

UCH-FC
Biotecnología
R 893
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

**“CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE UN RATÓN TRANSGÉNICO
CONDICIONAL QUE SOBREEXPRESA TNF- α ESPECÍFICAMENTE EN TEJIDO
NOCICEPTIVO Y SU IMPLICANCIA EN LA HOMEOSTASIS INMUNE SISTÉMICA”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**.

PABLO SEBASTIÁN ROZAS ROJAS

Marzo – 2014

Santiago - Chile

Director del Seminario de Título: Dr. Elías Utreras Puratich

Co-director del Seminario de Título: Dr. Christian González Billaut



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el Sr. Pablo Sebastián Rozas Rojas,

“Caracterización genotípica y fenotípica de un ratón transgénico condicional que sobreexpresa TNF- α específicamente en tejido nociceptivo y su implicancia en la homeostasis inmune sistémica”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**.

Dr. Elías Utreras Puratich

Director Seminario de Título

Dr. Christian González Billault

Co-director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Álvaro Glavic Maurer

Presidente Comisión

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Evaluador

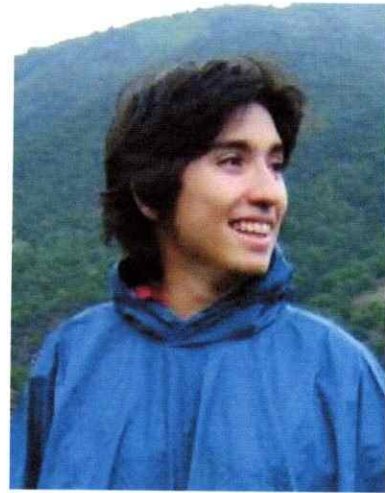
Santiago, Marzo de 2014

*...que hay más para ver que lo que puedo ver, que hay más para expresar que lo que
puedo decir, pero aún más para mantenerme en silencio.*

Tito Ureta Aravena

Biografía

Corría el viernes 2 de febrero de 1990 y salí del vientre de mi madre con el cañonazo de las 12 en Santiago de Chile. Crecí en el barrio San Isidro en Santiago Centro. Un barrio que me marcó con su plaza, el imponente templo de San Isidro y por sobretodo, por su calidez de "barrio antiguo", donde todos los vecinos compartían. Un barrio de esos que no hacen ahora.



Recibí buena educación tanto en mi hogar como en mi colegio, el colegio San Ignacio, al que asistí desde kínder a cuarto medio. Algunas personas se espantan cuando escuchan esto, preguntándome cómo "se aguanta" estar 13 años en colegio de curas y solo de hombres. La verdad es que no es nada terrible. Yo lo pasé de lo más bien. Ganando una vez el premio al mejor compañero y una acuarela en un bingo. Además, los jesuitas son lo más parecido a "lo liberal" dentro de la iglesia católica. Estoy muy agradecido de haber podido estudiar ahí. En todos esos años aprendí algo que no está en los libros, que no está en la mayoría de los hogares de hoy en día y que no está en el plan educacional de nuestra sociedad: recibí una educación que ponía énfasis en mi rol para los demás por sobre mi éxito personal. Uno alcanza la felicidad "con" los demás, no "sobre" los demás.

Llegó el momento de tomar una decisión para estudiar en la universidad. Por un momento se me pasó por la cabeza estudiar filosofía. Pero pensé que como biólogo también se podía "hacer filosofía". Así que, como la mayoría de los estudiantes de educación secundaria con inclinaciones biológicas en este país, postulé para estudiar

medicina. No obtuve el puntaje que esperaba. Quedé primero en lista de espera para medicina en la USACH. Podrán suponer bien que la lista de espera no corrió. Siete años después, puedo decir que ese episodio fue el fracaso más bonito que he tenido. Me matriculé en la rimbombante carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

En estos 6 años de entrenamiento, me encontré con un mundo fascinante y atrayente... ¡En la senda de la ciencia el principal motor era la curiosidad! Los primeros años pensaba: ¿me pagarán por satisfacer mi curiosidad? Sonaba muy bueno para ser verdad. Ahora me doy cuenta que si era verdad, solo que con muchos obstáculos burocráticos. Pero no me puedo quejar, de esos hay en todos lados. Al pensar en la idea de dedicar mi vida a criticar lo que pienso, lo que digo, lo que escucho, lo que leo, hasta mis creencias más profundas ... a conocer por conocer, a construir conocimiento y con eso construir sociedad... algo hizo "click" en mi cabeza. Ya al tercer año de carrera pensé y, más importante aún, sentí que éste era mi camino. Independiente de la carrera que uno pudiera elegir, el pensamiento científico es una forma de vivir la vida, y es la vida que quiero vivir.

Ahora estoy a las puertas de conseguir mi título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. La verdad es que no lo veo como una meta. Para mí, es un medio más para utilizar en la búsqueda de un fin mayor: el conocer.

Agradecimientos

Al momento de agradecer siempre se hace difícil escoger las palabras y pasajes correctos. También se hace muy difícil evitar que "gracias" sea la palabra más utilizada. Sin duda muchos han aportando directa o indirectamente a completar esta etapa de mi vida. A cada uno de ustedes le doy las gracias. Gracias por el consejo, la sonrisa, los malos ratos, los buenos ratos, la compañía, el cariño, las críticas destructivas y constructivas, los enojos, las palabras y las emociones. Todo me ayudó a crecer y a formar lo que soy ahora.

Gracias padre y madre, por darme lo más valioso que tuve y que tengo, la oportunidad de educarme, de leer y de conocer. Ninguna de ellas sería útil si no fuera por la gran formación valórica en la que pusieron tanto empeño en mis hermanos y en mí. Quiero agradecerle también, a mi segunda madre, la Wili, por pegarme con la cuchara de palo cuando me portaba mal y por enseñarme que no hay mejor arroz graneado que el suyo. ¡Gracias!

Gracias Dani y Marti, por darme el privilegio de que mi vida tenga un sentido transcendental. Agradecerles también al Tonel y al Q', mis hermanos. Ustedes forjaron gran parte de mi carácter y personalidad. A ustedes les debo mucho. Gracias por enseñarme y compartir la pasión por Colo Colo. Gracias por su ropa, sus juguetes y por ser los chivos expiatorios de las travesuras de la niñez: ¡las ventajas de ser el hermano menor! Y hablando de agradecimientos y ventajas de ser el hermano menor, les agradezco desde ya las mesadas con las que ayudarán a vivir a este pobre científico.

Quiero agradecerles a todos mis amigos. A los cabros del colegio: al Naj, Rommel, Pato, Huaso, Camilo, Falcón, Melo, David, Gastón y tantos otros, por las completadas bailables, los saumerios reflexivos y las veladas argumentativas. A pesar de que el tiempo se encarga de diversificar nuestros caminos, siempre se me sale una sonrisa cuando escucho de ustedes, de sus alegrías y sus triunfos.

Agradecerle también a los "bistek", compañeros rutinarios en el entretenido entrenamiento científico en nuestra querida Facultad. Gracias a los que fueron y los que aun son. ¡Los quiero a todos por igual! Gracias por su cariño siempre disponible. Eso ha sido muy importante para mí. Fuimos testigos privilegiados de cómo unos pequeñines desorientados se convirtieron en unos no tan pequeñines algo menos desorientados. Este es el hito que marca el fin del principio. Adonde sea que nos lleve la ciencia, la nutrición, la abogacía, la medicina, la ingeniería, la medicina veterinaria, etc. espero que se acuerden de los buenos días del chimbombo y el pool.

Una mención especial a los Anners, por defender a la Diosa, los colores y el emblema. También estoy muy agradecido de que Camilo y Raza hayan dejado la carrera, con su ausencia mi promedio subió más de 5 décimas. Vale cabros, ahora puedo postular a las becas.

Quiero agradecerle especialmente a mi compañera de ya casi 5 años, casi toda la carrera, Silvi. Cada uno ha sido parte importante del otro. Me has enseñado a mejorar como persona, mostrándome lo peor y reforzando lo mejor de mí. Gracias por estar ahí siempre. Gracias por corregir el escrito. Gracias por ser esa mujer llevada de sus ideas, apasionada y diversa. Tu perseverancia en áreas disímiles, aparentemente, como la

música, la danza y la ciencia son un ejemplo que me motiva a seguir trabajando tanto en la ciencia como en mis intentos artísticos (la mayoría fallidos).

Gracias a la gente del PDI en la Facultad de Medicina. En especial a Diego y Alex por su labor formativa en mis primeros pasos como pequeño saltamontes de laboratorio. No necesité más tiempo del que estuve ahí para darme cuenta que son excelentes profesionales y formadores. Gracias.

Gracias a mis tutores, Elías y Christian por las oportunidades brindadas, las críticas constructivas en esta tesis y por ser parte de un paso fundamental en mi formación profesional. A Lazcano y la Monse, gracias por compartir la gran tarea de empezar una línea de investigación en un naciente laboratorio. No fue fácil, pero lo conseguimos. Gracias a la gente del Cenedyn. A Bodales, Mauro, Muñón, Deivid, Bórtex, Henríquez, Erick, Wilson y al Seba. Por su apoyo, por las conversaciones, la ayuda experimental, los consejos y las risas. Quiero agradecerle de forma especial y cariñosa a la Cristi, por tus retos, por las tallas, por la compañía, por hacer de la vida en el lab una vida mejor y por ser la primera en enseñarme el trabajo de laboratorio hace algunos años. Espero no olvidarlo hasta que haya perdido muchas neuronas. Sin ti el Cenedyn no sería lo mismo.

Gracias a la profe María Rosa Bono por los experimentos de CBA y sus comentarios sobre los resultados. Gracias Deivid por la ayuda con las imágenes del confocal. ¡Gracias Sandrilla por tu ayuda con las tinciones histológicas!

Finalmente quiero agradecer a David Arellano por su legado, su grandeza y, sobretodo, por su sabiduría. Gracias a Colo Colo por tantas alegrías y tantas penas que nos han recordado la importancia de la humildad. Gracias por darle sentido a la historia de miles.

Índice de contenido

Índice de Figuras	xii
Índice de Tablas	xiv
Listado de abreviaturas	xv
1 Resumen.....	1
2 Abstract.....	3
3 Introducción	5
3.1 El dolor como fenómeno biológico.....	5
3.2 El dolor inflamatorio.....	10
3.3 Participación de TNF- α en dolor inflamatorio.....	13
3.4 Bases moleculares del dolor.....	16
3.5 Propuesta de un nuevo modelo murino de sobreexpresión de TNF- α tejido específica para el estudio de la función de Cdk5 en dolor.....	19
3.6 Implicancias inmunes del modelo murino propuesto	21
4 Hipótesis	23
5 Objetivos	23
5.1 Objetivo general:	23
5.2 Objetivos específicos:	23
6 Materiales y métodos.....	24
6.1 Materiales	24
6.1.1 Animales transgénicos.....	24

6.1.2	Líneas celulares	25
6.2	Métodos.....	25
6.2.1	Transfección de la línea celular	25
6.2.2	Generación de un ratón transgénico condicional para TNF- α	26
6.2.3	Obtención de DNA genómico	27
6.2.4	Genotipificación de la progenie mediante PCR.....	27
6.2.5	Análisis de ganancia de peso	28
6.2.6	Obtención de los ganglios trigeminales y otros tejidos de interés	29
6.2.7	Obtención de suero sanguíneo.....	29
6.2.8	Extracción de proteínas	30
6.2.9	SDS-PAGE y Western blot	30
6.2.10	Extracción de RNA y tratamiento con DNAasa	32
6.2.11	RT-PCR.....	32
6.2.12	ELISA anti TNF- α	35
6.2.13	Histología de ganglios trigeminales.....	35
6.2.14	Cytometric Bead Array.....	38
6.2.15	Análisis estadísticos.....	38
7	Resultados	39
7.1	Caracterización <i>in vitro</i> del vector TNF- α -pCle	39
7.2	Generación de la línea transgénica condicional TNF- α -pCle x SNS-Cre.....	41

7.3	Confirmación de la sobreexpresión de TNF- α en los ganglios trigeminales	45
7.4	Evaluación del potencial inflamatorio de los ratones cTg en los ganglios trigeminales	54
7.5	Impacto de la sobreexpresión de TNF- α en los TG sobre la vía de Cdk5/p35 ..	58
7.6	Evaluación del potencial inflamatorio sistémico del ratón cTg.....	62
8	Discusión y conclusiones	67
8.1	Sobreexpresión de TNF- α <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizando el vector TNF- α -pCie	67
8.2	Desbalance del perfil inflamatorio en los ganglios trigeminales de los ratones cTg	71
8.3	Impacto de la sobreexpresión local de TNF- α en la homeostasis inmune sistémica.....	78
9	Referencias.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de neuronas nociceptivas y algunos canales iónicos responsables de la transducción nociceptiva.....	7
Figura 2. Esquema de la morfología pseudounipolar de las neuronas nociceptivas y las células adyacentes.....	8
Figura 3. Dermatoma y esquema de la disposición anatómica de los ganglios trigeminales murinos.....	9
Figura 4. Mediadores celulares y moleculares del dolor inflamatorio.....	12
Figura 5. Esquema del vector pCle y la estrategia utilizada para sobreexpresar TNF- α dependientemente de Cre.....	21
Figura 6. Generación del ratón transgénico condicional para TNF- α en tejido nociceptivo.....	26
Figura 7. Evaluación de la expresión <i>in vitro</i> del vector TNF- α -pCle.....	40
Figura 8. Genotipificación de la descendencia obtenida del cruce entre ratones TNF- α -pCle y SNS-Cre.....	42
Figura 9. Comparación fenotípica y patrón de ganancia de peso de los ratones controles y cTg.....	44
Figura 10. Estructura y poblaciones celulares del ganglio trigémino.....	46
Figura 11. Expresión relativa de mRNA de TNF- α en los TG a 1 y 3 meses de edad..	49
Figura 12. Concentración de TNF- α en los TG a 1 y 3 meses de edad.....	51

Figura 13. Comparación cualitativa de la inmunoreactividad contra TNF- α en el ganglio trigémino.....	53
Figura 14. Perfil de expresión de mRNA de mediadores inflamatorios en TG y cerebro de ratones a los 3 meses de edad.....	55
Figura 15. Comparación cualitativa de la inmunoreactividad contra Iba1 en el ganglio trigémino.....	57
Figura 16. Expresión Cdk5 y de p35 en los TG en ratones cTg y controles a 1 y 3 meses de edad.....	59
Figura 17. Comparación cualitativa de la inmunoreactividad contra Cdk5 y p35 en TG de ratones cTg y controles.....	61
Figura 18. Concentración sérica de TNF- α en los ratones cTg y controles medida por ELISA a 1 y 3 meses de edad.....	63
Figura 19. Concentración sérica de varios mediadores inflamatorios a los 3 meses de edad, determinada por CBA.....	65

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencia de partidores utilizados para RT-PCR.....	34
--	----

Listado de abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
bp	Par de bases (<i>base pair</i>)
CamK-II	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
Cdk5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
cDNA	DNA complementario
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
CMV	Promotor de citomegalovirus
cTg	Transgénico condicional (<i>conditional transgenic</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOR	<i>Delta opioid receptor</i>
DRG	Ganglios de la raíz dorsal (<i>Dorsal root ganglia</i>)
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
Egr1	<i>Early growth response protein 1</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
HIP1r	<i>Huntingtin interacting protein 1 related</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IBA1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>

IgG	Inmunoglobulina de isotipo G
IKK	<i>IκB kinase</i>
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
kDa	KiloDalton
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolisacárido
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
OSM	Oncostatina M
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PI3-K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
polyA	Secuencia de poliadelinación
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa

SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SEM	Error estándar del promedio
SFB	Suero fetal bovino
TACE	<i>TNF-α-converting enzyme</i>
TAE	Tris acetato EDTA
TBS-T	Buffer Tris salino más tween 20
TEMED	Tetraetilmetiletilendiamina
TG	Ganglios trigeminales (<i>Trigeminal ganglia</i>)
Tm	Temperatura de denaturación (<i>Melting temperature</i>)
TNFR1	<i>TNF-α receptor 1</i>
TNFR2	<i>TNF-α receptor 2</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α (<i>Tumor necrosis factor α</i>)
T-PER	<i>Tissue-protein extraction reagent</i>
TRPV1	<i>Transient receptor potential vanilloid 1</i>

1 Resumen

El dolor en la región de la boca, cara y parte de la cabeza, también conocido como dolor orofacial, codificado y conducido por las neuronas trigeminales, constituye un fenómeno sensorial complejo asociado a varias patologías tales como neuralgias del trigémino, migrañas y dolor dental. En el contexto del dolor inflamatorio, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), una importante citoquina pro-inflamatoria, juega un papel fundamental en este proceso. Las neuronas trigeminales expresan receptores para TNF- α y responden a esta citoquina sensibilizando los nociceptores, sin embargo el mecanismo aún no está totalmente dilucidado. Por esta razón, nuestro grupo ha generado un ratón transgénico condicional (cTg) el cual sobreexpresa TNF- α específicamente en tejido nociceptivo. Por otro lado, anteriores estudios de nuestro laboratorio han establecido que la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) y su activador p35 cumplen un papel relevante en las vías de señalización del dolor, e interesantemente la actividad quinasa de Cdk5 es regulada por TNF- α *in vitro*. El objetivo de este Seminario de Título consiste en la caracterización genotípica y fenotípica y en la validación de este modelo animal a través de la confirmación de la sobreexpresión de TNF- α , evaluando su impacto en la homeostasis inmune local y sistémica para, en estudios posteriores, caracterizar la regulación *in vivo* de Cdk5 mediada por TNF- α y su implicancia en el dolor facial. Para esto, ratones transgénicos que expresan GFP flanqueado por sitios loxP seguido por la secuencia de TNF- α bajo el promotor de β -actina fueron cruzados con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor de SNS, específico de neuronas nociceptivas. Los ratones cTg y controles fueron genotipados a partir de DNA genómico con partidores

específicos para GFP y Cre mediante PCR. El peso corporal de los animales fue medido durante 3 meses sin encontrarse diferencias entre ratones cTg y controles. Se determinaron los niveles de TNF- α y de varios mediadores inflamatorios mediante RT-PCR y ELISA, a partir de ganglios trigeminales (TG) y de cerebro a 1 y 3 meses de edad. Los niveles de mRNA y de proteína de TNF- α fueron mayores a 1 y 3 meses de edad en los TG de los ratones cTg comparados con ratones controles. Asimismo, el nivel de los mRNA de IL-6 y MCP-1, moduladores inflamatorios relevantes en dolor, aumentaron en los TG de los ratones cTg, mientras que no hubo cambio en tejido cerebral. Además, se evaluaron los niveles de Cdk5 y p35 mediante RT-PCR y Western blot. Los niveles de mRNA de p35 no cambiaron en los ratones cTg, sin embargo la expresión proteica de p35 muestra una tendencia al alza a 1 y 3 meses de edad en ratones cTg comparados con ratones controles. Por su parte, los niveles de mRNA y proteínas de Cdk5 no cambiaron en estos animales. Paralelamente, se evaluó el perfil inflamatorio sistémico a partir de suero sanguíneo por medio de ELISA y Cytometric Bead Array (CBA). Aunque los niveles proteicos de TNF- α fueron mayores en los ratones cTg comparados con los controles a los 3 meses de edad, esta concentración está dentro de un rango fisiológico. Además, la sobreexpresión de TNF- α no cambia la concentración de seis mediadores inflamatorios críticos a nivel sistémico en ratones cTg comparado con los controles medido por CBA, sugiriendo que la homeostasis sistémica no fue alterada. En conclusión, la caracterización de los ratones cTg realizada en este Seminario de Título valida nuestro nuevo modelo murino para el estudio de las interacciones neuro-inmunes relacionadas con el fenómeno del dolor u otros fenómenos de interés gatillados por TNF- α en el tejido nociceptivo.

2 Abstract

Pain in the mouth, face and part of the head, also known as orofacial pain, encoded and transmitted by trigeminal neurons, is a complex sensory phenomenon linked to several pathologies like trigeminal neuralgias, migraines and tooth pain. In the context of inflammatory pain, tumor necrosis factor α (TNF- α), an important proinflammatory cytokine, plays a key role during this process. Trigeminal neurons express TNF- α receptors and respond to TNF- α sensitizing the nociceptors, however the mechanism is not fully elucidated. For this reason, our group has generated a conditional transgenic mouse (cTg), which overexpresses TNF- α specifically in nociceptive tissues. On other hand, previous works from our group have established that cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and its activator p35 play a relevant role in pain signaling, and interestingly, TNF- α regulates Cdk5 kinase activity *in vitro*. The aim of this Degree Seminar consists in the genotypic and phenotypic characterization and validation of this mouse model through the confirmation of TNF- α overexpression in the trigeminal ganglia (TG), assessing its impact in the local and systemic immune homeostasis in order to characterize, in future studies, the *in vivo* TNF- α -mediated regulation of Cdk5 in the orofacial pain. For this purpose, transgenic mice that express floxed GFP sequence followed by the TNF- α sequence under the β -actin promoter were crossed with transgenic mice that express Cre recombinase under the SNS promoter, specific for nociceptive neurons. The cTg and control mice were genotyped by PCR using genomic DNA and specific primers for GFP and Cre sequences. The body weight of animals was measured for 3 months without finding any differences between cTg and control mice. The expression levels of TNF- α and several inflammatory mediators were

measured by RT-PCR and ELISA from TG and brains at 1 and 3 months-old mice. The mRNA and protein levels of TNF- α were increased at 1 and 3 months-old on cTg mice as compared to controls mice. Also, mRNA levels of IL-6 and MCP-1, relevant inflammatory mediators in pain, were increased in the TG of cTg mice, while there was no changes in the brain tissues of these mice. Moreover, Cdk5 and p35 levels were measured by RT-PCR and Western blot. The mRNA levels of p35 did not change in cTg, however, its protein levels shown a clear upward trend in cTg mice at 1 and 3 months-old. On the other hand, mRNA and protein levels of Cdk5 did not change in cTg. At the same time, the systemic inflammatory profile was assessed from blood serum by ELISA and Cytometric Bead Array (CBA). Although the TNF- α protein levels were increased in cTg mice compared to control mice at 3 months old, its concentration was within a physiological range. Moreover, TNF- α overexpression do not change the concentration of six critical systemic inflammatory mediators measured in cTg and control mice by CBA suggesting that systemic immune homeostasis was not altered. In conclusion, the characterization of cTg mice done in this Degree Seminar validates this new mouse model for the research of neuro-immune interactions related to the study of pain or in another interesting TNF- α -driven phenomena in nociceptive tissue.

3 Introducción

En el presente Seminario de Título se caracterizó genética y fenotípicamente un modelo murino de sobreexpresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en la región orofacial, específicamente en neuronas nociceptivas, las cuales están encargadas de censar y transmitir los estímulos nocivos hacia el sistema nervioso central. El fin último de la línea de investigación en la que se enmarca este Seminario de Título, es el estudio de la regulación mediada por TNF- α de la actividad de la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) y su función en las vías de señalización del dolor facial. Para abordar esta temática, es necesario entender el fenómeno biológico del dolor, la arquitectura celular del tejido nociceptivo y la importancia de su estudio.

3.1 El dolor como fenómeno biológico

El fenómeno del dolor se considera como una sensación de malestar debido a una situación físicamente peligrosa y/o sufrimiento psicológico (International Association for the Study of Pain, IASP, 2012). Por lo tanto, constituye un fenómeno complejo con una componente tanto sensorial, dada por el funcionamiento del sistema nervioso y otros tejidos, como por una componente psicológica, dada por la experiencia y el estado mental del individuo. Se piensa que la función evolutiva del dolor correspondería a un mecanismo de protección frente a algún estímulo nocivo (Scholz y Woolf 2002). Además de la función protectora, también tiene una función reparadora al sensibilizar tejidos ya dañados, disminuyendo así su exposición frente a nuevos estímulos perjudiciales (Woolf 2010). La prevalencia del dolor varía según el país y el tipo de estudio, pero se estima que entre el 12 y el 80% de la población adulta mundial ha

experimentado algún tipo de dolor crónico en algún momento de su vida (Abu-Saad Huijjer 2010). Además, el dolor está asociado a varias patologías de alta prevalencia a nivel mundial, como el cáncer, la diabetes y las enfermedades coronarias (Kuner 2010). Además, en determinados casos la sensación dolorosa puede ser alterada generando hiperalgesia (una sensación aumentada de dolor frente a estímulos nocivos); hipoalgesia (una sensación disminuida de dolor frente a estímulos nocivos); o alodinia (una sensación de dolor provocada por estímulos que no son nocivos) (www.IASP-pain.org).

A nivel fisiológico, el primer evento durante el fenómeno doloroso es llevado a cabo por las neuronas nociceptivas especializadas del sistema nervioso periférico, las cuales expresan distintos tipos de receptores y canales iónicos, modulados por estímulos mecánicos, químicos, térmicos o por combinaciones de estos, denominados nociceptores, los cuales transducen estos estímulos permitiendo la despolarización neuronal (Scholz y Woolf 2002) (Figura 1). En general, estas neuronas se caracterizan por poseer un alto umbral de respuesta frente a estos estímulos, gatillando un potencial de acción en caso de eventos nocivos potencialmente peligrosos (Basbaum y col. 2009).

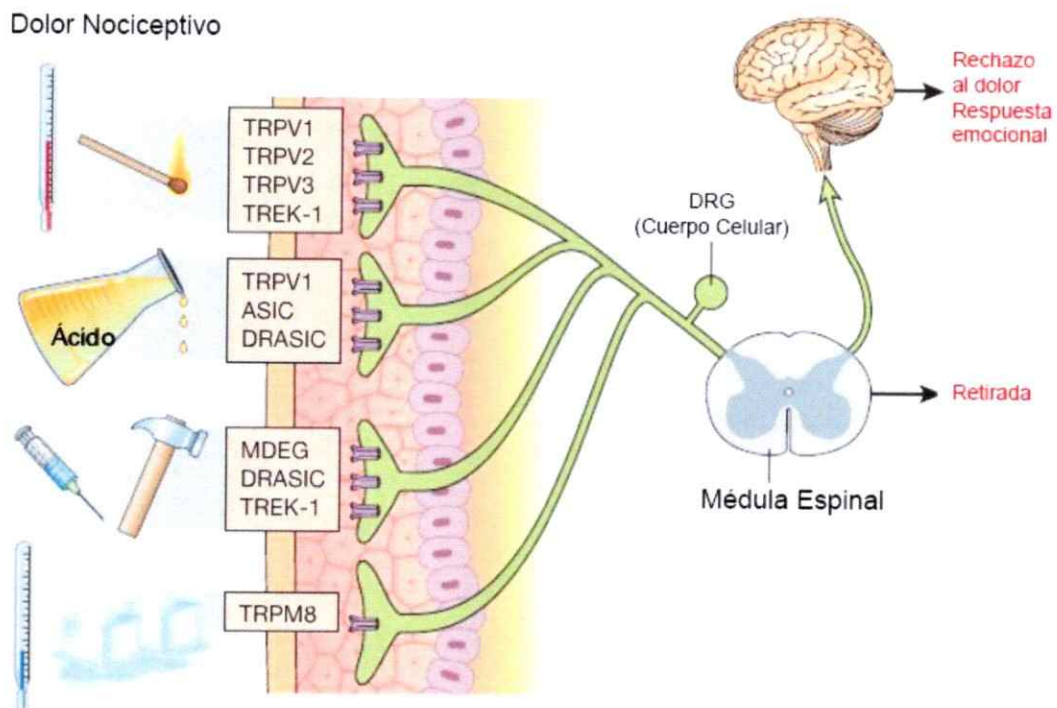


Figura 1. Esquema de neuronas nociceptivas y algunos canales iónicos responsables de la transducción nociceptiva. Los canales iónicos (en morado) de las neuronas nociceptivas (en verde) pueden responder cuando censan estímulos calóricos (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TREK-1), químicos (TRPV1, ASIC, DRASIC), físicos (MDEG, DRASIC, TREK-1) o bajas temperaturas (TRPM8), transformándolos en un potencial de acción que viaja por la neurona nociceptiva hasta la médula espinal y posteriormente a los centros superiores del cerebro. DRG: ganglio de la raíz dorsal. Modificado de (Scholz y Woolf 2002).

La población de neuronas nociceptivas es heterogénea en cuanto a tamaños celulares y a los canales que expresan en sus terminales nerviosos, lo que otorga distintas propiedades electrofisiológicas y especificidad frente a determinados tipos de estímulos (Scholz y Woolf 2002; Basbaum y col. 2009; Hendrich y col. 2012). Sin embargo, la morfología de las neuronas nociceptivas es común para todas ellas y se denomina pseudounipolar, consistente en un axón que emerge desde el cuerpo celular

y que, posteriormente, se bifurca generando dos terminales axonales a partir de un solo axón. Uno de ellos se establece como terminal libre en la periferia, ya sea subcutánea o visceralmente, y el otro terminal establece una sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal o en el tallo encefálico con las denominadas neuronas de segundo orden (Mantyh 2006) (Figura 2).

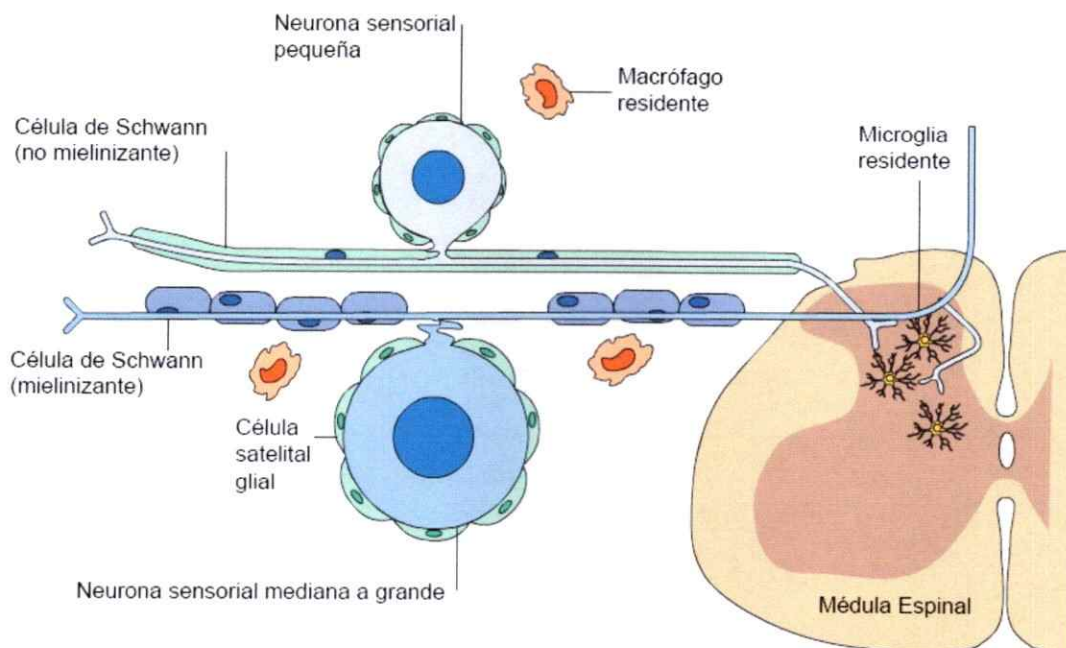


Figura 2. Esquema de la morfología pseudounipolar de las neuronas nociceptivas y las células adyacentes. En la periferia, rodeando los somas neuronales se encuentran células satelitales gliales. Rodeando los axones hay células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes dependiendo del tipo de neurona. Células del sistema inmune también se encuentran en las cercanías tanto de los somas como de los axones. En el asta dorsal de la médula espinal ocurre la primera sinapsis de los nociceptores con neuronas de segundo orden que transmiten el impulso nervioso hasta los centros superiores del cerebro. Modificado de (Mantyh 2006).

Los cuerpos neuronales de las neuronas nociceptivas se agrupan en tejidos denominados ganglios nerviosos, los cuales están envueltos en tejido conectivo (Kidd y Urban 2001; Basbaum y col. 2009). Según su disposición anatómica y las regiones corporales que son inervadas por sus neuronas nociceptivas, podemos discriminar entre dos tipos de ganglios nerviosos: los ganglios trigeminales (TG, por las siglas en inglés de *trigeminal ganglia*), encargados de censar y transmitir los estímulos recibidos en la región de la cara y parte de la cabeza (Figura 3); y los ganglios de la raíz dorsal (DRG, por las siglas en inglés de *dorsal root ganglia*), encargados de censar y transmitir los estímulos recibidos en las regiones del torso, vísceras y extremidades.

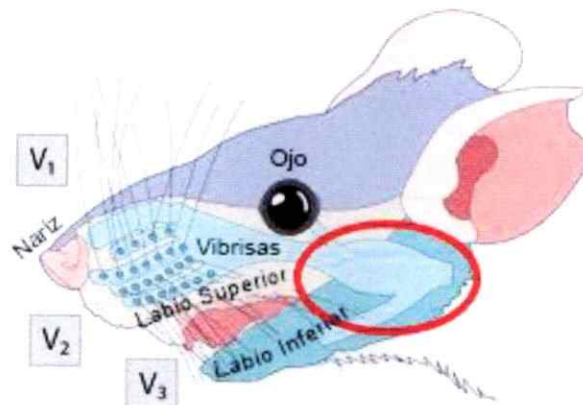


Figura 3. Dermatoma y esquema de la disposición anatómica de los ganglios trigeminales murinos.

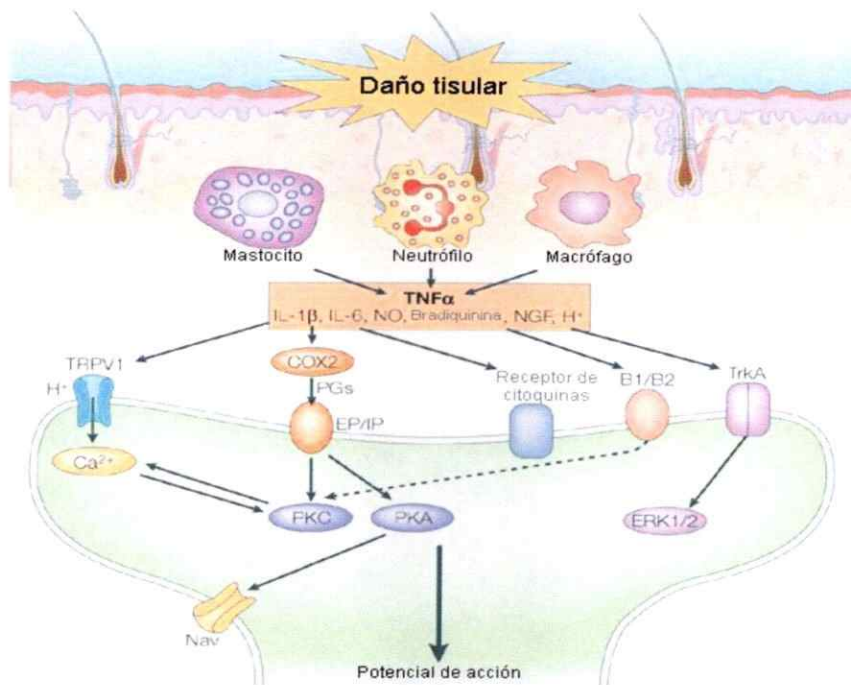
Los TG (Solo se dibuja un ganglio encerrado en rojo para simplificar el esquema), se encuentran ubicados uno a la izquierda y otro a la derecha de la parte baja de la bóveda craneal de donde se proyectan nervios hacia la cara y parte de la cabeza. En el esquema se presenta un dermatoma (superficies de piel inervadas por un tejido nervioso) de los TG donde se señalan las zonas V1 (dermatoma morado), V2 (dermatoma beige) y V3 (dermatoma azul), correspondientes a las ramas oftálmica, maxilar y mandibular del ganglio trigémino, respectivamente. Las agrupaciones de los somas neuronales dentro del ganglio trigémino cuyos axones dan origen a las distintas ramas reciben la misma denominación de V1, V2 y V3. Modificado de recurso online <http://picsbox.biz/key/rat%20trigeminal%20ganglion#>, visitado el 6 de Diciembre de 2013.

El presente Seminario de Título está enfocado en la caracterización de un nuevo modelo animal para el estudio del dolor inflamatorio en la región orofacial. El dolor orofacial está asociado a varias patologías, tales como los dolores de cabezas, migrañas, neuralgias, dolor dental, malestares temporal-mandibulares, dolor neoplásico y dolor idiopático (Benoliel y col. 2007; Shinal y Fillingim 2007). Las neuronas nociceptivas de los TG son las encargadas de censar y codificar las señales dolorosas de esta región, intervando posteriormente al núcleo trigémino espinal, el cual a su vez transmite la información a través del tallo encefálico por la vía trigémino-talámica, pasando por el tálamo, y llegando finalmente a la corteza cerebral (Basbaum y col. 2009). Según la IASP, el dolor orofacial representa la segunda causa más común de consultas médicas, después del dolor de espalda. Solo en Chile, el diagnóstico de las patologías que tienen asociado dolor orofacial tiene una prevalencia del 8% (Zegpi y col. 2008). Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares y celulares del dolor orofacial tiene un alto impacto en nuestra sociedad dada la prevalencia de este tipo de dolor a nivel mundial. Además, la investigación en esta área es relevante para el desarrollo de nuevos fármacos y terapias para disminuir o eliminar el dolor.

3.2 El dolor inflamatorio

Durante un daño tisular, una infección bacteriana o viral, se desencadenan procesos inflamatorios mediados por diferentes tipos celulares localizados en las inmediaciones del evento. Estos liberan distintos moduladores inflamatorios tales como quimioquinas, purinas, protones, prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas, entre otros, formando lo que se ha denominado la "sopa inflamatoria" (Moalem y Tracey 2006; Basbaum y col. 2009) (Figura 4). Las fuentes celulares de estas moléculas en los tejidos periféricos son principalmente las células del sistema inmune

innato, destacándose macrófagos, mastocitos y neutrófilos (Moalem y Tracey 2006; Scholz y Woolf 2007; Serhan y col. 2008); y células gliales presentes en los tejidos del sistema nervioso periférico, principalmente células satelitales gliales (Scholz y Woolf 2007; Thalakoti y col. 2007). Asimismo, las neuronas nociceptivas expresan receptores para una gran variedad de mediadores inflamatorios, en particular para citoquinas y quimioquinas (Marchand y col. 2005; Basbaum y col. 2009). De esta forma se produce una conversación cruzada entre células gliales, inmunes y neuronas, como se ha descrito en varios modelos de dolor y de enfermedades neurodegenerativas (Hohlfeld 2008; Savarin y Bergmann 2008; Kerschensteiner y col. 2010). Esta conversación entre distintos tipos celulares mediada por citoquinas y quimioquinas son dependientes de las concentraciones, localización y duración de las señales moleculares intercelulares (Scholz y Woolf 2007).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Neuroscience

Figura 4. Mediadores celulares y moleculares del dolor inflamatorio. Frente a daño tisular o infecciones por patógenos, las células inmunes son reclutadas, liberando mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas, bradiquininas, óxido nítrico, protones, ATP, entre otros, que pueden actuar directamente sobre las neuronas nociceptivas (en verde) que expresen sus receptores modificando la cantidad, localización y funcionamiento de distintos canales involucrados en la nocicepción. Se destaca la acción de TNF- α por su contribución a la formación de la denominada "sopa inflamatoria". B1/B2: receptores de bradiquinina. COX2: ciclooxigenasa 2. ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares 1/2. EP/IP: receptores de prostaglandinas. Nav: canal de sodio. NGF: factor de crecimiento neuronal. NO: óxido nítrico. PGs: prostaglandinas. PKA: proteína quinasa A. PKC: proteína quinasa C. TrkA: receptor tirosina quinasa de NGF. Modificado de (Marchand y col. 2005).

Algunos de estos mediadores inflamatorios pueden actuar directa o indirectamente sobre los nociceptores, generando sensibilización de los terminales nerviosos que puede durar horas, días, o incluso meses en pos de mantener la zona



lesionada lejos de peligro mientras sana (Woolf 2010). Dentro de estos moduladores inflamatorios, las citoquinas juegan un papel fundamental en la sensación de dolor (Mika y col. 2013). Las citoquinas son proteínas solubles y de membrana de diversas familias, con efectos pleiotrópicos sobre distintas poblaciones celulares del sistema inmune y de otros tipos de tejidos, dependiendo del microcontexto tisular (Ellis y Bennett 2013). El efecto sobre las neuronas nociceptivas de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6, IL-12, etc; y de algunas quimioquinas, tales como MCP-1 (proteína quimioattractante de monocitos 1), fractalquina, *Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted* (RANTES), etc. ha sido ampliamente estudiado (White y col. 2005; Moalem y Tracey 2006). La mayoría de los efectos observados en distintos modelos corresponden a la modulación de los nociceptores y el aumento de la actividad eléctrica neuronal tanto *in vitro* como *in vivo*, causando hiperalgesia o alodinia *in vivo* (Obreja y col. 2002; Verri y col. 2005; Zelenka y col. 2005; Moalem y Tracey 2006; Basbaum y col. 2009). Por otro lado, la citoquina anti-inflamatoria IL-10 actúa disminuyendo la actividad de los nociceptores y provocando efectos analgésicos *in vivo* en modelos animales de inflamación inducida (Milligan y col. 2012; Wang y col. 2012).

3.3 Participación de TNF- α en dolor inflamatorio

Una de las citoquinas más estudiada en dolor es TNF- α (Utreras y col. 2009; Shen y col. 2012; Wu y col. 2013). Miembro de la familia de los TNF, esta proteína es producida inicialmente como una proteína de transmembrana de tipo II de 235 aminoácidos en ratones, principalmente por macrófagos activados, aunque también puede ser expresada por diversos linajes celulares incluyendo neuronas (Chu 2013).

Cuando se encuentra unido a membrana, TNF- α conforma homotrimeros estables que pueden sufrir un corte proteolítico por la enzima metaloproteasa convertidora de TNF- α (TACE, también conocida como ADAM17) liberando los monómeros de 17 kDa que pueden establecer un homotrimerio de 51 kDa, formando la citoquina bioactiva (Chu 2013). TNF- α puede unirse a su receptor TNFR1 (p55/60), expresado en casi todos los tipos celulares, o a su receptor TNFR2 (p75/80), expresado en células del sistema inmune y en algunas poblaciones neuronales (Zhang y col. 2011; Yang y col. 2012). TNFR1 puede unir tanto a la forma soluble como de membrana de TNF- α con igual eficacia, y posee dominios de muerte al que pueden unirse otras proteínas adaptadoras. Por otra parte, TNFR2 une con mayor eficacia la forma de membrana de TNF- α y no posee dominios de muerte. TNFR1 puede gatillar apoptosis o necrosis en determinados contextos. Sin embargo, la vía canónica de señalización de TNF- α consiste en la activación de cualquiera de estos receptores desencadenando la activación de IKK, promoviendo la fosforilación de p65, miembro del heterodímero del factor nuclear kappa B (NF- κ B), el cual se transloca al núcleo activando la transcripción de varias citoquinas, quimioquinas y factores de supervivencia celular. Además, TNF- α también puede inducir la activación de las MAP quinasas, ya sea de p38 y JNK (Chu 2013), o de ERK1/2 (Utreras y col. 2009).

Desde su descubrimiento en 1975 (Carswell y col. 1975), ha sido ampliamente estudiada la importancia de la citoquina TNF- α en diversos fenómenos inflamatorios (Tracey y col. 1986; Tracey y Cerami 1992; Chu 2013; Ramseyer y Garvin 2013). TNF- α participa en el inicio de las respuestas inmunes, activando a la mayoría de los tipos celulares, promoviendo la expresión de otras citoquinas y mediadores inflamatorios,

generando así un efecto sinérgico (Watkins y col. 1999; Cunha y col. 2005; Moalem y Tracey 2006; Chu 2013). Además, TNF- α es altamente tóxico a concentraciones elevadas y su acumulación en el torrente sanguíneo promueve reacciones agudas de inflamación sistémica que pueden finalizar en shock séptico (Tracey y Cerami 1992).

El papel de TNF- α en el fenómeno del dolor ha sido ampliamente estudiado utilizando diferentes modelos animales. Por ejemplo, la inyección directa de TNF- α en la pata de ratas produce hiperalgesia mecánica. Además, en el mismo trabajo, la inducción de inflamación con carragenina en la pata aumenta la expresión temprana de esta citoquina, en cambio el tratamiento con suero anti TNF- α disminuye la hiperalgesia (Cunha y col. 1992), sugiriendo que TNF- α es fundamental para el inicio y mantenimiento del dolor inflamatorio. Además, se ha reportado el efecto de TNF- α sobre la regulación del canal *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1), uno de los principales canales catiónicos involucrados en el fenómeno del dolor (Caterina y col. 1997). TNF- α puede sensibilizar directamente las neuronas nociceptivas a través del aumento transcripcional de TRPV1 (Hensellek y col. 2007). Similarmente, TNF- α aumenta la cantidad de neuronas que responden a capsaicina, agonista del canal TRPV1 y además aumenta la amplitud de las corrientes evocadas por este agonista en cultivos neuronales primarios de DRG (Nicol y col. 1997). Por otro lado, ratones knock-out para TNFR1 no presentan hiperalgesia en un modelo de dolor inflamatorio inducido por la inyección intraplantar de carragenina (Cunha y col. 2005). En este mismo estudio se comprobó que la expresión de TNF- α aumenta post-inyección, antecediendo al aumento de IL-1 β y la quimioquina derivada de queratinocitos (KC). Alternativamente, la ausencia de TNFR2 provoca analgesia térmica en un modelo de cáncer murino

(Constantin y col. 2008) y el tratamiento con anticuerpos contra TNF- α reduce la hiperalgesia térmica y mecánica en modelos de daño al nervio ciático en ratas (Sommer y col. 2001).

Específicamente en dolor orofacial, se ha reportado que TNF- α se encuentra sobreexpresado en los TG en un modelo murino de migraña hemipléjica familiar (Franceschini y col. 2013). Además, los niveles proteicos de TNF- α están aumentados en la vena yugular humana en los inicios de un ataque de migraña (Paola y col. 2006). Asimismo, TNF- α puede activar la vía de MAPK p38 en los nociceptores meníngeos, induciendo un estado de sensibilización en los TG que podría explicar las bases moleculares de la migraña (Zhang y col. 2011). La expresión neuronal del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés), involucrado directamente en dolores de cabeza y dolores temporal-mandibulares, puede ser gatillada directamente por TNF- α en neuronas trigeminales vía MAPK p38 (Bowen y col. 2006). En conjunto, todos estos antecedentes han establecido que TNF- α es una molécula clave en el inicio y la mantención de las interacciones neuro-inmunes que promueven la hiperalgesia durante el dolor inflamatorio.

3.4 Bases moleculares del dolor

Una vez que los estímulos nocivos son censados y transducidos por las neuronas nociceptivas, se gatilla un potencial de acción y paralelamente varias vías de transducción de señales son activadas o inhibidas dependiendo de la naturaleza del estímulo y/o la presencia de mediadores inflamatorios. La consecuencia de la activación de distintas vías de transducción de señales es la modulación de la actividad

de los terminales nerviosos a través del tráfico y las propiedades electrofisiológicas de los nociceptores (Kuner 2010). Interesantemente, se ha reportado la participación de varias proteínas quinasas en diversas cascadas de transducciones de señales relacionadas con el dolor, tales como las MAP quinasas (Ji y col. 2007), la proteína quinasa C (PKC) (Velázquez y col. 2007), la calcio/calmodulina quinasa II (CamK-II) (Luo y col. 2008), la proteína quinasa A (PKA) (Aley y Levine 1999), la proteína quinasa B (PKB) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Xu y col. 2007).

Hace un tiempo, nuestro laboratorio reportó que Cdk5 cumple un papel clave en las vías de señalización del dolor (Pareek y Kulkarni 2006; Utreras y col. 2009). Cdk5, es una proteína quinasa que pertenece a la familia de quinasas dependiente de ciclinas y que fosforila proteínas en serinas o treoninas dirigidas por prolina (Dhavan y Tsai 2001; Bórquez y col. 2013). Aunque su participación no es trascendental en la regulación del ciclo celular, se le han atribuido varias funciones claves en el desarrollo y funcionalidad del sistema nervioso. De esta manera se ha reportado que Cdk5 participa en migración neuronal, liberación de neurotransmisores, plasticidad neuronal, memoria, aprendizaje, adicción y apoptosis, entre otros procesos (Dhavan y Tsai 2001; Lalioti y col. 2010). Cdk5 se expresa ubicuamente, sin embargo es inactiva y necesita de la unión de sus co-activadores p35 o p39, los cuales son expresados mayoritariamente en neuronas post-mitóticas, formando así un complejo con actividad quinasa (Lalioti y col. 2010). Además, se ha reportado varias funciones para Cdk5 en células no neuronales (Contreras-Vallejos y col. 2012; Utreras y col. 2013).

En conjunto con otros grupos, nuestro laboratorio ha reportado que Cdk5 y p35 se expresan en DRG y TG de roedores (Yang y col. 2007; Utreras y col. 2009;

Haenchen y col. 2010). Interesantemente, ensayos conductuales para medir dolor mediante estimulación térmica o mecánica demostraron que ratones knock-out para p35 (p35 KO), los cuales poseen una disminuida actividad quinasa de Cdk5, muestran una menor sensación dolorosa. En contraste, en ratones transgénicos para p35 (Tgp35), los cuales tienen una mayor actividad quinasa de Cdk5, presentan una mayor sensación dolorosa (Pareek y col. 2006; Prochazkova y col. 2013). La inducción de inflamación con carragenina o adyuvante completo de Freund (CFA) en la pata de roedores indujo un aumento de los niveles proteicos de p35 y un aumento en la actividad de Cdk5 en las neuronas sensoriales primarias (Pareek y col. 2006; Yang y col. 2007). Con respecto a los blancos moleculares de la quinasa Cdk5 que participan en nocicepción, se destaca el canal TRPV1, el cual puede ser fosforilado en la treonina 407, modificación que aumenta su conductancia en presencia de capsaicina (Pareek y col. 2007; Utreras y col. 2012; Utreras y col. 2013). Además, se reportó que Cdk5 regula el tráfico intracelular de este canal a través de la fosforilación en la treonina 506 del motor molecular KIF13B (*kinesin-3 family member 13B*) el cual une TRPV1. De esta forma, la fosforilación promueve su transporte anterógrado, aumentando la cantidad de canales en la periferia y contribuyendo a la hiperalgesia térmica en ratas (Xing y col. 2012). También se ha reportado que Cdk5 fosforila al receptor de delta-opioide (DOR1) en la treonina 161, disminuyendo su localización en membrana y, de esta forma, atenuando el efecto de tolerancia a la morfina en ratas (Xie y col. 2009). Estos antecedentes dan cuenta del emergente interés por estudiar el papel de Cdk5 en las vías de señalización del dolor, tanto por sus blancos moleculares como por su regulación río arriba.

3.5 Propuesta de un nuevo modelo murino de sobreexpresión de TNF- α tejido específica para el estudio de la función de Cdk5 en dolor

Recientes estudios de nuestro laboratorio demostraron que TNF- α incrementa la expresión de p35 con un subsecuente aumento en la actividad quinasa de Cdk5 en células PC12 (Utreras y col. 2009). El tratamiento con TNF- α activó la vía ERK1/2 y el aumento del factor de transcripción Egr-1 (*early growth response protein 1*), el cual se ha descrito como el regulador maestro de la expresión de p35 (Harada y col. 2001), en células PC12. Finalmente, los niveles de mRNA de TNF- α aumentaron en la pata inflamada con carragenina, y los niveles de mRNA de Egr-1 y p35 aumentaron en los DRG correspondientes de las patas inflamadas en ratones (Utreras y col. 2009). Por otro lado, se demostró que el resveratrol, un polifenol del vino tinto, con conocidas propiedades analgésicas (Bertelli y col. 2008), disminuye la expresión de p35 y la actividad quinasa de Cdk5, bloqueando el efecto de TNF- α sobre Cdk5 en líneas celulares y en cultivo primario de neuronas de DRG (Utreras y col. 2011). Estos antecedentes, en conjunto con los reportes de hipo e hiperalgnesia en ratones p35 KO o Tgp35, respectivamente (Pareek y col. 2006; Prochazkova y col. 2013); y los reportes de que Cdk5 fosforila TRPV1 aumentando su funcionalidad y transporte hacia la membrana celular (Pareek y col. 2007; Xing y col. 2012), sugieren que TNF- α podría regular la actividad de Cdk5 *in vivo* y, consecuentemente, la percepción del dolor.

En consideración de estos antecedentes, el proyecto Fondecyt Iniciación del Dr. Utreras, en el cual se enmarca este Seminario de Título, pretende estudiar la regulación de la actividad quinasa de Cdk5 *in vivo* mediada por la sobreexpresión de TNF- α , específicamente en tejido nociceptivo, y su implicancia en las vías de señalización del dolor. Para ello, utilizando la tecnología de recombinación Cre/loxP se

generó un ratón transgénico condicional diseñado para sobreexpresar TNF- α específicamente en tejido nociceptivo (TG y DRG). La estrategia experimental consiste en cruzar ratones transgénicos portadores del vector TNF- α -pCre con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen SNS (también conocido como Nav1.8, Scn10a o PN3, Gene ID: 20264) (Figura 5). El gen SNS codifica para un canal de sodio específico de neuronas nociceptivas presentes en los TG y DRG (Abrahamsen y col. 2008; Chiu y col. 2013). Cabe señalar que la estrategia experimental utilizada en este trabajo fue anteriormente probada en la generación de un ratón transgénico condicional que sobreexpresa la citoquina TGF- β 1 específicamente en las glándulas salivales (Hall y col. 2010).

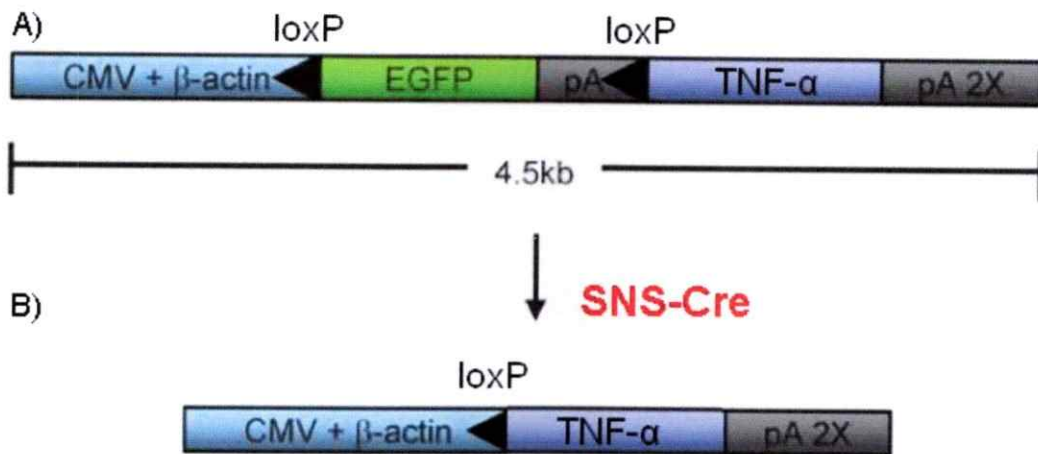


Figura 5. Estrategia utilizada para sobreexpresar TNF- α dependientemente de Cre. A: Esquema del vector pCle utilizado en la línea transgénica TNF- α -pCle. Posee una región reguladora de la transcripción con elementos enhancers de CMV más un promotor constitutivo de β -actina. La secuencia de EGFP más una secuencia de poliadenilación se encuentran *floxeadas* por sitios loxP. Posteriormente se encuentra el sitio de clonamiento donde fue insertado el cDNA de TNF- α de *Mus musculus*. B: En las neuronas nociceptivas donde se expresará Cre dependientemente del promotor del canal SNS, la secuencia de EGFP será escindida dando paso a la transcripción de TNF- α bajo la regulación del promotor constitutivo de β -actina (modificado de Bradley, Hyun y col. 2007).

3.6 Implicancias inmunes del modelo murino propuesto

Debido a la relevancia que tiene TNF- α en los procesos inflamatorios y al impacto terapéutico que se puede obtener al investigar la regulación *in vivo* de Cdk5 durante la transducción del dolor, es imperativo caracterizar el nivel de producción de TNF- α en el tejido deseado, como también entender que sucede a nivel local y sistémico en un organismo completo al sobreexpresar esta citoquina. Para esto, a nivel de los TG se analizará el perfil de expresión génica de varias citoquinas y quimioquinas que han sido relacionadas al fenómeno del dolor tales como IL-12p40 (parte del

heterodímero de IL-12), IFN- γ , MCP-1, IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β 1, LIF y OSM (Morikawa y col. 2004; Basbaum y col. 2009; Mika y col. 2013). El análisis de los posibles efectos sistémicos se evaluará utilizando el ensayo Cytometric Bead Array (CBA), con el cual es posible cuantificar, la expresión proteica de seis moduladores inflamatorios de suma importancia en la homeostasis inmune del organismo en una misma muestra (IL-12, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-6 e IL-10). El análisis de las concentraciones séricas de estos moduladores inflamatorios permite dar cuenta del estado inmune del animal, ya que son moléculas críticas en el desarrollo, mantención y/o término de respuestas inflamatorias (Xu y col. 2013). Cambios significativos en la expresión local y/o sistémica de algunos de estos modulares constituirían una nueva fuente de información para el estudio de la inmunomodulación sobre la función neuronal.

En resumen, con la caracterización funcional de los ratones transgénicos condicionales seguida de una evaluación de la homeostasis inmune local (en los TG) y sistémica (en el cerebro y suero sanguíneo) se espera validar y sustentar nuestro nuevo modelo animal para su posterior utilización en estudios de la regulación *in vivo* de TNF- α sobre la actividad quinasa de Cdk5 y de su función en la transducción de señales del dolor.

4 Hipótesis

Los ratones dobles transgénicos (TNF- α -pCie/SNS-Cre) sobreexpresan TNF- α en los ganglios trigeminales sin causar un desbalance inmune sistémico.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general:

Evaluar la sobreexpresión de TNF- α en los ganglios trigeminales de los ratones transgénicos condicionales, y su efecto sobre la homeostasis inmune local y sistémica, para validarlos como modelo de estudio *in vivo* de transducción de señales del dolor mediada por esta citoquina.

5.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar la estrategia de sobreexpresión de TNF- α transfectando los vectores TNF- α -pCie más CMV-Cre en la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a.
2. Genotipificar los ratones obtenidos del cruce entre ratones TNF- α -pCie y SNS-Cre, mediante PCR a partir de DNA obtenido de biopsias de colas.
3. Cuantificar la expresión de TNF- α , tanto a nivel de mensajero como proteína, en los TG.
4. Evaluar el perfil inflamatorio local de los TG mediante RT-PCR e inmunofluorescencia de mediadores inflamatorios de interés.
5. Evaluar el perfil inflamatorio sistémico del modelo murino, mediante la cuantificación de la expresión proteica de los mediadores inflamatorios IL-12, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-6 e IL-10 en el suero sanguíneo.

6 Materiales y métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Animales transgénicos

Ratones de la cepa C57BL/6 portadores del constructo SNS-Cre fueron generados en el laboratorio de la Dr. Rohini Kuner (Institute for Pharmacology, University of Heidelberg, Alemania) (Agarwal y col. 2004) y generosamente proporcionados al Dr. Elías Utreras. Estos animales expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor del canal SNS, específico de tejido nociceptivo. El sitio de inserción y número de copias del transgen está indeterminado.

Ratones de la cepa FVB/N portadores del constructo TNF- α -pCle fueron generados por el Dr. Elías Utreras en el laboratorio del Dr. Ashok Kulkarni (Laboratory of Cell and Developmental Biology, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). El vector pCle utilizado en este constructo fue generado por Bradley, Hyun y colaboradores (Bradley y col. 2007) y consiste en una región reguladora de la transcripción con elementos enhancers de CMV más un promotor constitutivo de β -actina. Posteriormente, posee un intrón seguido de la secuencia del cDNA de EGFP con una secuencia de poliadenilación flanqueadas por sitios loxP. Después del último sitio loxP, posee un sitio de clonación en el cual fue insertado el cDNA de TNF- α de *Mus musculus* entre los sitios EcoRI y NheI para generar el vector TNF- α -pCle seguido de una secuencia de poliadenilación. Por lo tanto, EGFP se expresará constitutivamente en todas las células del animal. En

presencia de la recombinasa Cre, EGFP será escindido y TNF- α se expresará constitutivamente bajo el mando del promotor de β -actina (Figura 5). El transgen se integró en un solo sitio del genoma pero se desconoce la cantidad de copias insertadas en tándem (datos no publicados).

Todos los animales fueron mantenidos y cruzados en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Durante su mantenimiento, cruce y sacrificio se siguió el protocolo de manipulación establecido por el Comité de Ética del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

6.1.2 Líneas celulares

Para comprobar la estrategia de sobreexpresión de TNF- α se usó la línea celular N2a (número ATCC: CCL-131), proveniente de un neuroblastoma de ratón, cultivadas a 37°C con CO₂ al 5% en medio DMEM, suplementadas con suero fetal bovino (SFB) al 5%, más la mezcla comercial antibiótico-antimicótico (Gibco, Life Technologies) consistente de penicilina, estreptomina y anfotericina B.

6.2 Métodos

6.2.1 Transfección de la línea celular

Los niveles de expresión del vector TNF- α -pCie fueron analizados en células N2a co-transfectadas con el vector CMV-Cre en una proporción 1:4 empleando lipofectamina (Life Technologies) en medio Optimem (Gibco, Life Technologies) durante 48 h a 37°C. Las células fueron observadas en microscopio de

epifluorescencia (Zeiss, modelo Axiovert 200M) para analizar la expresión de GFP del vector TNF- α -pCle.

6.2.2 Generación de un ratón transgénico condicional para TNF- α

Ratones TNF- α -pCle heterocigotos fueron cruzaron con ratones SNS-Cre heterocigotos, obteniendo cuatro posibles genotipos: ratones transgénicos condicionales (cTg) (TNF- α -pCle^{tg/+}; SNS-Cre^{tg/+}); ratones controles que solo presentan el constructo TNF- α -pCle (TNF- α -pCle^{tg/+}; SNS-Cre^{+/+}); ratones controles que solo presentan el constructo SNS-Cre (TNF- α -pCle^{+/+}; SNS-Cre^{tg/+}); y ratones controles que no presentan ninguno de los dos constructos (TNF- α -pCle^{+/+}; SNS-Cre^{+/+}); donde la notación tg/+ corresponde a la forma heterocigota del transgen; y la notación +/- corresponde a la forma silvestre del genotipo (Figura 6). A los 10 días de nacidos, se obtuvo biopsias de cola de las progenies para analizar su genotipo mediante PCR.

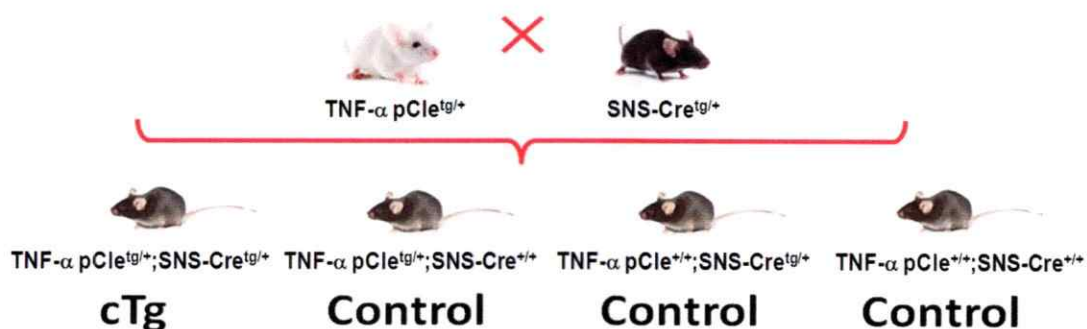


Figura 6. Generación del ratón transgénico condicional para TNF- α en tejido nociceptivo. Al cruzar ratones heterocigotos portadores del constructo TNF- α -pCle con los ratones transgénicos portadores del constructo SNS-Cre se espera obtener cuatro posibles genotipos en la progenie. Los ratones portadores de los dos constructos transgénicos se denominan transgénicos condicionales (cTg), en tanto, los ratones que expresan uno o ninguno de los constructos son considerados controles.

6.2.3 Obtención de DNA genómico

Biopsias de colas (de 1 cm aproximadamente) fueron digeridas con 6 μ l de proteinasa K (20 mg/mL) en 500 μ l de buffer de digestión de colas (Tris 50 mM pH 8.3, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,8%(v/v)) incubando a 1.000 rpm a 55°C por 3 h. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos, descartando el pellet. Se agregó 750 μ l de isopropanol 100% y se incubó por 2 min mezclando por inversión ocasionalmente hasta observar un ovillo blanco. Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de DNA se lavó con 750 μ l de etanol 70%, vortexeando brevemente y centrifugando a 14.000 rpm por 3 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire por 10 min. El pellet de DNA fue resuspendido en 100 μ l de agua bidestilada e incubado a 65°C por 10 min. Finalmente, fue mantenido a -20°C hasta su posterior utilización.

6.2.4 Genotipificación de la progenie mediante PCR

Para analizar la presencia o ausencia del constructo TNF- α -pCie en la progenie murina, se realizó una PCR a partir de DNA genómico utilizando los siguientes partidores contra la secuencia de EGFP: partidor sentido 5'-AAA TTC ATC TGC ACC ACC G-3'; partidor antisentido 5'-TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG- 3'; generando un amplicón de 173 bp. Además, se utilizaron los siguientes partidores universales como control interno de que hubo reacción: partidor sentido 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'; partidor antisentido 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'; generando un amplicón de 324 bp. La mezcla de reacción utilizada fue: 1,2 μ l de buffer Taq 10X con KCl (Thermo Scientific); 0,96 μ l de MgCl₂ 25 mM; 0,96 μ l de mix

dNTPs 2,5 mM; 1,2 μ l de cada partidor contra EGFP 10 mM; 0,6 μ l de cada partidor contra la secuencia control 10 mM; 1 μ l de Taq polimerasa (Thermo Scientific); 3 μ l de DNA en un volumen final de 12 μ l. El programa utilizado fue de: 1 ciclo de denaturación a 94°C por 2 min; 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, hibridación a 60°C por 1 min, elongación a 72°C por 1 min; 1 ciclo de elongación final 72°C por 2 min.

Para analizar la presencia o ausencia del constructo SNS-Cre se realizó una PCR a partir de DNA genómico utilizando los siguientes partidores contra la secuencia de Cre: partidor sentido 5'-GCA CTG ATT TCG ACC AGG TT-3'; partido antisentido 5'-GAG TCA TCC TTA GCG CCG TA-3'; generando un amplicón de 421 bp. La mezcla de reacción utilizada fue: 2 μ l de buffer Taq 10X con KCl (Thermo Scientific); 2,5 μ l de MgCl₂ 25mM; 2 μ l de mix dNTPs 2,5 mM; 1 μ l de cada partidor 10 mM; 1 μ l de Taq polimerasa (Thermo Scientific); 2 μ l de DNA en un volumen final de 25 μ l. El programa utilizado fue: 1 ciclo de denaturación a 97°C por 3 min; 30 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min, hibridación a 60°C por 30 s, elongación a 72°C por 1 min; 1 ciclo de elongación final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR fueron mezclados con buffer de carga de DNA 6X (xileno cianol 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v)) y sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X a 100V por 1 h en presencia de bromuro de etidio 1 μ g/ml.

6.2.5 Análisis de ganancia de peso

Los pesos de los ratones fueron medidos cada dos días a partir de los 21 días de edad (fecha de destete de las camadas). Para analizar la ganancia de peso de cada

genotipo, se generaron curvas de peso en gramos en función de la edad en semanas. Los valores de ganancia de peso obtenidos fueron comparados por género y genotipo.

6.2.6 Obtención de los ganglios trigeminales y otros tejidos de interés

Los ratones fueron sometidos a eutanasia utilizando una dosis letal de ketamina al 10% más xilacina al 2%. Rápidamente se procedió a diseccionar la cavidad torácica para exponer el corazón y obtener suero sanguíneo, como se detalla en la sección 6.2.7 (Obtención de suero sanguíneo). Posteriormente se diseccionó el cráneo exponiendo completamente el cerebro y los bulbos olfativos. El cerebro fue recolectado dejando los ganglios trigeminales a la vista. Estos fueron cuidadosamente removidos evitando desgarrar el inicio de cada una de las tres ramas (oftálmica, maxilar y mandibular) donde se agrupan los cuerpos neuronales. Posteriormente, se procedió a recolectar bazo para utilizarlo como tejido control para los experimentos de expresión de citoquinas mediante RT-PCR. Todos los tejidos fueron mantenidos a -20°C hasta su posterior análisis.

6.2.7 Obtención de suero sanguíneo

Antes de la extracción de cualquier tejido, a los ratones sacrificados se les realizó una disección torácica, exponiendo el corazón. Se procedió a realizar una punción a los ventrículos y se recolectó la sangre con una jeringa tuberculina 1 ml. Se traspasó la sangre a tubos eppendorf de 1,5 ml y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h o hasta que la sangre coagulara. Las muestras coaguladas fueron incubadas por 5 min en hielo y posteriormente centrifugadas a 3.500 rpm por 20 min a 4°C . El

sobrenadante fue traspasado a nuevos tubos y guardados a -80°C hasta su posterior análisis.

6.2.8 Extracción de proteínas

Los ganglios trigeminales y el cerebro fueron homogenizados utilizando homogenizadores de vidrio en buffer T-PER (Thermo Scientific) más una pastilla de inhibidores de proteasas (Roche) y una pastilla de inhibidores de fosfatasas (Roche) por cada 10 ml de buffer. El homogenizado se incubó en hielo por 5 min y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 20 min a 4°C . El sobrenadante fue recolectado y guardado a -80°C . El pellet obtenido fue rápidamente homogenizado en reactivo de TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA) para la posterior extracción de RNA total.

Los extractos de proteínas fueron cuantificados utilizando el método de Bradford usando albúmina de suero bovino (BSA) para generar la curva de calibración (Bradford 1976). Cincuenta a 75 μg de proteínas fueron preparados con buffer de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25%(v/v), SDS 2%(p/v), β -mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%(p/v), pH 6,8) y calentadas a 95°C por 5 min en thermomixer (Eppendorf).

6.2.9 SDS-PAGE y Western blot

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida al 12% con 380 mM Tris-HCl pH 8,8, 12% acrilamida-bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,06% TEMED. Los geles de apilamiento al 4,5% fueron preparados con 60 mM Tris-

HCl pH 6,8, 4,5% acrilamida-bis-acrilamida, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio y 0,06% TEMED. Las muestras se sometieron a electroforesis en buffer de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 200 mM y SDS 0,1%) a 80 V por 10 min seguido de 120 V hasta que se resolvieran las bandas entre 25 y 70 kDa.

Las proteínas electroforadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM; glicina 200mM y metanol 20% v/v) en frío a 100 V por 1 h. Las membranas fueron bloqueadas en leche descremada al 5% en TBS-T 0,05% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-p35/p25 1:500 (C64B10, Cell Signaling); anti-Cdk5 1:500 (J3, Santa Cruz Biotechnology); y anti α -Tubulina 1:10.000 (Sigma) en solución de anticuerpos en leche descremada 1% en TBS-T 0,05% toda la noche en agitación a 4°C. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T 0,05% durante 10 min por cada lavado y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a HRP 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology) contra IgG de ratón o conejo según el anticuerpo primario utilizado, durante 60 min a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T 0,05% durante 10 min por cada lavado. Finalmente, las membranas fueron reveladas utilizando el sustrato ECL (Thermo Scientific) incubando 2 min a temperatura ambiente y exponiendo a películas fotográficas Super HR-U (Fujifilm). Las películas fueron escaneadas y la intensidad densitométrica de cada banda fue cuantificada utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Los datos fueron normalizados contra α -tubulina como control de carga y expresados como relativos a los ratones controles.

6.2.10 Extracción de RNA y tratamiento con DNAasa

El pellet obtenido después de la obtención de proteínas fue homogenizado con el reactivo de TRIzol utilizando 1.000 μ l o 500 μ l para cerebro o ganglios trigeminales, respectivamente. La solución se incubó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se agregó 200 μ l de cloroformo, por cada 1000 μ l de reactivo de TRIzol utilizado, y se agitó vigorosamente por 15 s dejándose incubar por 3 min a temperatura ambiente. Los tubos fueron centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos. Luego, se agregó 500 μ l de isopropanol 100%, por cada 1.000 μ l de reactivo de TRIzol utilizado, y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con etanol 75% (preparado en agua tratada con DEPC) vortexeando brevemente y centrifugando a 7.500 g por 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar al aire a temperatura ambiente por 10 min. El RNA fue resuspendido en 20 μ l de agua DEPC e incubado a 60°C durante 10 min. Se cuantificó la concentración y pureza del RNA (relación de absorbancia a 260nm dividida por la absorbancia a 280nm mayor a 1,8) en nanodrop (Thermo Scientific). Además, se comprobó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en presencia de bromuro de etidio 1 μ g/ml. De 5-10 μ g de RNA total fueron tratados con DNAasa utilizando el protocolo descrito para la Turbo DNasa (Ambion, Life Technologies, CA). Posteriormente se volvió a cuantificar el RNA tratado.

6.2.11 RT-PCR

cDNA fue sintetizado a partir de 5 μ g de RNA libre de DNA utilizando la transcriptasa reversa M-MLV 200 U/ μ L (Life Technologies, Carlsbad, CA) en una

mezcla final de reacción consistente en: 1 μ l de oligo(dT)₂₀ 5'-fosfato 50 μ M; 1 μ l de mix dNTPs 10mM; 4 μ l de 5X first strand buffer; 2 μ l de DTT 0,1 M en un volumen final de 20 μ l, usando el siguiente programa en termociclador: incubar 5 min a 65°C con la muestra de RNA más oligo(dT)₂₀ y dNTPs; enfriar a 4°C por 3 min; agregar 5X first strand buffer y DTT; incubar a 37°C por 2 min y enfriar a 4°C por 3 min; agregar la transcriptasa reversa M-MLV e incubar a 37°C por 50 min. Terminar la reacción a 70°C por 15 min.

Mediante PCR se amplificó el cDNA de TNF- α , IL-12p40, IFN- γ , MCP-1, IL-6, IL-1 β , TGF- β 1, LIF, OSM, p35, Cdk5 y S29. La mezcla de reacción consistió de: 2,5 μ l buffer Taq 10X con KCl (Thermo Scientific); 2 μ l de MgCl₂; 2 μ l de mix dNTPs 2,5 mM; 1 μ l de cada partidor 10 mM; 1 μ l de Taq polimerasa (Thermo Scientific); 2 μ l de producto de reacción de síntesis de cDNA (10% del volumen final de reacción de síntesis) en un volumen final de 25 μ l. Se usó el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de denaturación a 95°C por 5 min; 35 ciclos de denaturación a 95°C por 30 s seguido por hibridación a 60°C (T_m) por 30 s y elongación a 72°C por 1 min; 1 ciclo de elongación final a 72°C por 10 min.

En la amplificación del cDNA de IL-10 se utilizó una T_m de 66°C. Todas las secuencias de los partidores utilizados y el tamaño de los amplicones esperados se detallan en la Tabla I. Los partidores fueron diseñados para hibridar con distintos exones de los genes para evitar contaminación con DNA genómico. Todas las PCR fueron inicialmente optimizadas utilizando muestras de cDNA obtenidos de bazo.

Tabla I. Secuencia de partidores utilizados para RT-PCR.

Blanco	Referencia de partidores*	Tamaño del amplicón	Secuencia de los partidores	Número de acceso GeneBank
TNF- α	(Utreras y col. 2009)	255	F: 5'-GATCTCAAAGACAACCAACTAGT-3' R: 5'-CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG-3'	NM_013693
IL-12p40	Diseñados para este trabajo	209	F: 5'-GACATCATCAAACCAGACCCG-3' R: 5'-TTCTCTACGAGGAACGCACC-3'	NM_008352
IFN- γ	Diseñados para este trabajo	119	F: 5'-CGGCACAGTCATTGAAAGCC-3' R: 5'-TGTCACCATCCTTTTGCCAGT-3'	NM_008337
MCP-1	(Zager 2005)	250	F: 5'-TCACCTGCTGCTACTCATTACCA-3' R: 5'-AAAGGTGCTGAAGACCCTAGGGCA-3'	NM_011333
IL-6	Diseñados para este trabajo	546	F: 5'-TCCTCTCTGCAAGAGACTTCC-3' R: 5'-GCCACTCCTTCTGTGACTCC-3'	NM_031168
IL-1 β	(Utreras y col. 2013)	152	F: 5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3' R: 5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'	NM_008361
IL-10	Diseñados para este trabajo	351	F: 5'-ACTGGCATGAGGATCAGCAG-3' R: 5'-GAGAAATCGATGACAGCGCC-3'	NM_010548
TGF- β 1	(Utreras y col. 2013)	119	F: 5'-GCAGTGGCTGAACCAAGGAG-3' R: 5'-CCCACGTTTGGGGCTGATC-3'	NM_011577
LIF	(Utreras y col. 2013)	103	F: 5'-ACGGCAACCTCATGAACCA-3' R: 5'-GGAAACGGCTCCCCTTGA-3'	NM_008501
OSM	(Utreras y col. 2013)	230	F: 5'-TGTGGCTTTCTCTGGGGATAC-3' R: 5'-GAAGGTCTGATTTTGCGGGAT-3'	NM_0010133 65
Cdk5	(Utreras y col. 2012)	228	F: 5'-GGCTAAAAACCGGGAAACTC-3' R: 5'-CCATTGCAGCTGTCGAAATA-3'	NM_007668
p35	(Utreras y col. 2012)	113	F: 5'-GCCCTTCTGGTAGAGAGCTG-3' R: 5'-GTGTGAAATAGTGTGGGTCGGC-3'	NM_009871
S29	(Utreras y col. 2012)	108	F: 5'-GGAGTCACCCACGGAAGTTCGG-3' R: 5'-GGAAGCACTGGCGGCACATG-3'	NM_009093

*: Los partidores diseñados específicamente para este trabajo fueron obtenidos utilizando la herramienta NCBI Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). F: partidor sentido; R: partidor antisentido.

6.2.12 ELISA anti TNF- α

A partir de los homogenizados de proteínas de ganglios trigeminales en buffer T-PER, 25 μ g de proteínas fueron llevados a un volumen final de 50 μ l y analizados utilizando el Mouse TNF- α ELISA kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos obtenidos fueron normalizados dividiendo por la cantidad total de proteínas cargadas y fueron expresados como pg de TNF- α por mg de proteínas totales en la muestra de ganglios trigeminales.

Para analizar la concentración sistémica de TNF- α se utilizaron 50 μ l de suero sanguíneo diluido en 50 μ l de buffer de dilución incluido en el Mouse TNF- α ELISA kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos obtenidos fueron corregidos por el factor de dilución y se expresaron como pg de TNF- α por ml de suero sanguíneo.

6.2.13 Histología de ganglios trigeminales

Para analizar la morfología celular, estructura, expresión y localización de marcadores moleculares de interés dentro de los TG, se realizaron análisis histológicos a partir de tejidos congelados. Para esto, un animal cTg y uno control, ambos de 3 meses de edad, fueron sacrificados como se detalló anteriormente en la sección 6.2.6., y los TG fueron diseccionados cuidadosamente bajo lupa (Olympus SZ51) para mantener la integridad del tejido. Posteriormente, cada par de TG de cada animal fueron puestos en una solución fijadora de paraformaldehído 4% en PBS 1X durante 24 h. Posteriormente, se cambiaron los TG a una solución de crioprotección de sacarosa 30% en PBS 1X, durante toda la noche. La completa incorporación de la solución de crioprotección fue comprobada al observar la precipitación del tejido al fondo del tubo.

Los TG fueron puestos en criomoldes de biopsias 10x10x5 mm (Sakura Finetek), embebidos en medio Optimal Cutting Temperature (OCT) (Sakura Finetek) y congelados a -80°C. Se realizaron cortes de 14 µm en criostato (Microm HM 525), siendo recibidos en portaobjetos Super Frost Plustm (Fischer Scientific) condicionados para la correcta adhesión de cortes de bloques de OCT.

Para analizar la morfología celular y estructura del ganglio trigeminal, se realizó una tinción de hematoxilina y eosina, de acuerdo al siguiente protocolo: cubrir las secciones con solución de hematoxilina de Mayer 0,1% durante 1 min. Lavar con agua 2 veces hasta remover el exceso de hematoxilina. Cubrir las secciones con solución de eosina durante 30 s. Lavar abundantemente con agua. Deshidratar las secciones sumergiendo los portaobjetos en soluciones con porcentajes crecientes de etanol: 50%, 75%, 95% y finalmente 100%, durante 1 min por cada solución. Sumergir en xilol 100% durante 1 min. Montar las secciones con medio de montaje Entellan (Merck Millipore).

Para analizar la expresión y localización de marcadores moleculares de interés, se realizó inmunofluorescencia en las secciones de los TG. Se incubaron las secciones con solución de permeabilización/bloqueo consistente en Triton X-100 al 0,3% más BSA al 5% en PBS 1X, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó las secciones 5 veces con PBS 1X más BSA al 1%, durante 5 min por cada lavado. Se incubó las secciones con solución de anticuerpos primarios en PBS 1X más BSA al 1%, durante toda la noche a 4°C, empleando anti NeuN 1:100 hecho en pollo (Aves), anti TNF-α 1:50 hecho en conejo (#3707, Cell Signaling), anti Iba1 1:500 hecho en

conejo (019-19741, Wako Rabbit), anti p35 1:100 hecho en conejo (C64B10, Cell Signaling), anti Cdk5 1:100 hecho en conejo (C-8, Santa Cruz Biotechnology), anti fosfo-TRPV1 1:100 hecho en conejo (Pareek y col. 2007) y anti β III-Tubulina hecho en conejo (T3952, Sigma-Aldrich). Al siguiente día, se lavó las secciones 5 veces con solución de PBS 1X más BSA al 1%, durante 5 minutos por cada lavado. Las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con solución de TO-PRO 3 yoduro 1:800, para teñir material genético, más anticuerpos secundarios anti-conejo, ratón o pollo, dependiendo de los anticuerpos primarios utilizados, conjugados a fluoróforos Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 546 1:500 (Molecular Probes, Life Technologies). Posteriormente, las secciones fueron lavadas 5 veces con PBS 1X más BSA 1%, seguido de 2 lavados con agua destilada filtrada. Finalmente, las secciones fueron montadas con medio de montaje FluorSave (Merck Millipore).

Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina fueron observadas utilizando microscopio óptico (AmScope). Las secciones teñidas con anticuerpos conjugados a fluoróforos fueron observadas utilizando microscopía confocal (modelo LSM 510 Meta, Carl Zeiss Microscopy) y procesadas con el software LSM Image Browser (Carl Zeiss Microscopy). Para comparar cualitativamente las intensidades de fluorescencia, los cortes de TG de los ratones controles y cTg fueron embebidos y seccionados en el mismo bloque y tratados con las mismas soluciones del protocolo de inmunofluorescencia. Las imágenes presentadas en cada figura fueron tomadas en la misma sesión, bajo las mismas condiciones de potencia de los lasers y ganancia de los detectores.



6.2.14 Cytometric Bead Array

Para analizar la concentración de IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10, IL-6 en suero sanguíneo, se realizó un ensayo *Cytometric Bead Array* (CBA) utilizando el mouse inflammation kit (BD Biosciences) el cual permite cuantificar estas seis moléculas en una misma muestra utilizando citometría de flujo. Este ensayo fue realizado por la Dra. María Rosa Bono en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El ensayo CBA consiste en incubar las muestras de suero con seis poblaciones de esferas, cada una cubierta con anticuerpos de captura contra uno de los analitos, además de incubar con anticuerpos de detección conjugados a ficoeritrina (PE) contra las seis proteínas. Cada población de esferas posee una fluorescencia característica y distinta de las otras cinco. Por lo tanto, a partir de los dot plots generados es posible analizar por separado cada población de esferas para cada analito dentro de la mezcla total. Comparando las intensidades de fluorescencia de PE contra una curva de calibración para cada analito es posible obtener su concentración absoluta. Los resultados se expresan como pg de analito por ml de suero sanguíneo.

6.2.15 Análisis estadísticos

Los datos son mostrados como promedio de las réplicas \pm SEM. Se utilizó test t de Student de dos vías no pareado, asignando valores de $p < 0,05$ como significativos. Los valores de p y la cantidad de réplicas de cada experimento se detallan en cada leyenda. Se utilizó el software GraphPad Prism 6.1 para los análisis estadísticos y la generación de los gráficos.

7 Resultados

7.1 Caracterización *in vitro* del vector TNF- α -pCle

Para analizar el correcto funcionamiento de la estrategia de recombinación y los niveles de expresión del vector TNF- α -pCle, se transfectó la línea celular N2a, correspondiente a un neuroblastoma de ratón, con el vector TNF- α -pCle más el vector CMV-Cre, que expresa la recombinasa Cre constitutivamente bajo el control del promotor CMV. Después de 48 h post transfección, se comprobó la presencia del vector TNF- α -pCle mediante microscopia de fluorescencia, observando la emisión de GFP (Figura 7, A). Las células transfectadas con ambos vectores expresan alrededor del doble de TNF- α comparadas con las células sin transfectar, determinado por RT-PCR (Figura 7, B y C).

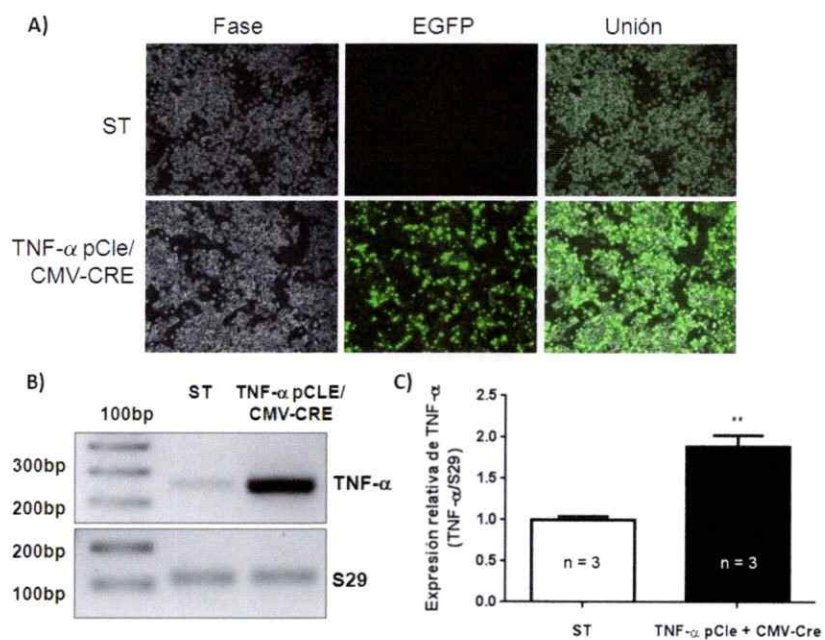


Figura 7. Evaluación de la expresión *in vitro* del vector TNF- α -pCle. A: Células N2a transfectadas e incubadas 48 h expresan la proteína GFP del vector TNF- α -pCle. B: Gel de agarosa representativo de la expresión de TNF- α en células controles y transfectadas determinado por RT-PCR. Hubo un aumento de aproximadamente el doble de los niveles de mRNA de TNF- α comparado con las células sin transfectar. C: Cuantificación de los RT-PCR. ST: sin transfectar. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM. Prueba t-Student, **: $p < 0,01$.

7.2 Generación de la línea transgénica condicional TNF- α -pCle x SNS-Cre

Para producir los ratones transgénicos condicionales (denominados cTg) que expresen TNF- α específicamente en tejido nociceptivo, se cruzaron ratones machos poseedores del constructo TNF- α -pCle con hembras portadoras del constructo SNS-Cre que expresan la recombinasa Cre bajo la actividad del promotor del canal de sodio SNS presente solo en TG y DRG, también denominado Nav1.8.

La progenie esperada de los cruces se encuentra detallada en la sección 6.2.2 de Materiales y Métodos. Se realizó la genotipificación a partir de biopsias de colas realizando PCR contra la secuencia de GFP, obteniendo un producto de reacción de 173 bp para los animales positivos, además de un producto de control interno de 324 bp que indica que hubo amplificación exitosa (Figura 8, A). Para la secuencia de Cre, el producto de PCR obtenido se encuentra en los 421 bp (Figura 8, A). Los ratones que expresan ambas secuencias se consideraron ratones cTg, mientras que los ratones poseedores de uno de los constructos o ninguno de ellos se consideraron ratones controles. Además, se analizó la presencia de la proteína GFP mediante Western blot a partir de muestras de cerebro de animales controles y transgénicos para confirmar la presencia del constructo TNF- α -pCle (Figura 8, B). En resumen, se observó la amplificación de la secuencia de GFP mediante PCR de biopsias de cola y la proteína de GFP visualizada por Western blot de muestras de cerebro de los ratones cTg, ya que la recombinación de la secuencia de GFP solo debería ocurrir en neuronas del tejido nociceptivo y no en el tejido cerebral.

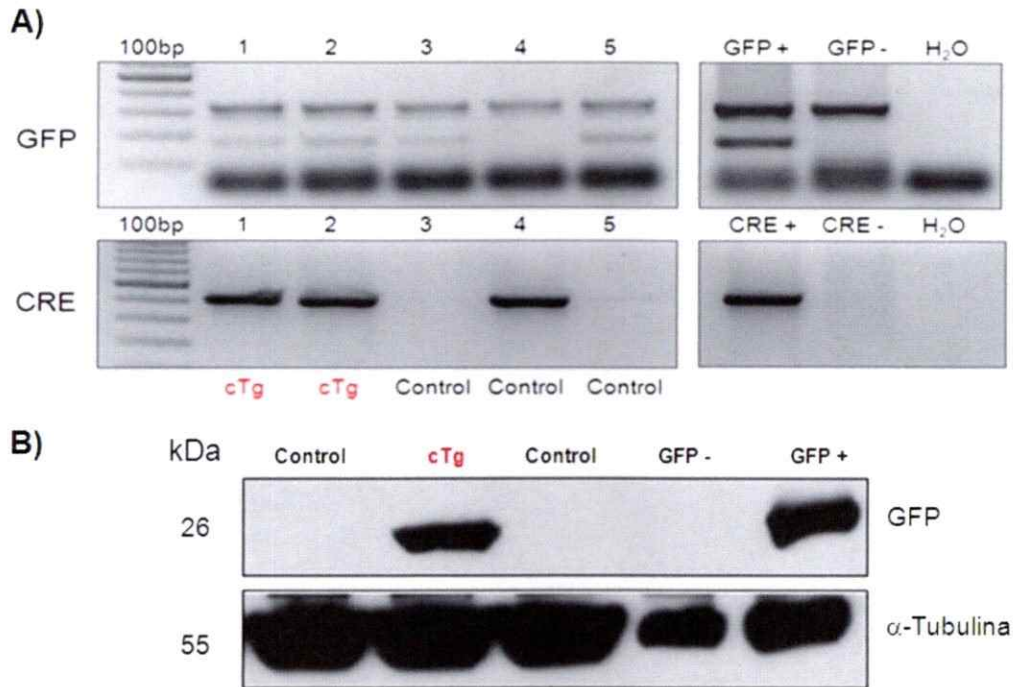


Figura 8. Genotipificación de la descendencia obtenida del cruce entre ratones TNF- α -pCre y SNS-Cre. A: Fotografías representativas de los productos de PCR para GFP y Cre. La banda superior en la electroforesis de GFP corresponde al control interno de reacción (324 bp); la banda intermedia corresponde al constructo de GFP (173 bp); la banda inferior corresponde a los partidores. El producto de PCR para Cre corresponde a la única banda observada (421 bp). La numeración de los carriles corresponde al número del individuo. B: Western blot representativo para confirmar la presencia del constructo TNF- α -pCre mediante la expresión de GFP en muestras de cerebro de ratones anteriormente genotipificados por PCR. Se utilizó un ratón positivo y negativo para GFP como controles. α -Tubulina se utilizó como control de carga.

En un primer análisis por inspección visual los ratones cTg fueron viables, fértiles y no presentaron síntomas de enfermedad en curso o fenotipos deletéreos aparentes (Figura 9, A), viviendo hasta 5 meses, edad máxima de sacrificio para análisis bioquímicos, sin desarrollar síntomas que los distinguieran de sus compañeros de camada controles. Interesantemente, no hubo diferencias en la ganancia de peso de los ratones tanto para machos como para hembras cTg comparado con los controles dentro de los primeros 3 meses de vida (Figura 9, B).

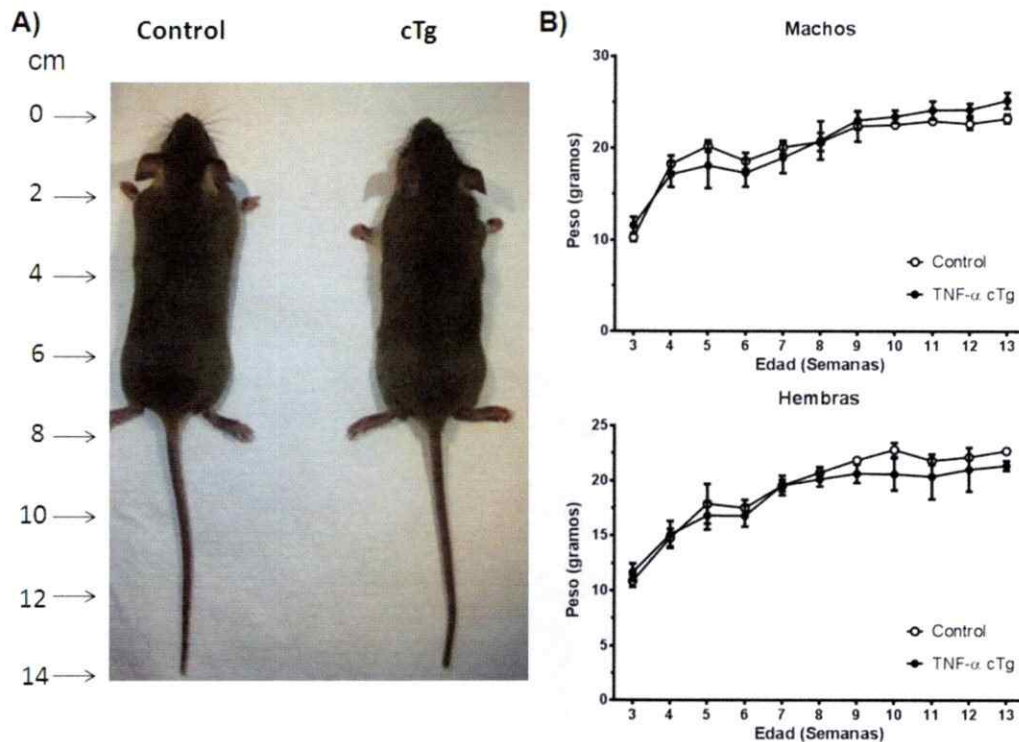


Figura 9. Comparación fenotípica y patrón de ganancia de peso de los ratones controles y cTg. Por inspección visual no se observan diferencias de tamaño ni síntomas de enfermedad en curso entre los ratones controles y cTg al menos hasta 5 meses de edad. A: imagen representativa de un ratón control comparado con un cTg ambos machos de 1 mes de edad. B: ganancia de peso en gramos de los ratones controles comparados con los cTg separados por machos y hembras. No se observan diferencias entre ambos genotipos para ninguno de los géneros. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM. Prueba t-Student múltiple. n: Machos, control = 3-15, cTg = 3-6; Hembras, control = 3-11, cTg = 2-8.

7.3 Confirmación de la sobreexpresión de TNF- α en los ganglios trigeminales

Para corroborar la integridad y la morfología celular de los TG extraídos (Figura 10, A), se realizó una tinción de hematoxilina y eosina (H&E), además de inmunofluorescencias a partir de cortes histológicos de 14 μm de TG congelados de ratones controles de 3 meses de edad (Figura 10). Mediante la tinción H&E es posible observar que el tejido nervioso de los TG está conformado por distintas poblaciones celulares, destacándose tres regiones densamente pobladas por cuerpos celulares de mayor tamaño correspondientes a las neuronas trigeminales (Figura 10, B y C). Estas tres regiones son las agrupaciones neuronales de las cuales se proyectan las ramas oftálmica (V1), maxilar (V2), y mandibular (V3). Además, se observan otros tipos celulares rodeando a estas neuronas, las cuales corresponderían a células satelitales gliales y macrófagos, principalmente (Figura 10, C).

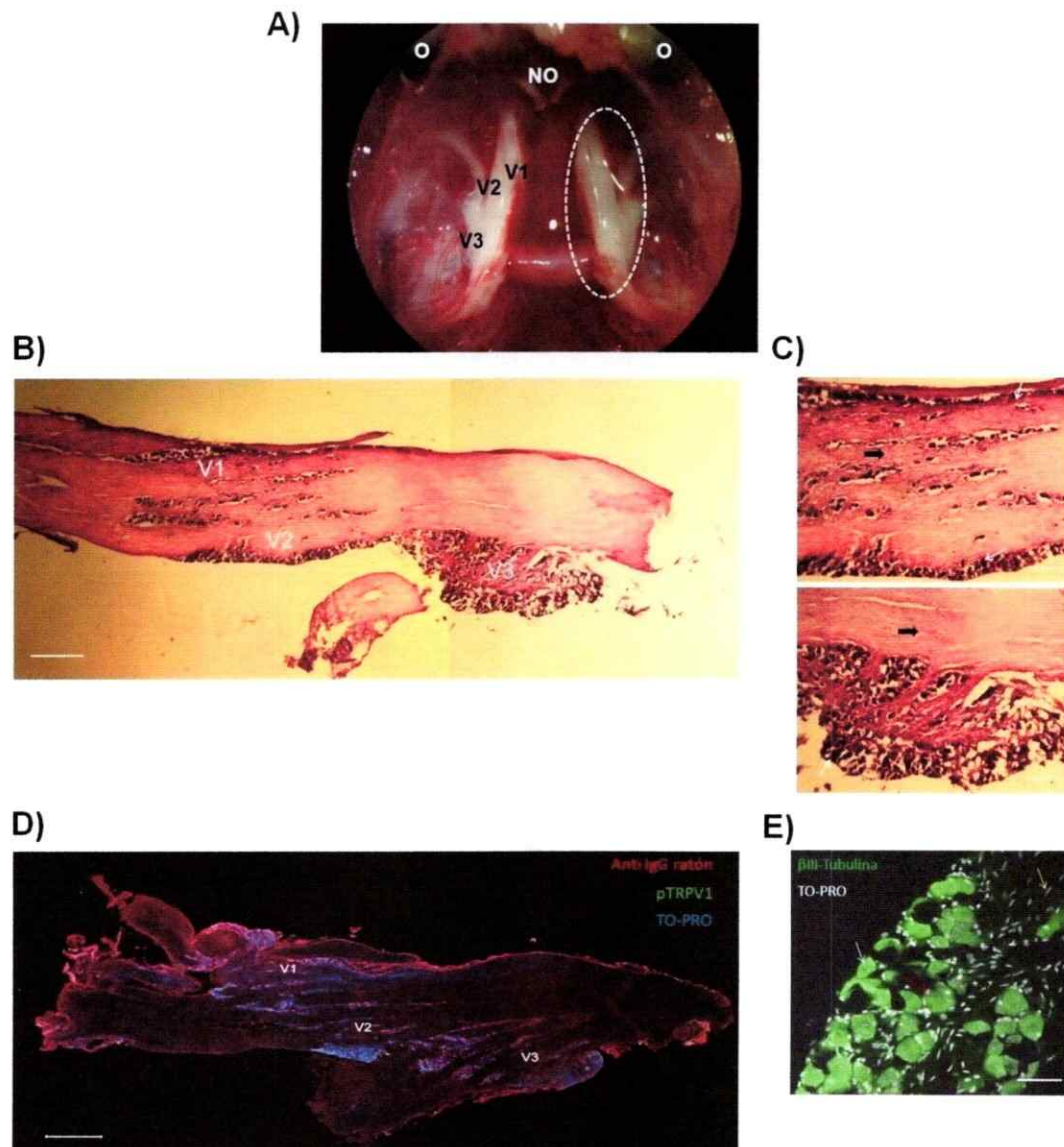


Figura 10. Estructura y poblaciones celulares del ganglio trigémino. A: Vista dorsal de los TG de ratón dispuestos en la base de la bóveda craneal, expuestos al remover el cerebro. Es posible observar la morfología característica del par de ganglios (ganglio izquierdo encerrado en línea punteada blanca), destacándose las tres zonas donde se agrupan los somas de las neuronas trigeminales (V1, V2 y V3 marcadas en el ganglio derecho). También se observan los ojos (O) y parte de los nervios ópticos que quedan al remover el cerebro (NO). El largo promedio de un ganglio trigémino de ratón adulto es de 5 mm. B: Imagen reconstituida con dos fotografías de un corte histológico de 14 μm de espesor de un ganglio

trigémico proveniente de un ratón control de 3 meses de edad teñido con hematoxilina y eosina visto en microscopio óptico. Cada fotografía fue tomada con el objetivo 4X. Se señalan las zonas V1, V2 y V3, correspondientes a las agrupaciones neuronales que dan origen a las ramas oftálmica, maxilar y mandibular, respectivamente. Se puede observar parte de la rama lateral que emerge desde V3 (rama mandibular). Barra de tamaño: 300 μm . C: Se observa con mayor aumento (10X) las zonas V1 más V2 (arriba), y la zona V3 (abajo) de la imagen en B. Los somas neuronales corresponden a los cuerpos celulares más grandes teñidos con hematoxilina (flechas blancas). Se pueden observar pequeños núcleos alargados a lo largo de todas las fibras del tejido, que corresponderían a células de Schwann (flechas negras). Barras de tamaño: 100 μm D: Imagen reconstituida con 20 fotografías de un corte histológico de 14 μm de un ganglio trigémino de un ratón control obtenidas por microscopía confocal utilizando el objetivo 10X y marcado contra la proteína neuronal TRPV1 en su epítipo fosforilado en la treonina 407 (pTRPV1) en verde y TO-PRO en azul. La marca en rojo corresponde a la unión de anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 546, que reconocería inmunoglobulinas endógenas presentes en el tejido. Se señalan las zonas V1, V2 y V3. Barra de tamaño: 500 μm . E: Se muestra una tinción de otro corte de ganglio trigémino control en la zona V2 contra el marcador neuronal β III-Tubulina (en verde) más TO-PRO (en blanco), utilizando el objetivo 40X. Se pueden distinguir al menos tres poblaciones celulares discriminando por la marca de β III-Tubulina y por morfología nuclear: neuronas (flecha blanca), células satelitales gliales o macrófagos (flecha roja) y células de Schwann, de núcleos más alargados (flecha amarilla). Se observa la disposición característica de algunas células (principalmente células satelitales gliales) rodeando los cuerpos neuronales (flecha roja). Barra de tamaño: 50 μm .

Para confirmar la sobreexpresión tejido-específica de TNF- α se realizó RT-PCR para amplificar el cDNA de TNF- α de muestras de TG de los ratones cTg y controles. Tanto al mes como a los 3 meses de edad se observó un aumento de expresión relativa de TNF- α de alrededor del doble en los ratones cTg con respecto a ratones controles (Figura 11).

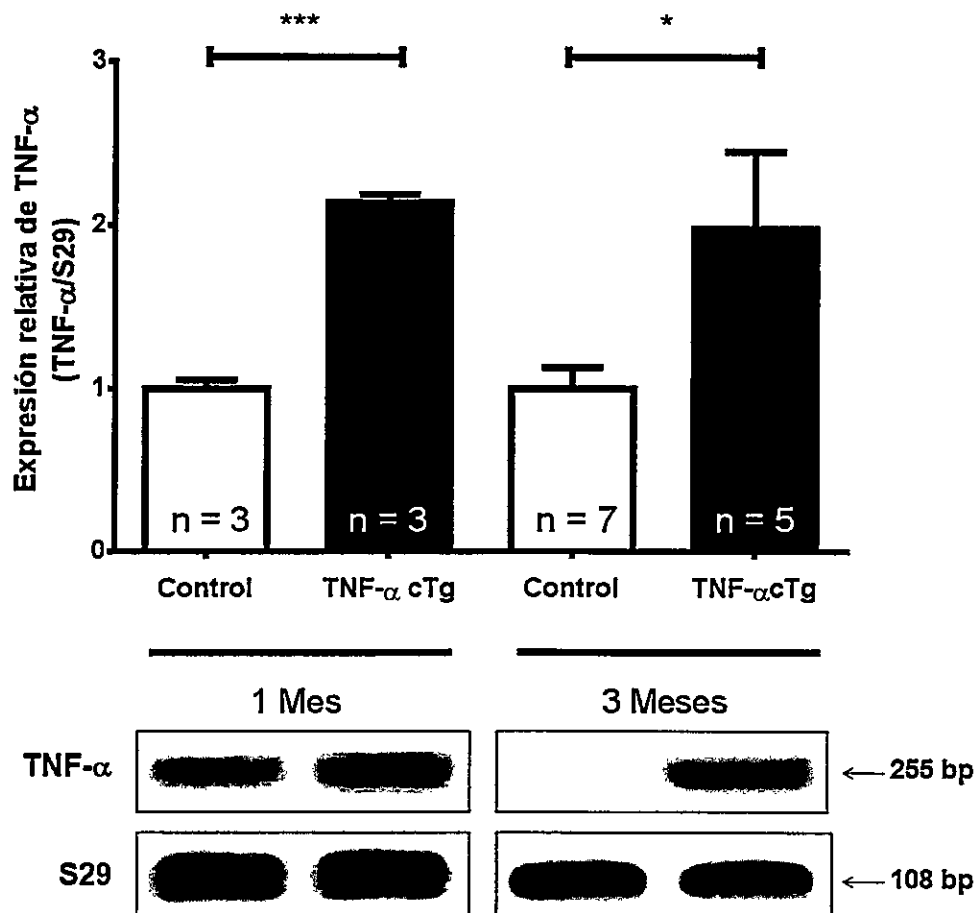


Figura 11. Expresión relativa de mRNA de TNF- α en los TG a 1 y 3 meses de edad. Mediante RT-PCR se determinó que la expresión de mRNA de TNF- α es de alrededor del doble en ratones cTg con respecto a ratones controles a 1 y 3 meses de edad. En el panel inferior se muestran los geles de agarosa representativos de los RT-PCR a 1 y 3 meses donde el primer carril corresponde a una muestra control y el segundo a una muestra cTg. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Prueba t-Student, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$.

Para analizar los niveles proteicos de TNF- α en los TG, se realizó ELISA a partir de 25 μ g de extractos de proteínas. Se observó que la cantidad de TNF- α fue aproximadamente 4 veces más en los ratones cTg con respecto a los controles a 1 y 3 meses de edad (Figura 12). En resumen, con estos resultados se concluye que los ratones cTg sobreexpresan TNF- α tanto a nivel de mensajero como proteico en los TG a 1 y 3 meses de edad.

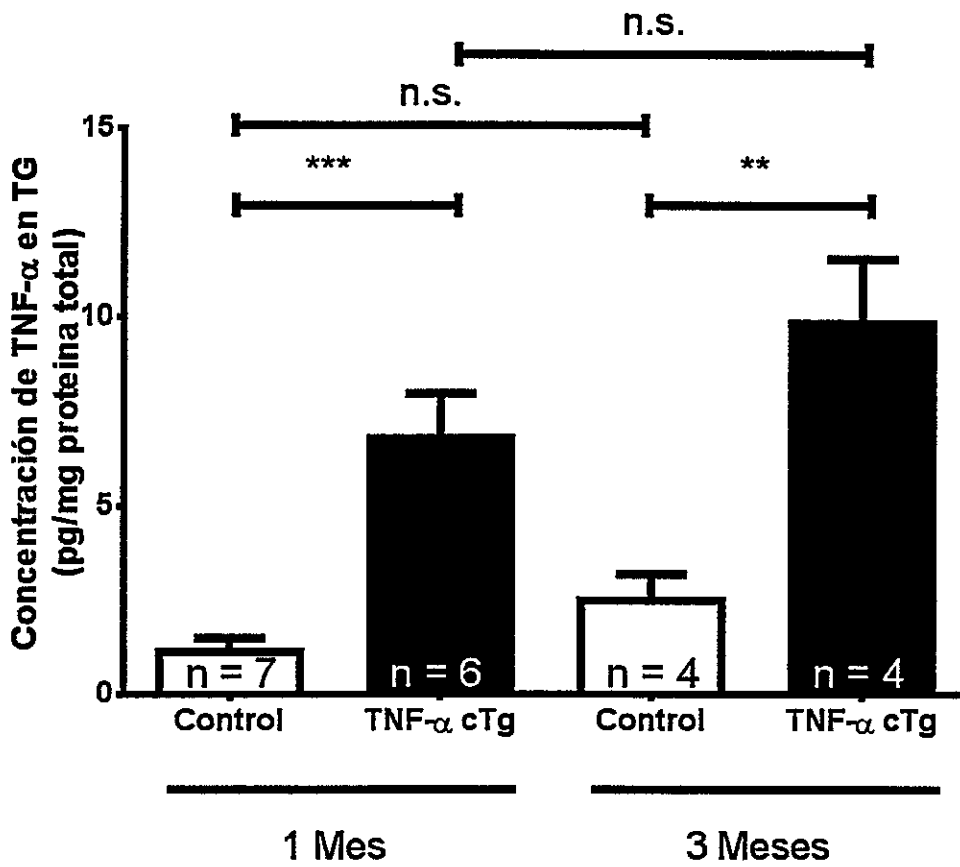


Figura 12. Concentración de TNF- α en los TG a 1 y 3 meses de edad. Se observó un aumento cercano a 4 veces en la concentración proteica de TNF- α en los TG de los ratone cTg a 1 y 3 meses de edad. No existe diferencia entre la cantidad de TNF- α en los TG de los ratones controles ni entre ratones cTg a 1 y 3 meses de edad. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Prueba t-Student, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. n.s.: no significativo.

Además, los niveles de TNF- α fueron analizados mediante inmunofluorescencia de los TG congelados de un ratón control y otro cTg a los 3 meses de edad. Cualitativamente, se observó una mayor inmunoreactividad contra TNF- α en los TG del ratón cTg en comparación con el ratón control (Figura 13).

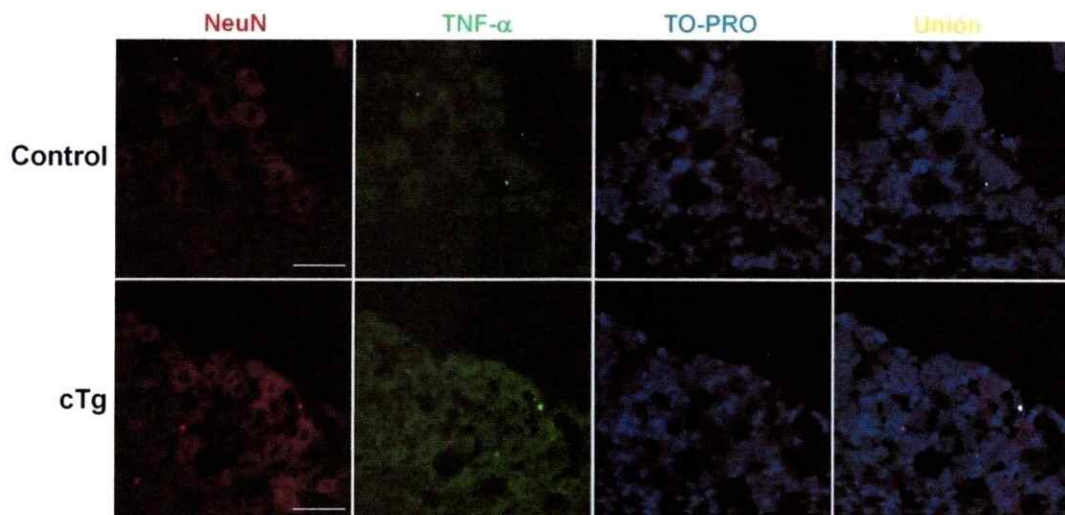


Figura 13. Comparación cualitativa de la inmunoreactividad contra TNF- α en el ganglio trigémino. Se observó un aumento en la inmunoreactividad contra TNF- α en la sección V3 del ganglio trigémino de un ratón cTg en comparación con un control a los 3 meses de edad. Se utilizó NeuN como marcador neuronal y TO-PRO como marcador nuclear. Las fotografías fueron obtenidas con el objetivo 40X. Barras de tamaño: 50 μ m.

7.4 Evaluación del potencial inflamatorio de los ratones cTg en los ganglios trigeminales

Para comparar los posibles desbalances inflamatorios locales producidos por la sobreexpresión de TNF- α se analizaron, tanto en los TG como en cerebro, los niveles de transcritos de distintos mediadores inflamatorios de interés en dolor inflamatorio entre los cuales están: TNF- α , IL-12, IFN- γ , MCP-1, IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β , LIF y OSM (Basbaum y col. 2009). Todos los RT-PCR para estos mediadores fueron optimizados a partir de RNA total obtenido de bazo, ya que se sabe que en este tejido se expresan mediadores inflamatorios en condiciones basales (Athanasakis y Iconomidou 1996; Yamasaki y col. 2003; Al-Banna y col. 2012). A los 3 meses de edad, el perfil de expresión inflamatorio en los TG de los ratones cTg fue distinto a los ratones controles (Figura 14 A y B). Así, además de la sobreexpresión de TNF- α , se observó un aumento significativo en la expresión de IL-6 y MCP-1, ambos mediadores asociados a eventos proinflamatorios (Vallières y Rivest 1999; Xia y Sui 2009). Por el contrario, no se observaron cambios en la expresión de otros mediadores antiinflamatorios, tales como IL-10 o TGF- β 1 (Figura 14, A y B). Como se esperaba, no se observó ningún cambio en todas las citoquinas y quimioquinas analizadas en el cerebro de animales controles y cTg (Figura 14, A y C). Estos resultados indican que la sobreexpresión tejido-específica de TNF- α , producida por modificación genética, altera solo la expresión local de mediadores proinflamatorios (MCP-1 y IL-6), a nivel de mRNA, sin alterar el perfil de expresión inflamatorio del tejido cerebral.

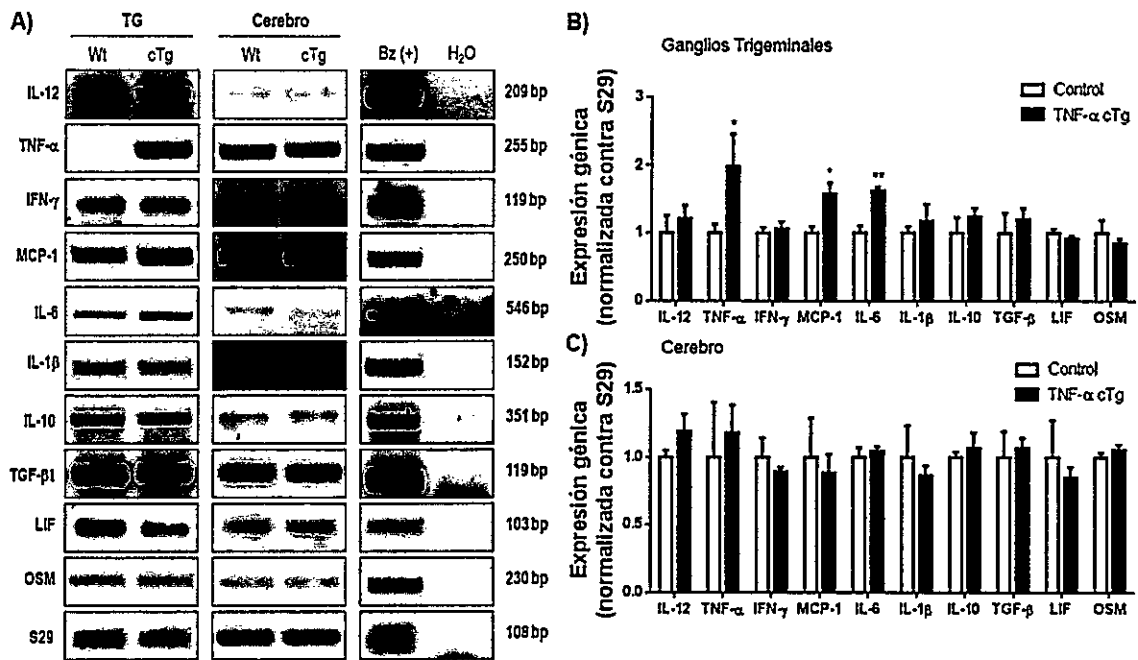


Figura 14. Perfil de expresión de mRNA de mediadores inflamatorios en TG y cerebro de ratones a los 3 meses de edad. Se observó un aumento de IL-6 y MCP1 en los TG de los ratones cTg comparados con controles (A y B). Sin embargo, este desbalance no se observó en el tejido cerebral (A y C). A: Geles representativos de los amplicones obtenidos por RT-PCR. Se utilizó cDNA de bazo a modo de control positivo. B y C: Cuantificación de las bandas de los distintos amplicones analizados en muestras de TG (B) y de cerebro (C). Los datos corresponden al promedio \pm SEM de ratones de 3 meses. Prueba t-Student, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. n: control = 3-7, cTg = 3-5. Bz: Muestra de cDNA de bazo de ratón control.

Se ha reportado que un aumento en la expresión de Iba1, marcador específico de macrófagos/microglías, ocurre en contextos proinflamatorios (Utans y col. 1995; Köhler 2007). Por lo tanto, se analizó la expresión de Iba1 como un indicador del desbalance del potencial inflamatorio en los ratones cTg. Para esto, se analizaron las distintas regiones V1, V2 y V3 en cortes de TG de ratones cTg y control mediante inmunofluorescencia contra Iba1. Se observó un aumento en la cantidad de células Iba1 positivas en las tres regiones del ganglio trigémino de un ratón cTg comparado con el control. Se obtuvo fotografías y se compararon las regiones V3 de cada ratón (Figura 15). Además, se observó diferencias en la distribución de la marca de las células Iba1 positivas, pasando de una marca relativamente homogénea en el citoplasma a un patrón punteado, en el TG de un ratón cTg comparado con el control (inserto magnificado en Figura 15).

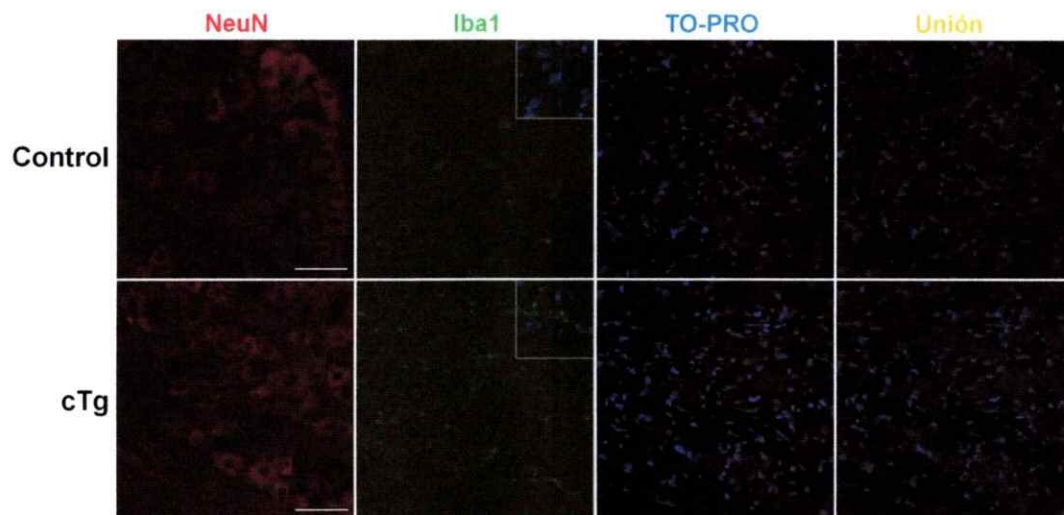


Figura 15. Comparación cualitativa de la inmunoreactividad contra Iba1 en el ganglio trigémino. Se observó un aumento en la inmunoreactividad contra Iba1 en la zona V3 del ganglio trigémino de un ratón cTg en comparación con un ratón control, a los 3 meses de edad. Además, el patrón de la señal de Iba1 cambia de relativamente homogéneo en el citoplasma (control) a uno menos homogéneo pero más intenso (cTg) (inserto magnificado en el panel de Iba1). Las fotografías fueron obtenidas con el objetivo 40X. Barras de tamaño: 50 μm .

7.5 Impacto de la sobreexpresión de TNF- α en los TG sobre la vía de Cdk5/p35

Como primera aproximación sobre el estudio de la regulación de la actividad de Cdk5 *in vivo* mediada por TNF- α , los niveles de mRNA y de proteína de Cdk5 y p35 fueron analizados en los TG de los ratones cTg y controles mediante RT-PCR y Western blot, respectivamente (Figura 16). Se encontró que los niveles de mRNA de Cdk5 y p35 no variaron en los ratones cTg comparados con los controles a 1 y 3 meses de edad. Por su parte, los niveles proteicos de Cdk5 no varían, sin embargo, se observó una tendencia al aumento en los niveles proteicos de p35 en los TG de los ratones cTg con respecto a los controles a 1 y 3 meses de edad (Figura 16, D).

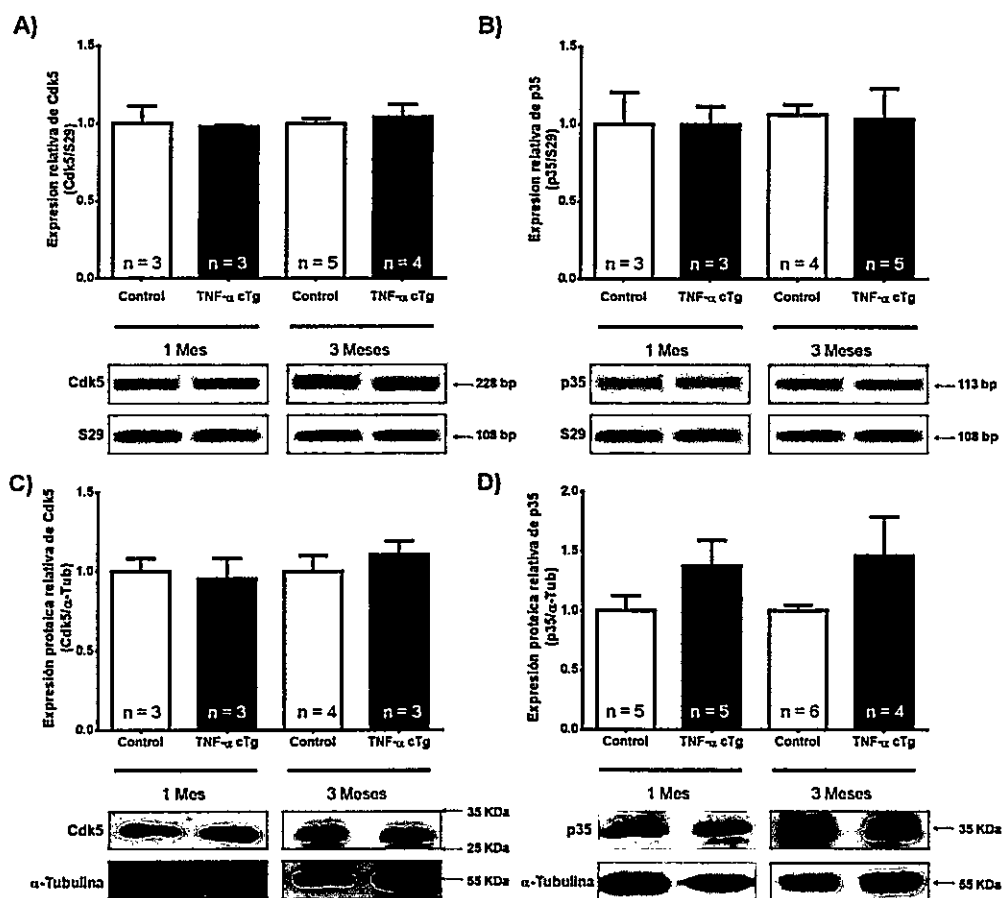


Figura 16. Expresión Cdk5 y de p35 en los TG en ratones cTg y controles a 1 y 3 meses de edad. Cuantificación de RT-PCR y Western blots contra Cdk5 y p35 a partir de extractos de TG. A: La expresión de mRNA de Cdk5 no varía entre los ratones cTg y controles a 1 y 3 meses de edad. B: La expresión de mRNA de p35 no varía entre ratones cTg y controles a 1 y 3 meses de edad. Se presentan imágenes de geles de agarosa representativos de los productos de PCR para Cdk5 y p35. S29 se utilizó como control de carga. El primer carril de cada imagen representativa (A y B) corresponde a una muestra control; el segundo corresponde a una muestra cTg. C: Los niveles proteicos de Cdk5 no cambian entre ratones cTg y controles a 1 y 3 meses de edad. D: Los niveles proteicos de p35 muestran una tendencia al alza en los TG de ratones cTg comparado con los controles a 1 y 3 meses de edad. Se presentan Western blots representativos para cada condición. El primer carril de cada imagen representativa (C y D) corresponde a una muestra de TG de ratón control y el segundo a una muestra de TG de ratón cTg. Se utilizó el Western blot de α -tubulina como control de carga. Los datos se muestran como promedio \pm SEM. Prueba t-Student.



Se comparó cualitativamente la inmunoreactividad contra Cdk5 y p35 en secciones histológicas de TG de ratones cTg y controles mediante inmunofluorescencia (Figura 17). A los 3 meses de edad se observó un aumento en la expresión de Cdk5 y p35 (en verde) en la zona V3 de los TG de ratones cTg en comparación con el tejido control. Además, se observó una diferencia en la localización subcelular de p35 en los cTg desde una zona nuclear/perinuclear en el control hacia la membrana neuronal en el cTg (Figura 17, B).

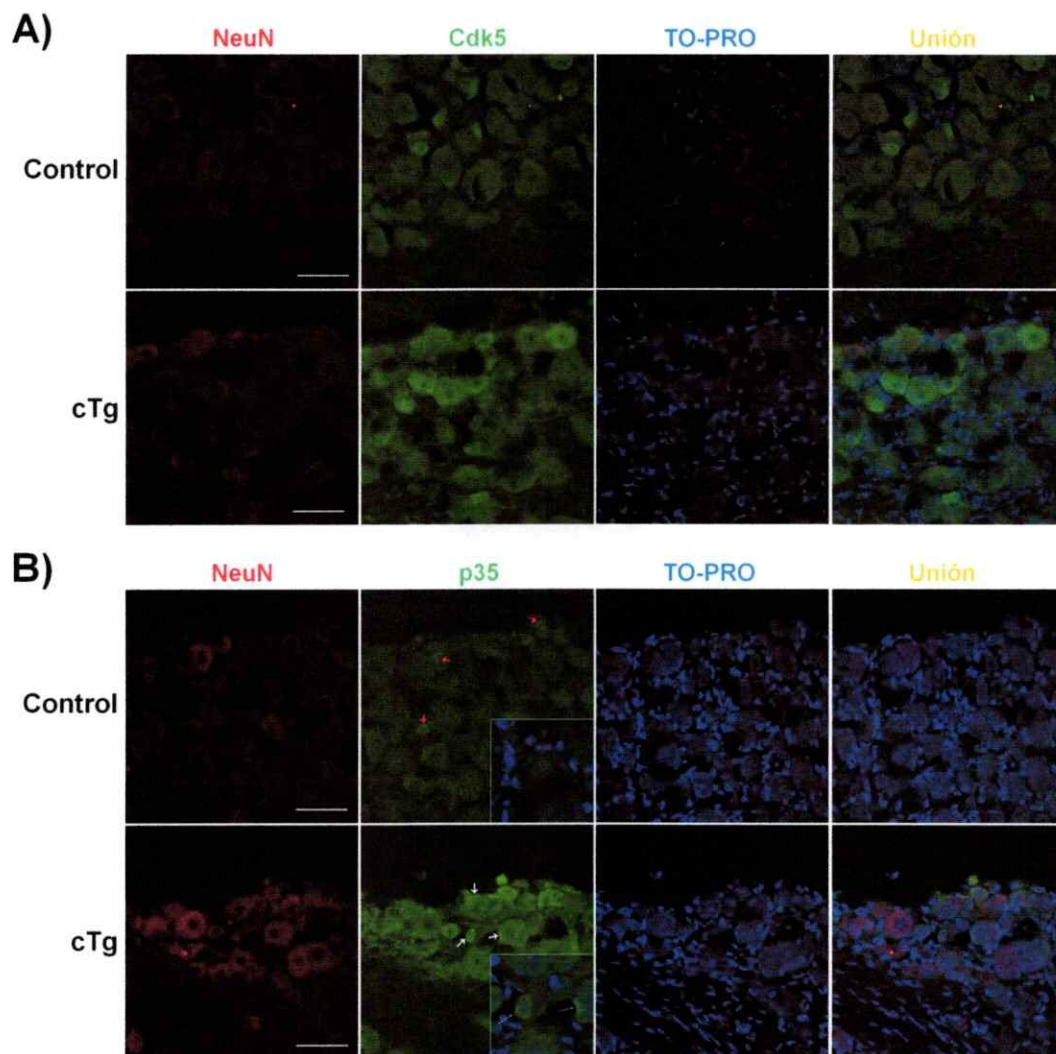


Figura 17. Comparación cualitativa de la inmunoreactividad contra Cdk5 y p35 en TG de ratones cTg y controles. A: La inmunoreactividad de Cdk5 estaba aumentada en los TG del ratón cTg en comparación con el control, a los 3 meses de edad. B: La inmunoreactividad contra p35 también estaba aumentada en los TG del ratón cTg en comparación con el control. Además, se observó un cambio de localización subcelular desde una zona nuclear/perinuclear en el control (flechas rojas), hacía una acumulación en la membrana en el cTg (flechas blancas). Las fotografías corresponden a la zona V3 obtenidas con el objetivo 40X. Barras de tamaño: 50 μ m.

7.6 Evaluación del potencial inflamatorio sistémico del ratón cTg

En consideración del aumento en la expresión de TNF- α en los TG y de su impacto en la expresión de otros mediadores inflamatorios, se analizó la posibilidad de que la sobreexpresión de esta citoquina en el tejido nociceptivo aumentara su concentración sérica y provocara un desbalance inmune sistémico en los ratones cTg. Para esto, la concentración de TNF- α en suero sanguíneo fue medida por ELISA. Los niveles de TNF- α en el suero de animales de 1 mes de edad no mostraron diferencias entre los ratones cTg y controles (Figura 18). Sin embargo, a los 3 meses de edad se observó un aumento de aproximadamente 2,5 veces más en la concentración de esta citoquina en ratones cTg comparado con los ratones control (Figura 18).

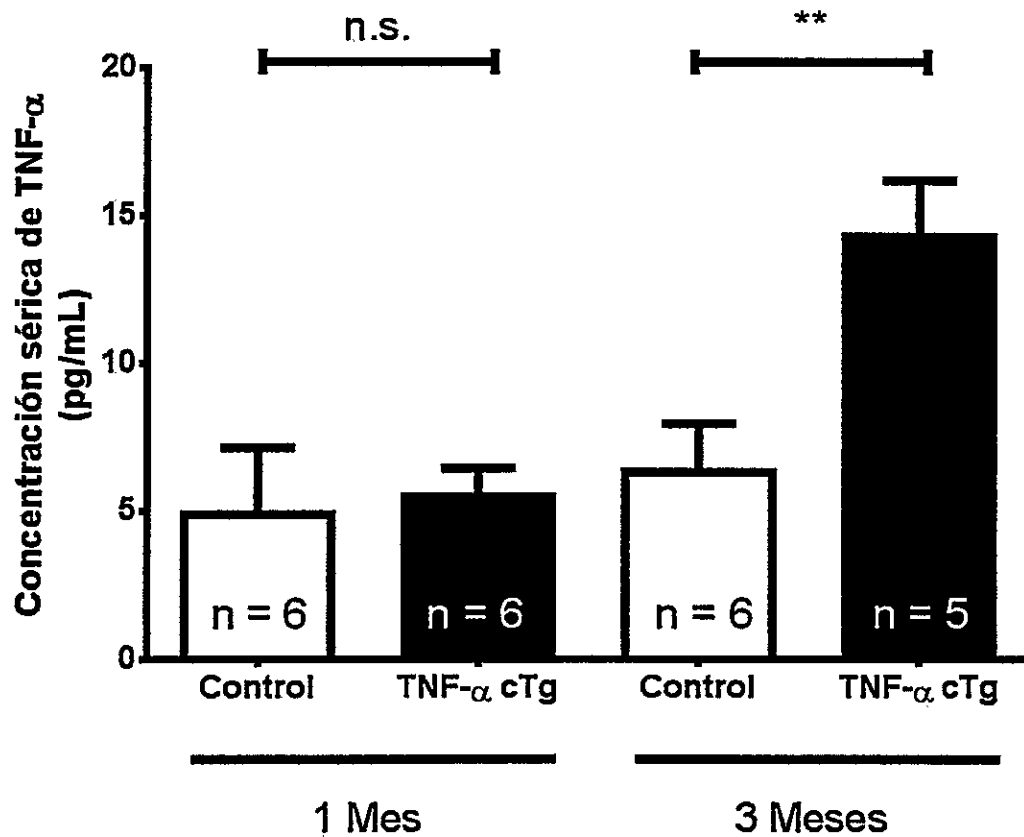


Figura 18. Concentración sérica de TNF- α en los ratones cTg y controles medida por ELISA a 1 y 3 meses de edad. A 1 mes de edad no se observaron diferencias en los niveles sistémicos de TNF- α entre ratones cTg y controles. Sin embargo, a 3 meses de edad se observó un aumento en la concentración sérica de TNF- α en los ratones cTg comparado con los controles. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Prueba t-Student, **: $p < 0,01$. n.s.: no significativo.

Dado el aumento en la concentración sérica de TNF- α a los 3 meses de edad en los ratones cTg, se evaluó mediante CBA la concentración de TNF- α , IL-12, IFN- γ , MCP-1, IL-6 e IL-10, seis mediadores inflamatorios importantes a nivel sistémico cuyo balance representa una medida de la homeostasis inmune del organismo, ya que son proteínas fundamentales en la regulación del inicio y de la mantención de respuestas inmunes frente a distintos tipos de alteraciones patológicas (Xu y col. 2013). Interesantemente, no se observaron diferencias de concentración de ninguna de estas moléculas entre ratones cTg y control, incluyendo TNF- α , mediante esta técnica (Figura 19). La concentración de IL-10 en los ratones cTg y control no pudo ser detectada dada su baja concentración.

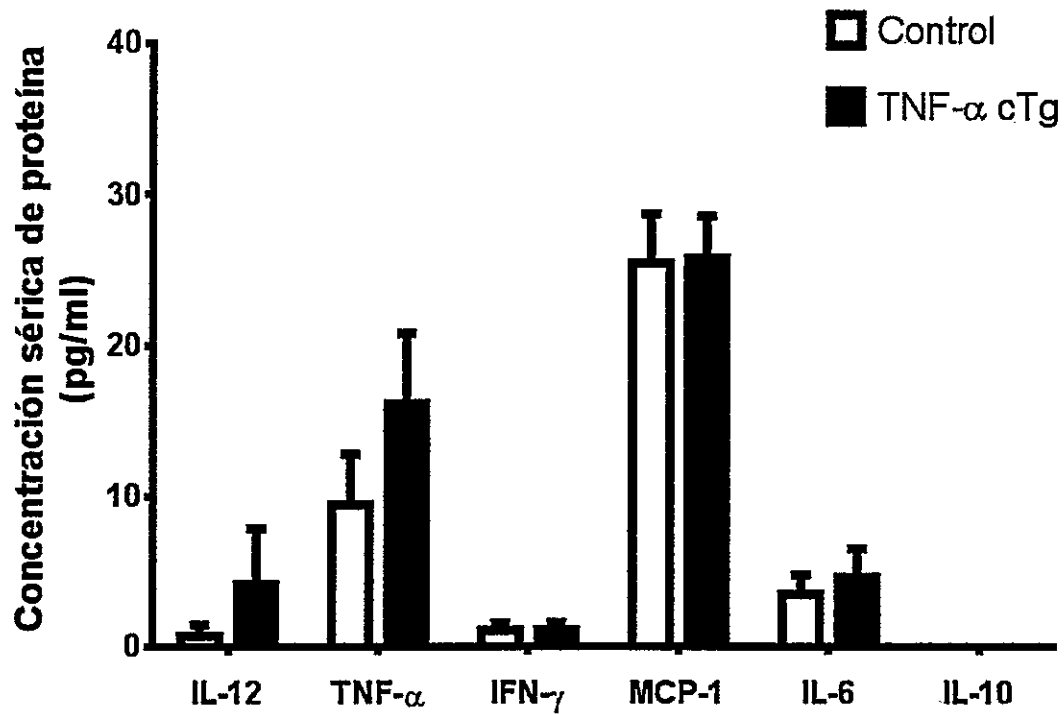


Figura 19. Concentración sérica de varios mediadores inflamatorios a los 3 meses de edad, determinada por CBA. A los 3 meses de edad no se observaron diferencias entre ratones cTg y controles en ninguno de estos seis mediadores críticos en la homeostasis inmune sistémica. Los niveles de IL-10 no pudieron ser detectados dada su baja concentración. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. Prueba t-Student. n: control = 5-6, cTg = 4-5.

En consideración de los ensayos a nivel sistémico, los resultados indican que a los 3 meses de edad existe un aumento en la concentración sérica de TNF- α en ratones cTg, medido por ELISA, que no es detectado por CBA y que no altera la concentración sistémica de IL-12, IFN- γ , MCP-1, IL-6 e IL-10; lo que se correlaciona con la observación visual de ningún fenotipo asociado a enfermedades en curso y la misma ganancia de peso entre ratones cTg y controles.

8 Discusión y conclusiones

Varias han sido las herramientas utilizadas para comprender la participación de TNF- α en el fenómeno del dolor: por ejemplo existen modelos murinos de inflamación provocada por la inyección de CFA, carragenina o formalina; modelos genéticos de migrañas hemipléjicas familiares; modelos de administración de TNF- α a nivel intratecal, administración periférica subcutánea, administración en meninges craneales *in vivo*, etc (Zelenka y col. 2005; Moalem y Tracey 2006; Xu y col. 2010; Zhang y col. 2011; Franceschini y col. 2013). Sin embargo, se ha hecho necesaria la incorporación de nuevos modelos genéticos para responder a preguntas más específicas sobre el mecanismo doloroso gatillado por TNF- α . En este trabajo se generó y caracterizó un nuevo modelo transgénico condicional que sobreexpresa TNF- α en los TG, tejidos claves en la transducción y transmisión de estímulos nocivos, para estudiar la conversación molecular local entre las vías de TNF- α y Cdk5, y así aportar con una nueva herramienta *in vivo* para diseccionar los mecanismos de acción de TNF- α en fenómenos de dolor.

8.1 Sobreexpresión de TNF- α *in vitro* e *in vivo* utilizando el vector TNF- α -pCle

Para generar este nuevo modelo se utilizaron ratones transgénicos portadores del vector TNF- α -pCle (Figura 5). Este vector fue generado por el Dr. Elías Utreras en el laboratorio del Dr. Ashok Kulkarni (Laboratory of Cell and Developmental Biology, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) a partir del vector base pCle diseñado por Bradley, Hyun y colaboradores, para sobreexpresar ubicuamente la proteína HIP1 humana en ratones

knock-out para HIP1 y HIP1r (Bradley y col. 2007) y que se utilizó con éxito en la sobreexpresión de TGF- β 1 específicamente en glándulas salivales de ratón (Hall y col. 2010). Nuestra estrategia consistió en cruzar esta línea transgénica con otra que expresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen SNS, que solo se expresa en neuronas nociceptivas de los TG y DRG (Agarwal y col. 2004; Abrahamsen y col. 2008; Chiu y col. 2013), promoviendo así la escisión de la región EGFP flanqueada por sitios loxP, y dejando la expresión de TNF- α bajo el control del promotor constitutivo de β -actina más los elementos *enhancers* de CMV (Figura 5).

El primer objetivo de este trabajo fue corroborar *in vitro* el funcionamiento de la estrategia de sobreexpresión de TNF- α mediada por estos dos constructos genéticos, pero utilizando un vector que expresa Cre constitutivamente bajo el promotor CMV. Al transfectar la línea celular N2a de neuroblastoma de ratón, con ambos vectores, se observó un aumento en la expresión de mRNA de TNF- α a las 48 h (Figura 7). Esto se condice con resultados preliminares obtenidos por el Dr. Elías Utreras utilizando la línea celular PC12, de feocromocitoma de médula adrenal de rata, donde se observa el mismo fenómeno (datos no publicados). Además de la sobreexpresión de mRNA de TNF- α , se analizaron muestras de sobrenadante de los cultivos por ELISA anti TNF- α , donde los datos de las células transfectadas con ambos vectores sobrepasaba el límite superior de la curva de calibración (1000 pg/mL) por lo que no pudo ser cuantificado (datos no mostrados). Las células no transfectadas no presentaban TNF- α en el medio (datos no mostrados). Esto indica que existe secreción de TNF- α al medio de cultivo en el sistema de N2a a las 48 h post transfección. No se repitieron estas mediciones para ocupar las reacciones de ELISA restantes en las muestras de animales. Por lo tanto,

en estas líneas celulares, estos vectores permiten la sobreexpresión del mensajero de TNF- α y la secreción de la proteína al medio, avalando esta estrategia genética de sobreexpresión de TNF- α en células de neuroblastoma de ratón.

Posteriormente, para la generación de los ratones cTg se cruzaron los ratones TNF- α -pCie con los ratones SNS-Cre. Ambas líneas transgénicas transportan el constructo solo en un alelo (heterocigosis) para evitar posibles efectos deletéreos en la expresión de otros genes si se encontrasen en homocigosis, ya que la inserción de los transgenes en el genoma fue al azar y se desconocen sus sitios específicos. De esta forma, si la inserción irrumpe algún gen o sitio de regulación génica, su efecto podría ser enmascarado por la copia silvestre de ese locus. Además, dado que se desconoce el número de copias de los transgenes insertos y que la transcripción de los genes de interés está gobernada por promotores constitutivos (β -actina a lo largo del desarrollo y toda la vida del organismo; SNS desde perinatal), se asume que la presencia del constructo en heterocigosis es suficiente para garantizar los niveles de expresión deseables.

En cuanto a la caracterización fenotípica de los ratones cTg, mediante inspección visual no se observaron cambios aparentes en la salud, viabilidad o fertilidad de los ratones cTg comparados con sus compañeros de camada controles (Figura 9, A). Los ratones cTg, tanto machos como para hembras, no presentan signos ni síntomas de algún tipo de enfermedad inflamatoria en curso hasta los 5 meses de edad, fecha en la cual se sacrificaron los animales más longevos. Más aun, no existen diferencias en la ganancia de peso de los ratones cTg comparados con los ratones

control (Figura 9, B). Esta primera inspección sugiere que no hay efectos sistémicos asociados a la sobreexpresión de TNF- α en los tejidos nociceptivos.

Posteriormente, se confirmó la sobreexpresión local de TNF- α en los TG de los ratones cTg a 1 y 3 meses de edad. Los niveles de mRNA de TNF- α aumentaron al doble en comparación con los ratones controles a ambas edades analizadas (Figura 11). Además, los niveles proteicos de TNF- α aumentaron aproximadamente cuatro veces en los TG de los ratones cTg comparados con los controles (Figura 12), comprobándose que la sobreexpresión del mRNA conlleva un aumento en la expresión de la proteína. A pesar que la relación mRNA/proteína no necesariamente debe ser igual a 1:1, la medición de los niveles de mRNA a través de RT-PCR clásico podría estar subestimando la cantidad de mensajero de TNF- α . Esto debido a que se miden los niveles en un determinado número de ciclos, en cambio un análisis mediante real-time PCR podría entregar valores en un rango dinámico, haciendo más exacta la medición de la cantidad de TNF- α sobreexpresada. Dada la intensidad de la banda del producto de PCR para TNF- α , es esperable que una cuantificación por real-time PCR entregue una relación de sobreexpresión mayor que 2 veces (cTg sobre controles) como se determinó por RT-PCR clásico.

Por otro lado, no se observaron cambios en la expresión de TNF- α ni de otros mediadores inflamatorios a nivel de mRNA en tejido cerebral (Figura 14, C) lo que sugiere que la sobreexpresión local de TNF- α en los TG, no afecta la expresión de mediadores inflamatorios en el sistema nervioso. Conjuntamente, se observó un aumento cualitativo en la inmunoreactividad contra TNF- α en cortes histológicos de los

TG de un ratón cTg en comparación con un control a 3 meses de edad (Figura 13). Cabe señalar que la expresión de la recombinasa Cre que está bajo el promotor de canal de sodio SNS (Nav1.8) corresponde a la totalidad de las neuronas nociceptivas de pequeño diámetro y a un pequeño porcentaje de neuronas de diámetro grande, los cuales representan solo a un subconjunto de todas las neuronas de los TG (Agarwal y col. 2004). Adicionalmente, en datos no publicados de nuestro laboratorio, se determinó que las neuronas nociceptivas representan aproximadamente un 10% de las células totales en un cultivo primario de células trigeminales de ratón. Por lo tanto, se espera que los niveles de expresión y secreción de TNF- α sean discretos y confinados dentro de los TG.

Dentro de los otros tipos celulares presentes en los TG se encuentran principalmente las células satelitales gliales, los macrófagos, las células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes (Figura 2 y 10) (Thalakoti y col. 2007). Dado el importante papel que desempeña TNF- α en el inicio y mantención de los eventos inflamatorios, es de esperar que la exposición crónica sobre estos tipos celulares desencadene distintas respuestas y afecte el perfil de expresión inflamatorio local.

8.2 Desbalance del perfil inflamatorio en los ganglios trigeminales de los ratones cTg

Se ha descrito que en modelos murinos de migraña o daño al tejido nociceptivo (TG y DRG), ocurre un aumento de la expresión de TNF- α y de otras citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (Cunha y col. 2005; Moalem y Tracey 2006; Basbaum y col. 2009; Franceschini y col. 2013). Las citoquinas que aumentan con mayor frecuencia dentro de los distintos modelos de estudios fueron TNF- α , IL-6, MCP-1, e IL-1 β (Cunha y col. 2005; Moalem y Tracey 2006; Mitchell y col. 2009; Franceschini y col.

2013). Esto no es de extrañar ya que estos mediadores inflamatorios juegan un papel fundamental en el inicio y en el mantenimiento de una respuesta inflamatoria frente a algún daño celular o tisular. En nuestro modelo encontramos que la expresión de los moduladores inflamatorios IL-6 y MCP-1 estaba aumentada en los TG de los ratones cTg en comparación con los controles a 3 meses de edad (Figura 14, A y B). Coincidentemente, se reportó que la expresión de estas proteínas también aumentan durante la inflamación en los TG (Franceschini y col. 2013). Se sabe que IL-6 contribuye a la generación de dolor y a la hiperalgesia en modelos animales (Arruda y col. 1998; Obreja y col. 2002; Cunha y col. 2005), como también lo hace MCP-1 (White y col. 2005; Hackel y col. 2013). Además, IL-6 podría actuar directamente sobre la actividad de Cdk5 ya que se ha reportado que induce la expresión de p35 en cultivos de neuronas hipocámpales de rata (Quintanilla y col. 2004). El aumento de IL-6 y MCP-1 mediado por TNF- α en los TG de los ratones cTg podría deberse directamente a la sobreexpresión de TNF- α , ya que se ha reportado que TNF- α media el aumento de estas citoquinas en otros modelos (Kurokouchi y col. 1998; Langert y col. 2013). En el contexto de estos antecedentes, el aumento en la expresión de estos dos agentes proinflamatorios en nuestro modelo sugieren la generación de hiperalgesia en la región orofacial. Es necesaria la realización de ensayos conductuales de dolor orofacial para dar cuenta de este asunto.

A diferencia del patrón de expresión de las citoquinas mencionadas en los estudios anteriores, en nuestro modelo no ocurre aumento de IL-1 β e IL-10 (Figura 14, A y B). Estas diferencias podrían deberse a los distintos mecanismos celulares y moleculares involucrados en el fenómeno doloroso, o a la temporalidad de los

estímulos en el tejido nervioso, ya que en nuestro modelo la exposición a TNF- α ocurre crónicamente dando tiempo a que mecanismos de compensación y regulación puedan aplacar la pérdida de la homeostasis inmune local. En este sentido, experimentos a estadios más tempranos, complementados con estos resultados, podrían dar cuenta de la evolución del perfil inflamatorio y corroborar si existen o no mecanismos anti-inflamatorios de regulación en este modelo. A su vez, también es necesario considerar que los patrones de expresión corresponden a nivel de mensajero y no representan necesariamente lo que ocurre con la cantidad de proteína de los TG, sin embargo, constituyen una primera aproximación que guíe el curso de las siguientes líneas de investigación que se quieran realizar utilizando estos animales.

La población celular en los TG es heterogénea y la pérdida de la homeostasis inmune puede desencadenar distintos eventos en macrófagos, glías y neuronas (Moalem y Tracey 2006; Franceschini y col. 2013). Aumento de los niveles de TNF- α inducen una activación de macrófagos, es decir, un cambio fenotípico que favorece la fagocitosis, presentación de antígenos, hiperalgesia y reparación tisular, evidenciada principalmente por dos características histológicas: cambios morfológicos, donde los macrófagos aumentan su volumen y disminuye su número de procesos; y un aumento del número de este tipo celular, que son positivos para el marcador Iba1, proteína involucrada en transducción de señales mediadas por calcio específicamente en microglía y macrófagos, y que aumenta su expresión en células estimuladas con agentes proinflamatorios (Deininger y col. 2002; Franceschini y col. 2013). En nuestro estudio se observó un aumento cualitativo en la cantidad de señal de Iba1 en cortes histológicos de TG del ratón cTg comparado con el control, donde la distribución de la

marca cambia de relativamente homogénea en el citoplasma a una menos homogénea pero más intensa que dificulta la observación de células únicas (insertos magnificados Figura 15). A pesar de que no se puede distinguir con claridad un aumento de superficie celular en los cortes ópticos, estas diferencias en el patrón de la marca de Iba1 sugieren un cambio metabólico que evidenciaría la activación de los macrófagos dentro de este tejido nervioso y representaría una medida de la pérdida de la homeostasis inmune en los TG de los ratones cTg. Este punto debe ser confirmado aumentando el número de animales y cuantificando. También se sugiere realizar un análisis de *z-stack* para analizar cambios en volumen.

A su vez, las células satélites gliales, presentes en gran número en los TG pueden responder a TNF- α . Se ha demostrado que son capaces de liberar más TNF- α e IL-1 β , contribuyendo a eventos hiperalgésicos (Takeda y col. 2009), punto que queda disponible para ser analizado en futuros experimentos utilizando marcadores específicos de células satelitales gliales.

Por otra parte, las neuronas nociceptivas son capaces de responder a TNF- α y a otras citoquinas sensibilizando los nociceptores a través del cambio en las propiedades electrofisiológicas, expresión y/o tráfico intracelular de canales y otras proteínas moduladoras (Moalem y Tracey 2006; Basbaum y col. 2009). En este nuevo modelo de dolor inflamatorio se caracterizó el impacto de la sobreexpresión de TNF- α sobre la vía de Cdk5/p35 en la población neuronal, ya que anteriormente se determinó que TNF- α es capaz de aumentar la expresión de p35 y subsecuentemente la actividad de Cdk5 en células PC12 (Utreras y col. 2009; Utreras y col. 2009; Utreras y col. 2011).

En este sentido, se determinó que la expresión de mRNA de Cdk5 y p35 no presenta diferencias en los TG de los ratones cTg comparados con los controles (Figura 16, A y B). Sin embargo, se recomienda realizar real-time PCR para esclarecer los niveles de expresión de mRNA de p35 ya que es el único gen analizado en este trabajo que tiene un solo exón. Todos los otros partidores fueron diseñados para hibridar con exones distintos con el fin de poder discriminar y no sobreestimar la eventual existencia de alguna contaminación de DNA genómico, ya que la secuencia en este DNA incluye las regiones intrónicas entre los exones aumentando el largo del producto de PCR. Por lo tanto, si hubo alguna contaminación presente en las muestras de RT-PCR de p35, no se podrían excluir de la cuantificación ya que los productos son del mismo largo que el cDNA. Si bien en los antecedentes de cultivos celulares existe un aumento en la expresión de p35 al tratar con TNF- α (Utreras y col. 2009; Utreras y col. 2011), en el organismo vivo existe la presencia de otros factores intra e intercelulares que podrían interactuar en esta vía de señalización, ya que las neuronas trigeminales son distintas a las células PC12 (diferencias intracelulares) y que se encuentran en presencia de otros tipos celulares (diferencias intercelulares). Por otro lado, el curso temporal de los experimentos también es un factor a considerar. Los tratamientos con TNF- α *in vitro* son del orden de horas-días, a diferencia de nuestro modelo de exposición crónica a TNF- α , lo que podría dar tiempo a la acción de mecanismos de compensación y/o desensibilización.

Se determinó que la cantidad de proteína de Cdk5 tampoco varía en los TG de los cTg comparados con controles (Figura 16, C), a pesar de que se observó un aumento cualitativo en la inmunoreactividad contra Cdk5 en TG de un ratón cTg en

comparación con un control a los 3 meses de edad (Figura 17, A). Como se observó en células PC12 tratadas con TNF- α (Utreras y col. 2009), es esperable que los niveles de Cdk5 se mantengan constantes frente a este estímulo, como se observa en los resultados de RT-PCR y Western blot. Sin embargo, las diferencias cualitativas observadas en la inmunofluorescencia dan cuenta de un aumento en la inmunoreactividad contra Cdk5 en las neuronas trigeminales. Esto se podría explicar por el efecto de dilución en los homogenizados para Western blot, ya que las neuronas están poco representadas. Por su parte, el hecho de que los niveles de mRNA no cambien, implicaría que en la condición cTg existe una menor degradación de la proteína y/o mayor traducción del pool de mRNA para Cdk5. Nuevas tinciones de inmunofluorescencia debe ser realizadas para aclarar si existe un aumento en los niveles de Cdk5 en las neuronas trigeminales, haciendo interesante el tratar de esclarecer los mecanismos diferentes a las células PC12 que darían cuenta de dicho aumento.

Por otro lado, se observó una tendencia de aumento en los niveles proteicos de p35 en los TG de los ratones cTg comparados con controles a 1 y 3 meses de edad (Figura 16, D). Asimismo, la inmunoreactividad contra p35 demostró un aumento cualitativo en las neuronas y un cambio en su localización celular en los TG del ratón cTg comparado con el control a 3 meses de edad (Figura 17, B). Esto sugiere que la sobreexpresión de TNF- α podría estar afectando la expresión de p35 y por consiguiente la actividad de Cdk5 tal como se reportó tempranamente (Utreras y col. 2009; Nohara y col. 2011). Dada la baja cantidad de células neuronales representadas en los homogenizados de los TG, lo que podría estar ocurriendo en los resultados de

RT-PCR y de Western blot sobre la expresión de p35 es un efecto de dilución lo que haría difícil detectar diferencias en estos tejidos. Por lo tanto, los análisis de inmunofluorescencia se erigen como buenas alternativas para zanjar el impacto de la sobreexpresión de TNF- α sobre la vía de Cdk5/p35. Finalmente, si el aumento de los niveles de p35 y su cambio de localización subcelular en las neuronas es directamente desencadenado por TNF- α , se podría comprobar en cultivos primarios de neuronas de TG silvestres en presencia de TNF- α más antagonistas de sus receptores.

Las células endoteliales del sistema vascular constituyen una cuarta población celular que puede responder frente a este cambio del perfil inflamatorio a nivel de TG. Se ha reportado que MCP-1, la cual aumenta su expresión en los TG de los ratones cTg (Figura 14, B), actúa sobre células endoteliales favoreciendo la vasodilatación y permeabilización del endotelio (Weber y col. 1999; Stamatovic y col. 2003). Estas cascadas de señalización favorecen el reclutamiento y la extravasación de células inmunes. En los eventos inflamatorios periféricos en general, destaca la infiltración de células del sistema inmune innato como macrófagos y monocitos cuyas funciones residen en protección y reparación tisular, entre otras (Serhan y col. 2008). En este sentido, análisis histológicos utilizando el marcador CD11b, el cual es expresado por varias células involucradas en respuestas inmunes innatas tales como granulocitos, monocitos, macrófagos y natural killers, podrían responder la pregunta sobre si existe o no una infiltración de células inmunes en este tejido (Solovjov y col. 2005; Franceschini y col. 2013). Esto podría constituir una interesante línea de investigación sobre la comunicación neurona-sistema inmune iniciada por TNF- α en los tejidos nociceptivos.

Es esperable que el conjunto de todos estos resultados sean extrapolables a lo que sucede en los DRG a lo largo de la columna vertebral, ya que el promotor SNS también se expresa en el tejido nociceptivo de estos ganglios nerviosos. Sería interesante analizar si en estos tejidos ocurre el mismo desbalance en el perfil inflamatorio que en TG y cuál sería la contribución de TNF- α en ese sistema. De existir mecanismos diferenciales entre TG y DRG activados por TNF- α , este modelo murino serviría para el estudio de analgésicos que sean específicos para una región del cuerpo (orofacial o dermatoma específico de algún conjunto de DRGs).

8.3 Impacto de la sobreexpresión local de TNF- α en la homeostasis inmune sistémica

Uno de los aspectos de mayor preocupación en la utilización de este modelo consistía en la posibilidad de que los ratones cTg sufrieran un desbalance inflamatorio sistémico dada la producción crónica de TNF- α , cuyo papel activador de varios eventos inflamatorios y en varios tipos celulares ya ha sido demostrado (Tracey y Cerami 1992; Chu 2013; Ramseyer y Garvin 2013). Para evaluar esta posibilidad, se realizaron los experimentos de ELISA anti TNF- α y CBA en muestras de suero sanguíneo de animales. Los ensayos de ELISA muestran que no existe diferencia en la concentración sérica de TNF- α a 1 mes de edad. Sin embargo, a los 3 meses de edad se evidencia un aumento en la concentración de TNF- α en los ratones cTg bordeando los 15 pg de TNF- α por ml (Figura 18). Una posible explicación a este fenómeno podría ser que parte de la producción de TNF- α en los tejidos nociceptivos actúe localmente y la otra parte difunda hacia la circulación, acumulándose a lo largo del tiempo. No se

descarta la posibilidad de que mecanismos endógenos de regulación destinados a disminuir los niveles de TNF- α , como el clivaje y solubilización de sus receptores (Westlund y col. 2012), estén actuando y se vean sobrepasados a tiempos extensos, como 3 meses de producción crónica. De todas formas, los niveles absolutos de concentración de TNF- α en suero, tanto de los ratones control como cTg, son similares a los reportados en ratones C57Bl/6 en condiciones basales, los cuales no superan los 30 pg por ml (Zhao y col. 2012). Adicionalmente, se ha reportado que ratones BALB/c en condiciones basales poseen alrededor de 10 pg de TNF- α por ml en suero (Yang y col. 2011). En modelos de inflamación inducida por LPS, las concentraciones séricas de TNF- α entran en el orden de ng por ml (Rosas-Ballina y col. 2008). Por lo tanto, si bien hay un aumento en la concentración de TNF- α a los 3 meses de edad en los ratones cTg, entra en un rango fisiológico y no se espera que sea patológico, como se deduce de los perfiles inflamatorios sistémicos por CBA. Siguiendo esta línea, los resultados obtenidos por CBA demuestran claramente que no existe una pérdida de la homeostasis inmune en los ratones cTg a los 3 meses de edad (Figura 19). Mediante esta técnica no se registraron diferencias en los niveles de IL-12, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 e IL-6, entre ratones cTg y controles. Estos seis moduladores son claves en procesos inflamatorios sistémicos, y su concentración representa una medida indirecta del estado inmune del organismo (Xu y col. 2013). Los niveles de IL-10 no fueron detectables en ninguna de las dos categorías genotípicas debido a su baja concentración. Interesantemente, a pesar de que los valores promedios de concentración de TNF- α son semejantes entre las técnicas de ELISA y CBA, mediante esta última no pudimos detectar una diferencia significativa en la concentración de TNF- α entre los ratones cTg y controles como si se observa en los resultados

obtenidos por ELISA, donde en ambas técnicas los valores obtenidos están sobre el límite de detección (>3 pg/mL para ELISA; > 7,3 pg/mL para CBA). Esta diferencia podría atribuirse a distintas variaciones intraensayo (se realizaron en paralelo a las mismas muestras) y/o a la sensibilidad de cada técnica.

En este seminario de título se evaluó un nuevo modelo transgénico condicional que sobreexpresa TNF- α específicamente en tejido nociceptivo para estudiar procesos de dolor inflamatorio gatillados por esta citoquina. Se confirmó la sobreexpresión local de TNF- α , que además promueve la expresión de IL-6 y MCP-1 en los TG. Se sugiere que esta sobreexpresión podría inducir la activación de una población de macrófagos en los TG. Este desbalance local del potencial inflamatorio no afecta los tejidos cerebrales. Si bien los ratones cTg acumulan más TNF- α en el suero que sus compañeros de camada controles a los 3 meses de edad, estos niveles no serían patológicos ya que queda evidenciado al no existir cambios en la concentración sérica de otros mediadores claves en eventos inflamatorios, que son promovidos por TNF- α . Además, la ganancia de peso y la inspección visual apoyan la conclusión de que la homeostasis inmune sistémica no está alterada en los ratones cTg. Por lo tanto, los ratones cTg poseen un desbalance local pero no sistémico del potencial inflamatorio, y constituyen una nueva herramienta para la investigación del papel de Cdk5 en dolor, además del estudio de otros mecanismos moleculares y celulares involucrados en la interacción neuro-inmune gatilladas por TNF- α .

9 Referencias

- Abrahamsen, B., J. Zhao, y col. (2008). "The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain." Science (New York, N.Y.) **321**(5889): 702-705.
- Abu-Saad Huijjer, H. (2010). "Chronic pain: a review." Le Journal médical libanais. The Lebanese medical journal **58**(1): 21-27.
- Agarwal, N., S. Offermanns, y col. (2004). "Conditional gene deletion in primary nociceptive neurons of trigeminal ganglia and dorsal root ganglia." Genesis (New York, N.Y. : 2000) **38**(3): 122-129.
- Al-Banna, N., R. Raghupathy, y col. (2012). "Induction of cytokines in different organs after intranasal inoculation of *Campylobacter jejuni* in mice." Gut pathogens **4**(1): 23.
- Aley, K. y J. Levine (1999). "Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **19**(6): 2181-2186.
- Arruda, J., R. Colburn, y col. (1998). "Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain." Brain research. Molecular brain research **62**(2): 228-235.
- Athanassakis, I. y B. Iconomidou (1996). "Cytokine production in the serum and spleen of mice from day 6 to 14 of gestation: cytokines/placenta/spleen/serum." Developmental immunology **4**(4): 247-255.
- Basbaum, A., D. Bautista, y col. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." Cell **139**(2): 267-284.
- Benoliel, R., J. Epstein, y col. (2007). "Orofacial pain in cancer: part I—mechanisms." Journal of dental research **86**(6): 491-505.
- Bertelli, A., M. Falchi, y col. (2008). "Analgesic resveratrol?" Antioxid Redox Signal **10**(3): 403-404.
- Bórquez, D., C. Olmos, y col. (2013). "Bioinformatic survey for new physiological substrates of Cyclin-dependent kinase 5." Genomics **101**(4): 221-228.
- Bowen, E., T. Schmidt, y col. (2006). "Tumor necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression and secretion from rat trigeminal ganglion neurons." Journal of neurochemistry **96**(1): 65-77.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**: 248-254.
- Bradley, S., T. Hyun, y col. (2007). "Degenerative phenotypes caused by the combined deficiency of murine HIP1 and HIP1r are rescued by human HIP1." Human molecular genetics **16**(11): 1279-1292.
- Carswell, E., L. Old, y col. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Caterina, M., M. Schumacher, y col. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.
- Constantin, C., N. Mair, y col. (2008). "Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(19): 5072-5081.

- Contreras-Vallejos, E., E. Utreras, y col. (2012). "Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5." Cell Signal **24**(1): 44-52.
- Cunha, F., S. Poole, y col. (1992). "The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia." British journal of pharmacology **107**(3): 660-664.
- Cunha, T., W. Verri, y col. (2005). "A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1755-1760.
- Chiu, I., B. Heesters, y col. (2013). "Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation." Nature **501**(7465): 52-57.
- Chu, W.-M. (2013). "Tumor necrosis factor." Cancer letters **328**(2): 222-225.
- Deininger, M., R. Meyermann, y col. (2002). "The allograft inflammatory factor-1 family of proteins." FEBS Lett **514**(2-3): 115-121.
- Dhavan, R. y L.-H. Tsai (2001). "A decade of CDK5." Nature Reviews Molecular Cell Biology **2**(10): 749-759.
- Ellis, A. y D. Bennett (2013). "Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain." British journal of anaesthesia **111**(1): 26-37.
- Franceschini, A., S. Vilotti, y col. (2013). "TNF α levels and macrophages expression reflect an inflammatory potential of trigeminal ganglia in a mouse model of familial hemiplegic migraine." PLoS One **8**(1).
- Hackel, D., D. Pflücke, y col. (2013). "The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain." PLoS One **8**(5).
- Haenchen, S., J. Utter, y col. (2010). "Role of a cdk5-associated protein, p35, in herpes simplex virus type 1 replication in vivo." Journal of neurovirology **16**(5): 405-409.
- Hall, B., C. Zheng, y col. (2010). "Conditional overexpression of TGF-beta1 disrupts mouse salivary gland development and function." Lab Invest **90**(4): 543-555.
- Harada, T., T. Morooka, y col. (2001). "ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1." Nature cell biology **3**(5): 453-459.
- Hendrich, J., P. Alvarez, y col. (2012). "In vivo and in vitro comparison of female and male nociceptors." The journal of pain : official journal of the American Pain Society **13**(12): 1224-1231.
- Hensellek, S., P. Brell, y col. (2007). "The cytokine TNFalpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation." Molecular and cellular neurosciences **36**(3): 381-391.
- Hohlfeld, R. (2008). "Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: relevance for repair strategies in multiple sclerosis?" Journal of the neurological sciences **265**(1-2): 93-96.
- Ji, R., Y. Kawasaki, y col. (2007). "Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain." Springer: 359-389.
- Kerschensteiner, M., E. Meini, y col. (2010). "Neuro-immune crosstalk in CNS diseases." Results and problems in cell differentiation **51**: 197-216.
- Kidd, B. y L. Urban (2001). "Mechanisms of inflammatory pain." British journal of anaesthesia **87**(1): 3-11.
- Köhler, C. (2007). "Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis." Cell and tissue research **330**(2): 291-302.
- Kuner, R. (2010). "Central mechanisms of pathological pain." Nat Med **16**(11): 1258-1266.

- Kurokouchi, K., F. Kambe, y col. (1998). "TNF-alpha increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF-kappaB in osteoblast-like ROS17/2.8 cells." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research **13**(8): 1290-1299.
- Lalioi, V., D. Pulido, y col. (2010). "Cdk5, the multifunctional surveyor." Cell cycle (Georgetown, Tex.) **9**(2): 284-311.
- Langert, K., C. Von Zee, y col. (2013). "Tumour necrosis factor α enhances CCL2 and ICAM-1 expression in peripheral nerve microvascular endoneurial endothelial cells." ASN neuro **5**(1).
- Luo, F., C. Yang, y col. (2008). "Reversal of chronic inflammatory pain by acute inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **325**(1): 267-275.
- Mantyh, P. (2006). "Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life." Nature reviews. Neuroscience **7**(10): 797-809.
- Marchand, F., M. Perretti, y col. (2005). "Role of the immune system in chronic pain." Nature reviews. Neuroscience **6**(7): 521-532.
- Mika, J., M. Zychowska, y col. (2013). "Importance of glial activation in neuropathic pain." European journal of pharmacology.
- Milligan, E., K. Penzkover, y col. (2012). "Spinal interleukin-10 therapy to treat peripheral neuropathic pain." Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society **15**(6): 520.
- Mitchell, K., H. Y. T. Yang, y col. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 in the choroid plexus: a potential link between vascular pro-inflammatory mediators and the CNS during peripheral tissue inflammation." Neuroscience **158**(2): 885-895.
- Moalem, G. y D. Tracey (2006). "Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain." Brain research reviews **51**(2): 240-264.
- Morikawa, Y., S. Tamura, y col. (2004). "Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **24**(8): 1941-1947.
- Nicol, G., J. Lopshire, y col. (1997). "Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **17**(3): 975-982.
- Nohara, A., S. Okada, y col. (2011). "Cyclin-dependent kinase-5 is a key molecule in tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance." J Biol Chem **286**(38): 33457-33465.
- Obreja, O., M. Schmelz, y col. (2002). "Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo." Pain **96**(1-2): 57-62.
- Paola, S., A. Andrea, y col. (2006). "Proinflammatory Cytokines, Adhesion Molecules, and Lymphocyte Integrin Expression in the Internal Jugular Blood of Migraine Patients Without Aura Assessed Ictally." Headache: The Journal of Head and Face Pain **46**.
- Pareek, T., J. Keller, y col. (2007). "Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 660-665.
- Pareek, T., J. Keller, y col. (2006). "Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 791-796.
- Pareek, T. y A. Kulkarni (2006). "Cdk5: a new player in pain signaling." Cell cycle (Georgetown, Tex.) **5**(6): 585-588.

- Prochazkova, M., A. Terse, y col. (2013). "Activation of cyclin-dependent kinase 5 mediates orofacial mechanical hyperalgesia." Mol Pain 9: 66.
- Quintanilla, R., D. Orellana, y col. (2004). "Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway." Experimental cell research 295(1): 245-257.
- Ramseyer, V. y J. Garvin (2013). "Tumor necrosis factor- α : regulation of renal function and blood pressure." Am J Physiol Renal Physiol 304(10): 42.
- Rosas-Ballina, M., M. Ochani, y col. (2008). "Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia." Proc Natl Acad Sci U S A 105(31): 11008-11013.
- Savarin, C. y C. Bergmann (2008). "Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved." Current opinion in pharmacology 8(4): 472-479.
- Scholz, J. y C. Woolf (2002). "Can we conquer pain?" Nature neuroscience 5 Suppl: 1062-1067.
- Scholz, J. y C. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nature neuroscience 10(11): 1361-1368.
- Serhan, C., N. Chiang, y col. (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." Nature reviews. Immunology 8(5): 349-361.
- Shen, C.-H., R.-Y. Tsai, y col. (2012). "Role of neuroinflammation in morphine tolerance: effect of tumor necrosis factor- α ." Acta anaesthesiologica Taiwanica : official journal of the Taiwan Society of Anesthesiologists 50(4): 178-182.
- Shinal, R. y R. Fillingim (2007). "Overview of orofacial pain: epidemiology and gender differences in orofacial pain." Dental clinics of North America 51(1): 1.
- Solovjov, D., E. Pluskota, y col. (2005). "Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin α 5 β 2." J Biol Chem 280(2): 1336-1345.
- Sommer, C., T. Lindenlaub, y col. (2001). "Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy." Brain Res 913(1): 86-89.
- Stamatovic, S., R. Keep, y col. (2003). "Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase." Journal of cell science 116(Pt 22): 4615-4628.
- Takeda, M., M. Takahashi, y col. (2009). "Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain." Neuroscience and biobehavioral reviews 33(6): 784-792.
- Thalakoti, S., V. Patil, y col. (2007). "Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology." Headache 47(7): 1008.
- Tracey, K., B. Beutler, y col. (1986). "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin." Science (New York, N.Y.) 234(4775): 470-474.
- Tracey, K. y A. Cerami (1992). "Tumor necrosis factor in metabolism of disease: hormonal actions versus local tissue effects." Nouvelle revue française d'hématologie 34 Suppl: 42.
- Utans, U., R. Arceci, y col. (1995). "Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection." J Clin Invest 95(6): 2954-2962.
- Utreras, E., A. Futatsugi, y col. (2009). "Molecular Roles of Cdk5 in Pain Signaling." Drug discovery today. Therapeutic strategies 6(3): 105-111.

- Utreras, E., A. Futatsugi, y col. (2009). "Tumor necrosis factor-alpha regulates cyclin-dependent kinase 5 activity during pain signaling through transcriptional activation of p35." J Biol Chem **284**(4): 2275-2284.
- Utreras, E., J. Keller, y col. (2012). "Transforming growth factor- β 1 regulates Cdk5 activity in primary sensory neurons." J Biol Chem **287**(20): 16917-16929.
- Utreras, E., M. Prochazkova, y col. (2013). "TGF- β 1 sensitizes TRPV1 through Cdk5 signaling in odontoblast-like cells." Mol Pain **9**: 24.
- Utreras, E., A. Terse, y col. (2011). "Resveratrol inhibits Cdk5 activity through regulation of p35 expression." Mol Pain **7**: 49.
- Vallières, L. y S. Rivest (1999). "Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia." Endocrinology **140**(9): 3890-3903.
- Velázquez, K. T., H. Mohammad, y col. (2007). "Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms." Pharmacological research **55**(6): 578-589.
- Verri, W., R. Molina, y col. (2005). "Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin (ET) acting on ETB receptors in rats." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **315**(2): 609-615.
- Wang, Z.-H., X.-Y. Zeng, y col. (2012). "Interleukin-10 of red nucleus plays anti-allodynia effect in neuropathic pain rats with spared nerve injury." Neurochem Res **37**(8): 1811-1819.
- Watkins, L., M. Hansen, y col. (1999). "Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β : molecular biology for non-molecular biologists." Life sciences **65**(5): 449-481.
- Weber, K., P. Nelson, y col. (1999). "Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **19**(9): 2085-2093.
- Westlund, K., L. Zhang, y col. (2012). "Chronic inflammation and pain in a tumor necrosis factor receptor (TNFR) (p55/p75-/-) dual deficient murine model." Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine **160**(1): 84-94.
- White, F., S. Bhangoo, y col. (2005). "Chemokines: integrators of pain and inflammation." Nature reviews. Drug discovery **4**(10): 834-844.
- Woolf, C. (2010). "What is this thing called pain?" J Clin Invest **120**(11): 3742-3744.
- Wu, Z., S. Wang, y col. (2013). "Full-length membrane-bound tumor necrosis factor- α acts through tumor necrosis factor receptor 2 to modify phenotype of sensory neurons." Pain.
- Xia, M. y Z. Sui (2009). "Recent developments in CCR2 antagonists." Expert opinion on therapeutic patents **19**(3): 295-303.
- Xie, W.-Y., Y. He, y col. (2009). "Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**(11): 3551-3564.
- Xing, B.-M., Y.-R. Yang, y col. (2012). "Cyclin-dependent kinase 5 controls TRPV1 membrane trafficking and the heat sensitivity of nociceptors through KIF13B." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **32**(42): 14709-14721.

- Xu, J.-T., H.-Y. Tu, y col. (2007). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats." Exp Neurol **206**(2): 269-279.
- Xu, X.-J., Y.-M. Tang, y col. (2013). "A multiplex cytokine score for the prediction of disease severity in pediatric hematology/oncology patients with septic shock." Cytokine.
- Xu, Z.-Z., L. Zhang, y col. (2010). "Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions." Nat Med **16**(5): 592.
- Yamasaki, M., H. Chujo, y col. (2003). "Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes is modulated in C57BL/6J mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid." The Journal of nutrition **133**(3): 784-788.
- Yang, H., C. Wei, y col. (2012). "Association of TLR4 gene non-missense single nucleotide polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population." Rheumatol Int.
- Yang, Y.-R., Y. He, y col. (2007). "Activation of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia." Pain **127**(1-2): 109-120.
- Yang, Y., H. Wang, y col. (2011). "Colitogenic role of tumour necrosis factor (TNF) receptors in trinitrobenzene sulphonic acid colitis: TNF-R1 ablation does not affect systemic inflammatory response." Clinical and experimental immunology **165**(3): 372-382.
- Zager, R. A. (2005). "Parenteral iron treatment induces MCP-1 accumulation in plasma, normal kidneys, and in experimental nephropathy." Kidney Int **68**(4): 1533-1542.
- Zegpi, C., J. P. Miranda, y col. (2008). "Prevalencia de Dolor Orofacial en la Unidad de Dolor y Cuidados Paliativos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile." Revista El Dolor **49**: 16-18.
- Zelenka, M., M. Schäfers, y col. (2005). "Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain." Pain **116**(3): 257-263.
- Zhang, X.-C., V. Kainz, y col. (2011). "Tumor necrosis factor- α induces sensitization of meningeal nociceptors mediated via local COX and p38 MAP kinase actions." Pain **152**(1): 140-149.
- Zhao, J., J. Zhang, y col. (2012). "Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells." Oncogene.