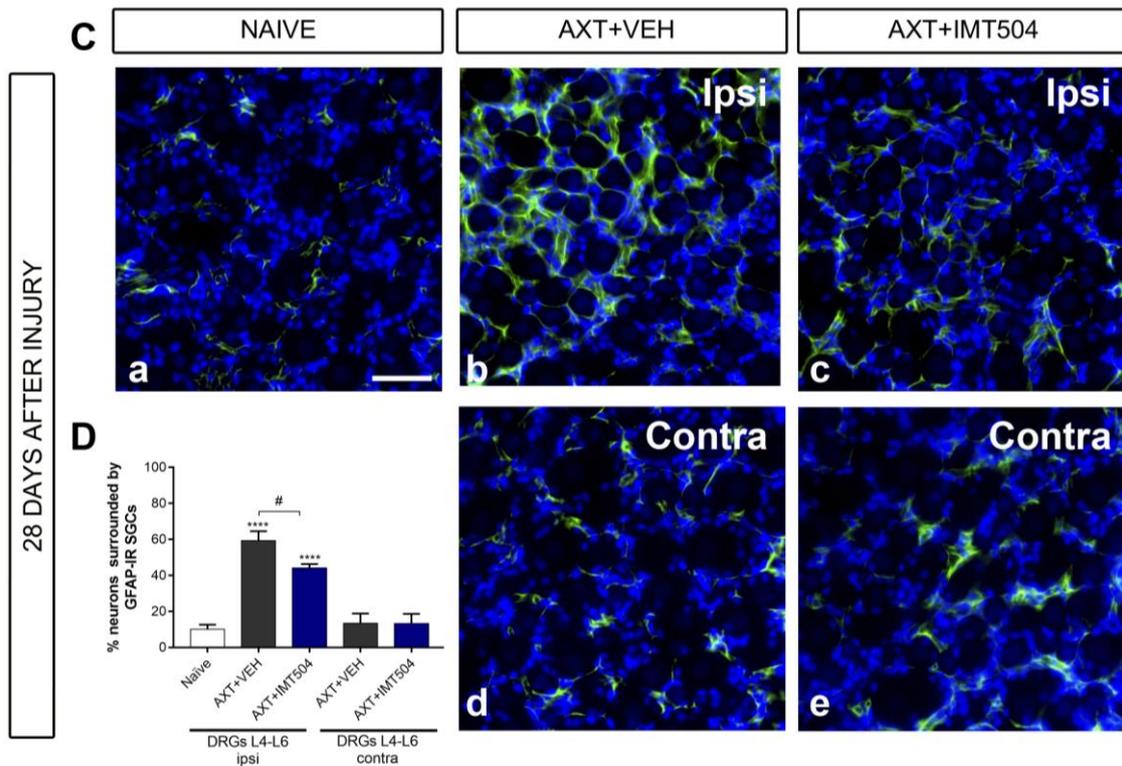
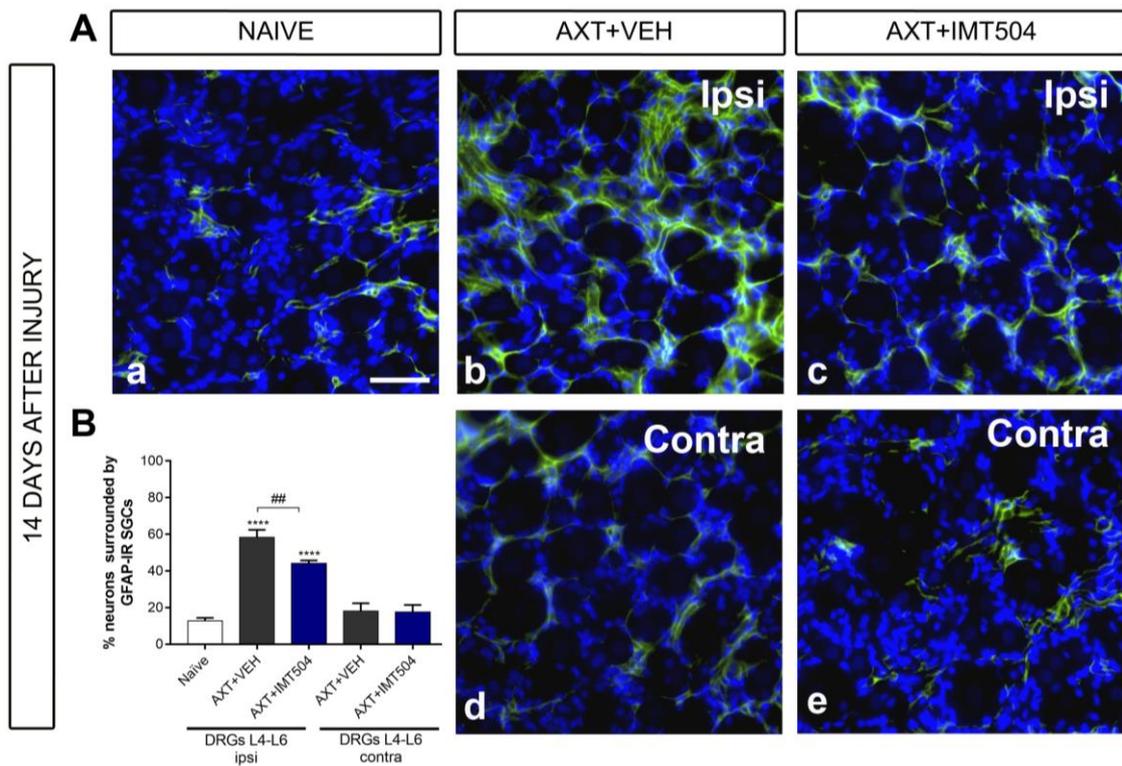


Figura 17. La administración de IMT504 disminuye el grado de gliosis espinal 14 días después de la lesión por axotomía del nervio ciático. (A) Microfotografías representativas de secciones de la médula espinal a la altura del engrosamiento lumbar en ratas naïve (Aa-c), AXT+VEH (Ad-f) y AXT+IMT504 (Ag-i) incubadas con anticuerpo contra GFAP. Los recuadros en Aa, Ad y Ag detallan magnificaciones en Ab-c, Ae-f y Ah-i, en áreas superficiales (Ab, Ae y Ah) y profundas (Ac, Af y Ai) del asta dorsal. Escala de magnificación: 100 μm (Aa=Ad=Ag); 50 μm (Ae-f=Ah-i). **(B)** Análisis de la inmunoreactividad de GFAP (expresado como porcentaje de área GFAP-IR) en láminas I-IV del asta dorsal de la médula espinal, en los diferentes grupos experimentales, 14 días después de la lesión. Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; $\#P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504. **(C)** Microfotografías representativas de secciones de la médula espinal a la altura del engrosamiento lumbar en ratas naïve (Ca-c), AXT+VEH (Cd-f) y AXT+IMT504 (Cg-i) incubadas con anticuerpo contra CD11b/c. Los recuadros en Ca, Cd y Cg detallan magnificaciones en Cb-c, Ce-f y Ch-i, en áreas superficiales (Cb, Ce y Ch) y profundas (Cc, Cf y Ci) del asta dorsal. Escala de magnificación: 100 μm (Ca=Cd=Cg); 50 μm (Ce-f=Ch-i). **(D)** Análisis de la inmunoreactividad de CD11b/c (expresado como porcentaje de área CD11b/c-IR) en láminas I-IV del asta dorsal de la médula espinal), en los diferentes grupos experimentales, 14 días después de la lesión. Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; $**P < 0.01$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; $\#P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.

Figure 17. Administration of IMT504 results in reduced gliosis, as evaluated 14 days after axotomy of the sciatic nerve. (A) Representative photomicrographs of spinal cord sections at the level of the lumbar enlargement of naïve (Aa-c), AXT+VEH (Ad-f) and AXT+IMT504 (Ag-i) rats, incubated with GFAP antiserum. Boxes in Aa, Ad and Ag are in high-power magnification in Ab-c, Ae-f and Ah-i, on superficial (Ab, Ae and Ah) and deep (Ac, Af and Ai) dorsal horn areas. Scale bars: 100 μm (Aa=Ad=Ag); 50 μm (Ae-f=Ah-i). **(B)** Analysis of GFAP immunoreactivity (expressed as relative percentage of GFAP-IR area) in lamina I-IV of spinal cord dorsal horn, in the different experimental groups, 14 days after injury. Data represents an $n= 6$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $\#P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504. **(C)** Representative photomicrographs of spinal cord sections at the level of the lumbar enlargement of naïve (Ca-c), AXT+VEH (Cd-f) y AXT+IMT504 (Cg-i) rats, incubated with CD11b/c antiserum. Boxes in Ca, Cd and Cg are in high-power magnification in Cb-c, Ce-f and Ch-i, on superficial (Cb, Ce and Ch) and deep (Cc, Cf y Ci) dorsal horn areas. Scale bars: 100 μm (Ca=Cd=Cg); 50 μm (Ce-f=Ch-i). **(D)** Analysis of CD11b/c immunoreactivity (expressed as relative percentage of CD11b/c-IR area) in lamina I-IV of spinal cord dorsal horn, in the different experimental groups, 14 days after injury. Data represents an $n= 6$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $**P < 0.01$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $\#P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.

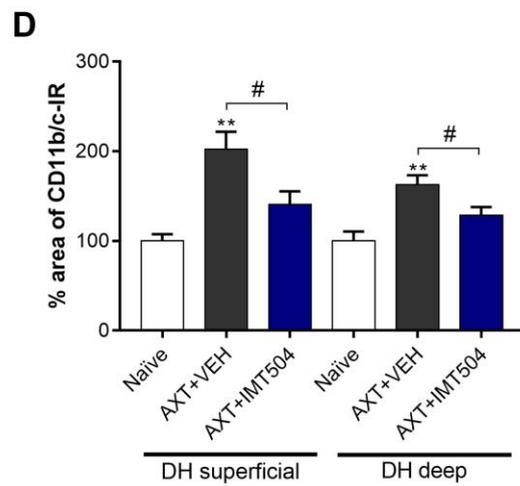
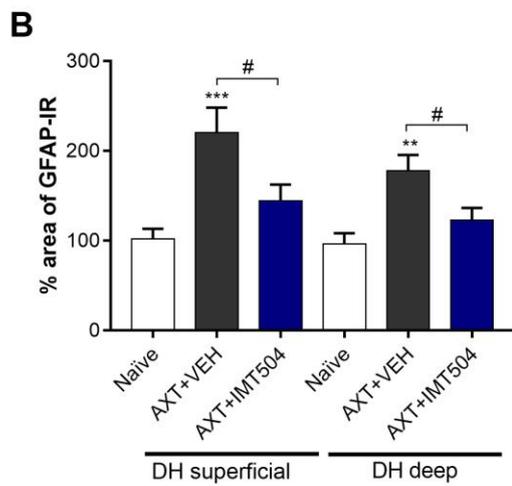
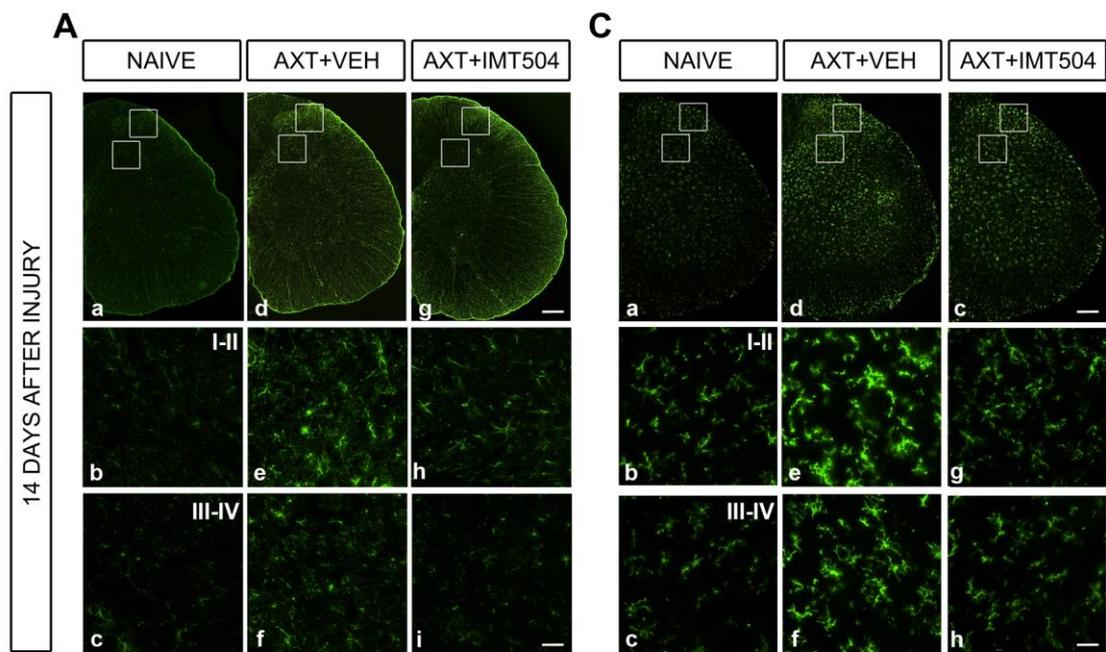
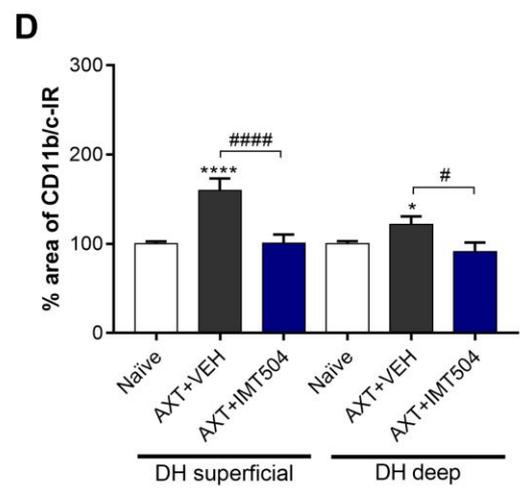
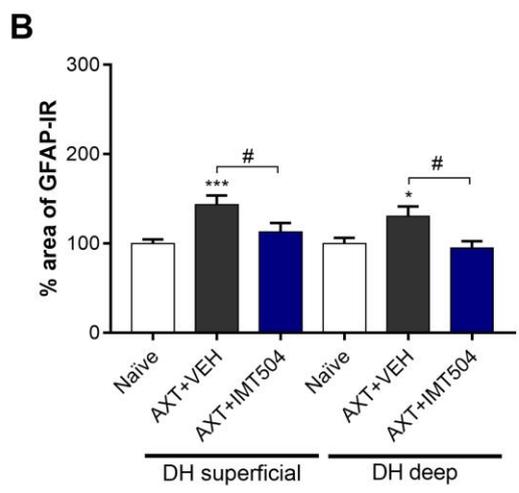
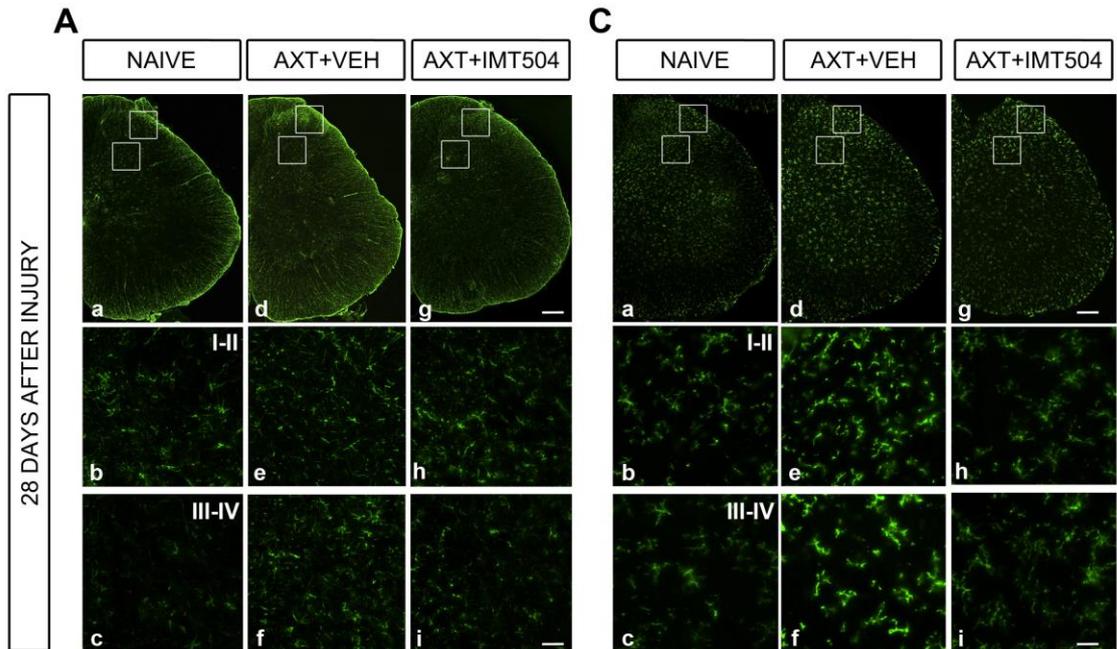


Figura 18. La administración de IMT504 disminuye el grado de gliosis 28 días después de la lesión por axotomía del nervio ciático. **(A)** Microfotografías representativas de secciones de la médula espinal a la altura del engrosamiento lumbar en ratas naïve (Aa-c), AXT+VEH (Ad-f) y AXT+IMT504 (Ag-i) incubadas con anticuerpo contra GFAP. Los recuadros en Aa, Ad y Ag detallan magnificaciones en Ab-c, Ae-f y Ah-i, en áreas superficiales (Ab, Ae y Ah) y profundas (Ac, Af y Ai) del asta dorsal. Escala de magnificación: 100 μm (Aa=Ad=Ag); 50 μm (Ae-f=Ah-i). **(B)** Análisis de la inmunoreactividad de GFAP (expresado como porcentaje de área GFAP-IR) en láminas I-IV del asta dorsal de la médula espinal, en los diferentes grupos experimentales, 28 días después de la lesión. Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; $\#P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504. **(C)** Microfotografías representativas de secciones de la médula espinal a la altura del engrosamiento lumbar en ratas naïve (Ca-c), AXT+VEH (Cd-f) y AXT+IMT504 (Cg-i) incubadas con anticuerpo contra CD11b/c. Los recuadros en Ca, Cd y Cg detallan magnificaciones en Cb-c, Ce-f y Ch-i, en áreas superficiales (Cb, Ce y Ch) y profundas (Cc, Cf y Ci) del asta dorsal. Escala de magnificación: 100 μm (Ca=Cd=Cg); 50 μm (Ce-f=Ch-i). **(D)** Análisis de la inmunoreactividad de CD11b/c (expresado como porcentaje de área CD11b/c-IR) en láminas I-IV del asta dorsal de la médula espinal, en los diferentes grupos experimentales, 28 días después de la lesión. Los resultados representan un $n= 6$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; $*P < 0.05$ y $****P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; $\#P < 0.05$ y $#####P < 0.0001$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.

Figure 18. Administration of IMT504 results in reduced gliosis, as evaluated 28 days after axotomy of the sciatic nerve. **(A)** Representative photomicrographs of spinal cord sections at the level of the lumbar enlargement of naïve (Aa-c), AXT+VEH (Ad-f) and AXT+IMT504 (Ag-i) rats, incubated with GFAP antiserum. Boxes in Aa, Ad and Ag are in high-power magnification in Ab-c, Ae-f and Ah-i, on superficial (Ab, Ae and Ah) and deep (Ac, Af and Ai) dorsal horn areas. Scale bars: 100 μm (Aa=Ad=Ag); 50 μm (Ae-f=Ah-i). **(B)** Analysis of GFAP immunoreactivity (expressed as relative percentage of GFAP-IR area) in lamina I-IV of spinal cord dorsal horn, in the different experimental groups, 28 days after injury. Data represents an $n= 6$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $*P < 0.05$ and $***P < 0.001$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $\#P < 0.05$ AXT+VEH vs AXT+IMT504. **(C)** Representative photomicrographs of spinal cord sections at the level of the lumbar enlargement of naïve (Ca-c), AXT+VEH (Cd-f) and AXT+IMT504 (Cg-i) rats, incubated with CD11b/c antiserum. Boxes in Ca, Cd and Cg are in high-power magnification in Cb-c, Ce-f and Ch-i, on superficial (Cb, Ce and Ch) and deep (Cc, Cf y Ci) dorsal horn areas. Scale bars: 100 μm (Ca=Cd=Cg); 50 μm (Ce-f=Ch-i). **(D)** Analysis of CD11b/c immunoreactivity (expressed as relative percentage of CD11b/c-IR area) in lamina I-IV of spinal cord dorsal horn, in the different experimental groups, 14 days after injury. Data represents an $n= 6$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $*P < 0.05$ and $****P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; $\#P < 0.05$ and $#####P < 0.0001$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.



2.5 El IMT504 modula el microambiente inflamatorio en el nervio lesionado y en la médula espinal ipsilateral de ratas con axotomía

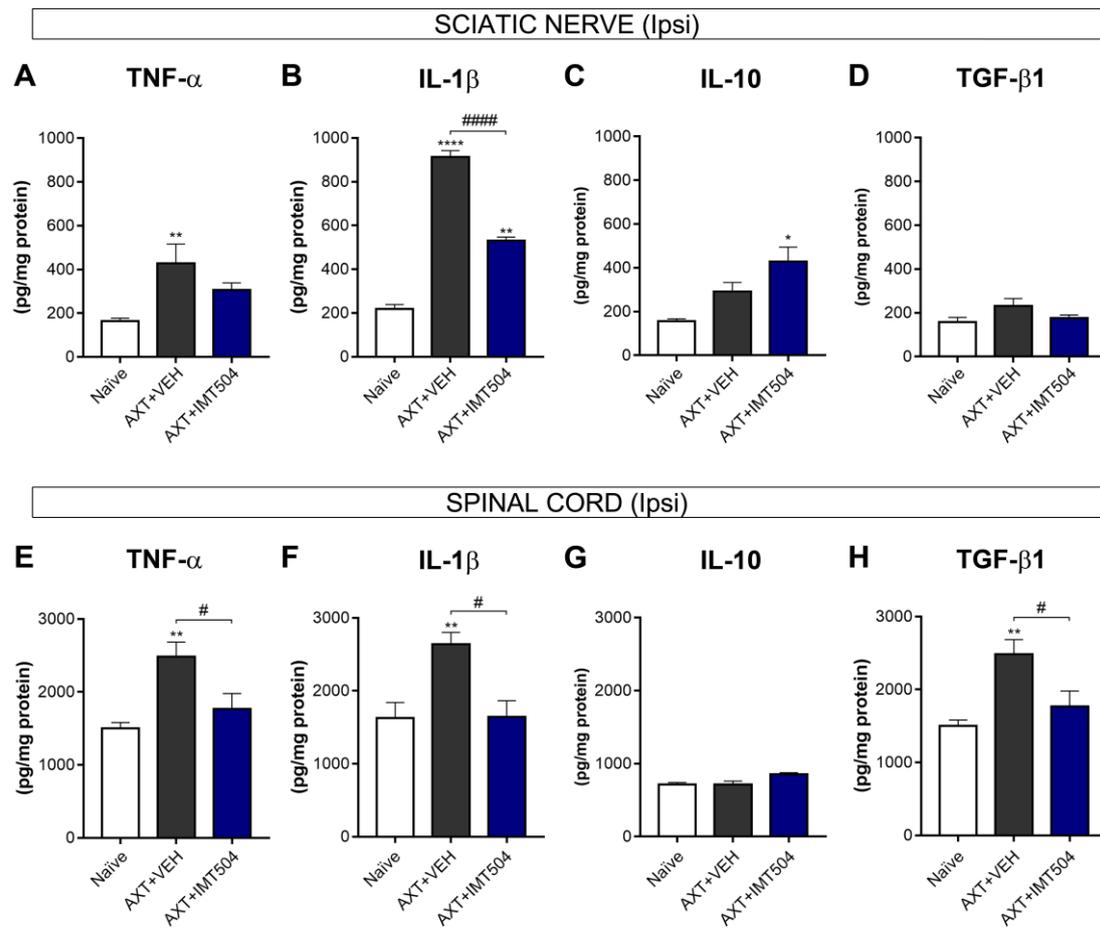
Para abordar la hipótesis de que los efectos preventivos de largo plazo del ODN sobre la autotomía y la gliosis ganglionar y espinal están asociados con la modulación de los procesos inflamatorios que tienen lugar como consecuencia de la lesión del nervio ciático, evaluamos los niveles de expresión proteica de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en los nervios lesionados y en la médula espinal ipsilateral, 28 días después de la lesión en ratas AXT+VEH, AXT+IMT504 y naïve (**Figura 19**).

En las ratas AXT+VEH 28 días post-lesión, se observó un marcado aumento en los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α (**Figura 19A**) e IL-1 β (**Figura 19B**) en los nervios lesionados, en comparación con ratas naïve. Sin embargo, los niveles de las citoquinas anti-inflamatorias no mostraron cambios estadísticamente significativos (**Figura 19C, D**). Por el contrario, el análisis de las ratas SNI+IMT504 28 días post-lesión mostró que el ODN previene (**Figura 19A**) o disminuye significativamente (**Figura 19B**) los niveles de expresión de TNF- α e IL-1 β , respectivamente en los nervios lesionados. El análisis de la expresión de citoquinas anti-inflamatorias en los nervios dañados reveló que el IMT504 conduce a un aumento significativo de la IL-10, aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas respecto de lo observado en ratas AXT+VEH (**Figura 19C**). Por otro lado, la expresión de TGF- β 1 en los nervios dañados no se vio influenciada por el ODN (**Figura 19D**).

A nivel espinal, las ratas AXT+VEH mostraron un marcado aumento de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α (**Figura 19E**) e IL-1 β (**Figura 19F**). El análisis de las citoquinas anti-inflamatorias en estos animales sólo mostró un aumento estadísticamente significativo en la expresión proteica de TGF- β 1 en la médula espinal (**Figura 19G, H**). La administración sistémica de IMT504 resultó en un bloqueo del aumento de los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias (**Figura 19E, F**), sin influir sobre los niveles de IL-10 (**Figura 19G**). Sin embargo, el tratamiento con el ODN reveló un efecto reductor de los niveles aumentados de TGF- β 1, en comparación con lo observado en las ratas AXT+VEH (**Figura 19H**).

Figura 19. La administración de IMT504 modula los niveles proteicos de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en el nervio lesionado y la médula espinal ipsilateral de ratas con axotomía completa del nervio ciático. (A-H) Los niveles de proteína de TNF- α (A y E), IL-1 β (B y F), IL-10 (C y G) y TGF- β 1 (D y H) fueron medidos en el nervio (A-D) y médula espinal ipsilateral (E-H; a nivel del ensanchamiento lumbar) de ratas naïve (columnas blancas), AXT+VEH (columnas grises) y AXT+IMT504 (columnas azules) 28 días después de la lesión. Los resultados representan un $n= 3$ ratas por grupo y son expresados como la media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de un-factor seguido por el test de comparación múltiple de Dunnett: $P < 0.0001$ entre grupos; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y **** $P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH o AXT+IMT504, y seguido por el test de comparación múltiple Sidak: $P < 0.0001$ entre grupos; # $P < 0.05$ y ##### $P < 0.0001$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.

Figure 19. IMT504 administration modulates the protein levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured nerve and in the ipsilateral spinal cord in rats with complete axotomy of the sciatic nerve. (A-H) TNF- α (A and E), IL-1 β (B and F), IL-10 (C and G) and TGF- β 1 (D and H) protein levels were measured in ipsilateral nerve (A-D) and spinal cord (E-H; at the lumbar enlargement) from naïve (gray columns), AXT+VEH (black columns) and AXT+IMT504 (blue columns) rats, 28 days after injury. Data represents an $n= 3$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of one-way ANOVA followed by the Dunnett's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$ naïve vs AXT+VEH or AXT+IMT504, and followed by the Sidak's multiple comparison test: $P < 0.0001$ among groups; # $P < 0.05$ and ##### $P < 0.01$ AXT+VEH vs AXT+IMT504.



Proyecto III

Tratamiento tardío con BMMC en ratas con lesión del nervio ciático

3.1 Diseño experimental

3.1.1 Evaluación de la ventana temporal en la cual se observa un mayor arribo de BMMC, administradas de forma exógena y a distintas sobrevividas, en el nervio lesionado de ratas con crush (**Proyecto III.1**)

En ratas lesionadas, a distintos días post-lesión (0, 3, 7, 14, 21 y 28), se administró de forma sistémica 1×10^7 BMMC (CRUSH+ Late BMMC) por la vena de la cola, en un volumen de 300 μ l de DMEM suplementado, utilizando una jeringa de 1 ml provista de una aguja 25G. Además de los animales lesionados y tratados con BMMC, se incluyeron animales lesionados tratados con solución salina estéril (CRUSH+VEH) y animales naïve.

Se evaluó la ventana temporal a la cual las células migran eficientemente al nervio lesionado, utilizando BMMC provenientes de ratas transgénicas ^{EGFP}Wistar (expresión de la proteína verde fluorescente).

3.1.2 Análisis del efecto del trasplante sistémico tardío de BMMC sobre la conducta del dolor, sobre la locomoción y sobre la velocidad de conducción y regeneración del nervio en ratas con crush del nervio ciático (**Proyecto III.2**)

Posteriormente, en animales lesionados que recibieron BMMC, 7 días después de la lesión, se estudió el posible efecto anti-alodínico, a través de ensayos conductuales de alodinia mecánica y al frío, y pro-regenerativo de estas células, a través del estudio de la locomoción de los animales, ensayos electromiográficos y análisis por Western-blot e inmunohistoquímica de la expresión de la proteína básica de la mielina (MBP) y β III-tubulina en el nervio lesionado (**Figura 20**).

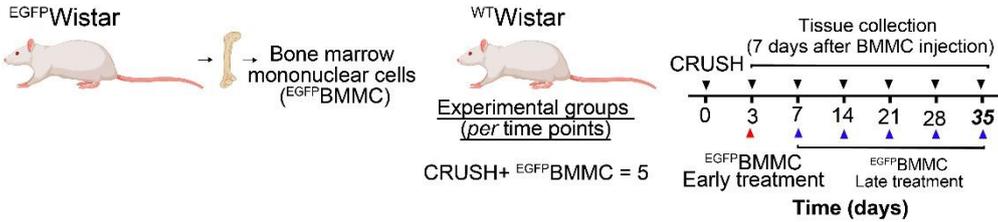
3.1.3 Administración sistémica de BMMC en ratas con lesión selectiva de las ramas del nervio ciático (Resultados preliminares) (**Proyecto III.3**)

Se administraron de forma sistémica 1×10^7 BMMC, 7 (única administración) o 7 y 10 días (doble administración) después de la lesión, por la vena de la cola del animal (SNI+ Late BMMC). Además de los animales lesionados y tratados con BMMC, se incluyeron animales lesionados tratados con solución salina estéril (SNI+VEH). A través de ensayos conductuales se evaluó la alodinia mecánica y térmica al frío, a diferentes sobrevividas (**Figura 21**).

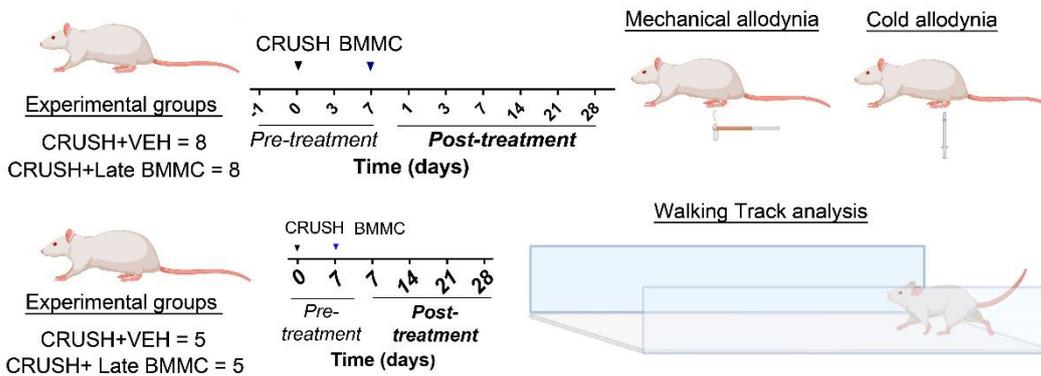
Figura 20. Diseño experimental para el estudio del efecto anti-alodínico y pro-regenerativo de BMMC en ratas con compresión aguda del nervio ciático. (A) Caracterización temporal de la cinética de migración de las BMMC en ratas lesionadas, tratadas a diferentes sobrevidas ($n= 5$ ratas por grupo). **(B)** Evaluación de la alodinia mecánica y térmica ($n= 8$ ratas por grupo) y análisis de la locomoción ($n= 5$ ratas por grupo), en ratas CRUSH+VEH y CRUSH+Late BMMC. **(C)** Registro de la latencia distal y la amplitud del complejo del potencial de acción del músculo, en ratas CRUSH+VEH y CRUSH+Late BMMC, a diferentes sobrevidas ($n= 5$ ratas por grupo). **(D)** Cuantificación de MBP y β III-tubulina en ratas naïve, CRUSH+VEH y CRUSH+ Late BMMC por Western blot y caracterización por inmunohistoquímica ($n=5$ ratas por grupo). La figura fue creada usando BioRender.com.

Figure 20. Experimental design to study the anti-allodynic and pro-regenerative effect of BMMC in rats with acute compression of the sciatic nerve. (A) Temporal characterization of cell migration kinetics in injured rats, treated at different time points ($n= 5$ rats per group). **(B)** Study of mechanical and thermal allodynia ($n= 8$ rats per group) and analysis of locomotion ($n= 5$ rats per group), in CRUSH+VEH and CRUSH+Late BMMC rats. **(C)** Distal latency and compound muscle action potential recording, in CRUSH+VEH and CRUSH+Late BMMC rats, at different time points ($n= 5$ rats per group). **(D)** Quantification of MBP and β III-tubulin in naïve, CRUSH+VEH and Crush+ Late BMMC rats by Western blot and characterization by immunohistochemistry ($n= 5$ rats per group). Figure was created using BioRender.com.

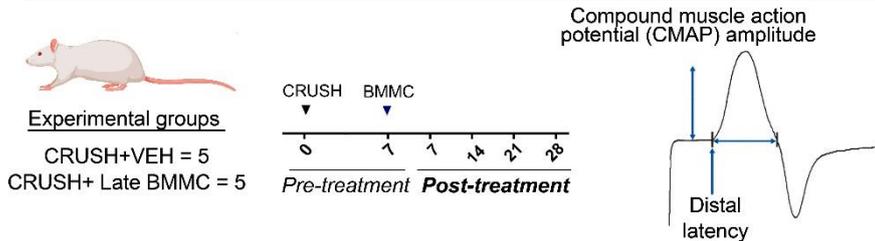
A. KINETICS OF BMMC MIGRATION



B. BEHAVIORAL TESTING



C. ELECTROMYOGRAPHY



D. WESTERN BLOT AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

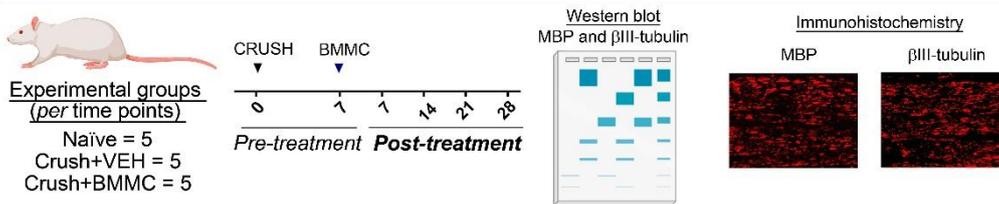


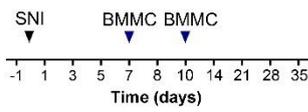
Figura 21. Diseño experimental para el estudio del efecto anti-alodínico de BMMC en ratas con lesión selectiva de las ramas del nervio ciático. Caracterización temporal de la alodinia mecánica y térmica en ratas SNI+VEH y SNI+Late BMMC ($n= 8$ ratas por grupo). La figura fue creada usando BioRender.com.

Figure 21. Experimental design to study the anti-allodynic effect of BMMC in rats with spared nerve injury. Characterization of the time course of mechanical and cold allodynia in naïve, SNI+VEH and SNI+Late BMMC-treated rats ($n= 8$ rats per group). Figure was created using BioRender.com.

BEHAVIORAL TESTING



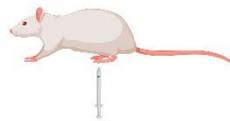
Experimental groups
Naïve = 8
SNI+VEH = 8
SNI+ Late BMMC = 8



Mechanical allodynia



Cold allodynia



3.2 Estudio de la ventana temporal terapéutica para la administración de BMMC en ratas con crush del nervio ciático

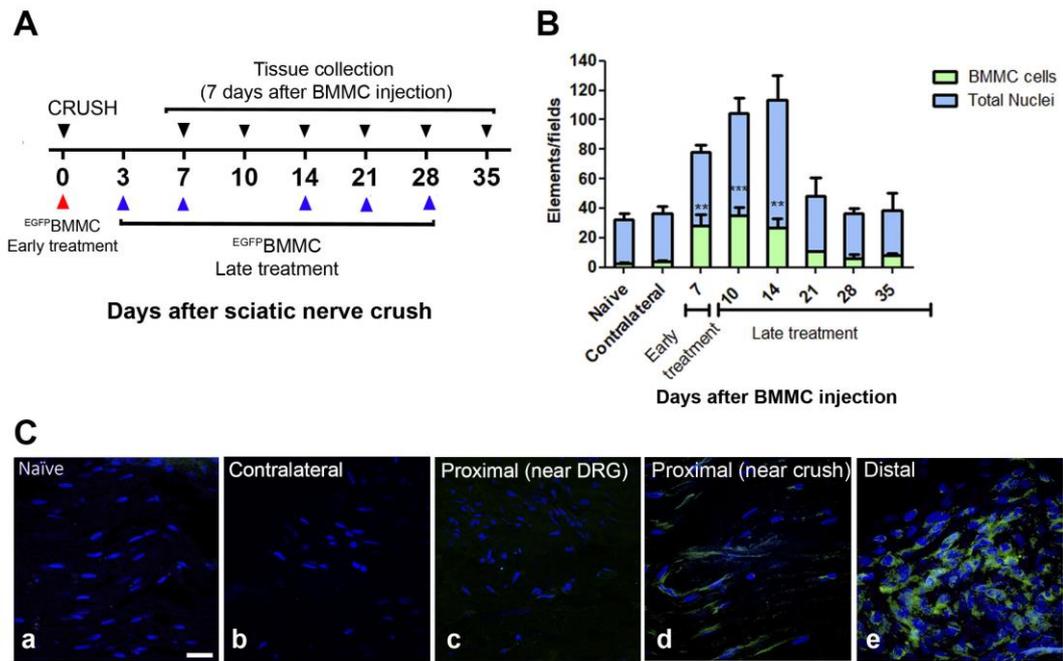
En un estudio previo demostramos que, frente a su administración sistémica inmediatamente después de lesiones reversibles [259] o irreversibles [235,291] del nervio ciático, las BMMC migran casi exclusivamente al sitio de lesión, favoreciendo la regeneración del nervio y formación de mielina, así como también, la recuperación parcial de las propiedades electrofisiológicas y la prevención completa del dolor neuropático asociado [291]. En base a estos resultados, nos preguntamos si existe una ventana temporal óptima para la administración de BMMC después de una lesión neuropática. Por ello, nos fijamos como objetivos determinar la ventana temporal en la que las BMMC trasplantadas migran de manera más eficiente a los nervios dañados en ratas con crush del nervio ciático. Asimismo, sabiendo que el tratamiento temprano con BMMC previene el dolor neuropático de estas ratas [291], determinar dentro de la ventana terapéutica expuesta, si una única administración tardía de BMMC es capaz de recuperar a los animales con dolor, y resultar además en mejorías morfológicas y fisiológicas similares a las observadas anteriormente en ratas que reciben intervención temprana de BMMC. Finalmente, y además, comenzar a explorar el valor terapéutico de las BMMC en un modelo de dolor persistente como el SNI. El diseño experimental para abordar estos objetivos se detalla en las **Figuras 20-21**.

3.2.1 Cinética de migración de las BMMC al nervio lesionado

Siguiendo el procedimiento experimental detallado en la **Figura 22A**, demostramos la anidación de un número considerable de BMMC-EGFP (BMMC que sobre-expresan la proteína fluorescente verde mejorada) en el área distal del nervio ipsilateral, tanto en ratas que recibieron un trasplante temprano (mismo día de la lesión) como tardío (días posteriores a la lesión) (**Figura 22B y C_e**). En particular, el mayor número de BMMC-EGFP se encontró en ratas que recibieron la administración de células inmediatamente después de la lesión o dentro de los primeros 7 días después del crush del nervio ciático, con valores que alcanzaron diferencias significativas en comparación con ratas sin tratamiento previo. Por el contrario, el trasplante realizado 14 a 28 días después de la lesión, mostraron una marcada disminución en el número de células reclutadas, observándose diferencias significativas en la comparación con ratas sin tratamiento previo (**Figura 22B**). Finalmente, prácticamente no se observó migración de BMMC-EGFP en nervios no lesionados de ratas naïve o del lado contralateral de ratas lesionadas (**Figura 22B y C_{a-d}**).

Figura 22. Cinética de la migración de BMMC. (A) Diseño experimental, indicando el día de trasplante de BMMC y los tiempos de recolección de tejido. Independientemente del momento elegido para el trasplante sistémico de BMMC-EGFP, los animales se sacrificaron 7 días después de la administración (por ejemplo, 10 días en la figura significan que el trasplante se realizó 3 días después de la lesión y se evaluó la migración 7 días después del trasplante). **(B)** Gráfico de barras que muestra los núcleos totales (azul) y las BMMC-EGFP (verde) por campo en el área distal de los nervios ipsilaterales en diferentes días después del trasplante, así como también en el nervio contralateral y en el nervio de animales naïve. Los datos representan una $n= 5$ ratas por grupo, por sobrevida y se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de un-Factor vía seguido de la prueba post-hoc de Dunnet: $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ (tratamiento con BMMC-EGFP a diferentes días post lesión vs. naïve). **(C)** Imágenes de microscopía confocal representativas de un nervio naïve (C_a), de un nervio contralateral (C_b) y del área proximal (C_{c-d}) y distal (C_e) al sitio de lesión de un nervio ipsilateral, proveniente de animales que fueron sacrificados a los 14 días después de la lesión. En azul, núcleos positivos para DAPI, y en verde, BMMC-EGFP trasplantadas. Escala de magnificación: 10 μ m.

Figure 22. Kinetics of BMMC migration. (A) Experimental design, indicating BMMC transplant and tissue collection times. Independently of the moment chosen for EGFP-BMMC systemic transplant, animals were sacrificed 7 days post-transplant (for example, 10 days in the figure means transplantation at day 3 and evaluation of migrated cells 7 days post-transplant). **(B)** Bar graph showing total nuclei (blue) and EGFP-BMMC (green) per field in naïve and distal areas of ipsilateral nerves at different days post-treatment. Data represents an $n= 5$ rats per group, per time-point and are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed through one way-ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test. $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ (EGFP-BMMC at different dpi vs. naïve). **(C)** Representative confocal microscopy images of a naïve nerve (C_a), contralateral nerve (C_b) and proximal (C_{c-d}) and distal area (C_e) of an ipsilateral nerve at 14 days after injury. In blue, DAPI-positive nuclei, and in green, transplanted EGFP-BMMC. Scale bar: 10 μ m.



3.3 Efecto terapéutico de BMMC en ratas con crush del nervio ciático

3.3.1 La administración tardía de BMMC bloquea la alodinia mecánica y al frío en ratas con crush del nervio ciático

Teniendo en cuenta el posible valor terapéutico de un tratamiento varios días después de una lesión neuropática, y habiendo observado que la administración de BMMC-EGFP 7 días después de la lesión condujo a un reclutamiento significativo de las células, elegimos esta sobredosis para abordar los efectos de la administración tardía de BMMC sobre la conducta de dolor, la recuperación de la función motora y la regeneración del nervio lesionado en ratas con crush del ciático.

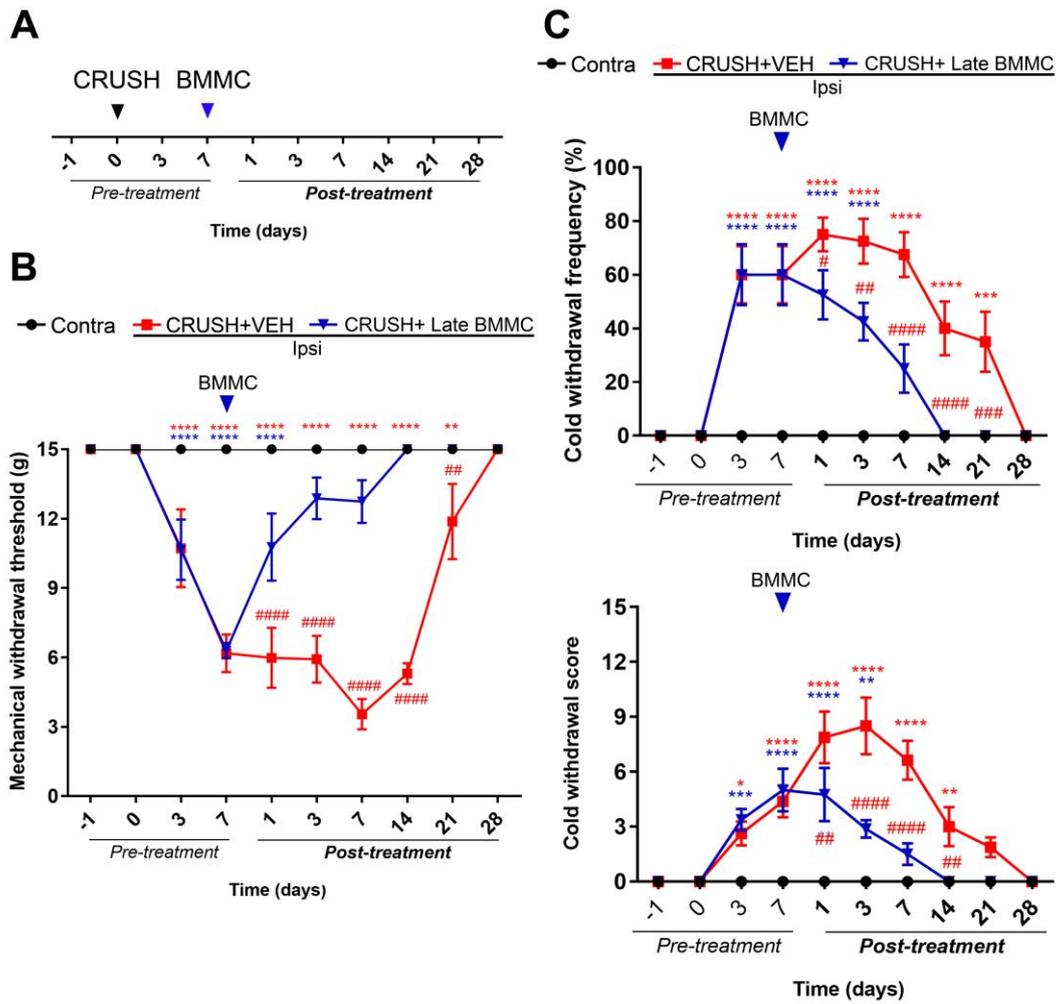
Todas las ratas lesionadas mostraron una disminución progresiva en el umbral de retirada al recibir estímulos mecánicos sobre la pata posterior lesionada (lado ipsilateral) y un aumento en la frecuencia y en la intensidad de respuesta ante la acetona, durante la primera semana después de la lesión (antes de recibir el tratamiento) (**Figura 23**). Las ratas tratadas con vehículo (CRUSH+VEH) mantuvieron la alodinia mecánica ipsilateral hasta el día 14 después de iniciado el tratamiento, seguida de una recuperación lenta que sólo se completó 28 días después de la administración del vehículo. Por el contrario, las ratas tratadas con BMMC, 7 días después de la lesión, (CRUSH+Late BMMC) mostraron un aumento progresivo en el umbral de retirada mecánica del lado ipsilateral, comenzando 1 día después del inicio del tratamiento, mostrando una mejora considerable durante la primera semana y alcanzando umbrales de retirada basales, 14 días después del tratamiento y en adelante (**Figura 23B**).

El análisis de alodinia por estímulo con acetona mostró que las ratas CRUSH+VEH mantuvieron aumentos significativos en la frecuencia de retirada y en la intensidad de respuesta frente al estímulo, en el lado ipsilateral, volviendo ambas a niveles basales 28 días después del tratamiento (**Figura 23C**). Por el contrario, la administración tardía de BMMC dio como resultado una reducción rápida de la alodinia al frío del lado ipsilateral, durante la primera semana después del tratamiento, mostrando una frecuencia e intensidad de respuesta basal, tan pronto como 14 días después del trasplante (**Figura 23C**).

Finalmente, ni las ratas tratadas con vehículo ni las ratas tratadas tardíamente con BMMC mostraron cambios notables en el umbral de retirada mecánica, así como en la frecuencia e intensidad de respuesta frente al estímulo con acetona, en el lado contralateral, y a lo largo de todo el estudio (**Figura 23**).

Figura 23. Efecto del trasplante tardío de BMMC sobre la alodinia mecánica y fría en animales con crush del nervio ciático. (A) Diseño experimental. Se indican los días de lesión, trasplante, y estudio del comportamiento de dolor. **(B y C)** Umbral de retirada mecánica (B) y frecuencia (C superior) e intensidad (C inferior) de respuesta al frío en el lado contralateral (Contra) (círculo negro), datos agrupados de ratas CRUSH+VEH y CRUSH+Late BMMC, e ipsilateral (Ipsi) de ratas CRUSH+VEH (cuadrado rojo) o CRUSH+Late BMMC (triángulos azules), tratadas 7 días después de la lesión. Los datos representan un $n= 8$ ratas por grupo y se expresan como media \pm SEM. La flecha azul indica el momento de la administración del vehículo o de las BMMC. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos-factores seguido por el test post-hoc de Bonferroni: $P < 0,0001$ entre los grupos; # $P < 0,05$, ## $P < 0,001$, ### $P < 0,001$, #### $P < 0,0001$ Ipsi CRUSH+VEH vs Ipsi CRUSH+Late BMMC; en rojo * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ Ipsi CRUSH+VEH vs Contra; azul ** $P < 0,001$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ Ipsi CRUSH+Late BMMC vs. Contra.

Figure 23. Effect of late BMMC transplant on the development of mechanical and cold allodynia in animals subjected to sciatic nerve crush. (A) Experimental design. Sciatic nerve crush, transplant and pain-like behavioural test times are indicated. **(B and C)** Mechanical withdrawal threshold (B) and cold withdrawal frequency (C upper) or cold withdrawal score (C lower) in the contralateral (Contra) (black circle), pools data from CRUSH+VEH and CRUSH+Late BMMC-treated rats and ipsilateral (Ipsi) hindpaws of CRUSH+VEH (red square) and CRUSH+Late BMMC-treated rats (blue triangles), treated 7 days after injury. Data represents an $n= 8$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Blue arrow indicated the time-point of vehicle or BMMC administration. Statistical significance was established by mean of two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test: $P < 0.0001$ among groups; # $P < 0,05$, ## $P < 0,001$, ### $P < 0,001$, #### $P < 0,0001$ Ipsi CRUSH+VEH vs. Ipsi CRUSH+Late BMMC; red * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ Ipsi CRUSH+VEH vs. Contra; blue ** $P < 0,001$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ Ipsi CRUSH+Late BMMC vs. Contra.



3.3.2 El tratamiento tardío con BMMC mejora parcialmente la superficie de apoyo de la pata lesionada, pero no la funcionalidad del nervio, en ratas con crush del nervio ciático

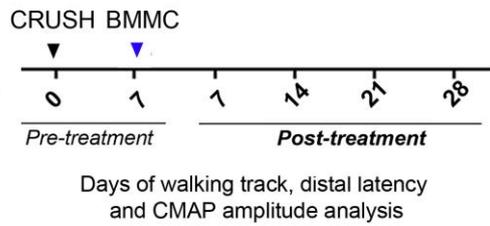
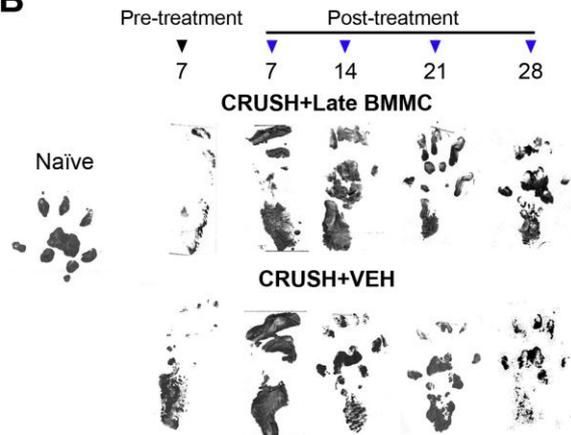
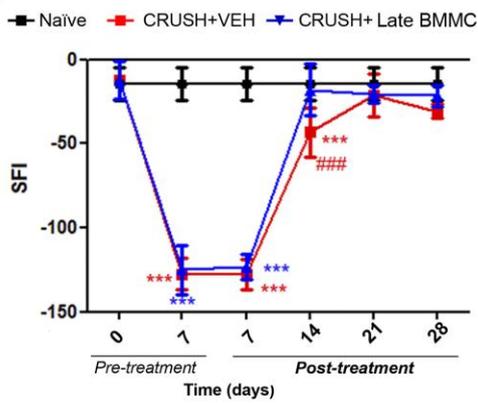
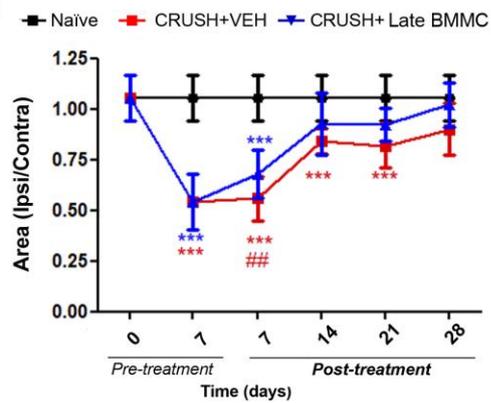
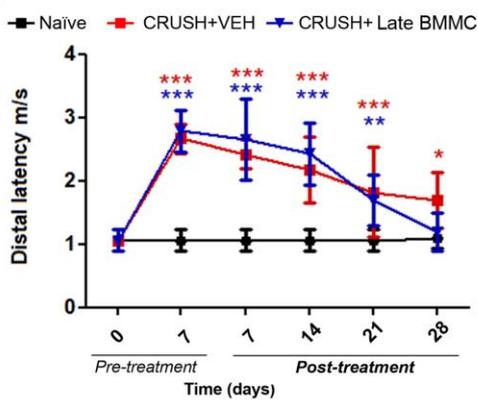
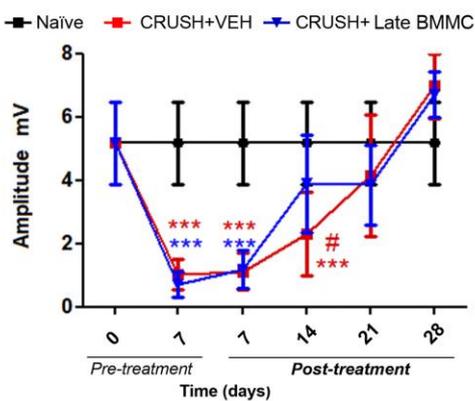
Previo al tratamiento, las ratas lesionadas exhibieron alteraciones en la superficie de apoyo (o patrón de huellas) de la pata trasera del lado lesionado, así como también, mostraron una abrupta reducción del índice funcional del nervio ciático (SFI) y el área de la huella (**Figura 24B-D**). Tales alteraciones persistieron siete días después de la administración del tratamiento, en donde se observó que las ratas CRUSH+VEH y CRUSH+Late BMMC mostraban un patrón de huellas alterado de manera similar, donde ninguno de los cinco dedos dejaba una impresión sobre el papel (**Figura 24B**), y con una reducción significativa del SFI (**Figura 24C**) y del área de la huella (**Figura 24D**), en comparación con ratas naïve. Catorce días después del tratamiento, las ratas CRUSH+VEH carecieron de la impresión del segundo, tercer y cuarto dedo de la pata lesionada; más aún, la disminución del SFI y del área de la huella persistió, en comparación con ratas naïve (**Figura 24B-D**). Por el contrario, en ratas lesionadas tratadas con BMMC, se observó una impresión clara de todos los dedos de la pata lesionada, a partir de los 14 días después del tratamiento y en adelante (**Figura 24B**), mostrando valores de SFI (**Figura 24C**) y del área de la pata trasera (**Figura 24D**) similares a los observados en ratas naïve. Después de 21 días de tratamiento, las ratas CRUSH+VEH mostraron una impresión separada de todos los dedos de la pata lesionada (**Figura 24B**) y no se evidenciaron diferencias en el SFI (**Figura 24C**), en comparación a las ratas naïve, sin embargo, el área de la pata trasera de las ratas tratadas con vehículo era más pequeña (**Figura 24D**).

Posteriormente, se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos para determinar si la mejoría parcial en la superficie de apoyo de la pata lesionada de los animales lesionados tratados con BMMC se correlacionaba con la recuperación de la funcionalidad del nervio ciático (**Figura 24E, F**). Previo al tratamiento, las ratas lesionadas mostraron un aumento significativo de la latencia distal y un incremento significativo de la amplitud del potencial de acción muscular, en comparación con las ratas naïve. Las ratas CRUSH+Late BMMC, mantuvieron el incremento de la latencia distal, hasta los 21 días después del tratamiento, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con las ratas CRUSH+VEH (**Figura 24C**). Sin embargo, se observó una tendencia hacia la recuperación más rápida, en las ratas trasplantadas con BMMC, 28 días después del tratamiento. Respecto del análisis de la amplitud del potencial de acción muscular compuesto, se observó que las ratas CRUSH+VEH mostraban una reducción considerable en los valores de amplitud hasta los 14 días después del tratamiento, seguido de una recuperación parcial hasta mostrar valores

basales comparables a las ratas naïve, 28 días después del tratamiento (**Figura 24D**). Las ratas CRUSH+Late BMMC exhibieron un cambio de amplitud similar a las ratas CRUSH+VEH, aunque se observó una diferencia significativa entre ambos grupos experimentales (con una mejora en el grupo CRUSH+Late BMMC), 14 días después del tratamiento (**Figura 24D**).

Figura 24. Efecto de la administración tardía de BMMC sobre la locomoción y la recuperación funcional del nervio ciático. (A) Diseño experimental. Se indica el día de lesión y trasplante y los tiempos de análisis. **(B-D)** Análisis de la caminata. Pata trasera ipsilateral (Ipsi) representativa (B); índice funcional del nervio ciático (SFI) calculado a través del análisis de la pisada al caminar (C) y el área de la pata trasera ipsilateral (Ipsi)/contralateral (Contra) (D) de ratas naïve y ratas lesionadas tratadas a los 7 días con vehículo o BMMC. **(E-F)** Efectos sobre la latencia distal (E) y la amplitud del CMAP (F) de nervios naïve y nervios ipsilaterales de ratas tratadas con vehículo o BMMC. Los datos representan una $n= 5$ ratas por grupo y se expresan como media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos factores seguido por el test post-hoc de Bonferroni: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ CRUSH+VEH o CRUSH+Late BMMC vs naïve; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ CRUSH+VEH vs CRUSH+Late BMMC.

Figure 24. Effects of late BMMC transplant on walking track and the functional recovery of the sciatic nerve. (A) Experimental design. Sciatic nerve crush, transplant and times of analysis are indicated. **(B-D)** Walking track analysis. Representative ipsilateral (Ipsi) hind paw (B); sciatic functional index (SFI) calculated through the walking track analysis (C) and ipsilateral (Ipsi)/contralateral (Contra) hind paw area (D) of naïve and 7 days VEH- and BMMC-treated rats. (E-F) Effects on distal latency (E) and CMAP amplitude (F) analysis of naïve and ipsilateral nerves of VEH-and BMMC-treated rats. Data represents an $n= 5$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was done by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ CRUSH+VEH or CRUSH+Late BMMC vs. naïve; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ CRUSH+VEH vs CRUSH+Late BMMC.

A**B****C****D****E****F**

3.3.3 La administración tardía de BMMC incrementa la cantidad y organización de MBP y β III-tubulina en el nervio lesionado

Finalmente, estudiamos si la administración tardía, 7 días después de la lesión, de BMMC promueve la regeneración del nervio ciático lesionado, a través de la cuantificación por WB de MBP, la proteína más sensible para el estudio de degeneración Walleriana, que permite evaluar la evolución del proceso de mielinización luego de la lesión, y de β III-tubulina, proteína que permite evaluar la integridad axonal (**Figura 25A**).

Como era de esperar, el análisis por WB expuso una disminución en la cantidad de MBP presente en el área distal al sitio de compresión del nervio, en animales tratados con vehículo, al ser comparados con ratas naïve. Esta disminución se mantuvo en todas las sobrevividas evaluadas, posteriores al tratamiento. (**Figura 25B**). Por el contrario, aunque los niveles de MBP también disminuyeron significativamente en ratas CRUSH+Late BMMC, este cambio fue mucho menor que el observado en las ratas CRUSH+VEH. De hecho, se observaron diferencias significativas entre las ratas CRUSH+VEH y CRUSH+Late BMMC en todas las sobrevividas analizadas (**Figura 25B**). Por otro lado, el análisis de la cantidad de β III-tubulina mostró una disminución a los 7 y 14 días después del tratamiento en ratas CRUSH+VEH, seguido de una recuperación sustancial a los 21 días después de la administración, siendo comparable con los niveles detectados en ratas naïve (**Figura 25A-C**). Al contrario, la administración tardía de BMMC evitó parcialmente la disminución de β III-tubulina, mostrando una diferencia levemente significativa con las ratas naïve o aquellas tratadas con vehículo a los 7 y 14 días después del tratamiento (**Figura 25A-C**).

El análisis inmunohistoquímico de MBP y β III-tubulina confirmó los resultados de inmunotransferencia por WB. Así, en nervios obtenidos de ratas naïve la expresión de MBP mostró una apariencia continua y homogénea (**Figura 26A**), mientras que en el nervio lesionado se pudo observar una profunda disminución de la marca de MBP, apareciendo en forma de agregados proteicos, generada por una desmielinización visiblemente clara, como se evidencia a los 7 días luego de la lesión (**Figura 26B**). Las ratas CRUSH+Late BMMC también mostraron una reducción en la marca de MBP y presencia de agregados proteicos (**Figura 26G-J**); sin embargo, estos cambios fueron más modestos en comparación con los observados en ratas CRUSH+VEH (**Figura 26C-F**). Además, las ratas CRUSH+Late BMMC mostraron signos de mejoría en la marca de MBP y una reducción en la presencia de grumos de MBP, a partir de los 7 días después del tratamiento, en adelante (**Figura 26G-J**), en comparación con las ratas CRUSH+VEH; estas últimas mostraron una disminución persistente en la marca de MBP, incluso hasta los 21 días post-tratamiento. El análisis inmunohistoquímico del

marcador axonal β III-tubulina reveló que, en comparación con la señal homogénea que se observa en los nervios de ratas naïve (**Figura 27A**), las ratas con 7 días de lesión previo al tratamiento, e inclusive 7 días posteriores al mismo, exhiben una disminución considerable en la señal de β III-tubulina, así como la aparición de agregados proteicos (**Figura 27B**). A partir de los 14 días posteriores al tratamiento, y en adelante, se observó en las ratas CRUSH+VEH una recuperación de la señal de β III-tubulina y la desaparición de agregados proteicos en este grupo de ratas (**Figura 27C-F**). Por el contrario, las ratas CRUSH+Late BMMC mostraron una caída notablemente menor en la señal de β III-tubulina, pero si formación de agregados proteicos, visibles a los 7 días posteriores a la administración (**Figura 27G**). A partir de esta sobredosis se observó en este grupo experimental una señal continua de la proteína β III-tubulina (**Figura 27H-J**).

Figura 25. Efectos de la administración tardía de BMMC sobre la expresión de MBP y de la proteína β III-tubulina. (A) Imagen representativa de un WB de nervios de ratas naïve y de las áreas distales de nervios ipsilaterales (IP) de ratas tratadas con vehículo o BMMC (7 días después de la lesión), evaluadas a distintas sobrevividas (7, 14 y 21 días después del tratamiento). A la izquierda, marcador de peso molecular; las proteínas analizadas fueron β III-tubulina (~ 50 kDa) y MBP (~ 21 y 18,5 kDa). **(B)** Cuantificación de MBP y β III-tubulina IOD (intensidad óptica integrada) normalizada a niveles de GAPDH (~ 36 kDa) y expresada en relación a nervios de ratas naïve (AU, unidades arbitrarias). Los datos representan una $n= 3$ ratas por grupo y se expresan como media \pm SEM. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos-factores seguido por el test post-hoc de Bonferroni: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ CRUSH+VEH o CRUSH+Late BMMC vs naïve; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ ratas CRUSH+VEH vs CRUSH+Late BMMC.

Figure 25. Effects of late BMMC administration on the expression of MBP and β III-tubulin protein. (A) Representative image of a WB of naïve nerves and the distal areas of ipsilateral (IP) nerves of VEH-treated and Late BMMC-treated rats at different survival times (7, 14 and 21 days after treatment). On the left, rainbow molecular weight marker; the proteins analyzed were β III-tubulin (~50kDa) and MBP (~ 21 and 18.5 kDa). **(B)** Quantification of MBP and β III-tubulin IOD (Integrated optical density) normalized to GAPDH (~36kDa) levels and expressed relative to naïve nerves (AU, arbitrary units). Data represents an $n= 3$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was done by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ CRUSH+VEH or CRUSH+Late BMMC vs. naïve; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ CRUSH+VEH vs CRUSH+Late BMMC.

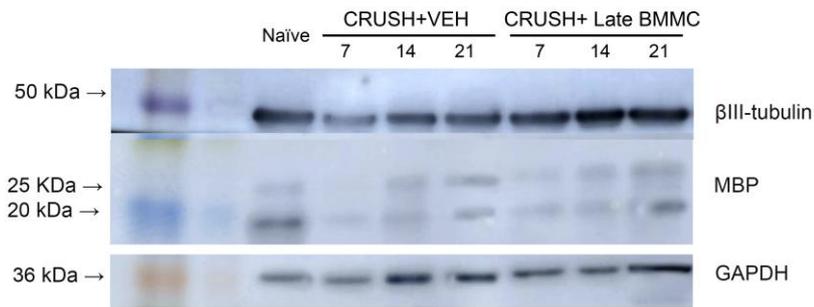
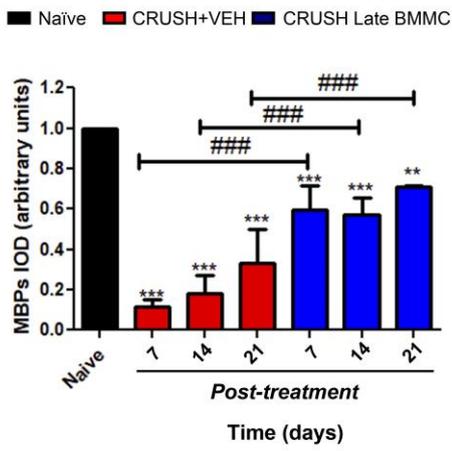
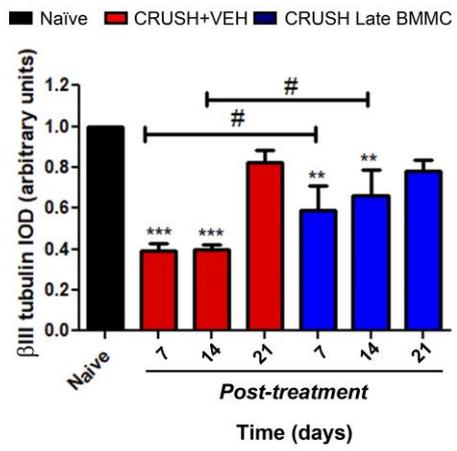
A**B****C**

Figura 26. Fotomicrografías que muestran la señal inmunofluorescente de MBP en ratas con administración tardía de BMMC. (A-J) El panel superior muestra secciones de nervios naïve (A) y el área distal de nervios de animales con 7 días de lesión (B). Los paneles medio e inferior muestran los resultados obtenidos en el área distal de ratas tratadas con vehículo (C-F) o con BMMC (G-J) trasplantadas 7 días después de la lesión y sacrificadas 7, 14, 21 y 28 días después del tratamiento ($n= 5$ ratas por grupo, por sobrevivida evaluada). Escala de magnificación: 50 μm .

Figure 26. Photomicrographs showing the immunofluorescent signal of MBP in rats with late administration of BMMC. (A-J) Top panel shows sections from naïve nerves (A) and the distal stump of nerves from 7 days-injured rats (B). Middle and bottom panels show results obtained in the distal stump of VEH- (C-F) and Late BMMC-treated rats (G-J), transplanted 7 days after injury, and sacrificed 7, 14, 21 y 28 days after treatment ($n= 5$ rats *per group, per time-point*). Scale bar 50 μm .

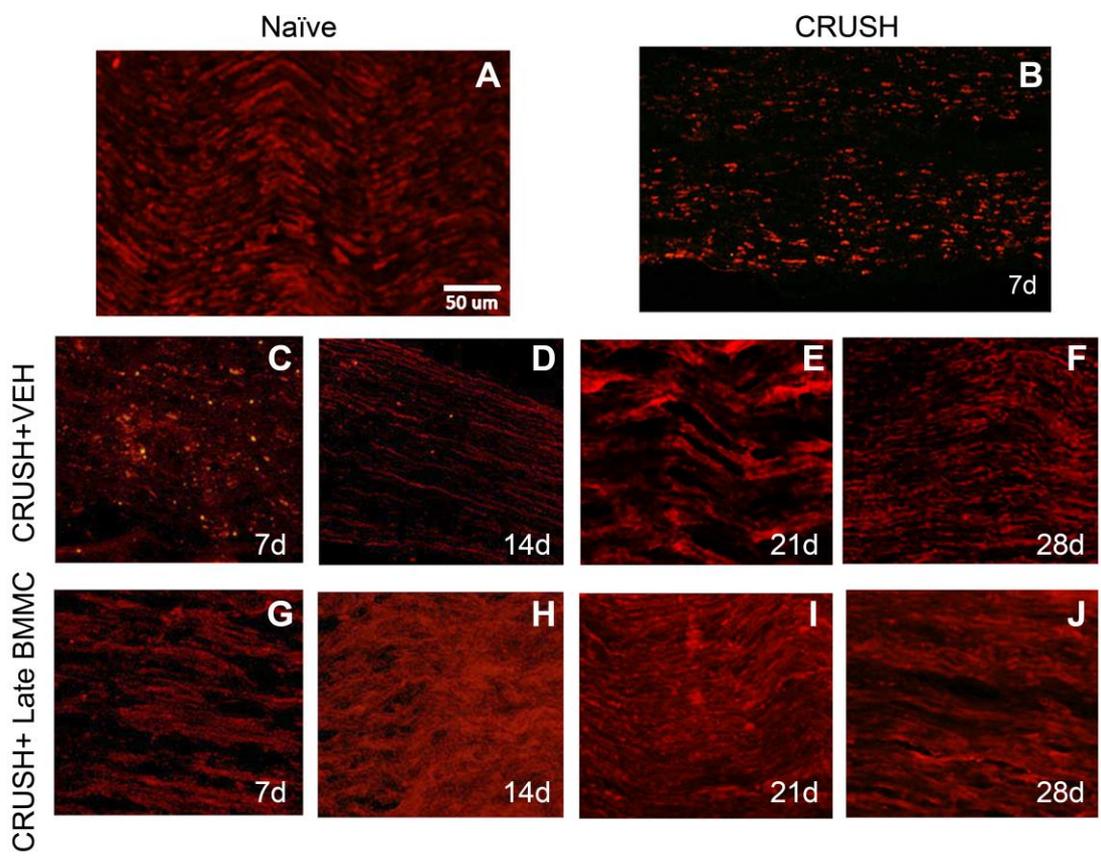
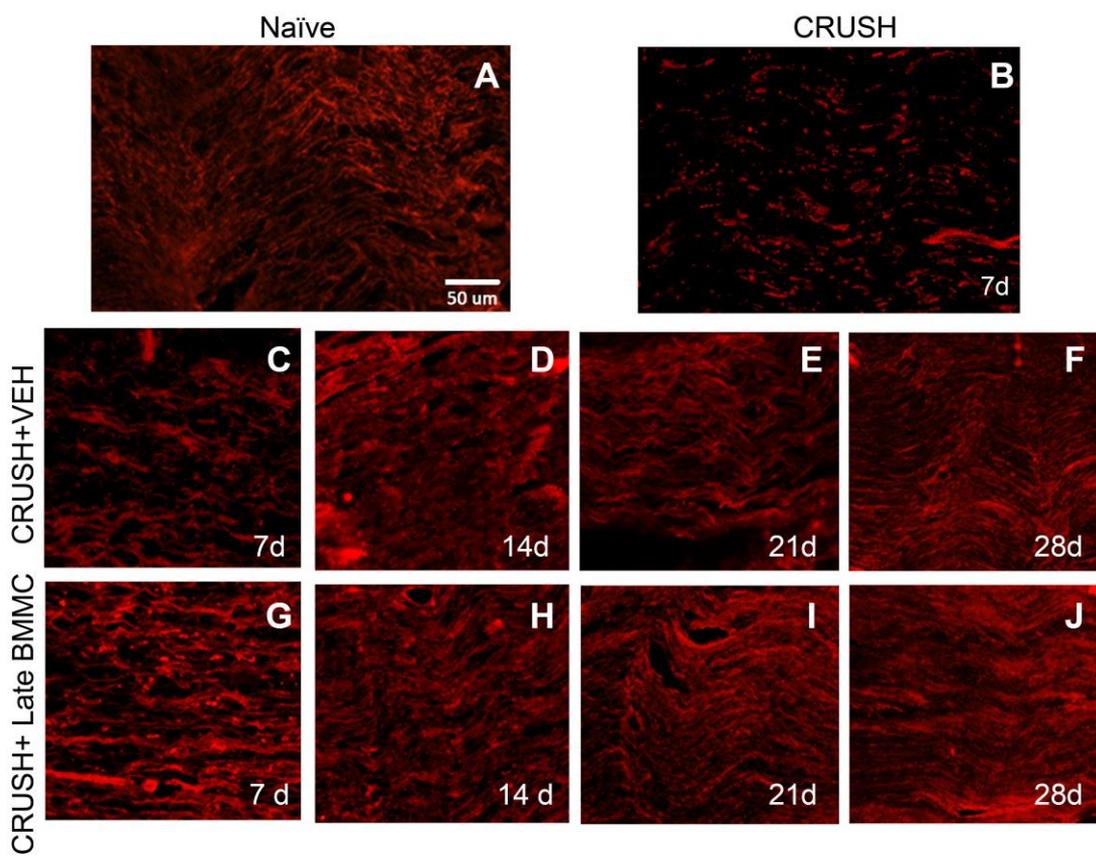


Figura 27. Fotomicrografías que muestran la señal inmunofluorescente de β III-tubulina en ratas con administración tardía de BMMC. (A-J) El panel superior muestra secciones de nervios naïve (A) y el área distal de nervios de animales con 7 días de lesión (B). Los paneles medio e inferior muestran los resultados obtenidos en el área distal de ratas tratadas con vehículo (C-F) o con BMMC (G-J) trasplantadas 7 días después de la lesión y sacrificadas 7, 14, 21 y 28 días después del tratamiento ($n= 5$ ratas por grupo, por sobrevivida evaluada). Escala de magnificación: 50 μ m.

Figure 27. Photomicrographs showing the immunofluorescent signal of β III-tubulin in rats with late administration of BMMC. (A-J) Top panel shows sections from naïve nerves (A) and the distal stump of nerves from 7 days-injured rats (B). Middle and bottom panels show results obtained in the distal stump of vehicle- (C-F) and BMMC-treated rats (G-J), transplanted 7 days after injury, and sacrificed 7, 14, 21 y 28 days after treatment ($n= 5$ rats *per* group, *per* time-point). Scale bar 50 μ m.



3.4 Efecto terapéutico de BMMC en ratas con lesión persistente (SNI) del nervio ciático – RESULTADOS PRELIMINARES

Habiendo establecido que la administración de BMMC en ratas con una neuropatía periférica reversible, como lo es el crush del nervio ciático, resulta en un efecto anti-alodínico y pro-regenerativo, y que tal efecto además responde a una ventana temporal, nos preguntamos si era posible alcanzar efectos terapéuticos con una sola administración sistémica tardía de BMMC en ratas con dolor neuropático persistente.

3.4.1 Una única administración tardía de BMMC bloquea, temporalmente, la alodinia mecánica y al frío inducida por SNI

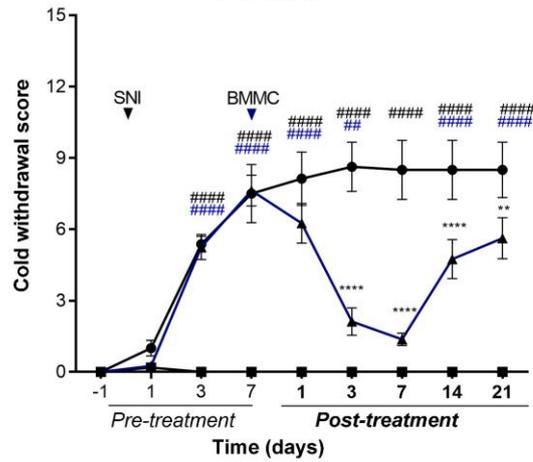
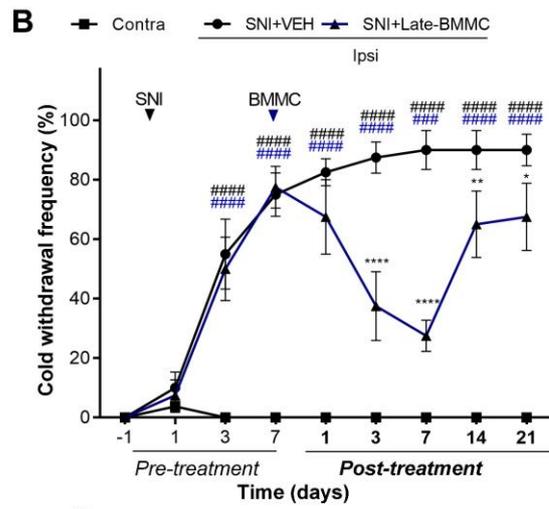
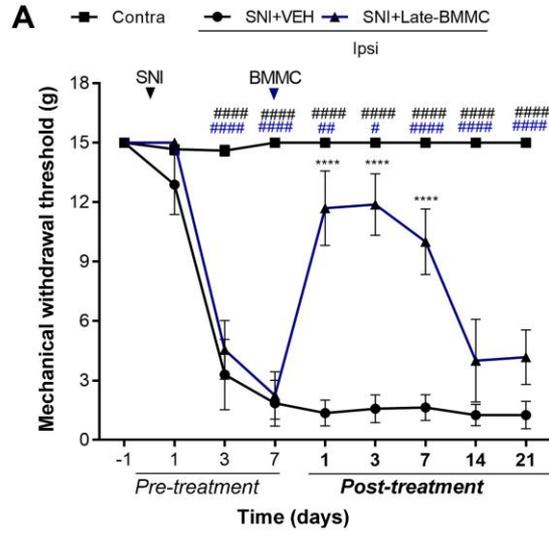
En primer lugar, se procedió a realizar un ensayo piloto consistente en una única administración sistémica de 1×10^7 BMMC en ratas con SNI de 7 días de evolución.

Todas las ratas lesionadas mostraron una clara reducción ipsilateral en el umbral de retirada frente al estímulo mecánico (**Figura 28A**) y un incremento en la frecuencia e intensidad (**Figura 28B**) de respuesta ante el estímulo con acetona, alcanzando niveles alodínicos 3 días después de iniciada la lesión y de ahí en adelante. En el caso del grupo vehículo (SNI+VEH) no tratado con BMMC, este permaneció alodínico durante la totalidad del tiempo experimental (**Figura 28A, B**). Por el contrario, las ratas lesionadas que recibieron una única administración de BMMC, 7 días después de la lesión, exhibieron un aumento progresivo en los umbrales de retirada ante el estímulo mecánico en la pata ipsilateral, comenzando un día después de iniciado el tratamiento y con una duración del efecto anti-alodínico de 3 días. A partir de los 7 días después del tratamiento, se observó una disminución en el umbral de retirada mecánico, alcanzando umbrales de retirada comparables con las ratas tratadas con vehículo, 14 días después del tratamiento (**Figura 28A**). En concordancia, el análisis de la respuesta de las ratas tratadas ante el estímulo con acetona mostró que las ratas lesionadas tratadas con BMMC experimentaron una disminución en la frecuencia e intensidad de respuesta frente al estímulo con frío, alcanzando valores que no presentaban diferencias significativas con el lado no lesionado (contralateral), 7 días después del tratamiento (**Figura 28B**). Catorce días después del tratamiento, se revertió el efecto anti-alodínico de las BMMC, observándose un incremento en la frecuencia e intensidad de respuesta frente a la acetona, siendo comparable con los animales tratados con vehículo, valores que se mantuvieron hasta finalizado el ensayo (**Figura 28B**).

Finalmente, los umbrales de retirada mecánica y la frecuencia e intensidad de respuesta luego de un estímulo frío en las patas contralaterales de ratas SNI tratadas con vehículo o BMMC, permanecieron sin cambios (**Figura 28A, B**).

Figura 28. Una única administración tardía de BMMC bloquea temporalmente la alodinia mecánica y térmica en ratas con SNI. (A-B) Umbral de retirada mecánica (A) y frecuencia de retirada (B superior) o score de retirada (B inferior) de las patas frente al estímulo frío, expresado como la media \pm SEM, en el lado ipsilateral (Ipsi) y contralateral (Contra; cuadrado negro; datos agrupados de todas las ratas empleadas en el ensayo por falta de diferencias estadísticas entre grupos), de los animales tratados con vehículo (círculo negro) o BMMC (triángulos negros). Los resultados representan un $n= 8$ ratas por grupo. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos factores seguido por el test post-hoc de Tukey: $P < 0.0001$ entre grupos; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $****P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH vs ipsilateral SNI+Late BMMC; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, $\###P < 0.001$ y $\####P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH o ipsilateral SNI+Late BMMC vs Contra.

Figure 28. A single late administration of BMMC temporarily blocks mechanical and thermal allodynia in rats with SNI. (A-B) Mechanical withdrawal thresholds (A) and cold withdrawal frequencies (B upper) or cold withdrawal scores (B lower), expressed as mean \pm SEM, from the ipsilateral (Ipsi) and contralateral hindpaws (Contra; black circles; data from all rats used in the experiment was pooled due to lack of differences between groups) from vehicle-treated vehicle-treated (black squares) and late BMMC-treated animals (blue triangles). Data represents an $n= 8$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $P < 0.0001$ among groups; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $****P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH vs ipsilateral SNI+Late BMMC; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, $\###P < 0.001$ and $\####P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH or ipsilateral SNI+Late BMMC vs Contra.



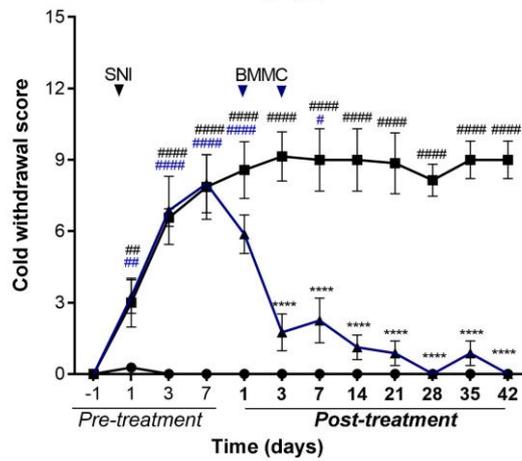
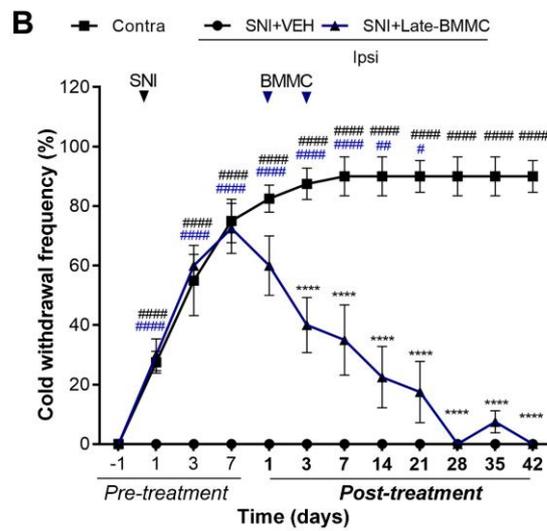
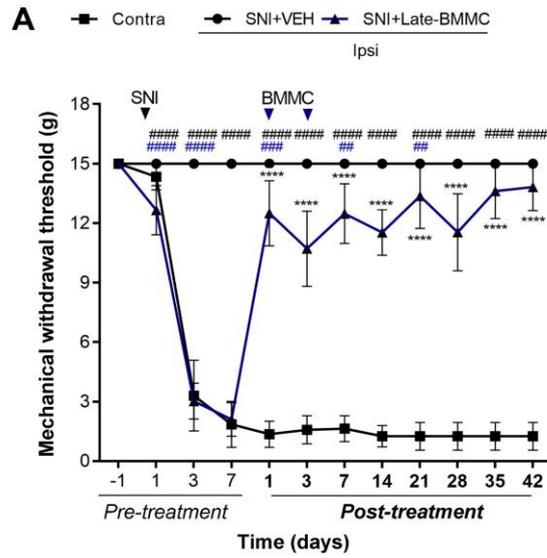
3.4.2 Una doble administración tardía de BMMC bloquea la alodinia mecánica y al frío inducida por SNI por un período prolongado

Habiendo observado que una única administración de BMMC, 7 días después de inducida la lesión por SNI, resultaba en un efecto anti-alodínico temporal, nos enfocamos en un esquema de administración doble con el fin de prolongar los efectos anti-alodínicos de las BMMC. Así, se decidió realizar una segunda administración sistémica de BMMC, 3 días después de la primera administración (10 días después de la lesión), sobrevida en la cual comenzáramos a observar la pérdida del efecto anti-alodínico provisto por las células (**Figura 28A, B**).

Previo a todo tratamiento, todos los animales lesionados exhibieron una dramática disminución en los umbrales de retirada mecánico y un aumento en la frecuencia e intensidad de respuesta al estímulo con acetona en la pata ipsilateral, manifestando alodinia a los 3 días luego de la lesión (**Figura 29A**). Asimismo, las ratas lesionadas que recibieron vehículo desarrollaron conducta alodínica durante la totalidad del tiempo experimental, en comparación con la respuesta de las patas contralaterales de ratas tratadas con vehículo o BMMC (**Figura 29A, B**). Por el contrario, las ratas tratadas con una doble administración de BMMC exhibieron una recuperación rápida, mostrando un incremento en el umbral de retirada mecánico un día después de la primera administración, como se había observado previamente, pero ahora, manteniendo estos valores cercanos al umbral basal (**Figura 29A**). El análisis de la respuesta a la estimulación con acetona reflejó que la doble administración de BMMC resulta en una rápida reducción y bloqueo de la alodinia, comenzando a los 3 días luego de la primera administración y permaneciendo hasta por lo menos 35 días después del tratamiento (**Figura 29B**).

Figura 29. Una doble administración tardía de BMMC bloquea la alodinia mecánica y al térmica por un período prolongado. (A-B) Umbral de retirada mecánica (A) y frecuencia de retirada (B superior) o score de retirada (B inferior) de las patas frente al estímulo frío, expresado como la media \pm SEM, en el lado ipsilateral (Ipsi) y contralateral (Contra; cuadrado negro; datos agrupados de todas las ratas empleadas en el ensayo por falta de diferencias estadísticas entre grupos), de los animales tratados con vehículo (círculo negro) o BMMC (triángulos negros). Los resultados representan un $n= 8$ ratas por grupo. Las diferencias significativas fueron establecidas por análisis ANOVA de dos factores seguido por el test post-hoc de Tukey: $P < 0.0001$ entre grupos; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y **** $P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH vs ipsilateral SNI+Late BMMC; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ y #### $P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH o ipsilateral SNI+Late BMMC vs Contra.

Figure 29. A late double administration of BMMC blocks mechanical and thermal allodynia for a prolonged period. (A-B) Mechanical withdrawal thresholds (A) and cold withdrawal frequencies (B upper) or cold withdrawal scores (B lower), expressed as mean \pm SEM, from the ipsilateral (Ipsi) and contralateral hindpaws (Contra; black circles; data from all rats used in the experiment was pooled due to lack of differences between groups) from vehicle-treated vehicle-treated (black squares) and late BMMC-treated animals (blue triangles). Data represents an $n= 8$ rats per group and are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was established by means of two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $P < 0.0001$ among groups; **** $P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH vs ipsilateral BMMC; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ and #### $P < 0.0001$ ipsilateral SNI+VEH or ipsilateral SNI+Late BMMC vs Contra.



DISCUSIÓN

1 PROYECTO I

La administración sistémica de IMT504 induce analgesia de rápido inicio y larga duración, asociada con la movilización de MSC y modulación del medio inflamatorio en el nervio lesionado, en ratas con neuropatía crónica.

Nuestro estudio comprobó las hipótesis planteadas, en las que se asociaban los efectos anti-alodínicos de IMT504 con los efectos de pro-movilización de MSC endógenas [65], mostrando: 1) que los efectos anti-alodínicos de inicio rápido y por períodos prolongados (al menos 6 semanas) de IMT504 en ratas con SNI se correlacionan directamente con la movilización rápida y duradera de las MSC desde médula ósea, dirigiéndose exclusivamente hacia el sitio de lesión, es decir los nervios periféricos dañados; 2) que el IMT504 evoca un fenotipo anti-inflamatorio en las MSC, promoviendo la resolución del proceso inflamatorio local; y 3) que el IMT504 retiene los efectos pro-migratorios en las MSC humanas expuestas *in vitro* a medio condicionado de nervios de ratas SNI, lo que respalda fuertemente el potencial traslacional de este ODN para tratar condiciones de dolor neuropático con componente inflamatorio.

La capacidad migratoria de las MSC hacia los nervios lesionados, o los medios condicionados obtenidos de los nervios lesionados, independientemente del tratamiento con IMT504, implica la rápida respuesta que presentan estas células a las señales químicas de la periferia [255]. De hecho, se sabe hace tiempo que la lesión de un nervio periférico da como resultado un aumento de la expresión local de una amplia variedad de moléculas implicadas en lo que se conoce como neuroinflamación [255], incluyendo algunas que actúan como quimioattractantes [188,273,316]. Los factores que influyen en la migración y el direccionamiento de las MSC incluyen citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α ; aquí mostramos, en ensayos *in vivo* e *in vitro*, que los niveles de ambas citoquinas se encuentran aumentados en los nervios lesionados. Así como para la IL-1 β y el TNF- α , también se ha observado que la quimioquina CXCL12 y su receptor homólogo CXCR4 [180,263], sintetizados por neuronas DRG nociceptivas y sus proyecciones periféricas, en roedores [245], y cuya expresión local se ve incrementada ante una lesión neuropática, son actores clave en la migración de las MSC administradas intratecalmente en ratones con CCI del nervio ciático [52]. De acuerdo con este concepto, aquí validamos la influencia del eje CXCL12-CXCR4 sobre la migración de las MSC endógenas luego de una lesión de nervios periféricos. Sorprendentemente, el IMT504 potenció la expresión de este eje *in vivo* e *in vitro*, lo que proporciona una explicación mecanística del rol pro-migratorio del ODN. Sin

embargo, cabe señalar que el efecto *in vivo* de IMT504 sobre el eje CXCL12-CXCR4, pareció debilitarse con el tiempo, mostrando una disminución de los niveles de expresión de la quimioquina y su receptor, 21 días después del tratamiento, lo que sugiere la participación de mecanismos adicionales que contribuyen a mantener el aumento de MSC en el nervio ciático lesionado de ratas tratadas con el ODN.

La migración y presencia de un mayor número de MSC en el nervio lesionado podría entenderse como un mecanismo para prevenir una reacción inflamatoria excesiva después de una lesión. Sin embargo, pareciera ser que en las ratas con o sin tratamiento esto no fuera suficiente para reducir el comportamiento de dolor, ni el aumento de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias en los nervios lesionados. Esto sugiere que los efectos anti-alodínico y anti-inflamatorio del IMT504 no solo dependen de potenciar la capacidad migratoria de las MSC hacia los nervios lesionados, sino también de su perfil anti-inflamatorio. Notablemente, aquí mostramos que el IMT504 actúa directamente sobre las MSC, induciendo la expresión de dos citoquinas con un rol anti-inflamatorio y anti-nociceptivo muy potente: IL-10 y TGF- β 1. La IL-10, secretada no solo por las MSC, sino también por las células T y B activadas, los macrófagos y los mastocitos, es una potente citoquina anti-inflamatoria que inhibe la liberación de IL-1 β , IL-6 y TNF- α [15,289,298]. De manera similar, se ha demostrado que el TGF- β 1, una citoquina multifuncional que pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento transformantes, induce efectos anti-inflamatorios y anti-nociceptivos [169,275]. Además, nuestro análisis *ex vivo* también reveló la existencia de interacciones bidireccionales complejas entre las MSC y el ambiente inflamatorio del nervio lesionado, donde la exposición de las MSC no-tratadas a los nervios lesionados indujo un incremento en la expresión de IL-10 y TGF- β 1, lo que respalda el rol inmunomodulador y protector de estas células y la potenciación de esta función por parte del ODN. Curiosamente, la co-incubación de MSC pre-tratadas con IMT504 con nervios lesionados indujo aún más la expresión del transcritto de IL-10 en estas células, pero dio como resultado una reducción considerable en los niveles de expresión de TGF- β 1. Pese a todo, el efecto neto de estas interacciones en los nervios lesionados, en presencia de IMT504, siguió siendo anti-inflamatorio.

La hipótesis mecanística de que el IMT504 actúa como un ODN inmunomodulador, potenciando el perfil anti-inflamatorio de las MSC que permite regular el estado pro-inflamatorio del nervio lesionado, que surge de nuestros experimentos *in vitro* y *ex vivo*, es respaldada por los resultados de nuestros estudios *in vivo*. Así, las ratas tratadas con IMT504 muestran un aumento temprano, duradero (> 35 días desde el inicio del tratamiento) y robusto en los niveles de proteína IL-10 y

TGF- β 1 asociados con reducciones marcadas de las proteínas TNF- α e IL-1 β en el nervio lesionado. Las dos últimas, son potentes citoquinas pro-inflamatorias fuertemente aumentadas en nervios periféricos lesionados [15,246] a expensas de macrófagos residentes, mastocitos y células de Schwann, así como de neutrófilos y macrófagos infiltrantes [175,212,251], las cuales promueven el desarrollo y mantenimiento de dolor neuropático [15,112]. En conjunto, nuestros datos actuales respaldan el mecanismo de acción anti-nociceptivo de las MSC infiltrantes en ratas tratadas con IMT504 a través de la modulación de la interacción neuroinmune en el medio local y la restauración del balance entre las citoquinas pro- y anti-inflamatorias, donde la IL-10 y el TGF- β 1 adquieren funciones clave. Este modo de acción homeostático concuerda con el concepto de que un tratamiento eficaz contra el dolor neuropático debería modular el equilibrio hacia un escenario anti-inflamatorio, actuando sobre más de una citoquina [100].

Nuestros resultados también concuerdan con la creciente evidencia sobre la acción terapéutica de las MSC, que parece depender de la liberación paracrina de una variedad de mediadores [41,160,264] capaces de influir en la transformación de macrófagos de un fenotipo M1 (pro-inflamatorio) a uno M2 (anti-inflamatorio) [101], inhibiendo la proliferación de células T [54], y suprimiendo a las células T CD4+ y CD8+ activadas y a las células B [110]. Alineado con estos conceptos, se observó que el efecto anti-alodínico de la administración sistémica de MSC humanas en ratones con SNI de 4 días de duración, se asocia a la migración de las MSC en la médula espinal y la corteza prefrontal (no en el nervio ciático), más una subsecuente disminución de los niveles de IL-1 β e IL-17 y el aumento de la expresión de IL-10 en la médula espinal [266]. Asimismo, la administración intratecal de MSC en ratones con CCI también bloquea el dolor, probablemente a través de la liberación de TGF- β 1, aunque no se observó que lo fuera por IL-10 [52]. Además, en estudios realizados en ratas con PSL, se observó que la administración intratecal de MSC pre-tratadas con IL-1 β alivia el dolor neuropático con mayor potencia que las MSC sin pre-tratamiento, mediante la modulación de la microglía y astrogía, en el asta dorsal de la médula espinal, y a través de la secreción de IL-10 y TGF- β 1 [176]. Más aun, y más recientemente, se demostró que la administración sistémica [100] o intratecal [264] de subproductos de las MSC, tales como medios condicionados derivados de MSC [100] o exosomas [264], reduce de manera eficiente el comportamiento de dolor en ratones con ligadura parcial del nervio ciático [100] o en ratas con ligadura de nervios espinales [264]. Este efecto también se asoció con la disminución de los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-17 en la médula espinal y el nervio ciático dañado, así como de una

expresión disminuida de TNF- α e IL-1 β y un aumento de la expresión de IL-10, factor neurotrófico derivado de la glía y del factor neurotrófico del cerebro, en los DRG L4-5 [264]. Todos estos datos son notablemente similares a nuestros hallazgos con la administración sistémica de IMT504 en ratas con lesión neuropática crónica, lo que respalda aún más nuestras hipótesis mecanística.

La disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en nervios con 7 días de lesión por SNI, incubados *in vitro* con IMT504, sugiere además efectos directos del ODN sobre el microambiente inflamatorio del nervio periférico lesionado. En concordancia con este concepto, recientemente demostramos que la administración sistémica de IMT504 regula negativamente la expresión de un gran número de moléculas pro-inflamatorias en la piel de las patas traseras de ratas con inflamación persistente, con una disminución, en paralelo, del número de macrófagos y linfocitos B [173]. Esto podría deberse a una acción directa temprana del ODN sobre las células inmunes en el sitio de la lesión, ya que IMT504 es detectable en el torrente sanguíneo durante las primeras 4 horas después de su administración subcutánea[97]. Por otro lado, y curiosamente, la incubación directa de los nervios lesionados con IMT504, no indujo la expresión de IL-10 o TGF- β 1 como fue el caso cuando los nervios se expusieron a MSC pre-tratadas con IMT504. Por lo tanto, se podría especular que, si bien la inmunomodulación temprana y directa por IMT504 es plausible, los efectos sustanciales *ex vivo* e *in vivo* sobre las citoquinas anti-inflamatorias, más las acciones anti-alodínicas de larga duración de IMT504 dependerían de la modulación de las MSC, particularmente a medida que avanza el tiempo después del tratamiento.

Una limitación de nuestro estudio es que no nos permite determinar si el IMT504 es igualmente eficaz o modula la señalización del dolor a través de mecanismos similares en ratas machos y hembras. Estudios recientes han llamado la atención sobre la influencia del sexo [114,186,203,270] o los estadios del desarrollo [276] en la fisiopatología del dolor crónico. En particular, se han observado diferencias en la participación de la microglía espinal [194,203,270] y de las células inmunes periféricas [186,270]. Esto, justificaría estudios futuros sobre la influencia del sexo en los efectos y mecanismos de acción de IMT504.

Finalmente, desde el punto de vista terapéutico, IMT504 surge como una opción prometedora contra el dolor neuropático, debido a que su efecto anti-inflamatorio parcialmente dependiente de la migración de las MSC hacia el nervio de ratas lesionadas, fue replicado en MSC humanas, lo que permite proyectar una mejor aplicación clínica basada en estas propiedades. Ensayos clínicos previamente fallidos

con fármacos prometedores en etapas pre-clínicas, como la propentofilina, han demostrado la importancia de una mayor validación de los resultados experimentales en modelos de animales, a través de la utilización de tejidos o células humanas [168]. Por otro lado, el IMT504 parece tener un mecanismo de acción y una duración de efecto, notablemente superiores al tratamiento estándar de referencia para los modelos de dolor neuropático, incluido el modelo de SNI, y también para la atención clínica, como lo es la gabapentina. Una dosis única de gabapentina (el mismo paradigma terapéutico que usamos para IMT504) ejerce acciones anti-alodínicas agudas y eficaces, aunque transitorias (aproximadamente 3 h después del tratamiento) en ratas con 7 días de lesión por SNI, mientras que, en este mismo modelo de lesión, el efecto de IMT504 es más estable y prolongado en el tiempo. Es por eso, que nuestro estudio actual sienta las bases para planificar estudios de seguridad clínica de IMT504 en seres humanos, y poner a prueba su potencial como novedoso tratamiento para el dolor neuropático con un mecanismo de acción único.

2 PROYECTO II

La administración sistémica de IMT504 previene la autotomía y reduce la gliosis ganglionar y espinal a través de la modulación del ambiente inflamatorio periférico y central, en ratas con axotomía del nervio ciático.

En el presente estudio, se comprobó la hipótesis de que la administración de una doble dosis sistémica y temprana de IMT504 previene la autotomía de la pata trasera lesionada y disminuye o inhibe la activación glial ganglionar y espinal inducida por la axotomía completa del nervio ciático en ratas. También demostramos que estos efectos se asocian a una disminución de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el sitio de la lesión y en la médula espinal ipsilateral.

La neurectomía del nervio ciático depriva por completo al campo receptivo asociado, en la pata trasera lesionada de las ratas. Esto conlleva a una pérdida de la capacidad de respuesta a estímulos sensitivos; aun así, el sistema nervioso central continúa recibiendo información nociceptiva espontánea y aberrante proveniente del neuroma que se forma en el extremo del nervio ciático lesionado, así como de los DRG asociados [9]. Estas descargas ectópicas, combinadas con los cambios plásticos gliales y neuronales en las vías asociadas a la transmisión de la información dolorosa, causan dolor espontáneo, provocando comportamientos anormales en las ratas, como lamerse, rascarse y en última instancia, como consecuencia más severa, la automutilación progresiva de la pata trasera denervada.

Entre las muy pocas estrategias experimentales evaluadas para prevenir la autotomía se incluye la aplicación tópica de compuestos que disuadan la conducta [91,272]. Así, se observó que la administración de una loción de sabor amargo, disponible comercialmente para su uso en humanos, desanimó a las ratas a morderse la pata trasera lesionada [272]. Si bien la aplicación de la loción no previno por completo la autotomía, disminuyó la incidencia de la misma (20% en ratas tratadas versus 70% en ratas de control) y un menor número de ratas tuvieron que ser retiradas del estudio por un grado de autotomía severo. Estudios posteriores demostraron que la aplicación tópica de ácido pícrico era más eficaz que la aplicación de una loción de sabor amargo para la prevención de la autotomía en ratas con lesión del sistema nervioso periférico [91]. Sin embargo, uno de los inconvenientes en la utilización de este tipo de compuesto es su seguridad, teniendo que ser preparado y manipulado con precaución, en el entorno del laboratorio. Más aún, estas técnicas parecen actuar como disuasivos conductuales, más que como moduladores de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, la manifestación de dolor, y la autotomía resultante. Desde un punto de vista clínico, tal tipo de abordaje podría ser considerado cuestionable.

Alternativamente, también se ha evaluado la capacidad de la pregabalina, el fármaco líder para el tratamiento del dolor neuropático, para prevenir la autotomía [303]. En estudios realizados en ratas con axotomía del nervio ciático, y evaluados durante 63 días post-lesión, los autores observaron que la administración oral de 30 mg/kg/día de pregabalina, dos veces al día y durante 6 semanas desde el inicio de la lesión, resulta en un retraso en la aparición de autotomía (día 8 post-lesión para el grupo control vs día 34 post-lesión para el grupo tratado), así como de su severidad (score promedio de 10 para el grupo control vs score promedio de 4 para el grupo tratado), y en un efecto residual de 3 semanas adicionales, después de haber suspendido el tratamiento, en comparación con los grupos control [303]. Los resultados presentados en la presente tesis, utilizando IMT504 para el control de la autotomía, son comparables a los del estudio de Wang et al. [303], aunque con algunas diferencias importantes: 1) tan sólo 2 administraciones consecutivas subcutáneas de IMT504, una el mismo día y otra al día siguiente de lesionar a los animales, fueron suficientes para evitar la ocurrencia de autotomía; 2) salvo en una rata, el resto de los animales nunca manifestó signos de autotomía en el grupo tratado con IMT504; 3) la rata que manifestó signos de autotomía en el grupo tratado con IMT504 alcanzó un grado 3 de auto-lesión, sólo observado 28 días post-lesión; por el contrario, al menos 3 de las 8 ratas tratadas con vehículo exhibieron niveles de

autotomía por encima de o igual a 5; y 4) la duración del efecto preventivo de la autotomía del IMT504 fue de al menos 4 semanas después del tratamiento, lo que es comparable a lo observado con el tratamiento con pregabalina, pero sin la necesidad de administración diaria. En suma, nuestro estudio sugiere que, al momento, el IMT504 es la droga experimental de administración sistémica más eficaz en prevenir la autotomía secundaria a la axotomía completa del nervio ciático en la rata.

Sólo recientemente es que ha sido posible profundizar sobre los mecanismos de acción del IMT504. Como destacamos en el Proyecto I, hemos demostrado que la administración sistémica de IMT504 en ratas con SNI alivia el dolor neuropático a través de la modulación del ambiente inflamatorio en el sitio de lesión, mecanismo mediado, al menos parcialmente, por la infiltración de MSC, promoviendo una disminución de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, TNF- α e IL-1 β , y un aumento de los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en el sitio de lesión (**Proyecto I**). Los resultados obtenidos en el presente proyecto, utilizando otro modelo de neuropatía periférica (axotomía del nervio ciático), sugieren que las MSC también contribuirían con el rol anti-alodínico del IMT504. Más aún, este rol no sólo podría tener lugar a nivel de los nervios dañados, como mostramos aquí con un aumento en el número de MSC en el neuroma, sino también en los DRG L4-L6 asociados, hasta por lo menos, 28 días después de la lesión. También coherente con lo demostrado en ratas con SNI, observamos aquí que la administración de IMT504 y la mayor presencia de MSC en el neuroma, se asocia a efectos inmunomoduladores de largo plazo, reflejados por el bloqueo total o parcial del aumento de citoquinas pro-inflamatorias (ver más adelante), acompañado de un modesto aumento en la citoquina anti-inflamatoria IL-10, según se registró 28 días después de la lesión y el tratamiento. En el presente trabajo, no evaluamos el perfil de citoquinas pro-y anti-inflamatorias en los DRG de ratas con axotomía del nervio ciático tratadas con IMT504. Sin embargo, especulamos que los efectos sobre el balance pro- y anti-inflamatorio observados en el neuroma sean también observados en los DRG. Apoyando esta hipótesis, se ha demostrado previamente que la lesión neuropática causada por CCI en el ratón induce la expresión de CXCL12 en los DRG lumbares L4-L6, y que esta regulación positiva promueve la migración de MSC inyectadas intratecalmente, mediada por el receptor CXCR4. Estas MSC anidadas en los DRG fueron observadas durante más de 2 meses, y se mostró que, a través de un mecanismo paracrino, brindan neuroprotección y alivian el dolor neuropático por secreción y acción de TGF- β 1 [52]. Finalmente, apoyando aún más el rol inmunomodulador de las MSC, se demostró recientemente que el co-trasplante de MSC y monocitos en los núcleos motores del

nervio facial en ratas con axotomía de las proyecciones periféricas de este nervio, promueve cambios en el microambiente de los núcleos, aumentando los niveles de citoquinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10 y TGF- β 1, y disminuyendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, INF- γ , IL-2, and IL-6. Este cambio en el microambiente favorecería el anidado de las MSC en el núcleo del nervio lesionado por un período de tiempo más prolongando, reduciendo la apoptosis neuronal [320].

El tratamiento del dolor neuropático crónico es una preocupación importante, y la necesidad de nuevos analgésicos más eficaces con menos efectos adversos es inmensa. Tradicionalmente, los mecanismos propuestos para la modulación del dolor se han centrado casi exclusivamente en las neuronas periféricas o centrales de las vías del dolor. Sin embargo, investigaciones recientes indican que la activación de las células gliales ganglionares y espinales es de vital importancia para el desarrollo de estados de dolor crónico [163,222,277]. De hecho, ha sido demostrado ya que la neurectomía del nervio ciático en ratas induce cambios retrógrados en las SGC de los DRG [2,153,191,226] y en la glía dorsal de los segmentos L4-L6 de la médula espinal lumbar [33,171]. Aquí confirmamos estas observaciones, demostrando que la axotomía completa del nervio ciático aumenta tanto el porcentaje de neuronas rodeadas por SGC GFAP-IR en los DRG L4-6, así como también el área ocupada por inmunoreactividad por GFAP y CD11b/c en el asta dorsal ipsilateral de la médula espinal, reflejando la presencia de astro- y microgliosis, respectivamente. Pero, más importante aún, revelamos que la administración sistémica de IMT504 resulta en una disminución modesta de la gliosis ganglionar, y un práctico bloqueo de la astro- y microgliosis espinal, con valores comparables con los basales de animales naïve, en todas las sobrevividas evaluadas. Si estos efectos sobre las células gliales, sobre todo los espinales, son consecuencia directa de la acción del IMT504, o secundarios a la inmunomodulación de la actividad de las neuronas aferentes primarias, queda por ser demostrado. Sin embargo, la disminución en la gliosis ganglionar y espinal nos sugirió la hipótesis de potenciales cambios en el microambiente inflamatorio espinal en las ratas tratadas con IMT504.

Es conocido que la axotomía del nervio ciático induce inflamación a nivel periférico y central, la cual contribuye al inicio y mantenimiento del dolor persistente [113,251,330]. La inflamación periférica está mediada principalmente por las células de Schwann y los macrófagos infiltrantes, mientras que la inflamación central está mediada por los astrocitos y la microglía [129,182,228]. Al activarse, estas células liberan agentes inmunoactivos, incluidas las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α [251,267]. Se ha demostrado que IL-1 β actúa de manera dependiente de p38 MAPK

para aumentar la excitabilidad de los nociceptores lo cual podría facilitar la actividad sináptica a nivel espinal y en consecuencia la transmisión y cronificación del dolor [31,56,80]. Por otro lado, el TNF- α es un factor pro-inflamatorio clave, que puede influir en múltiples mecanismos implicados en la transmisión del dolor [336]. A nivel periférico, TNF- α induce la transcripción génica de otras citoquinas pro-inflamatorias, incrementando la neuroinflamación [175], mientras que a nivel central, TNF- α participa en la reducción de la transmisión sináptica inhibitoria en la médula espinal e induce la proliferación de células inmunes y gliales [116]. Estudios previos han demostrado que el pre-tratamiento con minociclina en ratas con dolor neuropático inducido por CCI disminuye la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en el sitio de la lesión y en la médula espinal, resultando ser eficaz en el alivio de la inflamación espinal y el dolor neuropático [228]. Este efecto podría deberse a que la minociclina inhibe la activación microglial, lo que conlleva a la disminución de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y mediadores del estrés oxidativo por estas células.

En base a lo anteriormente descrito y a nuestras observaciones del efecto inmunomodular del IMT504 sobre microambiente inflamatorio, en los modelos de dolor inflamatorio [173,174] y dolor neuropático (**Proyecto I**), decidimos estudiar los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β 1) en el neuroma y en la médula espinal ipsilateral, para determinar si la disminución de la activación glial en ratas axotomizadas tratadas con IMT504, promovía una reducción de la inflamación a nivel central y si esta se correlacionaba con el estado inflamatorio de la periferia. Así, demostramos que la administración sistémica de IMT504 reduce los niveles de citoquinas pro-inflamatorias inducidos por la axotomía del nervio ciático, no solo en el neuroma, sino también a nivel de la médula espinal ipsilateral. Es importante, y curioso a la vez, observar que al igual que como se reportó en ratas con CCI tratadas con minociclina [250], la administración de IMT504 no indujo la síntesis de moléculas anti-nociceptivas en la médula espinal ipsilateral. De hecho, tampoco lo hizo en el nervio ciático lesionado. Estas observaciones contrastan con lo demostrado en el **Proyecto I**, en dónde caracterizamos no sólo una disminución de citoquinas pro-inflamatorias en el sitio de la lesión en ratas con SNI, sino también un aumento en IL-10 y TGF- β 1. Sin embargo, es posible identificar una serie de diferencias entre los diferentes modelos y tiempos experimentales utilizados en cada caso. En el **Proyecto II**, decidimos estudiar el entorno inflamatorio en nervios y médula espinal 28 días después de la axotomía del nervio ciático y el tratamiento, mientras que en las ratas con SNI del **Proyecto I**, el análisis fue hecho a los 3 y 21 días post-tratamiento; curiosamente a esta última sobrevivió el aumento en las citoquinas anti-inflamatorias

comenzaba a hacerse menos considerable. Es posible entonces que a los 28 días post-axotomía ya hayamos pasado el momento crítico de acción de las citoquinas anti-inflamatorias y su efecto anti-alodínico y que, a tiempos prolongados, el efecto permanentemente depresor del IMT504 sobre las citoquinas pro-inflamatorias conduzca a una disminución de la necesidad biológica de contar con la contraparte anti-inflamatoria.

En conclusión, demostramos por primera vez que la administración sistémica de IMT504 el mismo día de iniciada la lesión es eficaz en prevenir o al menos retrasar el desarrollo de la autotomía en animales con axotomía del nervio ciático. Actualmente, nos encontramos realizando nuevos experimentos en el laboratorio, con el fin de dilucidar los mecanismos implicados en la acción preventiva de la autotomía del IMT504 en ratas con axotomía del nervio ciático, estudiando en mayor detalle la posible consecuencia de la disminución de la gliosis espinal sobre la reactividad neuronal. Pero nuestros resultados actuales sugieren que tanto un aumento en el número de MSC en el sitio de la lesión y en DRG asociados, así como la modulación del equilibrio neuro-inmune en el sitio de la lesión y en la médula espinal ipsilateral son factores clave en los efectos terapéuticos del IMT504.

3 PROYECTO III

Estudio de la ventana temporal terapéutica para la administración de BMMC en ratas con lesión del nervio ciático

Los resultados obtenidos en este estudio confirman nuestra hipótesis de que la administración sistémica de BMMC en el momento en el que la neuropatía periférica ya se encuentra instalada, tiene valor terapéutico. Así, encontramos que la administración de BMMC dentro de la primera semana de ocurrido el crush del nervio ciático en la rata, da como resultado un reclutamiento más eficiente de estas células en el área proximal al sitio de lesión, en comparación con la administración a sobrevidas posteriores, donde se observó una reducción considerable en el número de BMMC infiltrantes. Este período de mayor reclutamiento se correlaciona con el período de mayor aumento en el número de núcleos totales presentes en el nervio lesionado, indicativo de la alta tasa de proliferación de las células de Schwann y del arribo de células inmunes infiltrantes, procesos característicos de la degeneración Walleriana [111,143]. Observamos, además, que la administración sistémica tardía de BMMC, en ratas con 7 días de lesión por crush o SNI, es muy eficaz en reducir la alodinia mecánica y térmica al frío en ratas lesionadas, mostrando una recuperación de los

umbrales de respuesta basal dentro de la primera semana después del tratamiento, en comparación con las ratas lesionadas y tratadas con vehículo. Esta mejoría observada en los estudios conductuales de dolor en ratas con lesión por crush del nervio ciático, se correlacionó con una muy modesta tendencia, aunque no significativa, hacia la recuperación de la funcionalidad motora de la pata lesionada, al menos como se observó una semana después de la administración de las BMMC. En paralelo, las ratas lesionadas y tratadas con BMMC mostraron además una rápida recuperación de los niveles de MBP y β III-tubulina, así como una mejor organización de estas proteínas a lo largo de la fibra nerviosa.

Nuestros resultados hacen un aporte concreto para la determinación de la ventana temporal óptima para obtener el mayor impacto terapéutico del trasplante de BMMC. Estudios previos han demostrado el efecto terapéutico positivo de la administración sistémica de BMMC en modelos de infarto y de accidente cerebrovascular, con trasplantes que se producen horas (1 o 24) [51] o días (3 o 7) [134,327] después de la lesión. Sin embargo, no se obtuvieron efectos beneficiosos cuando las células se trasplantaron a los 14 o 30 días después de la lesión [293]. Nuestros datos actuales sugieren que, en ratas con crush del nervio ciático, la primera semana después de la lesión representa una ventana temporal crítica que da como resultado el mayor número de células anidadas dentro del nervio ciático lesionado. Cabe mencionar, que se ha reportado previamente que la administración tardía de BMMC en un perro con tres años de lesión de médula espinal tuvo efectos neuroprotectores y neurotróficos en la médula espinal lesionada crónicamente, promoviendo la recuperación de la función motora, a pesar de la paraplejía prolongada [279]. Además, en ratas con 30 días de estrés crónico inducido por la exposición a una secuencia de eventos como ruido blanco, aislamiento social, privación de agua por 24 h, hacinamiento y luz estroboscópica, la administración tardía de BMMC tuvo un fuerte efecto anti-inflamatorio, con un aumento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en la amígdala, el hipocampo, la corteza frontal, el bazo y la sangre y una disminución de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ), mostrando un efecto terapéutico similar al de los antidepresivos [240].

El reclutamiento de BMMC (incluyendo a las MSC) y de células inmunes circulantes, está críticamente relacionado con cambios en el microambiente tisular de la injuria. Luego de la lesión de un nervio periférico, las células de Schwann proliferan activamente y adquieren un fenotipo de reparación [111,190], secretando factores tróficos y citoquinas que promueven el reclutamiento de macrófagos [141], linfocitos T [201] y células CD34⁺ [262]. Además, inducen la activación de precursores

mesenquimales residentes [45] o de células de Schwann desdiferenciadas con fenotipo similar a las MSC [62]. En conjunto, estos cambios celulares y moleculares contribuyen a la generación de un microambiente pro-regenerativo. Es importante destacar que, y apoyando la hipótesis de que las moléculas pro-inflamatorias secretadas después de la lesión son esenciales para el reclutamiento de las BMMC trasplantadas y de las células inmunes endógenas [213], no observamos una migración significativa de BMMC durante la fase de regeneración espontánea, la cual se presenta 21 días después de la lesión, hasta los 60 días. Finalmente, se ha sugerido que el trasplante tardío durante la fase sub-aguda ofrece un entorno más favorable para la supervivencia de las células trasplantadas [178,224,225].

Un hallazgo relevante en nuestro estudio es que la administración tardía de BMMC es altamente eficiente en reducir e incluso revertir el comportamiento de dolor en ratas lesionadas con el modelo de crush. De hecho, 1 día después de la administración de BMMC, se observó un aumento en el umbral de retirada de la pata ipsilateral frente a estímulos mecánicos, así como también una disminución en la frecuencia e intensidad de respuesta frente al estímulo térmico, acercándose a los niveles basales dentro de la primera semana después del tratamiento. Estos resultados fueron similares a los que observamos luego de administrar BMMC en ratas con 7 días de lesión por SNI. Sin embargo, en este modelo de lesión neuropática crónica fue necesario realizar una segunda administración de BMMC, 3 días después de la primera inyección (10 días después de la lesión), para lograr un efecto anti-alodínico de larga duración. En suma, los resultados concuerdan con estudios publicados anteriormente, donde el trasplante sistémico de BMMC inmediatamente después de una lesión reversible [291] o persistente [162] del nervio ciático, resultó en la disminución de la alodinia mecánica [162,291] y la hiperalgesia térmica [162] en ratas lesionadas, a partir de los 10 días posteriores al trasplante. También en coherencia con nuestros resultados actuales, se ha reportado previamente que la administración intramuscular tardía de BMMC en ratas con neuropatía diabética resulta en una mejoría de la hiperalgesia mecánica y fría, del flujo vascular y de la velocidad de conducción motora y sensorial del nervio ciático lesionado [216]. En conjunto, se puede concluir que el potencial terapéutico del trasplante de BMMC no solo se manifiesta en el contexto de la administración temprana, sino que un tratamiento tardío también podría ser capaz de reducir y eliminar el dolor neuropático. Creemos que este es un hallazgo importante, ya que sugiere que incluso cuando se ha producido un trauma y ha transcurrido algún tiempo, el trasplante de BMMC podría ser una opción terapéutica para reducir el dolor y mejorar la regeneración nerviosa

después de una lesión neuropática periférica. Sin embargo, aún se requieren más estudios para poder determinar la concentración o cantidad óptima de BMMC que se han de administrar para lograr un efecto terapéutico prolongado [120,256,280].

Los mecanismos por los cuales las BMMC modulan el dolor neuropático aún no se conocen en detalle. Se ha propuesto que su efecto terapéutico se relacionaría con la variedad de células que componen esta población (células madre mesenquimales, células madre hematopoyéticas, macrófagos y células progenitoras endoteliales) y sus interacciones sinérgicas [71,269]. La liberación de diversos factores de crecimiento, como VEGF y bFGF [278] y de factores que pueden mediar efectos antioxidantes potentes [283] también se ha propuesto como un posible mecanismo de acción de las BMMC. Siendo que en los últimos años se ha determinado que el dolor neuropático se asocia a un desbalance en el ambiente inflamatorio del sitio de lesión [255], debido a un aumento desmedido y prolongado de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α entre otras [132,223,326], el efecto terapéutico de las BMMC se asociaría a una acción inmunomoduladora que promueva un cambio fenotípico de las células infiltrantes en el nervio lesionado, promoviendo la disminución de citoquinas pro-inflamatorias y el aumento de citoquinas anti-inflamatorias. Ciertamente, nuestros resultados en los Proyectos I y II, enfocados en el rol promigratorio de MSC del IMT504, y sus efectos sobre el balance pro-vs-anti-inflamatorio en el sitio de la lesión, apoyan aún más esta hipótesis.

El índice funcional del nervio ciático (SFI) es uno de los parámetros más utilizados para evaluar la funcionalidad del nervio ciático después de una lesión [153], proporcionando información sobre la recuperación de las conexiones sensoriales y motoras, y la integración cortical necesaria para la locomoción. Aunque algunos autores informaron una clara correlación entre el SFI, las mediciones histomorfométricas del diámetro de las fibras nerviosas o del número de fibras nerviosas y los análisis electrofisiológicos [77,304], nuestros resultados actuales no apoyan dicha correlación, como también lo adelantó el estudio de Munro [209]. Esta discrepancia puede deberse a la dificultad para medir con precisión los parámetros necesarios para el cálculo del SFI, debido a la degeneración nerviosa severa que se desarrolla en las dos primeras semanas después de la lesión. Aquí observamos que, hasta la primera semana después del tratamiento, tanto las ratas lesionadas tratadas con vehículo como las tratadas tardíamente con BMMC exhiben un deterioro completo del índice funcional del nervio ciático, con valores de -100, lo que refleja la dificultad para obtener una huella confiable debido a la caída de los dedos de la pata lesionada [205]. Sin embargo, en las ratas tratadas con BMMC observamos un efecto positivo

temprano sobre los aspectos morfométricos del nervio dañado, con una recuperación de la integridad axonal seguida de una recuperación en la cantidad y organización de las proteínas de la mielina, en el nervio lesionado. Y, a partir de los 14 días después del tratamiento, y en adelante, observamos en las ratas tratadas con BMMC, una recuperación más acelerada del SFI y una tendencia hacia la recuperación de la amplitud de CMAP, en comparación con las ratas tratadas con vehículo. Sin embargo, como ya adelantamos más arriba, los efectos fueron modestos.

Finalmente, nuestros resultados concuerdan con ensayos clínicos recientes que demuestran el potencial terapéutico del uso de BMMC en diversas patologías asociadas a la lesión del sistema nervioso. En pacientes con neuropatía diabética que recibieron como tratamiento la administración de BMMC, su dolor mejoró y se observó una recuperación funcional de los nervios periféricos, acompañada de un aumento del flujo sanguíneo nervioso [216]. En pacientes con linfedema crónico, el tratamiento con BMMC mejoró la circunferencia de las extremidades y la capacidad de los pacientes para caminar [138]. En niños con parálisis cerebral, la administración de BMMC promovió mejoras en la función motora y en la espasticidad muscular, 6 meses después del trasplante [217]. Los pacientes con isquemia cerebral crónica que recibieron BMMC mostraron una mejora en la escala europea de ictus [121]. Finalmente, los pacientes con lesión de la médula espinal que recibieron tratamiento con BMMC durante la fase subaguda (dentro de los 12 meses posteriores a la lesión) mejoraron significativamente la movilidad y funcionalidad de las extremidades superiores y se volvieron más independientes en el desempeño de sus actividades cotidianas [260].

En conjunto, demostramos la existencia de una ventana temporal, en la cual el tratamiento tardío con BMMC en ratas con lesión nerviosa periférica transitoria, es efectivo para el alivio del dolor. Aún queda por dilucidar si los efectos anti-nociceptivos de las BMMC se relacionan con las acciones paracrinas sobre el sitio de lesión.

CONCLUSIÓN

El dolor neuropático es desencadenado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial y afecta al 7-10% de la población general. Se han descrito múltiples causas de dolor neuropático (enfermedades metabólicas, infección por HIV, quimioterapia contra el cáncer y traumas físicos, entre otros), y es probable que su incidencia aumente debido al envejecimiento de la población mundial, la mayor prevalencia de diabetes mellitus y la mejora de la supervivencia de pacientes con cáncer después de la quimioterapia [64].

Tradicionalmente, el dolor neuropático ha sido visto como una patología derivada únicamente del daño estructural de la propia neurona. Sin embargo, ahora está bien establecido que el entorno con el que interactúa el nociceptor también es un factor importante [145]. Se sabe que varios mediadores inflamatorios, como las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IFN- γ , IL-6 y TNF- α inducen efectos pro-algésicos tanto directos como indirectos, reduciendo el umbral nociceptivo, lo que provoca síntomas de alodinia (dolor debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor) e hiperalgesia (aumento de la percepción del dolor generado por un estímulo que provoca dolor) [268]. Teniendo en cuenta que la mayoría de los tratamientos disponibles para el dolor neuropático tienen una eficacia moderada y presentan efectos secundarios que limitan su uso, el enfoque terapéutico hacia la modulación de la neuroinflamación podría, por tanto, abrir nuevas vías para el desarrollo de fármacos novedosos para el tratamiento de esta patología [46].

En la presente tesis nos hemos enfocado en el abordaje terapéutico de una etiología concreta de dolor neuropático en ratas macho, como lo es la lesión mecánica del nervio ciático. Utilizamos dos modelos de dolor crónico, por lesión selectiva de las ramas del nervio ciático (**Proyectos I y III.3**) y por axotomía completa (**Proyecto II**); y un modelo de dolor transitorio, por crush del nervio ciático (**Proyectos III.1 y III.2**). Las estrategias terapéuticas que se emplearon para el tratamiento de estas condiciones fueron: 1) terapia farmacológica, administrando el ODN IMT504 (**Proyectos I y II**); y 2) terapia celular, administrando BMMC (**Proyecto III**).

En los Proyecto I y II demostramos el potencial terapéutico del IMT504 como anti-inflamatorio y anti-nociceptivo, durante su administración sistémica (subcutánea), en dos modelos de dolor crónico no regenerativo (SNI y axotomía). Asimismo, comenzamos a develar algunos de los mecanismos de acción por los cuales ejerce sus efectos. Los hallazgos demuestran que: 1) el IMT504 tiene un efecto anti-nociceptivo de larga duración, inclusive con una única administración, ya sea al momento de inducida la lesión o después de varios días de instalada la condición de dolor persistente por SNI (**Figuras 2-5**); 2) una doble administración de IMT504 es capaz de prevenir el desarrollo de autotomía en ratas con axotomía completa del

nervio ciático (**Figura 14**); 3) estos eventos se correlacionan con aumentos duraderos en el porcentaje de MSC en el nervio ciático lesionado (**Figuras 6-10, 15**) y en los DRG L4-L6 ipsilaterales (**Figura 15**); 4) el efecto anti-nociceptivo del IMT504 parece depender, al menos en parte, de sus propiedades inmuno-moduladoras sobre las MSC, potenciando su perfil anti-inflamatorio a través del aumento de la expresión de citoquinas anti-inflamatorias TGF- β 1 e IL-10 (**Figura 12**), y sobre la glía ganglionar y espinal (**Figuras 16-18**); 5) estas acciones combinadas sobre diferentes mediadores periféricos y centrales parecerían cimentar los efectos anti-inflamatorios de larga duración del IMT504, disminuyendo los niveles de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β , en el nervio lesionado y en la médula espinal ipsilateral, y aumentando los niveles de citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β 1, en el sitio de lesión (**Figuras 11, 12, 19; Resumen gráfico A-B**). Si bien la relación entre los diferentes eventos requiere de mayor estudio, se podría concluir que el efecto anti-nociceptivo neto del IMT504 subyace en la reducción de la actividad excitatoria de neuronas nociceptivas ganglionares y espinales, derivada de eventos neuro-inmunomodulatorios directamente influenciados por el ODN.

Es importante destacar que la mayor parte de lo analizado en esta tesis se centra en la acción del IMT504 sobre las MSC y sobre las células gliales, como mediadores claves del efecto neuro-inmunomodulador del ODN, pero sería relevante también analizar el efecto del IMT504 sobre las células inmunes circulantes e infiltrantes en el sitio de lesión, en el contexto del dolor neuropático crónico. Evidencia de tal rol en el contexto del dolor inflamatorio ha sido extensamente provista recientemente por nuestro grupo [172–174]. Además, es importante considerar que los diversos interrogantes sobre el efecto terapéutico y los mecanismos de acción del IMT504 presentados en esta tesis se han abordado utilizando ratas macho. Este dato es relevante, ya que se ha destacado la influencia del sexo o el estadio del desarrollo en los mecanismos fisiopatológicos de dolor neuropático, dependientes de células del sistema inmune y células gliales [186,203,276]. Será de interés continuar evaluando en experimentación futura el rol del IMT504 con esta importante variable en cuenta.

En suma, los resultados obtenidos en los Proyectos I y II confirman la hipótesis de que ***“la modulación de las MSC es una clave mecanística de los efectos anti-nociceptivos del IMT504, facilitando a su vez la modulación de procesos inflamatorios periféricos y centrales asociados a lesiones neuropáticas periféricas”***.

En el Proyecto III determinamos la ventana temporal terapéutica para la administración de BMMC en ratas con crush del nervio ciático y preliminarmente, en

ratas con SNI. Nuestros resultados demuestran que: 1) el mayor reclutamiento de BMMC, administradas de forma tardía, ocurre durante el pico de desmielinización e inflamación que se presenta 7 días después de iniciada la lesión (**Figura 22**); 2) la administración tardía de BMMC es capaz de revertir la alodinia mecánica y térmica en ambos modelos de dolor neuropático, aunque en ratas SNI el efecto anti-nociceptivo de larga duración pareciera depender de la cantidad de células inyectadas (**Figuras 23, 28, 29**); 3) las ratas tratadas con BMMC muestran una pronta mejoría en la organización estructural de los axones lesionados, sin embargo, la recuperación de la funcionalidad del nervio ciático se observa a tiempos posteriores (**Figuras 24-27; Resumen gráfico C-D**).

De este modo, se ha confirmado la hipótesis de que ***“existe una ventana temporal desde el inicio de la lesión neuropática, en la cual la administración tardía de BMMC es eficaz en revertir el comportamiento asociado al dolor en ratas con lesión reversible o crónica del nervio ciático”***.

Finalmente, el valor de la presente tesis reside en demostrar el potencial traslacional de dos estrategias terapéuticas cuyos mecanismos de acción se asocian a la modulación de la neuroinflamación. Así, el IMT504 se presenta como un ODN sintético capaz de incrementar la migración de MSC desde la médula ósea hacia el sitio de lesión, además de potenciar directamente su perfil anti-inflamatorio. La replicación de estos resultados claves en MSC humanas respalda el valor terapéutico del IMT504 como un tratamiento novedoso para el dolor neuropático con un mecanismo de acción único que involucra la regulación de las interacciones neuro-inmunes. Y pruebas concretas del potencial traslacional de esta propuesta lo constituyen: 1) la Patente de Uso presentada en la Oficina de Patentes de los Estados Unidos (Patent Application N° US 2020/0155592 A1 – 2019 – USE OF OLIGONUCLEOTIDES FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF PAIN. Inventors: Alejandro Daniel Montaner, Marcelo José Villar, Pablo Rodolfo Brumovsky, Candelaria Leiguarda, María Florencia Coronel, Mailín Casadei, Sandra Sbrascini). Titularidad: 100% CONICET. Pending); y 2) pasos firmes dados en el desarrollo del primer ensayo en humanos con IMT504, planteado como un ensayo en FASE I en voluntarios sanos. Asimismo, consideramos que la terapia celular con BMMC es también un enfoque prometedor tanto en el campo del dolor como de la medicina regenerativa para el tratamiento de lesiones neuropáticas periféricas. Esta estrategia es una de las terapias con células madre de mayor potencial, ya que las BMMC se obtienen a partir de organismos adultos y no requieren ser cultivadas para su purificación, lo cual además de evitarlos problemas éticos asociados al uso de células

madre de origen embrionario, evita las anomalías génicas o reordenamientos fenotípicos que se pudieran generar durante el cultivo celular.

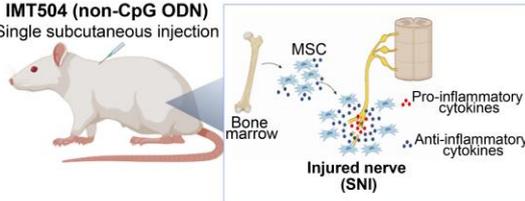
Resumen Gráfico. (A-B) Terapia farmacológica para el tratamiento del dolor neuropático en ratas. (A) La administración sistémica del IMT504, un ODN no-CpG, produce un bloqueo de la conducta al dolor de 5 semanas de duración, en ratas SNI. Dicho cambio involucra la migración de MSC hacia el sitio de lesión y la modulación de citoquinas a nivel local, favoreciendo el cambio hacia un estado anti-inflamatorio. (B) La administración sistémica del IMT504 en ratas con axotomía del nervio ciático, previene la autotomía de la pata lesionada y una disminución del estado inflamatorio en el neuroma. Más aún, el tratamiento se asocia a la promoción de la migración de MSC hacia el nervio y los DRG L4-L6 asociados, y la reducción de la gliosis ganglionar y espinal, así como una marcada disminución en la secreción de interleuquinas pro-inflamatorias en este último sitio. **(C-D)** Terapia celular para el tratamiento del dolor neuropático en ratas. (C) La administración sistémica tardía de MSC revierte la alodinia mecánica y térmica en ratas con crush del nervio ciático. Estos cambios se acompañan de un aumento de los niveles de MBP y β III-tubulina, redundando en una organización morfológica recuperada a lo largo de las fibras nerviosas. (D) La administración sistémica tardía de MSC en ratas SNI, produce un bloqueo de la conducta al dolor de 5 semanas de duración.

Graphical abstract. (A-B) Pharmacological therapy for the treatment of neuropathic pain in rats. (A) Systemic administration of IMT504, a non-CpG ODN, results in a 5-week long blockade of pain-like behavior in rats with SNI. This change involves the migration of MSC towards the site of injury and the modulation of cytokines at the local level, favoring the change towards an anti-inflammatory state. (B) Systemic administration of IMT504 in rats with axotomy of the sciatic nerve prevents autotomy of the injured paw and a decrease in the inflammatory state in the neuroma. Furthermore, the treatment is associated with the promotion of MSC migration towards the nerve and the associated L4-L6 DRG, and the reduction of ganglionic and spinal gliosis, as well as a marked decrease in the secretion of pro-inflammatory interleukins in this last site. **(C-D)** Cell therapy for the treatment of neuropathic pain in rats. (C) Late systemic administration of BMMC reverses mechanical and thermal allodynia in rats with crush of the sciatic nerve. These changes are accompanied by an increase in the levels of MBP and β III-tubulin, resulting in a recovered morphological organization along the nerve fibers. (D) Late systemic administration of BMMC in rats with SNI produces a 5-week blockade of pain-like behavior.

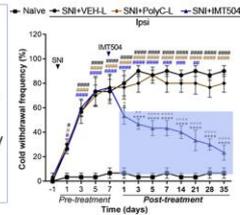
PHARMACOLOGICAL THERAPY: IMT504

A

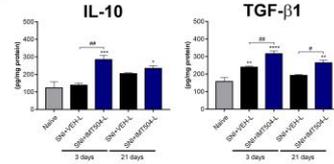
IMT504 (non-CpG ODN)
Single subcutaneous injection



Prevents or blocks mechanical and cold allodynia

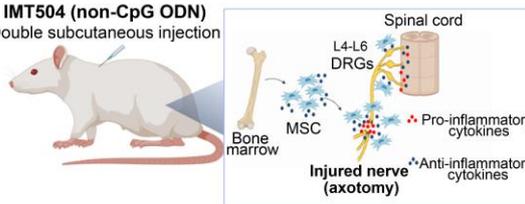


Acts on MSCs and the injured nerve to promote an anti-inflammatory milieu

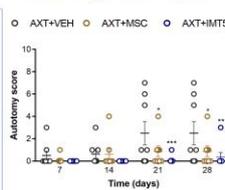


B

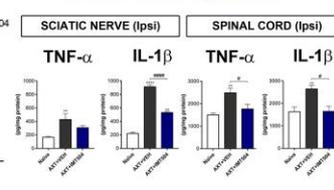
IMT504 (non-CpG ODN)
Double subcutaneous injection



Prevents autotomy of the injured hindpaw

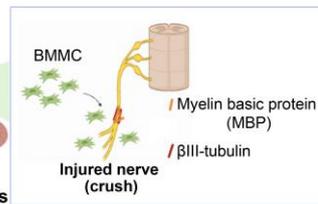
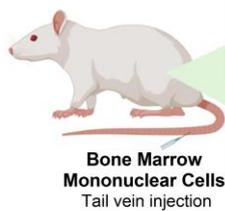


Modulates inflammation in the injured nerve and in the spinal cord

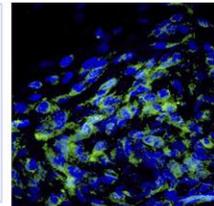


CELLULAR THERAPY: BMMC

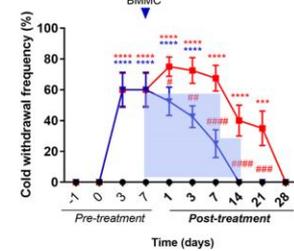
C



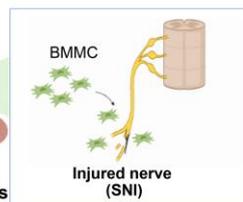
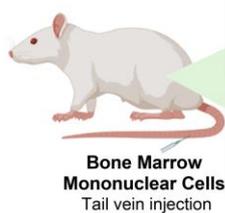
Migrates to the injured nerve



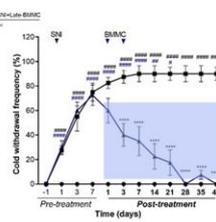
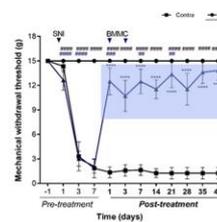
Reverts mechanical and cold allodynia



D



Reverts mechanical and cold allodynia



CONCLUSIONS

Neuropathic pain is triggered by injury or disease of the somatosensory nervous system and affects 7-10% of the general population. Multiple causes of neuropathic pain have been described (metabolic diseases, HIV infection, cancer chemotherapy and physical trauma, among others), and its incidence is likely to increase due to the aging of the world population, the higher prevalence of diabetes mellitus and improving survival of cancer patients after chemotherapy [64].

Traditionally, neuropathic pain has been seen as a pathology derived solely from structural damage to the neuron itself. However, it is now well established that the environment with which the nociceptor interacts is also an important factor [145]. Several inflammatory mediators, such as the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IFN- γ , IL-6, and TNF- α , are known to induce both direct and indirect pro-algesic effects, lowering the nociceptive threshold, leading to symptoms of allodynia (pain due to a stimulus that normally does not cause pain) and hyperalgesia (increased perception of pain generated by a stimulus that causes pain) [268]. Considering that most of the available treatments for neuropathic pain have moderate efficacy and have side effects that limit their use, the therapeutic approach towards the modulation of neuroinflammation could therefore open new avenues for the development of novel drugs for the treatment of this disease [46].

In this thesis we have focused on the therapeutic approach to a specific etiology of neuropathic pain in male rats, such as the mechanical injury of the sciatic nerve. We use two models of chronic pain, by selective lesion of the branches of the sciatic nerve (**Projects I and III.3**) and by complete axotomy (**Project II**); and a transient pain model, due to crushing of the sciatic nerve (**Projects III.1 and III.2**). The therapeutic strategies that were used for the treatment of these conditions were: 1) pharmacological therapy, administering the ODN IMT504 (**Projects I and II**); and 2) cell therapy, administering BMSC (**Project III**).

In Projects I and II we demonstrate the therapeutic potential of IMT504 as anti-inflammatory and anti-nociceptive, during its systemic (subcutaneous) administration, in two models of chronic non-regenerative pain (SNI and axotomy). Likewise, we begin to reveal some of the mechanisms of action by which it exerts its effects. The findings show that: 1) IMT504 has a long-lasting anti-nociceptive effect, even with a single administration, either at the time the injury is induced or after several days of the persistent pain condition due to SNI (**Figures 2-5**); 2) a double administration of IMT504 is able to prevent the development of autotomy in rats with complete axotomy of the sciatic nerve (**Figure 14**); 3) these events correlate with long-lasting increases in the percentage of MSC in the injured sciatic nerve (**Figures 6-10, 15**) and in ipsilateral L4-L6 DRG (**Figure 15**); 4) the anti-nociceptive effect of IMT504 seems to depend, at

least in part, on its immunomodulatory properties on MSC, enhancing its anti-inflammatory profile through increased expression of anti-inflammatory cytokines TGF- β 1 and IL-10 (**Figure 12**), and on the ganglionic and spinal glia (**Figures 16-18**); 5) these combined actions on different peripheral and central mediators seem to underpin the long-lasting anti-inflammatory effects of IMT504, decreasing the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β , in the injured nerve and in the ipsilateral spinal cord, and increasing the levels of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β 1, at the site of injury (**Figures 11,12,19; Graphic summary A-B**). Although the relationship between the different events requires further study, it could be concluded that the net anti-nociceptive effect of IMT504 underlies the reduction of the excitatory activity of spinal and ganglion nociceptive neurons, derived from neuro-immunomodulatory events directly influenced by the ODN.

It is important to note that most of what is analyzed in this thesis focuses on the action of IMT504 on MSC and on glial cells, as key mediators of the neuro-immunomodulatory effect of ODN, but it would also be relevant to analyze the effect of IMT504 on them. Circulating and infiltrating immune cells at the site of injury, in the context of chronic neuropathic pain. Evidence for such a role in the context of inflammatory pain has been extensively provided by our group. In addition, it is important to consider that the various questions about the therapeutic effect and the mechanisms of action of IMT504 presented in this thesis have been addressed using male rats. This data is relevant, since the influence of sex or developmental stage has been highlighted in the pathophysiological mechanisms of neuropathic pain, dependent on cells of the immune system and glial cells [186,203,276]. It will be of interest to continue evaluating the role of IMT504 in future experimentation with this important variable in mind.

In sum, the results obtained in Projects I and II confirm the hypothesis that "***the modulation of MSC is a mechanistic key to the anti-nociceptive effects of IMT504, facilitating in turn the modulation of peripheral and central inflammatory processes associated with peripheral neuropathic lesions***".

In Project III we determined the therapeutic time window for the administration of BMMC in rats with sciatic nerve crush and preliminarily, in rats with SNI. Our results show that: 1) the greatest recruitment of BMMC, administered late, occurs during the peak of demyelination and inflammation that occurs 7 days after the start of the injury (**Figure 22**); 2) delayed administration of BMMC is capable of reversing mechanical and thermal allodynia in both models of neuropathic pain, although in SNI rats the long-lasting anti-nociceptive effect seems to depend on the number of cells injected (**Figures 23, 28, 29**); 3) the rats treated with BMMC show a prompt improvement in the

structural organization of the injured axons, however, the recovery of the functionality of the sciatic nerve is observed at later times (**Figures 24-27; Graphic summary C-D**).

Thus, the hypothesis that ***"there is a time window from the onset of neuropathic injury, in which late administration of BMMC is effective in reversing pain-associated behavior in rats with reversible or chronic sciatic nerve injury"*** has been confirmed.

Finally, the value of this thesis lies in demonstrating the translational potential of two therapeutic strategies whose mechanisms of action are associated with the modulation of neuro-inflammation. Thus, IMT504 is presented as a synthetic ODN capable of increasing the migration of MSC from the bone marrow to the site of injury, in addition to directly enhancing its anti-inflammatory profile. Replication of these key results in human MSC supports the therapeutic value of IMT504 as a novel treatment for neuropathic pain with a unique mechanism of action involving regulation of neuro-immune interactions. And concrete evidence of the translational potential of this proposal is:) the Patent of Use filed in the United States Patent Office (Patent Application N° US 2020/0155592 A1 – 2019 – USE OF OLIGONUCLEOTIDES FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF PAIN. Inventors: Alejandro Daniel Montaner, Marcelo José Villar, Pablo Rodolfo Brumovsky, Candelaria Leiguarda, María Florencia Coronel, Mailín Casadei, Sandra Sbrascini). Titularidad: 100% CONICET. Pending); and 2) firm steps taken in the development of the first trial in humans with IMT504, proposed as a PHASE I trial in healthy volunteers. Likewise, we consider that BMMC cell therapy is also a promising approach both in the field of pain and regenerative medicine for the treatment of peripheral neuropathic injuries. This strategy is one of the stem cell therapies with the greatest potential, since the BMMC are obtained from adult organisms and do not need to be cultured for their purification, which in addition to avoiding the ethical problems associated with the use of embryonic stem cells, avoids gene abnormalities or phenotypic rearrangements that could be generated during cell culture.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ab Aziz CB, Ahmad AH. The Role of the Thalamus in Modulating Pain. *Malays J Med Sci* 2006;13:11.
- [2] Abdulla FA, Smith PA. Axotomy- and autotomy-induced changes in the excitability of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 2001;85:630–643.
- [3] Abaira VE, Ginty DD. The Sensory Neurons of Touch. *Neuron* 2013;79:618–639..
- [4] Adams JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 1992;40:1457–63.
- [5] Ahimsadasan N, Reddy V, Kumar A. Neuroanatomy, Dorsal Root Ganglion. *StatPearls* 2021.
- [6] Al-Chalabi M, Reddy V, Gupta S. Neuroanatomy, Spinothalamic Tract. *StatPearls* 2021.
- [7] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Innate Immunity*. 2002.
- [8] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The Adaptive Immune System* 2002.
- [9] Amir R, Devor M. Ongoing activity in neuroma afferents bearing retrograde sprouts. *Brain Res* 1993;630:283–288.
- [10] Anand P, Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* 2011;107:490–502.
- [11] Andersson JLR, Lilja A, Hartvig P, Långström B, Gordh T, Handwerker H, Torebjörk E. Somatotopic organization along the central sulcus, for pain localization in humans, as revealed by positron emission tomography. *Exp brain Res* 1997;117:192–199.
- [12] Armstrong SA, Herr MJ. Physiology, Nociception. *StatPearls* 2021.
- [13] Attal N, de Andrade DC, Adam F, Ranoux D, Teixeira MJ, Galhardoni R, Raicher I, Üçeyler N, Sommer C, Bouhassira D. Safety and efficacy of repeated injections of botulinum toxin A in peripheral neuropathic pain (BOTNEP): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2016;15:555–565.
- [14] Attal N, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 2006;13:1153–1169.
- [15] Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol* 2010;229:26–50.

- [16] Austin PJ, Wu A, Moalem-Taylor G. Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats. *J Vis Exp* 2012;3393.
- [17] Auvenshine RC. Acute vs. chronic pain. *Tex Dent J* 2000;117:14–20.
- [18] Barker PA, Mantyh P, Arendt-Nielsen L, Viktrup L, Tive L. Nerve Growth Factor Signaling and Its Contribution to Pain. *J Pain Res* 2020;13:1223.
- [19] Baron R. Neuropathic pain: a clinical perspective. *Handb Exp Pharmacol* 2009;194:3–30.
- [20] Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139:267–284. doi:10.1016/J.CELL.2009.09.028.
- [21] Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9237–9242.
- [22] Beggs S, Salter MW. Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun* 2007;21:624–633.
- [23] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87–107.
- [24] Bennett MI, Kaasa S, Barke A, Korwisi B, Rief W, Treede RD. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic cancer-related pain. *Pain* 2019;160:38–44.
- [25] Benveniste EN. Cytokines. *Encycl Neurol Sci* 2014:921–925.
- [26] Bettoni I, Comelli F, Rossini C, Granucci F, Giagnoni G, Peri F, Costa B. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia* 2008;56:1312–1319.
- [27] Beurel E, Michalek SM, Jope RS. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 2010;31:24.
- [28] Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81:1–5.
- [29] Bianchi MS, Bianchi S, Hernado-Insúa A, Martinez LM, Lago N, Libertun C, Chasseing NA, Montaner AD, Lux-Lantos VA. Proposed mechanisms for oligonucleotide IMT504 induced diabetes reversion in a mouse model of immunodependent diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016;311:E380–E395.
- [30] Bianchi S, Martínez Allo VC, Massimino M, Heguy MDRL, Borzone FR, Gomez Bustillo S, Chasseing NA, Libertun C, Montaner AD, Rabinovich GA, Toscano

- MA, Lux-Lantos VA, Bianchi MS. Oligonucleotide IMT504 Improves Glucose Metabolism and Controls Immune Cell Mediators in Female Diabetic NOD Mice. *Nucleic Acid Ther* 2021;31:155–171.
- [31] Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L, Brenner GJ, Ji RR, Bean BP, Woolf CJ, Samad TA. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J Neurosci* 2008;28:14062–14073.
- [32] Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17:592–604.
- [33] Boakye PA, Tang S-J, Smith PA. Mediators of Neuropathic Pain; Focus on Spinal Microglia, CSF-1, BDNF, CCL21, TNF- α , Wnt Ligands, and Interleukin 1 β . *Front Pain Res* 2021;2:41.
- [34] Boivin A, Pineau I, Barrette B, Filali M, Vallières N, Rivest S, Lacroix S. Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 2007;27:12565–12576.
- [35] Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S33–S40.
- [36] Botz B, Bölcskei K, Helyes Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017;9.
- [37] Bouhassira D. Neuropathic pain Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. 2018.
- [38] Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008;136:380–387.
- [39] Bushnell MC, Čeko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:502.
- [40] Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron* 2006;52:77.
- [41] Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, Noël A, Brook G, Schoenen J, Franzen R. Conditioned Medium from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Rats: An Original Strategy to Avoid Cell Transplantation. *PLoS One* 2013;8.
- [42] Cao H, Zhang YQ. Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:972–983.
- [43] Cao L, DeLeo JA. CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. *Eur J Immunol* 2008;38:448–458.
- [44] Caplan AI, Correa D. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell* 2011;9:11–15.

- [45] Carr MJ, Toma JS, Johnston APW, Steadman PE, Yuzwa SA, Mahmud N, Frankland PW, Kaplan DR, Miller FD. Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration. *Cell Stem Cell* 2019;24:240-256.e9.
- [46] Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2019;33.
- [47] Chahin A, Opal SM, Zorzopulos J, Jobes D V., Migdady Y, Yamamoto M, Parejo N, Palardy JE, Horn DL. The novel immunotherapeutic oligodeoxynucleotide IMT504 protects neutropenic animals from fatal *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1225–1229.
- [48] Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int J Neurosci* 2015;125:170–174.
- [49] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55–63.
- [50] Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *The Humoral Immune Response*. 2001.
- [51] Chen F, Suzuki Y, Nagai N, Peeters R, Coenegrachts K, Coudyzer W, Marchal G, Ni Y. Visualization of stroke with clinical MR imagers in rats: a feasibility study. *Radiology* 2004;233:905–911.
- [52] Chen G, Park CK, Xie RG, Ji RR. Intrathecal bone marrow stromal cells inhibit neuropathic pain via TGF- β secretion. *J Clin Invest* 2015;125:3226–3240.
- [53] Chen H-W, Wang L-T, Wang F-H, Fang L-W, Lai H-Y, Lu J, Hung M-S, Cheng Y, Liu S-J, Chong P, Lee OK-S, Hsu S-C. Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene chemokines. *J Immunol* 2013;190:5065–5077.
- [54] Chen P, Liu K, Hsu P, Wei C, Bai C, Ho L, Sytwu H, Yen B. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J Leukoc Biol* 2014;96:295–303.
- [55] Chen P, Piao X, Bonaldo P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol* 2015;130:605–618.
- [56] Chen Y, Balasubramanyan S, Lai AY, Todd KG, Smith PA. Effects of sciatic nerve axotomy on excitatory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *J Neurophysiol* 2009;102:3203–3215.

- [57] Choi JIL, Koehrn FJ, Sorkin LS. Carrageenan induced phosphorylation of Akt is dependent on neurokinin-1 expressing neurons in the superficial dorsal horn. *Mol Pain* 2012;8:1–11.
- [58] Choi S, Hachisuka J, Brett MA, Magee AR, Omori Y, Iqbal N ul A, Zhang D, DeLisle MM, Wolfson RL, Bai L, Santiago C, Gong S, Goulding M, Heintz N, Koerber HR, Ross SE, Ginty DD. Parallel ascending spinal pathways for affective touch and pain. *Nature* 2020;587:258–263.
- [59] Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 1994;59:369–376.
- [60] Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14:53–60.
- [61] Cichon J, Sun L, Yang G. Spared Nerve Injury Model of Neuropathic Pain in Mice. *Bio-protocol* 2018;8.
- [62] Clements MP, Byrne E, Camarillo Guerrero LF, Cattin AL, Zakka L, Ashraf A, Burden JJ, Khadayate S, Lloyd AC, Marguerat S, Parrinello S. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. *Neuron* 2017;96:98-114.e7.
- [63] Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: Mechanisms and their clinical implications. *BMJ* 2014;348:f7656–f7656.
- [64] Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Prim* 2017;3:1–19.
- [65] Coronel MF, Hernando-Insúa A, Rodriguez JM, Elías F, Chasseing NA, Montaner AD, Villar MJ. Oligonucleotide IMT504 reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Neurosci Lett* 2008;444:69–73.
- [66] Coronel MF, Musolino PL, Brumovsky PR, Hökfelt T, Villar MJ. Bone marrow stromal cells attenuate injury-induced changes in galanin, NPY and NPY Y1-receptor expression after a sciatic nerve constriction. *Neuropeptides* 2009;43:125–32.
- [67] Coronel MF, Musolino PL, Villar MJ. Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction. *Neurosci Lett* 2006;405:5–9.
- [68] Costa FAL, Moreira Neto FL. [Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain]. *Rev Bras Anesthesiol* 2015;65:73–81.
- [69] Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M. T-Cell Infiltration and Signaling in the Adult Dorsal Spinal Cord Is a Major Contributor to

- Neuropathic Pain-Like Hypersensitivity. *J Neurosci* 2009;29:14415.
- [70] Craig AD. A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci* 2003;26:303–307.
- [71] Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem Cells Transl Med* 2012;1:403–408.
- [72] Czeschik JC, Hagenacker T, Schäfers M, Büsselberg D. TNF-alpha differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci Lett* 2008;434:293–298.
- [73] D’Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 2008;101:8–16.
- [74] Dabrowska S, Andrzejewska A, Janowski M, Lukomska B. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. *Front Immunol* 2020;11.
- [75] Davies AL, Hayes KC, Dekaban GA. Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2007;88:1384–1393.
- [76] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000;87:149–158..
- [77] Dellon AL, Mackinnon SE. Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration. *Ann Plast Surg* 1989;23:197–202.
- [78] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980;20:441–462.
- [79] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.
- [80] Domoto R, Sekiguchi F, Tsubota M, Kawabata A. Macrophage as a Peripheral Pain Regulator. *Cells* 2021;10.
- [81] Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 2010;120:3760.
- [82] Dubový P, Jančálek R, Klusáková I, Svíženská I, Pejchalová K. Intra- and extraneuronal changes of immunofluorescence staining for TNF-alpha and TNFR1 in the dorsal root ganglia of rat peripheral neuropathic pain models. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26:1205–1217.
- [83] Dubový P, Klusáková I, Hradilová-Svíženská I, Joukal M, Boadas-Vaello P.

- Activation of astrocytes and microglial cells and CCL2/CCR2 upregulation in the dorsolateral and ventrolateral nuclei of periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla following different types of sciatic nerve injury. *Front Cell Neurosci* 2018;12:40.
- [84] Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther* 2011;2.
- [85] Dun X-P, Parkinson DB. Transection and Crush Models of Nerve Injury to Measure Repair and Remyelination in Peripheral Nerve. *Methods Mol Biol* 2018;1791:251–262.
- [86] Durand C, Pezet S, Eutamène H, Demarquay C, Mathieu N, Moussa L, Daudin R, Holler V, Sabourin JC, Milliat F, François A, Theodorou V, Tamarat R, Benderitter M, Sémont A. Persistent visceral allodynia in rats exposed to colorectal irradiation is reversed by mesenchymal stromal cell treatment. *Pain* 2015;156:1465–1476.
- [87] Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J. Transforming growth factor- β 1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain* 2009;5.
- [88] Elías F, Flo J, Lopez RA, Zorzopulos J, Montaner A, Rodriguez JM. Strong Cytosine-Guanosine-Independent Immunostimulation in Humans and Other Primates by Synthetic Oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT Motifs. *J Immunol* 2003;171:3697–3704.
- [89] Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice ASC, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2015;14:162–173.
- [90] Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DLH, Bouhassira D, Cruccu G, Freeman R, Hansson P, Nurmikko T, Raja SN, Rice ASC, Serra J, Smith BH, Treede RD, Jensen TS. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain* 2016;157:1599–1606.
- [91] Firouzi MS, Nabian MH, Zanjani LO, Zadegan SA, Kamrani RS, Rahimi-Movaghar V. The effects of picric acid (2,4,6-trinitrophenol) and a bite-deterrent chemical (denatonium benzoate) on autotomy in rats after peripheral nerve lesion. *Lab Anim (NY)* 2015;44:141–145.
- [92] Flatters SJL, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2004;109:150–161.
- [93] Fong A, Schug SA. Pathophysiology of pain: a practical primer. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:8S-14S.

- [94] Foong FW, Duggan AW. Brain-stem areas tonically inhibiting dorsal horn neurones: studies with microinjection of the GABA analogue piperidine-4-sulphonic acid. *Pain* 1986;27:361–371.
- [95] Foulkes T, Wood JN. Mechanisms of cold pain. *Channels (Austin)* 2007;1:154–160.
- [96] Franchi S, Valsecchi AE, Borsani E, Procacci P, Ferrari D, Zaffa C, Sartori P, Rodella LF, Vescovi A, Maione S, Rossi F, Sacerdote P, Colleoni M, Panerai AE. Intravenous neural stem cells abolish nociceptive hypersensitivity and trigger nerve regeneration in experimental neuropathy. *Pain* 2012;153:850–861.
- [97] Franco R, Rodriguez JM, Elías F, Hernando-Insúa A, Fló J, López R, Nagle C, Lago N, Zorzopulos J, Horn DL, Montaner AD. Non-clinical safety studies of IMT504, a unique non-CpG oligonucleotide. *Nucleic Acid Ther* 2014;24:267–282.
- [98] Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyó JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol* 2012;3.
- [99] Galvin D, McCrory C. The role of T-lymphocytes in neuropathic pain initiation, development of chronicity and treatment. *Brain, Behav Immun - Heal* 2021;18:100371.
- [100] Gama KB, Santos DS, Evangelista AF, Silva DN, De Alcântara AC, Dos Santos RR, Soares MBP, Villarreal CF. Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. *Stem Cells Int* 2018;2018.
- [101] Gao S, Mao F, Zhang B, Zhang L, Zhang X, Wang M, Yan Y, Yang T, Zhang J, Zhu W, Qian H, Xu W. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Exp Biol Med* 2014;239:366–375.
- [102] Garcia MG, Bayo J, Bolontrade MF, Sganga L, Malvicini M, Alaniz L, Aquino JB, Fiore E, Rizzo MM, Rodriguez A, Lorenti A, Andriani O, Podhajcer O, Mazzolini G. Hepatocellular carcinoma cells and their fibrotic microenvironment modulate bone marrow-derived mesenchymal stromal cell migration in vitro and in vivo. *Mol Pharm* 2011;8:1538–1548.
- [103] Garland EL. Pain Processing in the Human Nervous System: A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathways. *Prim Care* 2012;39:561.
- [104] Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 2011;8:1–13.

- [105] Gazerani P. Satellite Glial Cells in Pain Research: A Targeted Viewpoint of Potential and Future Directions. *Front Pain Res* 2021;2:4.
- [106] Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;87:46–51.
- [107] Gelati M, Profico D, Progetti-Pensi M, Muzi G, Sgaravizzi G, Vescovi AL. Culturing and expansion of “clinical grade” precursors cells from the fetal human central nervous system. *Methods Mol Biol* 2013;1059:65–77.
- [108] Gemma C, Bickford PC. Interleukin-1beta and caspase-1: players in the regulation of age-related cognitive dysfunction. *Rev Neurosci* 2007;18:137–148.
- [109] Gewandter JS, Dworkin RH, Turk DC, Farrar JT, Fillingim RB, Gilron I, Markman JD, Oaklander AL, Polydefkis MJ, Raja SN, Robinson JP, Woolf CJ, Ziegler D, Ashburn MA, Burke LB, Cowan P, George SZ, Goli V, Graff OX, Iyengar S, Jay GW, Katz J, Kehlet H, Kitt RA, Kopecky EA, Malamut R, McDermott MP, Palmer P, Rappaport BA, Rauschkolb C, Steigerwald I, Tobias J, Walco GA. Research design considerations for chronic pain prevention clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain reports* 2021;6:e895.
- [110] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EWF, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821–2827.
- [111] Gomez-Sanchez JA, Carty L, Iruarrizaga-Lejarreta M, Palomo-Irigoyen M, Varela-Rey M, Griffith M, Hantke J, Macias-Camara N, Azkargorta M, Aurrekoetxea I, De Juan VG, Jefferies HBJ, Aspichueta P, Elortza F, Aransay AM, Martínez-Chantar ML, Baas F, Mato JM, Mirsky R, Woodhoo A, Jessen KR. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *J Cell Biol* 2015;210:153–168.
- [112] Gonçalves dos Santos G, Delay L, Yaksh TL, Corr M. Neuraxial Cytokines in Pain States. *Front Immunol* 2020;10. doi:10.3389/fimmu.2019.03061.
- [113] Gong L, Wang D, Zhang L, Xie X, Sun H, Gu J. Genetic changes in rat proximal nerve stumps after sciatic nerve transection. *Ann Transl Med* 2019;7:763–763.
- [114] Gregus AM, Levine IS, Eddinger KA, Yaksh TL, Buczynski MW. Sex differences in neuroimmune and glial mechanisms of pain. *Pain* 2021;Publish Ah.
- [115] Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 1996;16:1091–1100.
- [116] Gruber-Schoffnegger D, Drdla-Schutting R, Hönigsperger C, Wunderbaldinger G, Gassner M, Sandkühler J. Induction of thermal hyperalgesia and synaptic

- long-term potentiation in the spinal cord lamina I by TNF- α and IL-1 β is mediated by glial cells. *J Neurosci* 2013;33:6540–6551.
- [117] Guan Z, Kuhn JA, Wang X, Colquitt B, Solorzano C, Vaman S, Guan AK, Evans-Reinsch Z, Braz J, Devor M, Abboud-Werner SL, Lanier LL, Lomvardas S, Basbaum AI. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nat Neurosci* 2016;19:94–101.
- [118] Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev* 2018;282:168.
- [119] Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M, Ceyzériat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 2015;9.
- [120] Hamamoto H, Gorman JH, Ryan LP, Hinmon R, Martens TP, Schuster MD, Plappert T, Kiupel M, St. John-Sutton MG, Itescu S, Gorman RC. Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *Ann Thorac Surg* 2009;87:794–801.
- [121] Hammadi AMA, Alhimiari F. Intra-Arterial Injection of Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in Ischemic Stroke Patients. *Exp Clin Transplant* 2019;17:239–241.
- [122] Hanani M, Spray DC. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 2020 219 2020;21:485–498.
- [123] Hernando-Insua A, Rodriguez JM, Elías F, Flo J, Lopez R, Franco R, Lago N, Zorzopulos J, Montaner AD. A high dose of IMT504, the PyNTTTTGT prototype immunostimulatory oligonucleotide, does not alter embryonic development in rats. *Oligonucleotides* 2010;20:33–36.
- [124] Hernando Insúa A, Montaner AD, Rodriguez JM, Elías F, Fló J, López RA, Zorzopulos J, Hofer EL, Chasseing NA. IMT504, the Prototype of the Immunostimulatory Oligonucleotides of the PyNTTTTGT Class, Increases the Number of Progenitors of Mesenchymal Stem Cells Both In Vitro and In Vivo: Potential Use in Tissue Repair Therapy. *Stem Cells* 2007;25:1047–1054.
- [125] Ho Kim S, Mo Chung J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50:355–363.
- [126] Hogan QH. Labat lecture: the primary sensory neuron: where it is, what it does, and why it matters. *Reg Anesth Pain Med* 2010;35:306–311.
- [127] Hore Z, Denk F. Neuroimmune interactions in chronic pain - An interdisciplinary perspective. *Brain Behav Immun* 2019;79:56–62.
- [128] Hruska R, Kennedy S, Silbergeld E. Quantitative aspects of normal locomotion in rats. *Life Sci* 1979;25:171–179.
- [129] Hu P, McLachlan EM. Distinct functional types of macrophage in dorsal root

- ganglia and spinal nerves proximal to sciatic and spinal nerve transections in the rat. *Exp Neurol* 2003;184:590–605.
- [130] Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009;88:792–806.
- [131] Hughes DI, Sikander S, Kinnon CM, Boyle KA, Watanabe M, Callister RJ, Graham BA. Morphological, neurochemical and electrophysiological features of parvalbumin-expressing cells: a likely source of axo-axonic inputs in the mouse spinal dorsal horn. *J Physiol* 2012;590:3927.
- [132] Hung AL, Lim M, Doshi TL. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. *Scand J Pain* 2017;17:287–293.
- [133] Ignatowski TA, Covey WC, Knight PR, Severin CM, Nickola TJ, Spengler RN. Brain-derived TNFalpha mediates neuropathic pain. *Brain Res* 1999;841:70–77.
- [134] Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res* 2004;1007:1–9.
- [135] Immke DC, Gavva NR. The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17:582–591.
- [136] Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci* 2018 193 2018;19:138–152.
- [137] Irvine KA, David Clark J. Chronic Pain After Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Pain Mechanisms. *Pain Med* 2018;19:1315–1333.
- [138] Ismail AM, Abdou SM, Abdelnaby AY, Hamdy MA, El Saka AA, Gawaly A. Stem Cell Therapy Using Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in Treatment of Lower Limb Lymphedema: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Lymphat Res Biol* 2018;16:270–277.
- [139] Jaeger LB, Banks WA. Transport of antisense across the blood-brain barrier. *Methods Mol Med* 2005;106:237–251.
- [140] Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;25:1–28.
- [141] Jander S, Lausberg F, Stoll G. Differential recruitment of CD8+ macrophages during Wallerian degeneration in the peripheral and central nervous system. *Brain Pathol* 2001;11:27–38.
- [142] Jergova S, Martinez H, Hernandez M, Schachner B, Gross S, Sagen J. Development of a Phantom Limb Pain Model in Rats: Behavioral and Histochemical Evaluation. *Front Pain Res* 2021;2:20.

- [143] Jessen KR, Arthur-Farraj P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia* 2019;67:421–437.
- [144] Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 2013;154 Suppl 1.
- [145] Ji RR, Chamesian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* 2016;354:572–577.
- [146] Ji RR, Donnelly CR, Nedergaard M. Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat Rev Neurosci* 2019 2011 2019;20:667–685.
- [147] Ji RR, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology* 2018;129:343.
- [148] Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:533–548.
- [149] Ji RR, Xu ZZ, Wang X, Lo EH. MMP regulation of neuropathic pain. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:336.
- [150] Joel MDM, Yuan J, Wang J, Yan Y, Qian H, Zhang X, Xu W, Mao F. MSC: immunoregulatory effects, roles on neutrophils and evolving clinical potentials. *Am J Transl Res* 2019;11:3890.
- [151] Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002;46:3349–3360.
- [152] Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 2020;14:198.
- [153] Kalinski AL, Yoon C, Huffman LD, Duncker PC, Kohen R, Passino R, Hafner H, Johnson C, Kawaguchi R, Carbajal KS, Jara JS, Hollis E, Geschwind DH, Segal BM, Giger RJ. Analysis of the immune response to sciatic nerve injury identifies efferocytosis as a key mechanism of nerve debridement. *Elife* 2020;9:1–41.
- [154] Kaliyaperumal S, Wilson K, Aeffner F, Dean C. Animal Models of Peripheral Pain: Biology Review and Application for Drug Discovery. *Toxicol Pathol* 2020;48:202–219.
- [155] Kandil A, Perret D. Classification of Neuropathic Pain. *Neuropathic Pain* 2018:11–16.
- [156] Kauppila T. Correlation between autotomy-behavior and current theories of neuropathic pain. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;23:111–129.
- [157] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central

- sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 2008;28:5189–5194.
- [158] Kela I, Kakarala CL, Hassan M, Belavadi R, Gudigopuram SVR, Raguthu CC, Gajjela H, Sange I. Chronic Pain: A Complex Condition With a Multi-Tangential Approach. *Cureus* 2021;13.
- [159] Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci* 2013;7:44.
- [160] Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, Hwang D, Kim KP, Kim DW. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res* 2012;11:839–849.
- [161] Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp brain Res* 1997;113:200–206.
- [162] Klass M, Gavrikov V, Drury D, Stewart B, Hunter S, Denson DD, Hord A, Csete M. Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy. *Anesth Analg* 2007;104:944–948.
- [163] Kohno K, Tsuda M. Role of microglia and P2X4 receptors in chronic pain. *Pain Reports* 2021;6:e864.
- [164] Kremer M, Salvat E, Muller A, Yalcin I, Barrot M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience* 2016;338:183–206.
- [165] Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546–549.
- [166] Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol.* 2001;31:3026-37.
- [167] Küry P, Greiner-Petter R, Cornely C, Jürgens T, Müller HW. Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells. *J Neurosci* 2002;22:7586–7595.
- [168] Landry RP, Jacobs VL, Romero-Sandoval EA, DeLeo JA. Propentofylline, a CNS glial modulator does not decrease pain in post-herpetic neuralgia patients: In vitro evidence for differential responses in human and rodent microglia and macrophages. *Exp Neurol* 2012;234:340–350.

- [169] Lantero A, Tramullas M, Díaz A, Hurlé MA. Transforming growth factor- β in normal nociceptive processing and pathological pain models. *Mol Neurobiol* 2012;45:76–86.
- [170] Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain* 2009;10:895.
- [171] Lee JW, Siegel SM, Oaklander AL. Effects of Distal Nerve Injuries on Dorsal-Horn Neurons and Glia: Relationships Between Lesion Size and Mechanical Hyperalgesia. *Neuroscience* 2009;158:904.
- [172] Leiguarda C, Coronel MF, Montaner AD, Villar MJ, Brumovsky PR. Long-lasting ameliorating effects of the oligodeoxynucleotide IMT504 on mechanical allodynia and hindpaw edema in rats with chronic hindpaw inflammation. *Neurosci Lett* 2018;666:17–23.
- [173] Leiguarda C, Potilinski C, Rubione J, Tate P, Villar MJ, Montaner A, Bisagno V, Constandil L, Brumovsky PR. IMT504 Provides Analgesia by Modulating Cell Infiltrate and Inflammatory Milieu in a Chronic Pain Model. *J Neuroimmune Pharmacol* 2020.
- [174] Leiguarda C, Villarreal A, Potilinski C, Pelissier T, Coronel MF, Bayo J, Ramos AJ, Montaner A, Villar MJ, Constandil L, Brumovsky PR. Intrathecal Administration of an Anti-nociceptive Non-CpG Oligodeoxynucleotide Reduces Glial Activation and Central Sensitization. *J Neuroimmune Pharmacol* 2021;16:818–834.
- [175] Leung L, Cahill CM. TNF- α and neuropathic pain - a review. *J Neuroinflammation* 2010;7.
- [176] Li J, Deng G, Wang H, Yang M, Yang R, Li X, Zhang X, Yuan H. Interleukin-1 β pre-treated bone marrow stromal cells alleviate neuropathic pain through CCL7-mediated inhibition of microglial activation in the spinal cord. *Sci Rep* 2017;7.
- [177] Li T, Chen X, Zhang C, Zhang Y, Yao W. An update on reactive astrocytes in chronic pain. *J Neuroinflammation* 2019;16:1–13.
- [178] Li Y, Zhang WM, Wang TH. Optimal location and time for neural stem cell transplantation into transected rat spinal cord. *Cell Mol Neurobiol* 2011;31:407–414.
- [179] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017;541:481–487.
- [180] Liesveld JL, Sharma N, Aljittawi OS. Stem cell homing: From physiology to

- therapeutics. *Stem Cells* 2020;38:1241–1253.
- [181] Lima D, Almeida A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog Neurobiol* 2002;66:81–108.
- [182] Lindborg JA, Niemi JP, Howarth MA, Liu KW, Moore CZ, Mahajan D, Zigmond RE. Molecular and cellular identification of the immune response in peripheral ganglia following nerve injury. *J Neuroinflammation* 2018;15:1–17.
- [183] Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology? *Transfus Med Hemotherapy* 2010;37:75–83.
- [184] Liu M, Li K, Wang Y, Zhao G, Jiang J. Stem Cells in the Treatment of Neuropathic Pain: Research Progress of Mechanism. *Stem Cells Int* 2020;2020.
- [185] Logu F, Nassini R, Materazzi S, Carvalho Gonçalves M, Nosi D, Rossi Degl'Innocenti D, Marone IM, Ferreira J, Li Puma S, Benemei S, Trevisan G, Souza Monteiro De Araújo D, Patacchini R, Bunnett NW, Geppetti P. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat Commun* 2017;8.
- [186] Lopes DM, Malek N, Edye M, Jager SB, McMurray S, McMahon SB, Denk F. Sex differences in peripheral not central immune responses to pain-inducing injury. *Sci Rep* 2017;7.
- [187] Luo X, Tai WL, Sun L, Qiu Q, Xia Z, Chung SK, Cheung CW. Central administration of C-X-C chemokine receptor type 4 antagonist alleviates the development and maintenance of peripheral neuropathic pain in mice. *PLoS One* 2014;9:e104860.
- [188] Luo X, Wang X, Xia Z, Chung SK, Cheung CW. CXCL12/CXCR4 axis: An emerging neuromodulator in pathological pain. *Rev Neurosci* 2016;27:83–92.
- [189] Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, Yaksh TL. Upregulation of dorsal root ganglion (α)₂(δ) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 2001;21:1868–1875.
- [190] Lutz AB, Chung WS, Sloan SA, Carson GA, Zhou L, Lovelett E, Posada S, Zuchero JB, Barres BA. Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E8072–E8080.
- [191] Lyu C, Lyu GW, Martinez A, Shi TJS. Effect of nerve injury on the number of dorsal root ganglion neurons and autotomy behavior in adult Bax-deficient mice. *J Pain Res* 2017;10:2079–2087.
- [192] Macias MY, Syring MB, Pizzi MA, Crowe MJ, Alexanian AR, Kurpad SN. Pain

- with no gain: allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. *Exp Neurol* 2006;201:335–348.
- [193] Malik-Hall M, Dina OA, Levine JD. Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 2005;21:3387–3394.
- [194] Mapplebeck JCS, Beggs S, Salter MW. Sex differences in pain: A tale of two immune cells. *Pain*. Lippincott Williams and Wilkins, 2016, Vol. 157. pp. S2–S6.
- [195] Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, Meller ST. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1993;54:57–69.
- [196] Melzack R. Pain and the Neuromatrix in the Brain. *J Dent Educ* 2001;65:1378–1382.
- [197] Miller SJ. Astrocyte heterogeneity in the adult central nervous system. *Front Cell Neurosci* 2018;12:15.
- [198] Mills EP, Keay KA, Henderson LA. Brainstem Pain-Modulation Circuitry and Its Plasticity in Neuropathic Pain: Insights From Human Brain Imaging Investigations. *Front Pain Res* 2021;2:34.
- [199] Mitchell EA, Gentet LJ, Dempster J, Belelli D. GABAA and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurones: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids. *J Physiol* 2007;583:1021–1040.
- [200] Miyamoto K, Kume K, Ohsawa M. Role of microglia in mechanical allodynia in the anterior cingulate cortex. *J Pharmacol Sci* 2017;134:158–165.
- [201] Moalem G, Monsonego A, Shani Y, Cohen IR, Schwartz M. Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *FASEB J* 1999;13:1207–1217.
- [202] Moalem G, Xu K, Yu L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 2004;129:767–777.
- [203] Mogil JS. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat Rev Neurosci* 2020;21:353–365.
- [204] Mokhtar M, Singh P. Neuroanatomy, Periaqueductal Gray. *StatPearls* 2021.
- [205] Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods* 2008;170:255–261.
- [206] Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765..
- [207] Moore RA, Chi CC, Wiffen PJ, Derry S, Rice ASC. Oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs for neuropathic pain. *Cochrane database Syst Rev*

- 2015;2015.
- [208] Morbach H, Schickel JN, Cunningham-Rundles C, Conley ME, Reisli I, Franco JL, Meffre E. CD19 controls TLR9 responses in human B cells. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:889.
- [209] Munro CA, Szalai JP, Mackinnon SE, Midha R. Lack of association between outcome measures of nerve regeneration. *Muscle Nerve* 1998;21:1095–1097.
- [210] Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8686–8691.
- [211] Musolino PL, Coronel MF, Hökfelt T, Villar MJ. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. *Neurosci Lett* 2007;418:97–101.
- [212] Myers RR, Shubayev VI. The ology of neuropathy: An integrative review of the role of neuroinflammation and TNF- α axonal transport in neuropathic pain. *Journal of the Peripheral Nervous System. J Peripher Nerv Syst*, 2011, Vol. 16. pp. 277–286.
- [213] Nadeau S, Filali M, Zhang J, Kerr BJ, Rivest S, Soulet D, Iwakura Y, Vaccari JP de R, Keane RW, Lacroix S. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. *J Neurosci* 2011;31:12533–12542.
- [214] Nakamura Y, Morioka N, Abe H, Zhang FF, Hisaoka-Nakashima K, Liu K, Nishibori M, Nakata Y. Neuropathic Pain in Rats with a Partial Sciatic Nerve Ligation Is Alleviated by Intravenous Injection of Monoclonal Antibody to High Mobility Group Box-1. *PLoS One* 2013;8:73640.
- [215] Napadow V, Sclocco R, Henderson LA. Brainstem neuroimaging of nociception and pain circuitries. *Pain Reports* 2019;4.
- [216] Naruse K, Sato J, Funakubo M, Hata M, Nakamura N, Kobayashi Y, Kamiya H, Shibata T, Kondo M, Himeno T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PLoS One* 2011;6.
- [217] Nguyen TL, Nguyen HP, Nguyen TK. The effects of bone marrow mononuclear cell transplantation on the quality of life of children with cerebral palsy. *Health Qual Life Outcomes* 2018;16.
- [218] Nicholson B. Differential diagnosis: Nociceptive and neuropathic pain. *Am J Manag Care* 2006;12:256–262.
- [219] Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem* 2016;60:275.

- [220] Niemi JP, Lindborg JA, Zigmond RE. Detection of Neutrophils in the Sciatic Nerve Following Peripheral Nerve Injury. *Methods Mol Biol* 2020;2143:207–222.
- [221] Noble M, Treadwell JR, Tregear SJ, Coates VH, Wiffen PJ, Akafofomo C, Schoelles KM, Chou R. Long-term opioid management for chronic noncancer pain. *Cochrane database Syst Rev* 2010;2010.
- [222] O’Callaghan JP, Miller DB. Spinal glia and chronic pain. *Metabolism* 2010;59 Suppl 1.
- [223] Ogawa N, Kawai H, Terashima T, Kojima H, Oka K, Chan L, Maegawa H. Gene therapy for neuropathic pain by silencing of TNF- α expression with lentiviral vectors targeting the dorsal root ganglion in mice. *PLoS One* 2014;9.
- [224] Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, Bregman BS, Koike M, Uchiyama Y, Toyama Y, Okano H. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 2002;69:925–933.
- [225] Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama Y. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:191–198.
- [226] Oliveira ALR. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2001;34:375–380.
- [227] Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sánchez A, García-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: A pilot study. *Transplantation* 2011;92:822–828.
- [228] Padi SSV, Kulkarni SK. Minocycline prevents the development of neuropathic pain, but not acute pain: possible anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2008;601:79–87.
- [229] Pannese E. Biology and pathology of perineuronal satellite cells in sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2018;226:65–83.
- [230] Patel R, Dickenson AH. Mechanisms of the gabapentinoids and $\alpha 2 \delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacol Res Perspect* 2016;4.
- [231] Peddareddygari LR, Oberoi K, Grewal RP. Congenital Insensitivity to Pain: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Neurol Med* 2014;2014:1–4.
- [232] Perkins NM, Tracey DJ. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience* 2000;101:745–757.
- [233] Pettine K, Suzuki R, Sand T, Murphy M. Treatment of discogenic back pain with

- autologous bone marrow concentrate injection with minimum two year follow-up. *Int Orthop* 2016;40:135–140.
- [234] Piao Y, Gwon DH, Kang DW, Hwang TW, Shin N, Kwon HH, Shin HJ, Yin Y, Kim JJ, Hong J, Kim HW, Kim Y, Kim SR, Oh SH, Kim DW. TLR4-mediated autophagic impairment contributes to neuropathic pain in chronic constriction injury mice. *Mol Brain* 2018;11.
- [235] Piñero G, Usach V, Soto P, Monje P, Setton-Avruj P. EGFP transgene: a useful tool to track transplanted bone marrow mononuclear cell contribution to peripheral remyelination. *Transgenic Res* 2018;27:135–153.
- [236] Piser TM. Linking the cytokine and neurocircuitry hypotheses of depression: a translational framework for discovery and development of novel antidepressants. *Brain Behav Immun* 2010;24:515–524.
- [237] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80-) 1999;284:143–147.
- [238] Ploner M, Gross J, Timmermann L, Schnitzler A. Cortical representation of first and second pain sensation in humans. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:12444–12448.
- [239] Polgar E, Sardella TCP, Watanabe M, Todd AJ. Quantitative Study of NPY-Expressing GABAergic Neurons and Axons in Rat Spinal Dorsal Horn. *J Comp Neurol* 2011;519:1007.
- [240] do Prado-Lima PAS, Onsten GA, de Oliveira GN, Brito GC, Ghilardi IM, de Souza EV, dos Santos PG, Salamoni SD, Machado DC, Duarte MMF, Barbisan F, da Cruz IBM, Costa-Ferro ZSM, daCosta JC. The antidepressant effect of bone marrow mononuclear cell transplantation in chronic stress. *J Psychopharmacol* 2019;33.
- [241] Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM. *Neuroglial Cells*. 2001.
- [242] Raghavendra V, Tanga F, Deleo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:624–630.
- [243] Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 2020;161:1976.
- [244] Raja SN, Meyer RA, Campbell JN. Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology* 1988;68:571–590.

- [245] Reaux-Le Goazigo A, Rivat C, Kitabgi P, Pohl M, Melik Parsadaniantz S. Cellular and subcellular localization of CXCL12 and CXCR4 in rat nociceptive structures: Physiological relevance. *Eur J Neurosci* 2012;36:2619–2631.
- [246] Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev* 2009;60:57–64.
- [247] Renthal W. Pain Genetics. *Rosenberg's Mol Genet Basis Neurol Psychiatr Dis Fifth Ed* 2015;5:1089–1100.
- [248] Ro LS, Jacobs JM. The role of the saphenous nerve in experimental sciatic nerve mononeuropathy produced by loose ligatures: a behavioural study. *Pain* 1993;52:359–369.
- [249] Rodriguez JM, Marchicio J, López M, Ziblat A, Elías F, Fló J, López RA, Horn D, Zorzopulos J, Montaner AD. PyNTTTTGT and CpG immunostimulatory oligonucleotides: Effect on Granulocyte/Monocyte Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) secretion by human CD56+ (NK and NKT) cells. *PLoS One* 2015;10.
- [250] Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Jurga AM, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. *J Neuroimmunol* 2014;277:57–66.
- [251] Ruohonen S, Khademi M, Jagodić M, Taskinen HS, Olsson T, Røyttä M. Cytokine responses during chronic denervation. *J Neuroinflammation* 2005;2.
- [252] Sah DWY, Ossipov MH, Rossomando A, Silvian L, Porreca F. New Approaches for the Treatment of Pain: The GDNF Family of Neurotrophic Growth Factors. *Curr Top Med Chem* 2005;5:577–583.
- [253] Sardella TCP, Polgár E, Watanabe M, Todd AJ. A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 2011;192:708–720.
- [254] Schoch KM, Miller TM. Antisense oligonucleotides: Translation from mouse models to human neurodegenerative diseases. *Neuron* 2017;94:1056.
- [255] Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 2007;10:1361–1368.
- [256] Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, Kellner J, Zviman MM, Hatzistergos KE, Detrick B, Conte J V., McNiece I, Steenbergen C, Lardo AC, Hare JM. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2009;30:2722–2732.
- [257] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205–218.
- [258] Sessle BJ. The Pain Crisis: What It Is and What Can Be Done. *Pain Res Treat*

- 2012;2012.
- [259] Setton-Avruj C, Musolino P, Salis C, Alló M, Bizzozero O, Villar M, Soto E, Pasquini J. Presence of alpha-globin mRNA and migration of bone marrow cells after sciatic nerve injury suggests their participation in the degeneration/regeneration process. *Exp Neurol* 2007;203:568–578.
- [260] Sharma A, Sane H, Gokulchandran N, Kulkarni P, Jose A, Nair V, Das R, Lakhanpal V, Badhe P. Intrathecal transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with sub-acute and chronic spinal cord injury: An open-label study. *Int J Health Sci (Qassim)* 2020;14:24.
- [261] Shen W, Hu XM, Liu YN, Han Y, Chen LP, Wang CC, Song C. CXCL12 in astrocytes contributes to bone cancer pain through CXCR4-mediated neuronal sensitization and glial activation in rat spinal cord. *J Neuroinflammation* 2014;11:75.
- [262] Sheu ML, Cheng FC, Su HL, Chen YJ, Chen CJ, Chiang CM, Chiu WT, Sheehan J, Pan HC. Recruitment by SDF-1 α of CD34-positive cells involved in sciatic nerve regeneration. *J Neurosurg* 2012;116:432–444.
- [263] Shichinohe H, Kuroda S, Yano S, Hida K, Iwasaki Y. Role of SDF-1/CXCR4 system in survival and migration of bone marrow stromal cells after transplantation into mice cerebral infarct. *Brain Res* 2007;1183:138–147.
- [264] Shiue SJ, Rau RH, Shiue HS, Hung YW, Li ZX, Yang KD, Cheng JK. Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury-induced pain in rats. *Pain* 2019;160:210–223.
- [265] Shubayev VI, Myers RR. Upregulation and interaction of TNF α and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res* 2000;855:83–89.
- [266] Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, de Novellis V, Rossi F, Maione S. Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. *Front Integr Neurosci* 2011;5.
- [267] Skaper SD, Facci L, Giusti P. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology* 2014;141:314–327.
- [268] Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* 2004;361:184–187.
- [269] Song F, Tang J, Geng R, Hu H, Zhu C, Cui W, Fan W. Comparison of the efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:1415.

- [270] Sorge RE, Mapplebeck JCS, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, Martin LJ, Austin JS, Sotocinal SG, Chen D, Yang M, Shi XQ, Huang H, Pillon NJ, Bilan PJ, Tu Y, Klip A, Ji RR, Zhang J, Salter MW, Mogil JS. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* 2015;18:1081–1083.
- [271] Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006;24:74–85.
- [272] Sporel-Özkat RE, Edwards PM, Hepgul KT, Savas A, Gispen WH. A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. *J Neurosci Methods* 1991;36:263–265.
- [273] Stevens AM, Liu L, Bertovich D, Janjic JM, Pollock JA. Differential expression of neuroinflammatory mrnas in the rat sciatic nerve following chronic constriction injury and pain-relieving nanoemulsion NSAID delivery to infiltrating macrophages. *Int J Mol Sci* 2019;20.
- [274] Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 2002;7:13–27.
- [275] Sulaiman W, Nguyen DH. Transforming growth factor beta 1, a cytokine with regenerative functions. *Neural Regen Res* 2016;11:1549–1552.
- [276] Suter MR. Microglial role in the development of chronic pain. *Curr Opin Anaesthesiol* 2016;29:584–589.
- [277] Svensson CI, Brodin E. Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. *Mol Interv* 2010;10:25–38.
- [278] Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291.
- [279] Tamura K, Harada Y, Kunimi M, Takemitsu H, Hara Y, Nakamura T, Tagawa M. Autologous bone marrow mononuclear cell transplant and surgical decompression in a dog with chronic spinal cord injury. *Exp Clin Transplant* 2015;13:100–105.
- [280] Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, Tokita Y, Keith MCL, Shirk G, Stowers H, Hunt GN, Wu W, Dawn B, Bolli R. Effects of Intracoronary Infusion of Escalating Doses of Cardiac Stem Cells in Rats With Acute Myocardial Infarction. *Circ Heart Fail* 2015;8:757–765.
- [281] Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. The CNS role of Toll-like receptor 4

- in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5856–5861.
- [282] Thakur KK, Saini J, Mahajan K, Singh D, Jayswal DP, Mishra S, Bishyae A, Sethi G, Kunnumakkara AB. Therapeutic implications of toll-like receptors in peripheral neuropathic pain. *Pharmacol Res* 2017;115:224–232.
- [283] Thrasivoulou C, Soubeyre V, Ridha H, Giuliani D, Giaroni C, Michael GJ, Saffrey MJ, Cowen T. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. *Aging Cell* 2006;5:247–257.
- [284] Todd AJ. Identifying functional populations among the interneurons in laminae I–III of the spinal dorsal horn. *Mol Pain* 2017;13.
- [285] Todd AJ, Sullivan AC. Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 1990;296:496–505.
- [286] Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 2007;55:377–391.
- [287] Turvey SE, Broide DH. Chapter 2: Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S24.
- [288] Üçeyler N, Eberle T, Rolke R, Birklein F, Sommer C. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain* 2007;132:195–205.
- [289] Üçeyler N, Schäfers M, Sommer C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Exp Brain Res* 2009;196:67–78.
- [290] Üçeyler N, Tschärke A, Sommer C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behav Immun* 2007;21:553–560.
- [291] Usach V, Malet M, López M, Lavallo L, Piñero G, Saccoliti M, Cueto A, Brumovsky P, Brusco A, Setton-Avruj P. Systemic Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Promotes Axonal Regeneration and Analgesia in a Model of Wallerian Degeneration. *Transplantation* 2017;101:1573–1586.
- [292] Vanderwall AG, Milligan ED. Cytokines in Pain: Harnessing Endogenous Anti-Inflammatory Signaling for Improved Pain Management. *Front Immunol* 2019;10:3009.
- [293] de Vasconcelos dos Santos A, da Costa Reis J, Diaz Paredes B, Moraes L, Jasmin, Giraldo-Guimarães A, Mendez-Otero R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Res* 2010;1306:149–158.
- [294] Vescovi AL, Gritti A, Galli R, Parati EA. Isolation and intracerebral grafting of

- nontransformed multipotential embryonic human CNS stem cells. *J Neurotrauma* 1999;16:689–693.
- [295] Vollmer J, Weeratna RD, Jurk M, Samulowitz U, McCluskie MJ, Payette P, Davis HL, Schetter C, Krieg AM. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 2004;113:212–223.
- [296] Vranken J. Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2012;12:304–314.
- [297] De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2004;491:137–148.
- [298] Wagner R, Janjigian M, Myers RR. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF- α expression. *Pain* 1998;74:35–42.
- [299] Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 1979;7:103–113.
- [300] Wall PD, Scadding JW, Tomkiewicz MM. The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 1979;6:175–182.
- [301] Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int* 2018;2018.
- [302] Wang QR, Wang BH, Huang YH, Dai G, Li, Wei M, Yan Q. Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells. *J Cell Biochem* 2008;103:21–29.
- [303] Wang RR, Lou GD, Yu J, Hu TT, Hou WW, Chen Z, Zhang SH, Seltzer Z. Oral Administration of Pregabalin in Rats before or after Nerve Injury Partially Prevents Spontaneous Neuropathic Pain and Long Outlasts the Treatment Period. *Pharmacology* 2016;97:251–258.
- [304] Wang T, Ito A, Aoyama T, Nakahara R, Nakahata A, Ji X, Zhang J, Kawai H, Kuroki H. Functional evaluation outcomes correlate with histomorphometric changes in the rat sciatic nerve crush injury model: A comparison between sciatic functional index and kinematic analysis. *PLoS One* 2018;13.
- [305] Wang X, Zhang J, Eberhart D, Urban R, Meda K, Solorzano C, Yamanaka H, Rice D, Basbaum AI. Excitatory superficial dorsal horn interneurons are functionally heterogeneous and required for the full behavioral expression of pain and itch. *Neuron* 2013;78:312.
- [306] Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in

- immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014;15:1009–1016.
- [307] Warwick R, Hanani M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain* 2013;17:571–580.
- [308] Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS One* 2010;5.
- [309] Watkins LR, Maier SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:973–985.
- [310] Watson JC, Sandroni P. Central Neuropathic Pain Syndromes. *Mayo Clin Proc* 2016;91:372–385.
- [311] Wei F, Guo W, Zou S, Ren K, Dubner R. Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. *J Neurosci* 2008;28:10482–10495.
- [312] Wei XH, Zang Y, Wu CY, Xu JT, Xin WJ, Liu XG. Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. *Exp Neurol* 2007;205:471–484.
- [313] Wei Z, Fei Y, Su W, Chen G. Emerging role of schwann cells in neuropathic pain: Receptors, glial mediators and myelination. *Front Cell Neurosci* 2019;13:116.
- [314] Wercberger R, Basbaum AI. Spinal cord projection neurons: a superficial, and also deep, analysis. *Curr Opin Physiol* 2019;11:109.
- [315] Wharton K, Derynck R. TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development* 2009;136:3691–3697. doi:10.1242/DEV.040584.
- [316] White FA, Jung H, Miller RJ. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20151–20158.
- [317] Wiffen PJ, Derry S, Bell RF, Rice ASC, Tölle TR, Phillips T, Moore RA. Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane database Syst Rev* 2017;6.
- [318] Wild KD, Bian D, Zhu D, Davis J, Bannon AW, Zhang TJ, Louis JC. Antibodies to nerve growth factor reverse established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:282–287.
- [319] Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the Pain System and of the Pathways That Modulate Pain. *J Clin Neurophysiol* 1997;14:2.
- [320] Wu L, Han D, Jiang J, Xie X, Zhao X, Ke T, Zhao W, Liu L, Zhao W. Co-transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells and monocytes in the brain stem to repair the facial nerve axotomy. *Eur J Histochem* 2020;64:22–33.

- [321] Xie W, Strong JA, Zhang JM. Localized sympathectomy reduces peripheral nerve regeneration and pain behaviors in two rat neuropathic pain models. *Pain* 2020;161:1925.
- [322] Xu N, Tang XH, Pan W, Xie ZM, Zhang GF, Ji MH, Yang JJ, Zhou MT, Zhou ZQ. Spared Nerve Injury Increases the Expression of Microglia M1 Markers in the Prefrontal Cortex of Rats and Provokes Depression-Like Behaviors. *Front Neurosci* 2017;11.
- [323] Xu Q, Zhang M, Liu J LW. Intrathecal transplantation of neural stem cells appears to alleviate neuropathic pain in rats through release of GDNF. *Ann Clin Lab Sci* 2013;43:154–162.
- [324] Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M. beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* 2009;65:218–225.
- [325] Yam MF, Loh YC, Tan CS, Adam SK, Manan NA, Basir R. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *Int J Mol Sci* 2018;19.
- [326] Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, Katagi M, Oi J, Urabe H, Sanada M, Kawai H, Chan L, Yasuda H, Maegawa H, Kimura H. Inactivation of TNF- α ameliorates diabetic neuropathy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301.
- [327] Yang B, Strong R, Sharma S, Brennehan M, Mallikarjunarao K, Xi X, Grotta JC, Aronowski J, Savitz SI. Therapeutic time window and dose response of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. *J Neurosci Res* 2011;89:833–839.
- [328] Yang F, Leung VYL, Luk KDK, Chan D, Cheung KMC. Mesenchymal stem cells arrest intervertebral disc degeneration through chondrocytic differentiation and stimulation of endogenous cells. *Mol Ther* 2009;17:1959–1966.
- [329] Yang H, de Jong JW, Cerniauskas I, Peck JR, Lim BK, Gong H, Fields HL, Lammel S. Pain modulates dopamine neurons via a spinal–parabrachial–mesencephalic circuit. *Nat Neurosci* 2021 2410 2021;24:1402–1413.
- [330] Ydens E, Cauwels A, Asselbergh B, Goethals S, Peeraer L, Lornet G, Almeida-Souza L, Van Ginderachter JA, Timmerman V, Janssens S. Acute injury in the peripheral nervous system triggers an alternative macrophage response. *J Neuroinflammation* 2012;9:176.
- [331] Yen CT, Lu PL. Thalamus and pain. *Acta Anaesthesiol Taiwanica* 2013;51:73–80.
- [332] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune

- regulation. *Nat Rev Immunol* 2007 76 2007;7:454–465.
- [333] Yu X, Liu H, Hamel KA, Morvan MG, Yu S, Leff J, Guan Z, Braz JM, Basbaum AI. Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nat Commun* 2020 111 2020;11:1–12.
- [334] Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 2012;32:6391–6410.
- [335] Zamboni L, DeMartino C. Buffered picric-acid formaldehyde: a new rapid fixation for electron microscopy. *J Cell Biol* 1967;35:1–10.
- [336] Zhang H, Nei H, Dougherty PM. A p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of disinhibition in spinal synaptic transmission induced by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci* 2010;30:12844–12855.
- [337] Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RCH. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004;13:263–271.
- [338] Zhao G, Jin H, Li J, Su B, Du X, Kang Y, Wang X, Wang B. PyNTTTTGT prototype oligonucleotide IMT504, a novel effective adjuvant of the FMDV DNA vaccine. *Viral Immunol* 2009;22:131–138.
- [339] Zhou Q, Bao Y, Zhang X, Zeng L, Wang L, Wang J, Jiang W. Optimal interval for hot water immersion tail-flick test in rats. *Acta Neuropsychiatr* 2014;26:218–222.
- [340] Zieglgänsberger W. Substance P and pain chronicity. *Cell Tissue Res* 2019;375:227.
- [341] Zorzopulos J, Opal SM, Hernando-Insúa A, Rodriguez JM, Elías F, Fló J, López RA, Chasseing NA, Lux-Lantos VA, Coronel MF, Franco R, Montaner AD, Horn DL. Immunomodulatory oligonucleotide IMT504: Effects on mesenchymal stem cells as a first-in-class immunoprotective/immunoregenerative therapy. *World J Stem Cells* 2017;9:45.