



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES ACTIVADORES DE LA
TRANSCRIPCIÓN 2, 3 Y 4 EN LA MODULACIÓN DEL DOLOR
NEUROPÁTICO EN LA RATA**

Tesis que presenta

M. en C. Ana Belen Salinas Abarca

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Director de Tesis: **Dr. Vinicio Granados Soto**

Ciudad de México

Agosto, 2018

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio de neurobiología del dolor (No. 12) del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav, Sede Sur) bajo la dirección del Dr. Vinicio Granados Soto.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de doctorado No. 277977 y del proyecto CB-2012/179294 otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Vinicio Granados por guiarme y formarme como investigadora, pero también por brindarme su amistad y apoyo en los momentos complicados de la vida. Hoy más que nunca reconozco que hice una excelente elección de tutor para la realización de esta tesis y me voy con la satisfacción de saber que aprendí del mejor. Todas sus enseñanzas son invaluable.

A mi sínodo: Dra. Claudia, Dr. Alonso, Dr. Miguel y Dr. Ricardo, gracias por mostrarme que no hay verdades absolutas, por enseñarme que siempre hay otra forma de interpretar los resultados, por las observaciones realizadas en el transcurso del proyecto y por tener el tiempo y la disposición de revisar y discutir mis resultados.

A la M. en C. Guadalupe Vidal Cantú por apoyarme académica y moralmente estos años y por todas las atenciones recibidas desde mi llegada al laboratorio.

A mis amigos: Hazael, Eduardo, Yarim, Angie, Cindy, Mali, Liz, Itzel, Isabel, Úrzula, Erick, Erika y Alejandro, por estar a mi lado y apoyarme en los buenos y malos momentos, por nunca dejarme caer y darme una palabra de aliento para seguir adelante y por hacer tan ameno el tiempo compartido, los quiero mucho.

A todas las personas que forman parte del Cinvestav-Sede Sur (personal de académico, administrativo, de bioterio, vigilancia e intendencia), ustedes facilitan el aprendizaje y hacen que el lugar de convivencia sea el adecuado para el desarrollo académico, personal y emocional.

¡Muchas Gracias!

Dedico esta tesis a las personas más importantes de mi vida, mi familia. Ustedes que me brindan su apoyo incondicional y que están siempre que los necesito sin importar la hora, día o situación en la que me encuentre. Porque a pesar de tantas adversidades siempre estamos apoyándonos: los amo.

Inicié este proyecto sola y en el trayecto llegaste tú mi pequeña Lía. Ahora no puedes leer estas palabras pero algún día lo harás y quiero que sepas que tú fuiste mi mayor motivación y ese motor que me hacía levantarme y llegar al laboratorio contenta con las ganas de ser mejor cada día. Tu amor, sonrisa y besos son la razón de mi felicidad, esfuerzo y entusiasmo por buscar lo mejor para ti. Tú eres lo mejor de mi vida, te amo.

ÍNDICE

	Página
I. Abreviaturas.....	V
II. Índice de tablas y figuras.....	VIII
III. Resumen.....	1
IV. Abstract.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Dolor.....	3
1.1.1. Neuronas sensoriales nociceptivas.....	5
1.2. Clasificación del dolor.....	7
1.2.1. Dolor neuropático.....	8
1.3. Mecanismos involucrados en el dolor neuropático.....	8
1.3.1. Actividad neuronal ectópica.....	10
1.3.2. Sensibilización periférica.....	10
1.3.3. Sensibilización central.....	12
1.3.3.1. Alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica	12
1.3.3.2. Pérdida del control inhibitor tónico.....	13
1.3.3.3. Interacciones glía-neurona.....	15
1.4. Factores de transcripción.....	16
1.4.1. Familia de factores activadores de la transcripción.....	17
1.5. ATF2.....	18
1.5.1. Antecedentes del ATF2 en el dolor.....	20
1.6. ATF3.....	21
1.6.1. Antecedentes del ATF3 en el dolor.....	22
1.7. ATF4.....	23
1.7.1. Antecedentes del ATF4 en el dolor.....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVO GENERAL.....	29
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30

6.1. Animales.....	30
6.2. Inducción de neuropatía por el modelo de ligadura de los nervios espinales L5-L6.....	30
6.3. Evaluación de la conducta nociceptiva.....	30
6.4. Extracción de tejido para <i>Western blot</i>	31
6.5. <i>Western blot</i>	32
6.6. Extracción de tejido para inmunohistoquímica.....	33
6.7. Inmunohistoquímica.....	33
6.8. Microscopía confocal, análisis de imágenes y cuantificación del tamaño celular.....	34
6.9. RT-PCR semi-cuantitativa <i>anidada</i>	35
6.10. Preparación de los siRNA y los anticuerpos neutralizantes....	36
6.11. Inyección intratecal directa.....	37
6.12. Diseño experimental.....	37
6.12.1. Expresión de proteínas.....	37
6.12.2. Localización de los ATFs en los GRDs y en la médula espinal.....	38
6.12.3. Tratamiento con los siRNAs.....	38
6.12.4. Tratamiento con los anticuerpos Anti-ATFs.....	39
6.13. Análisis de datos y estadística.....	39
7. RESULTADOS	41
7.1. ATF2.....	41
7.1.1. Expresión del ATF2 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.....	41
7.1.2. Localización y distribución celular del ATF2.....	42
7.1.3. Cuantificación de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L4, L5 y L6.....	44
7.1.4. Distribución del tamaño de las neuronas que expresan al ATF2 en los GRDs L4, L5 y L6.....	45
7.1.5. Inmunorreactividad del ATF2 en la médula espinal.....	48

7.1.6. Cuantificación de la inmunorreactividad del ATF2 en la médula espinal.....	50
7.1.7. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF2 sobre el umbral nociceptivo mecánico.....	51
7.1.8. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF2 sobre el umbral nociceptivo térmico.....	51
7.1.9. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 sobre la expresión de su ARN mensajero.....	53
7.1.10. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 sobre la expresión del ARN mensajero de los genes <i>Trpv1</i> y <i>Trpv2</i>	54
7.2. ATF3.....	56
7.2.1. Expresión del ATF3 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.....	56
7.2.2. Inmunorreactividad del ATF3 en los GRDs.....	57
7.2.3. Inmunorreactividad del ATF3 en la médula espinal.....	59
7.2.4. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF3 sobre el umbral nociceptivo mecánico.....	61
7.2.5. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF3 sobre el umbral nociceptivo térmico.....	62
7.2.6. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 sobre la expresión de su ARN mensajero.....	63
7.3. ATF4.....	65
7.3.1. Expresión del ATF4 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6.....	65

7.3.2. Inmunorreactividad del ATF4 en los GRDs.....	66
7.3.3. Inmunorreactividad del ATF4 en la médula espinal.....	68
7.3.4. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF4 sobre el umbral nociceptivo mecánico.....	70
7.3.5. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF4 sobre el umbral nociceptivo térmico.....	71
7.3.6. Efecto de la administración intratecal del siRNA del ATF4 sobre la expresión de su ARN mensajero.....	72
7.4. Controles de la inmunofluorescencia.....	73
7.5. Evaluación de la integridad del tejido.....	73
8. DISCUSIÓN.....	75
8.1. ATF2 y dolor neuropático.....	75
8.1.1. ATF2, <i>Trpv1</i> y <i>Trpv2</i>	76
8.2. Localización del ATF2 en los GRDs y en la médula espinal.....	77
8.3. ATF3 y dolor neuropático.....	78
8.4. Localización del ATF3 en los GRDs y en la médula espinal.....	79
8.5. ATF4 y dolor neuropático.....	80
8.6. Localización del ATF4 en los GRDs y en la médula espinal.....	81
8.7. Disminución de la inmunorreactividad de CGRP e IB4.....	82
9. CONCLUSIONES.....	83
10. PERSPECTIVAS.....	84
11. REFERENCIAS.....	85
12. ANEXOS.....	106

I. ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína serina-treonina cinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATF	Factor activador de la transcripción
ATF/CRE	Secuencia motivo TGACGTCA
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bZip	Región básica y cierre de leucina
Ca²⁺	Ion calcio
CaMK	Proteína cinasa calcio calmodulina II
CBP	Proteína de unión a CREB
CCL-2	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
c-Jun	Cinasa c-Jun amino terminal
Cl⁻	Ion cloruro
COX	Ciclooxigenasa
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CXCL1	Quimiocina ligando 1 motivo C-X-C
CXCL5	Quimiocina ligando 5 motivo C-X-C
DAG	Diacilglicerol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EPSC	Corrientes post-sinápticas excitadoras
ErB2	Neuregulina
ERK	Proteína cinasa activada por señales extracelulares

g	Fuerza centrífuga relativa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDNF	Factor de crecimiento derivado de células gliales
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
HCl	Ácido clorhídrico
HTM	Mecanoreceptor de alto umbral
i.t.	Intratecal
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
IB4	Isolectina B4 de unión a D-galactosa
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
K⁺	Ion potasio
KCC2	Cotransportador de K ⁺ -2Cl ⁻
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MMP2	Metaloproteinasa de matriz extracelular 2
MMP9	Metaloproteinasa de matriz extracelular 9
Na²⁺	Ion sodio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NKCC1	Cotransportador de Na ⁺ - K ⁺ - 2Cl ⁻
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
p38 MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos p-38

PAD	Despolarización de la neurona aferente primaria
PBS	Amortiguador fosfato-salino
pH	Potencial de hidrogeno
PI3K	Proteína cinasa fosfatidil inositol 3
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
Ras	Proteína GTPasa pequeña de subunidad simple
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RRD	Reflejos de raíz dorsal
SCG	Ganglio cervical superior
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Sham	Falsamente operada
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TPB	Proteína de unión a la caja TATA
TrkA	Receptor tirosina-cinasa A
TrkB	Receptor tirosina cinasa B
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPV1	Receptor vaniloide de potencial transitorio 1
TRPV2	Receptor vaniloide de potencial transitorio 2
UPR	Proteína de respuesta no codificable.
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VGCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Etiología y tipos de dolor neuropático.....	9
Tabla 2.	Miembros de la familia de ATFs.....	19
Tabla 3.	Clasificación funcional de los genes blanco del ATF2	21
Tabla 4.	Genes regulados por el ATF3.....	23
Tabla 5.	Cuantificación de la inmunorreactividad del ATF2, IB4 y CGRP en los GRDs L4, L5 y L6.....	46
Tabla 6.	Cuantificación de la inmunorreactividad del ATF2 en el asta dorsal de la médula espinal.....	51

FIGURAS

Figura 1.	Circuito del dolor.....	4
Figura 2.	Diversidad de las neuronas somatosensoriales en la piel.....	7
Figura 3.	Expresión de la proteína ATF2 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal.....	41
Figura 4.	Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L4, L5 y L6.....	42
Figura 5.	Localización celular de la inmunorreactividad del ATF2 en el GRD L6.....	43
Figura 6.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L4, L5 y L6 de ratas <i>sham</i>	43
Figura 7.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L4, L5 y L6 de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6 (21 días).....	44
Figura 8.	Distribución del ATF2 respecto al tamaño de las neuronas del GRD L4, L5 y L6.....	47
Figura 9.	Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF2 en	

	la región dorsal ipsilateral de la médula espinal.....	48
Figura 10.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas <i>sham</i>	49
Figura 11.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales (21 días).....	49
Figura 12.	Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF2 y GFAP en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal.....	50
Figura 13.	Inmunorreactividad del ATF2 en la médula espinal ventral ipsilateral de la médula espinal.....	50
Figura 14.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 y del anticuerpo neutralizante sobre el umbral nociceptivo mecánico.....	52
Figura 15.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 y del anticuerpo neutralizante sobre el umbral nociceptivo térmico.....	53
Figura 16.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA control y del siRNA del ATF2 sobre la expresión de su ARN mensajero.....	54
Figura 17.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 sobre la expresión del ARNm del gen <i>Trpv1</i>	55
Figura 18.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 sobre la expresión del ARNm del gen <i>Trpv2</i>	56
Figura 19.	Expresión de la proteína ATF3 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal.....	57
Figura 20.	Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF3 en los GRDs L4, L5 y L6.....	58

Figura 21.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF3 en los GRDs L4, L5 y L6 de ratas con ligadura de los nervios espinales (21 días).....	59
Figura 22.	Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF3 en la médula espinal.....	60
Figura 23.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF3 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas <i>sham</i>	60
Figura 24.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF3 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales (21 días).....	61
Figura 25.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo del ATF3 sobre el umbral nociceptivo mecánico.....	62
Figura 26.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo del ATF3 sobre el umbral nociceptivo térmico.....	63
Figura 27.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 sobre la expresión de su ARN mensajero.....	64
Figura 28.	Expresión de la proteína ATF4 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal.....	65
Figura 29.	Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF4 en los GRDs L4, L5 y L6.....	66
Figura 30.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF4 en los GRDs L4, L5 y L6 de ratas <i>sham</i>	67
Figura 31.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF4 en los GRDs L4, L5 y L6 de ratas con ligadura de los nervios espinales (21 días).....	67
Figura 32.	Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF4 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal.....	68

Figura 33.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF4 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas <i>sham</i>	69
Figura 34.	Distribución de la inmunorreactividad del ATF4 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales (14 días).....	69
Figura 35.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo del ATF4 sobre el umbral nociceptivo mecánico.....	70
Figura 36.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo del ATF4 sobre el umbral nociceptivo térmico.....	71
Figura 37.	Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF4 sobre la expresión de su ARN mensajero.....	72
Figura 38.	Controles de la inmunofluorescencia.....	73
Figura 39.	Evaluación de la integridad del tejido en el GRD.....	74
Figura 40.	Evaluación de la integridad del tejido en la médula espinal.....	74

III. RESUMEN

Los factores de transcripción son proteínas que modulan la tasa transcripcional de genes blanco en el núcleo en respuesta a señales extracelulares o citoplásmicas. Los factores activadores de la transcripción 2 (ATF2), 3 (ATF3) y 4 (ATF4) responden a las señales ambientales y mantienen la homeostasis celular. Existe evidencia de que la inflamación y la lesión de los nervios periféricos modulan la expresión del ATF2, ATF3 y ATF4. Sin embargo, se desconoce la función de estos factores de transcripción en el dolor crónico. El propósito de este estudio fue investigar la contribución del ATF2, ATF3 y ATF4 en el dolor neuropático inducido por el daño a los nervios periféricos. La ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo alodinia táctil e hiperalgesia térmica. De manera interesante, la ligadura de los nervios espinales aumentó la expresión de la proteína ATF2, ATF3 y ATF4 en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) lesionados y en la médula espinal, pero no en el GRD L4 (no lesionado). El daño a los nervios periféricos también aumentó la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L5, L6 y la médula espinal de 7 a 21 días después de la lesión. La inmunorreactividad de ATF2 se encontró principalmente en el núcleo (NeuN⁺) de neuronas no peptidérgicas (IB4⁺), pero también en las neuronas peptidérgicas (CGRP⁺). La ligadura aumentó la inmunorreactividad del ATF2 en los astrocitos (GFAP⁺) del día 7 al 21 post-ligadura. El ATF2 se encontró en neuronas pequeñas y medianas principalmente. El daño a los nervios también aumentó la inmunorreactividad del ATF3 en los GRDs (3-21 días) y la médula espinal (14-21 días), principalmente en los núcleos neuronales (NeuN⁺). Por otro lado, en ratas *naïve/sham* encontramos inmunorreactividad del ATF4 principalmente en el citoplasma de las neuronas peptidérgicas, pero también en algunas no peptidérgicas y en la médula espinal. La ligadura aumentó la inmunorreactividad de ATF4 en los núcleos neuronales. El post-tratamiento intratecal repetido con un ARN pequeño de interferencia (siRNA) dirigido contra el ATF2 o el anticuerpo neutralizante anti-ATF2 revirtió parcialmente la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica. Por el contrario, el siRNA del ATF3 o el anticuerpo anti-ATF3 no modificó la conducta nociceptiva, mientras que el siRNA y el anticuerpo anti-ATF4 revirtieron parcialmente la hiperalgesia térmica y tuvieron un efecto limitado sobre la alodinia táctil. Estos resultados sugieren que el ATF2 y el ATF4, pero no el ATF3, participan en el mantenimiento del dolor neuropático en ratas.

IV. ABSTRACT

Transcription factors are proteins that modulate the transcriptional rate of target genes in the nucleus in response to extracellular or cytoplasmic signals. Activating transcription factors 2 (ATF2), 3 (ATF3) and 4 (ATF4) respond to environmental signals and maintain cellular homeostasis. There is evidence that inflammation or nerve injury modulate ATF2, ATF3 and ATF4 expression. However, the function of these transcription factors in chronic pain is unknown. The purpose of this study was to investigate the contribution of ATF2, ATF3 and ATF4 to nerve injury-induced neuropathic pain. L5/6 spinal nerve ligation induced tactile allodynia and thermal hyperalgesia. Interestingly, nerve damage enhanced ATF2, ATF3 and ATF4 protein expression in injured L5/6 dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord, but not in uninjured L4 DRG. Nerve damage also enhanced ATF2 immunoreactivity in DRG and spinal cord 7-21 days post-injury. ATF2 immunoreactivity was found in DRG and spinal cord co-labeling with NeuN⁺ mainly in non-peptidergic (IB4⁺) but also in peptidergic (CGRP⁺) neurons. Nerve damage enhanced ATF2 immunoreactivity in astrocytes (GFAP⁺) (7-21 days). ATF2 was found mainly in small and medium sized neurons. Nerve injury also enhanced ATF3 immunoreactivity in DRG (3-21 days) and spinal cord (14-21 days) post-injury mainly in neuronal nuclei (NeuN⁺). On the other hand, we found ATF4 immunoreactivity mainly in the cytoplasm of peptidergic neurons but also in some non-peptidergic neurons in DRG and spinal cord. L5/6 spinal nerve ligation increased the ATF4 immunoreactivity in neuronal nuclei only in DRGs injured. Repeated intrathecal post-treatment with a small-interfering RNA targeted against ATF2 (ATF2 siRNA) or anti-ATF2 antibody partially reverted tactile allodynia and thermal hyperalgesia. In contrast, ATF3 siRNA or anti-ATF3 antibody did not modify nociceptive behaviors, while both the siRNA and the ATF4 antibody treatments partially reverted thermal hyperalgesia and had a minimal effect on tactile allodynia. These results suggest that ATF2 and ATF4, but not ATF3, participate in the maintenance of neuropathic pain in rats.

1. INTRODUCCION

1.1. Dolor

Los seres humanos evolucionaron y adquirieron una gran variedad de sistemas de defensa para responder rápidamente ante estímulos perjudiciales y mantener la homeostasis. En este sentido, el dolor tiene un papel fisiológico vital ya que ejerce una función protectora y alerta al individuo ante estímulos físicos, químicos o mecánicos nocivos permitiendo que responda de manera adecuada al daño. El dolor se percibe como una sensación no placentera que resulta de la interacción de mecanismos sensoriales y cognitivos.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial y descrito en términos de dicho daño. No obstante, el proceso fisiológico responsable de decodificar y procesar los estímulos nocivos se denomina nocicepción y comprende la transducción, conducción, transmisión y percepción del dolor (Schaible, 2006; Julius & Basbaum, 2001).

El sistema nociceptivo está formado por las neuronas de primer orden (aférentes primarias), neuronas de segundo orden (neuronas de proyección) y neuronas de tercer orden. Las primeras tienen terminales nerviosas que inervan la piel, músculo y vísceras. Las neuronas aferentes primarias perciben los estímulos nocivos y los transducen a potenciales de acción. Estos potenciales se conducen a lo largo del axón hacia la terminal central, sitio donde se transmite la información nociceptiva a la neurona de segundo orden a través de la liberación de neurotransmisores como glutamato, sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y adenosín trifosfato (ATP), entre otros. Los neurotransmisores se unen a receptores presentes en las neuronas de segundo orden que se encuentran en la materia gris del asta dorsal de la médula espinal. Una proporción de estas neuronas proyectan sus axones ascendentes por la vía espinotalámica y la vía espinoparabraquial a las neuronas de tercer orden en el tálamo (Figura 1) (Woolf & Ma, 2007; Scholz & Woolf, 2002; Bolay & Moskowitz, 2002; Julius & Basbaum, 2001). A nivel supra espinal distintas áreas están asociadas con

distintos aspectos del dolor. Por ejemplo, la corteza somatosensorial discrimina la localización y la intensidad del estímulo doloroso, mientras que la corteza anterior del cíngulo, la corteza frontal y la ínsula están más involucradas con los componentes emocionales y cognitivos. Otras áreas, como la amígdala y el complejo entorrinal, están asociadas con el miedo y la ansiedad al estímulo doloroso (Cai et al., 2018; Ong et al., 2018 & Raison et al., 2015).

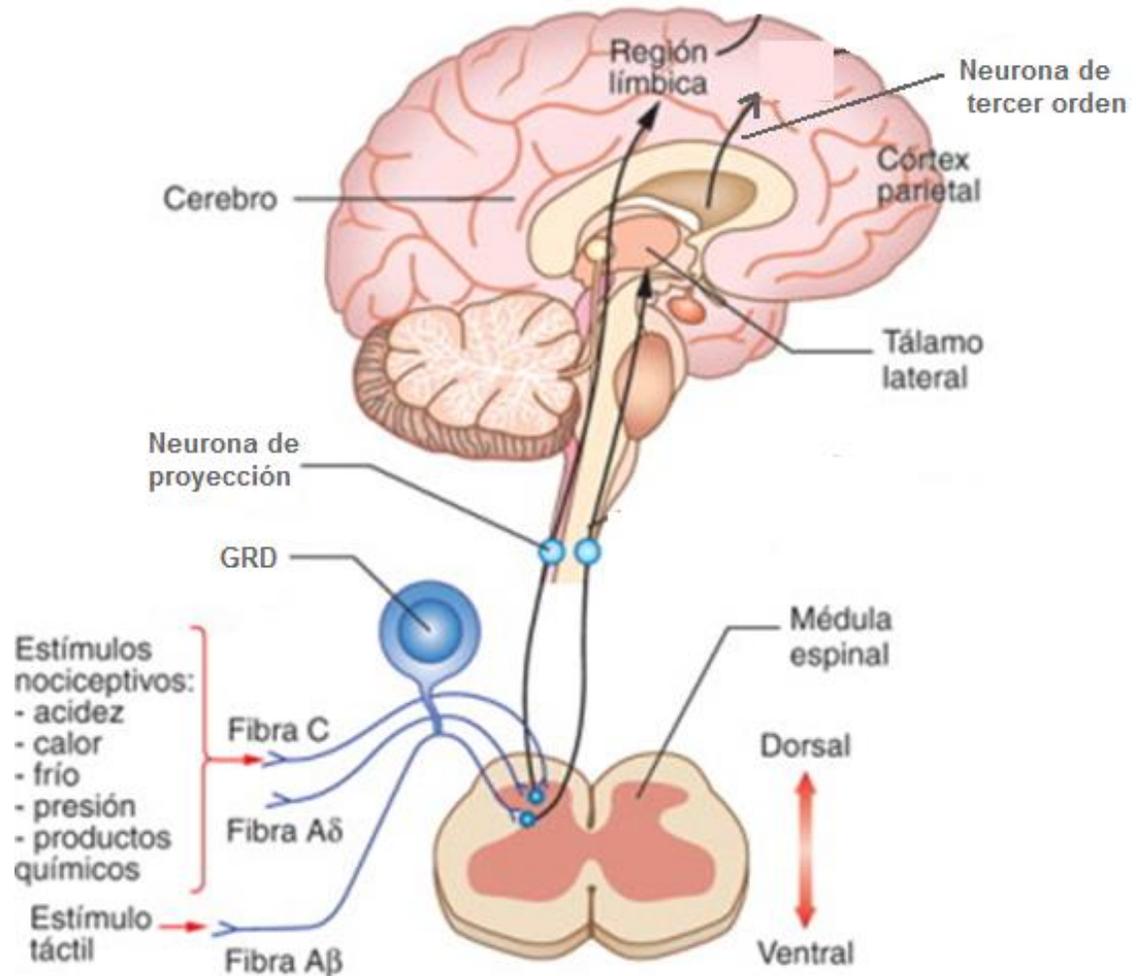


Figura 1. Circuito del dolor. El estímulo doloroso activa a los nociceptores que transducen, conducen y transmiten la información nociceptiva a las neuronas de protección presentes la región dorsal de la médula espinal. Estas a su vez envían el mensaje doloroso a áreas supraespinales específicas donde se determina el sitio y la intensidad del dolor. *Modificado de Guinot et al., 2015.*

1.1.1. Neuronas sensoriales nociceptivas

Las neuronas de primer orden están constituidas por una terminal axonal periférica que inerva su tejido blanco; una terminal central, que permite la conexión entre el sistema nervioso periférico y el central; y un cuerpo celular, encargado de controlar la identidad e integridad de la neurona. Los cuerpos celulares se encuentran contenidos en el ganglio de la raíz dorsal (GRD), ganglio trigeminal y el ganglio nodoso para las aferencias que inervan el cuerpo, la cara o las vísceras, respectivamente (Krames, 2014; Lumpkin & Caterina, 2007). Las neuronas de primer orden se clasifican en C, A δ y A β de acuerdo a la velocidad de conducción del potencial de acción, al nivel de mielinización o al diámetro de su soma (Figura 2). Cabe destacar que la velocidad de conducción correlaciona directamente con el diámetro del axón y con la cantidad de mielina y que en condiciones normales sólo las neuronas de diámetro pequeño y mediano transmiten estímulos nocivos, mientras que las neuronas de diámetro grande transmiten estímulos inocuos.

- Las fibras C (nociceptores) son neuronas localizadas periféricamente y especializadas en percibir, transducir y conducir estímulos nocivos, tales como temperatura extrema ($> 40^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$ o $< 15^{\circ}\text{C}$), presión intensa, irritantes químicos o daño al tejido por lo que se conocen también como polimodales. La mayoría de los nociceptores son de diámetro pequeño (0.4-1.2 μm), con axones amielínicos, tienen una velocidad de conducción lenta 0.4-1.4 m/s y un umbral de activación alto. Los nociceptores se subclasifican de acuerdo a su sensibilidad y umbral a estímulos mecánicos, térmicos y al frío nocivo. Hay dos clases de fibras C, la primera es la población peptidérgica, la cual contiene como neurotransmisores peptídicos a la SP y el CGRP. Además, éstas expresan en su membrana al receptor tirosina cinasa de alta afinidad (TrkA) en respuesta a estímulos inflamatorios y térmicos nocivos. La segunda es la población de fibras no peptidérgicas que tienen un sitio de unión selectivo para isolectina B4 de unión a α -D-galactosa y que expresan al receptor P2X3 y al receptor

del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) en su membrana (Basbaum et al., 2009; Julius & Basbaum, 2001; Millan, 1999). Ambas clases de nociceptores C proyectan a las láminas más superficiales del asta dorsal de la médula espinal (I y II). Sin embargo, la mayoría de las fibras peptidérgicas terminan en la lámina I y en la parte dorsal de la lámina II (Figura 1). En cambio, las fibras no peptidérgicas envían sus proyecciones a la región central de la lámina II (Braz et al., 2005).

- Las fibras A δ son otro tipo de nociceptores, éstas son de diámetro medio (2-6 μ m), de una velocidad de conducción intermedia (12-30 m/s), ligeramente mielinizadas y envían proyecciones tanto a la lámina I como a la lámina V de la médula espinal. Las fibras A δ se encargan de mediar la nocicepción aguda y bien localizada rápidamente. Hay dos clases principales de nociceptores A δ que responden a estímulos mecánicos intensos, pero se distinguen entre sí por su respuesta diferencial al calor: las fibras A δ tipo I o HTM (nociceptores mecánicos de alto umbral) responden tanto a estímulos mecánicos como químicos, pero muestran un umbral térmico alto (> 53 °C). Sin embargo, si el estímulo térmico se mantiene, estas aferencias pueden responder a menor temperatura. Por otra parte, las fibras A δ tipo II tienen un umbral térmico menor (> 43 °C) y un umbral mecánico muy alto. Estas aferencias son las primeras en activarse ante un estímulo térmico nocivo (Braz et al., 2005; Almeida et al., 2004; Millan, 1999).
- Las fibras A β son mielinizadas, de más de 10 μ m de diámetro, de velocidad de conducción rápida (30-100 m/s) e inervan las láminas III y IV del asta dorsal de la médula espinal. Tienen un umbral de activación bajo y responden a estimulación mecánica inocua (tacto ligero) y propiocepción (Braz et al., 2005; Millan, 1999).

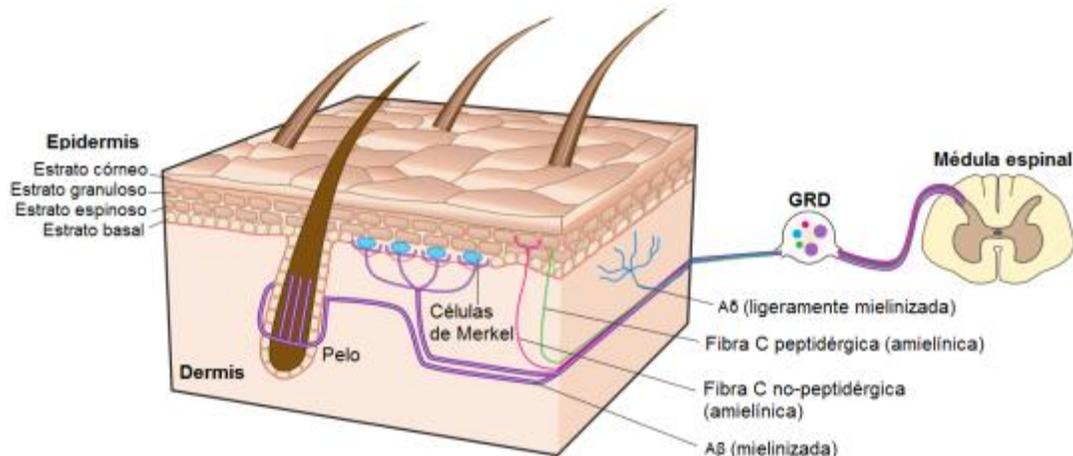


Figura 2. Diversidad de las neuronas somatosensoriales en la piel. La piel está inervada por neuronas somatosensoriales que proyectan a la médula espinal. Las fibras C peptidérgicas y no peptidérgicas terminan en el estrato espinoso y el estrato granuloso, respectivamente y tienen diferente patrón de proyección en la médula espinal. Las fibras Aδ inervan la dermis y las fibras Aβ se encuentran inervando a las células de Merkel y alrededor del folículo piloso. *Modificado de Lumpkin & Caterina, 2007.*

Recientemente Usoskin et al. (2016) reclasificaron los tipos de neuronas aferentes primarias responsables de la somatosensación mediante el análisis del transcriptoma del GRD de ratón y la secuenciación del ARN de célula única. Los autores reportaron 11 tipos de neuronas sensoriales: tres tipos de neuronas mielinizadas mecanoreceptoras de bajo umbral (NF1, 2 y 3), dos tipos de neuronas propioceptivas (NF5 y 6), tres tipos de nociceptores no-peptidérgicos termosensibles no mielinizados (NP1, 2 y 3), dos tipos de neuronas peptidérgicas: mielinizadas y no mielinizadas (PEP1 y PEP2) y un tipo de mecanoreceptor de bajo umbral tipo C. Todos tienen propiedades operacionales y moleculares distintas que los distinguen entre sí.

1.2. Clasificación del dolor

El dolor se clasificó en cuatro tipos primarios de acuerdo al mecanismo fisiopatológico que lo produce: 1) *Nociceptivo*: se produce en respuesta a estímulos físicos, químicos o mecánicos nocivos. 2) *Inflamatorio*: es un dolor espontáneo producido en respuesta a un daño al tejido e inflamación. 3) *Neuropático*: es un tipo de dolor patológico caracterizado por dolor

espontáneo e hipersensibilidad al dolor asociado a un daño o lesión en el sistema somatosensorial. 4) *Funcional*: es patológico y se manifiesta por hipersensibilidad al dolor como resultado de un procesamiento central anormal de la información nociceptiva (Woolf, 2004).

1.2.1. *Dolor neuropático*

El dolor neuropático es una condición crónica que se produce por la actividad neuronal excesiva (plasticidad maladaptativa) que resulta de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial y que altera el procesamiento nociceptivo. Además, el dolor neuropático involucra alteraciones complejas en las funciones cerebrales, emocionales y cognitivas. Este tipo de dolor se divide en periférico o central de acuerdo a la localización anatómica del daño (Colleoni & Sacerdote, 2010). En particular, el dolor neuropático crónico es un problema clínico debido a su pobre respuesta al tratamiento y a que los mecanismos involucrados en su generación son poco comprendidos.

Las causas del dolor neuropático son diversas y destacan el daño físico, los trastornos metabólicos, las enfermedades virales, algunas terapias farmacológicas (antineoplásicos) y la disfunción en los sistemas de neurotransmisión, entre otros (Tabla 1).

1.3. Mecanismos involucrados en el dolor neuropático

El dolor neuropático resulta de diversos mecanismos fisiopatológicos: en las neuronas aferentes primarias lesionadas hay cambios en la síntesis y señalización de neurotransmisores, incremento en la excitabilidad de la membrana y crecimiento axonal (central y periférico). Estos cambios se deben a la pérdida de factores neurotróficos periféricos, a la actividad espontánea de receptores, señalización retrógrada y señalización proveniente de células inmunes y células de Schwann denervadas. Además, en las neuronas sensoriales intactas se altera la expresión y el tráfico de receptores y canales iónicos. Asimismo, el dolor neuropático cambia el umbral y la cinética de los

canales iónicos y favorece el crecimiento axonal colateral. Esto se debe a que la liberación de factores tróficos de las fibras lesionadas y a las señales del sistema inmune y células de Schwann. Por otra parte, el dolor neuropático promueve la facilitación hetero y mono-sináptica, desinhibición GABAérgica, conectividad sináptica alterada y cambios en el circuito nociceptivo central en las neuronas de proyección. Estas alteraciones se deben a las señales generadas por las neuronas aferentes primarias lesionadas e intactas, las vías descendentes provenientes de núcleos cerebrales, las células inmunes, la microglía y los astrocitos (Clark et al., 2013; Costigan et al., 2009).

Tabla 1. Etiología y tipos de dolor neuropático.

Modificado de Sah et al., 2003.

Etiología	Tipo de dolor neuropático
Daño mecánico por traumatismo	Transección al nervio, daño a la médula espinal, dolor post-quirúrgico, dolor del miembro fantasma, formación de cicatrices
Metabólico o nutricional	Neuropatía diabética, neuropatía alcohólica, pelagra, beriberi
Viral	Neuralgia post-herpética, neuralgia por VIH/SIDA
Neurotoxicidad	Cisplatino, taxol, talio, arsénico, radiación
Enfermedades (no virales)	Diabetes mellitus, tumores malignos, esclerosis múltiple, neuralgia trigeminal síndrome de Guillain-Barré, vasculitis
Isquemia	Síndrome talámico, dolor posterior al accidente cerebro-vascular
Función neurotransmisora	Síndrome del dolor regional complejo

VIH: virus de inmunodeficiencia humana; SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

1.3.1. *Actividad neuronal ectópica*

El dolor espontáneo surge como resultado de la actividad neuronal ectópica en múltiples sitios, tales como el neuroma (sitio de daño), el cuerpo celular y las aferencias intactas cercanas al sitio de daño. Esto provoca el incremento de la excitabilidad intrínseca en las neuronas de proyección (Costigan et al., 2009) .

Los canales de sodio dependientes de voltaje, Nav1.3, Nav1.8 y Nav1.7, contribuyen a la generación de actividad ectópica de manera importante. Sin embargo, la eliminación de un sólo canal en animales *knock-out* no reduce el dolor neuropático y se cree que esto se debe a mecanismos compensatorios y de redundancia (Sheets et al., 2008; Nassar et al., 2006; Nassar et al., 2005). Otros canales iónicos importantes en la generación de actividad ectópica son los canales de potasio activados por calcio, los receptores de potencial transitorio (TRPs) y los canales de calcio Ca_v2.2 y Ca_v3.2 (Snuch & Zamponi, 2018; Julius, 2013; Swayne and Bourinet, 2008; Sarantopoulos et al., 2007; McGivern, 2006). Se sabe que la axotomía del nervio ciático reduce la actividad de los canales de potasio activados por calcio y aumenta la excitabilidad de la membrana neuronal (Sarantopoulos et al., 2007). Además, las citocinas y los factores de crecimiento pueden incrementar las corrientes de sodio y de los canales TRPs mediante cambios post-traduccionales y por la activación de segundos mensajeros que influyen sobre los canales iónicos (Zhu & Oxford, 2007; Jin, 2006). De la misma manera, el dolor neuropático aumenta la expresión tanto de los canales Ca_v2.2 como de la subunidad $\alpha\delta_1$ en neuronas del GRD (Salinas-Abarca et al., 2017; Patel & Dickerson, 2016; Altier et al., 2007) lo que sugiere que los canales de calcio tipo N tienen un papel importante en la transmisión de las señales nociceptivas en la periferia.

1.3.2. *Sensibilización periférica*

El daño a los nervios periféricos causa inflamación por la extravasación plasmática e infiltración de células de sistema inmune (macrófagos, linfocitos T y neutrófilos). Estas células invaden el sitio de la lesión y se propagan

alrededor de los nervios lesionados (Mueller et al., 2001; Perkins & Tracey, 2000). Las células inmunes infiltradas y las células residentes (células cebadas, macrófagos y queratinocitos) producen mediadores inflamatorios, tales como bradicinina, prostaglandinas, protones, ATP, factor de crecimiento nervioso (NGF), citocinas pro-inflamatorias (factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL-1 β), IL-6) y quimiocinas (CCL2, CXCL1, CXCL5), entre otros que reconocen a sus respectivos receptores expresados en las neuronas lesionadas e intactas (Clark et al., 2013; Costigan et al., 2009). La interacción ligando-receptor resulta en la generación de segundos mensajeros, tales como el calcio (Ca²⁺), adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y diacilglicerol (DAG), entre otros (McMahon et al., 2005). Los segundos mensajeros activan a varias cinasas, entre las que destacan la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK), proteína cinasa fosfatidil inositol 3 (PI3K), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPKs), proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), p38-MAPK y cinasa c-Jun N-terminal. La activación de estas cinasas causa hipersensibilidad e hiperexcitabilidad de las neuronas aferentes primarias lesionadas e intactas (sensibilización periférica) (Jiang et al., 2017; Mikuzuki et al., 2017; Humphreys et al., 2013; Matsuoka & Yang, 2012; Yamasaki et al., 2009; Schäfers et al., 2003) debido a que modulan la actividad de los canales iónicos TRPV1, TRPA1, Piezo (canales iónicos activados por cambios en el confinamiento celular), Na_v 1.7, Na_v 1.8, Na_v 1.9 y canales iónicos sensibles a ácido (ASICs) que favorecen el disparo ectópico de potenciales de acción y facilitan el dolor (Gohar, 2005).

Por otra parte, las neuronas lesionadas liberan mediadores vasoactivos como la SP, CGRP y óxido nítrico (NO) los cuales están involucrados en la producción de hiperemia, edema e inflamación neurogénica (Zochodne et al., 1999; Snider & McMahon, 1998). Estos cambios vasculares favorecen la invasión de más células inmunes y convierten el proceso en un círculo de estimulación constante que produce hipersensibilidad por la reducción del umbral de activación.

1.3.3. Sensibilización central

La sensibilización central se produce por el incremento de la excitabilidad y actividad de neuronas nociceptivas en la médula espinal como consecuencia de la estimulación constante y persistente proveniente de las neuronas de primer orden. Los mecanismos implicados amplifican y facilitan la transmisión nociceptiva y favorecen el desarrollo y el mantenimiento del dolor neuropático. Entre los mecanismos implicados se destaca la alteración en la neurotransmisión glutamatérgica mediada por el receptor N-metil D-aspartato (NMDA), la pérdida del control inhibitor tónico (desinhibición) y las interacciones glía-neurona (Inquimbert et al., 2018; Basbaum et al., 2009).

1.3.3.1. Alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica

En la terminal central de la neurona aferente primaria (presinapsis) se producen alteraciones en la síntesis de neurotransmisores y neuromoduladores e incrementa la densidad de canales de calcio (Hendrich et al., 2008; Obata et al., 2003). La exocitosis de neurotransmisores genera corrientes post-sinápticas excitadoras (EPSCs) en las neuronas de segundo orden. La suma de los EPSCs sub-umbrales resulta en el disparo de potenciales de acción que transmiten la información nociceptiva a las neuronas de tercer orden. Los cambios post-sinápticos incluyen la fosforilación de las subunidades del receptor NMDA, el incremento de la densidad y la síntesis de receptores, canales iónicos y proteínas (Li et al., 2016; Wu et al., 2014; Latremoliere & Woolf, 2009).

Los receptores ionotrópicos a glutamato tienen un papel crítico en este proceso. Recientemente Chen et al. (2018) reportaron que los receptores NMDA forman un complejo heterómero con la subunidad $\alpha_2\delta_1$ del canal de calcio activado por voltaje (VGCC) a través del extremo C-terminal. Esta interacción potencia el tráfico y la transmisión sináptica excitadora del receptor NMDA conduciendo al incremento de los iones sodio (Na^+) y Ca^{2+} intracelular y a la activación de proteínas cinasas (PKC, PKA y tirosinas

cinastas) que se encargan de fosforilar a canales iónicos y a otras cinastas, cambios que favorecen un estado de hiperexcitabilidad.

Además, el incremento del Ca^{2+} intracelular favorece la expresión de enzimas tales como la ciclooxigenasa (COX) (Treutlein et al., 2018; Kunori et al., 2011) y sintasa de óxido nítrico (NOS) (Ahlawat et al., 2014; Garrido-Suárez et al., 2014), mismas que sintetizan prostaglandinas y NO, respectivamente. En conjunto, esto favorece el incremento de la excitabilidad y facilita la transmisión de mensajes de dolor al cerebro.

1.3.3.2. Pérdida del control inhibitor tónico

Las interneuronas inhibitoras median la desinhibición a través del ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina (Prescott, 2015; Price et al., 2009). Las interneuronas inhibitoras representan cerca del 40% de las neuronas localizadas en el asta dorsal de la médula espinal (Bardoni et al., 2013). Las interneuronas GABAérgicas predominan en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal, mientras que las interneuronas glicinérgicas prevalecen entre las láminas II y III (Bardoni et al., 2013). El GABA y la glicina actúan sobre sus receptores localizados tanto en las neuronas de proyección como sobre los receptores pre-sinápticos localizados en las terminales centrales de las aferentes primarias (Price & Prescott, 2015; Chen et al., 2014; Sivilotti & Woolf, 1994). La interacción ligando receptor disminuye la excitabilidad neuronal mediante dos mecanismos principales: 1) generación de conductancias que producen un corto circuito en la membrana pre-sináptica y 2) la hiperpolarización de la membrana post-sináptica. En conjunto, estos mecanismos inhiben la liberación de neurotransmisores excitadores y median la inhibición pre y post-sináptica que depende directamente del gradiente de cloruro (Cl^-) a través de la membrana (Bardoni et al., 2013; Price et al., 2009). Existe evidencia que sugiere que la inhibición GABAérgica disminuye en condiciones de dolor neuropático (Prescott, 2015; Zeilhofer, 2008; Coull et al., 2003; Malan et al., 2002a).

La inhibición presináptica está mediada por el receptor GABA_A y el co-transportador de Na²⁺- K⁺- 2Cl⁻ (NKCC1) en el GRD. El NKCC1 transporta Cl⁻ al interior de las neuronas sensoriales primarias manteniendo la concentración intracelular de Cl⁻ por encima del potencial de equilibrio electroquímico. El GABA induce la apertura del receptor GABA_A (canal iónico). Esto permite la salida de Cl⁻ y produce una despolarización, conocida como despolarización de la neurona aferente primaria (PAD). Se sugiere que la PAD interrumpe la propagación ortodrómica de los potenciales de acción provenientes de la periferia e incrementa la conductancia de la membrana (*shunting*). Esto disminuye la liberación de neurotransmisores en la terminal central de las neuronas aferentes primarias (inhibición pre-sináptica) (Zeilhofer et al., 2012; Price et al., 2009). En condiciones patológicas, la activación de los receptores GABA_A (pre-sinápticos y extra-sinápticos) permite la salida masiva de Cl⁻ en las neuronas sensibilizadas. Esto provoca una PAD excesiva que alcanza el umbral de disparo del potencial de acción (reflejos de la raíz dorsal, RRD). Los RRD se propagan orto y antidrómicamente en la neurona aferente primaria e inducen la liberación de SP y CGRP. Los RRD que promueven la inflamación neurogénica en la terminal periférica, mientras que en la terminal central sobreexcitan a las neuronas de segundo orden (Loeza-Alcocer et al., 2013; Cervero et al., 2003).

Por otra parte, la concentración de Cl⁻ intracelular es menor que la extracelular en las neuronas de proyección de la lámina I de la médula espinal. Por lo tanto, la activación del receptor GABA_A por el GABA permite el influjo de Cl⁻ y conduce a la hiperpolarización. La regulación de la concentración del Cl⁻ en las neuronas de proyección está mediada por el co-transportador K⁺-Cl⁻ 2 (KCC2) (Price et al., 2009; Price & Prescott, 2015) y por la actividad de los receptores GABA_A y glicinérgicos. En condiciones normales, el KCC2 expulsa Cl⁻ de las neuronas manteniendo el gradiente del Cl⁻ y la inhibición GABAérgica por hiperpolarización (Doyon et al., 2011; Price et al., 2006). Sin embargo, en condiciones de dolor neuropático la expresión del KCC2 se reduce y el Cl⁻ intracelular se acumula. Por lo que la activación

de los receptores GABA_A resulta en la salida del Cl⁻. Esto induce un cambio despolarizante del potencial de equilibrio del Cl⁻ en el asta dorsal de la médula espinal y reduce la capacidad de inhibición de los receptores GABA_A (desinhibición) (Li et al., 2016; Price & Prescott, 2015; Mòdol et al., 2014; Miletic & Miletic, 2008; Kahle et al., 2008; Coull et al., 2003). En conjunto, las alteraciones en la homeostasis del Cl⁻ inducen desinhibición GABAérgica que resulta en la facilitación de la transmisión nociceptiva.

1.3.3.3. Interacciones glía-neurona

Las células gliales se clasifican en astrocitos, oligodendrocitos y microglía y representan el 70% de la población celular en el sistema nervioso central (SNC). La microglía es el macrófago residente del SNC y corresponde al 5-10% de la población de células gliales totales (Nakajima & Kohsaka, 2001). La microglía consta de un soma pequeño y de procesos espinosos delgados y ramificados. Sin embargo, tras el daño a los nervios periféricos la microglía prolifera y cambia su morfología transformándose en hipertrófica con engrosamiento y retracción de los procesos espinosos (Mika et al., 2013; Inoue & Tsuda, 2009).

El daño a los nervios periféricos resulta en la liberación de ATP, quimiocinas (CCL2, CCL21, CXCL1), metaloproteinasas de matrix extracelular (MMP-9 y MMP-2) neuregulina 1 (NRG1), fractalcina y CGRP, entre otros en la terminal central de las neuronas aferentes primarias. Estos mediadores activan a la microglía que expresa receptores a ATP (P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12), a quimiocinas (CX3CR1, CCR2) y a neuregulina (ErB2). La activación ligando-receptor resulta en la fosforilación de algunas cinasas, tales como ERK y p38-MAPK y como consecuencia se sintetizan y liberan citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-18), prostanoïdes, NO y el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), entre otros. Estos mediadores sensibilizan a las neuronas de proyección y activan a los astrocitos (Jiang et al., 2017; Ji et al., 2013; Mika et al., 2013; Agthong et al., 2012; Guertin, 2005; Schäfers et al., 2003; Zhuang et al., 2005). El BDNF tiene un papel clave en la sensibilización central. Éste se

une al receptor TrkB en las neuronas de proyección de la lámina I del asta dorsal de la médula espinal y provoca la activación de cinasas intracelulares que fosforilan canales iónicos y promueven el incremento de la excitabilidad y potenciación de las respuestas de dolor ante estímulos nocivos e inoos (Ferrini & De Koninck, 2013; Fukuoka et al., 2001). Además, algunos autores sugieren que la activación del receptor TrkB regula la internalización del cotransportador KCC2 (Ferrini et al., 2013; Morgado et al., 2011; Miletic & Miletic, 2008; Rivera et al., 2002), fenómeno que provoca alteraciones en la homeostasis del Cl⁻ y promueve el dolor.

Por otra parte, los astrocitos son las células macrogliales más abundantes del SNC. Los astrocitos se encargan de mantener la homeostasis en su ambiente circundante al regular los niveles extracelulares de iones, proteínas y neurotransmisores. La activación de los astrocitos induce cambios morfológicos, tales como hipertrofia e incremento en la producción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (marcador de astrocitos) (Gao & Ji, 2010; Moalem & Tracey, 2006). En condiciones patológicas, el transportador de glutamato GLT1 se regula a la baja en los astrocitos. Esto disminuye la recaptura de glutamato y promueve un estado de hiperexcitabilidad (Falnikar et al., 2016; Putatunda et al., 2014). Los astrocitos también liberan mediadores pronociceptivos, tales como quimiocinas, citocinas, ATP, GABA y glutamato (Lee et al., 2014; Lu et al., 2014; Ji et al., 2013; Gao & Ji, 2010). Este último media la sensibilización central a través de la activación de los receptores NMDA. Por otra parte, el ATP y la quimiocina CCL2 promueven la activación de la microglía favoreciendo el estado de hiperexcitabilidad.

1.4. Factores de transcripción

Una gran variedad de genes y proteínas se modulan diferencialmente durante la generación del dolor neuropático. Por ejemplo, los factores de transcripción son proteínas que regulan la expresión de genes blanco en el núcleo celular en respuesta a alteraciones en el entorno extracelular y a señales citoplasmáticas. Es decir, los factores de transcripción regulan la transcripción

del ácido desoxirribonucleico (ADN) al modular la actividad de la polimerasa II del ácido ribonucleico (ARN) (ARN polimerasa II) (Yang et al., 2013; Whitmarsh y Davis, 2000). Los factores de transcripción reconocen y se unen a secuencias específicas del ADN. Además, los factores de transcripción tienen la capacidad de interactuar con otros factores co-activadores o co-represores, o bien se unen directamente a la ARN polimerasa II. Por tal motivo, estos regulan la expresión génica, ya sea activando o reprimiendo la transcripción (Yang et al., 2013).

1.4.1. Familia de factores activadores de la transcripción (ATFs)

La regulación de la expresión de genes en las células eucariotas está mediada por distintos mecanismos, como la modificación química de histonas y ADN, por factores de transcripción y por secuencias pequeñas de ADN que proveen sitios de unión a factores de transcripción de secuencia específica llamados “elementos de respuesta”. Una de las principales clases de elementos reguladores que contribuye a la modulación transcripcional por señales extracelulares son los elementos ATF/CRE (TGACGTCA). El elemento ATF/CRE se definió como un sitio de unión al factor activador de la transcripción (ATF) o al elemento de respuesta a AMPc (CRE). Los sitios ATF/CRE son reconocidos por una familia de proteínas referida como ATF o por proteínas de unión a CRE (CREB). La familia de proteínas ATF/CREB representa a un gran grupo de factores de transcripción con un cierre de leucina y una región básica (bZIP). La región básica del cierre de leucina es la que interactúa con el ADN y permite la formación de homodímeros, heterodímeros o ambos (Hunt et al., 2012; Persengiev y Green, 2003; Hai y Hartman, 2001).

Los miembros de la familia ATF/CREB incluyen al ATF1 (también conocido como TREB36), CREB/CREM, CREB314, CREB-H, ATF2 (también llamado CRE-BP1), ATF3, ATF4, ATFX (ó ATF5), ATF6, ATF7 y B-ATF. Los integrantes de la familia de los ATFs se agrupan en subgrupos de acuerdo a su similitud de aminoácidos (**Tabla 2**) (Yu et al., 2014).

Esta familia de factores de transcripción muestra una habilidad común para responder a señales ambientales y al mantenimiento de la homeostasis celular. Por ejemplo, el ATF2, ATF3 y ATF6 participan en las respuestas ante estímulos estresantes. Particularmente el ATF6 está involucrado en la regulación de la expresión de genes asociados con estrés del retículo endoplásmico y respuestas en suero. Por otra parte, el ATF1 modula la transcripción en respuesta a cambios en la concentración intracelular de AMPc y el ATF4 actúa como un regulador negativo de la transcripción dependiente de CRE (Persengiev y Green, 2003; Hai y Hartman, 2001). La administración de anfetaminas y el estrés aumentan la expresión del ATF2, ATF3 y ATF4, pero no del ATF1 en el núcleo accumbens y en el estriado (Green et al., 2008). Estos datos sugieren que los ATFs 2, 3 y 4 regulan las respuestas a estímulos estresantes. Por lo tanto, juegan un papel importante en el circuito de recompensa cerebral y en la regulación de conductas emocionales.

1.5. ATF2

El ATF2 se descubrió en 1991. El gen que codifica para el ATF2 se localiza en el cromosoma humano 2q32 (Yu et al., 2014; Colmone et al., 2006) y se une con alta afinidad al octámero TGACGTAC (elemento de respuesta a AMPc). La proteína del ATF2 está formada por 505 aminoácidos y cuenta con sitios de fosforilación en los residuos de serina 472 y 480 cerca del extremo C-terminal en el ratón y en las serinas 490 y 498 y en las treoninas 69 y 71 en humanos (Yu et al., 2014).

El ATF2 se encuentra en la mayoría de células y tejidos, pero es especialmente abundante en cerebro y en hígado regenerado (Nomura et al., 1993). Esta proteína reside como homodímero en el citoplasma, principalmente en la membrana mitocondrial externa. Sin embargo, como homodímero tiene actividad transcripcional limitada. Los heterodímeros formados por ATF2 (c-Jun, CREB, ATF1, Fos, FRA2 y ATF3) residen en el núcleo (Bhoumik et al., 2007). Los genes blancos del ATF2 se pueden dividir

de acuerdo a su funcionalidad (**Tabla 3**) (Bhoumik et al., 2007). La exposición a citocinas pro-inflamatorias, la radiación ultravioleta, el daño al ADN y los cambios en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) son inductores de la actividad transcripcional del ATF2 (van-Dam et al., 1995). Además, el ATF2 puede activarse por factores de crecimiento a través de la vía Ras-ERK (Hayakawa et al., 2004). Sin embargo, la regulación de su actividad depende de la localización celular y de su estabilidad.

Tabla 2. Miembros de la familia de ATFs.
Modificado de Lu et al., 2014.

Molécula	Distribución (Tejido)	Funciones
ATF 1 (TREB36)	- Ubicua, alta en tiroides	Regulación del melanoma maligno
ATF2 (CRE-BP1)	- Ubicua	Producción de citocinas e inflamación; motilidad celular y apoptosis
ATF3	- Ubicua, alta en placenta, páncreas y pulmón	Inhibición de CCL2 y CCL4; regulación de isquemia cerebral, regeneración axonal, inflamación glial y respuestas de estrés celular
ATF4	- Ubicua	Regulación de inflamación retinal; producción de citocinas en diabetes; regulación de la expresión de IL-8; supervivencia o muerte celular en respuesta a estrés
ATFX (ATF5)	- Ubicua, alta en hígado, pulmón, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético	Regulación de la vía de señalización del receptor a glucocorticoides; participación en varios tipos de cáncer
ATF6	- Hígado, suero, plasma, plaquetas y células con cáncer	Regulación de la vía de señalización AKT-NF- κ B; inducción de UPR en fibrosis quística
ATF7	- Hígado, plasma, plaquetas y tejido con cáncer	Participación en la respuesta a la vitamina D en la enfermedad de Paget; represor de E-selectina

AKT: proteína cinasa B; NK- κ B: factor nuclear kappa B; UPR: respuesta de proteína no codificable.

1.5.1. Antecedentes del ATF2 en dolor

El tratamiento con electroacupuntura inhibe la vía p38-MAPK/ATF2/TRPV1 a nivel espinal y ésta puede ser una de las vías principales de transducción de señales del dolor inflamatorio inducido por CFA en ratas (Fang et al., 2013). En el mismo sentido, Agthong et al. (2012) reportaron que la inhibición de p38-MAPK reduce la actividad de su sustrato (el ATF2) y de la caspasa-3. La inhibición de p-38-MAPK previene la muerte neuronal en el GRD en el modelo de axotomía del nervio ciático. Estos datos sugieren que el ATF2 podría tener un papel pro-apoptótico en neuronas del GRD. Asimismo, Hayakawa et al. (2004) reportaron que el cisplatino aumenta la expresión de 269 genes cuyos promotores están ligados a ATF2 y c-Jun fosforilados en células BT474 humanas y reportan que la fosforilación de ATF2 y c-Jun precede a la activación de la cinasa JNK y que esta activación es esencial para la expresión de genes de reparación del ADN. Por otra parte, se reportó que los ratones mutantes de ATF2 muestran un defecto en la inducción de moléculas de adhesión (E-selectina, P-selectina y VCAM-1) y citocinas (TNF α , IL-1 β e IL-6) (Bhoumik et al., 2007). En el mismo sentido, el ATF2 regula la transcripción del gen de la tirosina hidroxilasa, el cual es un factor limitante para la biosíntesis de catecolaminas, mismas que son importantes durante el desarrollo neuronal (Suzuki et al., 2002). Además, la noradrenalina, adrenalina y dopamina son neurotransmisores involucrados en la modulación del dolor. En conjunto, estos datos sugieren que el ATF2 puede ser un regulador potencial de las respuestas de estrés neuronal producidas en el dolor neuropático.

Tabla 3. Clasificación funcional de genes blanco del ATF2.*Modificada de Bhoumik et al., 2007.*

Categoría	Proteínas blanco
Proteínas que participan en las respuestas de daño al ADN y estrés	c-Jun, c-fos, JunB, ATF3, ATM, XPA, RAD23B, MSH6, iNOS, Grp78, ciclina A, ciclina D1, TNF α , IL-1 β , IL-6 y CHOP
Proteínas asociadas con tumorigénesis y crecimiento	c-Jun, c-fos, ciclina A, ciclina D1 y MMP2
Proteínas importantes para la homeostasis fisiológica y mantenimiento	Tirosina hidroxilasa, colágeno, MMP2, E-selectina, P-selectina, VCAM-1 y PGC-1 α

1.6. ATF3

El gen del ATF3 se localiza en el cromosoma 1q32.3 y tiene un peso molecular de aproximadamente 56 kb divididas en 6 exones con dos sitios promotores (Hunt et al., 2012). El ATF3 se describe como un gen temprano inmediato, inducible por estrés celular y como un gen de respuesta adaptativa que está regulado principalmente a nivel transcripcional (Thompson et al., 2009). La expresión del ATF3 se induce por algunos factores de transcripción pertenecientes a su propia familia, tales como ATF2, ATF4, ATF6 y CREB; además de c-Jun/AP1, Myc, C/EBPB, Erg-1, entre otros y se reprime por su propia expresión (Tamura et al., 2005).

La proteína del ATF3 comprende 181 aminoácidos y tiene un peso molecular de 22 kDa. La proteína del ATF3 se expresa a muy bajos niveles en la mayoría de los tejidos sanos y juega un papel importante en mediar la respuesta celular a daño y estrés. Sin embargo, el ATF3 también permite a las células afrontar cambios intracelulares y extracelulares los cuales no son directamente perjudiciales (Hai, 2006). La interacción del ATF3 con otros factores de transcripción (dimerización) altera drásticamente sus efectos

sobre la transcripción tanto en células neuronales como en células no neuronales. Por ejemplo, la interacción del ATF3 con c-Jun incrementa robustamente la expresión del ATF3 en el sistema nervioso (Hai & Curran, 1991). El ATF3 también forma heterodímeros con otros factores de transcripción con bZIP, tales como ATF2, JunB, JunD, c-Fos y c/EBPs. La **tabla 4** resume algunos de los genes blancos de ATF3.

1.6.1. Antecedentes del ATF3 en el dolor

El ATF3 se expresa a muy bajos niveles o no se detecta por métodos convencionales en neuronas intactas. Sin embargo, estímulos estresantes causados por daño a nervios periféricos o por depleción del NGF incrementan la expresión del ATF3 a nivel nuclear (Tsuji et al., 2000; Shortland et al., 2006; Bráz & Basbaum, 2010) tanto en neuronas sensoriales como en neuronas simpáticas y motoras. Este aumento del ATF3 parece contribuir a la respuesta regenerativa (Campbell et al., 2005). En apoyo a estos datos, se reportó que una mutación en el gen del ATF3 altera la expresión de un conjunto de genes asociados a regeneración neuronal tanto en neuronas lesionadas como en intactas (Seiffers et al., 2006). Además, Nakagomi et al. (2003) y Seiffers et al. (2006) reportaron que el ATF3 potencia tanto el número de neuronas como el número y longitud de las neuritas en cultivos de neuronas del GRD, en ganglio cervical superior (SCG) y en células PC12 (línea celular derivada del feocromocitoma de la médula suprarrenal de la rata). Interesantemente, Peters et al. (2007) sugieren que el paclitaxel induce la expresión del ATF3 como consecuencia del deterioro del transporte axonal de factores de crecimiento y de moléculas requeridas para la función normal del nervio. En conjunto, estos datos sugieren que el ATF3 puede ser un regulador o un contribuyente potencial a la excitabilidad neuronal tras la lesión de los nervios periféricos.

Tabla 4. Genes regulados por el ATF3.
Modificado de Thompson et al., 2009 y Hunt et al., 2012 .

Función de ATF3	Blanco	Tipo celular	Participación en la modulación del dolor
Represor	IL-12p40	Macrófago de ratón	Secretada por células dendríticas y macrófagos. Induce la proliferación de células T y células NK y potencia su actividad citotóxica
Represor	IL-6, IL-12b	Macrófago de ratón	Potencian la transmisión sináptica excitadora
Represor	INF- γ	Células NK de ratón	Implicado en la activación de la microglía
Represor	CCL4	Macrófagos de ratón	Producida por macrófagos y células de Schwann en nervio ciático dañado
Represor	GADD153	Células HeLa	Induce arresto del ciclo celular y apoptosis en respuesta a factores de estrés celular
Inductor/Represor	Fibronectina-1	Línea celular MCF10CA1/Células epiteliales mamarias	Es producida por células de Schwann y promueve el crecimiento de neuritas en modelos de dolor neuropático
Inductor/Represor	Ciclina D1	Hepatocitos murinos/ Fibroblastos de embrión de ratón	Sobre regulación de su expresión en la microglía activa en un modelo de daño a la médula espinal
Inductor	SPRR1A	Neuronas	Promueve el crecimiento de neuritas
Inductor	Hsp27	Neuronas	Se asocia con regeneración axonal
Inductor	c-Jun	Neuronas	Regulador de la regeneración axonal
Inductor	DINE	Neuronas	Requerido para la formación de brotes de axones motores

1.7. ATF4

El gen que codifica para el ATF4 se localiza en el cromosoma 22 en la región citogenética 22q13.1. La región no traducible 5' (5' UTR) del gen que precede a la secuencia codificante e incluye tres marcos abiertos de lectura pequeños (uORFs) mismos que son fundamentales para las respuestas del ATF4 al estrés. Los dominios de activación transcripcional se localizan en el extremo

amino terminal (N-terminal) del gen. El ARNm del ATF4 se expresa constitutivamente a bajos niveles y se sobre regula por una variedad de señales extracelulares en diversos tipos celulares como en fibroblastos por anoxia (Estes et al., 1995), en linfocitos por ionóforos de calcio (Tsujimoto et al., 1991) y en células endoteliales por homocisteína (Hai & Hartman, 2001), entre otros. Sin embargo, el significado de la sobre regulación del ATF4 aún no está claro.

La proteína ATF4 se expresa ubicuamente en tejido cerebral (Ameri & Harris, 2008), está formada por 351 aminoácidos y su estructura incluye varios dominios que son esenciales para la homodimerización, unión al ADN y la regulación transcripcional. El ATF4 regula la proliferación celular, la hematopoyesis, el desarrollo del cristalino, los huesos y conductos deferentes, modula el almacenamiento de la memoria a largo plazo y la plasticidad sináptica (Ameri & Harris, 2008).

El ATF4 promueve la supervivencia o muerte celular dependiendo del paradigma y del tipo celular. Originalmente se describió ATF4 como un represor transcripcional debido a que regula negativamente la transcripción vía el elemento de respuesta a AMPc del promotor encefalina humano. Sin embargo, el ATF4 también funciona como co-activador transcripcional al interactuar con la proteína de unión a CREB (CBP) y con componentes de la maquinaria transcripcional, tales como la proteína de unión a TATA (TBP) y los factores TFIIB y TFIIF (Liang & Hai, 1997). No obstante, la sobre-expresión de ATF4 induce el secuestro de estas proteínas, dando como resultado la represión transcripcional.

El ATF4 regula la expresión de varios genes, entre los que se incluyen el gen de E-selectina, Gadd153, osteocalcina, VEGF, TRB3 (Ameri y Harris, 2008; Liang y Hai, 1997) y E3 ubiquitin ligasa (Sun et al., 2013), entre otros. Estos genes están involucrados en la función mitocondrial, el metabolismo de aminoácidos, el equilibrio óxido-reducción y la respuesta a la hipoxia.

1.7.1. Antecedentes del ATF4 en el dolor

Los ratones *knock-out* del ATF4 tienen una menor pérdida neuronal en un modelo de accidente cerebro vascular (Lange et al., 2008). Además, las mutaciones en el gen ATF4 reducen la toxicidad a glutamato (Lewerenz et al., 2012) y los cultivos de neuronas deficientes de ATF4 son más resistentes al estrés del retículo endoplásmico (Sun et al., 2013). Es decir, el ATF4 induce efectos pro-apoptóticos. En contraste, otros estudios reportan que los cultivos neuronales carentes de ATF4 son más sensibles a agentes que dañan el ADN (Galehdar et al., 2010). Es decir, estos datos sugieren que el ATF4 tiene una función protectora. Asimismo, tanto el *knock-down* del ATF4 en cultivo neuronal, como el *knock-down* de ATF4 en hipocampo de ratón adulto disminuyen la densidad de marcadores post-sinápticos y reducen la densidad de espinas dendríticas por un mecanismo mediado por la reducción de la estabilidad de la proteína reguladora del citoesqueleto Cdc42. Es decir, el ATF4 participa en la regulación de la formación de la sinapsis y en la morfología de las espinas dendríticas (Liu et al., 2014).

Por otra parte, la sobre-expresión del ATF4 induce la activación de la microglía e incrementa la liberación de BDNF en cultivos de células microgliales (Sun et al., 2014). Asimismo, se observa un incremento en el número de neuronas que expresan al ATF4 en el GRD en el modelo de articulación facetaria dolorosa, sugiriendo que la hipersensibilidad al dolor en este modelo de dolor inflamatorio podría estar sostenida a través de vías mediadas por ATF4 (Dong et al., 2011) y que la muerte celular en el GRD puede ser inducida por la activación prolongada de las vías del ATF4. Además, se reportó que el baclofén, un agonista del receptor GABA_B induce la interacción de las subunidades del receptor GABA_B con el ATF4 soluble en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Esta interacción provoca que el ATF4 se trasloque del citoplasma al núcleo y module la expresión de las subunidades del receptor GABA_B R1a y GABA_B R2 al unirse a su región promotora (Ritter et al., 2004; Steiger et al., 2004; White et al., 2000). Estos datos sugieren que el ATF4 modula la expresión de un receptor que es

esencial para regular la transmisión sináptica inhibitoria lenta en el SNC. En conjunto, estos datos sugieren que el ATF4 puede ser un regulador potencial de la excitabilidad neuronal en el dolor neuropático.

2. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes presentados sugieren que los ATF 2, 3 y 4 podrían tener un papel importante en la modulación del dolor neuropático debido a que regulan la expresión de genes que podrían favorecer el desarrollo y/o establecimiento de diversos mecanismos de dolor.

3. HIPÓTESIS

Los factores de transcripción ATF 2, 3 y 4 modulan de manera diferencial el dolor neuropático.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar la posible participación de los ATF 2, 3, y 4 en la modulación del dolor neuropático en la rata.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la expresión de los ATF 2, 3 y 4 en los GRDs y en la médula espinal de ratas con dolor neuropático.
- Determinar el tipo celular donde se expresan los ATF 2, 3 y 4 en los GRDs y la médula espinal de ratas con dolor neuropático.
- Determinar el papel funcional de los ATF 2, 3 y 4 en el dolor neuropático.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. *Animales*

Se utilizaron ratas Wistar hembra (140-160 g) provenientes del bioterio del Cinvestav, Sede-Sur. Las ratas se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento antes y después de los experimentos. Todos los experimentos siguieron las Normas Éticas para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983). Además, el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la institución (Cinvestav) aprobó el protocolo experimental (0042-13).

6.2. *Inducción de neuropatía por el modelo de ligadura de los nervios espinales L5-L6*

Las ratas se prepararon de acuerdo a un método reportado previamente (Kim y Chung, 1992). Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilazina (50/10 mg/kg, i.p.). Después de la preparación quirúrgica, los nervios espinales L5 y L6 se expusieron y ligaron con sutura de seda 6-0. Para las ratas falsamente operadas (*sham*), los nervios se expusieron, pero no se ligaron. Las ratas que mostraron cualquier deficiencia motora se descartaron del estudio (< 1%).

6.3. *Evaluación de la conducta nociceptiva*

Las ratas se colocaron en cajas de acrílico con fondo de malla metálica y se ambientaron por 1 hora para la evaluación de la alodinia táctil. Se determinó el umbral de retiro de la pata como lo describió Chaplan et al. (1994). Se estimuló la parte media de la superficie plantar con una serie de filamentos de von Frey calibrados evitando la almohadilla de la pata. El método arriba-abajo se inició con la estimulación con el filamento de 4.31 N y el calibre del filamento utilizado aumentó o disminuyó en función de la respuesta del animal. Se midió el umbral de retiro tomando como respuesta positiva el retiro de la pata estimulada en un lapso de 10 segundos y como respuesta negativa cuando la pata no fue retirada en el mismo periodo. Después del primer

cambio de respuesta de positiva a negativa o viceversa, se realizó la estimulación otras cuatro veces. Los patrones de registro de respuesta se utilizaron para calcular el 50% de umbral de retiro usando la formula (Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994):

$$50\% \text{ umbral (g)} = (10[xf + k\delta])/10,000$$

Dónde: Xf: valor del último filamento de von Frey utilizado (unidades log)
k: factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado en base al patrón de respuestas positivas y negativas

δ: diferencia de promedio entre estímulos (unidades log)

El 50% de umbral de retiro se define como la intensidad de estímulo requerido para provocar una respuesta en el 50% de las aplicaciones para cada animal. Se verificó que todas las ratas ligadas estuvieran alodínicas, es decir, que su umbral de retiro fuese menor a 4 g.

Para la evaluación de hiperalgesia térmica se midió la latencia de retiro de las patas traseras ante estímulos de calor radiante (Hargreaves et al., 1988). Las ratas se colocaron en cajas de acrílico sobre una superficie que se calentó a 28-30°C. Después de una hora de aclimatación, se aplicó un estímulo de calor radiante y se evaluó la latencia de retiro de la pata. Cada pata trasera se sometió a la prueba en tres ocasiones con un intervalo de 5 min entre cada ensayo. Se estableció un límite de 20 segundos de exposición al estímulo térmico para evitar el daño al tejido. La latencia de retiro de la pata de cada rata se calculó como la media de tres ensayos (Dirig et al., 1997)

6.4. Extracción de tejidos para Western blot

Las ratas se sacrificaron por decapitación e inmediatamente después se realizó el corte de la columna vertebral a la altura de la región sacra. Luego, se introdujo una aguja en el conducto vertebral que permitió la eyección de la medula espinal por presión. La médula espinal se seccionó en regiones dorsales ipsilaterales y contralaterales. Posteriormente, se removieron los músculos paraespinales a la altura de la región lumbosacra, además de la

apófisis espinosa y transversa de las vértebras L1-S2 para exponer los GRDs L4, L5 y L6. Una vez extraídos, los tejidos se colocaron en nitrógeno líquido para el procesamiento posterior de las muestras. Las muestras se homogenizaron en RIPA (150 mM de NaCl, 50 mM de Tris HCl, 1 mM de EDTA, 2 mM de PMSF, 0.1% de SDS y 0.1% de Triton X100), un amortiguador de lisis celular que permite eficientemente la solubilización de proteínas evitando su degradación al contener inhibidores de proteasas. A continuación se centrifugaron las muestras por 10 min a 20 800 de fuerza centrífuga relativa (g) a 4°C y finalmente se recolectó el sobrenadante que se congeló en alícuotas a -70°C.

6.5. *Western Blot*

Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford utilizando el *kit* de BIO-RAD (Cat # 500-0001, BioRad, Hercules, CA). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en geles al 10%. Se realizó la transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se bloquearon durante 1 h con leche sin grasa al 5% (Cat # 170-6404, BioRad, Hercules, CA). Después se incubaron con los anticuerpos primarios: rabbit anti-ATF2 antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Cat. # sc-187, Dallas, TX), rabbit anti-ATF3 antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Cat. # sc-188, Dallas, TX) or rabbit anti-ATF4 antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Cat. # sc-200, Dallas, TX) por 24 horas a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces por 10 minutos (3x10 min) con PBS 1X (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ y 2 mM de KH₂PO₄, pH= 7.4)-Tween 0.1% y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (anti-rabbit, Cat. # 111-035-003, 1:6000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se lavaron 3x10 min con PBS-Tween 1X y finalmente las membranas se expusieron a un sustrato quimioluminiscente (Western Lightninig® Plus-ECL, Perkin-Elmer, Waltham, MA) que permitió revelar la expresión de la proteína en una imagen fotográfica mediante el equipo ChemiDocTMXRS+ ImagingSystem (Bio-Rad,

Hercules, CA) para el posterior análisis densitométrico de las bandas mediante el *Software ImageLab*™ versión 5.0 de Bio-Rad.

6.6. Extracción de tejidos para inmunohistoquímica

Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se realizó una perfusión intracardiaca con 250 ml de PBS 1X (pH= 7.4 a 4°C) con heparina (10 000 U/L) a un flujo de 25–30 ml/min, seguido de 250 ml de paraformaldehído al 4% + 12% de solución de ácido pícrico en PBS 1X. Después de la perfusión se extrajeron la médula espinal y los GRDs (L4-L6). A continuación, los tejidos se crio-protegieron en una solución de sacarosa al 30% a 4°C por al menos 48 h y se embebieron en OCT compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA) y se almacenaron a -70°C.

6.7. Inmunohistoquímica

Se utilizó inmunofluorescencia (n=4 por grupo) para evaluar el tipo celular donde se expresan los ATFs 2, 3 y 4. Los GRDs (L4, L5 y L6) y la región lumbar de la médula espinal de ratas *sham* y de ratas con 14 y 21 días post-ligadura se cortaron en un criostato en secciones de 14 y 30 µm, respectivamente. Las secciones se montaron sobre laminillas gelatinizadas en el laboratorio y se utilizó un plumón hidrófobo para delimitar los tejidos. Las laminillas se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para su posterior lavado con PBS 0.1 M (3X10 min), se bloquearon con suero al 3% (Normal Donkey Serum, cat# 017-000-121, Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, West Grove) en PBS con 0.3% de Tritón-X100 durante 2 h. La inmunodetección de ATF2, ATF3 y ATF4 se realizó utilizando los anticuerpos primarios: anti-ATF2 antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Cat. # sc-187, Dallas, TX), rabbit anti-ATF3 antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Cat. # sc-188, Dallas, TX) y rabbit anti-ATF4 antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Cat. # sc-200, Dallas, TX), respectivamente. Se utilizaron anticuerpos adicionales para identificar la inmunoreactividad de los núcleos neuronales, neuronas peptidérgicas, neuronas no peptidérgicas,

astrocitos y microglía: mouse anti-NeuN antibody (1:1000, Cat. # MAB377, Merck, Darmstadt), goat anti-CGRP antibody (1:600, Cat. # 8856 N-20, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), anti-IB4 biotinilado antibody (1:600, Cat. # L2140, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mouse anti-GFAP antibody (1:500, Cat. # G3893, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y mouse anti-CD11b antibody (OX-42) (1:100 Cat. # MCA275G, Bio-Rad, Hercules, CA). Después de 24 h de incubación las preparaciones se lavaron con PBS (3X10 min) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados a marcadores fluorescentes: Cy3 (Cy™3 AffiniPure donkey anti-rabbit IgG [H+L], 1:600, Cat. # 711-166-152, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA); Cy2 (Cy™2 AffiniPure donkey anti-mouse IgG [H+L], 1:400, Cat. # 715-225-150, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA); Cy2 (Cy™2 AffiniPure donkey anti-goat IgG [H+L], 1:200, Cat. # 705-225-147, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y Cy2-streptavidin (Cy™2 AffiniPure donkey anti-biotin IgG [H+L], 1:600, Cat. # 016-220-084, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Las preparaciones se lavaron 3x10 min cada una en PBS y deshidrataron a través de un gradiente de alcohol etílico (70%, 80%, 90% y 100%), se enjuagaron en xileno y se cubrieron con DPX (medio de montaje). Las preparaciones se mantuvieron a 4°C hasta antes de examinarlas en el microscopio.

6.8. Microscopia confocal, análisis de imágenes y cuantificación del tamaño celular

Todas las imágenes se capturaron con el microscopio confocal Carl Zeiss (Carl Zeiss, LSM 780 Confocal Microscope System, Oberkochen) con los objetivos 10 y 63X + 1.32 (de inmersión). Las secciones ópticas se adquirieron a un tamaño digital de 1024 x 1024 píxeles y promediadas 8 veces para disminuir el ruido. Las imágenes se analizaron usando el *software* ZenZ Blue Edition (Carl Zeiss GmbH, Gottingen).

Para determinar el porcentaje de las neuronas inmunoreactivas a ATF2 se seleccionaron aleatoriamente de 4-5 secciones de los GRDs L4, L5 y L6 en

cada punto de tiempo y se cuantificó el perfil de expresión. El porcentaje de neuronas positivas se calculó al dividir el número de neuronas positivas a ATF2 entre el número de neuronas positivas a NeuN x 100.

Para realizar los histogramas de distribución de frecuencia del tamaño neuronal, se midió el área de las neuronas NeuN⁺ y ATF2⁺ en los GRDs L4, L5 y L6 mediante un análisis de imagen computarizado (Image J software) y sólo las neuronas con un núcleo claro y visible (NeuN⁺) se cuantificaron. Las neuronas se dividieron en neuronas pequeñas (<600 µm²), medianas (600-1200 µm²) y grandes >1200 µm²) de acuerdo con su área de sección transversal (Bravo-Hernández et al., 2016). Los resultados se reportaron como el porcentaje de neuronas positivas para cada tamaño poblacional. Se midieron al menos 300 neuronas NeuN⁺ por cada sección de cada grupo experimental. Además, el *software* Image J se utilizó para calcular el promedio de intensidad de fluorescencia de ATF2 en la médula espinal dorsal de al menos 5 secciones de cada rata (n=4).

6.9. RT-PCR semi-cuantitativa anidada

Se aisló ARN total de los GRDs L4, L5, L6 y de región dorsal ipsilateral (engrosamiento lumbar L1-S1) de la médula espinal usando reactivo de Trizol, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La concentración y pureza del ARN se determinó al medir la absorbancia a 260-280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington). 5 µg de ARN se retro-transcribieron en ADN de cadena complementaria (cDNA) usando oligo-dT y transcriptasa reversa MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción se realizó a 37°C por 60 min, seguida de un paso de desnaturalización a 65° por 7 min. La amplificación del cDNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con *primers* específicos para ATF2 (ATF-2 Cat. # sc-156017-PR, set de *primers* A (*forward* y *reverse*) y set de *primers* B (*forward* y *reverse*), producto de 427 pb), ATF3 (Cat. # sc-72029-PR, set de *primers* A (*forward* y *reverse*) y set de *primers* B (*forward* y *reverse*), producto de 1000 pb) y ATF4 (Cat. # sc-72029-PR, set de

primers A (forward y reverse) y set de primers B (forward y reverse), producto de 1000 pb). La primera reacción de PCR contenía 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP, 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 µl del *set de primers A* y 5 µg de cDNA en un volumen total de 50 µl. Se seleccionó el número óptimo de ciclos dentro del rango lineal de exponencial. Las condiciones de la PCR para la amplificación fueron: 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 45 s, 58.5 °C por 45 s, 72 °C por 90 s y 72 °C por 7 min, usando el termociclador Mastercycler DNA Engine Thermal Cycler (Eppendorf, Germany). La segunda reacción de PCR contenía 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTP, 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 µl del *set de primers B* y 5 µl del producto de la primer PCR en un volumen total de 50 µl. El gen de β-actina se utilizó como control de carga y se amplificó usando oligonucleótidos reportados previamente (Choi-Lundberg & Bohn, 1995). Los productos de la PCR se tiñeron con bromuro de etidio y se analizaron en un gel de agarosa al 1% usando el equipo Chemidoc XRS + imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA). Las bandas se cuantificaron por escaneo densitométrico usando el *software* Image Lab 5.0 (Bio-Rad, Hercules, CA).

6.10. Preparación de los siRNAs y los anticuerpos

Los siRNAs y los anticuerpos se prepararon inmediatamente antes de la administración. Se utilizó el siRNA del ATF2 (ATF2 siRNA, Cat. # sc-156017), siRNA del ATF3 (ATF3 siRNA, Cat. # sc-72029), siRNA del ATF4 (ATF4 siRNA, Cat. # sc-72029) o siRNA *scramble* (siRNA *scramble* control, Cat. # sc-37007) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas). Los siRNAs se prepararon a una concentración de 0.1 µg/µl con un reactivo de transfección (siRNA transfection reagent, Cat. # sc-29528, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las ratas recibieron 1 µg (10 µl) de siRNA en cada administración.

Los anticuerpos anti-ATF2, anti-ATF3 o anti-ATF4 se prepararon a un concentración de 1 µg/µl con el vehículo del anticuerpo (PBS 1X + Triton X-

100 al 0.1%). Las ratas recibieron 10 μg (10 μl) de anticuerpo en cada administración.

6.11. Inyección intratecal directa

La inyección intratecal es una técnica que facilita la administración farmacológica directa en la médula espinal. La inyección intratecal es poco invasiva, rápida y permite la administración repetida de fármacos (Njoo et al., 2014). Las ratas se anestesiaron con isoflurano al 3% y se verificó la carencia de signos de enderezamiento y del reflejo de retiro de la cola ante un estímulo mecánico para asegurar un estado de anestesia general. Se rasuró la parte dorsal de las ratas a la altura de las vértebras lumbares y sacrales. Las ratas se colocaron sobre un cilindro para facilitar la inserción de la aguja en el espacio intervertebral. Se utilizó una aguja de 30 G (0.30 mm de diámetro) (Septodont, Saint-Mour-des-Fossés Cedex, Francia) unida a una jeringa de 1 ml que se regulaba mediante un sistema de liberación controlado mecánicamente. Se localizaron los procesos espinosos de las vértebras L4-L5 (partiendo del proceso espinoso más protuberante, el L6). Cuidadosamente, la aguja se insertó en el espacio intervertebral entre los procesos espinosos L4-L5. Se consideró el reflejo sacudida de la cola como un signo de inyección exitosa en el espacio intradural. Una vez observado este reflejo se procedió inmediatamente a la inyección del volumen (10 μl) de la sustancia de interés (siRNAs, anticuerpos o controles). Finalmente, la aguja se retiró y las ratas se colocaron en sus cajas para que se recuperaran de la anestesia.

6.12. Diseño experimental

6.12.1. Expresión de proteínas

Para determinar el papel del ATF2, ATF3 y ATF4 en el dolor neuropático, primero decidimos evaluar si estos se expresan en sitios relevantes para la transmisión de la información nociceptiva. Por lo tanto, determinamos la expresión de proteínas ATF2, ATF3 y ATF4 por *Western blot* en los GRDs L4 (no lesionado), L5 y L6 (ligados) y en la porción dorsal ipsilateral de la médula

espinal de ratas con 3, 7, 14 y 21 post-cirugía y en los grupos control (*naïve* y *sham*) (n = 4).

6.12.2. Localización de los ATFs en los GRDs y en la médula espinal

Basados en los cambios de la expresión de proteínas, decidimos investigar la distribución del ATF2, ATF3 y ATF4 en los GRDs L4 (no lesionado), L5 y L6 (ligados) y en la médula espinal. Para este propósito utilizamos 6 grupos de 4 ratas cada uno: *naïve*, *sham* y con 3, 7, 14 y 21 días post-cirugía. Las muestras de tejido se obtuvieron como se describió previamente. Se utilizaron anticuerpos específicos para la inmunodetección de núcleos neuronales, neuronas peptidérgicas, neuronas no peptidérgicas, astrocitos y microglía y se determinó si estos marcadores co-localizaban con las proteínas de interés.

6.12.3. Tratamiento con los siRNAs

Para determinar el papel del ATF2, ATF3 y ATF4 en la modulación del dolor neuropático, utilizamos siRNAs específicos para hacer un *knock-down*. El tiempo de administración se determinó al conocer el pico máximo de expresión de las proteínas (Western blot). Los animales con 18 días post-cirugía (n = 6-8) recibieron la administración intratecal de 3 inyecciones consecutivas del siRNA del ATF2, siRNA ATF3, siRNA ATF4 o siRNA scramble (10 µl) cada 24 h. Se determinó la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica cada 24 h post-administración por 4-8 días dependiendo del tratamiento. Además, decidimos evaluar el efecto de los siRNAs en ratas intactas. Por lo tanto, grupos independientes de ratas *naïve* recibieron 3 inyecciones intratecales de los respectivos siRNAs bajo el mismo esquema de administración.

Para corroborar la eficiencia del *knock-down* se determinó la expresión del ARNm del gen *Atf2*, *Atf3* y *Atf4* en los GRDs L4, L5 y L6 y en la médula espinal de animales tratados con los respectivos siRNAs. El ATF2 se expresan de manera constitutiva, por lo tanto se utilizaron animales *naïve* (n=4, tratados con siRNA). Por otra parte, para el ATF3 y el ATF4 se utilizaron

animales ligados (n=4, tratados con siRNA de ATF3). Todos los animales se sacrificaron 24 horas después de la última administración del siRNA para la obtención de tejidos. Los experimentos se realizaron por duplicado.

6.12.4. *Tratamiento con anticuerpos Anti-ATFs*

Debido a que no existen inhibidores farmacológicos selectivos del ATF2, ATF3 o ATF4, decidimos evaluar si el tratamiento con anticuerpos específicos tenía algún efecto sobre la conducta nociceptiva inducida por la ligadura de los nervios espinales. Esta estrategia experimental se ha utilizado con anterioridad en el laboratorio (Pineda-Farias et al., 2015). Los animales con 18 días post-cirugía recibieron la administración intratecal de 3 inyecciones consecutivas de anticuerpos anti-ATF2, anti-ATF3, anti-ATF4 o del vehículo del anticuerpo (10 μ l) cada 24 h. Se evaluó el umbral mecánico y térmico basal antes de la administración intratecal de los anticuerpos. Se determinó la alodinia táctil y la hiperalgesia térmica cada 24 horas justo antes de la siguiente inyección durante 4-8 días dependiendo del tratamiento. Además, decidimos evaluar el efecto de la administración de los anticuerpos en ratas intactas. Por lo tanto, ratas *naïve* recibieron la inyección intratecal de los anticuerpos siguiendo el mismo protocolo experimental.

6.13. *Análisis de datos y estadística*

Los datos conductuales están expresados como el promedio (n = 6-8 animales) \pm el error estándar de la media (EEM) del umbral de retiro o la latencia de retiro de la pata. Los cursos temporales se construyeron trazando el umbral de retiro o la latencia de retiro de la pata en función del tiempo. A partir de los cursos temporales se calculó el área bajo la curva (ABC) por el método de trapezoides (Tallarida & Murray, 1981). Para determinar las diferencias estadísticas entre grupos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías, según el caso, seguida de la prueba de Dunnett o Tukey mediante el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA).

Los resultados de la expresión de proteína y ARNm se muestran como la expresión relativa de ATF2, ATF3 o ATF4 normalizada frente a β -actina. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM de 4 animales independientes. Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Los valores de P menores de 0.05 se consideraron significativos.

7. RESULTADOS

7.1. ATF2

7.1.1. Expresión del ATF2 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6

La ligadura de los nervios espinales L5-L6 incrementó la expresión de la proteína ATF2 en los GRDs L5, L6 y en la médula espinal, pero no en el GRD L4 (**Figura 3**).

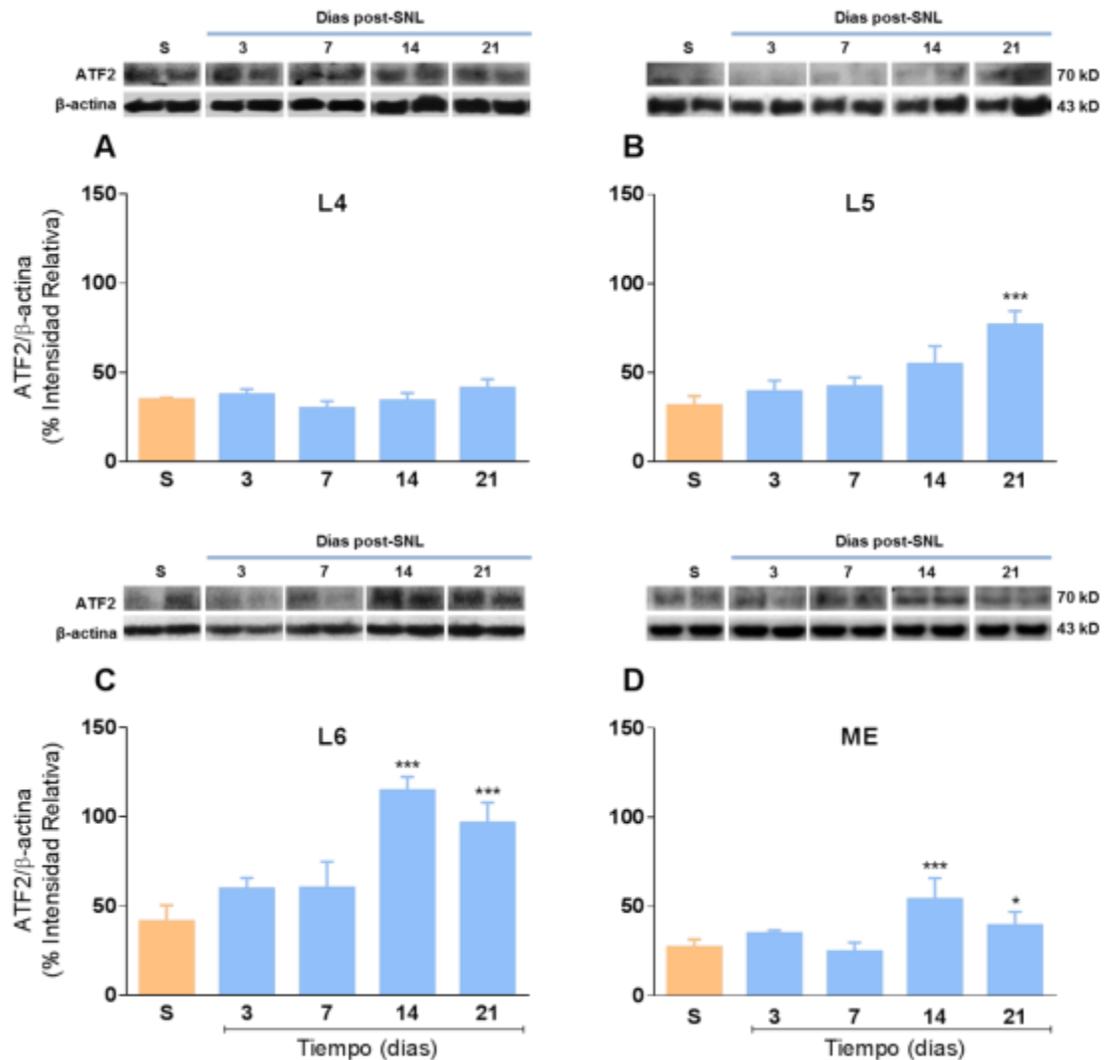


Figura 3. Expresión de la proteína ATF2 en los GRDs L4 (A), L5 (B), L6 (C) y en la médula espinal (ME) (D) de ratas con ligadura de los nervios espinales (SNL) L5-L6. La expresión del ATF2 se evaluó a los días 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM de 4 animales por grupo experimental. Los insertos arriba de las barras representan los *immunoblots* de 2 animales por grupo experimental. * $p < 0.05$ vs *sham* (S); *** $p < 0.001$ vs S por ANOVA 1V/Dunnett.

7.1.2. Localización y distribución celular del ATF2

El ATF2 se expresa constitutivamente en el núcleo de neuronas del GRD L4, L5 y L6 en ratas *naïve* y *sham*. La ligadura de los nervios espinales incrementó la inmunorreactividad del ATF2 en los ganglios L5 y L6, pero no en el GRD L4 (**Figura 4**). Además, la ligadura aumentó la fluorescencia del ATF2 en el núcleo de células satélite de los GRDs ligados (**Figura 5 y 7**) y la disminuyó en el núcleo de las neuronas al día 3 post-cirugía. En contraste, la ligadura provocó cambios en la inmunorreactividad del ATF2 tanto en el núcleo como el citoplasma de las neuronas del GRD L5 y L6 en los días 14 y 21 (**Figura 5**). El ATF2 se expresó de manera constitutiva en el núcleo de las neuronas peptidérgicas (CGRP⁺) y no peptidérgicas (IB4⁺) (**Figura 6**). Sin embargo, la ligadura de los nervios espinales L5-L6 redujo la inmunorreactividad del marcador de neuronas no peptidérgicas y del marcador de neuronas peptidérgicas en los GRDs L5 y L6 al día 7, 14 y 21 posteriores al daño (**Figura 7**).

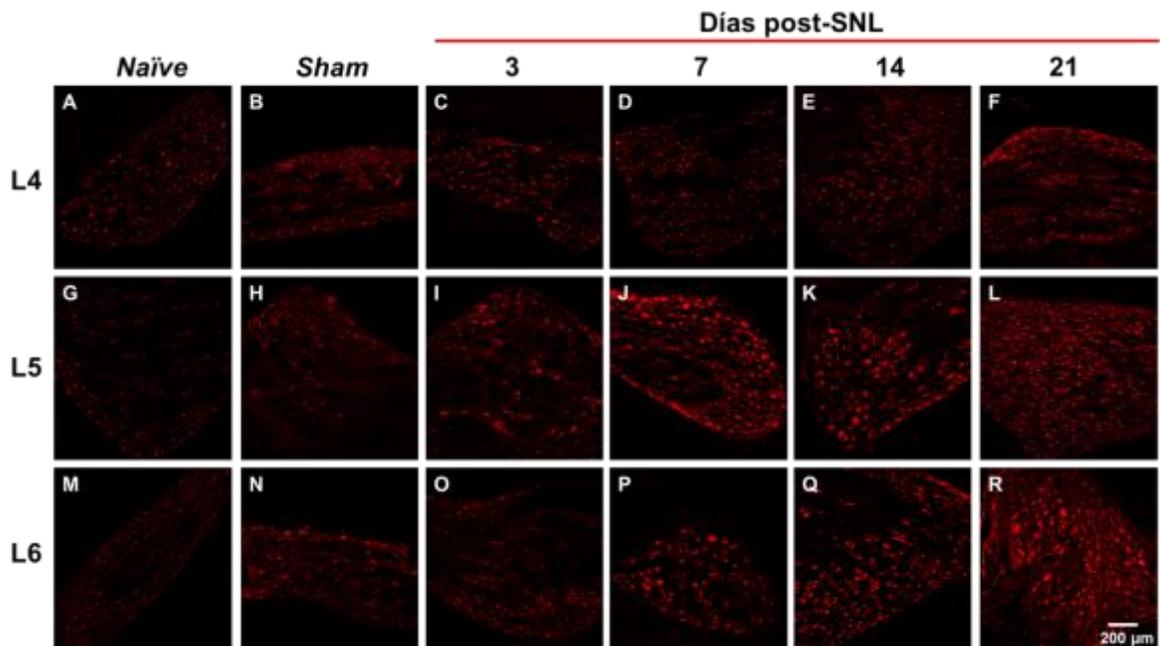


Figura 4. Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L4 (A-F), L5 (G-L) y L6 (M-R) de ratas *naïve*, *sham* y ratas con ligadura de los nervios espinales (SNL) L5-L6 (rojo). La expresión del ATF2 se evaluó el día 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. Barra de calibración, 200 µm.

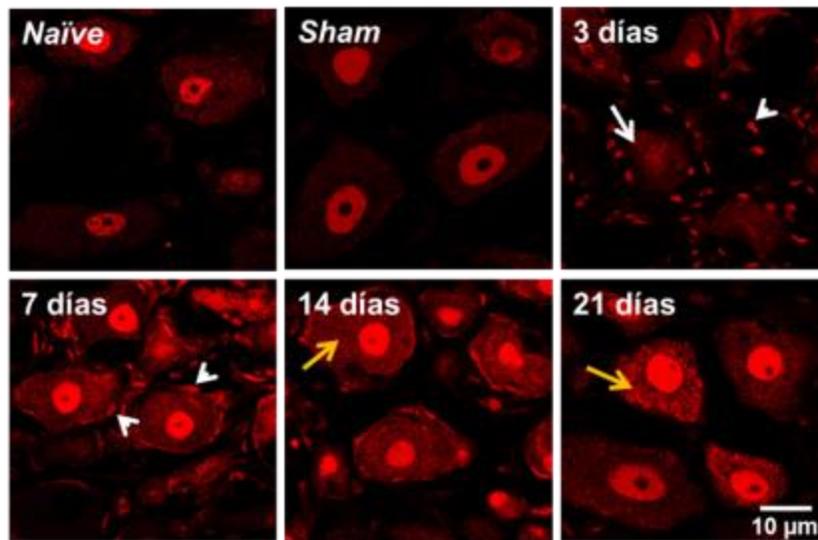


Figura 5. Localización celular de la inmunorreactividad del ATF2 en el GRD L6 de ratas naïve, *sham* y ratas con ligadura de los nervios espinales (rojo). La expresión del ATF2 se evaluó los días 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. Las flechas blancas indican la presencia de inmunorreactividad alrededor de los cuerpos neuronales. Las flechas amarillas indican inmunorreactividad en el citoplasma de las neuronas. Barra de calibración, 10 µm.

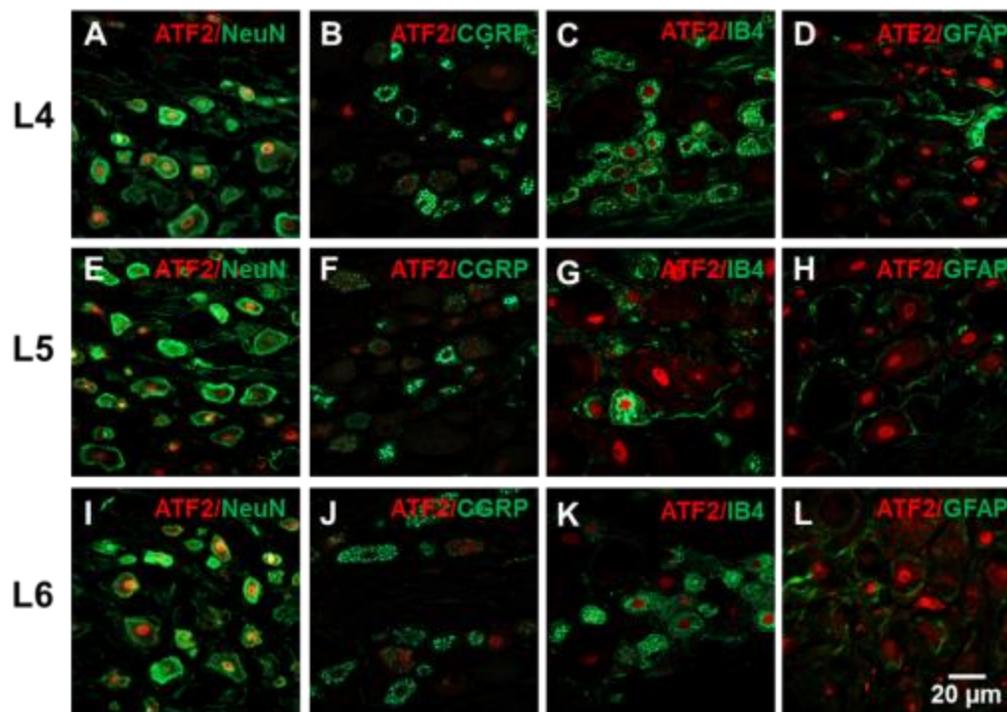


Figura 6. Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L4 (A-D), L5 (E-H) y L6 (I-L) de ratas *sham* (rojo). La expresión del ATF2 se evaluó en presencia del marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), neuronas no peptidérgicas (IB4⁺) y células satélite (GFAP⁺). Barra de calibración, 20 µm.

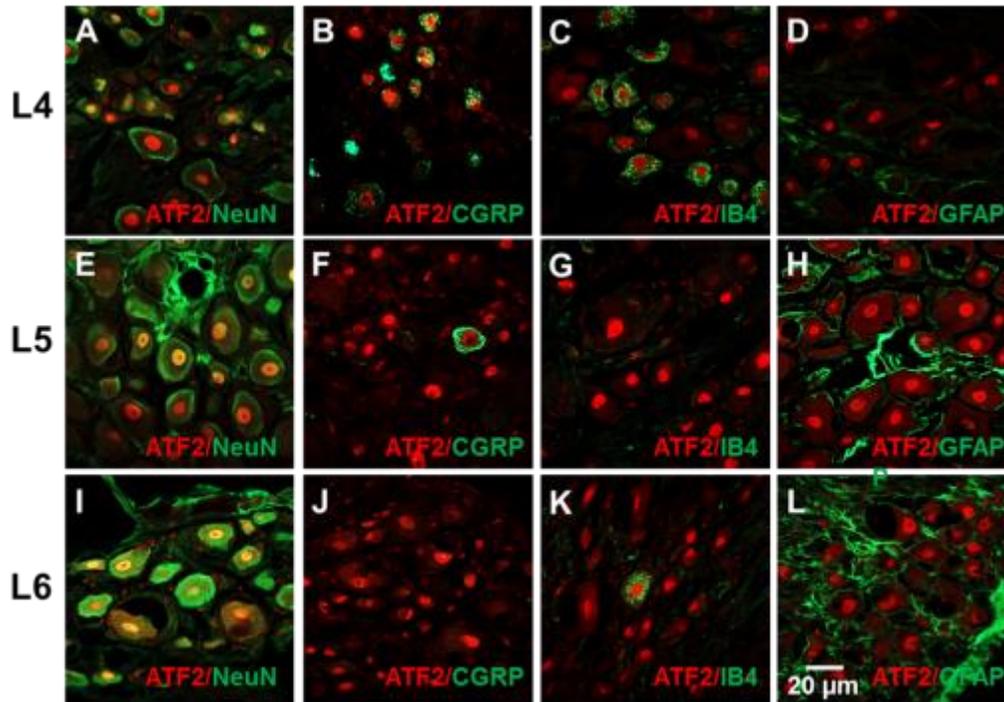


Figura 7. Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L4 (A-D), L5 (E-H) y L6 (I-L) de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6 (21 días) (rojo). La expresión del ATF2 se evaluó en presencia del marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), neuronas no peptidérgicas (IB4⁺) y células satélite (GFAP⁺). Barra de calibración, 20 µm.

7.1.3. Cuantificación de la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs

L4, L5 y L6

El ATF2 se expresó constitutivamente en ratas *naïve* en el $42.9 \pm 2.2\%$, $43.5 \pm 2.1\%$ y $42.8 \pm 0.9\%$ de neuronas del GRD L4, L5 y L6, respectivamente. Sin embargo, la ligadura de los nervios espinales modificó la expresión del ATF2 en los GRDs. Al día 3 post-ligadura disminuyó la expresión de ATF2 a $34.9 \pm 0.8\%$ y $31.6 \pm 2.3\%$ en los GRD L5 y L6, respectivamente. No obstante, se observó un incremento de la expresión del ATF2 en el ganglio L5 a $55.6 \pm 2.6\%$, $66.6 \pm 2.3\%$ y $72.2 \pm 4.3\%$ el día 7, 14 y 21, respectivamente. El ATF2 se expresó en el $59.1 \pm 2.4\%$, $69.2 \pm 4.0\%$ y $76.5 \pm 3.1\%$ al día 7, 14 y 21, respectivamente, en el GRD L6 (**Tabla 5A**).

Por otra parte, el marcador de neuronas no peptidérgicas (IB4⁺) se expresó en un $28.5 \pm 2.5\%$, $32.5 \pm 2.6\%$ y $28.3 \pm 3.6\%$ en el GRD L4, L5 y L6 de

ratas *naïve*, respectivamente. La ligadura de los nervios espinales disminuyó la inmunorreactividad del IB4 en el GRD L5 a $22.2 \pm 3.15\%$, $19.6 \pm 4.9\%$, $6.1 \pm 1.7\%$ y $3.2 \pm 1.3\%$ al día 3, 7, 14 y 21 post-cirugía, respectivamente. Asimismo, la expresión de IB4 disminuyó a $21.1 \pm 2.3\%$, $19.5 \pm 1.5\%$, $5.2 \pm 0.8\%$ y $4.8 \pm 0.5\%$ al día 3, 7, 14 y 21, respectivamente en el GRD L6 (**Tabla 5B**). El marcador de neuronas peptidérgicas CGRP se expresó en el $38.5 \pm 1.3\%$, $38.1 \pm 2.9\%$ y $39.1 \pm 1.3\%$ en los GRD L4, L5 y L6 de ratas *naïve*. La ligadura de los nervios espinales disminuyó la inmunorreactividad del CGRP a $21.8 \pm 2.6\%$, $8.8 \pm 2.4\%$, $3.1 \pm 1.2\%$ y $2.1 \pm 0.9\%$ en el GRD L5 el día 3, 7, 14 y 21, respectivamente. De igual forma, la ligadura disminuyó la inmunorreactividad del marcador CGRP a $33.1 \pm 5.2\%$, $10.3 \pm 4.7\%$, $5.2 \pm 1.8\%$ y $1.1 \pm 0.2\%$ al día 3, 7, 14 y 21, respectivamente (**Tabla 5C**). Cabe destacar que no se presentaron cambios en la inmunorreactividad de IB4 y CGRP en el ganglio no ligado (L4).

7.1.4. Distribución del tamaño de las neuronas que expresan al ATF2 en los GRDs L4, L5 y L6

También investigamos los cambios morfológicos que ocurren en los GRDs tras la ligadura de los nervios espinales y el tipo de neuronas que expresan al ATF2 de acuerdo al tamaño celular. Las neuronas se clasificaron como pequeñas ($\leq 600 \mu\text{m}^2$), medianas ($600-1200 \mu\text{m}^2$) o grandes ($>1200 \mu\text{m}^2$) de acuerdo al área de su soma (Bravo-Hernández et al., 2016). Encontramos que el ATF2 se expresó constitutivamente en las neuronas pequeñas, medianas y grandes de los GRD L4, L5 y L6 de ratas *naïve* (**Figura 8**). La ligadura de los nervios no modificó la frecuencia de distribución del ATF2 respecto al tamaño de las neuronas del GRD L4 (**Figura 8A**). En contraste, la ligadura de los nervios L5-L6 disminuyó la proporción de neuronas totales (NeuN⁺) con respecto al tiempo y aumentó la proporción de neuronas que expresaba al ATF2 (**Figura 8B-C**).

Tabla 5. Cuantificación de la inmunorreactividad del ATF2 (A), IB4 (B) y CGRP (C) en los GRDs L4, L5 y L6. La cuantificación se llevó a cabo en grupos de ratas *naïve*, *sham* y de 3, 7, 14 y 21 días post-cirugía.

A	% Neuronas ATF2+/Neuronas NeuN+					
	<i>Naïve</i>	<i>Sham</i>	3	7	14	21
L4	42.9 ± 2.2	41.3 ± 2.7	46.6 ± 1.8	42.2 ± 2.2	42.1 ± 1.3	42.9 ± 1.3
L5	43.5 ± 2.1	42.4 ± 1.1	34.6 ± 1.8*	55.6 ± 2.7*	66.6 ± 2.3**	72.3 ± 4.4***
L6	42.8 ± 0.9	41.1 ± 1.3	35.3 ± 2.5*	59.1 ± 2.4**	69.3 ± 4.1**	76.5 ± 3.2***

B	% Neuronas IB4+/Neuronas totales					
	<i>Naïve</i>	<i>Sham</i>	3	7	14	21
L4	28.3 ± 2.6	26.92 ± 3.5	30.53 ± 4.3	33.37 ± 2.2	28.07 ± 2.4	28.98 ± 3.1
L5	32.5 ± 2.6	27.2 ± 3.1	21.2 ± 3.2*	19.1 ± 4.9*	6.1 ± 1.7***	3.2 ± 1.3***
L6	28.3 ± 3.6	31.5 ± 3.0	21.1 ± 2.3*	21.9 ± 3.5*	5.3 ± 0.8***	4.8 ± 0.5***

C	% Neuronas CGRP+/Neuronas totales					
	<i>Naïve</i>	<i>Sham</i>	3	7	14	21
L4	37.2 ± 1.0	33.2 ± 2.5	32.9 ± 4.3	36.0 ± 1.3	38.0 ± 2.2	34.3 ± 3.9
L5	38.1 ± 2.9	36.4 ± 3.2	21.8 ± 2.6*	8.8 ± 2.4***	3.1 ± 1.2***	2.1 ± 0.9***
L6	39.1 ± 1.3	36.2 ± 3.7	33.1 ± 5.2	10.3 ± 4.7***	5.3 ± 1.8***	1.1 ± 0.2***

Se muestra el promedio ± EEM de 4 GRD de animales independientes. Se cuantificó el número de neuronas ATF2+/el número de neuronas NeuN+ o totales x 100. * p < 0.05 vs *naïve*; ** p < 0.01 vs *naïve*; *** p < 0.001 vs *naïve*; por ANOVA 1V/Dunnett.

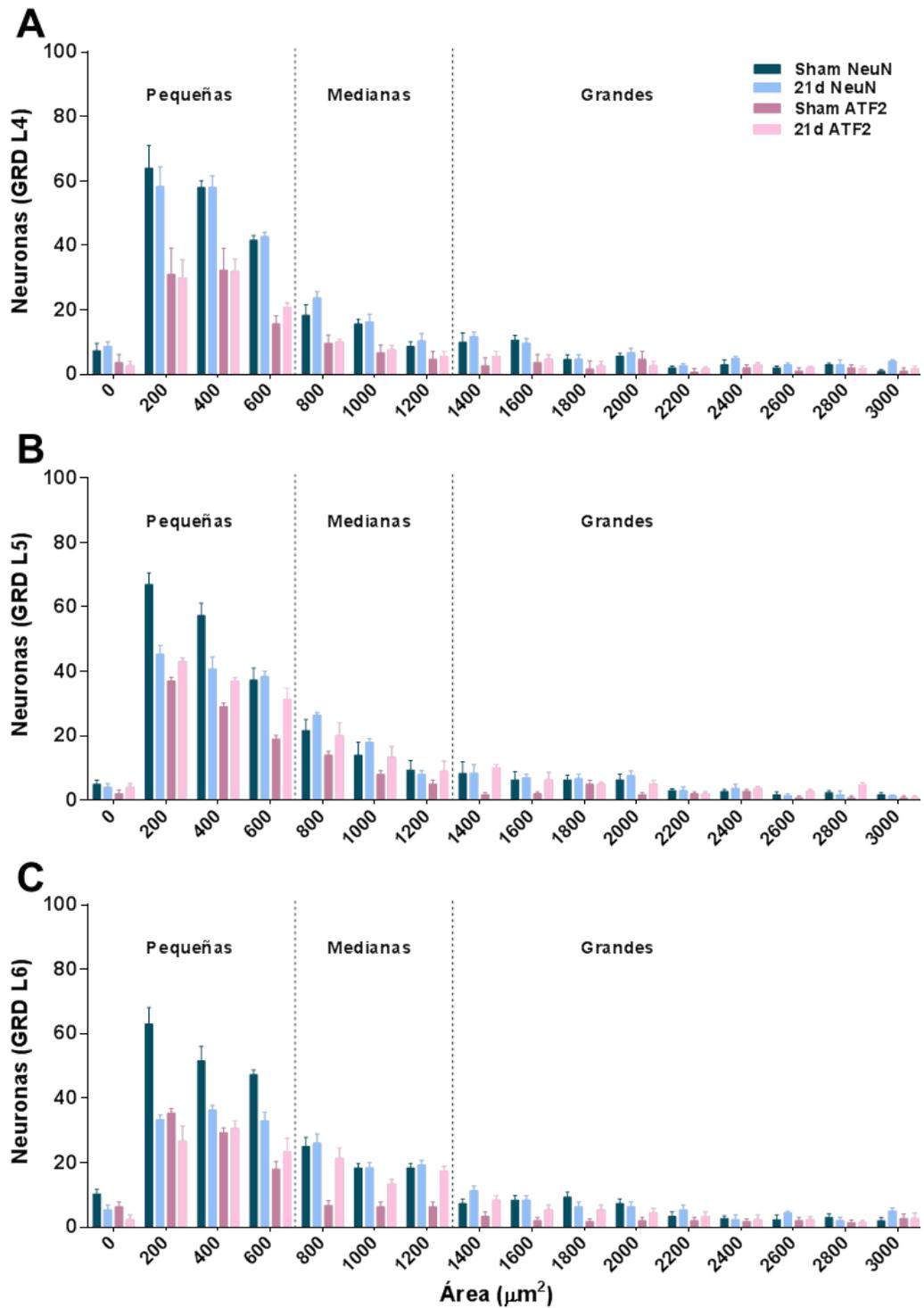


Figura 8. Distribución del ATF2 respecto al tamaño de las neuronas del GRD L4 (A), L5 (B) y L6 (C). La medición se llevó a cabo en grupos de ratas *sham* y de 21 días post-cirugía. Se grafica el área celular (μm^2) de las neuronas NeuN⁺ y ATF2⁺ de 3 GRDs L4, L5 y L6 de animales independientes. Los datos se expresan como una proporción.

7.1.5. Inmunorreactividad del ATF2 en la médula espinal

El ATF2 se expresó de manera constitutiva en el núcleo de neuronas del asta dorsal de la médula espinal de ratas *naïve* y *sham*. La ligadura aumentó la inmunorreactividad del ATF2 en las láminas superficiales I-V del asta dorsal de la médula espinal al día 7, 14 y 21 post-cirugía (**Figura 9**). Las **figuras 10** y **11** muestran la inmunorreactividad del ATF2 con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), no peptidérgicas (IB4⁺), astrocitos (GFAP⁺) y microglía (OX-42⁺) en ratas *sham* y ratas con 21 días post-cirugía, respectivamente. Estos datos sugieren que el ATF2 se expresa mayormente en las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal. Es importante resaltar que tanto el marcador de neuronas peptidérgicas como el de neuronas no peptidérgicas muestran inmunorreactividad en el citoplasma de las neuronas y el ATF2 en los núcleos neuronales. Por lo tanto, no se observa colocalización. No obstante, realizamos análisis de cortes en Z (*Z-stacks*) en el microscopio confocal para determinar si la marca se encontraba en la misma célula y nuestros resultados sugieren que la ligadura de nervios espinales provoca la expresión del ATF2 en el núcleo de los astrocitos (GFAP⁺) (**Figura 12**). Además, el ATF2 también se expresó en motoneuronas (CGRP⁺) del asta ventral de la médula espinal de manera constitutiva (**Figura 13**).

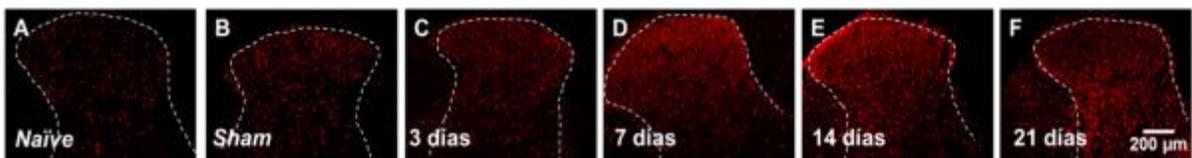


Figura 9. Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF2 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas *naïve*, *sham* y ratas con ligadura de nervios espinales (SNL) L5-L6 (rojo). La inmunorreactividad se evaluó en los días 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. Barra de calibración 200 μm .

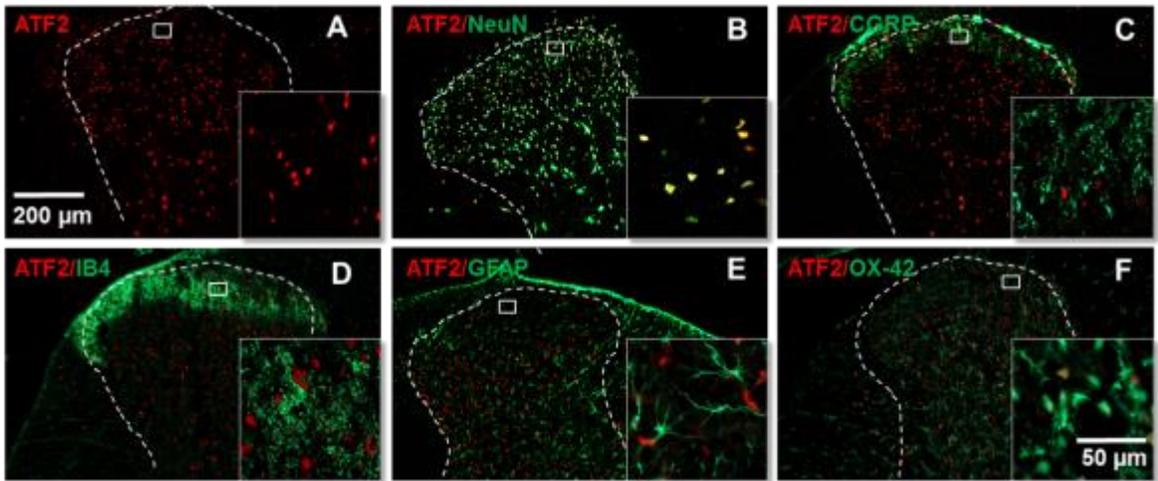


Figura 10. Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas *sham* y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), neuronas no peptidérgicas (IB4⁺), astrocitos (GFAP⁺) y microglía (OX-42⁺) (verde). Barra de calibración, 200 y 50 μ m.

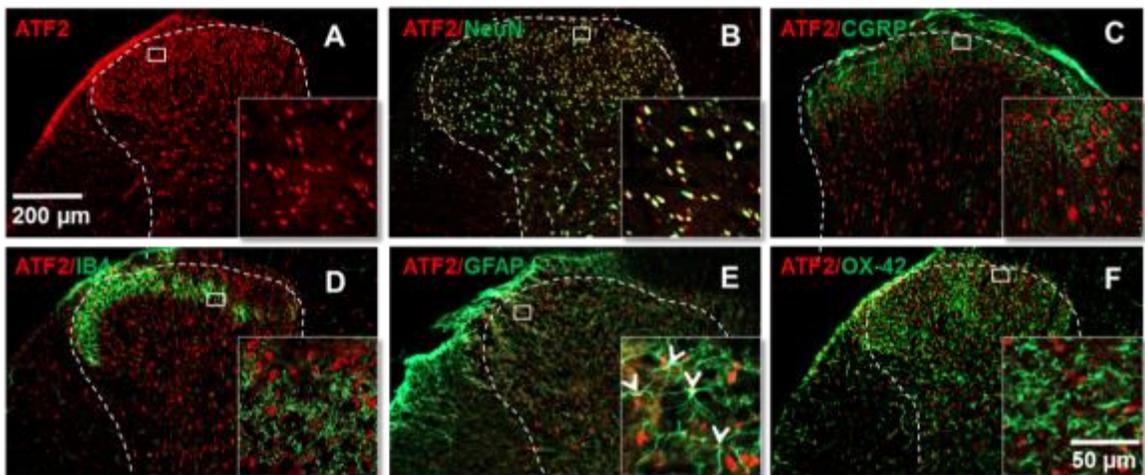


Figura 11. Distribución de la inmunorreactividad del ATF2 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales (21 días) y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), neuronas no peptidérgicas (IB4⁺), astrocitos (GFAP⁺) y microglía (OX-42⁺) (verde). La punta de flecha blanca (E) indica inmunorreactividad del ATF2 en el núcleo de los astrocitos. Barra de calibración, 200 y 50 μ m.

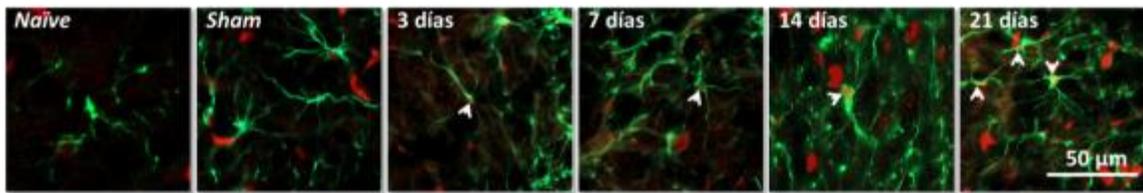


Figura 12. Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF2 (rojo) y GFAP (verde) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas *naïve*, *sham* y con ligadura de nervios espinales L5-L6. La expresión se evaluó al día 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. La punta de flecha blanca indica la inmunorreactividad del ATF2 en el núcleo de los astrocitos. Las figuras representan una sección de cortes en Z (*Z-stack*) tomadas con el microscopio confocal. Barra de calibración, 50 μm .

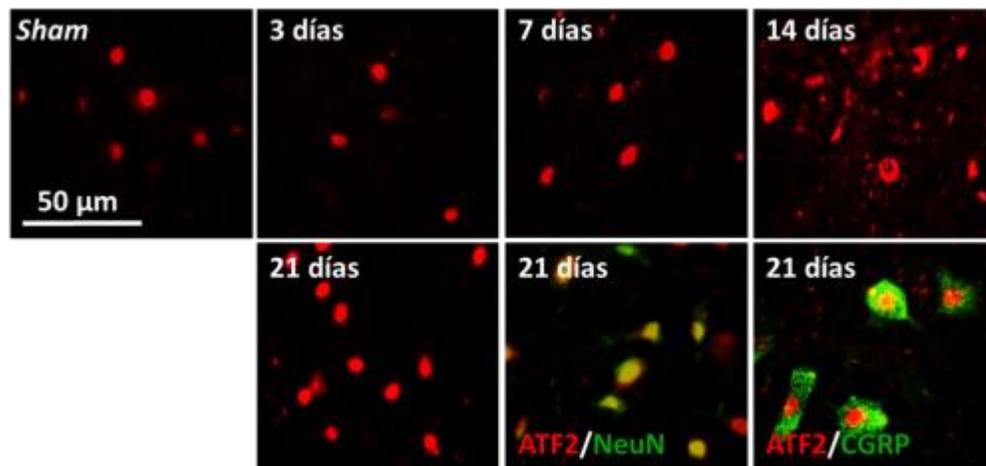


Figura 13. Inmunorreactividad del ATF2 (rojo) en la región ventral ipsilateral de la médula espinal de ratas *sham* y ratas con ligadura de nervios espinales L5-L6 y su colocación con el marcador de núcleos neuronales (NeuN^+) y de neuronas peptidérgicas (CGRP^+) (verde). La expresión se evaluó al día 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. Barra de calibración, 50 μm .

7.1.6. Cuantificación de la inmunorreactividad del ATF2 en la médula espinal

El ATF2 se expresó constitutivamente en la médula espinal de ratas *naïve* y *sham* con una intensidad de fluorescencia promedio de $525 \pm 53.2\%$ y $508 \pm 81.7\%$, respectivamente. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia incrementó a $856 \pm 94.7\%$, $1100 \pm 106.8.7\%$, $1471 \pm 179.27\%$ y $1872 \pm 112.8\%$ en la médula espinal de ratas con 3, 7, 14 y 21 días post-cirugía, respectivamente (**Tabla 6**).

Tabla 6. Cuantificación de la inmunoreactividad del ATF2 en el asta dorsal de la médula espinal. La cuantificación se llevó a cabo en grupos de ratas *naïve*, *sham* y de 3, 7, 14 y 21 días post-cirugía.

	Intensidad de fluorescencia promedio de ATF2					
	<i>Naïve</i>	<i>Sham</i>	3	7	14	21
Médula espinal	525 ± 53.2	508.4 ± 81.7	856 ± 94.7**	1100 ± 106.2***	1471 ± 179.2***	1872 ± 112.8***

Se muestra el promedio ± EEM de 4-5 secciones por médula espinal de 4 animales independientes. ** p < 0.01 vs *naïve*; *** p < 0.001 vs *naïve*; por ANOVA 1V/Dunnett.

7.1.7. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF2 sobre el umbral nociceptivo mecánico

La administración intratecal repetida (3 inyecciones) del siRNA del ATF2, pero no del siRNA control, produjo alodinia mecánica transitoria en las ratas *naïve* (**Figura 14A-B**). La ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo alodinia mecánica que se mantuvo hasta el día 21 post-cirugía. La administración intratecal del siRNA del ATF2 y del anticuerpo neutralizante del ATF2 revirtió parcialmente la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales (**Figura 14C-D**). Este efecto anti-alodínico persistió hasta por 72 horas después de la última administración

7.1.8. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF2 sobre el umbral nociceptivo térmico

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 y del siRNA control no modificó la latencia de retiro en las ratas *naïve* (**Figura 15A-B**). La ligadura de los nervios L5-L6 produjo hiperalgesia térmica que se mantuvo hasta el día 21 post-cirugía. La administración intratecal del siRNA del ATF2 y del anticuerpo neutralizante del ATF2 revirtió totalmente la hiperalgesia térmica

inducida por la ligadura de los nervios espinales (**Figura 15C-D**). Ambos efectos fueron prolongados y se mantuvieron por 5 y 6 días después de la última administración, respectivamente. Sin embargo, el efecto el anticuerpo neutralizante fue mayor.

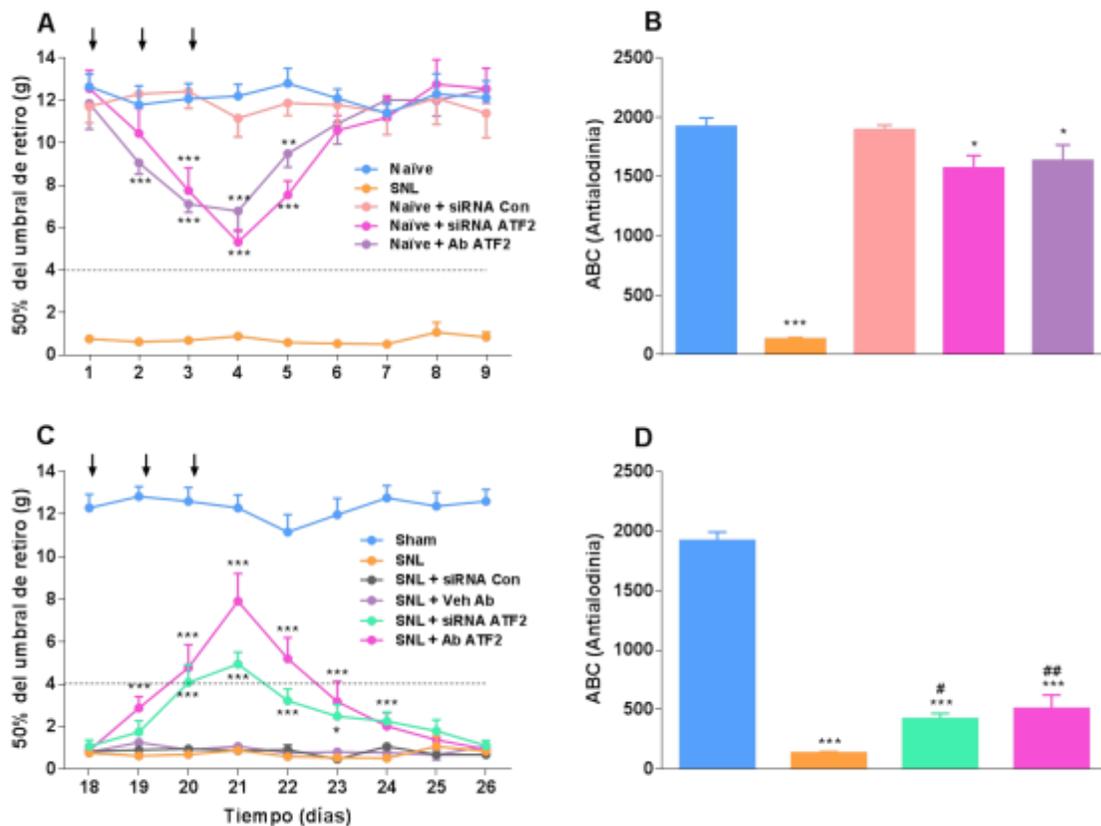


Figura 14. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 (siRNA ATF2) y del anticuerpo neutralizante (Ab ATF2) sobre el umbral nociceptivo mecánico en ratas *naïve* (A) y con ligadura de los nervios espinales (SNL) (C). B y D muestran el área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la gráfica A y C, respectivamente. Se grafica el promedio \pm EEM de 6 animales. * $p < 0.05$ vs SNL; ** $p < 0.01$ vs SNL; *** $p < 0.001$ vs SNL; por ANOVA 2V/Dunnett (A, C). *** $p < 0.001$ vs *sham*; # $p < 0.05$ vs SNL; ## $p < 0.01$ vs SNL; por ANOVA 1V/Dunnett (B, D).

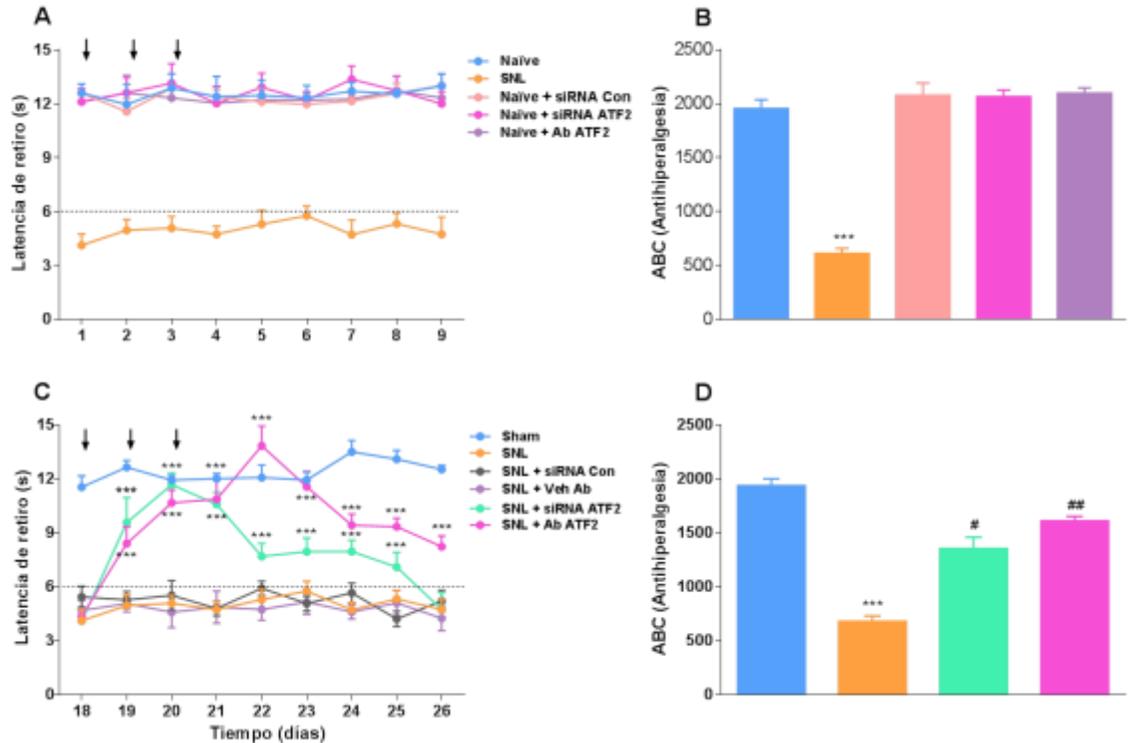


Figura 15. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 (siRNA ATF2) y del anticuerpo neutralizante (Ab ATF2) sobre el umbral nociceptivo térmico en ratas *naïve* (A) y con ligadura de los nervios espinales (SNL) (C). B y D muestran el área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la gráfica A y C, respectivamente. Se grafica el promedio \pm EEM de 6 animales. *** $p < 0.001$ vs SNL; por ANOVA 2V/Dunnett (A, C). *** $p < 0.001$ vs *sham*; # $p < 0.05$ vs SNL; ## $p < 0.01$ vs SNL; por ANOVA 1V/Dunnett (B, D).

7.1.9. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 sobre la expresión de su ARN mensajero

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 redujo parcialmente la expresión del ARN mensajero del ATF2 en los GRDs L4, L5, L6 y en la región lumbar de la médula espinal de ratas *naïve*. La administración repetida del siRNA control no tuvo efecto sobre la expresión del ARN mensajero del ATF2 (**Figura 16**).

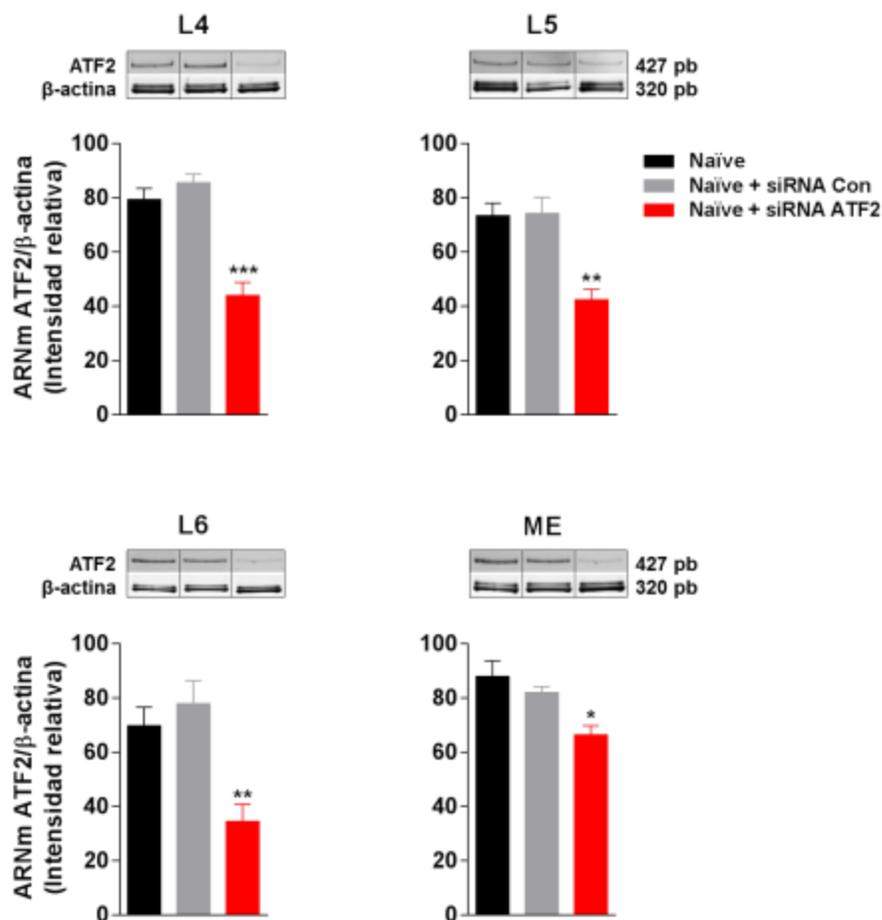


Figura 16. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA control (siRNA Con) y del siRNA del ATF2 (siRNA ATF2) sobre la expresión de su ARN mensajero en ratas *naïve*. Se grafica el promedio \pm SEM de 4 animales independientes. Los insertos arriba de las barras representan el *immunoblot* de 1 animal por grupo experimental. * $p < 0.05$ vs *naïve*; ** $p < 0.01$ vs *naïve*; *** $p < 0.001$ vs *naïve*, por ANOVA 1V/Dunnett.

7.1.10. Efecto de la administración intratecal del siRNA del ATF2 sobre la expresión del ARN mensajero de los genes *Trpv1* y *Trpv2*

Debido a que el tratamiento con el siRNA y con el anticuerpo de ATF2 revirtió totalmente la hiperalgesia térmica, decidimos investigar si el ATF2 podría modular la expresión de genes encargados de la percepción de estímulos térmicos durante el establecimiento del dolor neuropático. Por lo tanto, evaluamos la expresión del ARNm de los genes *Trpv1* y *Trpv2* en ratas con ligadura de nervios espinales que fueron inyectadas repetidamente con el siRNA del ATF2 bajo el esquema experimental descrito anteriormente. La

ligadura de los nervios espinales disminuyó la expresión del ARNm de gen *Trpv1* en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal a los 21 días post-cirugía. En contraste, el tratamiento repetido con el siRNA revirtió totalmente la expresión del *Trpv1* en el GRD L4 y parcialmente en la médula espinal. Cabe destacar que el tratamiento repetido con el siRNA del ATF2 no modificó la expresión del *Trpv1* en los GRDs lesionados (**Figura 17**).

Por otra parte, la ligadura de los nervios espinales disminuyó la expresión del *Trpv2* sólo en los GRDs lesionados, pero no el en GRD L4 ni en la médula espinal (**Figura 18**) espinal. Interesantemente, el tratamiento repetido con el siRNA del ATF2 redujo la expresión del *Trpv2* en el GRD L4 y en la médula espinal.

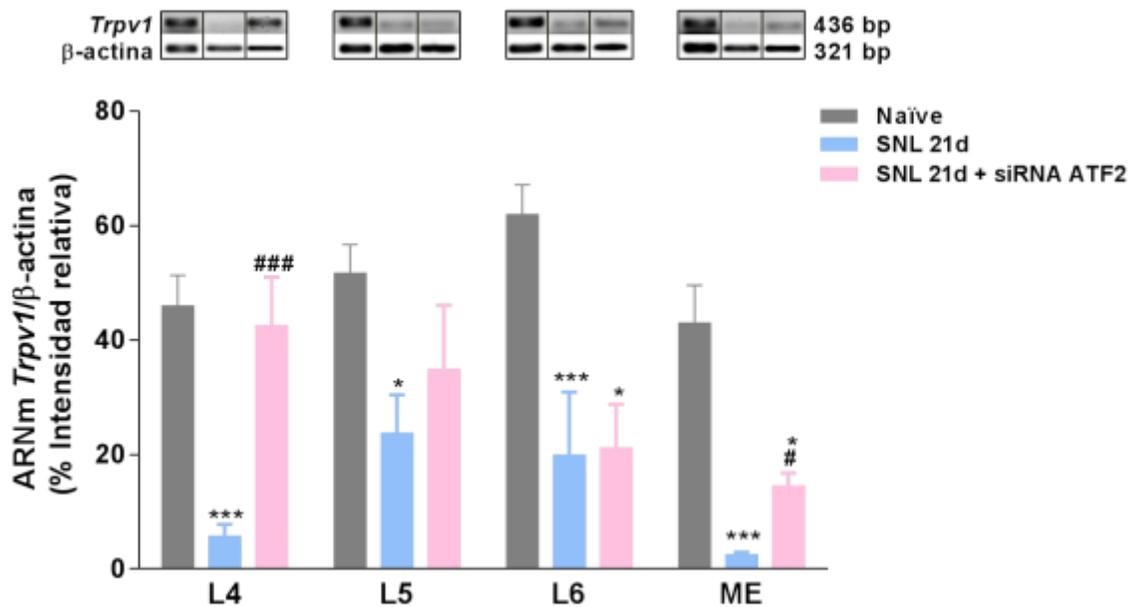


Figura 17. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 (siRNA ATF2) sobre la expresión del ARNm del gen *Trpv1* en ratas con 21 días post ligadura de los nervios espinales (SNL 21d). Se grafica el promedio \pm EEM de 4 animales independientes. Los insertos arriba de las barras representan el *immunoblot* de 1 animal por grupo experimental. * $p < 0.05$ vs Naïve; *** $p < 0.001$ vs Naïve; ### $p < 0.001$ vs SNL 21d por ANOVA 2V/Dunnett.

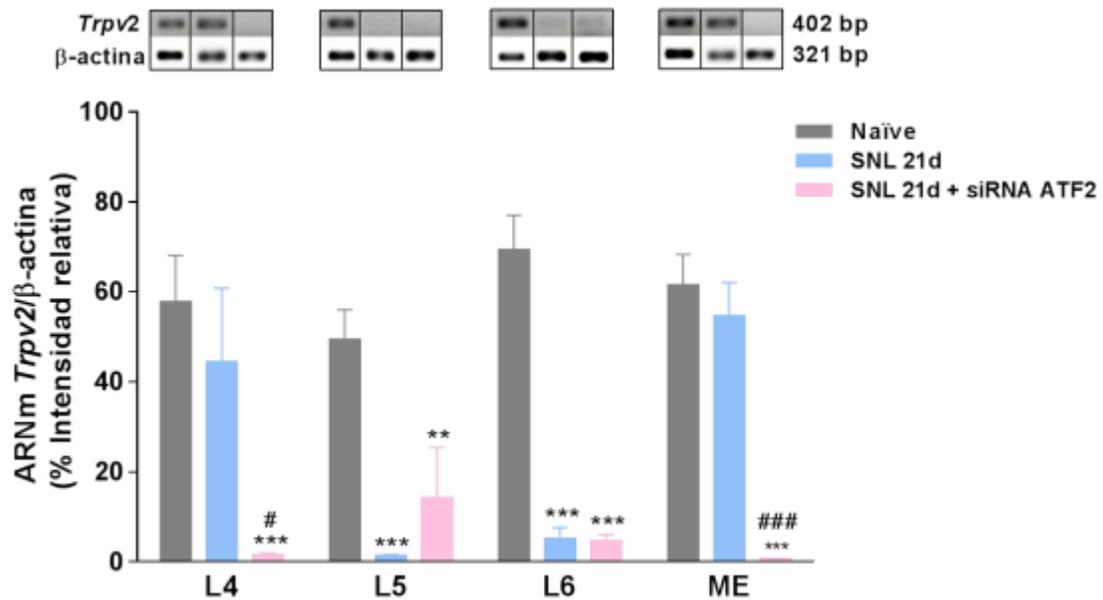


Figura 18. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF2 (siRNA ATF2) sobre la expresión del ARNm del gen *Trpv2* en ratas con 21 días post ligadura de los nervios espinales (SNL 21d). Se grafica el promedio \pm EEM de 4 animales independientes. Los insertos arriba de las barras representan el *inmunoblot* de 1 animal por grupo experimental. ** $p < 0.01$ vs Naïve; *** $p < 0.001$ vs Naïve; # $p < 0.05$ vs SNL 21d; ### $p < 0.001$ vs SNL 21d por ANOVA 2V/Dunnett.

7.2. ATF3

7.2.1. Expresión del ATF3 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6

La ligadura de los nervios espinales L5-L6 aumentó la expresión de la proteína ATF3 en el GRD L4 a los 3 días posteriores al daño y en los GRDs L5 y L6 a los 3, 7, 14 y 21 días. Además, la ligadura incrementó la expresión del ATF3 en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal (**Figura 19**).

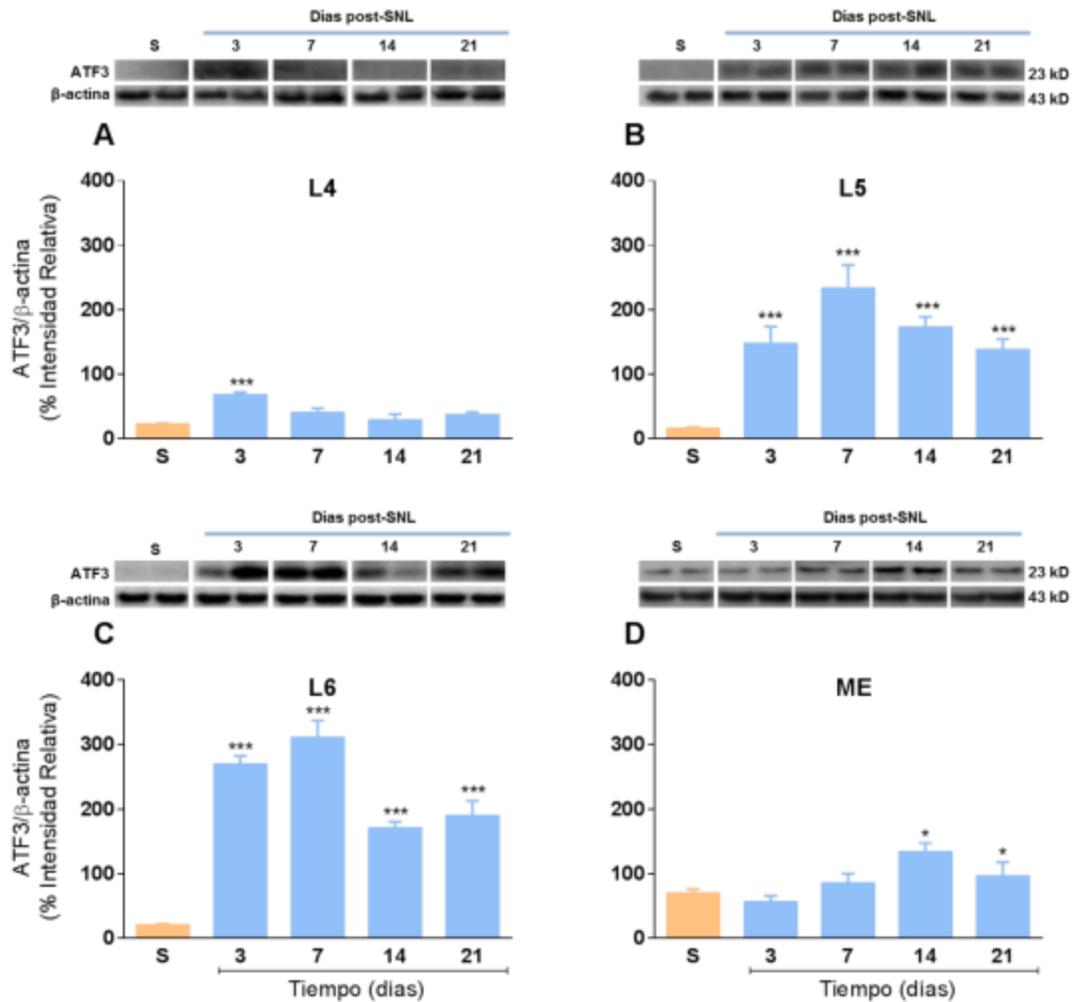


Figura 19. Expresión de la proteína ATF3 en los GRDs L4 (A), L5 (B), L6 (C) y en la médula espinal (ME) (D) de ratas con ligadura de los nervios espinales (SNL) L5-L6. La expresión del ATF3 se evaluó a los días 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM. de 4 animales por grupo experimental. Los insertos arriba de las barras representan los *immunoblots* de 2 animales por grupo experimental. * $p < 0.05$ vs Sham (S); *** $p < 0.001$ vs S por ANOVA 1V/Dunnett.

7.2.2. Inmunorreactividad del ATF3 en los GRDs

El ATF3 es una proteína inducible por daño, por lo tanto se expresa a muy bajos niveles en neuronas intactas (*naïve y sham*) (**Figura 20**). Sin embargo, la ligadura de los nervios espinales L5-L6 aumentó la inmunorreactividad del ATF3 en el GRD L4 a los 3 días post-cirugía y a los 3, 7, 14 y 21 días en los GRDs ligados (**Figura 20-21**). A los 21 días post-cirugía encontramos que el ATF3 aumentó su inmunorreactividad en el núcleo de las neuronas (NeuN⁺)

(Figura 21). Interesantemente, encontramos que a los 21 días post-cirugía menos del 2% y 5% de neuronas son inmunorreactivas para CGRP e IB4, respectivamente (Tabla 1 B-C) y del total de neuronas inmunorreactivas a CGRP, el 100% colocaliza con el ATF3 (Figura 21). Además, no se observó inmunorreactividad del ATF3 con el marcador de células satélite (GFAP) bajo nuestras condiciones experimentales (Figura 21).

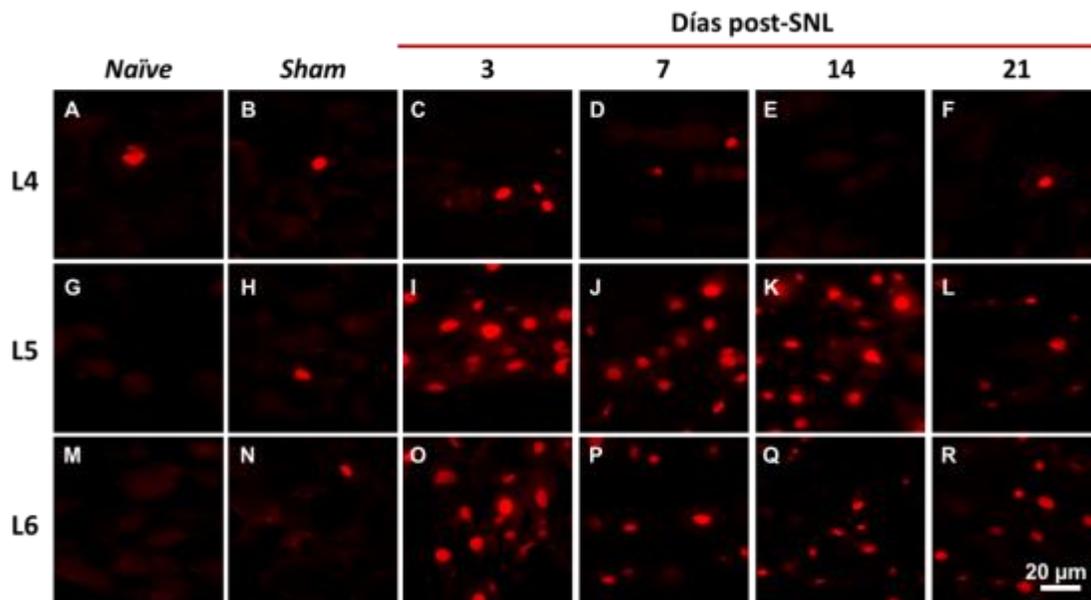


Figura 20. Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF3 en los GRDs L4 (A-F), L5 (G-L) y L6 (M-R) de ratas *naïve*, *sham* y de 3, 7, 14 y 21 días post-ligadura de los nervios espinales (SNL). Barra de calibración, 20 μ m.

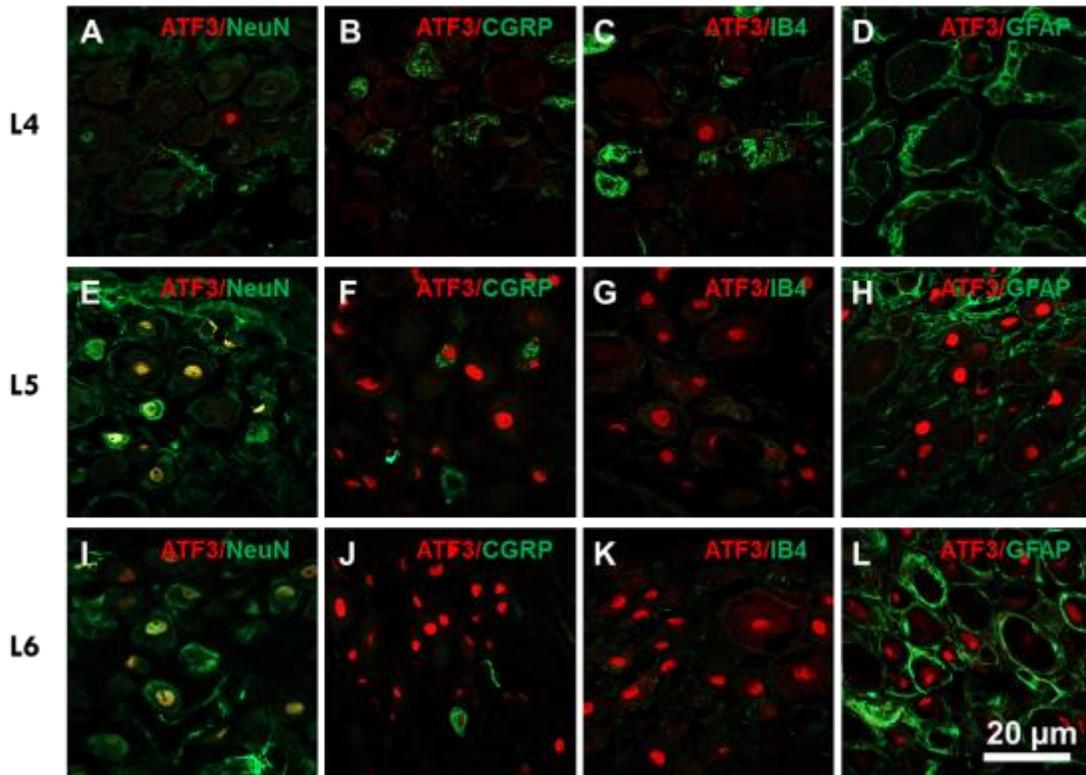


Figura 21. Distribución de la inmunorreactividad del ATF3 (rojo) en los GRDs L4 (A-D), L5 (E-H) y L6 (J-L) de ratas con 21 días post-cirugía. La expresión del ATF3 se evaluó en presencia del marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas, peptidérgicas (CGRP⁺), neuronas no peptidérgicas (IB4⁺) y células satélite (GFAP⁺) (todos en verde). Barra de calibración, 20 µm.

7.2.3. Inmunorreactividad del ATF3 en la médula espinal

El ATF3 se expresa a bajos niveles en la médula espinal de ratas *sham*. Sin embargo, la ligadura incrementó la inmunorreactividad del ATF3 en el asta dorsal de la médula espinal al día 7, 14 y 21 post-cirugía (**Figura 22**). Las **figuras 23 y 24** muestran la colocalización de la inmunorreactividad del ATF3 con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), neuronas no peptidérgicas (IB4⁺), astrocitos (GFAP⁺) y microglía (OX-42⁺) en ratas *sham* y ratas con 21 días post-cirugía, respectivamente. Estos datos sugieren que el ATF3 se expresa en los núcleos de las neuronas que están en zonas adyacentes al daño, pero no en astrocitos o microglía. Interesantemente, el ATF3 también se expresó en el núcleo de las motoneuronas del asta ventral de la médula espinal tras la cirugía (**Figura 22**, flechas amarillas).

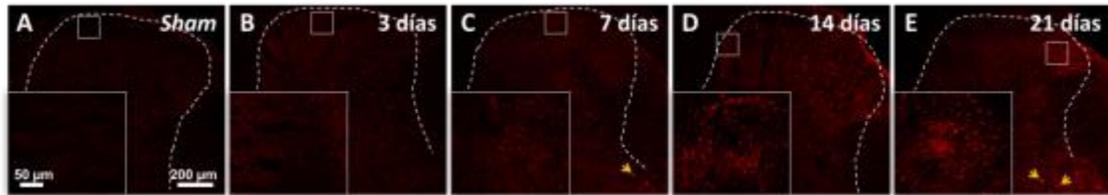


Figura 22. Curso temporal de la inmunoreactividad del ATF3 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas *sham* y ratas con ligadura de nervios espinales L5-L6. La expresión se evaluó los días 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. La punta de flecha amarilla muestra inmunoreactividad del ATF3 en motoneuronas. El recuadro de la esquina inferior izquierda es una amplificación del recuadro marcado en la región dorsal de la médula espinal. Barra de calibración, 50 y 200 μm .

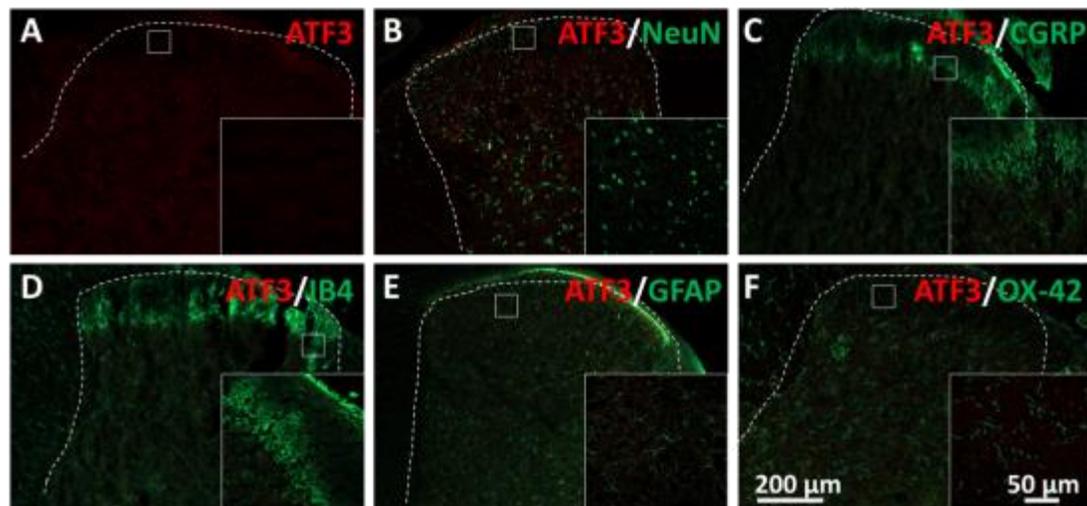


Figura 23. Distribución de la inmunoreactividad ATF3 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas *sham* (rojo) y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN^+), neuronas peptidérgicas (CGRP^+), no peptidérgicas (IB4^+), astrocitos (GFAP^+) y microglía (OX-42^+) (verde). El recuadro de la esquina inferior derecha es una amplificación del recuadro marcado en la región dorsal de la médula espinal. Barra de calibración, 200 y 50 μm .

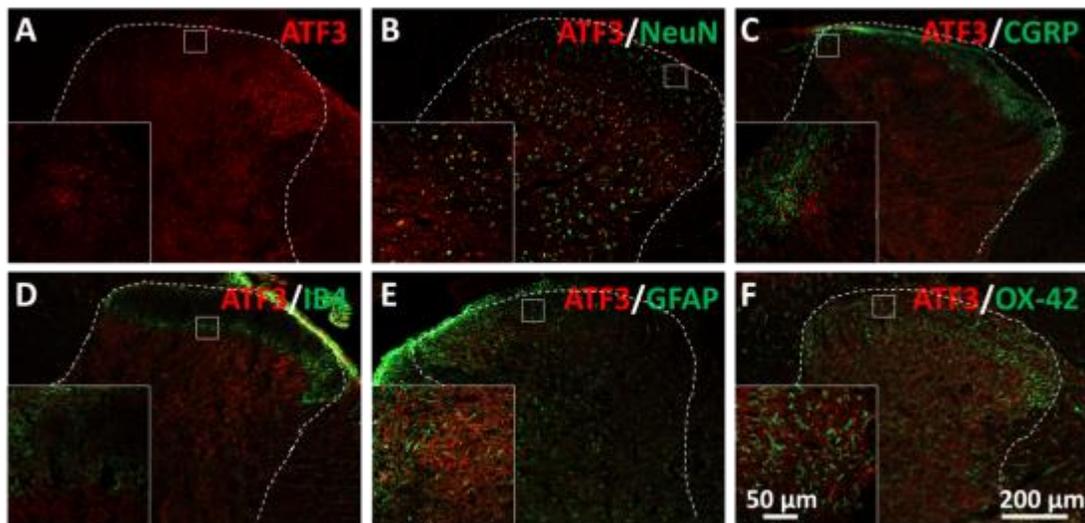


Figura 24. Distribución de la inmunoreactividad ATF3 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas con 21 días post-cirugía (rojo) y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), no peptidérgicas (IB4⁺), astrocitos (GFAP⁺) y microglía (OX-42⁺) (verde). El recuadro de la esquina inferior izquierda es una ampliación del recuadro marcado en la región dorsal de la médula espinal. Barra de calibración blanca, 200 y 50 μm .

7.2.4. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF3 sobre el umbral nociceptivo mecánico

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 y del siRNA control no alteró el umbral nociceptivo de ratas *naïve* (**Figura 25A-B**). La ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo alodinia mecánica que se mantuvo hasta el día 21 post-cirugía. La administración intratecal repetida del siRNA del ATF3, pero no del anticuerpo neutralizante del ATF3, revirtió ligeramente la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (**Figura 25C-D**). Este efecto persistió por 24 horas después de la última administración. Sin embargo, el efecto anti-alodínico no rebasa los 4 g y se considera ineficaz en el tratamiento del dolor.

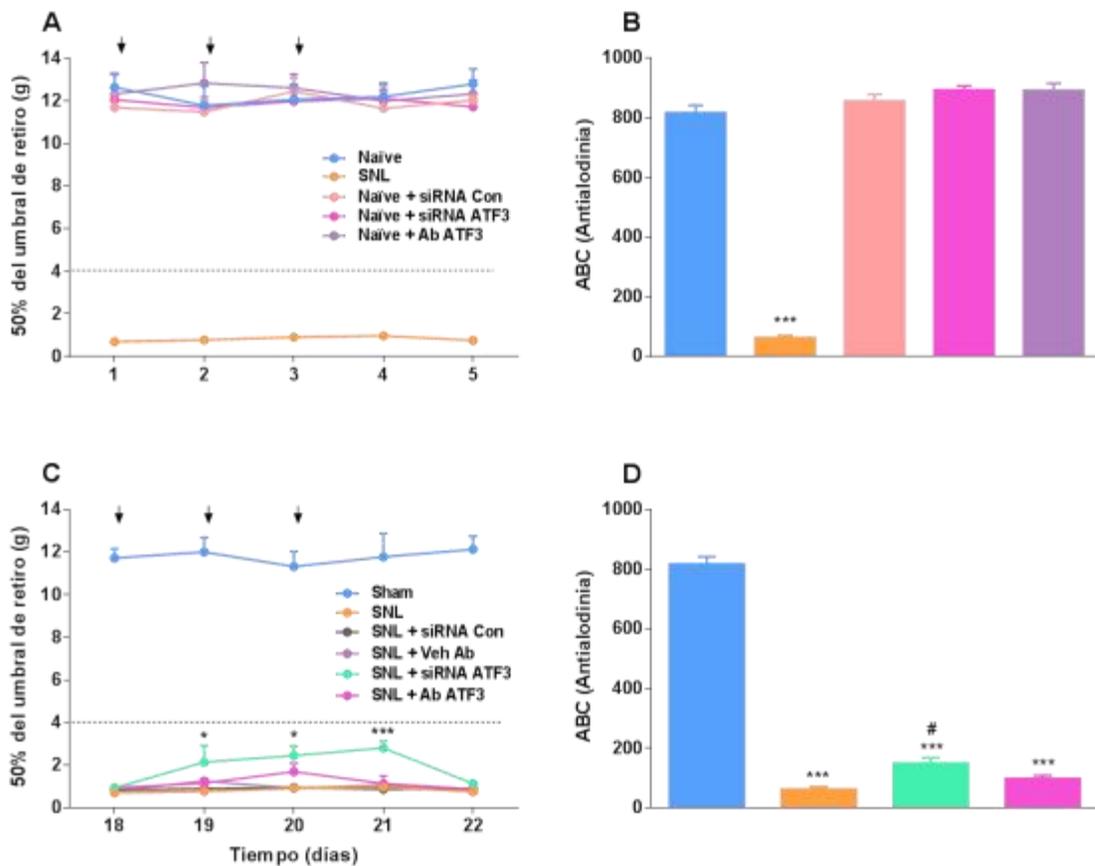


Figura 25. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA (siRNA ATF3) y del anticuerpo neutralizante del ATF3 (Ab ATF3) sobre el umbral nociceptivo mecánico en ratas *naïve* (A) y con ligadura de los nervios espinales (SNL) (C). B y D muestran el área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la gráfica A y C, respectivamente. Se grafica el promedio \pm EEM de 6 animales. * $p < 0.05$ vs SNL; *** $p < 0.001$ vs SNL; por ANOVA 2V/Dunnett (A y C). *** $p < 0.001$ vs *sham*; # $p < 0.05$ vs SNL; por ANOVA 1V/Dunnett (B y D).

7.2.5. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF3 sobre el umbral nociceptivo térmico

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 y del siRNA control no modificó la latencia de retiro en ratas *naïve*. La ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo hiperalgesia térmica que se mantuvo hasta el día 21 post-cirugía (**Figura 26A-B**). La administración intratecal del siRNA del ATF3 y del anticuerpo neutralizante del ATF3 revirtió ligeramente la hiperalgesia térmica inducida por la ligadura de los nervios espinales. Este efecto anti-

hiperalgésico se mantuvo por 24 horas después de la última administración (Figura 26 C-D).

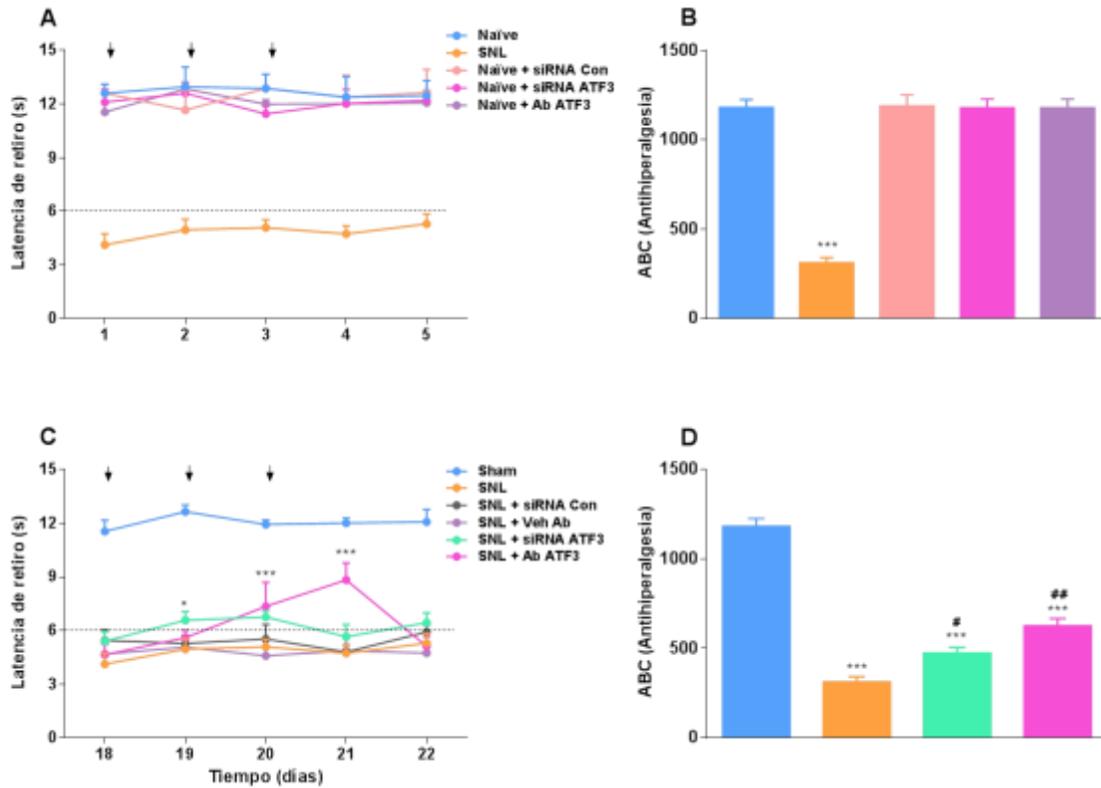


Figura 26. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA (siRNA ATF3) y del anticuerpo neutralizante del ATF3 (Ab ATF3) sobre el umbral nociceptivo térmico en ratas *naïve* (A) y con ligadura de los nervios espinales (SNL) (C). B y D muestran el área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la gráfica A y C, respectivamente. Se grafica el promedio \pm EEM de 6 animales. * $p < 0.05$ vs SNL; *** $p < 0.001$ vs SNL; por ANOVA 2V/Dunnett (A y C). *** $p < 0.001$ vs *sham*; # $p < 0.05$ vs SNL; ## $p < 0.01$ vs SNL; por ANOVA 1V/Dunnett (B y D).

7.2.6. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 sobre la expresión de su ARN mensajero

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 redujo parcialmente la expresión del ARN mensajero del ATF3 en los GRDs L4, L5 y L6 y en la región lumbar de la médula espinal de ratas ligadas. La administración repetida del siRNA control no tuvo efecto sobre la expresión del ARN mensajero del ATF3 (Figura 27).

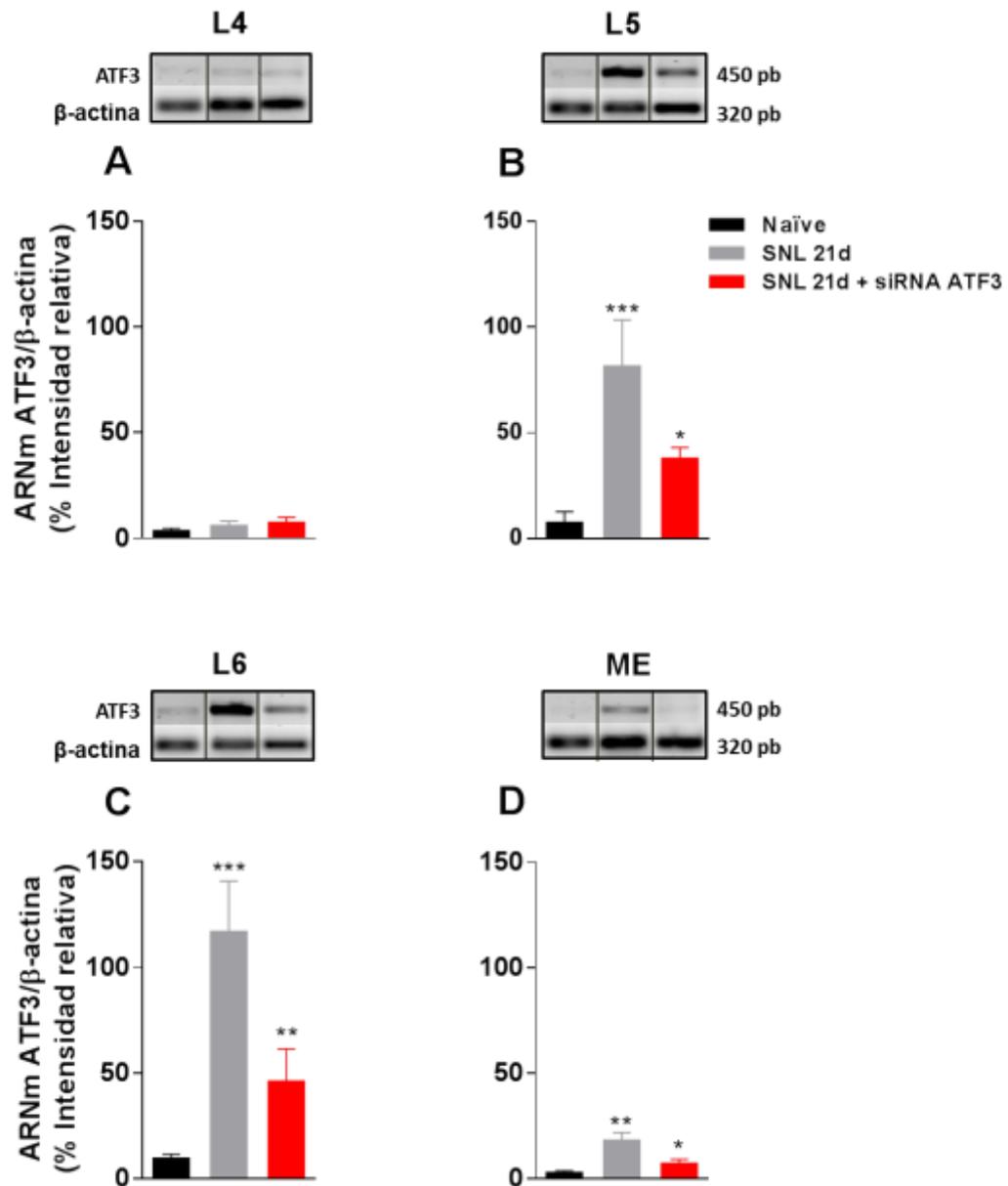


Figura 27. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 (siRNA ATF3) sobre la expresión de su ARN mensajero en ratas con ligadura de los nervios espinales de 21 días (SNL 21 d) post-cirugía. Se grafica el promedio \pm EEM de 4 animales independientes. Los insertos arriba de las barras representan el *immunoblot* de 1 animal por grupo experimental. * $p < 0.05$ vs SNL 21d; ** $p < 0.01$ vs SNL 21d; *** $p < 0.001$ vs SNL 21d, por ANOVA 1V/Dunnett.

7.3. ATF4

7.3.1. Expresión del ATF4 en los GRDs L4, L5, L6 y en la médula espinal de ratas con ligadura de los nervios espinales L5-L6

La ligadura de los nervios espinales L5-L6 aumentó la expresión de la proteína ATF4 en los GRDs L5, L6 pero no en L4 y en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal a los 14 y 21 días post-cirugía (**Figura 32**).

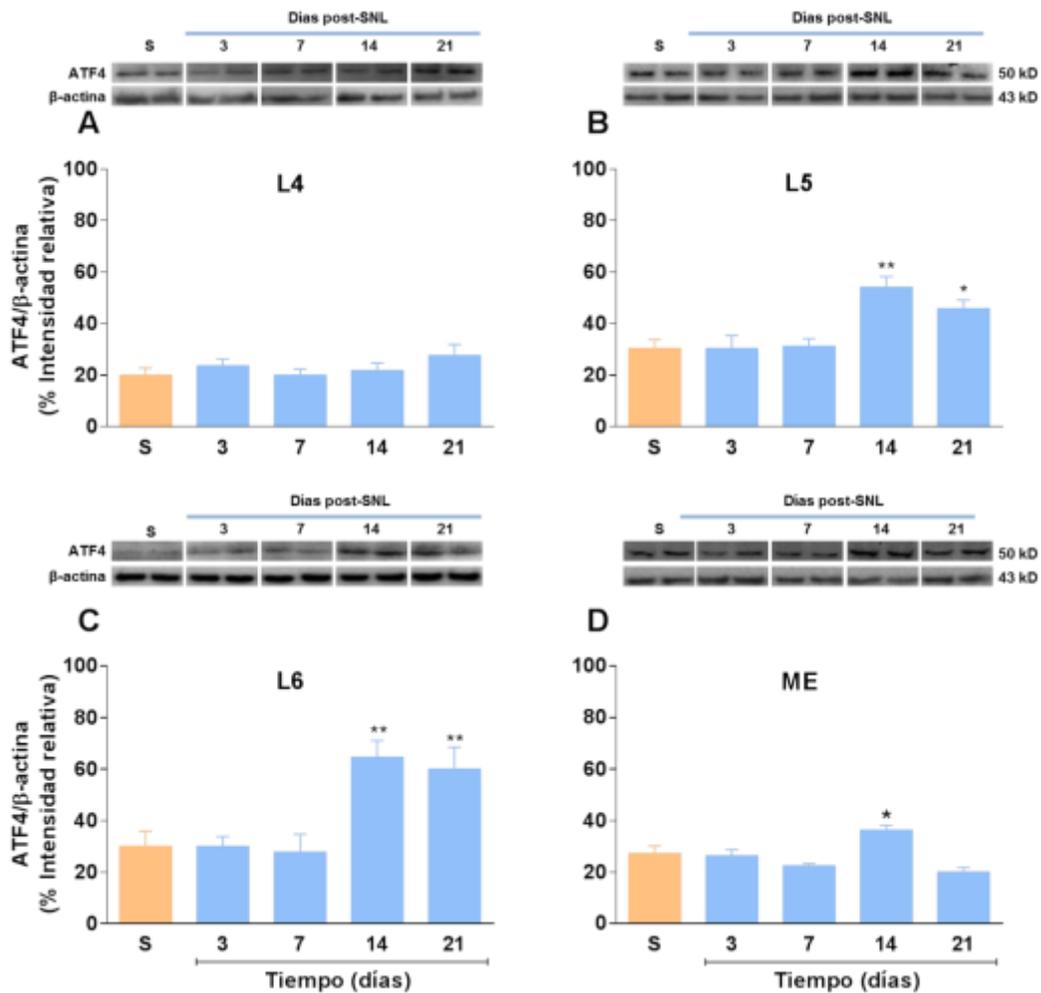


Figura 28. Expresión de la proteína ATF4 en los GRDs L4 (A), L5 (B), L6 (C) y en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal (ME) (D) de ratas con ligadura de los nervios espinales (SNL) L5-L6. La expresión del ATF4 se evaluó en ratas *sham* y ratas con 3, 7, 14 y 21 días post-cirugía. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM de 4 animales por grupo experimental. Los insertos arriba de las barras representan los *immunoblots* de 2 animales por grupo experimental. * $p < 0.05$ vs *Sham* (S); ** $p < 0.001$ vs S por ANOVA 1V/Dunnett.

7.3.2. Inmunorreactividad del ATF4 en los GRDs

El ATF4 es una proteína constitutiva que se expresa a bajos niveles en el citoplasma de animales intactos (*naïve* y *sham*) (flechas blancas) (**Figura 29A, F y K**). Sin embargo, la ligadura de los nervios espinales L5-L6 aumentó la inmunorreactividad del ATF4 en el núcleo de las neuronas de los GRDs L5 y L6 a los 3, 7, 14 y 21 días posteriores al daño. Interesantemente, la ligadura provocó un aumento de inmunorreactividad del ATF4 en el núcleo de algunas neuronas del GRD L4 (flechas amarillas) (**Figura 29C-E**). Además, se observó que el ATF4 colocaliza con el marcador de neuronas peptidérgicas (CGRP⁺) (flechas amarillas) en los GRDs L4, L5 y L6 de ratas *sham* y en menor proporción con el marcador de neuronas no peptidérgicas (IB4⁺) (flechas blancas). A los 14 días post-cirugía se observó la pérdida de la inmunorreactividad a IB4 y CGRP en los GRDs L5 y L6, pero no en el L4 (**Figura 31**).

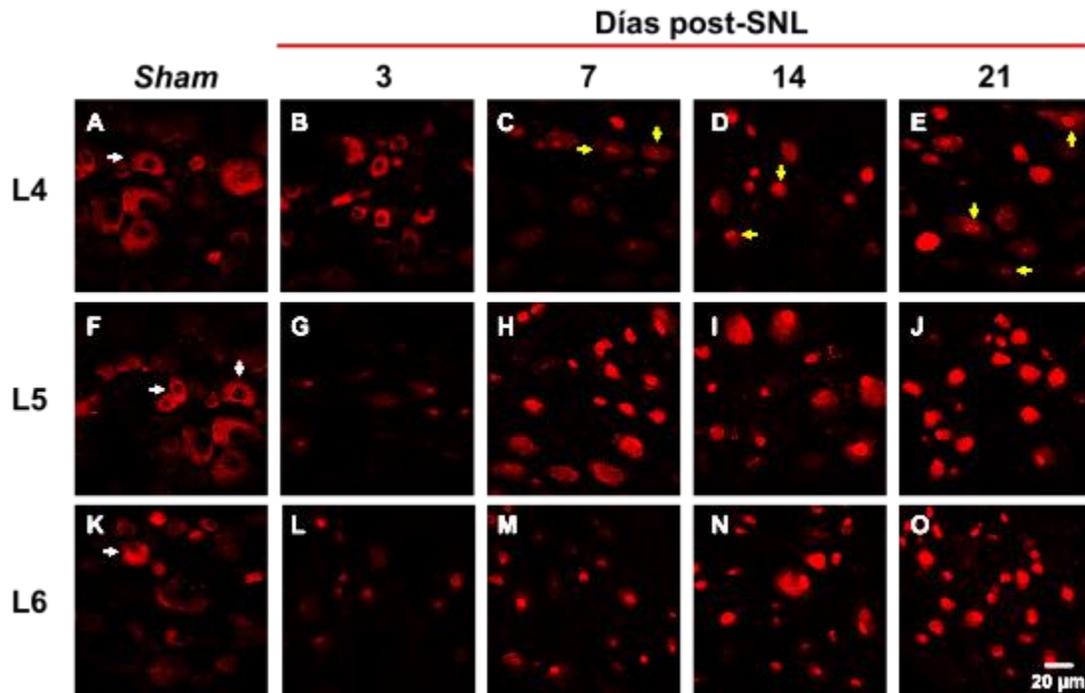


Figura 29. Curso temporal de la inmunorreactividad del ATF4 (rojo) en los GRDs L4 (A-E), L5 (F-J) y L6 (K-L) de ratas *sham* y ratas con ligadura de nervios espinales (SNL) L5-L6. La expresión del ATF4 se evaluó a los 3, 7, 14 y 21 días post-cirugía. Las flechas amarillas y blancas indican inmunorreactividad en el núcleo y citoplasma, respectivamente. Barra de calibración, 20 µm.

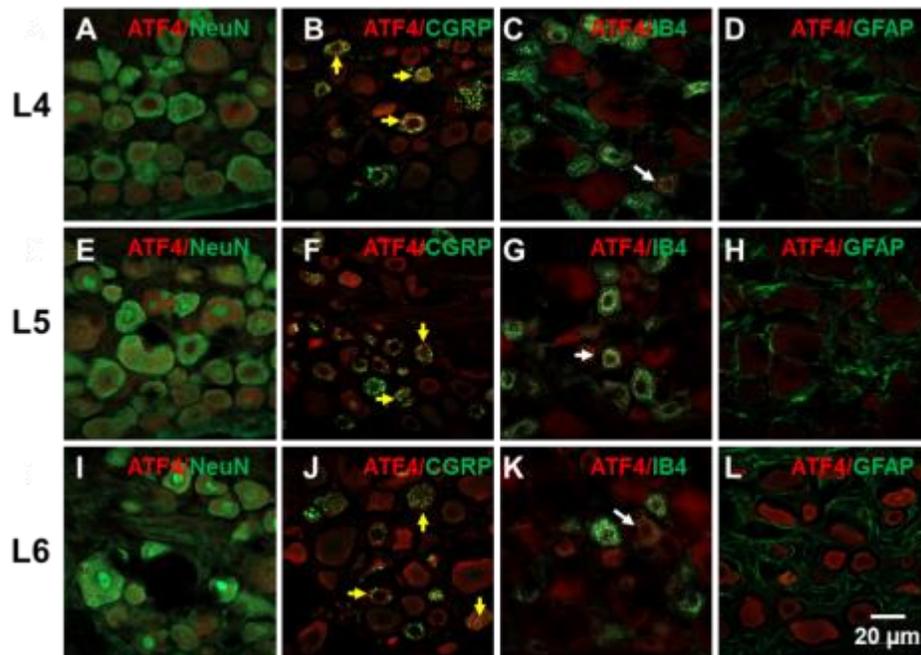


Figura 30 Distribución de la inmunoreactividad del ATF4 (rojo) en los GRDs L4 (A-D), L5 (E-H) y L6 (I-L) de ratas *sham* y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), no peptidérgicas (IB4⁺) y células satélite (GFAP⁺) (verde). Las flechas amarillas y blancas indican colocalización con neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas, respectivamente. Barra de calibración, 20 µm.

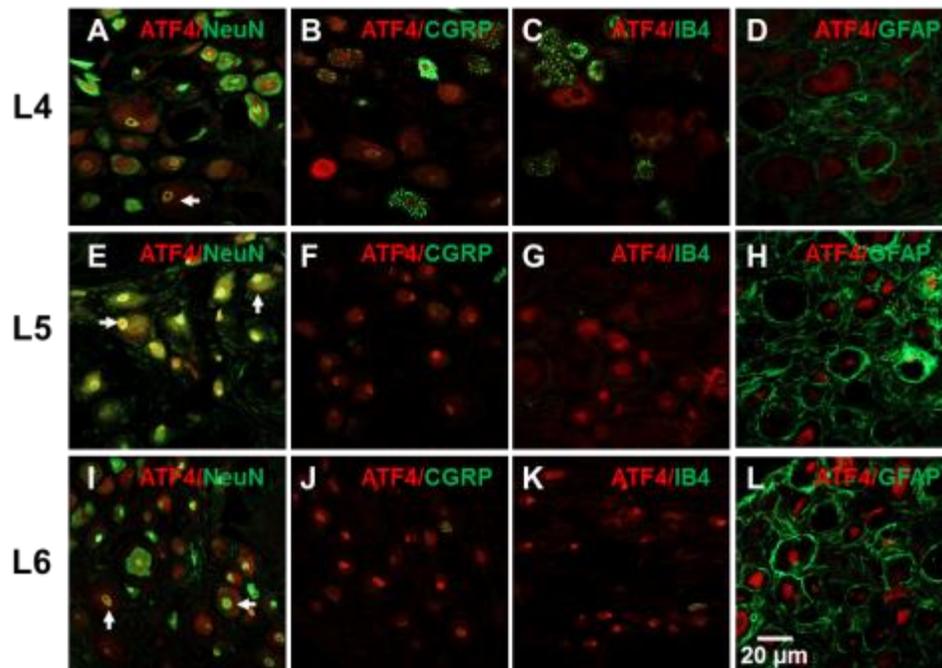


Figura 31 Distribución de la inmunoreactividad del ATF4 (rojo) en los GRDs L4 (A-D), L5 (E-H) y L6 (I-L) de ratas con 21 días post-cirugía y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), no peptidérgicas (IB4⁺) y de células satélite (GFAP⁺) (verde). Las flechas blancas indican colocalización en el núcleo neuronal. Barra de calibración, 20 µm.

7.3.3. Inmunorreactividad del ATF4 en la médula espinal

El ATF4 se expresó de manera constitutiva en la médula espinal de ratas *sham*. Además, la ligadura incrementó la inmunorreactividad del ATF4 en las láminas superficiales el asta dorsal de la médula espinal a los 7, 14 y 21 días post-cirugía (**Figura 32**). Al día 14 post-cirugía se observó el mayor incremento de la inmunorreactividad en la médula espinal (**Figura 32D**) Las **figuras 33** y **34** muestran la inmunorreactividad del ATF4 con el marcador de núcleos neuronales (NeuN), neuronas peptidérgicas (CGRP), no peptidérgicas (IB4), astrocitos (GFAP) y microglía (OX-42) en ratas *sham* y ratas con 14 días post-cirugía, respectivamente. Estos datos sugieren que el ATF4 se expresa sólo en los núcleos de las neuronas de la médula espinal tras la ligadura de los nervios espinales.

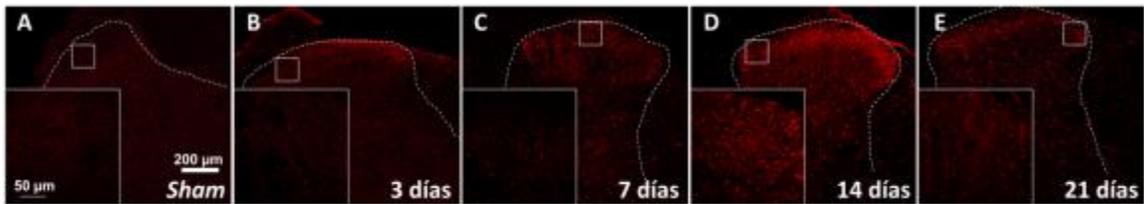


Figura 32. Curso temporal de inmunorreactividad del ATF4 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas *sham* y ratas con ligadura de nervios espinales (SNL) L5-L6. La inmunorreactividad se evaluó los días 3, 7, 14 y 21 post-cirugía. El recuadro de la esquina inferior izquierda es una ampliación del recuadro marcado en la región dorsal de la médula espinal. Barra de calibración, 50 y 200 μm .

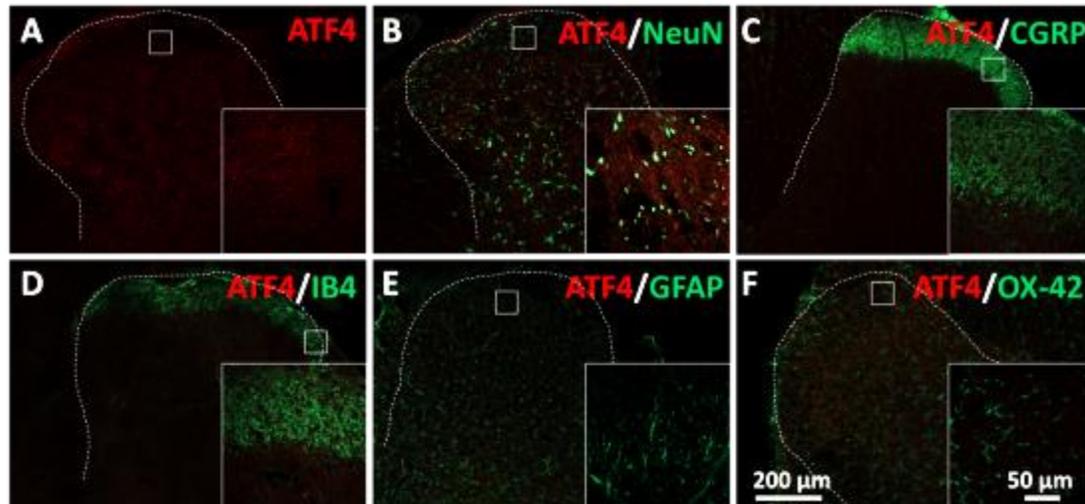


Figura 33. Distribución de la inmunorreactividad del ATF4 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas *sham* y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), no peptidérgicas (IB4⁺), astrocitos (GFAP⁺) y microglía (OX-42⁺) (verde). El recuadro de la esquina inferior derecha es una amplificación del recuadro marcado en la región dorsal de la médula espinal. Barra de calibración, 200 y 50 μm.

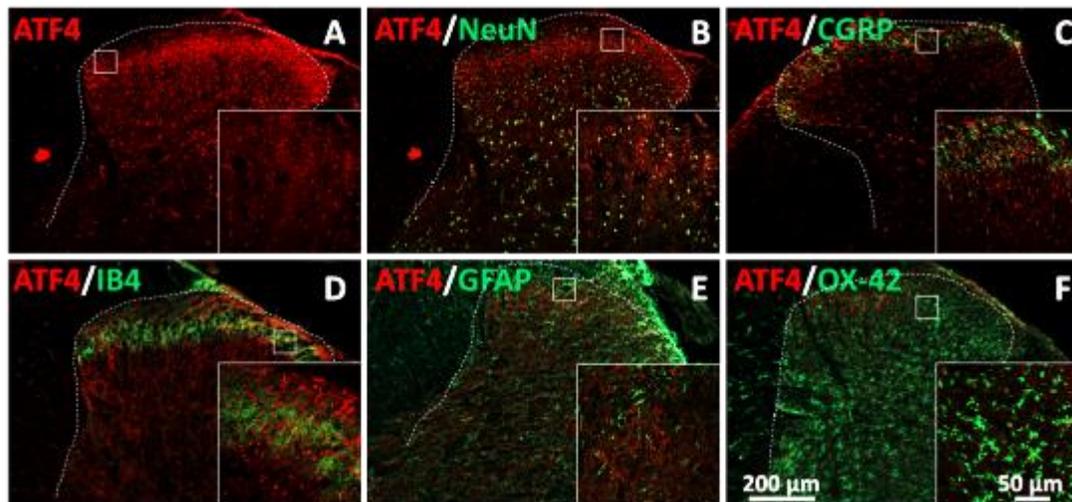


Figura 34. Distribución de la inmunorreactividad del ATF4 (rojo) en la región dorsal ipsilateral de la médula espinal de ratas con 14 días post-cirugía y su colocalización con el marcador de núcleos neuronales (NeuN⁺), neuronas peptidérgicas (CGRP⁺), no peptidérgicas (IB4⁺), astrocitos (GFAP⁺) y microglía (OX-42⁺) (verde). El recuadro de la esquina inferior derecha es una amplificación del recuadro marcado en la región dorsal de la médula espinal. Barra de calibración, 200 y 50 μm.

7.3.4. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF4 sobre el umbral nociceptivo mecánico

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF4 y del siRNA control no alteró el umbral nociceptivo en ratas *naïve* (**Figura 35A-B**). La ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo alodinia mecánica que se mantuvo hasta el día 21 post-cirugía. La administración intratecal del siRNA del ATF4 y del anticuerpo neutralizante del ATF4 revirtió ligeramente la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5-L6 (**Figura 35 C-D**). Este efecto anti-alodínico persistió por 72 y 48 horas después de la última administración, respectivamente.

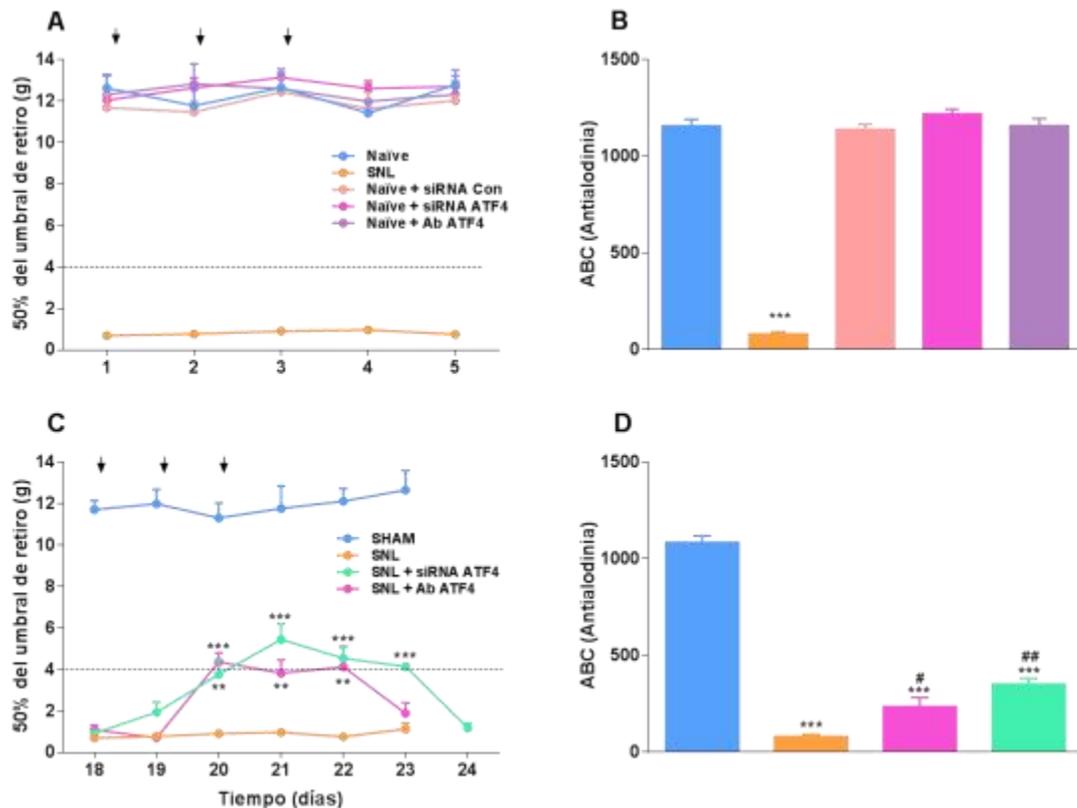


Figura 35. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA (siRNA ATF4) y del anticuerpo neutralizante del ATF4 (Ab ATF4) sobre el umbral nociceptivo mecánico de ratas *naïve* (A) y con ligadura de los nervios espinales (SNL) (C). B y D muestran el área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la gráfica A y C, respectivamente. Se grafica el promedio \pm EEM de 6 animales. *** $p < 0.001$ vs *Naïve/Sham*; ** $p < 0.01$ vs *Naïve/Sham*; por ANOVA2V/Dunnett (A y C). *** $p < 0.001$ vs *Sham*; ## $p < 0.01$ vs SNL; ### $p < 0.001$ vs SNL; por ANOVA1V/Dunnett (B y D).

7.3.5. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA y del anticuerpo neutralizante del ATF4 sobre la hiperalgesia térmica

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF4 y del siRNA control no afectó la latencia de retiro en ratas *naïve* (**Figura 36A-B**). La ligadura de los nervios espinales L5-L6 produjo hiperalgesia térmica que se mantuvo hasta el día 21 post-cirugía. La administración intratecal del siRNA del ATF4 revirtió totalmente la hiperalgesia térmica (**Figura 36C-D**). Este efecto antihiperalgésico duró 72 horas post-última administración. El anticuerpo neutralizante del ATF4 revirtió parcialmente la hiperalgesia térmica y el efecto antihiperalgésico duró 24 horas post-última administración.

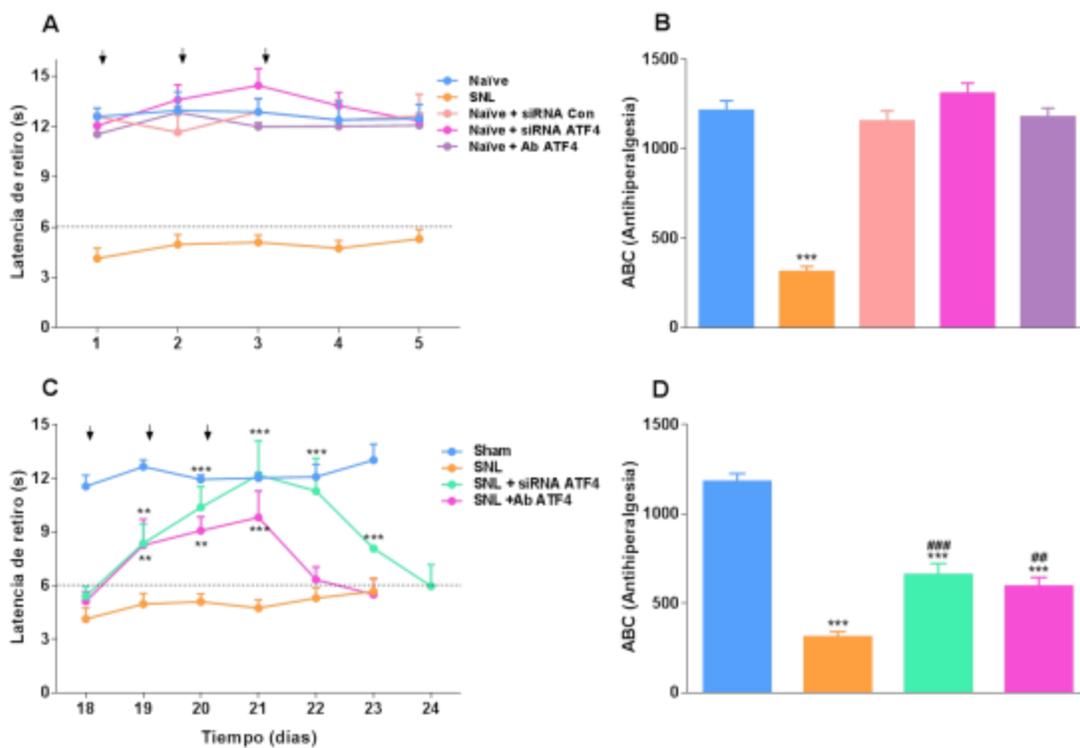


Figura 36. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA (siRNA ATF4) y del anticuerpo neutralizante del ATF4 (Ab ATF4) sobre el umbral nociceptivo térmico en ratas *naïve* (A) y con ligadura de los nervios espinales (SNL) (C). B y D muestran el área bajo la curva (ABC) del curso temporal de la gráfica A y C, respectivamente. Se grafica el promedio \pm EEM de 6 animales por grupo experimental. ** $p < 0.01$ vs *Naïve/Sham*; *** $p < 0.001$ vs *Naïve/Sham*; por ANOVA2V/Dunnett (A y C). ## $p < 0.01$ vs SNL; ### $p < 0.001$ vs SNL; *** $p < 0.001$ vs *Naïve/Sham*; por ANOVA1V/Dunnett (B y D).

7.3.6. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF4 sobre la expresión de su ARN mensajero

La administración intratecal repetida del siRNA del ATF4 redujo parcialmente la expresión del ARN mensajero del ATF4 en la región lumbar de la médula espinal de ratas ligadas, pero no en los GRDs L4, L5 y L6. La administración repetida del siRNA control no tuvo efecto sobre la expresión del ARN mensajero del ATF4 (**Figura 37**).

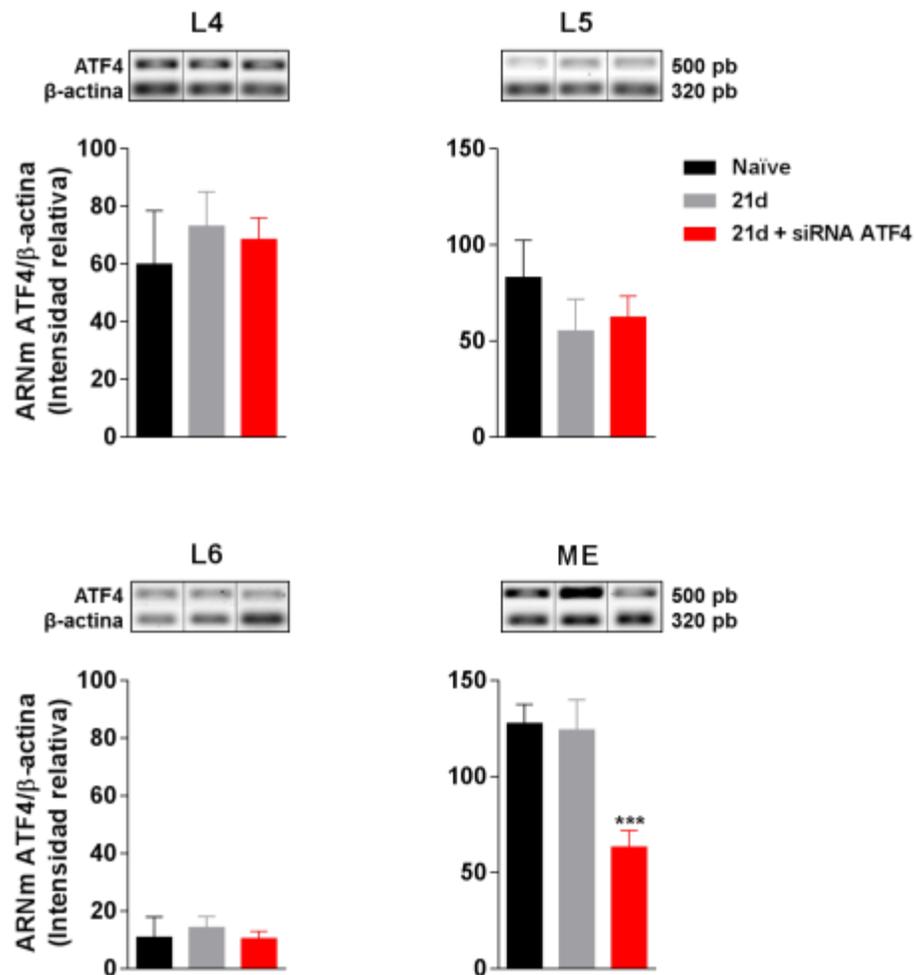


Figura 37. Efecto de la administración intratecal repetida del siRNA del ATF4 (siRNA ATF4) sobre la expresión de su ARN mensajero en ratas con ligadura de los nervios espinales de 21 días (SNL 21 d) post-cirugía. Se grafica el promedio \pm EEM de 4 animales independientes. Los insertos arriba de las barras representan el *immunoblot* de 1 animal por grupo experimental. *** $p < 0.001$ vs SNL 21d, por ANOVA 1V/Dunnett.

7.4. Controles de la inmunofluorescencia

No se observó inmunorreactividad de los ATF2, ATF3 y ATF4 al omitir la incubación con el anticuerpo primario o cuando se preincubó a los anticuerpos de ATF2 y ATF4 con su respectivo péptido control (**Figura 38**).

7.5. Evaluación de la integridad del tejido (Tinción de Nissl)

La tinción de Nissl es una técnica utilizada para el estudio de detalles citológicos y cito-arquitectónicos. Se encontró que se tiñen los núcleos de todas las células (neuronas y células gliales) y la sustancia de Nissl (ribosomas libres y asociados a membranas de neuronas) en los GRDs y en la médula espinal de ratas *naïve* y de ratas con la ligadura de los nervios espinales L5-L6. Cabe destacar que esta tinción no tiñe los axones (**Figura 39-40**).

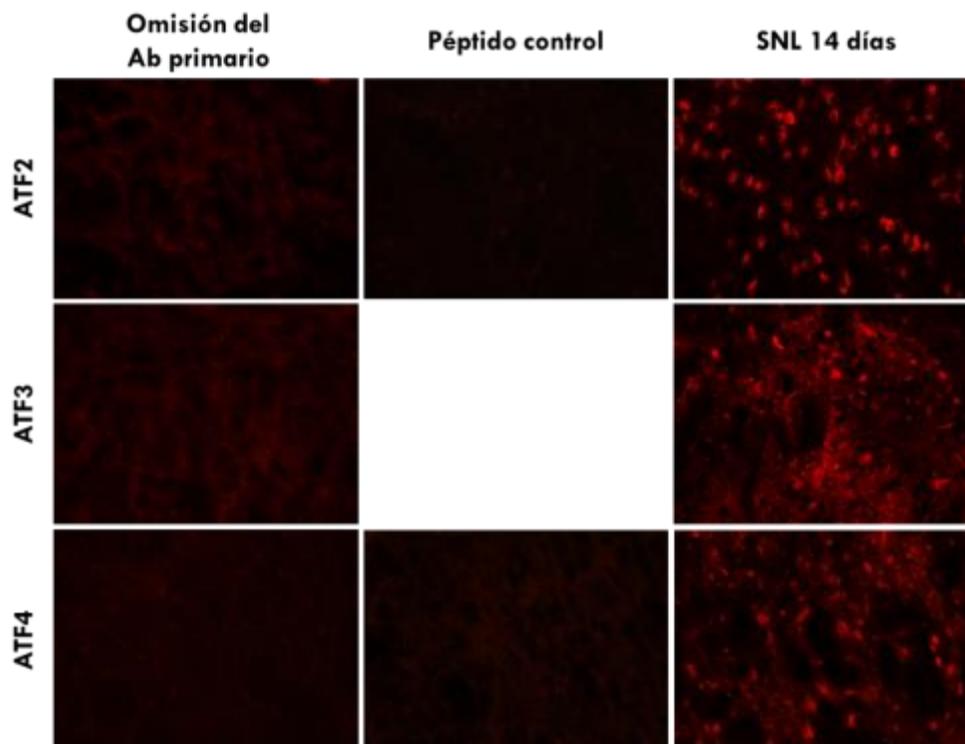


Figura 38. Controles de la inmunofluorescencia del ATF2, ATF3 y ATF4. La inmunorreactividad se evaluó al día 14 posterior a la cirugía. Omisión del anticuerpo (Ab) primario para ATF3 y omisión del Ab primario y pre-incubación con el péptido control para ATF2 y ATF4. Barra de calibración 100 μm .

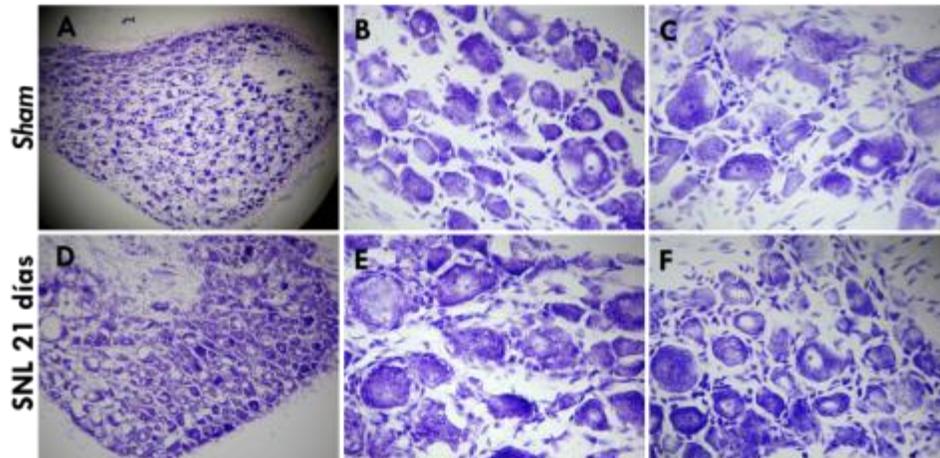


Figura 39. Evaluación de la integridad del tejido en el GRD. Se muestra la imagen representativa de GRDs de ratas *sham* y con ligadura de los nervios espinales (SNL) (21 días). Imágenes tomadas con el objetivo de 10X (A-D) y 60X (B-C y E-F).

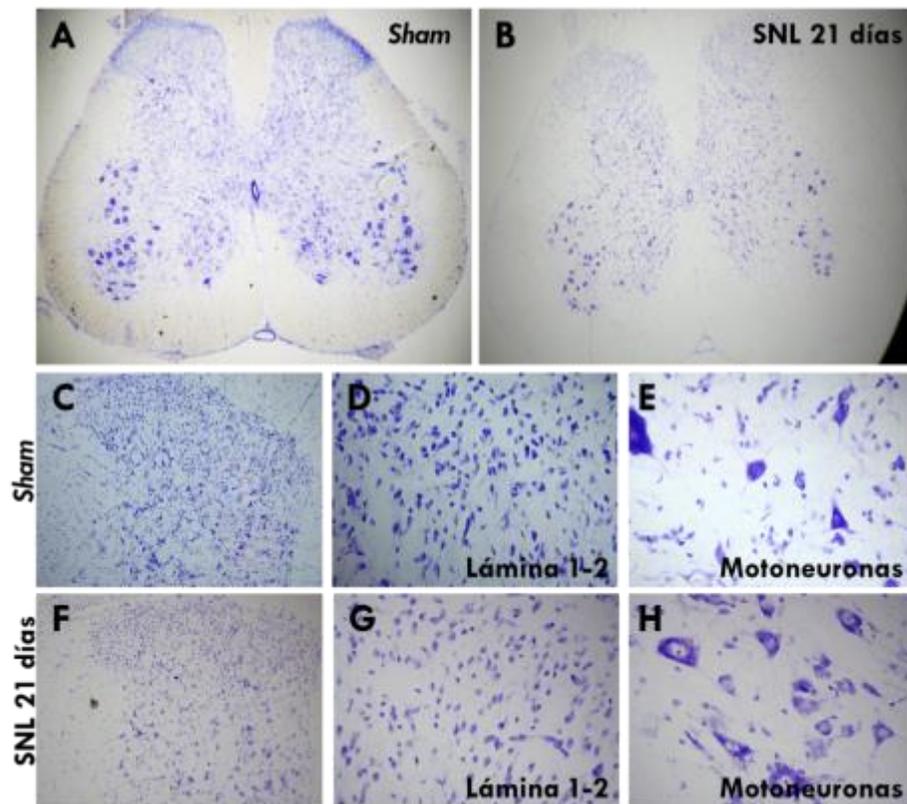


Figura 40. Evaluación de la integridad del tejido en la médula espinal. Imagen representativa de un corte sagital de la región lumbar de la médula espinal de ratas *sham* (A) y ratas con 21 días post ligadura de los nervios espinales (SNL) (B) tomadas con un objetivo de 4X. Imágenes representativas del asta dorsal de la médula espinal tomadas con el objetivo de 10X (C y F). Amplificación de las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (D-G). Amplificación de un área ventral de la médula espinal (motoneuronas) (E y H), objetivo de 60X.

8. DISCUSIÓN

8.1. ATF2 y dolor neuropático

Los resultados sugieren que el ATF2 participa en la generación de alodinia táctil e hiperalgia térmica inducida por el daño a los nervios periféricos en ratas. En primer lugar, se encontró que la ligadura de los nervios espinales aumentó la expresión del ATF2 en las neuronas del GRD y la médula espinal de las ratas. Los datos concuerdan con estudios previos que muestran que la axotomía del nervio ciático y el CFA aumentan la expresión del p-ATF2 en el GRD y en la médula espinal, respectivamente (Fang et al., 2013; Agthong et al., 2012). En contraste, hay evidencia de que la transección del nervio óptico, vagal y facial disminuyen rápidamente la expresión del ATF2 en neuronas axotomizadas, mientras que la radiación ultravioleta reduce la expresión de ATF2 en cultivos de neuronas del GRD adultas (Herdegen et al., 1997). Las diferencias con este estudio podrían deberse al sitio de la lesión o a la preparación de las neuronas del GRD. En segundo lugar, se demostró que la inyección intratecal del siRNA del ATF2 o del anticuerpo anti-ATF2 revirtió la alodinia táctil y la hiperalgia térmica inducida por la ligadura de los nervios espinales. Hasta donde se sabe, éste es el primer reporte sobre el papel del ATF2 en el mantenimiento del dolor neuropático en ratas. El efecto antinociceptivo del siRNA del ATF2 podría deberse al *knock-down* del gen *Atf2*, ya que la administración intratecal del siRNA redujo la expresión del ARNm del ATF2 en animales *naïve*. De manera interesante, el siRNA del ATF2 y el anticuerpo anti-ATF2 inducen alodinia táctil, pero no hiperalgia térmica en animales *naïve*. Aunque se desconocen los mecanismos que subyacen a este efecto, los datos sugieren que el ATF2 podría tener un papel antinociceptivo tónico en condiciones normales, mientras que tiene un papel pronociceptivo en condiciones patológicas (daño a los nervios periféricos). Este fenómeno no es raro en el dolor, también se ha reportado con los receptores GABA_A y el KCC2 (Coull et al., 2003; Malan et al., 2002). El efecto protector putativo del ATF2 en animales *naïve* concuerda con un estudio

previo que muestra que el *knock-out* del ATF2 conduce a la muerte neuronal en ratones neonatos (Reimold et al., 1996).

8.1.1. ATF2, *Trpv1* y *Trpv2*

Con respecto a los genes *Trpv1* y *Trpv2*, los resultados sugieren que el ATF2 regula diferencialmente la expresión de estos genes. El ATF2 podría funcionar como represor transcripcional del gen *Trpv1*. Esta conclusión se basa en que el silenciamiento del ATF2 restaura la expresión del ARNm del *Trpv1* tanto en el GRD L4 como en la médula espinal, pero no en los GRDs ligados. La regulación diferencial de genes y proteínas entre los GRDs lesionados e intactos se ha reportado anteriormente (Zang et al., 2015; Han et al., 2013; Takahashi et al., 2010; White et al., 2005; Schäfers et al., 2003) lo que sugiere que los GRDs intactos tienen un papel importante en la generación de dolor. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para corroborar si el ATF2 reprime al TRPV1 uniéndose directamente a su región promotora o si actúa de manera indirecta. Cabe destacar que este resultado no explica el papel antihiperálgico que tiene el *knock-down* de ATF2. En este sentido, Caterina et al. (2001, 2000, 1997) reportaron que el TRPV1 es un mediador crítico de la hiperálgia que ocurre después del daño al tejido en modelos de dolor inflamatorio pero no contribuye a la hiperálgia inducida por el daño al nervio periférico. Además, se reportó que tanto la proteína como el ARNm del TRPV1 disminuyen tras la ligadura del nervio tibial y peroneal (Michael & Priestley, 1999). Estos estudios apoyan lo encontrado en este trabajo. Por otra parte, los datos sugieren que el ATF2 induce la expresión del gen *Trpv2* (directa o indirectamente). Esta conclusión se basa en que el *knock-down* del ATF2 disminuye drásticamente la expresión del ARNm del *Trpv2* en el GRD L4 y en la médula espinal, sugiriendo que el *knock-down* del ATF2 podría ejercer sus efectos antihiperálgicos en parte por la disminución de la expresión del *Trpv2*.

8.2. Localización del ATF2 en los GRDs y en la médula espinal

La inmunorreactividad del ATF2 se encontró en el núcleo celular de las neuronas del GRD L4, L5 y L6 así como en la médula espinal de ratas *naïve* y *sham*, lo que indica que este factor de transcripción se expresa constitutivamente en las neuronas sensoriales. El daño a los nervios periféricos redujo la inmunorreactividad del ATF2 en el núcleo, mientras que la aumentó en las células satélites al día 3 post-cirugía. Los datos coinciden parcialmente con otras observaciones que reportan que la estimulación de neuronas adultas del GRD con doxorubicina, radiación ultravioleta (*in vitro*) y axotomía (*in vivo*) inducen una regulación a la baja del ATF2 rápida (2-24 h) y constante (3-20 días) (Martin-Villalba et al., 1998; Herdegen et al., 1997; Robinson, 1996). En contraste, se encontró que el daño a los nervios periféricos incrementó la inmunorreactividad del ATF2 en los GRDs L5, L6 y en la médula espinal, pero no en el L4, de una manera dependiente del tiempo (7-21 días). Las diferencias podrían deberse al sitio del daño al nervio. De manera interesante, se encontró que el daño a los nervios periféricos aumentó la inmunorreactividad del ATF2 en el citoplasma de las neuronas del GRD L5 y L6. Y este trabajo parece ser el primer reporte que sugiere la translocación del ATF2 del núcleo al citoplasma en un modelo de daño a los nervios periféricos. No obstante, la función del ATF2 en el citoplasma es desconocida. Sin embargo, varios estudios demuestran que el daño neuronal aumenta la expresión de c-Jun en el GRD y la médula espinal (Kreutz et al., 1999; Delander et al., 1997; Herdegen et al., 1992) y se sabe que el ATF2 se une a c-Jun para modular la expresión de varios genes blanco (Yuan et al., 2009; Hai & Hartman, 2001). Por ejemplo, existe evidencia de que c-Jun modula la expresión del péptido intestinal vasoactivo y del neuropéptido Y en cultivos de neuronas del GRD y en ratas neuropáticas (Son et al., 2007). Por lo tanto, el heterodímero ATF2/c-Jun podría promover la nocicepción inducida por el daño a los nervios periféricos a través de la sobre expresión del péptido intestinal vasoactivo y del neuropéptido Y en el GRD y la médula espinal. Sin embargo, ATF2 podría tener otros genes blanco para promover la nocicepción

en ratas neuropáticas. En este sentido, el ATF2 puede unirse a la secuencia promotora de algunos genes implicados en el dolor neuropático (*Asic2*, *Cacna2d1*, *Clcn1/2/3/6/7*, *Best1/4* y *Trpv1/2/3/4*) (Rouillar et al., 2013). Además, el ATF2 también promueve la transcripción de genes involucrados en inflamación, tales como moléculas de adhesión (E-selectina, P-selectina, L-selectina y VCAM), citocinas (TNF α , INF γ) y algunas quimiocinas (IL-1 β , IL-2, IL4 e IL-6) (Reimold et al., 2001).

De manera interesante, el ATF2 se encontró en neuronas no peptidérgicas principalmente. Además, se encontró que el ATF2 se expresa en neuronas pequeñas, medianas y grandes del GRD. Este parece ser el primer reporte sobre la distribución de ATF2 en las neuronas del GRD.

Por otra parte, los resultados sugieren que el ATF2 se expresa en el núcleo de los astrocitos. Los astrocitos se activan en la fase tardía al daño a los nervios periféricos como consecuencia de la sensibilización central y son importantes para el mantenimiento del dolor neuropático (Gao & Ji, 2010). En este sentido, algunos autores reportaron que la expresión del ATF2 se induce en respuesta a citocinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento y estrés ambiental (Yu et al., 2014; Reimold, 2001). Estos datos sugieren que los astrocitos expresan al ATF2 en respuesta a un ambiente pro-inflamatorio en la médula espinal. Los resultados de inmunofluorescencia junto con los estudios de *Western blot* y conductuales soportan la conclusión de que el ATF2 participa en el procesamiento nociceptivo espinal.

8.3. ATF3 y dolor neuropático

En contraste con ATF2, el ATF3 es un factor de transcripción inducible que se expresa a niveles muy bajos en el tejido neuronal intacto (Bráz & Basbaum, 2010; Salinas-Abarca, et al., 2017). Sin embargo, hay evidencia que muestra que el daño neuronal aumenta su expresión (Salinas-Abarca et al., 2017; Bráz & Basbaum, 2010; Peters et al., 2007; Tsujino et al., 2000). De hecho, este factor de transcripción se considera un marcador de daño al nervio (Weir et al., 2017; Tsujino et al., 2000). Se ha sugerido que el ATF3 podría contribuir a

los efectos conductuales de larga duración inducidos por formalina (Salinas-Abarca et al., 2017). Como era de esperarse, se encontró que el daño a los nervios periféricos aumentó la expresión del ATF3 en los GRDs y la médula espinal. Sin embargo, la administración intratecal repetida del siRNA del ATF3 no modificó la alodinia táctil ni la hiperalgesia térmica inducida por la ligadura de los nervios espinales. En contraste, el anticuerpo anti-ATF3 modificó ligeramente la hiperalgesia térmica, pero no la alodinia táctil. La falta de efecto del siRNA del ATF3 no se debió a la falla en el silenciamiento del gen *Atf3*, ya que el siRNA sí fue capaz de disminuir la expresión del ARNm del ATF3 inducida por el daño a los nervios periféricos. Por lo tanto, los resultados sugieren que aunque el ATF3 está sobre expresado en los GRDs lesionados y en la médula espinal, parece jugar un papel mínimo en las manifestaciones conductuales del dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales.

8.4. Localización del ATF3 en los GRDs y en la médula espinal

De manera interesante, se encontró que ATF3 no solo se expresa en tejido neuronal dañado sino también en las neuronas de la médula espinal. Existe evidencia de que el daño a los nervios periféricos conduce a la pérdida de neuronas de proyección en el asta dorsal superficial probablemente debido a la excitotoxicidad mediada por el glutamato (Olmos & Lladó, 2014). Esta podría ser una de las causas que conducen a la sobreexpresión del ATF3 en la médula espinal. Sin embargo, esta hipótesis aún debe ser evaluada. El ATF3 participa en los procesos de regeneración de los nervios periféricos ya que favorece la expresión de c-Jun, HSP27, SPRR1A y de la endopeptidasa neuronal inducida por daño (DINE) (Kiryu-Seo & Kiyama, 2011; Lindå et al., 2011; Hill et al., 2010; Campbell et al., 2005), que a su vez reducen la muerte neuronal y favorecen el crecimiento de neuritas (Seijffers et al., 2007; Seijffers et al., 2006; Nakagomi et al., 2003). A pesar de estos efectos, ATF3 parece jugar un papel menor en los efectos conductuales del dolor neuropático.

8.5. ATF4 y dolor neuropático

Los resultados sugieren que el ATF4 participa en la generación de la hiperalgesia térmica y alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales. Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones: 1) La administración intratecal repetida del siRNA del ATF4 y el anticuerpo anti-ATF4 revierten la hiperalgesia térmica y la alodinia mecánica. 2) La ligadura aumentó la expresión del ATF4 tanto en los GRDs como en la médula espinal (14-21 días) y 3) el ATF4 se expresa en neuronas nociceptivas principalmente en neuronas peptidérgicas pero también en no peptidérgicas. De acuerdo con la literatura, éste es el primer trabajo que sugiere la participación del ATF4 en el procesamiento del dolor neuropático. En apoyo parcial a los resultados, Dong et al. (2011) reportaron que el daño a la articulación facetaria (modelo de dolor musculoesquelético) incrementa la expresión del ATF4 en el GRD cervical. Sin embargo, los autores reportan que el tratamiento con ketorolaco (antiinflamatorio no esteroideo) previene la expresión del ATF4 en el GRD cervical, pero no atenúa el dolor musculoesquelético. Los autores sugieren que la activación del ATF4 no contribuye directamente al dolor persistente, pero que el ATF4 podría ser responsable de sensibilizar a las neuronas para el inicio del dolor. En apoyo a los datos encontrados en este trabajo, distintos autores han reportado mecanismos que podrían explicar el papel pronociceptivo del ATF4. El ATF4 forma dímeros con la proteína NF-E2 y estos dímeros reconocen y se unen al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en el ADN. El ARE está presente en los promotores de los principales genes antioxidantes tales como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), quinosa oxidoreductasa, glutatión S-transferasa, hemoxigenasa y glutatión sintasa (Hayes & McMahon, 2001). Estos estudios sugieren que el ATF4 tiene un papel importante en la regulación del estrés oxidativo. En este sentido, algunos estudios sugieren que estas enzimas tienen un papel pronociceptivo tras el daño neuronal (Choi et al., 2013; Guedes et al., 2009; Gordh et al., 2000). Por otra parte, se reportó que el ATF4 trasloca del citoplasma al núcleo tras su interacción con subunidades del receptor GABA_B

en neuronas hipocampales (Ritter et al., 2004; White et al., 2000). El ATF4 modula la expresión de las subunidades del receptor GABA_B R1a y GABA_B R2 al unirse a su región promotora en el núcleo (Ritter et al., 2004; White et al., 2000). La expresión de los receptores GABA_B es esencial para la transmisión sináptica inhibitoria lenta en el SNC y la disrupción de las respuestas mediadas por el receptor GABA_B se ha asociado con varios desórdenes neurológicos incluyendo el dolor neuropático (Liao et al., 2017; Zemoura et al., 2016; Laffray et al., 2012).

8.6. Localización del ATF4 en los GRDs y en la médula espinal

La inmunorreactividad del ATF4 se encontró principalmente en el citoplasma de las neuronas peptidérgicas del GRD L4, L5 y L6 y en la médula espinal de ratas *naïve* y *sham*, lo que indica que este factor de transcripción se expresa constitutivamente en las neuronas sensoriales nociceptivas. Interesantemente el daño a los nervios periféricos aumentó la inmunorreactividad del ATF4 en el núcleo de las neuronas del GRD. En apoyo a los datos encontrados en este trabajo White et al. (2000) sugieren que el ATF4 trasloca al núcleo como consecuencia de la activación del receptor GABA_B. Sin embargo, se necesitan experimentos sustanciales para evaluar si el receptor GABA_B influye en la traslocación nuclear del ATF4 bajo estas condiciones experimentales. Además, los resultados sugieren que el ATF4 se expresa robustamente en el núcleo de las neuronas de las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal, pero no en astrocitos o microglía. En contraste, Sun et al. (2014). reportaron que el ATF4 se expresa en cultivos de microglía y que su sobreexpresión favorece la síntesis de BDNF. La discrepancia de resultados podría deberse a que las células cambian su perfil transcripcional al encontrarse en cultivo (Berta et al., 2017). Sin embargo, se necesita corroborar si el ATF4 modula la síntesis de BDNF bajo las condiciones experimentales de este trabajo. En conjunto, los resultados de inmunohistoquímica y farmacológicos sugieren que el ATF4 tiene un papel pronociceptivo tras el daño a los nervios periféricos.

8.7. *Disminución de la inmunorreactividad del CGRP e IB4*

Los resultados inmunohistoquímicos muestran la pérdida de la inmunorreactividad de los marcadores CGRP e IB4 en los GRDs lesionados. Este dato es consistente en todos los experimentos de colocalización del ATF2, ATF3 y ATF4 con dichos marcadores, lo que soporta la reproducibilidad del hallazgo. Además, la tinción de Nissl nos permitió corroborar que la disminución de la inmunorreactividad del CGRP e IB4 no se debe al mal procesamiento del tejido. De manera interesante, los resultados muestran que la ligadura de los nervios espinales disminuye considerablemente la cantidad de neuronas inmunorreactivas a NeuN en los GRDs ligados. Este dato sugiere que el daño a los nervios periféricos induce la muerte neuronal. En apoyo a los resultados de este trabajo, se reportó que la ligadura de los nervios espinales incrementa la caspasa 3, una proteína indicadora de muerte neuronal por apoptosis (García et al., 2018). Adicionalmente, Bennett et al. (1998) sugieren que la disminución de la inmunorreactividad del CGRP e IB4 se debe a la muerte neuronal tras el insulto celular. En contraste, Hammond et al. (2004) sugieren que la pérdida de la inmunorreactividad se debe a la regulación a la baja del gen que codifica para el CGRP y de la D-galactosa, respectivamente (blancos de los anticuerpos utilizados) y que la inmunorreactividad se restablece hasta las 20 semanas post-lesión.

En conjunto, los resultados sugieren que la pérdida de la inmunorreactividad del CGRP e IB4 es un fenómeno que se produce en respuesta al daño neuronal y que conduce a la muerte de neuronas del GRD en el modelo de ligadura de los nervios espinales.

9. CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que el ATF2 localizado en los GRDs y en la médula espinal tiene un papel pronociceptivo y participa en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por daño a los nervios periféricos. En contraste, el ATF2 tiene un papel antinociceptivo en condiciones normales.
- Los resultados sugieren que el ATF3 expresado robustamente en los GRDs lesionados y en la médula espinal no participa en la modulación del dolor neuropático.
- Los datos sugieren que el ATF4 localizado en los GRDs y en la médula espinal tiene un papel pronociceptivo y participa en el mantenimiento del dolor neuropático inducido por daño a los nervios periféricos.
- La ligadura de los nervios espinales L5-L6 disminuye la inmunorreactividad de los marcadores CGRP e IB4 y la cantidad de neuronas de diámetro pequeño y mediano en los GRDs lesionados. Estos datos sugieren la muerte de neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas en los nervios lesionados
- La hipótesis fue verdadera, los factores de transcripción ATF2, ATF3 y ATF4 modulan diferencialmente el dolor neuropático.

10. PERSPECTIVAS

- Este trabajo abre la puerta a la investigación de moléculas que no están vinculadas típicamente con la inducción del dolor, pero que modulan a genes importantes en la generación del mismo. Por lo tanto, los factores de transcripción como el ATF2 y el ATF4 podrían funcionar como blanco farmacológico de terapia múltiple para el alivio del dolor neuropático
- Realizar un análisis con microarreglos de ADN para identificar que genes se modulan por el ATF2/4 en condiciones dolor neuropático.
- Evaluar si la traslocación del ATF2 del núcleo al citoplasma está relacionada con muerte neuronal inducida por la ligadura de los nervios espinales.
- Determinar el papel de los heterodímeros de ATF2 en la modulación del dolor neuropático.
- Evaluar el papel del ATF2 en los astrocitos.
- Evaluar si la expresión de ATF3 en la médula espinal está mediada por la excitotoxicidad glutamatérgica en ratas con ligadura de nervios espinales.
- Evaluar si el ATF4 induce dolor a través de la modulación de la expresión de genes antioxidantes.
- Investigar si el receptor GABA_B modula la traslocación del ATF4 del citoplasma al núcleo.
- Evaluar si el ATF4 modula la expresión del BDNF.

11. REFERENCIAS

- Agthong, S., Kaewsema, A., & Chentanez, V. (2012). Inhibition of p38 MAPK reduces loss of primary sensory neurons after nerve transection. *Neurological Research*, *34*(7), 714–720.
- Ahlawat, A., Ajay, R., Goyal, N., & Sharma, S. (2014). Potential role of nitric oxide synthase isoforms in pathophysiology of neuropathic pain. *Inflammopharmacology*, *22*, 269–278.
- Almeida, T. F., Roizenblatt, S., & Tufik, S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, *1000*(1), 40–56.
- Altier, C., Dale, C. S., Kisilevsky, A. E., Chapman, K., Castiglioni, A. J., Matthews, E. A., Zamponi, G. W. (2007). Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *Journal of Neuroscience*, *27*(24), 6363–6373.
- Ameri, K., & Harris, A. L. (2008). Activating transcription factor 4. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(1), 14–21.
- Bardoni, R., Takazawa, T., Tong, C.-K., Choudhury, P., Scherrer, G., & MacDermott, A. B. (2013). Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1279*(1), 90–96.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, *139*(2), 267–284.
- Bennett, D. L., Michael, G. J., Ramachandran, N., Munson, J. B., Averill, S., Yan, Q., Priestley, J. V. (1998). A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *Journal Neuroscience*, *18*(8), 3059–3072.
- Berta, T., Perrin, F. E., Pertin, M., Tone, R., Liu, Y., Chamesian, A., Decosterd, I. (2017). Gene expression profiling of cutaneous injured and non-injured nociceptors in SNI animal model of neuropathic pain, *2*(3), 1–11.

- Bhoulmick, A., Lopez-Bergami, P., & Ronai, Z. (2007). ATF2 on the double - activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Research*, 20(6), 498–506.
- Bolay, H., & Moskowitz, M. a. (2002). Mechanisms of pain modulation in chronic syndromes. *Neurology*, 59(5), 2–7.
- Bravo-Hernández, M., Corleto, J. A., Barragán-Iglesias, P., González-Ramírez, R., Pineda-Farías, J. B., Felix, R., Delgado-Lezama R., Granados-Soto, V. (2016). The $\alpha 5$ subunit containing GABAA receptors contribute to chronic pain. *Pain*, 157(3), 613–626.
- Bráz, J. M., & Basbaum, A. I. (2010). Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain*, 150(2), 290–301.
- Braz, J. M., Nassar, M. A., Wood, J. N., & Basbaum, A. I. (2005). Parallel “pain” pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron*, 47(6), 787–93.
- Cai, Y., Wang, W., Paulucci-Holthauzen, A., Pan, Z. (2018) Brain circuits mediating opposing effects on emotion and pain. *The Journal of Neuroscience*, in press.
- Campbell, G., Hutchins, K., Winterbottom, J., Grenningloh, G., Lieberman, A. R., & Anderson, P. N. (2005). Upregulation of activating transcription factor 3 (ATF3) by intrinsic CNS neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts. *Experimental Neurology*, 192(2), 340–7.
- Caterina, M. J. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288(5464), 306–313.
- Caterina, M. J., & Julius, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 487–517.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel

- in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824.
- Cervero, F., Laird, J. M. A., & García-Nicas, E. (2003). Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. *European Journal of Pain*, 7(4), 345–351.
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55–63.
- Chen, J., Li, L., Chen, S. R., Chen, H., Xie, J. D., Sirrieh, R. E., Pan, H. L. (2018). The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA receptor complex is critically involved in neuropathic pain development and gabapentin therapeutic actions. *Cell Reports*, 22(9), 2455–2468.
- Chen, S.-R., Zhu, L., Chen, H., Wen, L., Laumet, G., & Pan, H.-L. (2014). Increased spinal cord $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter-1 (NKCC1) activity contributes to impairment of synaptic inhibition in paclitaxel-induced neuropathic pain. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31111–20.
- Choi-Lundberg, D. L., & Bohn, M. C. (1995). Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Developmental Brain Research*, 85(1), 80–88.
- Choi, S.-R., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Kang, S.-Y., Moon, J.-Y., Kwon, S.-G., Lee, J.-H. (2013). Spinal sigma-1 receptors activate NADPH oxidase 2 leading to the induction of pain hypersensitivity in mice and mechanical allodynia in neuropathic rats. *Pharmacological Research*, 74, 56–67.
- Clark, A. K., Old, E. a, & Malcangio, M. (2013). Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *Journal of Pain Research*, 6, 803–14.
- Colleoni, M., & Sacerdote, P. (2010). Murine models of human neuropathic pain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(10), 924–933.
- Colmone, A, Li, S., & Wang, C.-R. (2006). Activating transcription factor/cAMP response element binding protein family member regulated transcription

- of CD1A. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7024–7032.
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Neuroscience*, 32, 1–32.
- Coull, J. A. M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sk, A., De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951), 938–942.
- Dam, H. Van, Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., & Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *The EMBO Journal*, 14(8), 1798–1811.
- Delander, G. E., Schtt, E., Brodin, E., & Fredholm, B. B. (1997). Spinal expression of mRNA for immediate early genes in a model of chronic pain. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161(4), 517–25.
- Dirig, D. M., Salami, A., Rathbun, M. L., Ozaki, G. T., & Yaksh, T. L. (1997). Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *Journal of Neuroscience Methods*, 76(2), 183–91.
- Dong, L., Guarino, B. B., Jordan-Sciutto, K. L., & Winkelstein, B. A. (2011). Activating transcription factor 4, a mediator of the integrated stress response, is increased in the dorsal root ganglia following painful facet joint distraction. *Neuroscience*, 193, 377–86.
- Doyon, N., Prescott, S. A., Castonguay, A., Godin, A. G., Krger, H., & De Koninck, Y. (2011). Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PloS One*, 7(9), 1–22.
- Estes, S., Stoler, D., & Anderson, G. (1995). Normal fibroblasts induce the C/EBP β and ATF-4 bZIP transcription factors in response to anoxia.

Experimental Cell Research, 220, 47–54.

- Falnikar, A., Hala, T. J., Poulsen, D. J., & Lepore, A. C. (2016). GLT1 overexpression reverses established neuropathic pain-related behavior and attenuates chronic dorsal horn neuron activation following cervical spinal cord injury. *Glia*, 64(3), 396–406.
- Fang, J.-Q., Du, J.-Y., Liang, Y., & Fang, J.-F. (2013). Intervention of electroacupuncture on spinal p38 MAPK/ATF-2/VR-1 pathway in treating inflammatory pain induced by CFA in rats. *Molecular Pain*, 9(1), 13.
- Ferrini, F., & De Koninck, Y. (2013). Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plasticity*, 2013.
- Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.-A. M., Laffray, S., Del'Guidice, T., Lorenzo, L.-E., De Koninck, Y. (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl⁻ homeostasis. *Nature Neuroscience*, 16(2), 183–192.
- Fukuoka, T., Kondo, E., Dai, Y., Hashimoto, N., & Noguchi, K. (2001). Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model, 21(13), 4891–4900.
- Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S. M., Park, D. S., & Cregan, S. P. (2010). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *The Journal of Neuroscience*, 30(50), 16938–48.
- Gao, Y. J., & Ji, R. R. (2010). Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*, 7(4), 482–493.
- Garrido-Suárez, B. B., Garrido, G., Castro-Labrada, M., Merino, N., Valdés, O., Rodeiro, I., Delgado-Hernández, R. (2014). Anti-hypernociceptive effect of mangiferin in persistent and neuropathic pain models in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 124, 311–319.
- Guinot, M., Launois, S., Favre-Juvin, A., Maindet-Dominici, C. (2015). Fibromialgia: fisiopatología y apoyo terapéutico. *EMC-Kinesiterapia* -

Medicina Física, 36(2),1-12

- Gohar, O. (2005). Contribution of ion channels in pain sensation. *Modulator*, (19), 9–13.
- Gordh, T., Sharma, H. S., Azizi, M., Alm, P., & Westman, J. (2000). Spinal nerve lesion induces upregulation of constitutive isoform of heme oxygenase in the spinal cord. An immunohistochemical investigation in the rat. *Amino Acids*, 19(1), 373–81.
- Green, T. A, Alibhai, I. N., Unterberg, S., Neve, R. L., Ghose, S., Tamminga, C. A, & Nestler, E. J. (2008). Induction of activating transcription factors (ATFs) ATF2, ATF3, and ATF4 in the nucleus accumbens and their regulation of emotional behavior. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(9), 2025–32.
- Guedes, R. P., Dal Bosco, L., Araújo, A. S. da R., Belló-Klein, A., Ribeiro, M. F. M., & Partata, W. A. (2009). Sciatic nerve transection increases glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 80(6), 422–427.
- Guertin, A. D. (2005). Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *Journal of Neuroscience*, 25(13), 3478–3487.
- Hai, T. (2006). The ATF transcription factors in cellular adaptive responses. In J. Ma (Ed.), *Gene Expression and Regulation*, (pp. 329–340). New York.
- Hai, T., & Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos / Jun and ATF / CREB alters DNA binding specificity. *Biochemistry*, 88, 3720–3724.
- Hai, T., & Hartman, M. G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*, 273(1), 1–11.
- Hammond, D. L., Ackerman, L., Holdsworth, R., & Elzey, B. (2004). Effects of spinal nerve ligation on immunohistochemically identified neurons in the

- L4 and L5 dorsal root ganglia of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 475(4), 575–589.
- Han, P., Korepanova, A. V., Vos, M. H., Moreland, R. B., Chiu, M. L., & Faltynek, C. R. (2013). Quantification of TRPV1 protein levels in rat tissues to understand its physiological Roles. *Journal of Molecular Neuroscience*, 50(1), 23–32.
- Hargreaves, K., Hargreaves, K., Dubner, R., Dubner, R., Brown, F., Brown, F., Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32(1), 11.
- Hayakawa, J., Mittal, S., Wang, Y., Korkmaz, K. S., Adamson, E., English, C., Jolla, L. (2004). Identification of promoters bound by c-Jun / ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Molecular Cell*, 16, 521–535.
- Hayes, J. D., & McMahon, M. (2001). Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Letters*, 174(2), 103–113.
- Hendrich, J., Van Minh, A. T., Heblich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Dolphin, A. C. (2008). Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3628–33.
- Herdegen, T., Blume, A., Buschmann, T., Georgakopoulos, E., Winter, C., Schmid, W., Gass, P. (1997). Expression of activating transcription factor-2, serum response factor and cAMP/ca response element binding protein in the adult rat brain following generalized seizures, nerve fibre lesion and ultraviolet irradiation. *Neuroscience*, 81(1), 199–212.
- Herdegen, T., Fiallos-Estrada, C. E., Schmid, W., Bravo, R., & Zimmermann, M. (1992). The transcription factors c-JUN, JUN D and CREB, but not FOS and KROX-24, are differentially regulated in axotomized neurons

- following transection of rat sciatic nerve. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 14(3), 155–65.
- Hill, C. E., Harrison, B. J., Rau, K. K., Hougland, M. T., Bunge, M. B., Mendell, L. M., & Petruska, J. C. (2010). Skin incision induces expression of axonal regeneration-related genes in adult rat spinal sensory neurons. *The Journal of Pain*, 11(11), 1066–73.
- Humphreys, J. M., Piala, A. T., Akella, R., He, H., & Goldsmith, E. J. (2013). Precisely ordered phosphorylation reactions in the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23322–30.
- Hunt, D., Raivich, G., & Anderson, P. N. (2012). Activating transcription factor 3 and the nervous system. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(7), 1–17.
- Inoue, K., & Tsuda, M. (2009). Microglia and neuropathic pain. *Glia*, 57(14), 1469–1479.
- Inquimbert, P., Moll, M., Latremoliere, A., Tong, C.-K., Whang, J., Sheehan, G. F., Scholz, J. (2018). NMDA receptor activation underlies the loss of spinal dorsal horn neurons and the transition to persistent pain after peripheral nerve injury. *Cell Reports*, 23(9), 2678–2689.
- Ji, R.-R., Berta, T., & Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 154, 1-28.
- Jiang, L., Pan, C.-L., Wang, C.-Y., Liu, B.-Q., Han, Y., Hu, L., Liu, W.-T. (2017). Selective suppression of the JNK-MMP2/9 signal pathway by tetramethylpyrazine attenuates neuropathic pain in rats. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 174.
- Jin, X. (2006). Acute p38-Mediated Modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor. *Journal of Neuroscience*, 26(1), 246–255.
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *The Annual Review of Cell and*

- Developmental*, 29, 355-384.
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210.
- Kahle, K. T., Staley, K. J., Nahed, B. V, Gamba, G., Hebert, S. C., Lifton, R. P., & Mount, D. B. (2008). Roles of the cation–chloride cotransporters in neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(9), 490–503.
- Kim, S. H., & Chung, J. M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50(3), 355–363.
- Kiryu-Seo, S., & Kiyama, H. (2011). The nuclear events guiding successful nerve regeneration. *Molecular Neuroscience*, 4(53), 1–11.
- Krames, E. S. (2014). The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain. *Pain Medicine* 15(10.), 1669-1685
- Kreutz, M. R., Bien, A., Vorwerk, C. K., Bockers, T. M., Seidenbecher, C. I., Tischmeyer, W., & Sabel, B. A. (1999). Co-expression of c-Jun and ATF-2 characterizes the surviving retinal ganglion cells which maintain axonal connections after partial optic nerve injury. *Molecular Brain Research*, 69(2), 232–241.
- Kunori, S., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Katano, T., Audoly, L. P., Urade, Y., & Ito, S. (2011). A novel role of prostaglandin E2 in neuropathic pain. *Glia*, 59(2), 208–218.
- Laffray, S., Bouali-Benazzouz, R., Papon, M.-A., Favereaux, A., Jiang, Y., Holm, T., Landry, M. (2012). Impairment of GABAB receptor dimer by endogenous 14-3-3 ζ in chronic pain conditions. *The EMBO Journal*, 31(15), 3239–51.
- Lange, P. S., Chavez, J. C., Pinto, J. T., Coppola, G., Sun, C.-W., Townes, T. M., Ratan, R. R. (2008). ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(5), 1227–42.

- Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, *10*(9), 895–926.
- Lee, J., Favorov, O. V, Tommerdahl, M., Lee, C. J., & Whitsel, B. L. (2014). Attenuated glial K⁺ clearance contributes to long-term synaptic potentiation via depolarizing GABA in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *Experimental Neurobiology*, *23*(1), 53.
- Lewerenz, J., Sato, H., Albrecht, P., Henke, N., Noack, R., Methner, A., & Maher, P. (2012). Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. *Cell Death and Differentiation*, *19*(5), 847–58.
- Li, L., Chen, S.-R., Chen, H., Wen, L., Hittelman, W. N., Xie, J.-D., & Pan, H.-L. (2016). Chloride homeostasis critically regulates synaptic NMDA receptor activity in neuropathic pain. *Cell Reports*, *15*(7), 1376–1383.
- Liang, G., & Hai, T. (1997). Characterization of human activating transcription factor 4, a transcriptional activator that interacts with multiple domains of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *Journal of Biological Chemistry*, *272*(38), 24088–24095.
- Liao, C., Yang, M., Zhong, W., Liu, P., Zhang, W., Liao, C., Zhang, W. (2017). Association of myelinated primary afferents impairment with mechanical allodynia in diabetic peripheral neuropathy: an experimental study in rats. *Oncotarget*, *8*(38), 64157–64169.
- Lindå, H., Sköld, M. K., & Ochsman, T. (2011). Activating transcription factor 3, a useful marker for regenerative response after nerve root injury. *Frontiers in Neurology*, *2*(04), 1–6.
- Liu, J., Pasini, S., Shelanski, M. L., & Greene, L. (2014). Activating transcription factor 4 (ATF4) modulates post-synaptic development and dendritic spine morphology. *Cellular Neuroscience*, *8*(177), 1–13.
- Loeza-Alcocer, E., Canto-Bustos, M., Aguilar, J., González-Ramírez, R., Felix,

- R., & Delgado-Lezama, R. (2013). 5 GABA A receptors mediate primary afferent fiber tonic excitability in the turtle spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, *110*, 2175–2184.
- Lu, Y., Jiang, B.-C., Cao, D.-L., Zhang, Z.-J., Zhang, X., Ji, R.-R., & Gao, Y.-J. (2014). TRAF6 upregulation in spinal astrocytes maintains neuropathic pain by integrating TNF- α and IL-1 β signaling. *Pain*, *155*, 2618-2629.
- Lumpkin, E. A., & Caterina, M. J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, *445*(7130), 858–865.
- Malan, T. P., Mata, H. P., & Porreca, F. (2002a). Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*, *96*(5), 1161–7.
- Malan, T. P., Mata, H. P., & Porreca, F. (2002b). Spinal GABAA and GABAB receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*, *96*(5), 1161–1167.
- Martin-Villalba, A., Winter, C., Brecht, S., Buschmann, T., Zimmermann, M., & Herdegen, T. (1998). Rapid and long-lasting suppression of the ATF-2 transcription factor is a common response to neuronal injury. *Molecular Brain Research*, *62*(2), 158–166.
- Matsuoka, Y., & Yang, J. (2012). Selective inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1/2 blocks nerve growth factor to brain-derived neurotrophic factor signaling and suppresses the development of and reverses already established pain behavior in rats. *Neuroscience*, *206*, 224–236.
- McGivern, J. G. (2006). Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discovery Today*, *11*(5–6), 245–253.
- McMahon, S. B., Cafferty, W. B. J., & Marchand, F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Experimental Neurology*, *192*(2), 444–62.
- Michael, G. J., & Priestley, J. V. (1999). Differential expression of the mRNA

- for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *The Journal of Neuroscience*, 19(5), 19.
- Mika, J., Zychowska, M., Popiolek-Barczyk, K., Rojewska, E., & Przewlocka, B. (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 716(3), 106–119.
- Mikuzuki, L., Saito, H., Katagiri, A., Okada, S., Sugawara, S., Kubo, A., ... Iwata, K. (2017). Phenotypic change in trigeminal ganglion neurons associated with satellite cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation is involved in lingual neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, 46(6), 2190–2202.
- Miletic, G., & Miletic, V. (2008). Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain*, 137, 532–539.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164.
- Moalem, G., & Tracey, D. J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews*, 51(2), 240–264.
- Mòdol, L., Cobianchi, S., & Navarro, X. (2014). Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, 155, 1577-1590.
- Morgado, C., Pereira-Terra, P., Cruz, C. D., & Tavares, I. (2011). Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(2), 150–159.
- Mueller, M., Wacker, K., Ringelstein, E. B., Hickey, W. F., Imai, Y., & Kiefer, R. (2001). Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to

- nerve injury. *American Journal of Pathology*, 159(6), 2187–2197.
- Nakagomi, S., Suzuki, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., & Kiyama, H. (2003). Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 5187–96.
- Nakajima, K., & Kohsaka, S. (2001). Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *The Journal of Biochemistry*, 130(2), 169–175.
- Nassar, M. A., Baker, M. D., Levato, A., Ingram, R., Mallucci, G., McMahon, S. B., & Wood, J. N. (2006). Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Molecular Pain*, 2(33), 1–10.
- Njoo, C., Heinl, C., & Kuner, R. (2014). In vivo siRNA transfection and gene knockdown in spinal cord via rapid noninvasive lumbar intrathecal injection in mice. *Journal of Visualized Experiment*, (85), 1-4.
- Nassar, M. A., Levato, A., Stirling, L. C., & Wood, J. N. (2005). Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Nav1.7 and Nav1.8. *Molecular Pain*, 1(24), 1–9.
- Nomura, N., Zu, Y.-L., Maekawa, T., Tabata, S., & Ishii, S. (1993). Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4259–4266.
- Obata, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Yi, D., Tokunaga, A., Hashimoto, N., Noguchi, K. (2003). Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain*, 101(1–2), 65–77.
- Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: a link between

- neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–12.
- Ong, W., Stohler, C. S., Herr, D. R. (2018). Role of the prefrontal cortex in pain processing. *Molecular Neurobiology*, 1,1-30.
- Patel R. & Dickenson A. H. (2010). Mechanisms of the gabapentinoids and $\alpha_2\delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. *Pharmacology Research & Perspectives*, 4(2), 1-13.
- Perkins, N. . M., & Tracey, D. . J. (2000). Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience*, 101(3), 745–757.
- Persengiev, S. P., & Green, M. R. (2003). The role of ATF / CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis*, 8(3), 225–228.
- Peters, C. M., Jimenez-Andrade, J. M., Kuskowski, M. A., Ghilardi, J. R., & Mantyh, P. W. (2007). An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Brain Research*, 1168(1), 46–59.
- Pineda-Farias, J. B., Barragán-Iglesias, P., Loeza-Alcocer, E., Torres-López, J. E., Rocha-González, H. I., Pérez-Severiano, F., Delgado-Lezama, R., Granados-Soto, V. (2015). Role of anoctamin-1 and bestrophin-1 in spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats. *Molecular Pain*, 11(41), 1-14.
- Prescott, S. A. (2015). Synaptic Inhibition and Disinhibition in the Spinal Dorsal Horn. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 131, 359–383.
- Price, T. J., Cervero, F., Gold, M. S., Hammond, D. L., & Prescott, S. A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Research Reviews*, 60(1), 149–170.
- Price, T. J., Hargreaves, K. M., & Cervero, F. (2006). Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Research*, 1112(1), 146–158.

- Price, T. J., & Prescott, S. A. (2015). Inhibitory regulation of the pain gate and how its failure causes pathological pain. *Pain*, 156(5), 789–792.
- Putatunda, R., Hala, T. J., Chin, J., & Lepore, A. C. (2014). Chronic at-level thermal hyperalgesia following rat cervical contusion spinal cord injury is accompanied by neuronal and astrocyte activation and loss of the astrocyte glutamate transporter, GLT1, in superficial dorsal horn. *Brain Research*, 1581, 64–79.
- Raison C. (2015) Cingulate and insula: the pain in the brain is not All the same. *Biological Psychiatry*, 77(3),205-206.
- Reimold, A. M., Grusby, M. J., Kosaras, B., Fries, J. W. U., Mori, R., Maniwa, S., Glimcher, L. H. (1996). Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature*, 379, 262-265.
- Reimold, A. M., Kim, J., Finberg, R., & Glimcher, H. G. (2001). Decreased immediate inflammatory gene induction in activating transcription factor-2 mutant mice. *International Immunology*, 13(2), 241–248.
- Ritter, B., Zschüntsche, J., Kvachnina, E., Zhang, W., & Ponimaskin, E. G. (2004). The GABA_B receptor subunits R1 and R2 interact differentially with the activation transcription factor ATF4 in mouse brain during the postnatal development. *Developmental Brain Research*, 149(1), 73–77.
- Rivera, C., Li, H., Thomas-Crusells, J., Lahtinen, H., Viitanen, T., Nanobashvili, A., Saarma, M. (2002). BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *The Journal of Cell Biology*, 159(5), 747–52.
- Robinson, G. A. (1996). Changes in the expression of transcription factors ATF-2 and Fra-2 after axotomy and during regeneration in rat retinal ganglion cells. *Molecular Brain Research*, 41(1–2), 57–64.
- Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, Ma'ayan A. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and

proteins. Database (Oxford). 2016 Jul 3;2016. pii: baw100. [cited 2018 March 20]. Available from: <http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/dataset/ENCODE+Transcripti on+Factor+Targets>

- Salinas-Abarca, A. B., Avila-Rojas, S. H., Barragán-Iglesias, P., Pineda-Farias, J. B., & Granados-Soto, V. (2017). Formalin injection produces long-lasting hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 797, 83–93.
- Sarantopoulos, C. D., McCallum, J. B., Rigaud, M., Fuchs, A., Kwok, W. M., & Hogan, Q. H. (2007). Opposing effects of spinal nerve ligation on calcium-activated potassium currents in axotomized and adjacent mammalian primary afferent neurons. *Brain Research*, 1132(1), 84–99.
- Schäfers, M., Sorkin, L. S., Geis, C., & Shubayev, V. I. (2003a). Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neuroscience Letters*, 347(3), 179–82.
- Schäfers, M., Svensson, C. I., Sommer, C., & Sorkin, L. S. (2003b). Tumor necrosis factor- α induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2517–2521.
- Schaible, H. (2006). Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 173, 3–28.
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, 5(42), 1062–1067.
- Seiffers, R., Allchorne, A. J., & Woolf, C. J. (2006). The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 32(5), 143–54.
- Seiffers, R., Mills, C. D., & Woolf, C. J. (2007). ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration.

The Journal of Neuroscience, 27(30), 7911–20.

Sheets, P. L., Heers, C., Stoehr, T., & Cummins, T. R. (2008). Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(Acetylamino)-N-benzyl-3-]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 89–99.

Shortland, P. J., Baytug, B., Krzyzanowska, A., McMahon, S. B., Priestley, J. V., & Averill, S. (2006). ATF3 expression in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve transection. *European Journal of Neuroscience*, 23(2), 365–373.

Sivilotti, L., & Woolf, C. J. (1994). The contribution of GABA_A and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 72(1), 169–79.

Snider, W. D., & McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 20(4), 629–32.

Snutch T. P. & Zamponi G. W. (2017). Recent advances in the development of T-type calcium channel blockers for pain intervention. *British Journal of Pharmacology*, 175, 2375–2383

Son, S. J., Lee, K. M., Jeon, S. M., Park, E. S., Park, K. M., & Cho, H. J. (2007). Activation of transcription factor c-jun in dorsal root ganglia induces VIP and NPY upregulation and contributes to the pathogenesis of neuropathic pain. *Experimental Neurology*, 204(1), 467–472.

Steiger, J. L., Bandyopadhyay, S., Farb, D. H., & Russek, S. J. (2004). cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABA_BR1A and GABA_BR1B subunit gene expression through alternative promoters. *Journal of Neuroscience*, 24(27), 6115–6126.

Sun, P., Li, X., Chen, C., Chen, Q., Ouyang, Q., Liu, F., Yuan, H. (2014). Activating transcription factor 4 modulates BDNF release from microglial cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 52(2), 225–30.

- Sun, X., Liu, J., Crary, J. F., Malagelada, C., Sulzer, D., Greene, L. a, & Levy, O. (2013). ATF4 protects against neuronal death in cellular Parkinson's disease models by maintaining levels of parkin. *The Journal of Neuroscience*, 33(6), 2398–407.
- Suzuki, T., Yamakuni, T., Hagiwara, M., & Ichinose, H. (2002). Identification of ATF-2 as a transcriptional regulator for the tyrosine hydroxylase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40768–74.
- Swayne L. A. & Bourinet E. (2008). Voltage-gated calcium channels in chronic pain: emerging role of alternative splicing. *European Journal of Physiology*, 456, 459–466.
- Takahashi, T., Aoki, Y., Okubo, K., Maeda, Y., Sekiguchi, F., Mitani, K., Kawabata, A. (2010). Upregulation of Cav3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. *Pain*, 150(1), 183–191.
- Tallarida, R. J., & Murray, B. M. (1981). *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*. (Springer-Verlag, Ed.). New York. Heidelberg, Berlin.
- Tamura, K., Hua, B., Adachi, S., Guney, I., Kawauchi, J., Morioka, M., Kitajima, S. (2005). Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *The EMBO Journal*, 24(14), 2590–601.
- Thompson, M. R., Xu, D., & Williams, B. R. G. (2009). ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 87(11), 1053–60.
- Treutlein, E.-M., Kern, K., Weigert, A., Tarighi, N., Schuh, C.-D., Nüsing, R. M., Scholich, K. (2018). EP3/CCL2 axis in trauma-induced neuropathy The prostaglandin E2 receptor EP3 controls CC-chemokine ligand-mediated neuropathic pain induced by mechanical nerve damage. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 9685–9693.
- Tsujimoto, A., Nyunoya, H., Morita, T., Sato, T., & Shimotohno, K. (1991).

- Isolation of cDNAs for DNA-binding proteins which specifically bind to a tax-responsive enhancer element in the long terminal repeat of human T-Cell leukemia virus type I. *Journal of Virology*, 65(3), 1420–1426.
- Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Dai, Y., Tokunaga, A., Miki, K., Noguchi, K. (2000). Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 15(2), 170–182.
- Weir, G. A., Middleton, S. J., Clark, A. J., Daniel, T., Khovanov, N., McMahon, S. B., & Bennett, D. L. (2017). Using an engineered glutamate-gated chloride channel to silence sensory neurons and treat neuropathic pain at the source. *Brain*, 140(10), 2570–2585.
- White, F. A., Sun, J., Waters, S. M., Ma, C., Ren, D., Ripsch, M., Miller, R. J. (2005). Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 14092–14097.
- White, J. H., McIlhinney, R. A. J., Wise, A., Ciruela, F., Chan, W.-Y., Emson, P. C., Marshall, F. H. (2000). The GABA_B receptor interacts directly with the related transcription factors CREB2 and ATFx. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13967–13972.
- Whitmarsh, A. J., & Davis, R. J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(8), 1172–1183.
- Woolf, C. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, 140(6), 441–451.
- Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3), 353–64.
- Wu, F., Pan, R., Chen, J., Sugita, M., Chen, C., Tao, Y., Sun, Y. (2014).

- Lentivirus mediated siRNA against GluN2B subunit of NMDA receptor reduces nociception in a rat model of neuropathic pain. *BioMed Research International*, 2014, 1-7.
- Yamasaki, T., Takahashi, A., Pan, J., Yamaguchi, N., & Yokoyama, K. K. (2009). Phosphorylation of activation transcription factor-2 at serine 121 by protein kinase C controls c-Jun-mediated activation of transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8567–8581.
- Yang, S.-H., Sharrocks, A. D., & Whitmarsh, A. J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 513(1), 1–13.
- Yu, T., Li, Y. J., Bian, A. H., Zuo, H. Bin, Zhu, T. W., Ji, S. X., Cho, J. Y. (2014). The regulatory role of activating transcription factor 2 in inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–10.
- Yuan, Z., Gong, S., Luo, J., Zheng, Z., Song, B., Ma, S., Li, M. (2009). Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 29(9), 2431–2442.
- Zang, Y., Chen, S.-X., Liao, G.-J., Zhu, H.-Q., Wei, X., Cui, Y., Liu, X.-G. (2015). Calpain-2 contributes to neuropathic pain following motor nerve injury via up-regulating interleukin-6 in DRG neurons. *Brain, Behavior, and Immunity*, 44, 37–47.
- Zeilhofer, H. U. (2008). Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain—contributions of inflammation and microglia. *International Immunopharmacology*, 8(2), 182–187.
- Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological Review*, 92, 193–235.
- Zemoura, K., Ralvenius, W. T., Malherbe, P., & Benke, D. (2016). The positive allosteric GABAB receptor modulator rac-BHFF enhances baclofen-mediated analgesia in neuropathic mice. *Neuropharmacology*, 108, 172–178.

- Zhu, W., & Oxford, G. S. (2007). Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *34*(4), 689–700.
- Zhuang, Z. Y., Gerner, P., Woolf, C. J., & Ji, R. R. (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain*, *114*(1–2), 149–159.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, *16*(2), 109–110.
- Zochodne, D. W., Levy, D., Zwiers, H., Sun, H., Rubin, I., Cheng, C., & Lauritzen, M. (1999). Evidence for nitric oxide and nitric oxide synthase activity in proximal stumps of transected peripheral nerves. *Neuroscience*, *91*(4), 1515–1527.
- .

12. ANEXOS

Parte de este trabajo se presentará en el siguiente congreso:

Vinicio Granados-Soto, Ana B. Salinas-Abarca, Isabel Velazquez-Lagunas, Úrzula M. Franco-Enzástiga and Héctor I. Rocha-González. ATF2, but not ATF3, participates in the maintenance of nerve injury-induced tactile allodynia and thermal hyperalgesia. *IASP World Congress on Pain 2018*, September 12 – 16th, Boston, Massachusetts.

Además, parte de este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

Salinas-Abarca A. B., Velazquez-Lagunas I., Granados-Soto V. “Participación del ATF2 y ATF3 en la modulación del dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales”. Presentación oral. *LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas*. 13-17 Agosto de 2017. Monterrey, Nuevo León.

Salinas-Abarca A. B., Velazquez-Lagunas I., Granados-Soto V. “Inhibition of ATF2 decreases mechanical allodynia and thermal hyperalgesia after spinal nerves ligation”. Poster 194: *36th Annual Scientific Meeting of the American Pain Society*. 17-20 de Mayo 2017, Pittsburgh, Pensilvania, USA.

Se publicó el siguiente artículo científico derivado de este proyecto:

Salinas-Abarca A. B., Velazquez-Lagunas I., Franco-Enzástiga U. M., Torres-López J. E., Rocha-González H. I. and Granados-Soto V (2018). ATF2, but not ATF3, participates in the modulation of tactile allodynia and thermal hyperalgesia induced by spinal nerves ligation. *Molecular pain*, 14,1-14.