

VNIVERSITAT VALÈNCIA



Treball de Fi de Grau en Farmàcia

“Alteracions sobre els astròcits i el transportador de glutamat GLT-1 en el còrtex prefrontal induïdes per dolor inflamatori: estudi preclínic amb perspectiva de gènere”

Estudiant: Paula Andrés Herrera

Tutors: Lucía Teresa Hipólito Cubedo
Ana Polache Vengut
Javier Cuitavi Martín

Departament: Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia

Juliol 2021

Facultat de Farmàcia 

**“ALTERACIONS SOBRE ELS ASTRÒCITS I EL
TRANSPORTADOR DE GLUTAMAT GLT-1 EN EL
CÒRTEX PREFRONTAL INDUÏDES PER DOLOR
INFLAMATORI: ESTUDI PRECLÍNIC AMB
PERSPECTIVA DE GÈNERE”**

AUTORA: Paula Andrés Herrera¹

TUTORS: Lucía Teresa Hipólito Cubedo¹

Ana Polache Vengut¹

Javier Cuitavi Martín¹

¹Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia (Universitat de València).

Paraules clau: dolor inflamatori, còrtex prefrontal, astròcits, glutamat, GLT-1.

Key words: inflammatory pain, prefrontal còrtex, astrocytes, glutamate, GLT-1.

LLISTAT D'ABREVIATURES

ATP	Trifosfat d'adenosina
BCIP	“5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate”
CFA	Adjuvant Complet de Freund
CgL	Cingulat
CPF	Còrtex prefrontal
EAAT2	Transportador aminoacídic excitador 2
GAPDH	Gliceraldehíd-3-fosfat deshidrogenasa
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial
GLT-1	Transportador de glutamat 1
H ₂ O	Aigua
IgG	Immunoglobulina G
IL	Infralímbic
INF- α	Interferó α
NBT	“Nitro blue tetrazolium”
PAG	Matèria grisa periaqüeductal
PB	Tampó fosfat salí
PrL	Prelímbic
RD	Real decret
SAL	Salí
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
SNC	Sistema nerviós central
TBS	Tampó Tris salí

RESUM

El dolor crònic és un problema de salut complex i greu que habitualment va associat a altres patologies com la depressió, l'ansietat o el trastorn de consum de drogues. És interessant remarcar que el còrtex prefrontal (CPF) està involucrat tant en el processament del dolor com en les seues comorbiditats. L'evidència clínica suggereix que les alteracions relacionades en els astròcits i en l'expressió d'un dels seus transportadors de glutamat, en concret el GLT-1, estan relacionades en la cronificació del dolor i en l'aparició de comorbiditats, encara que el paper del CPF no està massa estudiat. Els astròcits, ubicats en el sistema nerviós central, juguen un paper essencial en la regulació i manteniment de l'homeòstasi del glutamat, neurotransmissor excitador per excel·lència de la via del dolor. En aquest treball s'estudia, en presència de dolor inflamatori, el nivell d'astròcits presents en el CPF de rates femella i mascle, així com l'expressió del transportador de glutamat GLT-1. Per tal d'induir el dolor inflamatori, s'ha emprat una injecció d'Adjuvant Complet de Freund (CFA) subcutània a la superfície plantar. La quantificació d'astròcits s'ha realitzat mitjançant una immunohistoquímica per detectar GFAP, proteïna expressada només pels astròcits; mentre que l'expressió del transportador de glutamat 1 (GLT-1), s'ha estudiat a través d'una immunoelectrotransferència. Els resultats obtinguts són sexe-dependents, és a dir, només s'han detectat diferències estadísticament significatives en rates femella. De fet, s'ha observat que el dolor inflamatori augmenta la quantitat d'astròcits i l'expressió de GLT-1 en certes subregions del CPF de les femelles. Aquestes dades poden ser importants a l'hora d'iniciar una nova investigació per trobar noves dianes terapèutiques dirigides i més individualitzades en un futur.

Paraules clau: dolor inflamatori, còrtex prefrontal, astròcits, glutamat, GLT-1.

ABSTRACT

Chronic pain is a complex health burden which is usually associated to other pathologies such as depression, anxiety, and drug abuse disorders. Interestingly, prefrontal cortex (PFC) plays a role in both pain processing and its comorbidities. Clinic evidence suggests that alterations related to astrocytes and one of their glutamate receptors known as GLT-1 are associated with pain chronification and the development of its comorbidities, even though the role of PFC is not very clear yet. Astrocytes within the central nervous system are involved in glutamate homeostasis regulation and maintenance, which is the main neurotransmitter in pain-related neural pathways. Herein, we study how inflammatory pain alters astrocytes levels and GLT-1 expression in PFC from male and female rats. To do so, we used a subcutaneous injection of Complete Freund Adjuvant (CFA) in the hind paw. Astrocytes' quantification was carried out by using immunohistochemistry to detect GFAP, a protein only expressed by astrocytes, whereas GLT-1 expression was studied with western blotting. The obtained results are sex-dependent since only female rats showed statistically significant differences. In fact, we observed that inflammatory pain increases the number of astrocytes and GLT-1 expression in some PFC subregions in female rats. These findings might be relevant regarding future investigations to find new therapeutical targets and better individualised treatments.

Key words: inflammatory pain, prefrontal cortex, astrocytes, glutamate, GLT-1.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
2. ANTECEDENTS	4
2.1. Breu repàs a l'anatomia del dolor	4
2.2. Funció del còrtex prefrontal (CPF) en el processament del dolor	5
2.3. Paper dels astròcits en el dolor	6
2.4. Homeòstasi del glutamat: paper dels seus transportadors	9
3. OBJECTIUS	11
4. MATERIALS I MÈTODES	12
4.1. Animals	12
4.2. Inducció de dolor inflamatori	12
4.3. Preparació de la mostra i immunoelectrotransferència	13
4.4. Preparació de la mostra i immunohistoquímica	14
4.4.1. Selecció de regions cerebrals d'interès	14
4.4.2. Immunohistoquímica de fluorescència	16
4.4.3. Anàlisi de l'expressió de GFAP	17
4.5. Mètodes estadístics	17
5. RESULTATS	18
5.1. Quantificació d'astròcits en CPF	18
5.1.1. Cingulat (CgL)	18
5.1.2. Prelímbic (PrL)	19
5.1.3. Infralímbic (IL)	21
5.2. Expressió de GLT-1 en CPF	22
6. DISCUSSIÓ	24
7. CONCLUSIONS	30
8. BIBLIOGRAFIA	31

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Manifestacions del dolor crònic	1
Figura 2. Anatomia de la via del dolor	5
Figura 3. Funcions principals dels astròcits en absència de patologia en SNC	7
Figura 4. Dolor crònic com a conseqüència d'alteracions en els astròcits per estímuls dolorosos	8
Figura 5. Mecanisme de recaptació del transportador de glutamat	10
Figures 6 i 7. Representació esquemàtica de les zones utilitzades per la quantificació immunohistoquímica de GFAP	15
Figura 8. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de CgL en mascles	18
Figura 9. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de CgL en femelles	19
Figura 10. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de PrL en mascles	20
Figura 11. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de PrL en femelles	20
Figura 12. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de IL en mascles	21
Figura 13. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de IL en femelles	22
Figura 14. Nivells d'expressió de GLT-1 en CPF en mascles (A) i en femelles (B)	23
Figura 15. Canvis en la morfologia i en la funció dels astròcits després d'estímuls dolorosos	26

1. INTRODUCCIÓ

L'Associació Internacional per l'Estudi del Dolor defineix el dolor com “una experiència sensitiva i emocional desagradable, associada a una lesió tissular real o potencial” (Raja et al., 2020). El dolor és una patologia prou complexa, ja que comprèn components sensorials, emocionals, cognitius i motivacionals (Seminowicz i Moayedi, 2017). Així i tot, ens adverteix sobre possibles danys als teixits del nostre organisme i és considerat com un mecanisme de protecció (Woolf, 2010).

Atenent a l'origen del dolor, pot classificar-se en tres grups: nociceptiu, inflamatori i patològic. El primer s'activa en presència d'estímuls intensos, té un paper protector i requereix un reflex immediat. El dolor inflamatori és provocat per l'activació del sistema immunitari quan hi ha lesió o infecció tissular i està implicat en el procés de curació. Per últim, el patològic es relaciona amb el dany del sistema nerviós (neuropàtic) o amb una alteració en la funcionalitat (Woolf, 2010).

Tot i que el dolor fisiològic té una funció protectora, aquest pot adoptar un caràcter patològic i anar associat a inflamació, neuropatia, càncer o diabetis per exemple (Kuner, 2010). El dolor inflamatori i el neuropàtic promouen una sèrie de canvis a nivell cel·lular i molecular que contribueixen al desenvolupament de dolor crònic (Descalzi et al., 2015). La sensibilització central és una forma de plasticitat sinàptica en la medul·la espinal i el cervell (Ji et al., 2019), és un procés patològic que consisteix en un descens del llindar del dolor i una percepció alterada dels estímuls. Els seus símptomes inclouen la hiperalgèsia (sensació de dolor augmentada en estímuls dolorosos lleugers) i al·lodínia (dolor associat a estímuls no dolorosos) representades en la Figura 1 i dolor espontani (Bleakman et al., 2006).

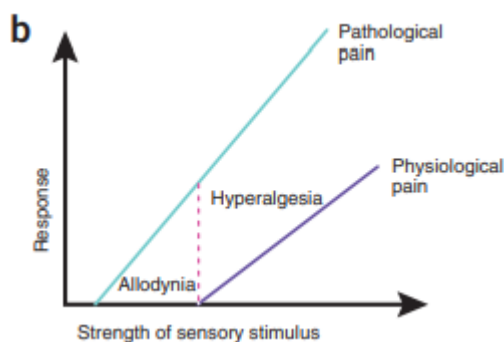


Figura 1. Manifestacions del dolor crònic. L'al·lodínia es correspon a una resposta dolorosa patològica a estímuls benignes. La hiperalgèsia s'associa a respostes exagerades en presència d'estímuls dolorosos. Figura obtinguda de Kuner, 2010.

També és possible classificar el dolor considerant la duració dels símptomes. Per una banda, el dolor agut té una duració limitada en el temps, està localitzat en una àrea concreta i ens serveix d'alerta. D'altra banda, el dolor crònic té una duració superior a 3 mesos i s'associa amb un component psicològic.

El dolor crònic representa un problema de salut important en Europa, és considerat una de les primeres causes de discapacitat a llarg termini a nivell global i en conseqüència, suposa un gran impacte social i econòmic. (Reid et al., 2011; Vos et al., 2016). A més, s'ha detectat que el 18% de la població de països en desenvolupament pateix dolor crònic i s'ha observat un increment de prevalença en dones i persones majors de 30 anys (Nunes et al., 2019). Les condicions del dolor crònic que mostren un augment de la prevalença amb l'edat, com la fibromiàlgia, també mostren diferències sexuals prominents, mostrant una major prevalença en dones que en homes (Ro et al., 2019). Les dades obtingudes per la literatura mostren clarament una diferència entre gèneres.

Majoritàriament, els trastorns del dolor s'inicien amb lesions o malalties, però la seua evolució també es veu afectada per factors emocionals, socials i econòmics (Nicholson i Verma, 2004). El dolor crònic és una patologia complexa que sovint es vincula a l'ansietat, la depressió, l'addicció a drogues o fins i tot l'insomni (Bilevicius et al., 2020). Tant el dolor crònic com els trastorns de l'estat d'ànim són condicions inhabilitants que disminueixen significativament la qualitat de vida de l'individu (Feingold et al., 2018; Humo et al., 2019). La interrelació entre el dolor i les seues comorbiditats és complexa i pot suposar un greu problema per als pacients. Són diverses les comorbiditats neuropsiquiàtriques que presenten els pacients amb dolor crònic, de nou amb major prevalença en el cas de les dones (Leibenluft, 1999).

Una de les comorbiditats comunes és l'alteració del son. Les persones amb dolor crònic tenen problemes per iniciar i mantenir el son; alhora, la privació del son produeix una disminució del llindar de dolor i l'aparició de rigidesa muscular (Nicholson i Verma, 2004).

Però sense dubte, les comorbiditats més habituals són els trastorns de tipus depressiu. Fins al 54% de pacients amb dolor crònic pateixen depressió (Feingold et al., 2018). La presència d'aquest estat d'ànim incrementa la sensació de dolor i viceversa (Ong et al., 2019). La comorbiditat amb l'ansietat és semblant, els components conductuals i afectius de l'ansietat exacerben el dolor i l'ansietat pot contribuir a la cronicitat del dolor (Beesdo

et al., 2009). A més, ambdós tenen en comú alguns factors predisposants com l'alta sensibilitat a les lesions, la sensació d'imptència o la tendència al catastrofisme entre altres (Csupak et al., 2018).

Finalment, els pacients amb dolor i amb problemes d'addicció a alguna droga, solen tenir múltiples problemes psicològics, psiquiàtrics i comorbiditats mèdiques incloent la polimediació, de manera que tots interactuen entre si de manera complexa. Les múltiples comorbiditats semblen jugar un paper important en la cronificació del dolor i en l'aparició de símptomes adversos associats (Manhapra i Becker, 2018). A més, evidències científiques en humans i en animals d'experimentació mostren que existeixen diferències de gènere en la neurobiologia de les addiccions (Filligim, 2000) i del dolor (Fillingim et al., 2009). Inclús, certs articles mostren una diferent sensibilitat del gènere femení als símptomes emocionals negatius de les drogues en l'addicció, sent més sensibles a ells (Mogil et al., 2003).

2. ANTECEDENTS

2.1. Breu repàs a l'anatomia del dolor

La percepció del dolor sorgeix a través d'una complexa cascada de senyalització perifèrica, processament central, activació cortical i finalment, una resposta conductual. Aquest procés es veu reflectit en la Figura 2.

Els receptors encarregats de replegar la informació del dolor s'anomenen nociceptors. Aquests receptors són responsables de traduir esdeveniments potencialment perjudicials en senyals neuronals per produir una resposta conductual adequada (Fenton et al., 2015). Es tracta de terminacions nervioses lliures situades en els teixits perifèrics que poden respondre a estímuls mecànics, tèrmics o químics (Pinho-Ribeiro et al., 2017).

Els nociceptors s'exciten únicament quan l'estímul dolorós supera un llindar, aquesta informació es propaga al llarg de les neurones aferents primàries fins a la medul·la espinal. (Elman i Borsook, 2016). Aquestes neurones tenen una morfologia especial anomenada pseudo-unipolar, contenen un axó dividit en dues branques. Mentre que la branca perifèrica del nociceptor respon als estímuls ambientals, tant la branca perifèrica com la central poden ser objectiu d'una sèrie de molècules endògenes que regulen la seua sensibilitat (Basbaum et al., 2009). Les neurones sorgeixen des de la medul·la espinal cap a la part dorsal del cervell, es troben en l'origen de múltiples vies ascendents, incloent-hi els tractes espinotalàmics i espinoreticulatàmics, que porten missatges de dolor al tàlem i al tronc cerebral, respectivament. (Basbaum et al., 2009; Kuner, 2010). La informació ascendent també accedeix a la matèria grisa periaqueductal (PAG), on s'integren les dades nociceptives i es regula la resposta descendent (Elman i Borsook, 2016). Tot aquest procés es troba representat en la Figura 2.

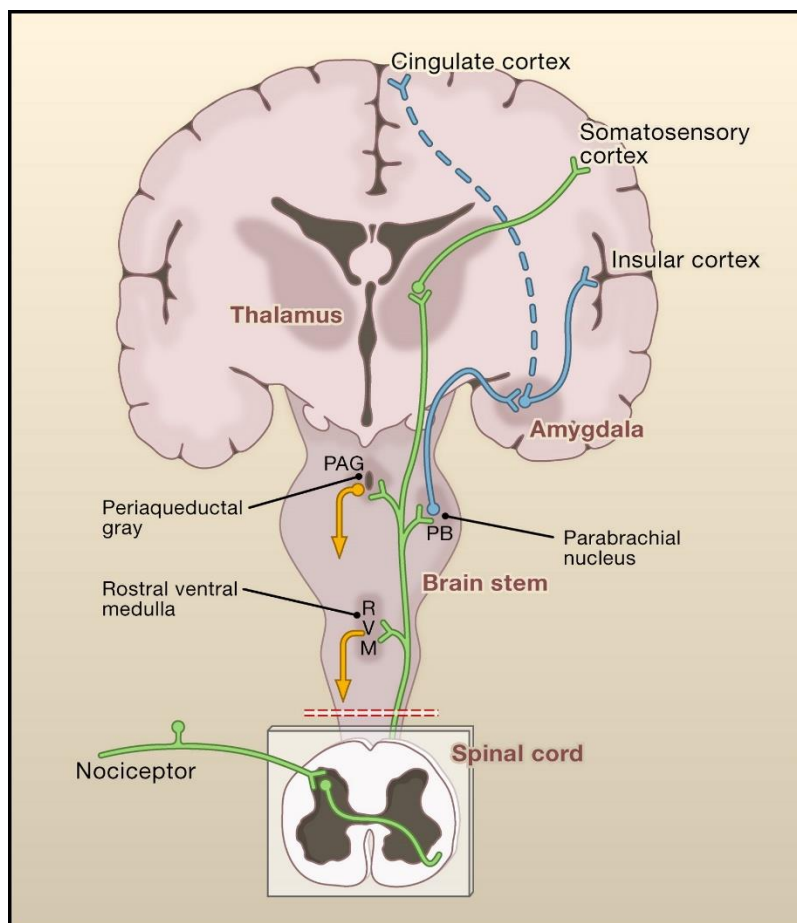


Figura 2. Anatomia de la via del dolor. Els nociceptors aferents primaris transmeten informació a les neurones dins de la banya dorsal de la medulla espinal. Algunes de les neurones de projecció que parteixen de la medulla espinal transmeten informació al còrtex somatosensorial a través del tàlem (tracte espinotalàmic, línia verda), obtenint informació sobre la ubicació i la intensitat del dolor. Altres neurones de projecció arriben als troncs cerebral i l'amígdala pel tracte espinoparabraquial (línia blava), associat més als components emocionals i aversius de l'estímul dolorós. La informació ascendent també accedeix a les neurones de la medulla ventral rostral i el PAG per involucrar sistemes de retroalimentació descendents que regulen la sortida de la medulla espinal (línia groga). Figura extreta de Basbaum et al., 2009.

Les estructures neurals que intervenen el dolor són plàstiques, és a dir, modificables. La plasticitat induïda per la malaltia pot ocórrer tant a nivells estructurals com funcionals i pot manifestar-se com canvis en les sinapsis (potenciació pre- i post-sinàptica), canvis moleculars (modificacions transcripcionals) o en la funció cel·lular (augment de l'excitabilitat i d'activitat espontània) (Kuner, 2010).

2.2. Funció del còrtex prefrontal (CPF) en el processament del dolor

Diverses regions corticals s'activen simultàniament en presència d'un estímul dolorós, entre elles el còrtex prefrontal (CPF) (Fenton et al., 2015). Aquesta zona està implicada en el processament cognitiu, afectiu i sensorial. Generalment s'encarrega de dur a terme

respostes conductuals adequades i té capacitat de representar la informació del medi ambient i utilitzar-la per guiar el pensament, les accions i les emocions (Seminowicz i Moayedi, 2017).

Aquesta àrea està involucrada en el processament del dolor, ja que es troba connectada amb altres àrees cerebrals implicades com l'amígdala, el tàlem o el còrtex somatosensorial i, a més, intervé en la discriminació de la seua intensitat i dels aspectes espacials (Ong et al., 2019). El CPF redueix la sensibilització al dolor i suprimeix l'activació d'algunes àrees cerebrals com l'amígdala o el tàlem en presència d'un estímul dolorós (Bräscher et al., 2016). Alguns estudis en models de dolor, han mostrat una disminució en el volum de matèria grisa i en la grossor del CPF en pacients amb dolor crònic, a més de la seua reversió parcial en alleujar el dolor (Davis i Moayedi, 2013). Per altra banda, també s'han trobat alteracions de la transmissió sinàptica. Per exemple, en el còrtex cingulat s'observa una millora en la transmissió glutamatèrgica aplicant un model de dolor inflamatori amb l'Adjuvant Complet de Freund (CFA) (Ji et al., 2007; Ong et al., 2019).

Com s'ha comentat anteriorment, el dolor crònic té com a comorbiditats la depressió, l'ansietat i l'addicció a drogues. La presència d'un estat d'ànim depressiu pot augmentar la sensació de dolor i viceversa. Estudis clínics i amb models animals han demostrat que aquesta interacció pot associar-se amb una activació en el CPF (Bär et al., 2007; Ong et al., 2019). També s'ha observat que el CPF, responsable de processar la informació basada en els senyals motivacionals i desenvolupar les respostes més adequades (Kalivas et al., 2009), està hiperactiu en les primeres etapes de l'addicció a drogues, va perdent volum de matèria grisa (reducció de la densitat sinàptica) i com a conseqüència, es perd gradualment l'autocontrol apareixent un comportament compulsiu (Goldstein i Volkow, 2011; Lewis, 2017). El CPF és una àrea important del sistema límbic, el qual té un paper crític en els processos d'iniciació i progressió de la dependència a la majoria de drogues d'abús (Alasmari et al., 2018).

2.3. Paper dels astròcits en el dolor

De manera general podem dir que les cèl·lules glials serveixen principalment per donar suport físic, estructural i metabòlic a les neurones i aïllar unes de les altres. Els astròcits representen aproximadament el 20-40% de totes les cèl·lules glials del sistema nerviós

central (SNC) (Herculano-Houzel, 2014). Són un tipus de cèl·lula glial amb la funció principal de mantenir l'homeòstasi de l'espai extracel·lular (Scofield i Kalivas, 2014).

Els astròcits es troben units físicament pel citosol mitjançant unions de tipus Gap, les quals permeten el flux lliure d'ions, petits components cel·lulars i diverses molècules de senyalització a llarga distància (Ji et al., 2019). En condicions fisiològiques, tal com es mostra en la Figura 3, s'encarreguen de proporcionar suport a les neurones i preservar l'homeòstasi del glutamat, del potassi i de l'aigua (Ji et al., 2013). També formen part del sistema glimfàtic, un sistema de transport de fluids que serveix com a via de neteja de productes residuals del SNC (Ji et al., 2019).

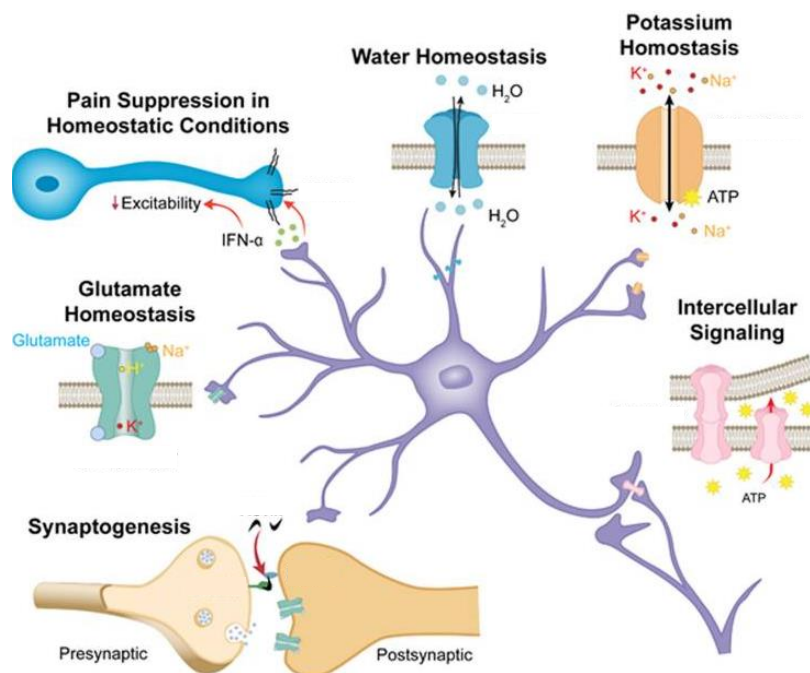


Figura 3. Funcions principals dels astròcits en absència de patologia en el SNC. Les seues funcions principals inclouen mantindre l'homeòstasi del glutamat, el potassi i l'aigua; aïllar les sinapsis i proporcionar suport metabòlic a les neurones. Sent H₂O: aigua; ATP: trifosfat d'adenosina; IFN- α : interferó- α . Figura obtinguda de Ji et al., 2019.

Els mediadors neuroinflamatoris i l'activació d'astròcits podria ser responsable dels canvis a nivell estructural, funcional i molecular associats a dolor patològic per augment d'alliberament de neurotransmissors i excitació neuronal (Ong et al., 2019).

Alguns estudis suggereixen que una sèrie de trastorns neurològics, incloent el dolor crònic, poden ser resultat d'una gliopatia (Ji et al., 2018). Després d'estímuls dolorosos, les cèl·lules glials exhibeixen alteracions funcionals i morfològiques com la desregulació de transportadors de glutamat en la membrana dels astròcits de la medul·la espinal i regions cerebrals com el CPF o l'amígdala (Ji et al., 2019; Mayegowda i Thomas, 2019).

La pèrdua de la seua funció produeix alteracions homeostàtiques, provocant la hiperactivitat neuronal com a conseqüència d'alts nivells extracel·lulars de glutamat i potassi, la qual cosa pot desencadenar neurotoxicitat i dolor crònic (Figura 4). A causa de la gliopatia, les cèl·lules glials deixen d'aïllar el circuit del dolor i actuen com amplificadors produint mediadors inflamatoris (Ji et al., 2018).

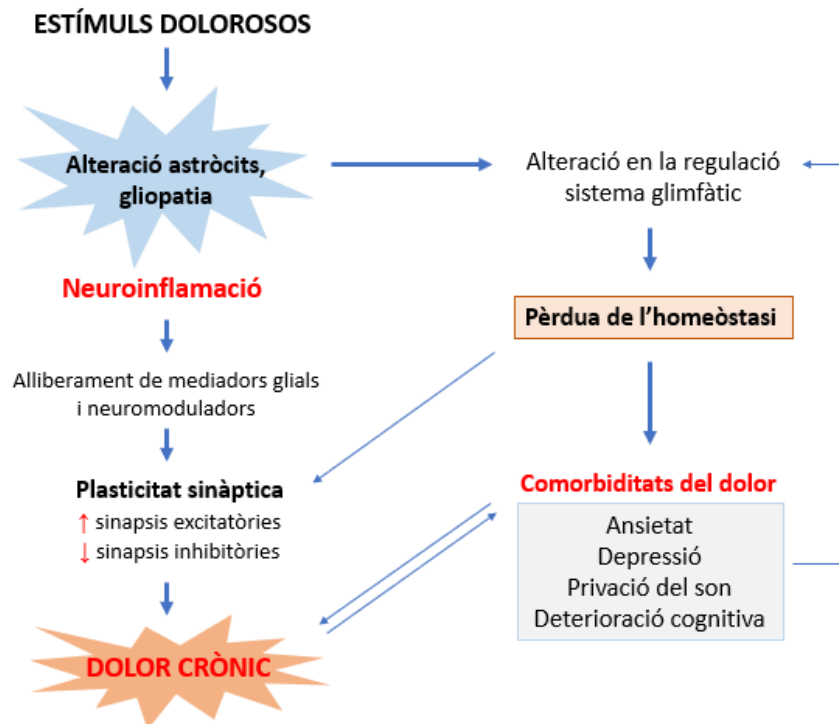


Figura 4. Dolor crònic com a conseqüència d'alteracions en els astròcits per estímuls dolorosos. Figura modificada de Ji et al., 2019.

La sensibilització central també està impulsada per la neuroinflamació en el sistema nerviós perifèric i central. L'alliberament de citokines glials proinflamatòries condueixen a la hipersensibilitat contribuint a la inducció de la hiperalgèsia i l'al·lodínia, de manera que el dolor perd la utilitat com a sistema d'alerta (Basbaum et al., 2009). L'augment sostingut d'aquests símptomes promou el dolor crònic generalitzat que s'estén més enllà del lloc de lesió inicial. (Ji et al., 2019; Ji et al., 2018).

Relacionat amb el dolor i les seues comorbiditats, es creu que la pèrdua d'astròcits pot jugar un paper important en l'aparició de trastorns de l'estat d'ànim (Rajkowska i Stockmeier, 2013). En el cas de la depressió, els astròcits mostren signes de degeneració i es redueixen en nombre, la qual cosa pot provocar una alteració en el balanç de la neurotransmissió i la connectivitat sinàptica (Peng et al., 2015). Aquest fenomen s'ha estudiat en el CPF (Sun et al., 2012) i es creu que pot ser causat parcialment per una

connexió intercel·lular defectuosa entre astròcits (Illes et al., 2020). En el cas dels trastorns de consum de droga, els astròcits del nucli accumbens pateixen adaptacions a llarg termini que provoquen alteracions en l'homeòstasi extracel·lular i, com a conseqüència, s'augmenta el risc de recaiguda en el trastorn de consum de drogues. (Kruyer i Kalivas, 2021).

2.4. Homeòstasi del glutamat: paper dels seus transportadors.

El glutamat és el neurotransmissor excitador primari relacionat amb la via del dolor (Ji et al., 2019). La transmissió del glutamat és essencial per la funcionalitat del cervell, incloent l'aprenentatge i la memòria.

Es creu que la majoria de les neurones aferents primàries que es projecten sobre les neurones secundàries de la banya dorsal espinal són glutamatèrgiques. El dany a les neurones aferents primàries desencadena una cascada d'esdeveniments plàstics expressats en l'augment de l'eficàcia de la neurotransmissió glutamatèrgica a la banya dorsal espinal (sensibilització central) i, com a resultat, el desenvolupament de característiques típiques del dolor neuropàtic crònic ja comentades anteriorment: hiperalgèsia i al·lodínia (Gegelashvili i Bjerrum, 2019).

Per mantenir les concentracions no tòxiques de glutamat, a banda de la difusió, és necessari un sistema d'eliminació de glutamat ràpid a través dels transportadors de glutamat (Rimmele i Rosenberg, 2016). La regulació a la baixa dels transportadors de glutamat es produeix simultàniament amb el desenvolupament de la hipersensibilitat als estímuls tèrmics o tàctils en diversos models de dolor crònic persistent (Gegelashvili i Bjerrum, 2017; Guo et al., 2019).

La transmissió elevada del glutamat produeix efectes secundaris negatius, de fet, diverses malalties neurològiques i psiquiàtriques presenten un excés de glutamat extracel·lular i pèrdua d'expressió del transportador aminoàcid excitador 2 (EAAT2) (Takahashi et al., 2015).

L'EAAT2 també es coneix com el transportador de glutamat 1 (GLT-1) (Fenton et al., 2015). Es tracta del principal responsable de la neteja del glutamat extracel·lular (Holmseth et al., 2012). S'encarrega de mantenir l'homeòstasi de glutamat en el SNC per tal de prevenir la toxicitat neuronal i la hiperactivitat (Guo et al., 2019). Sota condicions

fisiològiques, aquest transportador s'expressa majoritàriament en astròcits (Takahashi et al., 2015).

El glutamat és alliberat per neurones presinàptiques per exocitosis, la seua concentració augmenta en l'espai sinàptic i comença a captar-se per l'astròcit. El transport de glutamat està mediat per les concentracions de sodi, potassi i protons (H^+). Aquests gradients electroquímics són mantinguts per la Na^+/K^+ ATPasa i proporcionen la força motriu per la recaptació del glutamat representada en la Figura 5 (Rimmele i Rosenberg, 2016).

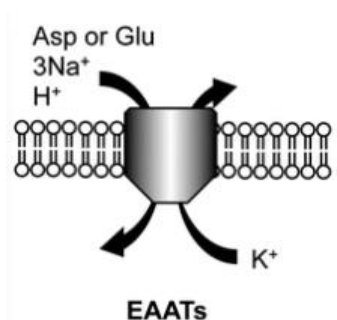


Figura 5. Mecanisme de recaptació del transportador de glutamat. El GLT-1 transporta 3 Na^+ i 1 H^+ cap a l'interior i 1 K^+ cap a l'exterior per cycle. Figura de Takahashi et al., 2015.

Una vegada el glutamat és recaptat per l'astròcit, es converteix en glutamina a través de la glutamina sintetasa. Aquesta és transportada de tornada a la neurona presinàptica i després es converteix en glutamat de nou mitjançant la glutaminasa. Aquest procés també contribueix al metabolisme energètic, ja que el glutamat en l'astròcit pot ser oxidat per obtenir ATP (Lauriat i McInnes, 2007).

S'ha demostrat que l'alteració crònica de l'homeòstasi de glutamat extracel·lular juga un paper clau en la hiperexcitabilitat central de neurones de la medul·la espinal implicades en la neurotransmissió del dolor, la qual cosa porta a diverses formes de dolor neuropàtic (Falnikar et al., 2016). A més, aquesta alteració també està implicada en trastorns psiquiàtrics com ara depressió, ansietat i trastorns relacionats amb la por (Jia et al., 2020).

En rosegadors, s'ha demostrat que l'alteració de cèl·lules glials en el CPF és suficient per induir comportaments depressius (Banar i Duman, 2008; Czéh i Benedetto, 2013). A més, altres investigacions han demostrat que els receptors de glutamat al nucli accumbens (una àrea del cervell afectada tant en el dolor com en la depressió) poden contribuir al desenvolupament de comportaments depressius associats amb el dolor crònic (Benson et al., 2015).

3. OBJECTIUS

El dolor crònic és un problema greu a nivell global. Nombroses investigacions assenyalen a les alteracions en les cèl·lules glials, en especial els astròcits, com a possible causa de la persistència d'aquesta patologia. L'objectiu principal del treball és "avaluar l'efecte del dolor inflamatori tant sobre la població d'astròcits com sobre un dels seus transportadors de glutamat (concretament GLT-1) en el CPF en rates mascles i en rates femelles". Per realitzar-ho, s'ha emprat un model animal de dolor inflamatori per injecció de CFA.

Per tal d'aconseguir aquest objectiu general i amb l'ús de les tècniques explicades a continuació, s'abordaran dos objectius específics:

- Quantificar el nombre d'astròcits en les subàrees del CPF en mascles i femelles en presència i absència de dolor inflamatori.
- Investigar l'expressió de GLT-1 en el CPF en mascles i femelles en presència i absència de dolor inflamatori.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. Animals

Amb l'objectiu de dur a terme aquest projecte d'investigació, s'han emprat 24 femelles i 24 mascles de rates Sprague Dawley (Evigo®, Barcelona, Espanya) de huit setmanes d'edat. Per tal de reduir el nombre de rates emprades i de complir en les 3R, s'han utilitzat els animals control d'un altre protocol de dolor inflamatori (procediment 2020VSC/PEA/0070). Aquests animals s'han mantingut en les instal·lacions del Servei d'experimentació animal de la Universitat de València aplicant cicles inversos de llum/fosc (12/12h, s'encén la llum a les 22:00) a temperatura ambient ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) i humitat controlada al 60%. Els animals es van allotjar en caixes de plàstic estàndard ($42 \times 27 \times 18 \text{ cm}^3$), dividits en grups de 3 o 4 per caixa, amb accés a menjar i aigua *ad libitum* durant el període experimental. Els procediments de manipulació animal descrits en aquest treball han sigut realitzats per personal amb la titulació adequada. La metodologia experimental ha sigut aprovada pel Comitè d'Experimentació i Benestar Animal de la Universitat de València i per l'òrgan competent (codi: 2020VSC/PEA/0070). A més, està realitzada d'acord amb el EEC Council Directive 63/2010, la legislació vigent espanyola (RD 53/2013) i les polítiques de protecció animal.

4.2. Inducció de dolor inflamatori

En primer lloc, els animals van estar una setmana junts per a habitar-se a la seua nova localització i després, se'ls va col·locar agrupats en caixes de plàstic estàndard per iniciar el cicle invertit durant una setmana més. Es deixaren créixer fins l'adolescència tardana o joventut.

Per la inducció de dolor inflamatori s'emprà CFA (Merk). El CFA és un agent immunològic que augmenta la resposta antigènica, es compon de micobacteris inactivats i liofilitzats en una solució oliosa. Els animals es van dividir en quatre grups ($n = 6/\text{grup}$): dos grups van rebre la injecció en la superfície plantar de la pota posterior de 0,1 mL de CFA diluït, mentre que els altres dos van rebre la injecció del mateix volum però en aquest cas de solució salina estèril. Després de 7 dies, els animals van ser sacrificats.

Aquest model de dolor inflamatori ha sigut validat pel nostre grup de recerca en nombroses ocasions mitjançant el test de Von Frey i el test de Hargreaves per tal de

comparar els nivells de nocicepció mecànica i tèrmica respectivament entre animals injectats amb CFA i animals injectats amb solució salina. Tal com cal esperar, s'observa una disminució del llindar de nocicepció en aquells animals tractats amb CFA (Hipólito et al., 2015; Campos-Jurado et al., 2019; Lorente et al., 2021).

4.3. Preparació de la mostra i immunoelectrotransferència.

Els animals, les mostres dels quals estaven destinades a la immunoelectrotransferència, (en concret 12 mascles i 12 femelles) van ser sacrificats mitjançant una sobredosi d'isoflurà. L'extracció dels cervells es va dur a terme al fresc i de cada cervell es va disseccionar el CPF. Per tal d'obtenir les proteïnes d'aquesta àrea, es va homogeneïtzar el teixit en tampó de lisi fred (0,5 mL de tampó de lisi cada 250 mg de teixit; 1% IGEPAL CA-630, 20 mM Tris-HCl pH 8, 130 M NaCl, 10 mM NaF i inhibidor de proteases a l'1%). Els extractes homogeneïtzats es van mantenir en gel durant 30 minuts i posteriorment, les mostres es van centrifugar a 13000 rpm durant 15 minuts a 4°C. Finalment, el sobrenedant es va replegar per determinar la concentració de proteïnes mitjançant l'ús d'un kit d'assaig de proteïnes Bradford (Bio-Rad).

La immunoelectrotransferència s'ha emprat per determinar els nivells d'expressió de les proteïnes d'interès per aquest estudi, en concret gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) i GLT-1, emprant-se GAPDH com a control de càrrega. Amb aquesta finalitat, es van utilitzar gels d'acrilamida d'1 mm al 10%, carregat amb 20 µg de proteïna/mostra. A les mostres es va afegir el tampó de càrrega (350 mM Tris pH 6.8, 30% glicerol, 30% mercaptoetanol, 100 g/L sodi dodecil sulfat i 200 mg/L de bromofenol blau) i es van introduir en un bany d'aigua calenta a 70 °C durant 20 minuts. A més a més, el sistema tampó Bio-Rad Mini Protean (6 g/L base Trizma, 2.88 g/L glicina i 20 g/L sulfat de dodecil de sodi) s'emprà per dur a terme l'electroforesi.

Les proteïnes ja separades per electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE) es van transferir a les membranes de nitrocel·lulosa (Bio-Rad) en un tampó de transferència (3 g/L base Trizma, 1.44 g/L de glicina i 20% metanol) durant 25 min a 25 V. Utilitzant el sistema semisec de transferència Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™. Les membranes es tallaren a l'altura de 50 kDa, ja que les nostres proteïnes d'interès, GAPDH i GLT-1, apareixien en 37 i 60 kDa respectivament ja que, d'aquesta manera, cadascuna pot ser tractada amb els anticossos corresponents de manera independent.

El següent pas va ser bloquejar les unions inespecífiques de les membranes amb llet sense calci, desnatada i assecada al 5% en TBS-Tween20 (TBS-T; 20 mM Tris, 500 mM NaCl i Tween20 al 0,1%) durant 60 min per, a continuació, incubar les membranes durant la nit a 4°C en agitació amb els anticossos primaris corresponents:

- Anticòs de conill anti-GAPDH IgG (Invitrogen) en dilució 1:5000.
- Anticòs de conill anti-GLT-1 IgG (Abcam) en dilució 1:1000.

Posteriorment, les membranes es van rentar tres vegades amb TBS-T 0,1% i es van incubar amb l'anticòs secundari a temperatura ambient durant 60 min.

- Anticòs de cabra anti-conill IgG fosfatasa alcalina (Sigma) en dilució 1:1000.

Per últim, les membranes es van revelar mitjançant el mètode de la fosfatasa alcalina, el qual consisteix en una mescla de “5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium” (BCIP/NBT) 1:2 diluïda en un tampó de fosfatasa alcalina (Bio-Rad).

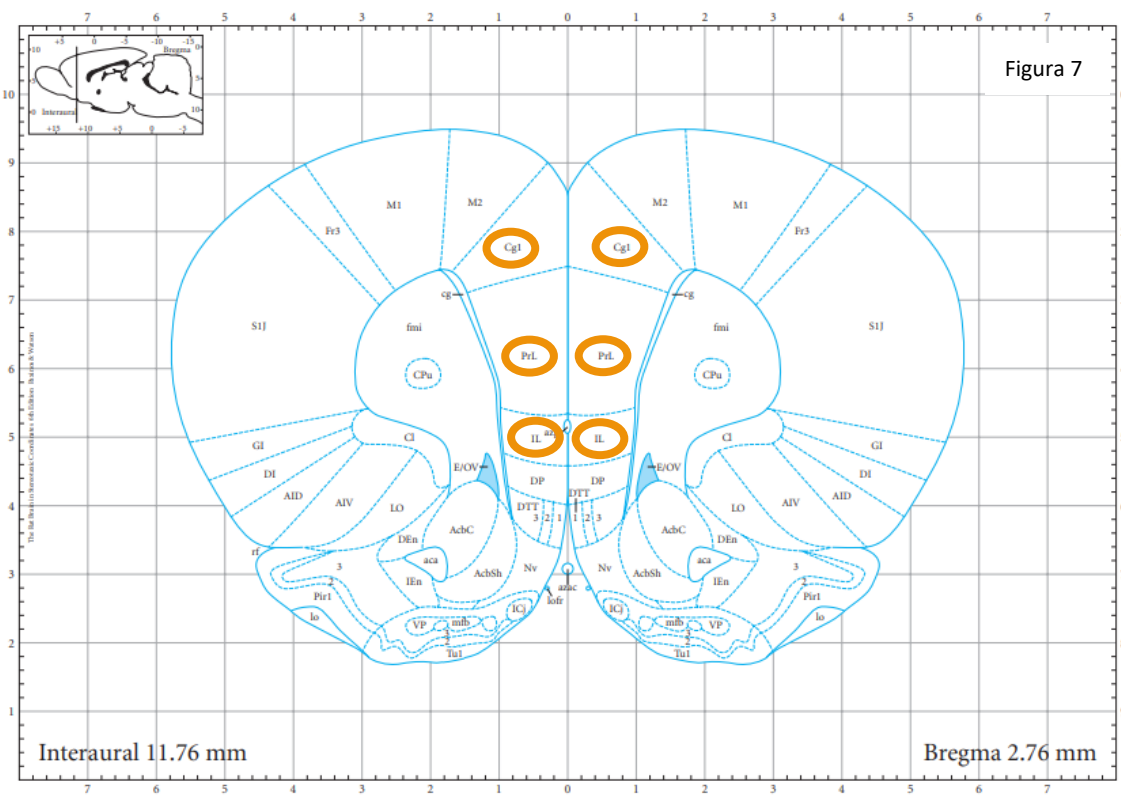
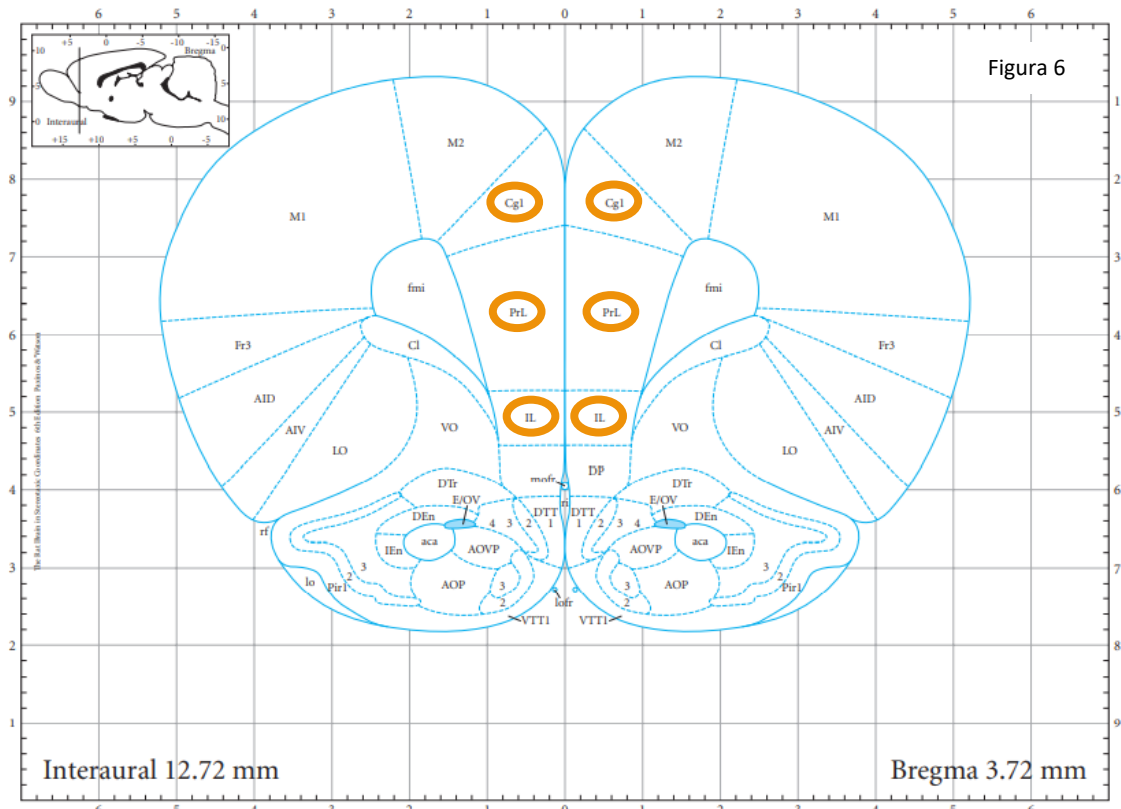
S'ha emprat un total de quatre grups per tal d'assolir els objectius experimentals:

- 6 rates femella amb injecció salina (sense dolor).
- 6 rates femella amb injecció de CFA (amb dolor).
- 6 rates mascle amb injecció salina (sense dolor).
- 6 rates mascle amb injecció de CFA (amb dolor).

4.4. Preparació de la mostra i immunohistoquímica

4.4.1. Selecció de regions cerebrals d'interès

Les estructures d'interès van ser identificades emprant l'atles de Paxinos i Watson (2007). Per cada animal, es quantificà l'expressió de GFAP en el CPF en un tall més anterior (Figura 6) i altre més posterior (Figura 7). En concret, s'observaren les àrees cingulada (CgL), prelímbica (PrL) i infralímbica (IL) en ambdós hemisferis, analitzant-se un total de 12 regions en cada animal (senyalades en les Figures 6 i 7).



Figures 6 i 7. Representació esquemàtica de les zones utilitzades per la quantificació immunohistoquímica de GFAP. La Figura 6 representa el CPF més anterior mentre que la Figura 7 representa el CPF més posterior. Les captures de les microfotografies es van fer en les àrees marcades amb cercles taronja: CgL, PrL i IL. Imatges de Paxinos and Watson, 2007.

4.4.2. Immunohistoquímica de fluorescència

Els animals, els cervells dels quals anaven a usar-se per la immunohistoquímica, van ser sacrificats per sobredosi de pentobarbital i es van perfondre intracardíacament, primer amb PBS 0,1M seguit de paraformaldehid 0,4% en PB 0,1M. Es van extraure els cervells i es van fixar en formol 0,4% en PB 0,1M durant 20h en la nevera. A continuació, es van passar a sacarosa 30% en PB 0,1M. A l'inici, els cervells es mantenen flotant, però als 3 dies aproximadament s'afonen, la qual cosa indica que ja es poden congelar a -80°C. El tall del teixit es va realitzar en un micròtom de congelació amb un espessor de 40 µm i els talls es replegaven en recipients amb sacarosa 30% en PB 0,1M.

La immunohistoquímica de GFAP es va iniciar després de l'elecció dels talls anterior i posterior de CPF de cada animal.

En primer lloc, es van realitzar 3 rentats en agitació amb TBS durant 5 min per, seguidament, bloquejar les unions inespecífiques amb sèrum de cabra al 30% en TBS-Tx (TBS amb 0,03% Triton X-100) durant 60 min a temperatura ambient en agitació. A continuació, es van incubar els talls amb l'anticòs primari diluït en TBS amb 0,3% Triton X-100 i sèrum de cabra (20 µL/mL) durant 16h aproximadament a 4°C.

- Anticòs de conill anti-GFAP IgG (Invitrogen) en dilució 1:250.

El següent pas és rentar en agitació amb TBS (3 x 5 min) i després, incubar els talls amb l'anticòs secundari diluït en TBS amb 0,3% Triton X-100 i sèrum de cabra (20 µL/mL) durant 2h a temperatura ambient, en agitació i en foscor.

- Anticòs de ruc anti-conill IgG alexa fluor plus 488 (Invitrogen) en dilució 1:1000.

Per últim, es realitzen rentats en agitació durant 5 min mantenint la foscor amb TBS (2 x 5 min) i TB (1 x 5 min). Els talls es muntaren en portaobjectes utilitzant H-1000 Vectashield (Palex) com a medi de muntatge amb DAPI.

S'ha dissenyat un total de quatre grups:

- 6 rates femella amb injecció salina (sense dolor).
- 6 rates femella amb injecció de CFA (amb dolor).
- 6 rates mascle amb injecció salina (sense dolor).
- 6 rates mascle amb injecció de CFA (amb dolor).

4.4.3. Anàlisi de l'expressió de GFAP

Es van realitzar microfotografies (441 x 330 µm) a 20x de les diferents mostres emprant un microscopi de fluorescència (Leica Biosystems, Germany). La quantificació de l'expressió de GFAP es va realitzar per "Mean Gray Intensity (MGI)" mitjançant un software de processat d'imatges digitals (ImageJ, NIH, EEUU).

4.5. Mètodes estadístics

Els resultats mostrats estan expressats com mitjana ± error estàndard de la mitjana (SEM). Per tal d'analitzar estadísticament els resultats es va emprar la versió 25.0 del programa informàtic SPSS.

La prova de Levene es va utilitzar per confirmar l'homogeneïtat de la variància de les dades. La prova de t-Student per a mostres independents es va emprar per comparar la mitjana de dos grups.

En tots els anàlisis estadístics realitzats es va fixar un nivell de confiança del 95%, de manera que existeixen diferències significatives quan el valor de la probabilitat p és menor del 5%.

5. RESULTATS

5.1. Quantificació d'astròcits en CPF

En aquest treball, s'ha dut a terme un estudi comparatiu en rates femelles i mascles per tal d'estudiar la quantitat d'astròcits en diverses subàrees del CPF en presència i absència de dolor inflamatori. Amb aquesta finalitat, s'ha realitzat una immunohistoquímica per detectar GFAP, proteïna expressada per astròcits, en regions anterior i posterior de les subàrees del CPF.

5.1.1. Cingulat (CgL)

La quantitat d'astròcits presents en CgL en els mascles es troba representada en la Figura 8. En aquesta es pot observar que ni en talls anteriors (A) ni en els posteriors (B) hi ha diferència significativa entre els valors de MGI obtinguts en les rates mascles que reberen la injecció de CFA i les de salí (test t-Student per mostres independents, $p = 0,862$ i $p = 0,921$ respectivament). Aquest comportament també s'ha observat en les femelles, tal com es mostra en la Figura 9 (test t-Student per mostres independents, $p = 0,210$ i $p = 0,725$ per anterior i posterior respectivament).

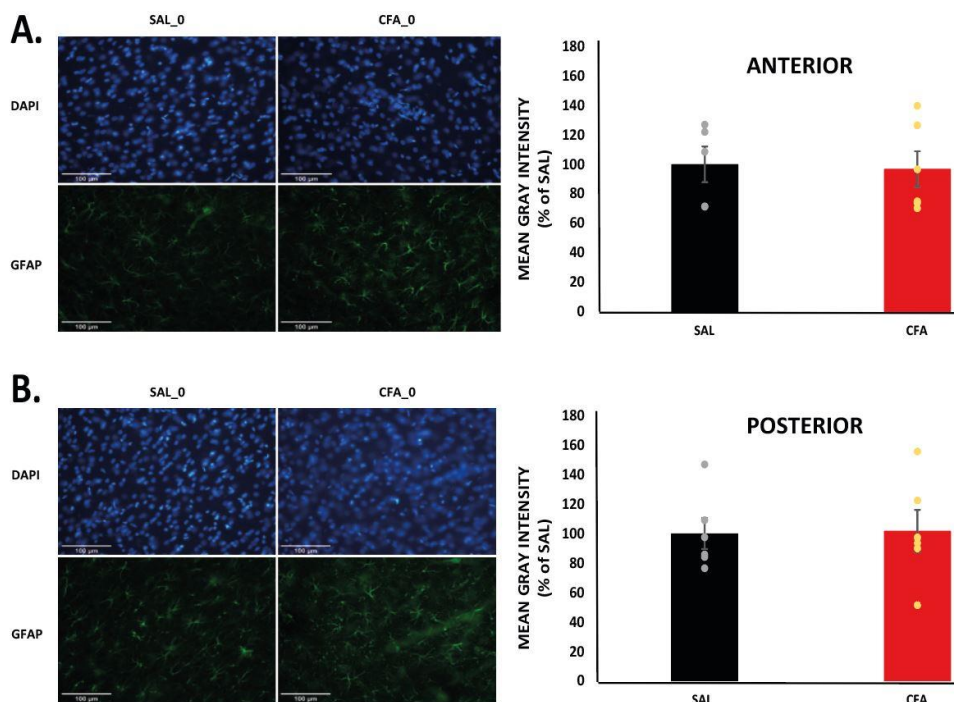


Figura 8. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de CgL en mascles. Absència (SAL, barres negres) o presència de dolor inflamatori (CFA, barres roges). $N = 6/\text{grup}$. Anàlisi estadístic mitjançant test t-Student ($p > 0,05$). No es van detectar diferències significatives entre els grups

experimentals comparats. Les dades estan representades mitjançant la mitjana \pm error típic. La línia blanca representa 100 μm .

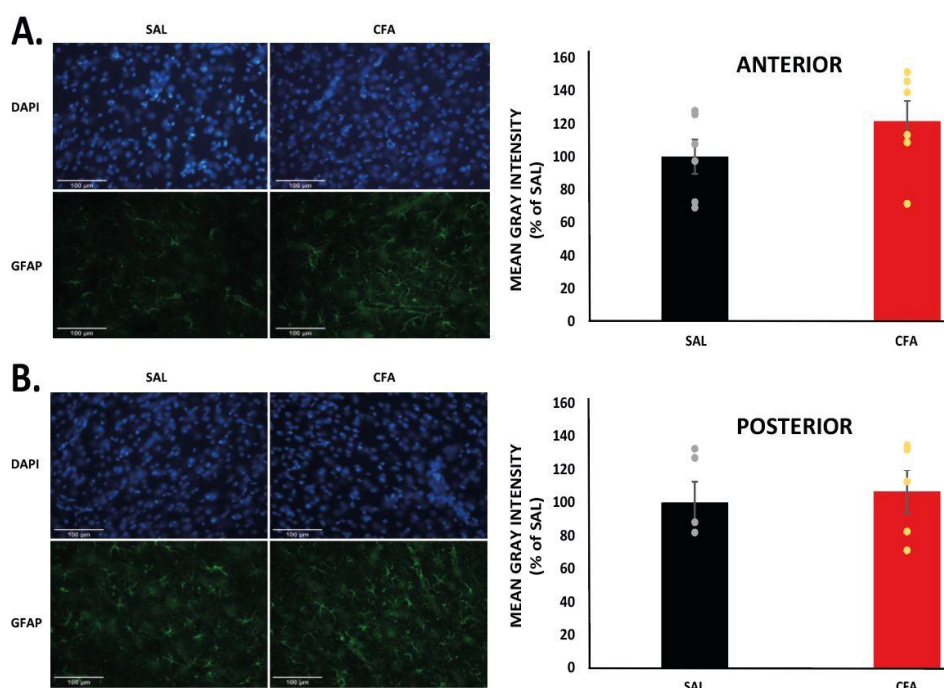


Figura 9. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de CgL en femelles. Absència (SAL, barres negres) o presència de dolor inflamatori (CFA, barres roges). N = 6/grup. Anàlisi estadístic mitjançant test t-Student ($p > 0,05$). No es van detectar diferències significatives entre els grups experimentals comparats. Les dades estan representades mitjançant la mitjana \pm error típic. La línia blanca representa 100 μm .

5.1.2. Prelímbic (PrL)

En les Figures 10 i 11 s'han representat la quantitat d'astròcits en la regió prelímbica en mascles i femelles respectivament. La Figura 10 mostra la inexistència de diferència significativa entre els valors de MGI en mascles en una regió més anterior (A; $p = 0,954$) i en altra més posterior (B; $p = 0,587$) comparant els animals que pateixen dolor inflamatori amb els que no respectivament (test t-Student per mostres independents). En canvi, tal com s'observa en la Figura 11, en la regió anterior de la subàrea PrL (A) té lloc un increment estadísticament significatiu en els animals que van rebre la injecció de CFA ($p = 0,005$). D'altra banda, en la regió posterior (B) no es troba cap diferència significativa ($p = 0,073$).

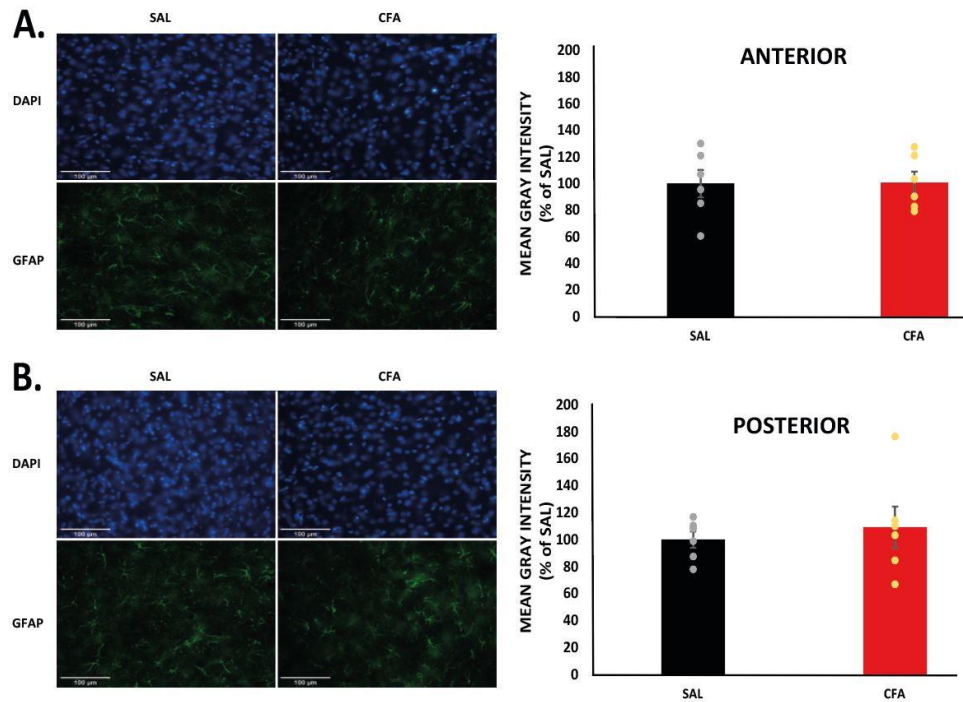


Figura 10. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de PrL en mascles. Absència (SAL, barres negres) o presència de dolor inflamatori (CFA, barres roges). N = 6/grup. Anàlisi estadístic mitjançant test t-Student ($p > 0,05$). No es van detectar diferències significatives entre els grups experimentals comparats. Les dades estan representades mitjançant la mitjana \pm error típic. La línia blanca representa 100 μm .

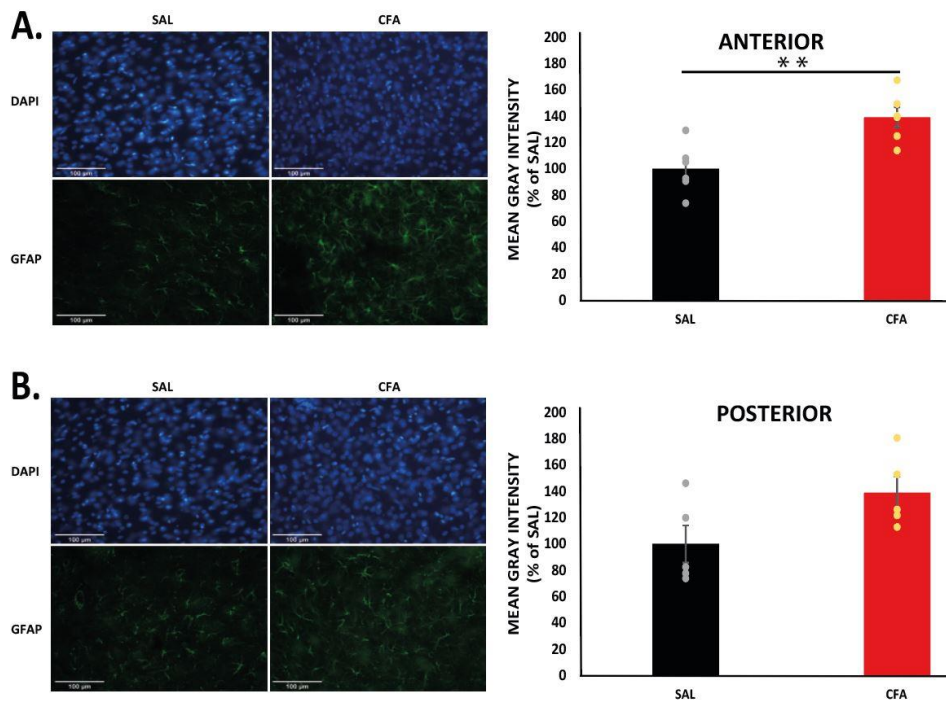


Figura 11. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de PrL en femelles. Absència (SAL, barres negres) o presència de dolor inflamatori (CFA, barres roges). N = 6/grup. Anàlisi

estadístic mitjançant test t-Student. **Indica les diferències significatives entre els grups experimentals amb un p-valor < 0,01. Les dades estan representades mitjançant la mitjana ± error típic. La línia blanca representa 100 µm.

5.1.3. Infralímbic (IL)

Les Figures 12 i 13 representen la quantitat d'astròcits en la subàrea infralímbica en mascles i femelles respectivament. Els resultats han sigut analitzats mitjançant el test t-Student per mostres independents. En el cas dels mascles (Figura 12), no hi ha cap diferència estadísticament significativa comparant els valors de MGI en els animals en presència i absència de dolor inflamatori tant en la regió anterior (A; 0,354) com en la posterior (B; p = 0,389). Únicament s'ha trobat un augment significatiu de la presència d'astròcits en les femelles (Figura 13) que pateixen dolor inflamatori respecte les que no, tant en la regió més anterior (A; p = 0,028) com en la més posterior (B; p = 0,007).

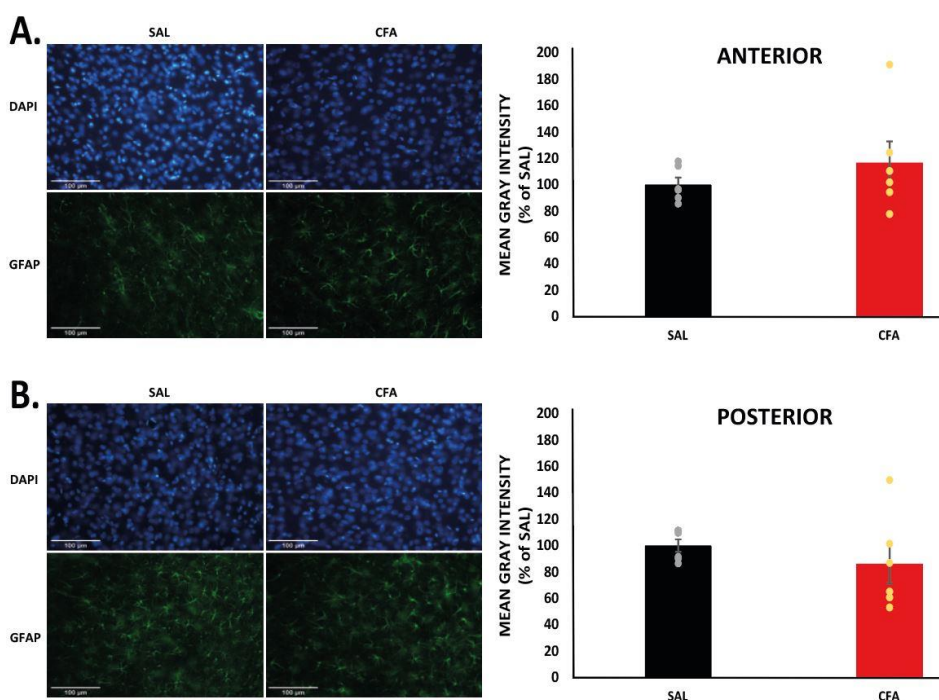


Figura 12. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de IL en mascles. Absència (SAL, barres negres) o presència de dolor inflamatori (CFA, barres roges). N = 6/grup. Anàlisi estadístic mitjançant test t-Student (p > 0,05). No es van detectar diferències significatives entre els grups experimentals comparats. Les dades estan representades mitjançant la mitjana ± error típic. La línia blanca representa 100 µm.

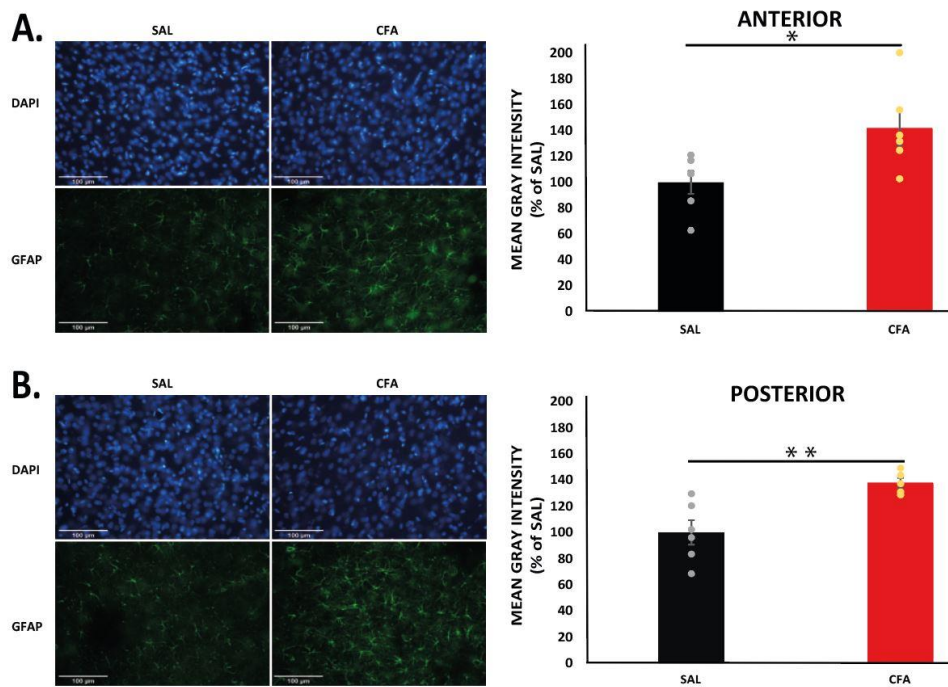


Figura 13. Quantificació d'astròcits en la regió anterior (A) i posterior (B) de PrL en femelles. Absència (SAL, barres negres) o presència de dolor inflamatori (CFA, barres roges). N = 6/grup. *Indica les diferències significatives entre els grups experimentals amb un p-valor < 0,05, **p-valor < 0,01 (test t-Student per mostres independents). Les dades estan representades mitjançant la mitjana ± error típic. La línia blanca representa 100 µm.

5.2. Expressió de GLT-1 en CPF

El transportador de glutamat 1 (GLT-1) és el principal transportador de glutamat del sistema nerviós, és essencial per la regulació de l'homeòstasi del glutamat i s'expressa majoritàriament en la membrana dels astròcits. Els nivells d'expressió de GLT-1 en CPF s'han mesurat tant en femelles com en mascles. La Figura 14A mostra que en mascles no es va detectar diferències significatives en l'expressió de GLT-1 en CPF quan les rates pateixen dolor inflamatori (test t-Student per mostres independents, $p = 0,117$). En canvi, la Figura 14B mostra un increment significatiu en l'expressió de GLT-1 en el CPF de femelles que segueixen el protocol de dolor inflamatori (test t-Student per mostres independents, $p = 0,03$).

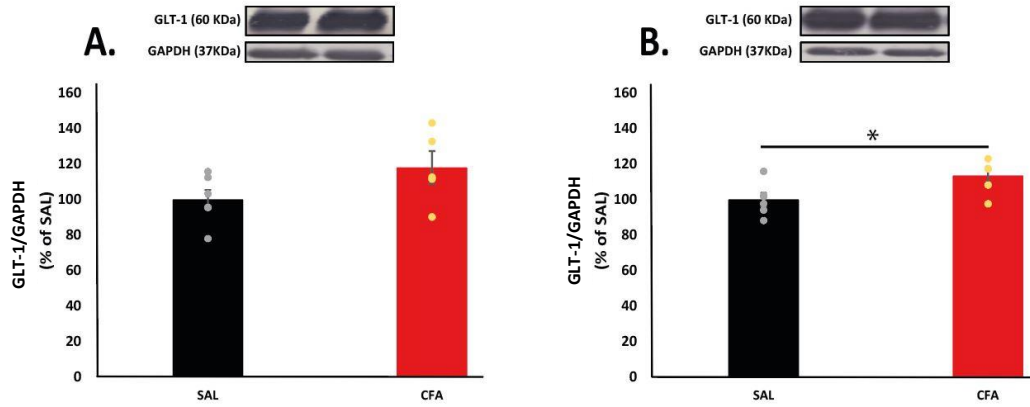


Figura 14. Nivells d'expressió de GLT-1 en CPF en mascles (A) i en femelles (B). Absència (SAL, barres negres) o presència de dolor inflamatori (CFA, barres roges). N = 6/grup. *Indica les diferències significatives entre els grups experimentals amb un p-valor < 0,05 (test t-Student per mostres independents). Les dades estan representades mitjançant la mitjana ± error típic.

6. DISCUSSIÓ

L'aparició de dolor crònic pot ser una conseqüència de patir alteracions en cèl·lules gials, en concret en els astròcits. Aquestes cèl·lules tenen un paper fonamental en la regulació i el manteniment de l'homeòstasi del glutamat, el qual és un neurotransmissor excitador involucrat en la via del dolor i és essencial pel correcte funcionament del sistema nerviós (Ji et al., 2019). Els astròcits, mitjançant transportadors com el GLT-1, s'encarreguen de la recaptació de glutamat a nivell de les sinapsis amb l'objectiu d'evitar una acumulació de glutamat en el medi extracel·lular i per tant, una hiperexcitació neuronal (Guo et al., 2019). La persistència d'un estímul dolorós i d'alteracions en astròcits poden modificar l'estructura i la funcionalitat del cervell conduint a la cronificació del dolor (Mayegowda i Thomas, 2019).

En aquest Treball de Fi de Grau, es compara el nivell d'astròcits presents en diverses àrees del CPF i l'expressió de GLT-1 en rates a les quals es va induir dolor inflamatori per injecció amb CFA, front a les rates control que se'ls ha injectat solució salina. A més, també s'ha realitzat el treball des d'una perspectiva de gènere, és a dir, els estudis s'han dut a terme tant en rates femella com en rates mascle. D'aquesta manera podem avaluar com influeix la presència de dolor inflamatori en la població d'astròcits i en la seua capacitat de regular l'homeòstasi del glutamat mitjançant GLT-1 tant en rates femella com en rates mascle.

Els principals resultats senyalen que la presència de dolor inflamatori en rates femelles indueix un augment de l'expressió de GFAP, i per tant, un augment en la quantitat d'astròcits tant en la regió PrL (part anterior) com en la IL (part anterior i posterior). D'altra banda, el dolor inflamatori no produeix canvis en l'expressió de GFAP en rates mascles en cap de les regions estudiades del CPF. A més a més, pel que fa al GLT-1, sols en femelles hem observat un augment significatiu en l'expressió d'aquesta proteïna en astròcits del CPF derivat de la presència de dolor inflamatori. En conjunt, les nostres dades mostren *a priori* efectes de dolor sobre el nombre d'astròcits i l'homeòstasi del glutamat dependents del sexe dels individus.

Un punt que cal destacar dels resultats és que, en relació al nivell d'astròcits al còrtex prefrontal PrL, només s'observen diferències estadísticament significatives en la part més anterior. Açò podria ser de gran rellevància, ja que estudis previs i recopilats per Kummer et al. (2020) mostren un comportament diferenciat entre el CPF anterior i el posterior

atenent a les connexions d'aquestes subregions amb el sistema de control de dolor. De manera molt breu, les neurones del PrL anterior mostren una elevada taxa de activació després d'un estímul nociu, encara que un input nociceptiu mantingut en el temps suprimeix l'activitat a l'àrea. A més a més, aquesta revisió també mostra com el PrL i el IL tenen una activitat oposada al CgL front al dolor crònic, cosa que explicaria les diferències en els resultats observades entre les subàrees del CPF.

Els astròcits són considerats reguladors essencials de la funció i la resposta a lesions en el cervell i en la medul·la espinal, tan mateix, es coneix molt poc sobre les diferències regionals que existeixen (Tsai et al., 2012). El GLT-1, transportador de glutamat ubicat en la membrana dels astròcits, és el responsable de més del 90% de la captació de glutamat al SNC i s'expressa en nivells 10 vegades més baixos en medul·la espinal comparat en cervell. En canvi, s'observen resultats més elevats de GFAP en medul·la espinal en comparació amb els astròcits cerebrals (Yoon et al., 2017).

Després de l'estimulació nociva, el fenotip, les funcions i l'expressió gènica dels astròcits poden experimentar un canvi significatiu, conegut com a *astrogliosi reactiva*. Com s'observa en la Figura 15, les alteracions poden incloure canvis morfològics (per exemple hipertròfia), proliferació o augment en l'expressió de GFAP (Li et al., 2019). Durant aquest procés, els astròcits es diferencien en subconjunts, incloent astròcits reactius i astròcits que formen cicatrius. Els astròcits reactius es poden dividir en astròcits A1 tòxics, que indueixen la mort ràpida de neurones, i astròcits neuroprotectors A2, que promouen la supervivència neuronal i la reparació de teixits (Miller, 2018).

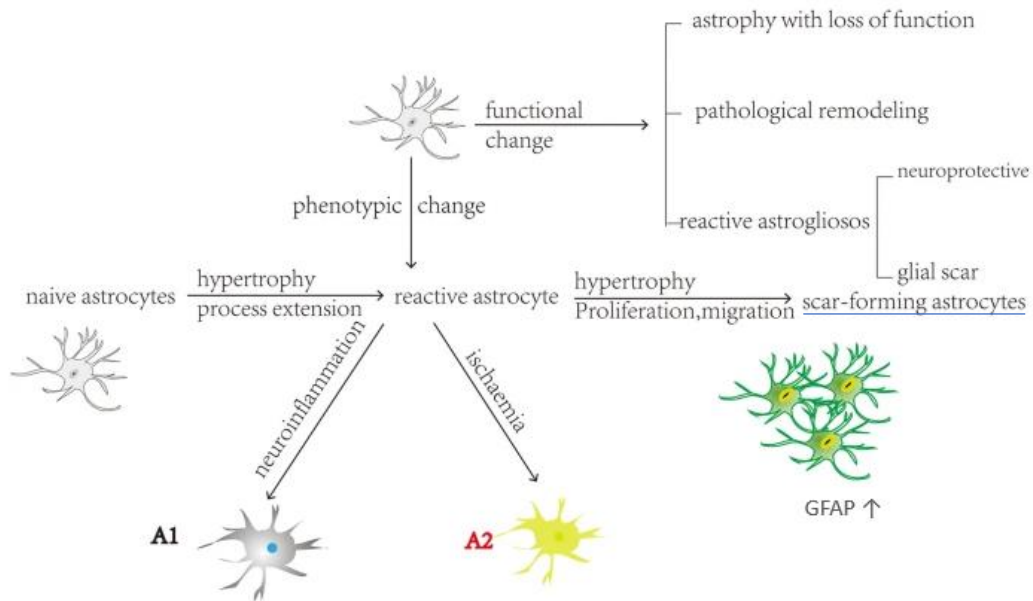


Figura 15. Canvis en la morfologia i en la funció dels astròcits després d'estímuls dolorosos. Basant-se en els canvis fenotípics dels astròcits, els astròcits es poden dividir en astròcits reactius i formadors de cicatrius. Els astròcits reactius es poden classificar més per A1 i A2. Els astròcits experimenten una sèrie de canvis típics com la hipertròfia o l'augment d'expressió de GFAP, que formen les característiques fenotípiques dels astròcits reactius. A partir d'aquest moment, poden proliferar, migrar i transformar-se en astròcits formadors de cicatrius. Imatge extreta de Li et al., 2019.

Com s'ha mencionat anteriorment, la persistència d'un estímul dolorós produeix canvis en l'expressió gènica i indueix la proliferació dels astròcits reactius. Aquest fet, s'ha relacionat en lesions en medul·la espinal i presència d'inflamació (Ji et al., 2018). Degut a que hem observat un augment de l'expressió de GFAP en el nostre estudi en diverses regions del CPF de femelles que pateixen dolor inflamatori, podem pensar que tal vegada en el CPF també poden proliferar astròcits reactius com a conseqüència d'un estímul dolorós.

D'altra banda, alguns estudis han demostrat que els astròcits activats en regions cerebrals relacionades amb la regulació de l'emoció (el còrtex somatosensorial primari (S1), el còrtex cingulat anterior (ACC), el còrtex prefrontal medial i l'hipocamp) estan associats amb la disfunció emocional sota els estats del dolor crònic (Kim et al., 2016; Eto et al., 2018).

Encara que és ben sabut que hi ha un alt grau de comorbiditat entre el dolor crònic i els trastorns d'ànim i l'ansietat, els mecanismes implicats en aquests no són clars (Benson et al., 2015). En rosegadors, la pèrdua glial en el còrtex prefrontal es va demostrar que era suficients per induir comportaments similars als depressius (Jia et al., 2020). A més,

models animals (en mascles i femelles) de trastorns d'estat d'ànim incloent depressió, estrès i ansietat, han revelat disminucions en GFAP en el còrtex frontal (Kim et al., 2018). Comparant aquesta informació amb els resultats d'aquest treball podem dir que la relació entre el dolor crònic i els trastorns d'ànim no venen regulats pels astròcits presents en CPF, ja que s'observen comportaments contraris. En canvi, en ratolins exposats a alcohol s'ha vist un augment de l'expressió de GFAP en el CPF (Cantacorps et al., 2017), açò implica que tant en dolor inflamatori com en consum d'alcohol pareix que hi ha una activació d'astròcits que potencia la comorbiditat entre ambdós, tal com estudis previs en el nostre grup ja han mostrat (Campos-Jurado et al., 2020; Lorente et al., 2021).

Així mateix, les alteracions en l'activitat de GLT-1 també s'han relacionat amb el dolor persistent, encara que la importància d'aquests canvis no és ben compresa. En rates injectades amb CFA es va observar en medul·la espinal un increment en l'expressió de GLT-1 inicial que gradualment disminueix (Guo et al., 2019). Els resultats del nostre estudi també mostren un increment de l'expressió de GLT-1 en femelles amb dolor inflamatori. Aquesta observació pot implicar que les rates emprades pel nostre estudi es trobaven en l'etapa inicial després de la injecció de CFA i per això s'observa un augment de GLT-1 (Guo et al., 2019) o bé, les alteracions d'aquest transportador de glutamat presenten patrons diferents en cervell i medul·la espinal.

L'estrès crònic i el comportament depressiu també poden afectar a la capacitat de recaptació de glutamat pel GLT-1; en conseqüència el glutamat pot acumular-se en la sinapsis i produir excitotoxicitat (Haroon i Miller, 2017). Similar a la regulació baixa de GFAP associada amb trastorns de l'estat d'ànim, s'ha observat una disminució en l'expressió de GLT-1 en el còrtex orbitofrontal que s'associa àmpliament amb depressió i estrès (Wang et al., 2017). Immediatament després de l'exposició a un estímul estressant, l'expressió de GLT-1 pot ser augmentada temporalment, però després és seguida d'una disminució prolongada (Kim et al., 2018). La capacitat de recaptar glutamat del medi extracel·lular es veu alterada després del consum de drogues i durant l'abstinència. S'ha postulat que aquest desequilibri en la regulació glutamatèrgica, en el cas del trastorn per consum de drogues, és causada parcialment per adaptacions a llarg termini en els astròcits del nucli accumbens (incloent la disminució del transportador glutamat GLT-1) i, en conseqüència, s'augmenta el risc de recaiguda en el consum de la droga (Kruyer i Kalivas, 2021).

Els resultats d'aquest treball han mostrat que els efectes del dolor sobre els paràmetres estudiats són sexe-dependents, ja que únicament trobem diferències significatives en femelles. Diversos estudis mantenen que el dolor crònic té major prevalença en dones; aquest resultat es veu recolzat amb diferents treballs duts a terme emprant models de rosegadors amb condicions inflamatòries on es demostra que les femelles tenen una major sensibilitat al dolor en comparació als mascles (Dahlhamer et al., 2018; Ro et al., 2019). Encara que el mecanisme no està clar, es pensa que poden haver diferències en el processament del dolor a nivell central (Fillingim et al., 2009), ja que s'ha observat l'activació d'àrees específiques depenent del sexe, per exemple: en presència d'un estímul elèctric hi ha una major activació del CPF en femelles que en mascles (Straube et al., 2008). Fins ara no hi ha massa articles que estudien el perquè d'aquesta diferència quan és un problema greu, ja que les dones representen aproximadament la meitat de la població global.

Aquestes diferències no apareixen sols en el dolor crònic, també es veuen reflectides en les seues comorbiditats. Els estudis epidemiològics realitzats en diverses cultures mostren constantment que, començant en la pubertat, la depressió i els trastorns d'ansietat són dues o tres vegades més comuns en dones que en homes (Leibenluft, 1999). La diferències de gènere poden ser resultat d'un tipus específic de depressió associada amb símptomes somàtics com alteracions de son i fatiga acompanyades de dolor i ansietat (Silverstein, 2002). Entendre els efectes del gènere en els paràmetres epidemiològics seria fonamental per promoure el reconeixement i el tractament efectiu dels trastorns d'ansietat i les seues comorbiditats (McLean et al., 2011).

L'evidència clínica i preclínica suggereix que les diferències de sexe també modulen el consum de drogues, així com la transició cap als estats patològics promoguts per les drogues, com ara en les etapes inicials de consum de drogues i en addicció (Sanchis-Segura i Becker, 2016). Canvis en la farmacocinètica i en la farmacodinàmica de la droga poden promoure aquest fenomen.

Tal com hem descrit, la diferència entre sexes tant en el dolor crònic com en algunes de les seues comorbiditats està fonamentada en diversos estudis. El meta-anàlisi realitzat per Cragg A i col·legues senyala que la major part dels estudis mostren diferències en base al gènere, encara que els resultats són heterogenis (Cragg et al., 2019). Per aquest motiu és necessari realitzar més estudis per analitzar les bases neurobiològiques de les diferències de gènere. Seria interessant començar a tenir-ho més present i dirigir noves

investigacions cap aquest àmbit amb l'objectiu de cercar tractaments dirigits i individualitzats, en dianes terapèutiques noves i més específiques depenent del sexe del pacient, per tal d'obtenir una millor resposta terapèutica.

7. CONCLUSIONS

En conjunt de les dades obtingudes al present TFG, les conclusions més importants són:

- La resposta al dolor inflamatori en astròcits i en la seua expressió de GLT-1 és sexe-dependent, ja que sols es troben diferències significatives en femelles.
- El dolor inflamatori és capaç d'augmentar la quantitat d'astròcits, estudiada mitjançant l'expressió de GFAP, en certes àrees cerebrals de les femelles.
- L'expressió de GLT-1 es veu incrementada en certes àrees cerebrals de les femelles com a conseqüència del dolor inflamatori.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Alasmari F, Goodwani S, McCullumsmith RE, Sari Y. Role of glutamatergic system and mesocorticolimbic circuits in alcohol dependence. *Prog Neurobiol.* 2018;171:32-49. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.10.001>
- 2) Banasr M, Duman RS. Glial Loss in the Prefrontal Cortex Is Sufficient to Induce Depressive-like Behaviors. *Biological Psychiatry.* 2008;64(10):863-70. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.008>
- 3) Bär K-J, Wagner G, Koschke M, Boettger S, Boettger MK, Schlösser R, et al. Increased Prefrontal Activation During Pain Perception in Major Depression. *Biological Psychiatry.* 2007;62(11):1281-7. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.02.011>
- 4) Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell.* 2009;139(2):267-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- 5) Beesdo K, Hoyer J, Jacobi F, Low NCP, Höfler M, Wittchen H-U. Association between generalized anxiety levels and pain in a community sample: Evidence for diagnostic specificity. *Journal of Anxiety Disorders.* 2009;23(5):684-93. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2009.02.007>
- 6) Benson C, Mifflin K, Kerr B, Jesudasan SJB, Dursun S, Baker G. Biogenic Amines and the Amino Acids GABA and Glutamate: Relationships with Pain and Depression. *Pain in Psychiatric Disorders.* 2015;30:67-79. <https://doi.org/10.1159/000435933>
- 7) Bilevicius E, Sommer JL, Keough MT, El-Gabalawy R. An Examination of Comorbid Generalized Anxiety Disorder and Chronic Pain on Substance Misuse in a Canadian Population-Based Survey. *Can J Psychiatry.* 2020;65(6):418-25. <https://doi.org/10.1177/0706743719895340>
- 8) Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2006;17(5):592-604. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2006.10.008>

- 9) Bräscher A-K, Becker S, Hoeppli M-E, Schweinhardt P. Different Brain Circuitries Mediating Controllable and Uncontrollable Pain. *J Neurosci*. 2016;36(18):5013-25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1954-15.2016>
- 10) Campos-Jurado Y, Igual-López M, Padilla F, Zornoza T, Granero L, Polache A, et al. Activation of MORs in the VTA induces changes on cFos expression in different projecting regions: Effect of inflammatory pain. *Neurochemistry International*. 2019;131:104521. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104521>
- 11) Campos-Jurado Y, Lorente JD, González-Romero JL, Granero L, Polache A, Hipólito L. Impaired alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in an inflammatory pain model: behavioral implications in male rats. *PAIN*. 2020;161(9):2203-11. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001915>
- 12) Cantacorps L, Alfonso-Loeches S, Moscoso-Castro M, Cuitavi J, Gracia-Rubio I, López-Arnau R, et al. Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring mice. *Neuropharmacology*. 2017;123:368-84. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.05.034>
- 13) Cragg A, Hau JP, Woo SA, Kitchen SA, Liu C, Doyle-Waters MM, et al. Risk Factors for Misuse of Prescribed Opioids: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of Emergency Medicine*. 2019;74(5):634-46. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2019.04.019>
- 14) Csupak B, Sommer JL, Jacobsohn E, El-Gabalawy R. A population-based examination of the co-occurrence and functional correlates of chronic pain and generalized anxiety disorder. *Journal of Anxiety Disorders*. 2018;56:74-80. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2018.04.005>
- 15) Czéh B, Di Benedetto B. Antidepressants act directly on astrocytes: Evidences and functional consequences. *European Neuropsychopharmacology*. 2013;23(3):171-85. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.04.017>
- 16) Dahlhamer J, Lucas J, Zelaya, C, Nahin R, Mackey S, DeBar L, et al. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018;67(36):1001-6.

<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>

- 17) Davis KD, Moayed M. Central Mechanisms of Pain Revealed Through Functional and Structural MRI. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(3):518-34. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9386-8>
- 18) Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler E, Zachariou V, Narita M. Epigenetic Mechanisms of Chronic Pain. *Trends Neurosci.* 2015;38(4):237-46. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.02.001>
- 19) Elman I, Borsook D. Common Brain Mechanisms of Chronic Pain and Addiction. *Neuron.* 2016;89(1):11-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.027>
- 20) Eto K, Kim SK, Takeda I, Nabekura J. The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies. *Neuroscience Research.* 2018;126:3-8. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.08.009>
- 21) Falnikar A, Hala TJ, Poulsen DJ, Lepore AC. GLT1 overexpression reverses established neuropathic pain-related behavior and attenuates chronic dorsal horn neuron activation following cervical spinal cord injury. *Glia.* 2016;64(3):396-406. <https://doi.org/10.1002/glia.22936>
- 22) Feingold D, Brill S, Goor-Aryeh I, Delayahu Y, Lev-Ran S. The association between severity of depression and prescription opioid misuse among chronic pain patients with and without anxiety: A cross-sectional study. *Journal of Affective Disorders.* 2018;235:293-302. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.04.058>
- 23) Fenton BW, Shih E, Zolton J. The neurobiology of pain perception in normal and persistent pain. *Pain Management.* 2015;5(4):297-317. <https://doi.org/10.2217/pmt.15.27>
- 24) Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL. Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. *J Pain.* 2009;10(5):447-85. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.12.001>
- 25) Fillingim RB. Sex, gender, and pain: Women and men really are different. *Current*

- Review of Pain. 2000;4(1):24-30. <https://doi.org/10.1007/s11916-000-0006-6>
- 26) Gegelashvili G, Bjerrum OJ. Glutamate transport system as a key constituent of glutamosome: Molecular pathology and pharmacological modulation in chronic pain. *Neuropharmacology*. 2019;161:107623. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.029>
- 27) Gegelashvili G, Bjerrum OJ. Glutamate Transport System as a Novel Therapeutic Target in Chronic Pain: Molecular Mechanisms and Pharmacology. *Adv Neurobiol*. 2017;16:225-53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4_11
- 28) Goldstein RZ, Volkow ND. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(11):652-69. <https://doi.org/10.1038/nrn3119>
- 29) Guo W, Imai S, Zou S, Yang J, Watanabe M, Wang J, et al. Altered glial glutamate transporter expression in descending circuitry and the emergence of pain chronicity. *Mol Pain*. 2019;15:1744806918825044. <https://doi.org/10.1177/1744806918825044>
- 30) Haroon E, Miller AH. Inflammation Effects on Brain Glutamate in Depression: Mechanistic Considerations and Treatment Implications. En: Dantzer R, Capuron L, editors. *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citad 6 juliol 2021]. p. 173-98. (Current Topics in Behavioral Neurosciences). https://doi.org/10.1007/7854_2016_40
- 31) Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 2014;62(9):1377-91. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>
- 32) Hipólito L, Wilson-Poe A, Campos-Jurado Y, Zhong E, Gonzalez-Romero J, Virag L, et al. Inflammatory Pain Promotes Increased Opioid Self-Administration: Role of Dysregulated Ventral Tegmental Area μ Opioid Receptors. *J Neurosci*. 2015;35(35):12217-31. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1053-15.2015>

- 33) Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, Mylonakou MN, et al. The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. *J Neurosci*. 2012;32(17):6000-13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5347-11.2012>
- 34) Humo M, Lu H, Yalcin I. The molecular neurobiology of chronic pain-induced depression. *Cell Tissue Res*. 2019;377(1):21-43. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03003-z>
- 35) Illes P, Rubini P, Yin H, Tang Y. Impaired ATP Release from Brain Astrocytes May be a Cause of Major Depression. *Neurosci Bull*. 2020;36(11):1281-4. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00494-7>
- 36) Ji R-R, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain*. 2013;154(Supplement 1):S10-28. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.022>
- 37) Ji R-R, Donnelly CR, Nedergaard M. Astrocytes in chronic pain and itch. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(11):667-85. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0218-1>
- 38) Ji R-R, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*. 2018;129(2):343-66. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>
- 39) Jia D, Gao G-D, Liu Y, He S-M, Zhang X-N, Zhang Y-F, et al. TNF- α involves in altered prefrontal synaptic transmission in mice with persistent inflammatory pain. *Neuroscience Letters*. 2007;415(1):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.12.032>
- 40) Jia Y-F, Wininger K, Ho AM-C, Peyton L, Baker M, Choi D-S. Astrocytic Glutamate Transporter 1 (GLT1) Deficiency Reduces Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Mice. *Front Behav Neurosci*. 2020;14:57. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00057>
- 41) Kalivas PW, LaLumiere R, Knackstedt L, Shen H. Glutamate Transmission in Addiction. *Neuropharmacology*. 2009;56(Suppl 1):169-73. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.011>

- 42) Kim R, Healey KL, Sepulveda-Orengo MT, Reissner KJ. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018;87:126-46. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.10.002>
- 43) Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, et al. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1983-97. <https://doi.org/10.1172/JCI82859>
- 44) Kruyer A, Kalivas PW. Astrocytes as cellular mediators of cue reactivity in addiction. *Curr Opin Pharmacol*. 2021;56:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.07.009>
- 45) Kummer KK, Mitrić M, Kalpachidou T, Kress M. The Medial Prefrontal Cortex as a Central Hub for Mental Comorbidities Associated with Chronic Pain. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):3440. <https://doi.org/10.3390/ijms21103440>
- 46) Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*. 2010;16(11):1258-66. <https://doi.org/10.1038/nm.2231>
- 47) Lauriat TL, McInnes LA. EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. *Mol Psychiatry*. 2007;12(12):1065-78. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002065>
- 48) Leibenluft E. *Gender Differences in Mood and Anxiety Disorders: From Bench to Bedside*. American Psychiatric Pub; Washington DC; ISBN 978-0-88048-958-4; 1999.
- 49) Lewis M. Addiction and the Brain: Development, Not Disease. *Neuroethics*. 2017;10(1):7-18. <https://doi.org/10.1007/s12152-016-9293-4>
- 50) Li T, Chen X, Zhang C, Zhang Y, Yao W. An update on reactive astrocytes in chronic pain. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(1):140. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1524-2>

- 51) Lorente JD, Cuitavi J, Campos-Jurado Y, Montón-Molina R, González-Romero JL, Hipólito L. Kappa opioid receptor blockade in NAc shell prevents sex-dependent alcohol deprivation effect induced by inflammatory pain. PAIN [Internet]. 2021 [citat 6 juliol 2021];Articles in Press. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002332>
- 52) Manhapra A, Becker WC. Pain and Addiction. Medical Clinics of North America. 2018;102(4):745-63. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.02.013>
- 53) Mayegowda SB, Thomas C. Glial pathology in neuropsychiatric disorders: a brief review. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2019;30(4). <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0120>
- 54) McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. Journal of Psychiatric Research. 2011;45(8):1027-35. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.03.006>
- 55) Miller SJ. Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. Front Cell Neurosci [Internet]. 2018 [citat 6 juliol 2021];12. Disponible a: <https://internal-journal.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00401/full>
- 56) Mogil JS, Wilson SG, Chesler EJ, Rankin AL, Nemmani KVS, Lariviere WR, et al. The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans. PNAS. 2003;100(8):4867-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730053100>
- 57) Nicholson B, Verma S. Comorbidities in Chronic Neuropathic Pain. Pain Medicine. 2004;5(suppl_1):S9-27. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2004.04019.x>
- 58) Ong W-Y, Stohler CS, Herr DR. Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. Mol Neurobiol. 2019;56(2):1137-66. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1130-9>
- 59) Peng L, Verkhatsky A, Gu L, Li B. Targeting astrocytes in major depression. Expert Review of Neurotherapeutics. 2015;15(11):1299-306. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1095094>

- 60) Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology*. 2017;38(1):5-19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- 61) Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020;161(9):1976-82. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- 62) Rajkowska G, A. Stockmeier C. Astrocyte Pathology in Major Depressive Disorder: Insights from Human Postmortem Brain Tissue. *Current Drug Targets*. 2013;14(11):1225-36. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990156>
- 63) Reid KJ, Harker J, Bala MM, Truyers C, Kellen E, Bekkering GE, et al. Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. *Current Medical Research and Opinion*. 2011;27(2):449-62. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.545813>
- 64) Rimmele TS, Rosenberg PA. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochemistry International*. 2016;98:19-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.04.010>
- 65) Ro JY, Zhang Y, Tricou C, Yang D, da Silva JT, Zhang R. Age and Sex Differences in Acute and Osteoarthritis-Like Pain Responses in Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(8):1465-72. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz186>
- 66) Sanchis-Segura C, Becker J. WHY WE SHOULD CONSIDER SEX (AND STUDY SEX DIFFERENCES) IN ADDICTION RESEARCH. *Addict Biol*. 2016;21(5):995-1006. <https://doi.org/10.1111/adb.12382>
- 67) Scofield MD, Kalivas PW. Astrocytic Dysfunction and Addiction: Consequences of Impaired Glutamate Homeostasis. *Neuroscientist*. 2014;20(6):610-22. <https://doi.org/10.1177%2F1073858413520347>
- 68) Seminowicz DA, Moayedi M. The dorsolateral prefrontal cortex in acute and chronic pain. *J Pain*. 2017;18(9):1027-35. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2017.03.008>

- 69) Silverstein B. Gender Differences in the Prevalence of Somatic Versus Pure Depression: A Replication. *AJP*. 2002;159(6):1051-2. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.6.1051>
- 70) Straube T, Schmidt S, Weiss T, Mentzel H, Miltner WHR. Sex differences in brain activation to anticipated and experienced pain in the medial prefrontal cortex. *Hum Brain Mapp*. 2008;30(2):689-98. <https://doi.org/10.1002/hbm.20536>
- 71) Sun J-D, Liu Y, Yuan Y-H, Li J, Chen N-H. Gap Junction Dysfunction in the Prefrontal Cortex Induces Depressive-Like Behaviors in Rats. *Neuropsychopharmacol*. 2012;37(5):1305-20. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.319>
- 72) Takahashi K, Foster JB, Lin C-LG. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(18):3489-506. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1937-8>
- 73) Tsai H-H, Li H, Fuentealba LC, Molofsky AV, Taveira-Marques R, Zhuang H, et al. Regional Astrocyte Allocation Regulates CNS Synaptogenesis and Repair. *Science*. 2012;337(6092):358-62. <https://doi.org/10.1126/science.1222381>
- 74) Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1545-602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)
- 75) Wang Q, Jie W, Liu J-H, Yang J-M, Gao T-M. An astroglial basis of major depressive disorder? An overview. *Glia*. 2017;65(8):1227-50. <https://doi.org/10.1002/glia.23143>
- 76) Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 1 novembre 2010;120(11):3742-4. <https://doi.org/10.1172/JCI45178>
- 77) Yoon H, Walters G, Paulsen AR, Scarisbrick IA. Astrocyte heterogeneity across the brain and spinal cord occurs developmentally, in adulthood and in response to

demyelination.

PLOS

ONE.

2017;12(7):e0180697.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180697>