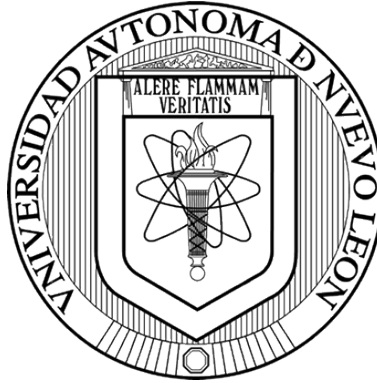


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA NOCICEPCIÓN (DOLOR Y COMEZÓN) EN RATONES $129Sv^{Ebf2-TauGFP}$ EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN LOCAL INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO

POR:

MARÍA BLANCA DELIA CEPEDA VARELA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INMUNOBIOLOGÍA

2023

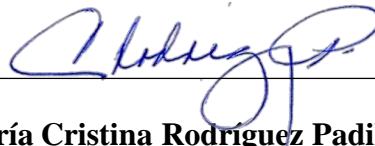
EVALUACIÓN DE LA NOCICEPCIÓN (DOLOR Y COMEZÓN) EN RATONES
129S_v^{Ebf2-TauGFP} EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN LOCAL INDUCIDO POR
LIPOPOLISACÁRIDO

Comité de Tesis



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Presidente



Dra. María Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



Dr. Moisés Armidés Franco Molina

Vocal

DIANA
CASAUFRO

Dra. Diana Elia Caballero Hernández

Vocal



Dra. Viviana Zomosa-Signoret

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Subdirectora de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA NOCICEPCIÓN (DOLOR Y COMEZÓN) EN RATONES 129Sv^{Ebf2-}
^{TauGFP} EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN LOCAL INDUCIDO POR
LIPOPOLISACÁRIDO

Dirección de Tesis



Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Director interno



Dr. Román Vidal Tamayo Ramírez

Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Inmunología y Virología, al L-14, a la Universidad de Monterrey y a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el apoyo económico (Número de apoyo 790309) e infraestructura para realizar este proyecto.

Quiero agradecerle a la Dra. Ana Carolina Martínez Torres, a quien admiro mucho su trayectoria y su habilidad para gestionar múltiples responsabilidades, gracias por apoyarme estos últimos años, al aceptarme en su laboratorio y permitirme hacer investigación sobre un tema que me apasiona, por formarme como investigadora, aconsejarme y tenerme muchísima paciencia. Al Dr. Román Vidaltamayo, por apoyarme, permitirme continuar trabajando con él, por motivarme a seguir haciendo investigación más allá de la licenciatura y ser más crítica con mi propia investigación y la de otros. Por compartirme su sabiduría y paciencia que me parecen son infinitas. Por invitarme a su laboratorio y mostrarme lo bonito que es hacer ciencia y estudiar el sistema nervioso.

A mis compañeros del L-14, gracias por escucharme en seminarios y darme retroalimentación, gracias por esforzarse en entender un tema complicado y muy diferente al suyo. A mis compañeros de maestría Adrián, Alondra, Daniel y Gerardo, gracias por compartir conmigo risas y buenos momentos. A Ana, Isaías y a la Dra. Diana Caballero, gracias por su amistad y por darme un pequeño espacio en su laboratorio. Gracias por escucharme y darme retroalimentación de mi proyecto, su perspectiva y su línea de investigación enriquecieron mucho la mía.

Quiero agradecerle a la “Lab’s Family”, Dra. Damaris, a la Dra. Irene, al Dr. Jesús “Don Chuy”, a Lacho y a Yolis, por extenderme su amistad y cariño, tener momentos de risas y tranquilidad. Por su ayuda ya sea desde el mantenimiento de los ratones hasta el análisis y retroalimentación de mis resultados, gracias por enriquecer mi investigación y mi persona.

A Daniel Chávez, quien me acompañó al concluir la maestría, a toda su familia, que se interesó por mi trabajo y me apoyaron. Por último, quiero agradecerle a mi Papá Grande, Alejandro Varela, a mi mamá Mayra Varela y a mi hermano Ricardo, gracias por apoyarme y motivarme a entrar a la maestría y terminarla, gracias por alentarme a perseguir y cumplir mis sueños.

Para toda mi familia

Las afirmaciones extraordinarias requieren evidencia extraordinaria

Carl Sagan

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xi
GLOSARIO	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Sistema nervioso somatosensorial	2
Sistema inmune.....	3
Ebf2 y proteínas Collier/Olf1/Ebf (COE).....	6
Modelo de estudio para mediciones simultáneas de dolor y comezón	10
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO DEL TRABAJO	13
Objetivo General.....	13
Objetivos específicos	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
Ratones	14
Obtención de ADN y reacción en cadena polimerasa (PCR)	14
Electroforesis en gel	15
Experimento conductual	15
Eutanasia y perfusión.....	17
Histología	17
Criosección	18
Inmunofluorescencia secundaria	18
Microscopia de fluorescencia	19
Patrones de expresión génica en ganglio trigeminal de ratones adultos	19
Análisis Estadístico.....	20

RESULTADOS	21
1. Ebf2 se expresa en el ganglio trigeminal de ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP	21
2. Patrones de expresión de Ebf2 y genes relacionados con la nocicepción en el ganglio trigeminal de ratones C57BL/6J	26
3. La inserción de la aguja en el modelo de inyección en cachete presenta su efecto nocifensivo durante los primeros 10 minutos	29
4. Los ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP presentan comportamientos de grooming similares a los silvestres	31
5. Los ratones KO presentan una discriminación anormal de estímulos nocivos	33
6. Aumento de las conductas de wiping con el tratamiento de LPS en ratones silvestres y knockout	35
7. Múltiples inyecciones de LPS inducen un patrón de inflamación crónico agudizado en cachetes ipsilateralmente tratados en ratones WT y bilateralmente en ratones KO.....	36
DISCUSIÓN	38
1. Ebf2 se expresa en el ganglio trigeminal de ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP	38
2. Patrones de expresión de Ebf2 y genes relacionados con la nocicepción en el ganglio trigeminal de ratones C57BL/6J	39
3. La inserción de la aguja en el modelo de inyección en cachete presenta su efecto nocifensivo durante los primeros 10 minutos	40
4. Los ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP presentan comportamientos de grooming similares a los silvestres	40
5. Los ratones KO presentan una discriminación anormal de estímulos nocivos	40
6. Aumento de las conductas de wiping con el tratamiento de LPS en ratones silvestres y knockout	43
7. Múltiples inyecciones de LPS inducen un patrón de inflamación crónico agudizado en cachetes ipsilateralmente tratados en ratones WT y bilateralmente en ratones KO.....	43
CONCLUSIONES.....	46
PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
RESUMEN BIOGRÁFICO	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inflamación ipsilateral y contralateral en ratones tratados con LPS.....	37
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Vías anatómicas de transmisión de información nocifensiva.	3
Figura 2	Interacciones neuroinmunes en la nocicepción.	5
Figura 3	Expresión de Ebf2 en componentes del sistema somatosensorial.	7
Figura 4	Modelo de estudio de Ebf2. Generación de ratones de la línea 129SvEbf2-TauGFP.	9
Figura 5	Microscopía de fluorescencia de ganglios trigeminales de ratones de la línea Ebf2-TauGFP.	22
Figura 6	Microscopía de fluorescencia de ganglio trigeminal de ratones heterocigotos de la línea Ebf2-TauGFP.	24
Figura 7	Microscopía de fluorescencia de ganglio trigeminal de ratones <i>knockout</i> de la línea Ebf2-TauGFP.	25
Figura 8	Patrones de expresión génica de genes relacionados a la nocicepción en ganglios trigeminales de ratones C57BL/6J.	27
Figura 9	Patrones de expresión génica de genes relacionados a los canales TRP en ganglios trigeminales de ratones C57BL/6J.	28
Figura 10	Comportamientos nocifensivos en ratones WT con la inyección de PBS.	30
Figura 11	Efectos en la conducta de <i>grooming</i> con dos sustancias proinflamatorias.	32
Figura 12	Percepción nociceptiva (modalidad de dolor) con dos sustancias proinflamatorias en ratones silvestres y transgénicos.	34
Figura 13	Percepción nociceptiva (modalidad de comezón) con dos sustancias proinflamatorias en ratones silvestres y transgénicos.	34
Figura 14	Múltiples inyecciones de LPS aumentan la conducta de <i>wiping</i> en ratones silvestres y <i>knockout</i> .	35
Figura 15	Cortes representativos de piel de ratones silvestres y <i>knockout</i> tratados con PBS y LPS.	37

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

CFA	Adyuvante completo de Freund
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
COE	Familia de proteínas Collier/Olf/EBF
DRG	Ganglio de la raíz dorsal de la espina
Ebf2	Early B cell Factor 2
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GRP	Péptido liberador de gastrina
HET	Heterocigoto
HIS	Histamina
IFM	Mediadores inflamatorios
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolisacárido
NKA	Neuroquinina A
PBS	Tampón fosfato salino
PrV	Núcleo principal sensorial del nervio trigémino
RAMP1	Proteína modificadora de la actividad del receptor 1
SP	Sustancia P
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TauGFP	Proteína de fusión de Tau y la Proteína Verde Fluorescente
TG	Ganglio trigeminal
TLR	Receptor de tipo Toll
TRP	Canal iónico de potencial receptor transitorio
VPM	Núcleo ventral posterior medial del tálamo
WT	Silvestre

GLOSARIO

Aferente: Neuronas que transportan información desde la periferia hasta el sistema nervioso central. Es información aferente la que proviene de órganos de los sentidos, de la piel, músculos, articulaciones y vísceras.

Algoeno: Se refiere a estímulos físicos (frío/calor) o químicos que activan receptores asociados a la nocicepción y producen la sensación de dolor.

Crosstalk: Se refiere a instancias en las cuales uno o varios componentes de una vía de transducción de señales afecta a otra.

Factor de transcripción: Son proteínas que se unen a secuencias cortas de ADN y pueden “encender” o “apagar” genes, dependiendo de si su actividad es activadora o represora. Como su nombre lo dice, controlan la transcripción de un gen o varios genes blanco.

Knockout: un ratón *knockout*, se refiere a un ratón de laboratorio genéticamente modificado. En el que, un gen o varios genes son inactivados, o bien, un gen (o varios) existente es reemplazado o interrumpido por una secuencia de ADN artificial. En este trabajo se describe el modelo *knockout* de Ebf2 que se utiliza.

Nocifensivo: Se utiliza este término cuando se describe una respuesta conductual asociada a dolor o a una incomodidad.

Parálogos: Son genes que codifican para proteínas, que surgieron a raíz de un proceso de duplicación de un gen inicial. Conservan características de la proteína o gen del que proceden originalmente y por ello, tienen roles redundantes. Ebf2 tiene de parálogos a Ebf1, Ebf3 y Ebf4.

Percepción: Experiencia consciente que resulta de la estimulación de los sentidos. || Procesos complejos que implican mecanismos de mayor orden (como la interpretación y memoria) y, por lo tanto: involucran la actividad en el cerebro (Goldstein y Brockmole, 2017).

Pruritígeno: Se refiere a estímulos que activan receptores asociados a la comezón e inducen dicha sensación.

Sensación: Procesos simples o “elementales” que involucran uno de los componentes de un sistema sensorial, en el que se pueden detectar diversos estímulos relacionados con el tacto, la vista, el gusto, el olfato, la temperatura, entre otros (Goldstein y Brockmole, 2017).

RESUMEN

La piel es un órgano encargado de proteger al cuerpo de posibles amenazas, y se encarga de proporcionar información de estímulos nociceptivos, que provocan comezón y/o dolor. En condiciones patológicas, el prurito y/o el dolor agudo o crónico son incapacitantes y a menudo se acompañan con inflamación. Es importante investigar las funciones de los circuitos neuronales que procesan estos estímulos y cómo se comunican o interactúan con el sistema inmune. Ebf2 es un factor de transcripción expresado en neuronas del sistema trigeminal el cual transmite información nociceptiva del rostro a estructuras superiores en el cerebro. Por lo que en este trabajo se propuso evaluar la expresión de Ebf2 en el ganglio trigémino (TG) de ratones heterocigotos (HET) y *knockout* (KO). Además de comparar la percepción nociceptiva y el patrón de inflamación local inducido por lipopolisacárido (LPS) entre los ratones con los genotipos silvestre (WT), HET y KO de la línea Ebf2-TauGFP en el modelo de inyección en cachete. Se utilizaron ratones macho y hembra adultos de la línea 129Sv^{Ebf2-TauGFP}. Se realizó una inmunotinción con anticuerpos primarios para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la sustancia P (SP) y el péptido liberador de gastrina (GRP). También, se realizaron experimentos conductuales en los que se inyectaron LPS o Histamina (HIS) en el cachete de los ratones para medir simultáneamente conductas asociadas a dolor (*wiping*) y a comezón (*scratching*). Posteriormente se analizó el infiltrado con cortes histológicos. Se encontró que las células Ebf2+, de ratones HET, co-expresan la sustancia P y GRP, mientras que las células KO marcadas con Tau-GFP no co-expresan dichos neurotransmisores. LPS en WT, provoca episodios de *wiping*, HET y KO tienen en menor medida que en WT estos episodios y confunden la localización espacial del estímulo, lo cual es más marcado en los KO, y en estos últimos hay mayor *scratching* que en WT. Con HyE, los animales WT presentaron un patrón inflamatorio compuesto por neutrófilos y linfocitos, y mostró signos de inflamación crónica. Los ratones KO también mostraron el mismo patrón de infiltración que los WT en los cachetes ipsilaterales y en los cachetes contralaterales. En conclusión, los ratones transgénicos adultos de la línea Ebf2-TauGFP expresan Ebf2 en el ganglio trigeminal. Los ratones *knockout* tienen alteraciones en la percepción de estímulos nociceptivos. Los ratones WT presentan datos patológicos consistentes a inflamación en la piel tratada con LPS y los animales KO tienen una respuesta bilateral inflamatoria. Esta tesis sienta las bases para investigar el posible papel de Ebf2 en la nocicepción.

ABSTRACT

Skin is the organ in charge of protecting the body from possible threats, and it is responsible for providing information on noxious stimuli that causes itch and/or pain. In pathological conditions, itching and/or pain, acute or chronic are disabling and are often accompanied by inflammation. It is important to investigate the functions of the neural circuits that process these stimuli and how they communicate or interact with the immune system. Ebf2 is a transcription factor expressed in neurons of the trigeminal system, which transmits nociceptive information from the face to higher structures in the brain. Therefore, in this work we evaluated the expression of Ebf2 in the trigeminal ganglion (TG) of heterozygous (HET) and knockout (KO) mice. In addition, we compared the nociceptive perception and the local inflammation pattern induced by lipopolysaccharide (LPS) between mice with the wild type (WT), HET and KO genotypes of the Ebf2-TauGFP strain with the cheek injection model. Adult male and female mice of the 129Sv^{Ebf2-TauGFP} strain were used. Immunostaining was performed with primary antibodies for calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P (SP), and gastrin-releasing peptide (GRP). Also, behavioral experiments were performed in which LPS or Histamine (HIS) were injected into the cheeks of mice to simultaneously measure behaviors associated with pain (wiping) and itching (scratching). Subsequently, the infiltration was analyzed with histological sections. It was found that Ebf2⁺ cells, from HET mice, co-express substance P and GRP, whereas KO cells marked with Tau-GFP do not co-express these neurotransmitters. LPS in WT causes wiping episodes, HET and KO have these episodes to a lesser extent than in WT and confuse the spatial location of the stimulus, which is more marked in KOs, and in the latter, there is more scratching than in WT. With H&E, WT animals presented an inflammatory pattern composed of neutrophils and lymphocytes and showed signs of chronic inflammation. KO mice also showed the same infiltration pattern as WT in ipsilateral cheeks and contralateral cheeks. In conclusion, adult transgenic mice of the Ebf2-TauGFP strain express Ebf2 in the trigeminal ganglion. Knockout mice have alterations in the perception of nociceptive stimuli. WT mice present pathology signs consistent with inflammation in LPS-treated skin and KO animals have a bilateral inflammatory response. This thesis lays the foundations to investigate the possible role of Ebf2 in nociception.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha cobrado relevancia el estudio de las interacciones neuroinmunes en la nocicepción, ya que, tanto el sistema nervioso como el inmune, comparten el rol de percibir estímulos nocivos que atentan contra la integridad de los individuos: heridas, piquetes de mosquito o infecciones bacterianas. Sin embargo, aún quedan algunas incógnitas por dilucidar; ya sea la manera en que un estímulo nocivo promueve una respuesta dolorosa o de comezón, como es que se discrimina el dolor o la comezón de otras sensaciones, o la forma en que la inflamación y su compleja señalización influyen en el desarrollo de patologías cuyos síntomas presentan dolor y/o comezón.

En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que el factor de transcripción Ebf2 se expresa en núcleos relacionados con el sistema somatosensorial, que procesan señales nociceptivas: el núcleo principal sensorial del trigémino (PrV), el núcleo ventral posteromedial (VPM) y la sustancia gelatinosa. Con base en estos hallazgos, en este trabajo se propuso indagar cómo este factor de transcripción influye en el proceso de percepción nociceptiva del rostro. Para ello utilizamos la cepa de ratones 129Sv^{Ebf2-TauGFP}, donde la proteína de fusión Tau-GFP sirve como un marcador histogenético para visualizar tanto somas y axones de neuronas que expresan Ebf2, permitiendo analizar ratones heterocigotos que tienen 1 copia activa de Ebf2 y otra inactiva, y ratones homocigotos nulos, o *knockout*, que tienen 2 copias inactivas de Ebf2.

En esta investigación se caracterizaron las neuronas del ganglio trigeminal, pues se quería conocer si Ebf2 se encontraba presente en esta estructura, la cual inerva el rostro y transporta información somatosensorial a estructuras superiores en el cerebro. Además, se analizó la conducta de defensa ante estímulos nociceptivos (conducta nocifensiva), que consiste en episodios de *wiping* (sobado) que corresponden a dolor, los episodios de *scratching* (rascado) a comezón, y *grooming* (acicalamiento) que corresponden a una conducta intrínseca de los ratones.

Y finalmente se analizó la interrelación sistema inmune-nervioso con histología, de cortes de piel de ratones tratados con lipopolisacárido pertenecientes a los grupos experimentales conductuales, teñidos con hematoxilina y eosina. Los resultados presentados en este trabajo sientan las bases para investigar y profundizar sobre el posible papel que desempeña el factor de transcripción Ebf2 en la nocicepción.

ANTECEDENTES

Sistema nervioso somatosensorial

El sistema nervioso somatosensorial (del prefijo griego para somato- “cuerpo”) es un subcomponente de los sistemas sensoriales (visión, oído, gusto, olfato, balance y tacto) que se encarga de producir las percepciones relacionadas con el cuerpo. En específico, se encarga de interpretar información del ambiente externo a través del tacto, la propiocepción (posición y movimientos de las partes del cuerpo), monitorear la temperatura (corporal, la de objetos externos y del ambiente) y proveer información de estímulos dolorosos, de comezón o de cosquillas (Goldstein y Brockmole, 2017).

Entre las modalidades de información somatosensorial destaca la nocicepción, proceso por el cual el sistema nervioso codifica y procesa aquellos estímulos externos que tienen un potencial de ser nocivos contra los tejidos (Donnelly *et al.*, 2020; Goldstein y Brockmole, 2017). En otras palabras, es la percepción de un estímulo que puede ser doloroso o que induzca comezón.

Las neuronas nociceptivas de primer orden, o nociceptores, se les conoce a aquellas que inervan, por ejemplo, la piel, y son aferentes por naturaleza (Krebs *et al.*, 2018). El cuerpo de las neuronas de primer orden se encuentra en los ganglios trigeminales (TG), para el caso de la inervación del rostro (El-Boustani *et al.*, 2020; Erzurumlu *et al.*, 2010), y los ganglios de la raíz dorsal (DRG) localizados en la columna vertebral, para la inervación del cuello hasta la planta de los pies (Cevikbas y Lerner, 2020). Las proyecciones de las neuronas de primer orden (originarias del TG o del DRG) hacen sinapsis con neuronas de segundo orden en el núcleo principal sensorial (PrV), localizado en el tronco encefálico, y Lámina I y II (sustancia gelatinosa), localizados en la parte dorsal de la espina (Cevikbas y Lerner, 2020; Chen y Sun, 2020; Lipshetz *et al.*, 2018). Las neuronas de segundo orden proyectan y relevan la información sensorial que reciben hacia estructuras superiores en el cerebro como es el núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM) y el núcleo parabraquial (Cevikbas y Lerner, 2020; Chen y Sun, 2020; Lipshetz *et al.*, 2018). El tálamo es el principal integrador de información somatosensorial y motora dentro del cerebro, a través de la percepción consciente de la sensación, guía al sistema motor (Mtui *et al.*, 2017). Los axones de las neuronas de segundo orden cruzan la línea media (decusan) para inervar el tálamo contralateral; y el relevo de la información contralateral, así como de su procesamiento, se realiza

en el hemisferio contrario en el que se origina la sensación(El-Boustani *et al.*, 2020; Goldstein y Brockmole, 2017) (**Figura 1**).

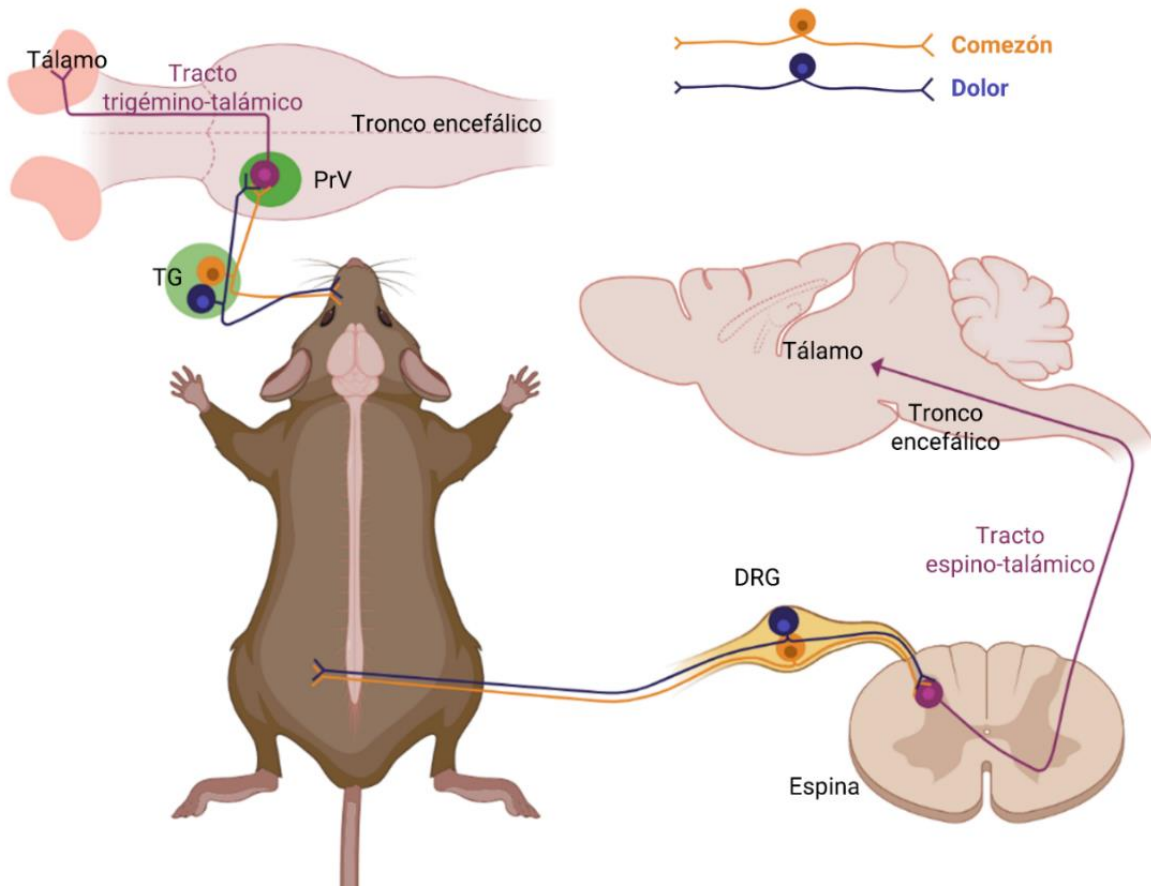


Figura 1. Vías anatómicas de transmisión de información nocifensiva.

En azul, corresponde a nociceptores en ganglio trigeminal (TG) o en el ganglio de la raíz dorsal de la espina (DRG), mientras que en naranja corresponde a las neuronas pruriceptivas. Las neuronas pruriceptivas son una subpoblación de los nociceptores, y son las neuronas encargadas de transducir las señales de comezón. La información que transportan las neuronas de primer orden proyecta a núcleos que son centros de relevo de la información somatosensorial, cuyas neuronas de segundo orden proyectan a otras estructuras superiores en el cerebro, cruzan la línea media y ascienden de manera contralateral. Imagen creada en Biorender.com.

Sistema inmune

El sistema inmune comparte con el sistema somatosensorial la capacidad de detectar estímulos nocivos que amenacen la integridad del huésped: infecciones bacterianas o el daño a tejido en forma de heridas (Donnelly *et al.*, 2020). La inflamación es el mecanismo por el cual el sistema inmune responde a un estímulo que es potencialmente dañino (Weavers y Martin, 2020). Comienza

con la exposición de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que promueve la activación de células inmunes, donde existe una intrincada red de señales químicas como las citocinas, quimiocinas y otras moléculas encargadas del reclutamiento específico de otras células y cambios vasculares mediados por una respuesta humoral (Bennett *et al.*, 2018).

Ante un estímulo nocivo, como un corte en la piel, el sistema inmune innato es el primero que media la respuesta inflamatoria, a través de células como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas; que producen especies reactivas de oxígeno y realizan la fagocitosis para eliminar microbios (Bennett *et al.*, 2018). En ocasiones, cuando las heridas se vuelven crónicas o infectadas, las células presentadoras de antígeno, macrófagos y células dendríticas activadas, viajan a los ganglios linfáticos para promover una activación de la respuesta inmune adaptativa (humoral) (Bennett *et al.*, 2018; Weavers y Martin, 2020).

Además, los mediadores inflamatorios (IFM) que liberan las células inmunes pueden funcionar como ligandos específicos para los nociceptores que inervan la piel (Bautista *et al.*, 2014; Donnelly *et al.*, 2020; Miao *et al.*, 2018; Voisin *et al.*, 2021; Xie y Li, 2019; Yamanoi *et al.*, 2019), e incluso hay investigaciones que demuestran que los PAMPs y DAMPs pueden interactuar directamente con los nociceptores, ya que estos expresan TLRs como TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR8 (Boonen *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2011; T.-T. Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018). El mRNA de TLR4 es el que tiene mayor expresión entre todos los transcritos para TLR y es principalmente expresado por nociceptores peptidérgicos (Donnelly *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2019).

Las interacciones indirectas de los PAMPs y DAMPs con los nociceptores son aquellas que son mediadas a través de los IFM, reciben el nombre de interacciones neuroinmunes, en donde las células del sistema inmune se activan y liberan esos mediadores que se unen a receptores específicos que expresan las neuronas de primer orden, promoviendo su activación y la transducción de la señal a eléctrica, en forma de potenciales de acción, y química, con la liberación de neurotransmisores, como el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), péptido liberador de gastrina (GRP) y Sustancia P (SP), mismos que pueden activar a las células del sistema inmune y aumentar la inflamación (**Figura 2**) (Bautista *et al.*, 2014; Donnelly *et al.*, 2020; Miao *et al.*, 2018; Voisin *et al.*, 2021; Xie y Li, 2019; Yamanoi *et al.*, 2019).

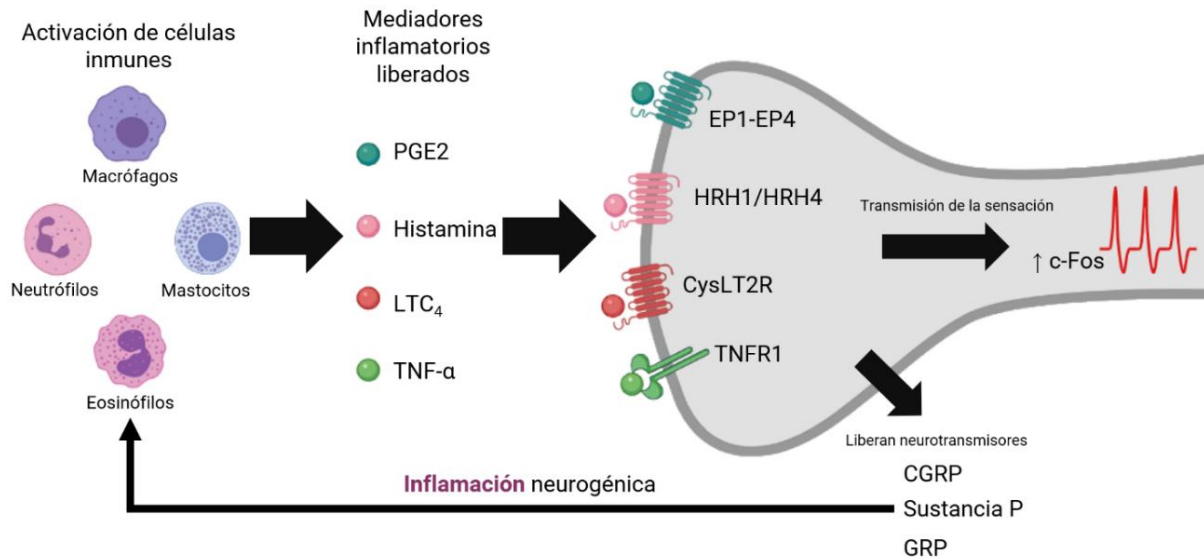


Figura 2. Interacciones neuroinmunes en la nocicepción.

En la piel, la activación de células inmunes libera mediadores inflamatorios (IFM) que funcionan como ligandos que se unen a los receptores específicos que expresan las neuronas de primer orden somatosensoriales. La unión de los mediadores inflamatorios promueve dentro de la neurona su despolarización y liberación de neurotransmisores para continuar transmitiendo la sensación (de dolor y/o comezón) hacia las neuronas de segundo orden. Los neurotransmisores también pueden ser liberados hacia la superficie de la piel y estimular a las células inmunes para continuar o prolongar la inflamación. La inflamación neurogénica, se le dice aquella que se origina por moléculas o señales que libera el sistema nervioso. Imagen creada en Biorender.com.

Por otro lado, las interacciones directas son, por ejemplo, con moléculas que son afines a los TLRs, como es el caso del lipopolisacárido (LPS), cuyo receptor específico, es el TLR4. El lipopolisacárido es un elemento de la membrana externa de las bacterias Gram negativas como *E. coli*, el sistema inmune de humanos y de ratones ha evolucionado para montar respuestas proinflamatorias cuando los TLR4 que expresan las células inmunes son activados, tras la unión ligando-receptor, se promueve una cascada de señalización que culmina en la activación del factor nuclear Kappa B y la producción de citocinas proinflamatorias (Lu *et al.*, 2008).

Mientras que, en el caso de las neuronas que expresan TLR4, se sabe que la activación de estas es a través de la unión del LPS a su receptor específico, y este TLR sensibiliza el canal iónico TRPV1 (Diogenes *et al.*, 2011). Por otro lado, las investigaciones como la de Meseguer y colaboradores en 2014, y la de Boonen y colaboradores en 2018, demostraron que el LPS puede unirse a los canales TRPA1 y TRPV1 de forma directa; estos canales pueden reconocer una amplia variedad de moléculas y se encargan de mediar dolor y comezón en las neuronas (Silverman *et al.*, 2020).

En el contexto de la inflamación los canales TRPV1 presentan un rol asociado con mecanismos proinflamatorios: el calor nocivo, prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) son otros ligandos endógenos que activan a este receptor y promueven un influjo del calcio interno de la neurona, que termina en la liberación de neurotransmisores: Sustancia P, GCRP y Neuroquinina A (NKA) y la transmisión de potenciales de acción que genera dolor y/o comezón (Silverman *et al.*, 2020).

También, TRPA1 ha tenido un papel prominente en la inflamación al ser un regulador de la señalización inflamatoria, así como que la expresión de este se puede modular por IFMs. Por ejemplo, en modelos de inflamación por lesión nerviosa o utilizando el Adyuvante Completo de Freund (CFA), se ve un incremento en la expresión de TRPA1 (Obata *et al.*, 2005). La citocina proinflamatoria TNF- α regula al alza la expresión de TRPA1 a la membrana celular en nervios periféricos (Meng *et al.*, 2016). Algunos agonistas para TRPA1, cuando se aplican de manera tópica en la piel generan una respuesta inflamatoria local: el alil isotiocianato (AITC), que es la molécula encargada de darle el sabor de pungencia a la mostaza y al wasabi, causa hipersensibilidad térmica y mecánica, así como también un aumento en la sensibilidad al dolor, y viene acompañado de una inflamación (Bautista *et al.*, 2013).

Ebf2 y proteínas Collier/Olf1/Ebf (COE)

En trabajos previos del laboratorio demostramos que Ebf2 se expresa en neuronas del núcleo principal del nervio trigémino, y sus axones proyectan hacia el núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM), así como en la sustancia gelatinosa a lo largo de la espina, en ratones posnatales recién nacidos hasta adultos (**Figura 3**) (Cepeda-Varela *et al.*, 2020). Debido a que el VPM es el sitio principal de relevo de información somatosensorial a estructuras superiores en el cerebro, es de interés determinar si Ebf2 influye en la formación de este circuito neuronal, es decir, la proyección de los axones de las neuronas en el PrV hacia el VPM; y si la función de estas se ve alterada. A modo de extender el conocimiento sobre Ebf2 y llegar a estudiar la percepción nociceptiva del rostro en ratones *knockout* para este factor de transcripción.

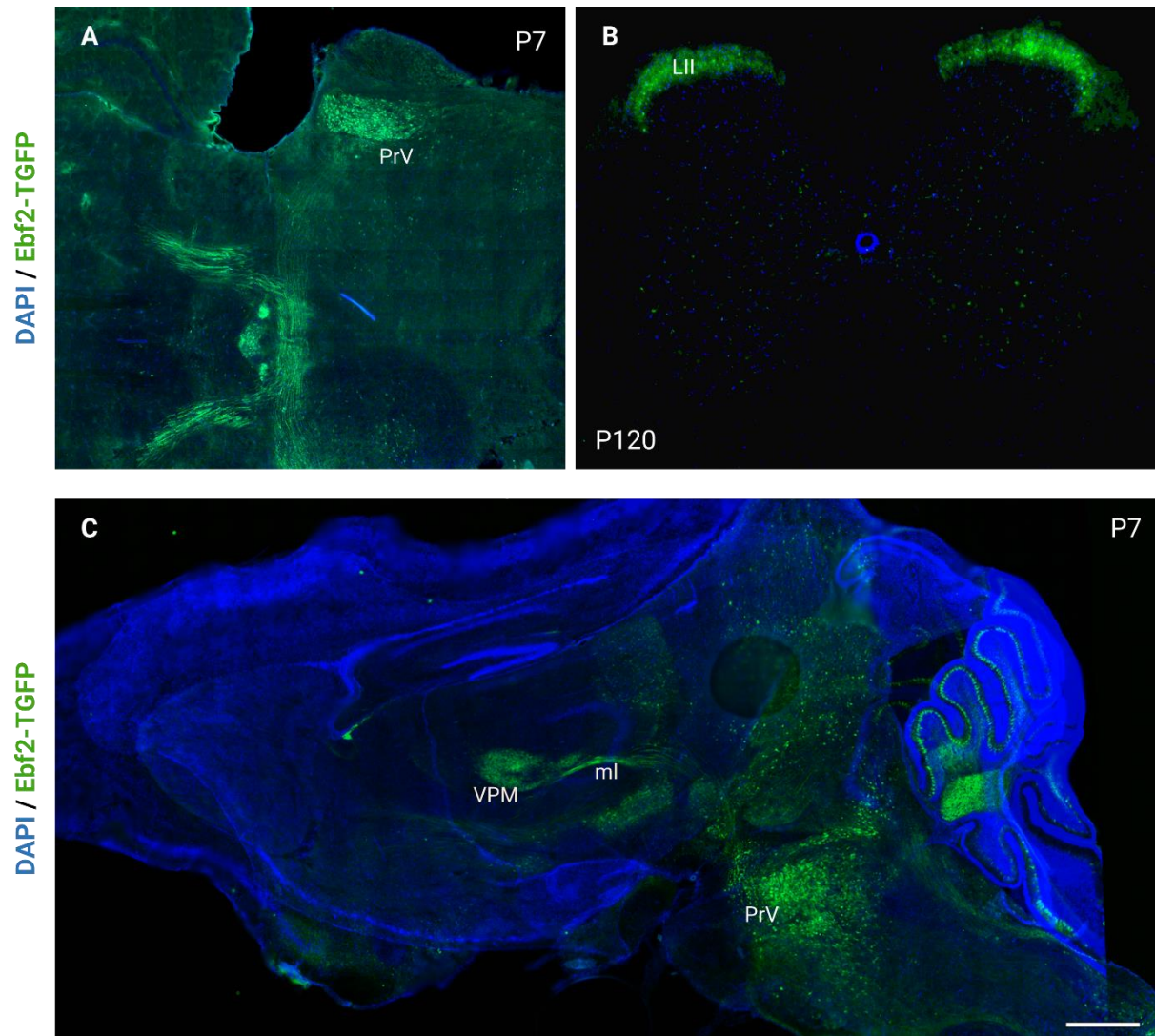


Figura 3. Expresión de Ebf2 en componentes del sistema somatosensorial.

Cortes representativos para cerebros de ratones heterocigotos de diferentes edades posnatales (en días). Corte oblicuo en el que se muestra la decusación de axones originarios del PrV y que se integran hacia el lemnisco medial (A). Corte transversal de la espina, Ebf2 se expresa en la sustancia gelatinosa (LII) (B.). Imágenes solapadas de cortes sagitales de cerebro de ratón heterocigoto en las que se ve el circuito PrV–VPM (C). Núcleo principal sensorial del nervio trigémino (PrV). núcleo ventral posteromedial del tálamo (VPM). Lemnisco medial (ml) (Cepeda-Varela *et al.*, 2020).

Las proteínas COE, se le denominó a un conjunto de factores de transcripción presentes en distintos miembros del reino animal, desde la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, el pez cebra, *Danio rerio*, en ranas, *Xenopus laevis*, en el ratón, *Mus musculus*, hasta en humanos (Dubois y Vincent, 2001). Estas proteínas se caracterizan por formar homo- o heterodímeros y poseer un dominio de unión al ADN único, zinc knuckle, formado por un bucle y 3 hélices cortas,

conformado por un átomo de zinc que protruye y participa en el reconocimiento del ADN (Treiber *et al.*, 2010).

En el año 1997, dos grupos de investigación, independientes, descubren parálogos para Ebf1 en el ratón, entre ellos destaca Ebf2, también conocido como O/E-3 (Garel *et al.*, 1997; S. S. Wang *et al.*, 1997). El factor de transcripción Ebf2 tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario, pues participa en la diferenciación celular de linajes como grasa parda, músculo, células hematopoyéticas (Y. S. Green y Vetter, 2011; Kieslinger *et al.*, 2005; Rajakumari *et al.*, 2013) y también durante el desarrollo y formación de circuitos neuronales (Garel *et al.*, 1997; S. S. Wang *et al.*, 1997). Además, en ratones adultos se ha visto que Ebf2 participa en el control de la actividad de genes de termogénesis en adipocitos pardos (Angueira *et al.*, 2020) y para mantener la hematopoyesis normal en el ratón (Hinzen, 2012; Kieslinger *et al.*, 2010).

Uno de los principales modelos de estudio de Ebf2 consiste en el uso de ratones genéticamente modificados de la cepa $129Sv^{Ebf2-TauGFP}$, en los cuales la proteína de fusión Tau-GFP sustituye a los primeros 5 exones codificantes para Ebf2 por recombinación homóloga y después esos ratones son cruzados con ratones Cre para eliminar el cassette Neo (**Figura 4 A**). Los ratones F1 (primer generación de camada) de esa cruce son los de la cepa $129Sv^{Ebf2-TauGFP}$. La proteína Tau-GFP se expresa bajo el control del promotor de Ebf2, por lo que Tau-GFP funciona como una proteína reportera que permite, con técnicas de microscopia de fluorescencia, visualizar los somas y los axones de las neuronas que expresan Ebf2 (**Figura 4 B**). Los ratones de la cepa $129Sv^{Ebf2-TauGFP}$, son heterocigotos y se requiere cruzarlos para mantener el alelo transgénico; con las cruces se obtienen ratones de los 3 genotipos (**Figura 4 C**) con un porcentaje de probabilidad de que nazcan ratones silvestres (WT) del 25%, heterocigotos (HET) del 50%, y *knockout* (KO) del 25%, por cada camada.

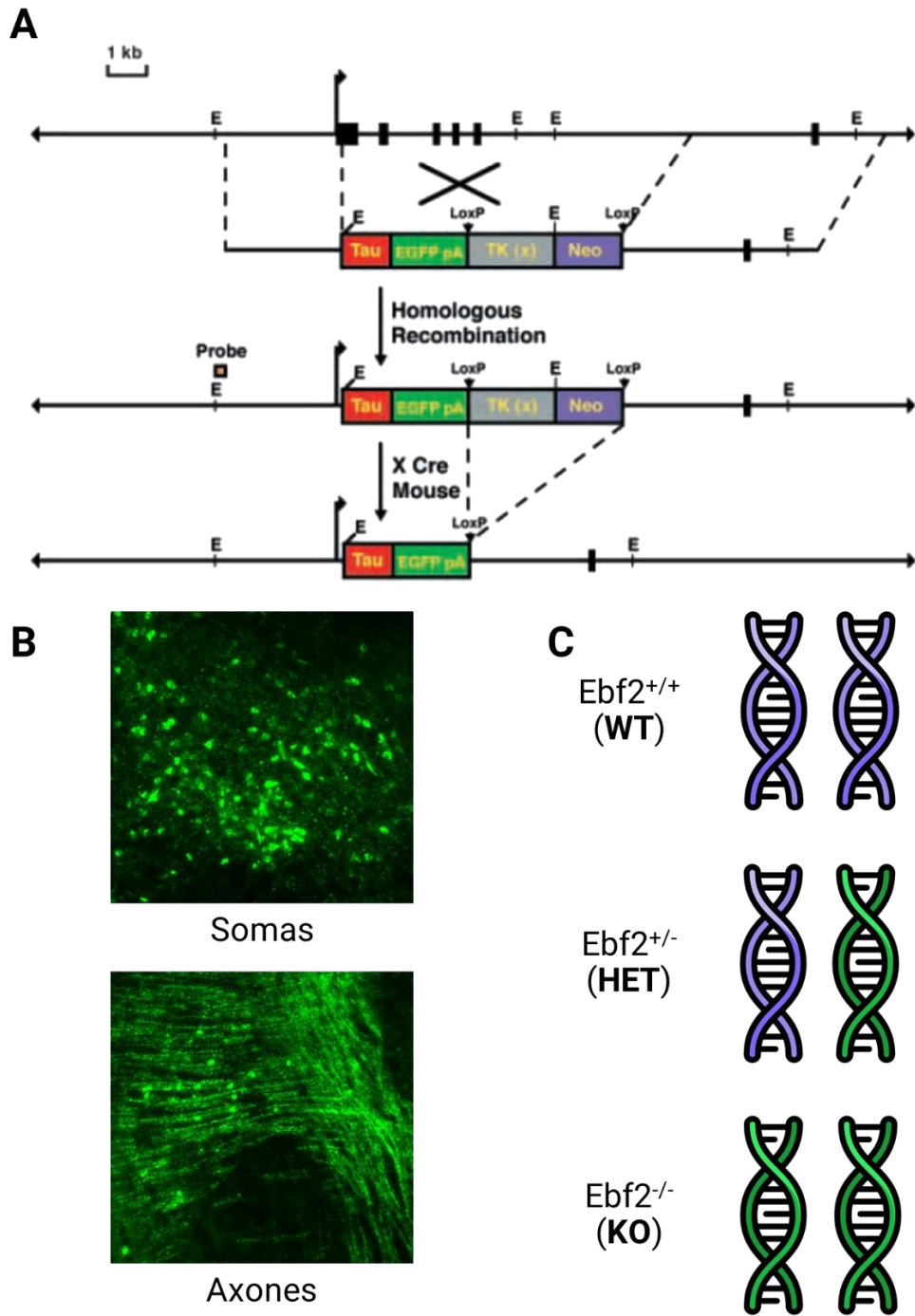


Figura 4. Modelo de estudio de Ebf2. Generación de ratones de la línea 129Sv^{Ebf2-TauGFP}.

Diagrama donde se muestra el reemplazo de los primeros 5 exones (rectángulos negros) codificantes para la proteína Ebf2 por la proteína de fusión Tau-GFP con técnicas de ingeniería genética. Tau-GFP se expresa bajo el control del promotor de Ebf2 (flecha negra) **A**. Imágenes de somas y axones de las neuronas que expresan Ebf2 en ratones heterocigotos y *knockout* **B**. Genotipos de los ratones que se utilizarán en este proyecto **C**. Los ratones silvestres (WT) tienen 2 alelos silvestres para Ebf2 (cromosomas morados). Los ratones heterocigotos (HET) presentan 1 alelo silvestre para Ebf2 y otro transgénico con Tau-GFP (cromosoma verde). Los ratones *knockout* (KO) presentan 2 alelos transgénicos con Tau-GFP (no tienen copias funcionales de Ebf2). Imagen tomada y sin modificaciones de Wang *et al.*, 2003 **A**.

Modelo de estudio para mediciones simultáneas de dolor y comezón

El modelo de inyección en cachete se ha estandarizado para estudiar el efecto algogeno o pruritígeno de sustancias químicas en ratones, gracias a los esfuerzos de Steven Shimada y Robert LaMotte: se encontró que, inyecciones de sustancias previamente reportadas como algogenas provocaban movimientos estereotipados que consistían en la acción de levantar una de las patas delanteras hacia el cachete (en donde se administró la sustancia) y moverla hacia delante en dirección caudal a rostral de forma breve, esta conducta se denominó *wiping*, por asemejarse a la acción de dicho verbo en inglés. Mientras que, una sustancia pruritígena ocasionaba los movimientos estereotipados de levantar una de las patas traseras hacia la parte del cachete y realizar movimientos hacia delante y atrás, que, finalizaban cuando el ratón se llevaba dicha pata hacia la boca o al suelo; denominada *scratching*. Finalmente, se hizo la distinción de una tercera conducta, *grooming*, que consiste en ser repetitiva, iniciar desde la parte de las orejas y requerir, en la mayoría de las veces, ambas patas delanteras (2008). Este modelo, surgió ante la necesidad de distinguir las respuestas asociadas a la comezón de las dolorosas (LaMotte *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2014). Y, a partir de este, se han encontrado nuevas sustancias pruritígenas (Voisin *et al.*, 2021) y se han corroborado las conductas estereotipadas de *wiping* y *scratching* con diferentes sustancias algogenas y pruritígenas (Akiyama *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2011; Lipshetz *et al.*, 2018).

Por ello, aplicar este modelo experimental funciona para conocer, al mismo tiempo, la percepción nociceptiva, tanto en la modalidad de dolor como la de comezón, en ratones transgénicos de la línea 129Sv^{Ebf2-TauGFP}. Basado en los antecedentes previamente establecidos; se sabe sobre la expresión de Ebf2 en componentes del sistema nociceptivo trigeminal. Sin embargo, se desconoce si, la pérdida parcial o total de Ebf2 tiene efectos o alteraciones en la percepción nociceptiva. Además, el uso del LPS como una de las sustancias experimentales; permite esclarecer si, el mismo, tiene un efecto algogeno o pruritígeno dentro de nuestro modelo experimental, tanto por parte de la cepa de ratones utilizada, así como la localización de la inyección y las veces que fue administrado.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, se han realizado esfuerzos para entender los mecanismos implicados en la percepción nociceptiva. En el modelo de inyección en cachete de ratones se ha utilizado la histamina como sustancia inductora de conductas de comezón. Sin embargo, no hay reportes identificados a la fecha que utilicen el LPS como una sustancia experimental para dicho modelo.

El LPS al ser un ligando para TLR4 y TRPs puede provocar, dependiendo del contexto celular y neuronal, inflamación, dolor y/o comezón. Utilizar el LPS en el modelo de inyección en cachete pudiera contribuir a tener un mejor entendimiento sobre cómo es el *crosstalk* neuroinmune, en un contexto en el que se induce una activación del sistema inmune y no con un componente producido por la activación de este como lo es histamina.

Además, basados en los estudios anteriores se sospechaba de la participación del factor de transcripción Ebf2 en la nocicepción. Sin embargo, no se conoce de qué manera contribuye en dicho proceso. Estudiar Ebf2 con los ratones *knockout* puede contribuir a dilucidar cómo es que este factor de transcripción desempeña un papel en el procesamiento de estímulos nocivos. Y encontrar un nuevo blanco terapéutico para enfermedades relacionadas al dolor y/o comezón, inducidas por inflamación.

HIPÓTESIS

Los ratones *knockout* para Ebf2 presentarán diferencias con respecto a los heterocigotos y silvestres en la percepción de dolor y/o comezón.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo General

Determinar cuáles son los cambios en la percepción nociceptiva entre los ratones silvestres, heterocigotos y *knockout* de la línea Ebf2-TauGFP inyectados con lipopolisacárido.

Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión de Ebf2 en el ganglio trigeminal de ratones adultos con los genotipos heterocigoto y *knockout* de la línea Ebf2-TauGFP.
2. Comparar la percepción nociceptiva entre los ratones con los genotipos silvestre, heterocigoto y *knockout* de la línea Ebf2-TauGFP en el modelo de inyección en cachete utilizando lipopolisacárido.
3. Comparar el patrón de inflamación local inducido por lipopolisacárido en ratones con los genotipos silvestre y *knockout* de la línea Ebf2-TauGFP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratones

Se utilizaron un total de 18 ratones macho y hembras de 8-14 semanas de edad de la línea 129Sv^{Ebf2-TauGFP}, con los genotipos homocigotos nulos o *knockout* (KO), *Ebf2*^{-/-}, heterocigotos (HET), *Ebf2*^{+/-}. Estos ratones fueron alojados en la Universidad de Monterrey, se mantuvieron en jaulas de polisulfonato ámbar transparente con rejillas, con una cama de aserrín y acceso a agua potable estéril (por autoclave) y alimento ad libitum, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura ambiental de 21-25°C con humedad relativa entre 40-60%, el espacio en el que se encontraron (Edificio 3, salón 3412, de la Universidad de Monterrey) posee: sistema de ventilación, sistema de extracción y filtrado del aire y el sistema de luz automático. Para el enriquecimiento del ambiente, se agregaron tubos de PVC y papel, para la recreación y creación de nidos de los ratóns.

Obtención de ADN y reacción en cadena polimerasa (PCR)

Para la obtención de ADN, se utilizó el kit de Purificación de ADN Wizard Genomic de Promega (Madison, WI, USA), a partir de una porción de aproximadamente 5 mm de cola de ratones de entre 12 y 14 d de nacidos, siguiendo los pasos indicados en el instructivo del kit. Una vez que se obtuvo el ADN, se revisó la concentración y su pureza con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), para determinar cuántos μl se utilizarían para la PCR, utilizando un volumen entre los 1 a 2 μl (La concentración del DNA debe de estar entre 50 a 100 ng/ μl). El siguiente paso, fue la realización de la reacción en cadena polimerasa, se utilizó el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega), que contiene la enzima Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl_2 y buffers de reacción y se siguieron los pasos descritos para reacciones de 25 μl de volumen. Los primers utilizados fueron sintetizados por IDT DNA Technologies. Todos los análisis de PCR se realizaron utilizando el termociclador (Eppendorf). El perfil de ciclos para la PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 s, 63°C por 15 s, 72°C por 20 s.

Electroforesis en gel

Se preparó el gel de agarosa con 150 ml de TAE 1X y 3 g de agarosa grado molecular, se mezcló y calentó en un microondas hasta que luzca transparente. Se agregó 5 µl de colorante GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium) y se vertió la mezcla en la cámara de electroforesis, previamente preparada con cepillos puestos y sellada de los extremos, se dejó a temperatura ambiente hasta que cuajó el gel. Se colocó el gel en la cámara para electroforesis y se llenó con TAE 1X, se retiraron los cepillos una vez estuvo cubierto el gel de TAE 1X. Se colocaron 5 µl de escalera en el primer pocillo y en los demás se cargaron las muestras de la PCR.

Experimento conductual

Un día previo al experimento conductual, se rasuró el pelaje en el cachete del ratón con una rasuradora. Para todos los experimentos conductuales: los ratones se colocaron de manera individual en cajas de plástico transparente, dejándolos 30 min para que se habituaran al entorno nuevo, en un ambiente libre del experimentador con la menor cantidad de ruido y a temperatura ambiente. Después del período de habituación, se procedió a iniciar la grabación, y realizar la inyección subdérmica de la sustancia experimental hacia el cachete rasurado, bajo condiciones donde el ratón estaba despierto. Para cada ratón, se siguió un esquema experimental que duraba 3 semanas, para cada semana, se inyectaba en el cachete izquierdo la sustancia control PBS 1X, y 3 d después la sustancia proinflamatoria en el cachete derecho, que dependiendo del grupo experimental al que pertenecía el sujeto era lipopolisacárido (O111:B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) disuelto en PBS 1X a una concentración de 0.2 µg/µl, o histamina (H7125; Sigma-Aldrich) disuelta en PBS a 10 µg/µl. El pH de todas las soluciones preparadas se ajustó a 7.4. Se inyectó un volumen de 20 µl de las sustancias experimentales en el cachete de los ratóns y se grabaron 40 min tras la misma. El posterior análisis de los videos conductuales se realizó por parte de M.B.D.C.V. y alumnas de licenciatura sin un conocimiento completo del diseño experimental, ni de los objetivos de este. En el análisis de los videos, se clasificaron los comportamientos en episodios (bouts) de rascado (*scratching*), frotado (*wiping*) o acicalamiento (*grooming*) según los criterios establecidos por Shimada y LaMotte (2008) y se cuantificaron los mismos en intervalos de 10 min. La conducta de *scratching* está asociada a una respuesta a una sustancia pruritógena, mientras que *wiping* se asocia a una respuesta a una sustancia algogena. A continuación, se presenta el protocolo de Score para clasificar las conductas de *scratching*, *wiping* y *grooming*.

- *Scratching*: es el movimiento en el cual el ratón toca la parte rostral con una de las patas traseras. Este es el tipo de conducta nocifensiva referente a la comezón.
 - Inicia cuando el ratón lleva una de sus patas traseras al lado unilateral de la cabeza para rascarse.
 - El episodio termina cuando el ratón aleja su pata trasera de la cabeza para llevarla al suelo o cuando la lleva al hocico para lamerla.
 - Se debe especificar el área en la cual se realizó el rascado (cachete, cuello, u otra).
 - Si en el video, la posición del ratón no permite distinguir el movimiento, se omite.
- *Wiping*: es el movimiento en el cual el ratón toca la parte rostral con una de las patas delanteras. Este es el tipo de conducta nocifensiva referente al dolor.
 - El episodio comienza solamente cuando el ratón frota con su pata delantera el cachete unilateral.
 - El episodio termina cuando aleja la pata del cachete, se la coloca en el suelo, o cuando se lame la pata.
 - Solamente se considera *wiping* cuando se soba iniciando en el cachete, NO desde la oreja.
- *Grooming*: es el movimiento en el cual el ratón lleva ambas patas delanteras al frente de su cara. Esto lo hacen los ratones para limpiarse y es el comportamiento conductual más frecuente de los ratones. Para evaluar este movimiento se debe considerar:
 - El episodio de *grooming* comienza cuando el ratón lleva por primera vez ambas patas delanteras a cualquier parte de la cabeza (incluyendo orejas, cachete y hocico).
 - Si se rasca intercaladamente (se frota con ambas patas delanteras o con una delantera) se sigue considerando como *grooming*.
 - Si se frota con una pata delantera unilateralmente desde la oreja se considera *grooming*. No *wiping*.
 - Si solamente se lame las patas y no se frota alguna parte de la cabeza, no se considera como un episodio de *grooming*.
 - El episodio finaliza cuando el ratón aleje por completo las patas de la cabeza, o cuando el ratón permanece lamiéndose las patas por un periodo prolongado y no se observe qué se frota la cabeza nuevamente*.

*Observación: si el episodio termina con el ratón lamiendo las patas, y no se vuelve a observar que se frota la cabeza, este termina cuando se realizó el último rascado.

El análisis de los videos se realiza en la aplicación llamada Kinovea. Esta aplicación permite ver el video de manera lenta, marco por marco, cámara rápida, y hacer anotaciones dentro del video para indicar en qué momento se realizó cada episodio. Se debe de visualizar el video desde que se realiza la inyección hasta que transcurren 40 min. Se realizan las anotaciones correspondientes en la aplicación en el minuto en el que suceden. Posteriormente, se contabiliza en intervalos de 10 min cada uno de los movimientos dependiendo de su duración.

Eutanasia y perfusión

Se anestesiaron a los ratones con pentobarbital con una inyección intraperitoneal. Se realizó una incisión en tórax y abdomen, se rompieron costillas y se buscó el corazón. Se colocó una cánula en el ventrículo izquierdo de forma inclinada y se sostiene en su lugar con una pinza hemostática, se cortó vena cava. Luego, se suministraron 30 ml de PBS 1X a pH 7.4 frío para iniciar con la perfusión. Después 50 ml de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% en PBS 1X (PFA), frío y posteriormente, 30 ml de PBS 1X fresco.

Microcirugía para obtener cerebro, espinas, ganglios trigeminales y músculo masetero

Una vez que se finalizó la perfusión de los animales, se limpiaron las cavidades abdominal y torácica y se cortaron las extremidades. Se removió la piel y se separó la cabeza y espina en un corte longitudinal con hoja de bisturí, cerca del inicio de la porción cervical de la columna vertebral para la conservación de las espinas cervicales. Se diseccionó el cráneo y vértebras para quitar músculo, ligamentos y huesos. Se preservó la espina, cerebro, ganglios trigeminales, piel de cachetes y músculos maseteros en PFA por una noche a 4°C y se hizo su pase a sacarosa al 20% en PBS 1X al día siguiente, con excepción de la piel y músculos maseteros.

Histología

La piel de cachetes y músculos maseteros se colocan en cassettes de inclusión y se colocan en un histoquinete que tiene el siguiente programa y tren: 1. Formol al 10% por tiempo indeterminado. 2. Alcohol etílico al 80% 1 h. 3. Alcohol etílico al 80% 1 h. 4. Alcohol etílico al 96% 1 h. 5. Alcohol etílico al 96% 1 h. 6. Alcohol etílico al 96% 1 h. 7. Alcohol etílico al 96% 1 h. 8. Alcohol

isopropílico 10 min. 9. Xilol 1 h. 10. Xilol 1 h. 11. Parafina 1 h. 12. Parafina 1 h. Luego, las muestras del cassette que se encuentran pre-parafinadas se preparan en un bloque de parafina y se colocan en microtomo para su corte y extensión en baño maría. Para la tinción de hematoxilina y eosina se sigue el siguiente orden en un tren de tinciones, en donde las muestras para la tinción se les hacen 10 inmersiones por cada elemento del tren, a menos de que se indique lo contrario. 1. Xilol. 2. Xilol. 3. Alcohol etílico al 80%. 4. Alcohol etílico al 70%. 5. Alcohol etílico al 50%. 6. Agua destilada. 7. Hematoxilina por 4 min. 8. Agua corriente. 9. Agua acidulada 1 inmersión. 10. Agua corriente. 11. Agua amoniacal. 12. Agua corriente. 13. Eosina por 20 s. 14. Alcohol etílico al 96%. 15. Alcohol etílico al 96%. 16. Alcohol etílico al 96% 17. Alcohol isopropílico. 18. Alcohol isopropílico. 19. Alcohol isopropílico. 20. Xilol. 21. Xilol. 22. Montar con resina EntellanTM.

Criosección

Esta técnica se utilizó para realizar cortes histológicos finos con un espesor de 20 µm, se utilizó el criostato de Leica CM1860 UV, se preparó el tejido con medio de congelación (Leica) para su montaje en el microtomo dentro del criostato. Se desbastó el bloque hasta que se llegó a la porción del tejido del que se quiso obtener las secciones. Se utilizaron portaobjetos APEX SAS® (Leica), y los cortes se almacenaron a -80 °C para su preservación.

Inmunofluorescencia secundaria

Las laminillas con criosecciones se secaron en incubadora a 37°C por 30 min, se rehidrataron los cortes y se realizaron 4 lavados con PBS-Tween-Gly con un volumen de 500 µl por laminilla y 5 min entre cada lavado, en cámara húmeda. Se preparó la solución de bloqueo y se dejó sobre las laminillas por una hora en cámara húmeda. Después, se preparó la solución de anticuerpos primarios, misma que se colocó sobre las laminillas, cada una de estas se cubrió con Parafilm® y se dejó incubar en cuarto frío a 4°C por una noche o fin de semana. Una vez que transcurrió el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween con un volumen de 500 µl por laminilla y 5 min entre cada lavado. Se preparó la solución de anticuerpos secundarios, se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 2 h. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween con un volumen de 500 µl por laminilla y 5 min entre cada lavado, y 2 lavados con PBS con un volumen de 500 µl por laminilla y 5 min entre cada lavado. Se secaron las laminillas por los extremos y por su parte de

abajo (blotting), quitando el exceso de PBS y se colocaron en cámara seca: se realizó el montaje con 3 gotas del medio de montaje Fluro-Gel II® con DAPI (Electron Microscopy Sciences), se esparció sobre toda la laminilla y se cubrió con un cubreobjetos. Se dejó secando las laminillas hasta que se endureció el medio de montaje, aproximadamente 1 h en cámara seca y sin que incida la luz sobre las muestras. Anticuerpos primarios: Chicken Anti-GFP (600-901-B12, Rockland Immunochemicals), Goat anti-CGRP (ab36001, Abcam), Guinea Pig anti-Substance P (ab106291, Abcam), Rabbit anti-GRP (20072, Immunostar). Anticuerpos secundarios de Jackson ImmunoResearch: Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L) (703-546-155). Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (711-606-152). Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Goat IgG (H+L) (705-606-147). Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L) (706-606-148).

Microscopia de fluorescencia

La adquisición de imágenes de los tejidos se realizó utilizando el microscopio Zeiss Axio Imager 2, en conjunto con el Software Zen PRO 3.1, con el cual se pueden hacer uso de diferentes canales para ver la expresión de múltiples marcadores en la misma ronda de adquisición.

Patrones de expresión génica en ganglio trigeminal de ratones adultos

Con la herramienta en línea, Trigeminal Ganglion Cell Atlas proporcionada por el laboratorio Renthal (L. Yang *et al.*, 2022) y que se accede con el dominio <https://painseq.shinyapps.io/tg-painseq/> se generaron mapas de calor con la base de datos Mouse ATAC-seq, que fue realizada con información de ganglios trigeminales de ratones de 8 a 12 semanas, machos y hembras de la cepa C57BL/6J. En el apartado de Gene expression bubbleplot/heatmap se enlistan los nombres de los genes de interés que corresponden con *Ebf2*, *Tac1*, *Tacr1*, *Calca*, *Ramp1*, *Calcr1*, *Grpr*, *Zbtb20*, *Trpa1*, *Trpv1*, *Trpm8*, *Tlr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr7* y *Tlr8*. En el mapa de calor, la expresión normalizada se promedia, después de transforma logarítmicamente y se grafica. Los datos se agruparon por “predicted.id” y se generaron las **Figuras 8 y 9** de la sección resultados.

Análisis Estadístico

Las gráficas cuantitativas se generaron con el programa GraphPad Prism, los valores presentados corresponden a la media \pm error estándar (Media \pm ES). Utilizando el análisis ANOVA de una sola vía junto con las pruebas Dunnett y/o Tukey, considerando estadísticamente significativos aquellos valores de p menores a 0.05.

RESULTADOS

1. Ebf2 se expresa en el ganglio trigeminal de ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP

Trabajos previos en el laboratorio se habían enfocado en analizar la expresión de Ebf2 en núcleos localizados dentro del cerebro y la espina. Por ello se comenzó por identificar la expresión de Ebf2 en el ganglio trigeminal de ratones transgénicos adultos de la línea Ebf2-TauGFP, a modo de conocer si dicho factor de transcripción también forma parte del conjunto de células localizadas en esta estructura; encargada de transmitir información somatosensorial del rostro (periférica) hacia las estructuras superiores descritas en antecedentes.

En la **Figura 5**, se presentan imágenes representativas de inmunofluorescencias secundarias realizadas en criosecciones de ganglios trigeminales de ratones heterocigotos y *knockout* de la línea 129Sv^{Ebf2-TauGFP}. Para la **Figura 5 A-F**, el canal en azul, corresponde a DAPI, que tiñe los núcleos de las células. Mientras que los canales en rojo corresponden con una tinción para el neurotransmisor de interés y el verde es para Ebf2-TauGFP. En **Figura 5 A y B**, se ve un patrón de células que expresan Ebf2 cercanas a las neuronas que expresan el neurotransmisor CGRP.

En la **Figura 5 C** se observa la co-expresión de Ebf2 y SP en una subpoblación de neuronas que expresan dicho neurotransmisor (neuronas amarillas; que resulta por la coincidencia de las señales rojas y verdes), que corresponde a ganglios trigeminales de ratones heterocigotos. Sin embargo, en la **Figura 5 D**, se pierde la subpoblación de células que co-expresan Ebf2 y SP, que corresponde con imágenes representativas de ganglios trigeminales de ratones *knockout*. Finalmente, en **Figura 5 E y F** para el péptido liberador de gastrina: se encuentra una subpoblación que co-expresa Ebf2 y GRP en ratones heterocigotos, y la misma se pierde en ratones *knockout*, similar a lo descrito para **Figura 5 C y D**.

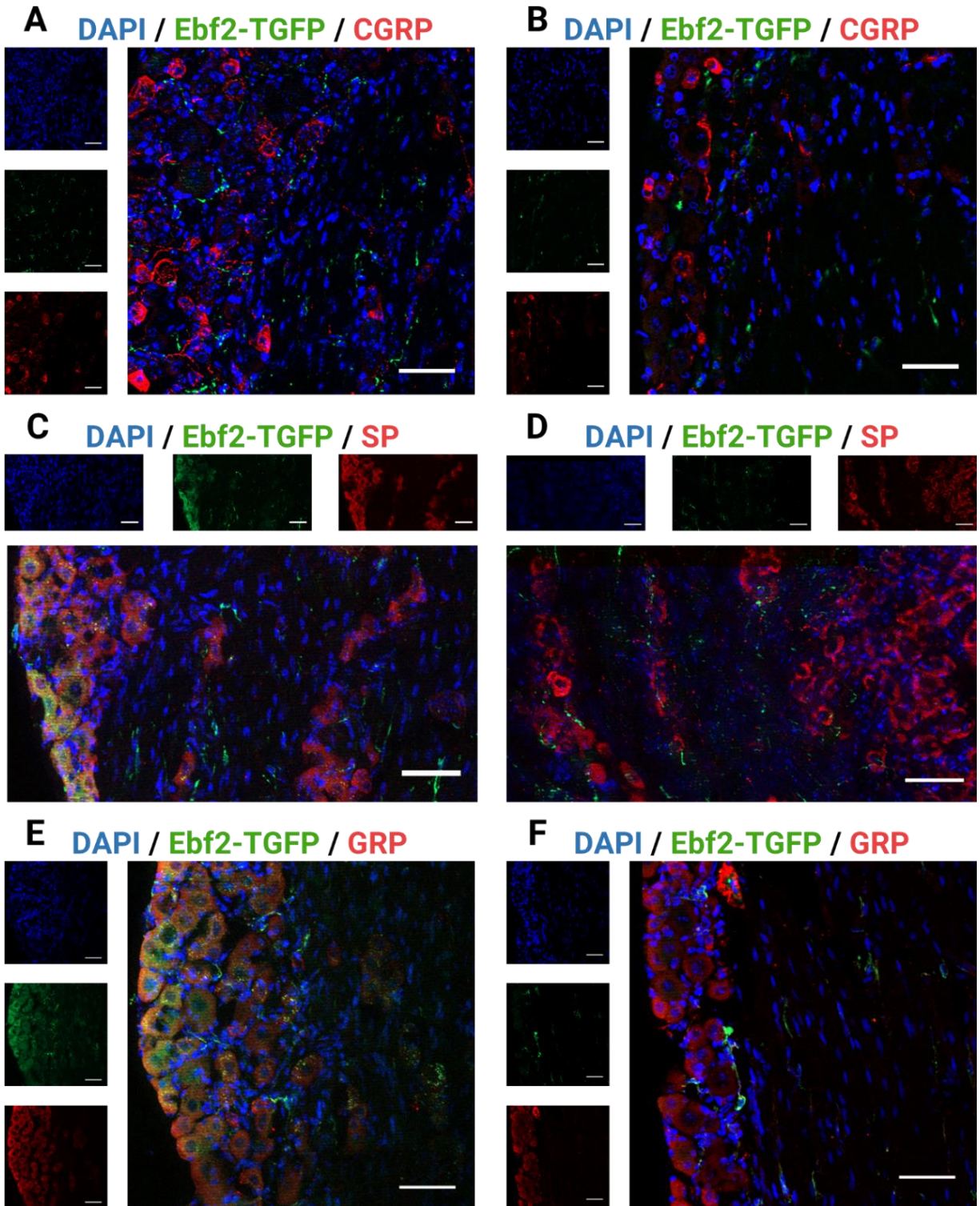


Figura 5. Microscopía de fluorescencia de ganglios trigeminales de ratones de la línea Ebf2-TauGFP.

Imágenes representativas de ganglios trigeminales (TG) de ratones heterocigotos **A, C, E** (n=3) y *knockout* **B, D, F** (n=3) para Ebf2-TauGFP, el canal en azul, DAPI, el canal en verde, Ebf2-TauGFP y el canal en rojo corresponde con neurotransmisores asociados a una de las modalidades nociceptivas. Péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) **A, B**, asociado a dolor crónico. Sustancia P (SP) **C, D**, asociado con la modalidad de dolor quemante y el Péptido liberador de Gastrina (GRP) **E, F**, asociado con la transmisión de comezón. Escala 100 μ m.

En las **Figuras 6 y 7**, se presentan imágenes representativas de ganglios trigeminales de ratones heterocigotos y *knockout*, respectivamente con la triple tinción para DAPI, en azul, Ebf2-TauGFP en verde y Sustancia P en rojo. En la **Figura 6**, la co-expresión de sustancia P y Ebf2 ocurre en neuronas en la porción superior de las imágenes. También se observa la expresión de Ebf2-TauGFP en la porción inferior, en axones o fibras finas. En la **Figura 7**, no se identifica la co-expresión de Sustancia P y Ebf2 para ratones *knockout*, sin embargo se observa la expresión de Tau-GFP en células cercanas a las que expresan SP.

DAPI / Ebf2-TGFP / SP

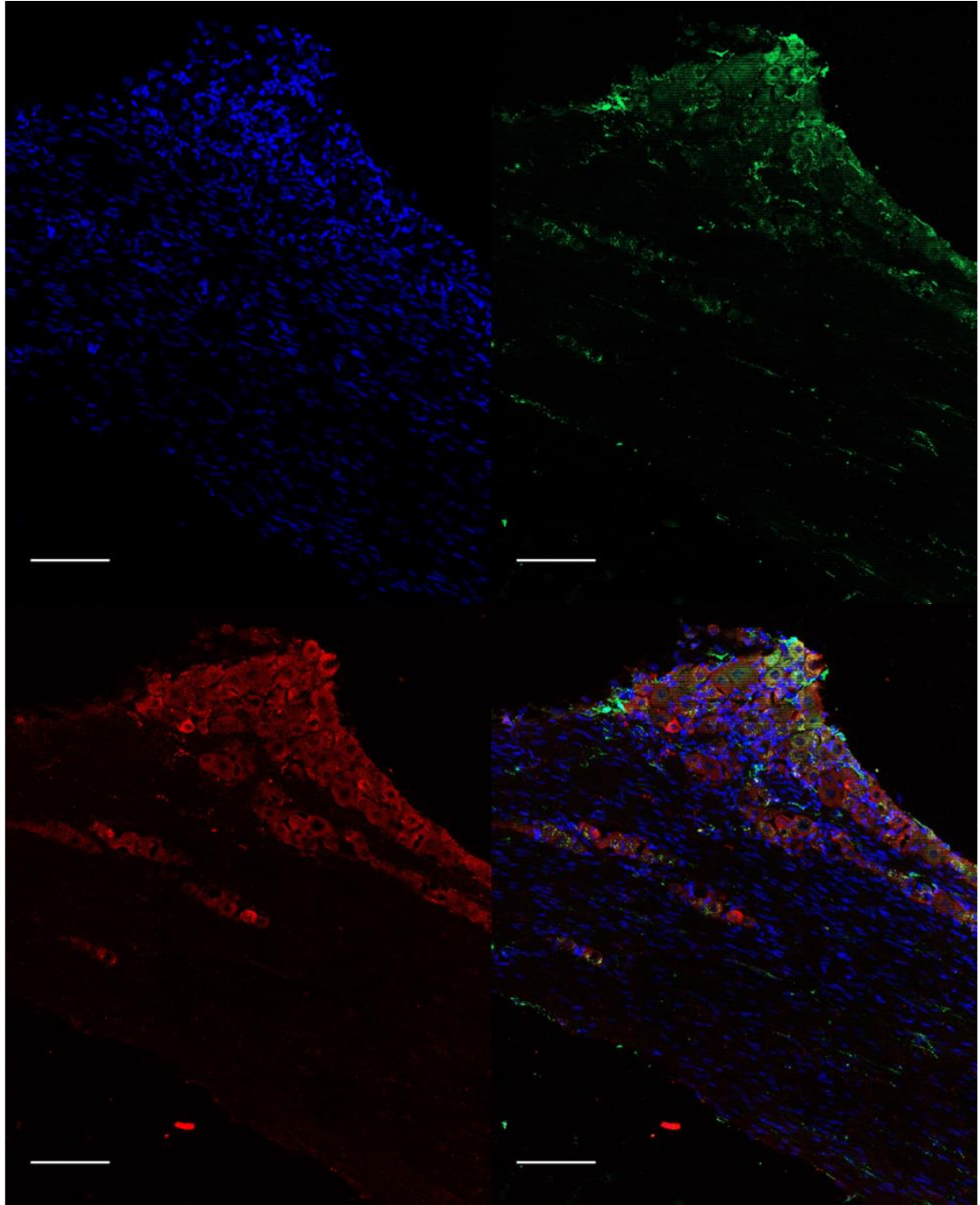


Figura 6. Microscopía de fluorescencia de ganglio trigeminal de ratones heterocigotos de la línea Ebf2-TauGFP. Imagen representativa de ganglios trigeminales (TG) de ratones heterocigotos (n=3) para Ebf2-TauGFP, el canal en azul, DAPI, el canal en verde, Ebf2-TauGFP y el canal en rojo, Sustancia P (SP). Escala 100 μ m.

DAPI / Ebf2-TGFP / SP

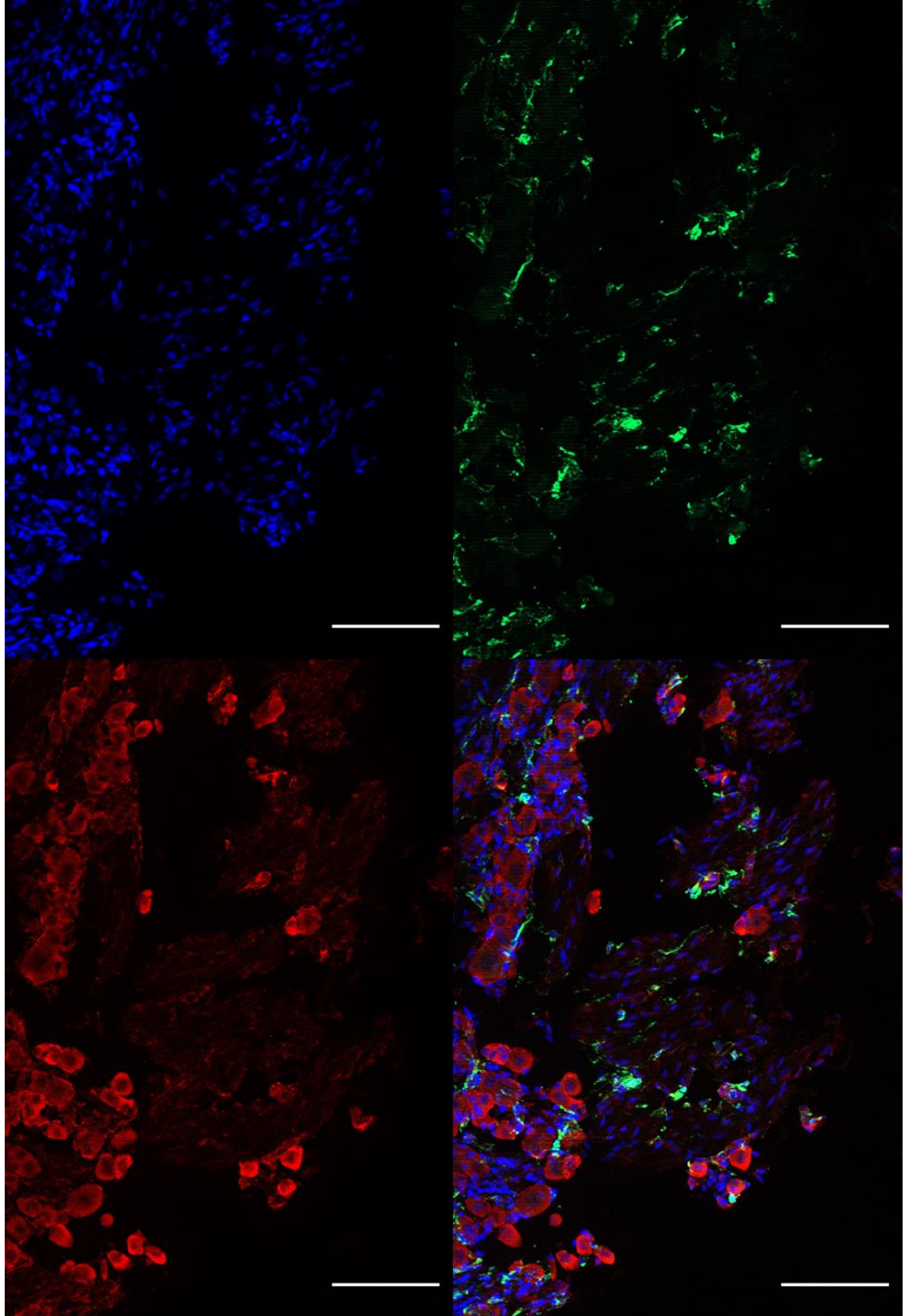


Figura 7. Microscopía de fluorescencia de ganglio trigeminal de ratones *knockout* de la línea Ebf2-TauGFP. Imagen representativa de ganglios trigeminales (TG) de ratones *knockout* (n=3) para Ebf2-TauGFP, el canal en azul, DAPI, el canal en verde, Ebf2-TauGFP y el canal en rojo, Sustancia P (SP). Escala 100 μ m.

2. Patrones de expresión de Ebf2 y genes relacionados con la nocicepción en el ganglio trigeminal de ratones C57BL/6J

A modo de identificar las posibles subpoblaciones neuronales o celulares que expresan Ebf2 en el ganglio trigeminal de ratones adultos, se obtuvieron mapas de calor con la herramienta del Trigeminal Ganglion Cell Atlas. Por ello, en la **Figura 8**, se presentan los patrones de expresión de Ebf2 y los genes precursores para los neurotransmisores de interés tales como: el péptido liberador de gastrina y Sustancia P (con excepción de GRP, pues el atlas no mostró resultados del gen Grp), así como también sus receptores. La co-expresión al alta (coloración naranja) de Ebf2 y Tac1 en el subtipo neuronal PEP2, nociceptores peptidérgicos, coinciden con **Figuras 5 C y 6**, ya que Tac1 es el gen que codifica para las preprotaquicinas, proteínas precursoras para Sustancia P. También, Ebf2 se expresa (en rojo) en un tipo de célula clasificada como NF1, que corresponde a neuronas mecanorreceptoras de bajo umbral (LTMR), un grupo heterogéneo de neuronas sensoriales primarias que funcionan para sentir fuerzas mecánicas externas (Olson *et al.*, 2016). Y gracias a ello, transmiten información mecanosensorial —relacionada al tacto— a estructuras superiores en el sistema nervioso central. En el subtipo celular NF1, Ebf2 se expresa al alta junto con los genes para los receptores de los neurotransmisores nociceptivos (Donde Tacr1 tiene de ligando Sustancia P, Calcr1 y Ramp1: CGRP, y Grpr: GRP).

Además, en la **Figura 9.**, se muestra otro mapa de calor generado con la misma herramienta mencionada anteriormente, se observan los patrones de expresión de Ebf2, el factor de transcripción Zbtb20, los genes para 3 de los TRPs más conocidos: Trpa1, Trpv1 y Trpm8, y para los Tlrs, incluyendo el específico para LPS, Tlr4. Los niveles de expresión más altos se encuentran en las células NF1 para los factores de transcripción Ebf2 y Zbtb20 (en rojo) y para los canales iónicos TRP y TLR4. Asimismo, para las células subtipo PEP1 presentan expresión al alta de Ebf2, junto con Tlr4.

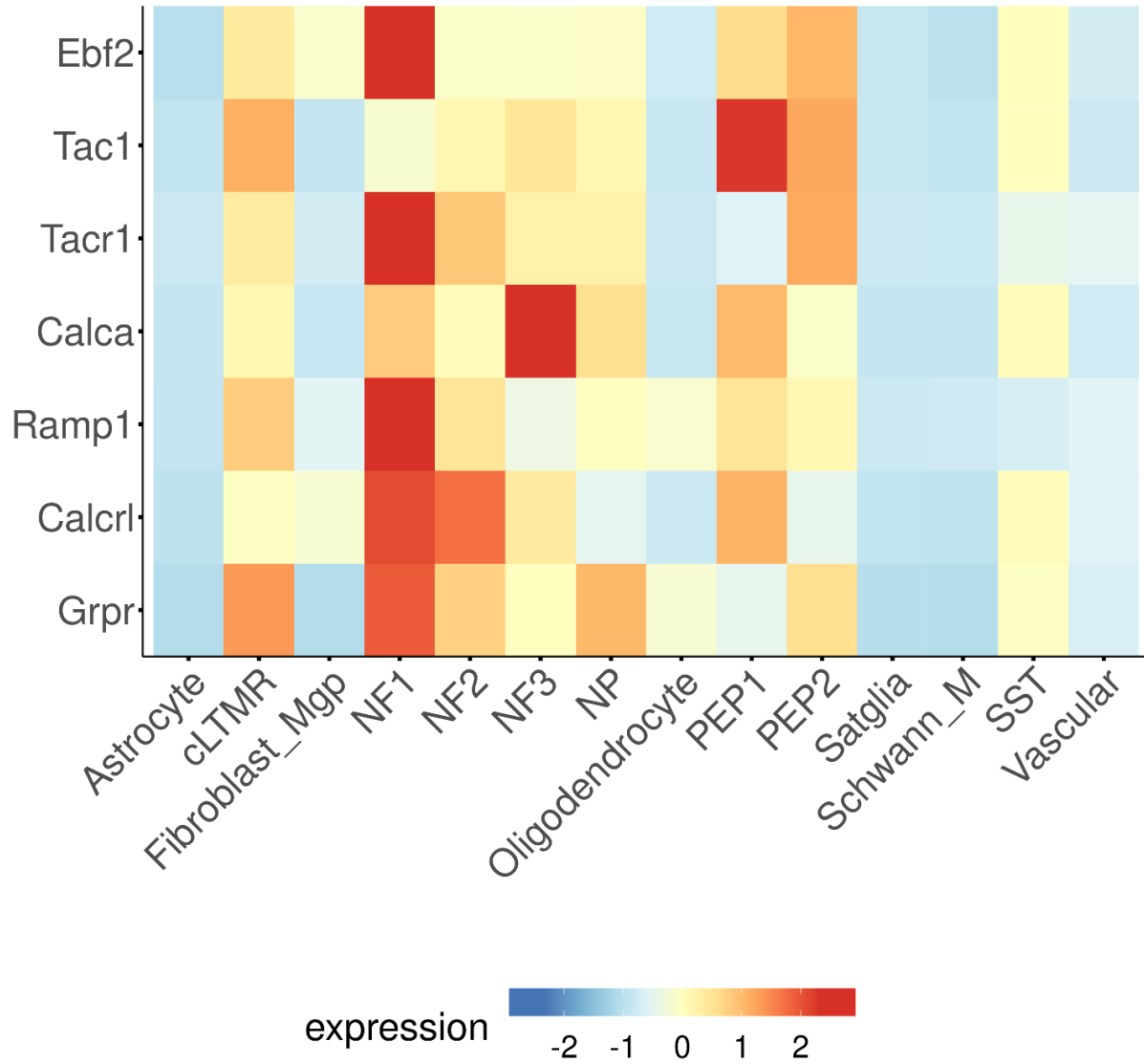


Figura 8. Patrones de expresión génica de genes relacionados a la nocicepción en ganglios trigeminales de ratones C57BL/6J.

La expresión normalizada se promedió, se transformó logarítmicamente y se graficó.

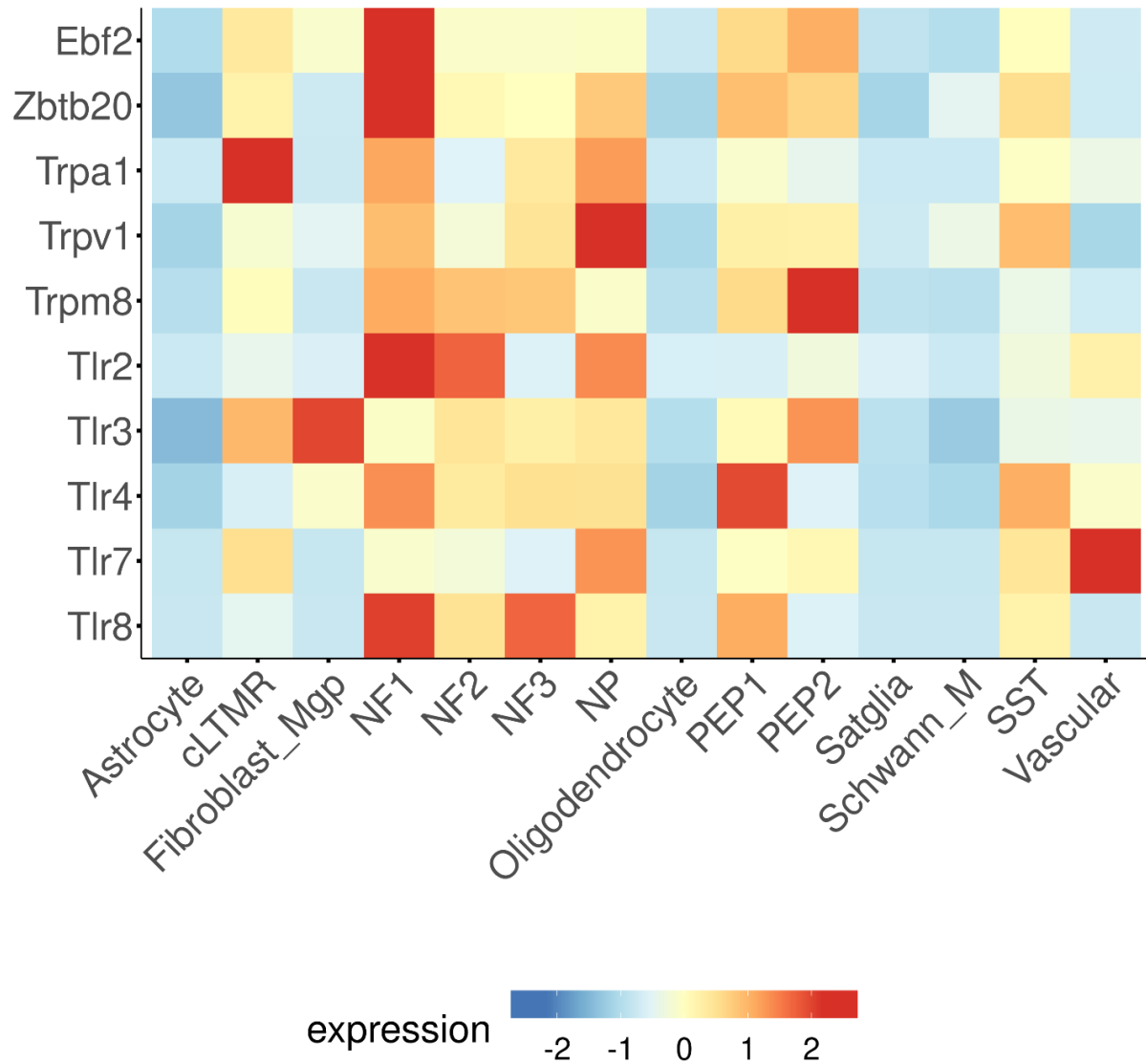


Figura 9. Patrones de expresión génica de genes relacionados a los canales TRP en ganglios trigeminales de ratones C57BL/6J.

La expresión normalizada se promedió, se transformó logarítmicamente y se graficó.

3. La inserción de la aguja en el modelo de inyección en cachete presenta su efecto nocifensivo durante los primeros 10 minutos

Una vez que se determinaron los patrones de expresión de *Ebf2* y genes relacionados con la nocicepción en el ganglio trigeminal de ratones C57BL/6J, se continuó con la experimentación conductual, realizando experimentos con el modelo de estudio para mediciones simultáneas de dolor y comezón, que es el modelo de inyección en cachete, a modo de conocer sobre la percepción nociceptiva en ratones 129Sv^{Ebf2-TauGFP}. Dado que se desconocía la duración que pudiera tener el efecto de la inserción de la aguja (que suele ser interpretada como un estímulo doloroso) durante el experimento conductual; y que la misma acción de introducirla, pudiera influir en los resultados sobre los comportamientos nocifensivos, se hizo un análisis como se muestra en la **Figura 10**. Se cuantificaron los episodios (bouts) de las respuestas nocifensivas de los ratones silvestres durante los experimentos en los que se inyectó la sustancia control PBS. En el eje Y se encuentra la frecuencia promedio (media) de los episodios de *wiping* (**Figura 10 A**) o *scratching* (**Figura 10 B**), y en el eje X, intervalos de 10 min. Así, la información de esta figura representa el estándar de la cepa 129Sv^{Ebf2-TauGFP}.

En la **Figura 10 A**, observamos diferencias altamente significativas entre las medias de los episodios de *wiping* del intervalo de 10 min versus los demás. Lo cual demuestra que el efecto de la inserción de la aguja en el cachete del sujeto ocurre dentro de los primeros 10 min. En cambio, en los últimos 30 min las conductas observadas podrían ser atribuidas al efecto que tiene la sustancia administrada. Y en este caso, no es perceptible ya que el PBS es una solución inocua que no tiene efectos alérgicos ni pruritógenos y ha sido previamente utilizada como sustancia vehículo y control en otro trabajo (Voisin *et al.*, 2021). En la **Figura 10 B**, no se observan diferencias significativas entre las medias de los episodios de *scratching* del intervalo de 10 min versus los demás intervalos, es posible que la falta de diferencias significativas entre las medias sea por la variabilidad encontrada 10 min después de la inserción de la aguja.

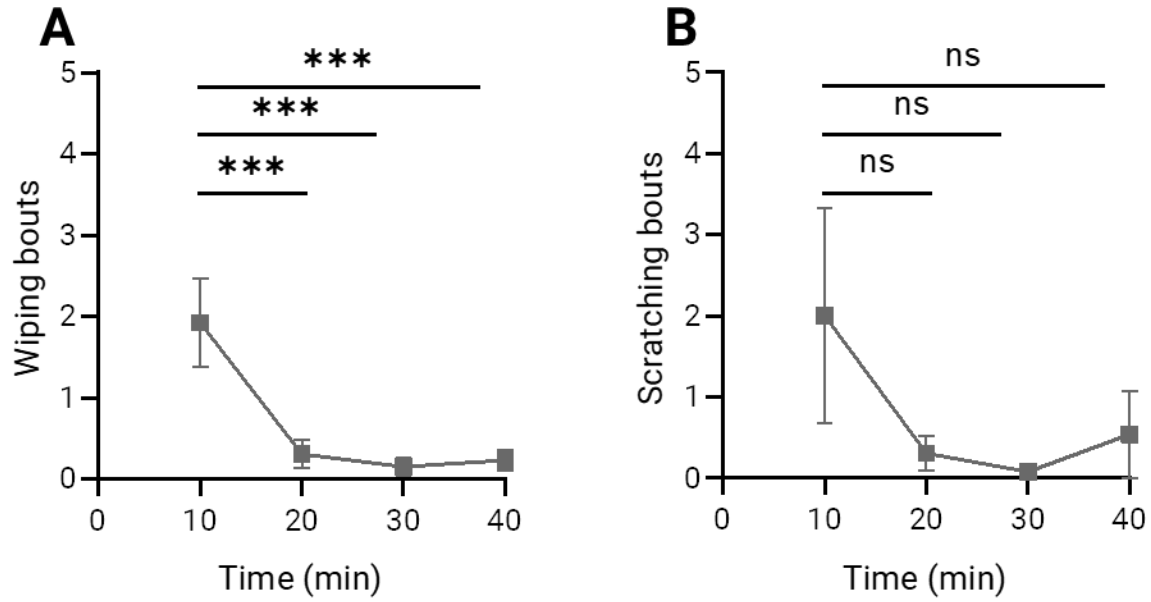


Figura 10. Comportamientos nocifensivos en ratones WT con la inyección de PBS.

Promedio de los episodios de *wiping* **A** (conducta asociada a dolor) y *scratching* **B** (conducta asociada a comezón) en intervalos de 10 min tras la inyección de PBS (n=5). Datos agrupados de varias repeticiones de experimentos. Valores presentados como Media ± ES. Análisis estadístico ANOVA de una sola vía, con prueba de Dunnett e intervalo de confianza del 95%, ns (no significativo), * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).

4. Los ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP presentan comportamientos de *grooming* similares a los silvestres

Ya que los ratones *knockout* para Ebf2 presentan aspectos de narcolepsia (De La Herrán-Arita *et al.*, 2011), se analizó la conducta de *grooming* en los ratones de la cepa 129Sv^{Ebf2-TauGFP} con las diferentes sustancias PBS, LPS e HIS, para determinar si los ratones transgénicos son aptos para este modelo experimental. En la **Figura 11**, se presenta la cuantificación de los episodios de *grooming* durante los últimos 30 min, es decir que, corresponden con el efecto de la sustancia. Dicha cuantificación se realizó 10 min posteriores a la inyección de la sustancia correspondiente, dado que en la **Figura 10** se determinó que en los primeros 10 min: las conductas se asociaban con el efecto inducido por la inserción de la aguja y los siguientes 30 min por la sustancia.

Se observa que, la conducta de *grooming* se encuentra presente en los ratones silvestres, así como también en los ratones transgénicos (HET y KO). Asimismo, los ratones transgénicos no presentan una conducta de *grooming* exacerbada ni disminuida, validando este diseño experimental para comparar comportamientos nocifensivos entre los 3 genotipos de los ratones y las 3 sustancias administradas. En la **Figura 11 A**, hay diferencias estadísticamente significativas entre los ratones silvestres y los transgénicos. Sin embargo, no hay estas diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos para los tratamientos de lipopolisacárido e histamina (**Figura 11 B y C**). Esto, se pudiera atribuir a la variabilidad que los animales introducen al experimento debido a su propia naturaleza, o bien, que los animales transgénicos en condiciones inocuas, tratamiento PBS, tiendan a moverse menos que los silvestres, pero en condiciones de un estímulo nocivo como LPS o HIS tiendan a tener actividad por la administración de estas.

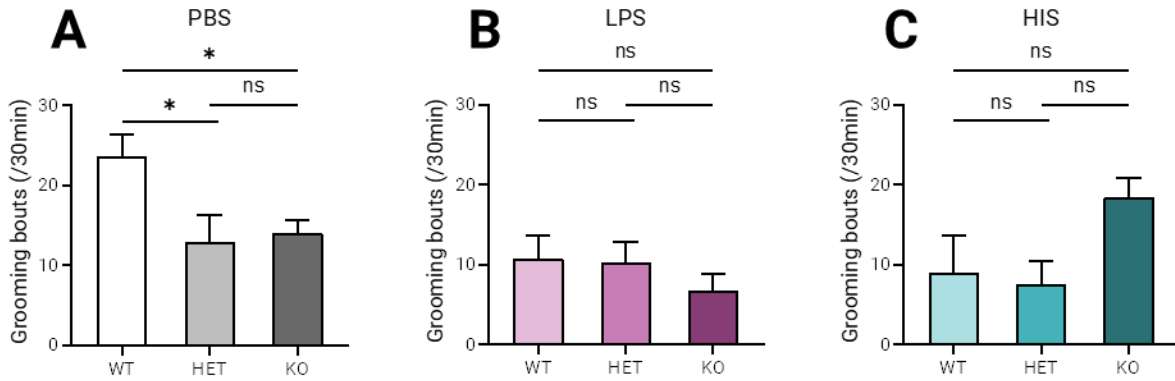


Figura 11. Efectos en la conducta de *grooming* con dos sustancias proinflamatorias.

Cuantificación de los episodios de *grooming* en ratones WT, HET y KO durante el periodo de 30 min que representa el efecto de la sustancia PBS **A** (n= 5, 4, 5), lipopolisacárido **B** (n= 3, 2, 3) e histamina **C** (n= 2, 2, 2). Datos agrupados de varias repeticiones de experimentos. Valores presentados como Media \pm ES. Análisis estadístico ANOVA de una sola vía, prueba Tukey e intervalo de confianza del 95%, ns (no significativo), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

5. Los ratones KO presentan una discriminación anormal de estímulos nocivos

A modo de estudiar el efecto de dos sustancias proinflamatorias, y conocer si hay diferencias entre las conductas nocifensivas de los ratones silvestres y los transgénicos, se presenta en las **Figuras 12 y 13**, la cuantificación de los episodios de *wiping* (conductas asociadas a dolor) y *scratching* (conductas asociadas a comezón), respectivamente. En las gráficas de estas figuras, hay dos barras para cada genotipo, la de color claro es la cuantificación de episodios en el cachete donde no se realizó la inyección (con signo de -), y la de color oscuro, el sitio donde se realizó la inyección (con signo de +).

Para PBS (**Figuras 12 A y 13 A**), que es una solución inerte e inocua que simula ser el líquido extracelular, se observa que para los tres genotipos de ratones son pocos los episodios de *wiping* y de *scratching*, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Mientras que, para el LPS, reportado como un inductor de dolor *in vitro* (Boonen *et al.*, 2018; Diogenes *et al.*, 2011; Meseguer *et al.*, 2014) coincide para el caso de ratones silvestres, que se frota (*wiping*) el lado donde se realizó la inyección de esta sustancia (**Figura 12 B**). Los ratones transgénicos tienen la tendencia en que se redujeron los episodios de *wiping* y se frota el cachete donde no hubo inyección (**Figura 12 B**), sugiriendo que no distinguen la localización espacial proveniente del estímulo. Además, los KO se rascan en mayor medida que los WT, insinuando que no interpretan la modalidad nociceptiva de manera correcta (**Figura 13 B**). A pesar de que se ven tendencias en que los ratones KO tienen anomalías en la percepción nociceptiva (dolor y comezón), de forma estadística se indica que no hay diferencias significativas, esto se puede atribuir al número de sujetos que se han procesado hasta el momento de la redacción de esta tesis.

Por otro lado, con la sustancia experimental histamina, la cual está reportada como un inductor de comezón (Voisin *et al.*, 2021; Yamanoi *et al.*, 2019), los ratones KO se frota (episodios de *wiping*) más que los ratones silvestres (**Figura 12 C**) y se rascan en menor medida que estos de forma estadísticamente significativa (**Figura 13 C**). Tomando todo en cuenta, se observa una tendencia que, cuando los ratones transgénicos se equivocan de modalidad nociceptiva, aciertan correctamente el lado en donde se realizó la inyección.

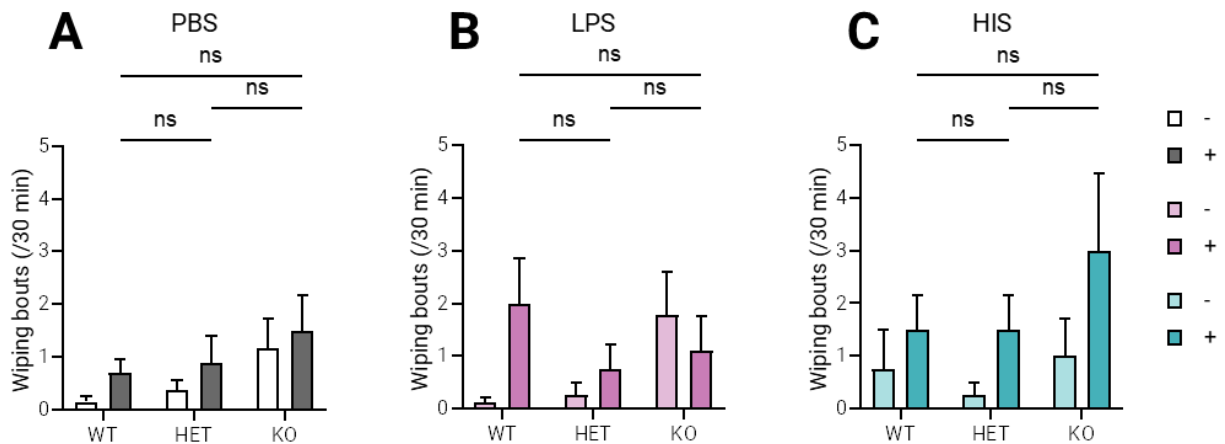


Figura 12. Percepción nociceptiva (modalidad de dolor) con dos sustancias proinflamatorias en ratones silvestres y transgénicos.

Cuantificación de los episodios de *wiping* en ratones WT, HET y KO durante el periodo de 30 min que representa el efecto de la sustancia PBS **A** (n= 5, 4, 5), lipopolisacárido **B** (n= 3, 2, 3) e histamina **C** (n= 2, 2, 2). El signo de + corresponde con el sitio donde si se realizó la inyección y - corresponde con el sitio en donde no fue realizada la inyección de la sustancia indicada. Datos agrupados de varias repeticiones de experimentos Los puntos abiertos son valores extremos que se salen de la distribución de los datos. Valores presentados como Media \pm ES. Analisis estadístico ANOVA de dos vías, con prueba Tukey e intervalo de confianza del 95%, ns (no significativo), * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).

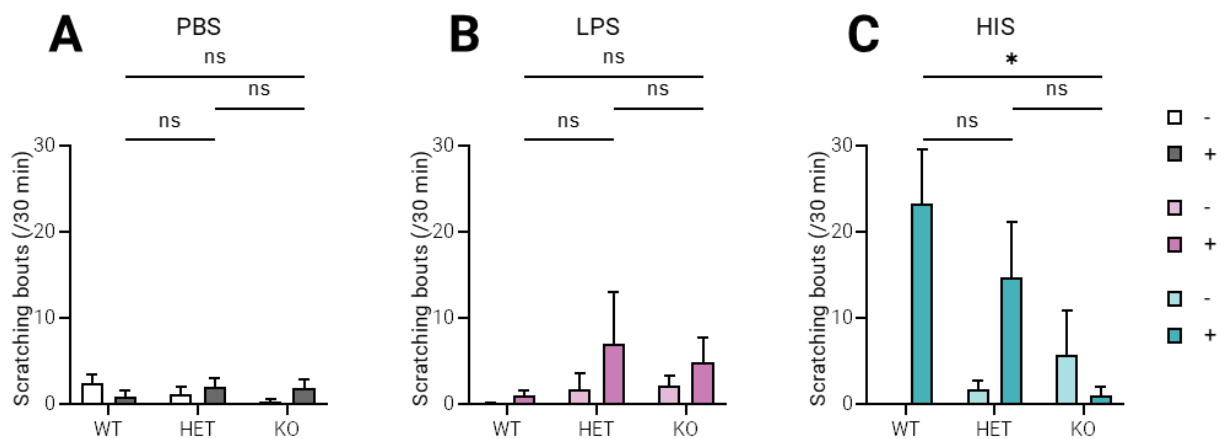


Figura 13. Percepción nociceptiva (modalidad de comezón) con dos sustancias proinflamatorias en ratones silvestres y transgénicos.

Cuantificación de los episodios de *scratching* en ratones WT, HET y KO durante el periodo de 30 min que representa el efecto de la sustancia PBS **A** (n= 5, 4, 5), lipopolisacárido **B** (n= 3, 2, 3) e histamina **C** (n= 2, 2, 2). El signo de + corresponde con el sitio donde si se realizó la inyección y - corresponde con el sitio en donde no fue realizada la inyección de la sustancia indicada. Datos agrupados de varias repeticiones de experimentos Los puntos abiertos son valores extremos que se salen de la distribución de los datos. Valores presentados como Media \pm ES. Analisis estadístico ANOVA de dos vías, con prueba Tukey e intervalo de confianza del 95%, ns (no significativo), * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).

6. Aumento de las conductas de *wiping* con el tratamiento de LPS en ratones silvestres y *knockout*

En la **Figura 14**, se muestran las conductas nocifensivas en ratones WT y KO durante las 3 semanas del tratamiento de lipopolisacárido, en donde tras cada semana se volvía a inyectar la sustancia proinflamatoria. Se ve en la barra **e**, que para la última semana (Week 3) hay un aumento en la conducta nocifensiva asociada a dolor de manera ipsilateral para los ratones silvestres. En la barra **f**, hay un aumento en la última semana para ratones *knockout*, que ocurre de igual manera en el lado contralateral al tratamiento de lipopolisacárido (**l**).

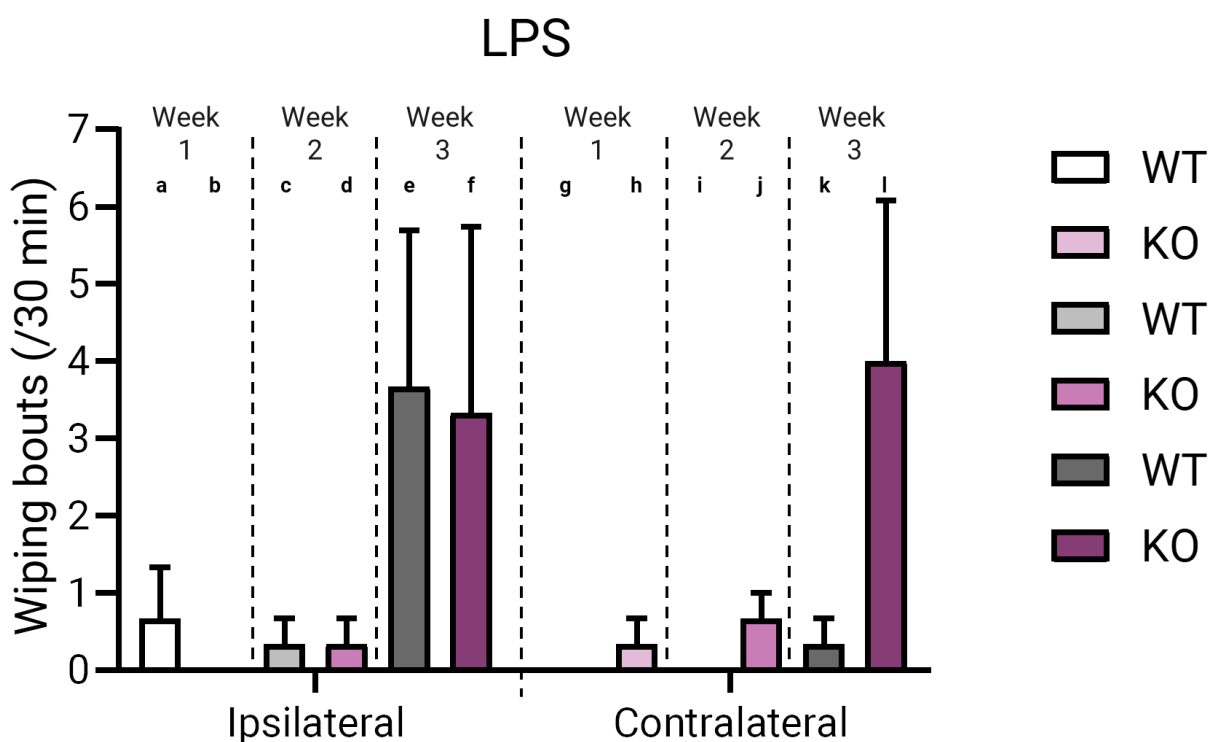


Figura 14. Múltiples inyecciones de LPS aumentan la conducta de *wiping* en ratones silvestres y *knockout*. Cuantificación semanal de las conductas de *wiping* en ratones WT y KO en el lado ipsilateral y contralateral a la inyección de LPS. Silvestre WT (n=3). *Knockout* KO (n=3). Valores presentados como Media \pm ES.

7. Múltiples inyecciones de LPS inducen un patrón de inflamación crónica agudizado en cachetes ipsilateralmente tratados en ratones WT y bilateralmente en ratones KO

Debido al esquema de tratamiento que recibieron los ratones para los experimentos conductuales y los resultados presentados en la **Figura 14**, se optó por analizar los cortes histológicos de la piel de cachetes de ratones silvestres y *knockout* tratados con LPS (ipsilateral) y PBS (contralateral). En la **Figura 15**, se presentan cortes representativos para piel de ratones silvestres y *knockout* para Ebf2, no se observaron diferencias entre los tejidos de hembras y machos, en la **Figura 15**, la parte superior corresponde a cortes de piel con un aumento de 100X y en la parte inferior un aumento de 400X, de la parte del recuadro remarcado.

Ipsilateral al tratamiento de LPS, **Figura 15 A**, se muestra en ratones silvestres un proceso inflamatorio crónico agudizado, en el que se presenta un infiltrado de células (constituido por linfocitos, neutrófilos y células plasmáticas) entre la dermis y tejido adiposo, se indica con la flecha en negro.

En la **Figura 15 B**, se observa en el lado contralateral, tratado con PBS, en ratones silvestres un segmento de piel sano, similar al que se observa de forma basal cuando se analiza la piel de ratones sin haber sido tratados previamente o inyectados. También, en **Figura 15 C**, ipsilateral al tratamiento de lipopolisacárido en ratones *knockout*, se presenta un infiltrado crónico agudizado conformado por linfocitos, flecha en azul, neutrófilos y células plasmáticas (flecha en verde), y en particular, se observa un monocito señalado con la flecha color naranja. Mientras que, en la **Figura 15 D**, contralateral al tratamiento de LPS en ratones *knockout*, se presenta un corte en el que se observan glándulas sudoríparas, folículos pilosos, músculo esquelético estriado y la destrucción del folículo piloso enmarcado con el recuadro en negro, atribuido a un proceso inflamatorio. Únicamente, en la piel de ratones KO contralateral al tratamiento de LPS se presentan signos de inflamación (**Figura 15 D**).

En la **Tabla 1**, se presenta el resumen del diagnóstico determinado por dos patólogos diferentes de los cortes de piel de cachetes de ratones silvestres y *knockout*, tratados con LPS y PBS.

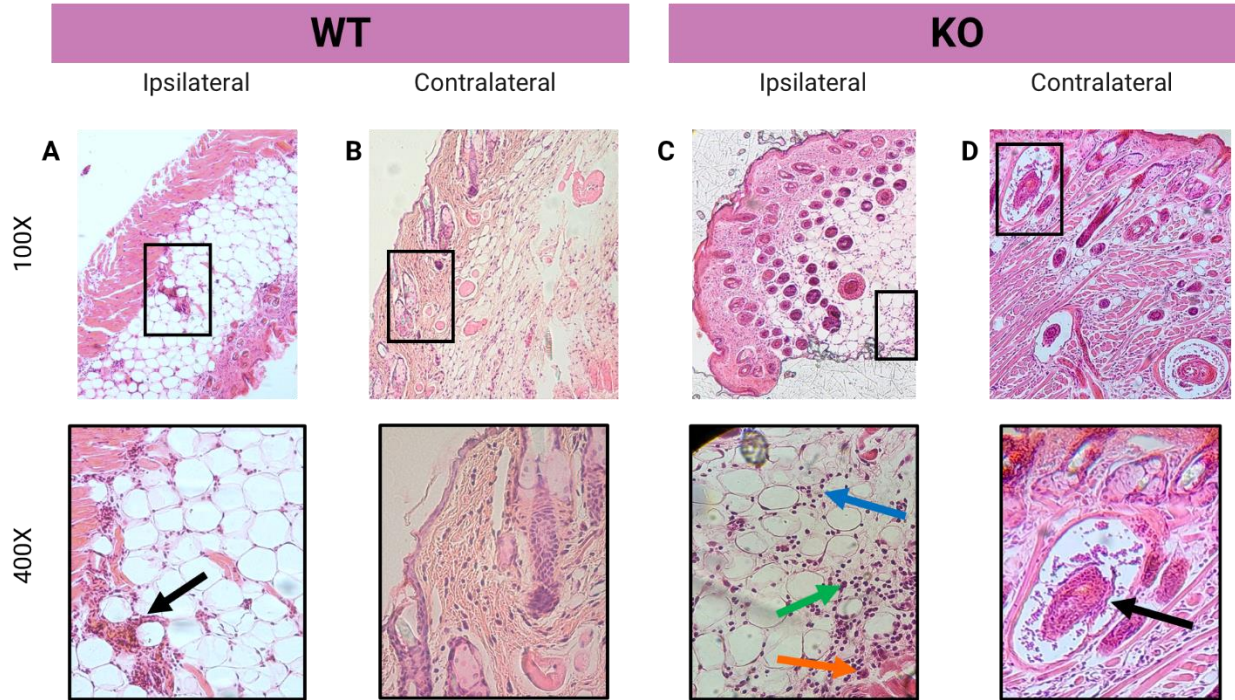


Figura 15. Cortes representativos de piel de ratones silvestres y *knockout* tratados con PBS y LPS.

Hematoxilina y eosina de cortes representativos de ratones hembra y macho de los genotipos WT y KO. Hembras (n=4, 3), machos (n=1, 2). Los cachetes contralaterales fueron tratados con PBS y los ipsilaterales con LPS. Corte histológico de ratones silvestres ipsilaterales al tratamiento de LPS **A**. Corte histológico de ratones silvestres contralaterales, tratados con PBS **B**. Corte histológico de ratones *knockout* con tratamiento de LPS **C** y corte histológico de ratones *knockout* con PBS **D**. Recuadros en negro acercamientos a 400X en la parte inferior. Flechas en negro indican rastros de inflamación. Flecha en azul, linfocitos. Flecha en verde, células plasmáticas. Flecha en naranja, monocito.

Tabla 1. Inflamación ipsilateral y contralateral en ratones tratados con LPS

Genotipo	Tratamiento (Ipsilateral)	Inflamación	Tratamiento (Contralateral)	Inflamación
WT	LPS	Si	PBS	No
WT	LPS	Si	PBS	No
WT	LPS	Si	PBS	Si, agudizada y sin distribución específica.
WT	LPS	Si	PBS	No
WT	LPS	Si	PBS	No
KO	LPS	Si	PBS	Si
KO	LPS	Si	PBS	No, sin datos patológicos observados
KO	LPS	Si	PBS	Si
KO	LPS	Si	PBS	Si
KO	LPS	Si	PBS	Si

DISCUSIÓN

1. Ebf2 se expresa en el ganglio trigeminal de ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP

La sustancia P es un neurotransmisor reportado en participar en el dolor inflamatorio (Green *et al.*, 2019). Mientras que en este trabajo se reporta por primera vez la expresión de Ebf2 en el ganglio trigeminal de ratones transgénicos adultos. Se observó que en ratones HET se tiene una subpoblación de neuronas que co-expresan Ebf2 y la sustancia P, y existe otra subpoblación que co-expresan Ebf2 y GRP, mientras que en el KO se pierden estas poblaciones. En el 2021, Landy y colaboradores reportaron que, la pérdida de Prdm12, un factor de transcripción importante en la neurogénesis de nociceptores; causaba defectos en la nocicepción. En particular, ratones recién nacidos KO desde la línea germinal, como los KO para Ebf2 que se utilizan en este proyecto, fallecían tras unas horas de haber nacido. Mientras que, al generar un KO condicional para neuronas sensoriales; los ratones llegaban a la adultez, lo que permitió la experimentación conductual; demostrando que los KO para Prdm12 presentaban una percepción al dolor y la comezón reducida a comparación de sus hermanos de camada silvestres. Tomando en cuenta que Ebf2 es también un factor de transcripción que se expresa durante el desarrollo embrionario, pudiera ser que este factor de transcripción tenga un rol en el desarrollo y/o formación de neuronas nociceptivas (**Figura 5 C y E**), y que los ratones *knockout* al no tener esas subpoblaciones de neuronas nociceptivas (**Figura 5 D y F**), presenten fenotipos anómalos o alteraciones relacionadas a la nocicepción.

Ebf2 es un factor de transcripción requerido para el desarrollo de neuronas dopaminérgicas en la sustancia gris periacueductal (Yang *et al.*, 2015) y también presenta un rol central en la diferenciación de células progenitoras multipotentes en el dermomiótomo al linaje pardo (grasa parda) (Rajakumari *et al.*, 2013; W. Wang y Seale, 2016). Por ello, es posible que la ausencia de la subpoblación de neuronas que co-expresan Ebf2 y SP, vista en la **Figura 5 D** y **Figura 7**, se deba a que la pérdida de Ebf2 promueva alteraciones y fallas en la diferenciación neuronal, en donde las células precursoras para las neuronas que expresan sustancia P, terminen diferenciándose en un linaje diferente.

2. Patrones de expresión de Ebf2 y genes relacionados con la nocicepción en el ganglio trigeminal de ratones C57BL/6J

Las neuronas que expresan receptores para neurotransmisores nociceptivos se encuentran en cercanía con las que expresan los neurotransmisores, y en muy raras ocasiones se pueden encontrar neuronas que co-expresen el neurotransmisor y su receptor, como por ejemplo CGRP y RAMP1 (Eftekhari *et al.*, 2015; Messlinger *et al.*, 2011). Las células que expresan Ebf2-TauGFP en **Figura 5 A**, pudieran pertenecer a las de la población NF1, debido a que esa subpoblación expresa los genes para los receptores de CGRP: Ramp1 y Calcr1 (**Figura 8**), sin embargo, se requieren más estudios para determinar si es el caso, un posible experimento es hacer una triple tinción en ganglios trigeminales de ratones heterocigotos y *knockout* con DAPI, Ebf2-TauGFP y S100b, una proteína que expresan las neuronas NF1 y NF2 (Yang *et al.*, 2022).

Además, se ha visto en animales *knockout* para ZBTB20, un factor de transcripción que modula el dolor a través de regular la expresión de canales TRP en neuronas nociceptivas, presentan defectos en la percepción nociceptiva: tanto en la modalidad de dolor, así como también en la de prurito (comezón) (Jia *et al.*, 2021; Ren *et al.*, 2014). Es posible que, Ebf2 tenga un rol en modular la nocicepción debido a los altos niveles de expresión de Zbtb20 y los TRPs en la **Figura 9** para el subtipo neuronal NF1. Además, Ebf2 pudiera tener un papel interesante relacionado con el TLR4, pues se sabe que este receptor puede sensibilizar o activar a los TRPs (Boonen *et al.*, 2018; Diogenes *et al.*, 2011; Meseguer *et al.*, 2014) y las neuronas NF1 expresan al alta Tlr4 y Ebf2.

Cabe destacar que, el atlas de células del ganglio trigeminal se realizó con ratones de la cepa C57Bl/6J, y si bien es una de las cepas que más se utiliza en la actualidad, no corresponde con la cepa que utilizamos en este trabajo, por lo que se requerirá corroborar la información presentada en las **Figura 8 y 9**, realizando una secuenciación con ganglios trigeminales de ratones de la cepa 129Sv^{Ebf2-TauGFP}. Se requieren más experimentos para profundizar en la relación de Ebf2 con las neuronas mecanorreceptoras de bajo umbral de activación (LTMRs) pertenecientes al subtipo NF1, así como también llegar a dilucidar si Ebf2 tiene un rol regulatorio para los canales TRP y/o TLR4.

3. La inserción de la aguja en el modelo de inyección en cachete presenta su efecto nocifensivo durante los primeros 10 minutos

En la **Figura 10**, se distingue entre el efecto causado por la inserción de la aguja, que se percibe como un estímulo doloroso, en los primeros 10 min y los siguientes 30 min se atribuyen al efecto que tendrá la sustancia inyectada, esto es consistente con lo reportado por distintos autores: desde el establecimiento del protocolo experimental por Shimada y LaMotte en 2008, y adaptaciones (Kanehisa *et al.*, 2022; Voisin *et al.*, 2021; Yamanoi *et al.*, 2019). Los resultados de la **Figura 10**, pueden ser novedosos y tomados en cuenta para futuros trabajos en donde se busque que el efecto de la aguja no influya en las conductas nocifensivas.

4. Los ratones transgénicos de la línea Ebf2-TauGFP presentan comportamientos de grooming similares a los silvestres

La conducta de *grooming* es intrínseca de los ratones y su cuantificación puede utilizarse como un indicativo de ansiedad, así como también de tendencias a conductas obsesivas-compulsivas (Kalueff *et al.*, 2016), los ratones transgénicos no presentan una conducta disminuida ni exacerbada (**Figura 11**). Y considerando que los ratones *knockout* presentan un fenotipo de narcolepsia, lo visto en **Figuras 11 B y C** valida el uso de este modelo experimental para comparar conductas nocifensivas entre ratones silvestres y transgénicos. Debido a que los ratones transgénicos no presentan diferencias estadísticamente significativas con los ratones silvestres con las sustancias proinflamatorias (**Figuras 11 B y C**), sugiere que la cuantificación realizada para los episodios de *wiping* y *scratching* (**Figuras 12 y 13**) se puede atribuir al efecto que tendrán esas sustancias y no a conductas repetitivas, causadas por tendencias obsesivas-compulsivas.

5. Los ratones KO presentan una discriminación anormal de estímulos nocivos

Para la sustancia control, PBS, vemos que no hay diferencias significativas entre los episodios de *wiping* y *scratching* (**Figuras 12 A y 13 A**) entre los 3 genotipos. Además, estos episodios son muy pocos, validando el uso de PBS como vehículo, mismo que se ha utilizado previamente por otros (Voisin *et al.*, 2021).

Por otro lado, el LPS, está reportado en la literatura como un inductor de dolor en estudios in vitro, en la **Figura 12 B** para ratones WT se ve que presentan episodios de *wiping*, asociados a dolor;

mientras que en HET y KO se ven disminuidos dichos episodios y aumentan para el lado en donde no se realizó la inyección. Sugiriendo que los ratones transgénicos no distinguen la localización espacial proveniente del estímulo doloroso. La implementación de este modelo de inyección en el cachete nos permitió evaluar el efecto algogeno del lipopolisacárido en ratones de la línea 129Sv^{Ebf2-TauGFP} y determinar que se presentaba una conducta asociada al dolor bajo nuestras condiciones experimentales, corroborando lo reportado en estudios previos *in vitro* (Boonen *et al.*, 2018; Diogenes *et al.*, 2011; Meseguer *et al.*, 2014).

Estos resultados contrastan con los hallazgos de Min y colaboradores (2014), pues en su estudio administraron LPS (100 µg) en la nuca de ratones y observaron que había una media de aproximadamente 10 episodios de *scratching* durante 30 min tras la inyección intradérmica. En otro experimento, utilizaron ratones *knockout* para TLR4, y observaron que, tras la administración intradérmica de histamina y cloroquina (sustancias que promueven comezón) en la nuca, los episodios de rascado eran significativamente menores que en ratones silvestres, sugiriendo que TLR4 tiene un papel en transmitir la señal de comezón causada por dichos pruritógenos (Min *et al.*, 2014). Cabe destacar que, el modelo de inyección en la nuca presenta la limitante de que el experimentador no puede distinguir entre una conducta asociada a comezón o dolor de forma innegable (LaMotte *et al.*, 2011). De hecho, Shimada y LaMotte en 2008 demuestran que la inyección intradérmica de capsaicina, un agente algogeno, en la nuca producía conductas de *scratching* (los ratones alzaban la pata trasera y se rascaban la nuca), y se debía a que este era el único comportamiento que los ratones pueden realizar cuando se les administra una sustancia algogena o pruritógena en esa área. Por lo que los episodios de *scratching* que Min y colaboradores reportan con la inyección de LPS en la nuca, pudieran atribuirse a que esos ratones únicamente tienen la posibilidad de rascarse y no de sobarse, ya que no se alcanzan la nuca con sus patas delanteras.

Debido a que, se observa una tendencia de conductas nocifensivas de *wiping* con el tratamiento de LPS (**Figura 12 B**) en ratones silvestres en lugar de conductas relacionadas con comezón (**Figura 13 B**); es posible que, en este modelo de inyección en cachete, la administración de lipopolisacárido (2 µg) cause la sensación de dolor *in vivo*. Sin embargo, se requiere aumentar la cantidad de ratones silvestres para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas.

La histamina, está reportada como un pruritígeno (Voisin *et al.*, 2021; Yamanoi *et al.*, 2019), y corresponde con la **Figura 13 C** para ratones WT. Los ratones KO tienen una disminución en los episodios de *scratching* y se equivocan del lado en donde perciben el estímulo. Cabe resaltar que, en la **Figura 12 C** y **13 B** los ratones KO aciertan el sitio de la inyección con la sustancia proinflamatoria administrada, pero, invierten la modalidad nociceptiva que interpretan: ya que un estímulo pruritígeno lo perciben como doloroso y viceversa.

Las alteraciones en las conductas de *wiping* y *scratching* de los ratones KO para el tratamiento de LPS e HIS (**Figura 12** y **13**) pudieran atribuirse a que tras la pérdida de Ebf2, las neuronas no funcionan de manera normal, y dichas neuronas pudieran ser las NF1 o PEP1 que expresan al alta los genes para Ebf2 y Tlr4 (**Figura 9**). Se requieren más estudios para determinar el papel que desempeña Ebf2 en la percepción nociceptiva del dolor y la comezón.

En esta tesis se cuantificaron los episodios de *wiping* y de *scratching* tomando en cuenta el sitio de la inyección y la pata delantera o trasera que levantaban los ratones, otros autores han establecido que únicamente cuantifican los episodios unilaterales en los que el ratón alza su pata (delantera o trasera) hacia el sitio de la inyección (Jia *et al.*, 2021; Kanehisa *et al.*, 2022; Shimada y LaMotte, 2008). Sin embargo, hay otros trabajos en los que no se hace una clara distinción de si se cuantifican unilateralmente o no, obviando que lo reportado ocurre en el sitio de inyección (Voisin *et al.*, 2021; Yamanoi *et al.*, 2019). Con ello, lo que se reporta en este trabajo es la primera ocasión en la que se comparan los episodios de *wiping* y *scratching* unilaterales al sitio de inyección con el lado contralateral. Gracias a esto, se logró observar que los ratones KO para Ebf2 presentan alteraciones en las cuales: 1) no distinguen la sensación de dolor o de comezón con el sitio en el que la presentan, en otras palabras, los ratones KO se confunden en la localización espacial proveniente del estímulo algógeno y/o pruritígeno y 2) cambian la modalidad nociceptiva interpretada.

Dado que Ebf2 es un factor de transcripción implicado en participar en la migración de neuronas (Yang *et al.*, 2015), formación de circuitos neuronales (Wang *et al.*, 2004) y tomando en cuenta que se expresa en neuronas del circuito PrV – VPM, es posible que, las anomalías en la percepción nociceptiva de los KO sean atribuidas a defectos en la formación de este circuito neuronal.

En resumen, surge la incógnita sobre, si las alteraciones se deben a una falla en la formación del circuito de manera generalizada: desde las células localizadas en el ganglio trigeminal y/o en las

proyecciones de neuronas de 2do orden del circuito PrV – VPM que se comentaron en antecedentes (**Figura 3**). Sobre las proyecciones de las neuronas de 2do orden, se tiene la hipótesis de que la falta de *Ebf2* provoca que dichas neuronas no crucen la línea media y no se proyecten hacia el VPM contralateral, causando que los ratones confundan la localización espacial en la que perciben el estímulo nociceptivo y cambien la modalidad nociceptiva interpretada.

6. Aumento de las conductas de *wiping* con el tratamiento de LPS en ratones silvestres y *knockout*

En el diseño experimental de esta tesis, se prefirió realizar inyecciones múltiples de lipopolisacárido en los ratones silvestres y *knockout*. En la **Figura 14**, se muestran las medias de los episodios de *wiping* para estos ratones en la semana 1, 2 y 3, con las conductas cuantificadas tras la inyección subdérmica de LPS (2 µg). En la tercera semana, hay una tendencia en las conductas de *wiping* ipsilateral al tratamiento de LPS para ratones silvestres y *knockout*, pero también, los KO tienen un aumento de los episodios de *wiping* a la tercera semana en el lado contralateral.

Es posible que el aumento de las conductas de *wiping* a la tercera semana con el tratamiento de LPS sea provocado por una sensibilización de los canales TRP o TLR4 en las neuronas nociceptivas del sistema trigeminal (Boonen *et al.*, 2018; Diogenes *et al.*, 2011). La sensibilización es un proceso en el que las neuronas sensoriales primarias se vuelven hiperresponsivas (hipersensibles) a estímulos nociceptivos extracelulares, y es la base fisiopatológica del dolor neuropático y/o el dolor crónico (Fabbretti, 2013). Los distintos TRPs pueden participar en transmitir las sensaciones nociceptivas de dolor y comezón durante una inflamación periférica; dependiendo del mediador o ligando presente y de la expresión de estos (Silverman *et al.*, 2020). Se requieren más estudios para profundizar sobre los efectos que tiene el LPS (de manera crónica y aguda) en los mecanismos nociceptivos, para tener un mejor entendimiento del dolor y/o comezón presentes ante una infección bacteriana crónica o aguda.

7. Múltiples inyecciones de LPS inducen un patrón de inflamación crónico agudizado en cachetes ipsilateralmente tratados en ratones WT y bilateralmente en ratones KO

Los ratones WT tratados con LPS tienen una respuesta inflamatoria ipsilateral al tratamiento (**Figura 15 A**), constituida por linfocitos, neutrófilos y células plasmáticas, consistente con el

esquema de tratamiento realizado en los ratones para los experimentos conductuales (Weavers y Martin, 2020; Xu *et al.*, 2008). Por otro lado, los ratones KO tratados con LPS, tienen una respuesta inflamatoria bilateral (**Figura 15 C y D**) constituida por las mismas células que están presentes en los ratones silvestres.

La inflamación crónica agudizada ipsilateral para ratones WT ocurre en el mismo sitio en el que se presenta el aumento de las conductas de *wiping* a la tercera semana (barra **e** en **Figura 14**), por lo que pudiera haber una correlación entre la inflamación en la piel con la cantidad de episodios de *wiping* que presentan los ratones. Además, la inflamación bilateral en la piel de cachetes de los ratones KO, se pudiera atribuir a la sensibilización del sistema trigeminal (inervación del rostro) y que se promueva en el cachete contralateral al tratamiento de LPS una inflamación de origen neurogénico (barras **f** y **l** en **Figura 14**).

Basándonos en la información disponible, los resultados anteriores, nos hablan de un *crosstalk* neuroinmune, en donde la participación del sistema nervioso es capaz de detectar insultos, como el LPS y montar una respuesta para activar o estimular al sistema inmune (inflamación crónica agudizada) (Donnelly *et al.*, 2020).

Cabe destacar que ratones *knockout* para Ebf2, presentan una disminución marcada en la población de linfocitos pre-B (B220⁺CD43⁺) y los linfocitos B (B220⁺CD43⁻), pero no presentan cambios en las poblaciones para los linajes mieloide, granulocítico y eritrocítico a las 3 semanas de edad (Kieslinger *et al.*, 2010). A pesar de la deficiencia en la población de linfocitos pre-B, el infiltrado ipsi- y contralateral de los ratones KO de la línea Ebf2-TauGFP está compuesto por células plasmáticas, que son un estado posterior en la diferenciación de los linfocitos pre-B, sugiriendo que estos presentan una respuesta al LPS “normal” a pesar de que Ebf2 no se exprese, posiblemente la presencia de células plasmáticas se deba a la redundancia genética que existe con los parálogos para Ebf2 (Hinzen, 2012; Kieslinger *et al.*, 2010).

En la Tabla 1. Se presenta de manera resumida los cortes histológicos de piel de cachetes de ratones silvestres y *knockout* tratados con LPS y PBS, se describe de manera cualitativa ya que se dificultó cuantificar la inflamación en los tejidos, pues la piel del cachete es una porción muy pequeña que es difícil de alinear en el bloque de parafina y en el microtomo. Sería interesante realizar experimentos en los cuales la piel de cachete de ratones WT y KO, tratados de igual manera, sea

disgregada y marcada para pasar por citometría de flujo, con lo que se pudiera realizar una cuantificación de las células que conforman el infiltrado.

CONCLUSIONES

- Los ratones transgénicos adultos de la línea Ebf2-TauGFP expresan Ebf2 en el ganglio trigeminal.
- Los ratones *knockout* para Ebf2 tienen alteraciones en la percepción de estímulos nociceptivos.
 - La pérdida total de las copias funcionales de Ebf2 agrava la percepción de la localización espacial del estímulo y la identificación de la modalidad nociceptiva que provocan dos diferentes sustancias proinflamatorias.
- Los ratones silvestres y *knockout* tienen datos patológicos consistentes a inflamación en la piel de cachetes tratados con LPS (ipsilateral al tratamiento). Mientras que, los animales *knockout*, tienen una respuesta bilateral inflamatoria, en la que la piel de cachetes tratados con PBS (contralateral) también se encuentra con patrones de inflamación.

PERSPECTIVAS

Debido a que surgieron nuevas hipótesis tras los resultados presentados, se queda como perspectivas y áreas de oportunidad para nuevas líneas de investigación los siguientes puntos:

- Caracterización neuroquímica de células Ebf2+ en el ganglio trigeminal, para definir la subpoblación de células que lo expresan
 - De los ganglios trigeminales recolectados de los ratones que se usaron para los experimentos conductuales del **Resultado 4**, realizar inmunofluorescencias y analizar si hay cambios en la expresión de neurotransmisores y receptores nociceptivos, comparando el ganglio trigeminal ipsilateral al tratamiento de LPS o HIS, con el contralateral, tratado con PBS.
- Utilizar más sustancias algógenas y pruritógenas: Capsaicina y aceite de mostaza y cloroquina y compuesto 48/80 y analizar la bilateralidad de la respuesta inflamatoria en animales KO en un modelo agudo.
 - Para que el LPS promueva conductas nocifensivas dolorosas en los ratones se requiere que sea un tratamiento crónico, que prolonga y dificulta la obtención de resultados rápidos. Además, de que el LPS al ser un ligando que puede ser reconocido por los TRPs y no solo por TLR4 dificulta el estudio, pues agrega más variables a tomar en cuenta. Utilizar sustancias algógenas y pruritógenas en un modelo agudo (1 sola inyección y observación conductual), puede dar nuevos resultados rápidos y claros. Además, las dosis de estas otras sustancias ya están estandarizadas y se han utilizado en múltiples investigaciones en diferentes laboratorios del mundo.
- Análisis embrionario de la formación del ganglio trigeminal, el circuito PrV-VPM en ratones heterocigotos y *knockout*
 - Esto, para dilucidar sobre qué efectos tiene Ebf2, si la pérdida de este factor de transcripción repercute en la formación y fisiología desde su desarrollo embrionario, o si es un problema que surge por la falta de modulación de genes relacionados a la nocicepción en el adulto.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama, T., Carstens, M., y Carstens, E. (2010). Differential Itch- and Pain-related Behavioral Responses and μ -opioid Modulation in Mice. *Acta Dermato Venereologica*, 90(6), 575–581. <https://doi.org/10.2340/00015555-0962>
- Angueira, A. R., Shapira, S. N., Ishibashi, J., Sampat, S., Sostre-Colón, J., Emmett, M. J., Titchenell, P. M., Lazar, M. A., Lim, H.-W., y Seale, P. (2020). Early B Cell Factor Activity Controls Developmental and Adaptive Thermogenic Gene Programming in Adipocytes. *Cell Reports*, 30(9), 2869-2878.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.023>
- Bautista, D. M., Pellegrino, M., y Tsunozaki, M. (2013). TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 181–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183811>
- Bautista, D. M., Wilson, S. R., y Hoon, M. A. (2014). Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nature Neuroscience*, 17(2), 175–182. <https://doi.org/10.1038/nn.3619>
- Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E., y Sturmburg, J. P. (2018). Inflammation–Nature’s Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
- Boonen, B., Alpizar, Y. A., Sanchez, A., López-Requena, A., Voets, T., y Talavera, K. (2018). Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. *Cell Calcium*, 73, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.04.004>
- Cepeda-Varela, M. B. D., Cabrera-Alvarado, L. M., y Barboza-Chávez, A. C. (2020). *Desarrollo de circuitos neuronales en el sistema nervioso de ratones transgénicos EBF2-TGFP*. Universidad de Monterrey.
- Cevikbas, F., y Lerner, E. A. (2020). Physiology and Pathophysiology of Itch. *Physiological Reviews*, 100(3), 945–982. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2019>

- Chen, X.-J., y Sun, Y.-G. (2020). Central circuit mechanisms of itch. *Nature Communications*, 11(1), 3052. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16859-5>
- De La Herrán-Arita, A. K., Zomosa-Signoret, V. C., Millán-Aldaco, D. A., Palomero-Rivero, M., Guerra-Crespo, M., Drucker-Colín, R., y Vidaltamayo, R. (2011). Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mutant mice. *Neuroscience*, 183, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.029>
- Diogenes, A., Ferraz, C. C. R., Akopian, A. N., Henry, M. A., y Hargreaves, K. M. (2011). LPS Sensitizes TRPV1 via Activation of TLR4 in Trigeminal Sensory Neurons. *Journal of Dental Research*, 90(6), 759–764. <https://doi.org/10.1177/0022034511400225>
- Donnelly, C. R., Chen, O., y Ji, R.-R. (2020). How Do Sensory Neurons Sense Danger Signals? *Trends in Neurosciences*, 43(10), 822–838. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.07.008>
- Dubois, L., y Vincent, A. (2001). The COE – Collier/Olf1/EBF – transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions. *Mechanisms of Development*, 108(1–2), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00486-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00486-5)
- Eftekhari, S., Salvatore, C. A., Johansson, S., Chen, T., Zeng, Z., y Edvinsson, L. (2015). Localization of CGRP, CGRP receptor, PACAP and glutamate in trigeminal ganglion. Relation to the blood–brain barrier. *Brain Research*, 1600, 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.031>
- El-Boustani, S., Sermet, B. S., Foustoukos, G., Oram, T. B., Yizhar, O., y Petersen, C. C. H. (2020). Anatomically and functionally distinct thalamocortical inputs to primary and secondary mouse whisker somatosensory cortices. *Nature Communications*, 11(1), 3342. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17087-7>
- Erzurumlu, R. S., Murakami, Y., y Rijli, F. M. (2010). Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrn2804>
- Fabbretti, E. (2013). ATP P2X3 receptors and neuronal sensitization. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00236>
- Garel, S., Marín, F., Mattéi, M.-G., Vesque, C., Vincent, A., y Charnay, P. (1997). Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional

- specification in the central nervous system. *Developmental Dynamics*, 210(3), 191–205.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199711\)210:3<191::AID-AJA1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3<191::AID-AJA1>3.0.CO;2-B)
- Goldstein, E. B., y Brockmole, J. (2017). *Sensation and Perception* (10a ed.). Cengage Learning.
- Green, D. P., Limjunyawong, N., Gour, N., Pundir, P., y Dong, X. (2019). A Mast-Cell-Specific Receptor Mediates Neurogenic Inflammation and Pain. *Neuron*, 101(3), 412-420.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.012>
- Green, Y. S., y Vetter, M. L. (2011). EBF proteins participate in transcriptional regulation of *Xenopus* muscle development. *Developmental Biology*, 358(1), 240–250.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.07.034>
- He, L., Han, G., Wu, S., Du, S., Zhang, Y., Liu, W., Jiang, B., Zhang, L., Xia, S., Jia, S., Hannaford, S., Xu, Y., y Tao, Y.-X. (2020). Toll-like receptor 7 contributes to neuropathic pain by activating NF- κ B in primary sensory neurons. *Brain, Behavior, and Immunity*, 87, 840–851. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.03.019>
- Hinzen, C. (2012). *The role of Ebf2 in normal and malignant hematopoiesis* [Universidad de Múnich]. https://edoc.ub.uni-muenchen.de/17854/1/Hinzen_Christoph.pdf
- Jia, X., Dai, M.-H., Ren, A.-J., Wang, T.-T., Zhang, W. J., y Zhang, L. (2021). ZBTB20 in Nociceptive Neurons of the Trigeminal Ganglia Regulates Pruritus. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.626554>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., y Fentress, J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Kanehisa, K., Koga, K., Maejima, S., Shiraiishi, Y., Asai, K., Shiratori-Hayashi, M., Xiao, M.-F., Sakamoto, H., Worley, P. F., y Tsuda, M. (2022). Neuronal pentraxin 2 is required for facilitating excitatory synaptic inputs onto spinal neurons involved in pruriceptive transmission in a model of chronic itch. *Nature Communications*, 13(1), 2367.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-30089-x>
- Kieslinger, M., Folberth, S., Dobreva, G., Dorn, T., Croci, L., Erben, R., Consalez, G. G., y Grosschedl, R. (2005). EBF2 Regulates Osteoblast-Dependent Differentiation of

- Osteoclasts. *Developmental Cell*, 9(6), 757–767.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.009>
- Kieslinger, M., Hiechinger, S., Dobрева, G., Consalez, G. G., y Grosschedl, R. (2010). Early B Cell Factor 2 Regulates Hematopoietic Stem Cell Homeostasis in a Cell-Nonautonomous Manner. *Cell Stem Cell*, 7(4), 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.015>
- Klein, A., Carstens, M. I., y Carstens, E. (2011). Facial injections of pruritogens or algogens elicit distinct behavior responses in rats and excite overlapping populations of primary sensory and trigeminal subnucleus caudalis neurons. *Journal of Neurophysiology*, 106(3), 1078–1088. <https://doi.org/10.1152/jn.00302.2011>
- LaMotte, R. H., Shimada, S. G., y Sikand, P. (2011). Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans. *Experimental Dermatology*, 20(10), 778–782.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01367.x>
- Landy, M. A., Goyal, M., Casey, K. M., Liu, C., y Lai, H. C. (2021). Loss of Prdm12 during development, but not in mature nociceptors, causes defects in pain sensation. *Cell Reports*, 34(13), 108913. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108913>
- Lipshetz, B., Khasabov, S. G., Truong, H., Netoff, T. I., Simone, D. A., y Giesler, G. J. (2018). Responses of thalamic neurons to itch- and pain-producing stimuli in rats. *Journal of Neurophysiology*, 120(3), 1119–1134. <https://doi.org/10.1152/jn.00264.2018>
- Liu, T., Berta, T., Xu, Z.-Z., Park, C.-K., Zhang, L., Lü, N., Liu, Q., Liu, Y., Gao, Y.-J., Liu, Y.-C., Ma, Q., Dong, X., y Ji, R.-R. (2012). TLR3 deficiency impairs spinal cord synaptic transmission, central sensitization, and pruritus in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2195–2207. <https://doi.org/10.1172/JCI45414>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., y Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Meng, J., Wang, J., Steinhoff, M., y Dolly, J. O. (2016). TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18–1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Scientific Reports*, 6(1), 21226.
<https://doi.org/10.1038/srep21226>

- Meseguer, V., Alpizar, Y. A., Luis, E., Tajada, S., Denlinger, B., Fajardo, O., Manenschijn, J.-A., Fernández-Peña, C., Talavera, A., Kichko, T., Navia, B., Sánchez, A., Señarís, R., Reeh, P., Pérez-García, M. T., López-López, J. R., Voets, T., Belmonte, C., Talavera, K., y Viana, F. (2014). TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nature Communications*, 5(1), 3125. <https://doi.org/10.1038/ncomms4125>
- Messlinger, K., Fischer, M. J. M., y Lennerz, J. K. (2011). Neuropeptide Effects in the Trigeminal System: Pathophysiology and Clinical Relevance in Migraine. *The Keio Journal of Medicine*, 60(3), 82–89. <https://doi.org/10.2302/kjm.60.82>
- Miao, X., Huang, Y., Liu, T.-T., Guo, R., Wang, B., Wang, X.-L., Chen, L.-H., Zhou, Y., Ji, R.-R., y Liu, T. (2018). TNF- α /TNFR1 Signaling is Required for the Full Expression of Acute and Chronic Itch in Mice via Peripheral and Central Mechanisms. *Neuroscience Bulletin*, 34(1), 42–53. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0124-3>
- Min, H., Lee, H., Lim, H., Jang, Y. H., Chung, S. J., Lee, C. J., y Lee, S. J. (2014). TLR4 enhances histamine-mediated pruritus by potentiating TRPV1 activity. *Molecular Brain*, 7(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13041-014-0059-9>
- Mtui, E., Gruener, G., y Dockery, P. (2017). *Fitzgerald's Clinical Neuroanatomy and Neuroscience* (7a ed.). Elsevier.
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M., y Noguchi, K. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *The Journal of clinical investigation*, 115(9), 2393–2401. <https://doi.org/10.1172/JCI25437>
- Olson, W., Dong, P., Fleming, M., y Luo, W. (2016). The specification and wiring of mammalian cutaneous low-threshold mechanoreceptors. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 5(3), 389–404. <https://doi.org/10.1002/wdev.229>
- Qi, J., Buzas, K., Fan, H., Cohen, J. I., Wang, K., Mont, E., Klinman, D., Oppenheim, J. J., y Howard, O. M. Z. (2011). Painful Pathways Induced by TLR Stimulation of Dorsal Root

- Ganglion Neurons. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6417–6426.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001241>
- Rajakumari, S., Wu, J., Ishibashi, J., Lim, H.-W., Giang, A.-H., Won, K.-J., Reed, R. R., y Seale, P. (2013). EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell metabolism*, 17(4), 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.015>
- Ren, A.-J., Wang, K., Zhang, H., Liu, A., Ma, X., Liang, Q., Cao, D., Wood, J. N., He, D. Z., Ding, Y.-Q., Yuan, W.-J., Xie, Z., y Zhang, W. J. (2014). ZBTB20 regulates nociception and pain sensation by modulating TRP channel expression in nociceptive sensory neurons. *Nature communications*, 5, 4984. <https://doi.org/10.1038/ncomms5984>
- Shimada, S. G., y LaMotte, R. H. (2008). Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. *Pain*, 139(3), 681–687. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.08.002>
- Silverman, H. A., Chen, A., Kravatz, N. L., Chavan, S. S., y Chang, E. H. (2020). Involvement of Neural Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Inflammation. *Frontiers in immunology*, 11, 590261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590261>
- Treiber, N., Treiber, T., Zocher, G., y Grosschedl, R. (2010). Structure of an Ebf1:DNA complex reveals unusual DNA recognition and structural homology with Rel proteins. *Genes y development*, 24(20), 2270–2275. <https://doi.org/10.1101/gad.1976610>
- Voisin, T., Perner, C., Messou, M.-A., Shiers, S., Ualiyeva, S., Kanaoka, Y., Price, T. J., Sokol, C. L., Bankova, L. G., Austen, K. F., y Chiu, I. M. (2021). The CysLT₂ R receptor mediates leukotriene C₄-driven acute and chronic itch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.2022087118>
- Wang, S. S., Lewcock, J. W., Feinstein, P., Mombaerts, P., y Reed, R. R. (2004). Genetic disruptions of *O/E2* and *O/E3* genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development*, 131(6), 1377–1388. <https://doi.org/10.1242/dev.01009>
- Wang, S. S., Tsai, R. Y., y Reed, R. R. (1997). The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(11), 4149–4158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-11-04149.1997>

- Wang, T.-T., Xu, X.-Y., Lin, W., Hu, D.-D., Shi, W., Jia, X., Wang, H., Song, N.-J., Zhang, Y.-Q., y Zhang, L. (2020). Activation of Different Heterodimers of TLR2 Distinctly Mediates Pain and Itch. *Neuroscience*, 429, 245–255.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.01.010>
- Wang, W., y Seale, P. (2016). Control of brown and beige fat development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(11), 691–702. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.96>
- Weavers, H., y Martin, P. (2020). The cell biology of inflammation: From common traits to remarkable immunological adaptations. *The Journal of cell biology*, 219(7).
<https://doi.org/10.1083/jcb.202004003>
- Xie, B., y Li, X.-Y. (2019). Inflammatory mediators causing cutaneous chronic itch in some diseases via transient receptor potential channel subfamily V member 1 and subfamily A member 1. *The Journal of dermatology*, 46(3), 177–185. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14749>
- Xu, H., Liew, L. N., Kuo, I. C., Huang, C. H., Goh, D. L.-M., y Chua, K. Y. (2008). The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology*, 125(2), 218–228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02832.x>
- Yamanoi, Y., Kittaka, H., y Tominaga, M. (2019). Cheek Injection Model for Simultaneous Measurement of Pain and Itch-related Behaviors. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 151. <https://doi.org/10.3791/58943>
- Yang, L., Xu, M., Bhuiyan, S. A., Li, J., Zhao, J., Cohrs, R. J., Susterich, J. T., Signorelli, S., Green, U., Stone, J. R., Levy, D., Lennerz, J. K., y Renthal, W. (2022). Human and mouse trigeminal ganglia cell atlas implicates multiple cell types in migraine. *Neuron*, 110(11), 1806-1821.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.03.003>
- Yang, Q., Liu, S., Yin, M., Yin, Y., Zhou, G., y Zhou, J. (2015). Ebf2 is required for development of dopamine neurons in the midbrain periaqueductal gray matter of mouse. *Developmental neurobiology*, 75(11), 1282–1294. <https://doi.org/10.1002/dneu.22284>

Zhang, Z.-J., Guo, J.-S., Li, S.-S., Wu, X.-B., Cao, D.-L., Jiang, B.-C., Jing, P.-B., Bai, X.-Q., Li, C.-H., Wu, Z.-H., Lu, Y., y Gao, Y.-J. (2018). TLR8 and its endogenous ligand miR-21 contribute to neuropathic pain in murine DRG. *The Journal of experimental medicine*, 215(12), 3019–3037. <https://doi.org/10.1084/jem.20180800>

Zheng, Y., Liu, P., Bai, L., Trimmer, J. S., Bean, B. P., y Ginty, D. D. (2019). Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties. *Neuron*, 103(4), 598-616.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.039>

RESUMEN BIOGRÁFICO

María Blanca Delia Cepeda Varela

Candidata para el grado de

Maestra en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DE LA NOCICEPCIÓN (DOLOR Y COMEZÓN) EN RATONES
129Sv^{Ebf2-TauGFP} EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN LOCAL INDUCIDO POR
LIPOPOLISACÁRIDO

Campo de estudio: Ciencias básicas, Ciencias de la Salud

Datos personales:

Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 25 de septiembre de 1996.

Educación:

Egresada de Universidad de Monterrey con el grado obtenido de Licenciatura en Ingeniero
Biomédico.

Experiencia profesional:

Asistente de investigación (2019 - actualidad)

Becario de Investigación Mitacs Globalink (2019)

Becario de Investigación UT Dallas- Mexico (2018)

Comunicaciones a congresos:

Asistencia y presentación del poster “Abnormalities in nociceptive perception of *Ebf2 knockout* mice in a cheek injection model”. En el congreso Neuroscience 2022, organizado por la Society for Neuroscience (SfN) en San Diego, Estados Unidos, del 12 al 16 de noviembre de 2022.