



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
TOXICOLOGÍA**

**Estudio de la neuropatía periférica dolorosa inducida por paclitaxel y su
relación con el sensor del retículo endoplásmico IRE1 α**

Alumno: Andrés Luévano Luna

Tutor: Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino

Cotutor: Dr. Paulino Barragán Iglesias

Comité tutorial: Dra. Raquel Guerrero Alba

Fecha: 21/06/23

Aguascalientes, Ags.



CARTA DE VOTO APROBATORIO

COMITÉ TUTORAL

Mtro. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **ANDRÉS LUÉVANO LUNA** con ID 165089 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LA NEUROPATÍA PERIFÉRICA DOLOROSA INDUCIDA POR PACLITAXEL Y SU RELACIÓN CON EL SENSOR DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO IRE1α** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *el* pueda proceder a imprimir *la* tesis así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 29 de Mayo de 2023.


Bruno Antonio Marchel Cancino
Tutor de tesis


Asesor de tesis


Paulino Barragán Iglesias
Co-Tutor de tesis



c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 12/06/2023

NOMBRE: Andrés Luévano Luna ID 165089

PROGRAMA: Maestría en ciencias en el área de biotecnología vegetal o toxicología posgrado: Toxicología

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Estudio de la neuropatía periférica dolorosa inducida por paclitaxel y su relación con el sensor del retículo endoplásmico IRE1α

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se logró encontrar una relación entre el sensor del retículo endoplásmico IRE1α y la neuropatía periférica dolorosa provocada por paclitaxel en ratones C57BL/6 macho, lo que mediante futuras pruebas podrían llegarse a crear tratamientos que utilicen inhibidores de dicha vía para evitar el padecimiento que provoca.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
N.A.				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.				El estudiante es el primer autor
N.A.				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Elsa Marcela Ramírez López
 Dra. Elsa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Ramón Guerrero Alba
 Dra. Ramón Guerrero Alba

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Juan Alejandro Rincón
 Dr. Juan Alejandro Rincón

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M en C. Jorge Martín Alférez Chávez
 M en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105f las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posgrado
 Revisado por: D. Control Escolar/ D. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-15
 Actualización: 01
 Emisión: 28/04/20

AGRADECIMIENTOS

Se agradece tanto al CONACYT por todo el apoyo otorgado, así también a la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme cursar esta maestría, por brindarme las instalaciones necesarias para el desarrollo del presente proyecto, y por contar con docentes interesados en compartir su valioso conocimiento de manera paciente. En relación con lo antes mencionado, agradezco al Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino por aceptarme para trabajar bajo su tutoría, y por confiarme su laboratorio para realizar las actividades de este proyecto; así como por preocuparse por que estuviera bien, aclarar todas mis dudas, y tener la perseverancia que muchos otros no me hubieran tenido. También agradezco al Dr. Paulino Barragán Iglesias por facilitar su laboratorio con la intención de que aprendiera aquellas técnicas que fueron clave para el desarrollo de esta tesis, por los equipos, reactivos, ideas para el proyecto, y por estar en contacto a pesar de la distancia. Aprecio el trabajo de la Dra. Raquel Guerrero Alba, y el empeño que puso tanto en sus clases, como en su labor como coordinadora de la maestría. Agradezco al Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega por ser tan comprensivo, y por tomarse el tiempo para explicar de forma clara los temas y clases en las que tanto esfuerzo puso. Agradezco al Dr. Javier Ventura Juárez por el curso que implementó en su laboratorio, y por ser tan accesible como para permitirme utilizar algunos equipos sin los que no hubiera sido posible desarrollar algunos de los resultados necesarios en la realización de esta tesis. Le agradezco de sobremanera a la Dra. Sandra Luz Martínez Hernández por los consejos de vida y técnicos que me brindó, y por siempre haberme ayudado a resolver mis dudas, aunque no fuera su deber hacerlo. También se agradece a la Dra. Así mismo, agradezco a Bertha Alicia Hernández Mercado, a Argelia Calvillo Robledo, y a Jesús Barrera Juárez; por apoyarme en muchas de las técnicas que necesitaba y que eran nuevas para mí.

Dedicatorias

Este trabajo va dedicado a mis padres que me han apoyado durante toda mi vida y que han aceptado mi forma de ser y creer en mí a pesar de todo lo que hemos pasado. También, a todos aquellos amigos que me han acompañado desde antes de que empezara este proyecto y que estuvieron para mí durante este difícil pero enriquecedor camino. Lo dedico también a todos los docentes y personas que me apoyaron cuando las posibilidades lo permitieron.

Índice

INDICE DE FIGURAS	2
ACRÓNIMOS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
TÍTULO	6
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	8
Las ramas de la respuesta a proteínas desplegadas ante el estrés del retículo endoplásmico ...	8
Dolor neuropático	11
Dolor neuropático inducido por quimioterapia	12
Paclitaxel.....	12
Neuropatía periférica causada por Paclitaxel.....	13
Modelos de neuropatía en ratones tratados con paclitaxel	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
General	15
Específicos	15
METAS	15
METODOLOGÍA	15
Animales	15
Pruebas conductuales.....	16
Escala grimace	16
Medición de alodinia mecánica	16
Medición de alodinia térmica.....	17
Disolución de los fármacos	17
Tratamientos	18
Curva dosis respuesta de paclitaxel	18
Efecto terapéutico del 4 μ 8c.....	18
Efecto profiláctico del 4 μ 8c y del STF-083010	19

Extracción de ganglios de la raíz dorsal	21
Procesamiento de los tejidos	21
Cuantificación total de proteína	22
Western Blot.....	22
Análisis estadísticos	23
RESULTADOS	23
Modelo de alodinia mecánica y térmica causada por paclitaxel.....	23
Efectos terapéuticos del inhibidor 4 μ 8c.....	25
Efectos profilácticos del inhibidor 4 μ 8c	28
Pruebas con la administración profiláctica del inhibidor STF-083010.....	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	39
REFERENCIAS	40
ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Activación de la respuesta a proteínas desplegadas	10
Figura 2.- Estructura química del paclitaxel.	13
<i>Figura 3.-</i> Diseño experimental de la curva dosis respuesta con paclitaxel	18
<i>Figura 4.-</i> Diseño experimental de los efectos terapéuticos del 4 μ 8c administrado de forma terapéutica	19
<i>Figura 5.</i> Diseño experimental de los efectos profilacticos de 4 μ 8c	20
<i>Figura 6.</i> Diseño experimental de los efectos profilácticos de STF-083010	21
<i>Figura 7.-</i> Efecto del paclitaxel sobre el umbral de retiro de la pata	24
<i>Figura 8.-</i> Efecto del paclitaxel sobre la escala grimace.	25
<i>Figura 9.-</i> Efecto del paclitaxel sobre la latencia de respuesta dolorosa en la prueba de la plancha caliente.	25
<i>Figura 10.-</i> Efecto del 4 μ 8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel	26
<i>Figura 11.-</i> Efecto de 4 μ 8c sobre los expresiones de sensaciones nociceptivas causadas por el paclitaxel.	27

<i>Figura 12.- Efecto del 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de la plancha caliente.</i>	27
<i>Figura 13.- Efecto profiláctico de 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de Von Frey.</i>	28
<i>Figura 14.- Efecto profiláctico del 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la escala gimace.</i>	29
<i>Figura 15.- Efecto profiláctico del 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de la plancha caliente</i>	30
<i>Figura 16.- Efecto profiláctico del STF-083010 sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de Von Frey.</i>	31
<i>Figura 17.- Efecto profiláctico del STF-083010 sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la escala grimace</i>	32
<i>Figura 18.- Efecto profiláctico del STF-083010 sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de la plancha caliente.</i>	33

ACRÓNIMOS

- 4μ8c → 7-hidroxi-4-metil-oxo-2h-1-benzopirán-8-carbaldehído (C₁₁H₈O₄)
- ATF4 → factor de transcripción activador 4 (*activating transcription Factor 4*)
- ATF6 → factor 6 activador de la transcripción (*activating transcription factor 6*)
- BCA → ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid*)
- BiP → proteína de unión a inmunoglobulinas (*immunoglobulin binding protein*)
- BSA → suero bovino fetal (*bovine serum albumin*)
- CIPN → neuropatía periférica inducida por quimioterapia (*chemotherapy-induced peripheral neuropathy*)
- COX-2 → ciclooxigenasa-2 (*cyclooxygenase-2*)
- DMSO → Dimetil sulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*)
- eIF2 → factor de iniciación eucariota 2 (*eukaryotic Initiation Factor 2*)

ER → *retículo endoplásmico (endoplasmic reticulum)*

ERAD → *degradación de proteínas asociada al ER (Endoplasmic reticulum-associated degradation).*

GAPDH → *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)*

GDP → *Guanosín difosfato (guanosine diphosphate)*

GRD → *ganglios de la raíz dorsal (dorsal root ganglia)*

GRP → *proteína reguladora de la glucosa (glucose-regulated protein)*

GTP → *Guanosín trifosfato (guanosine triphosphate)*

Hsp90 → *proteína de shock térmico de 90 kDa (heat shock protein 90)*

i.p. → *intraperitoneal*

IRE1 α → *enzima 1 α que requiere de inositol (inositol-requiring enzyme 1 α)*

mPGES-1 → *prostaglandina E sintasa microsomal-1 (microsomal Prostaglandin E Synthase-1)*

mRNA → *ácido ribonucleico mensajero (messenger ribonucleic acid)*

PERK → *quinasa del retículo endoplásmico de tipo de la quinasa de proteínas dependientes de ARN (protein kinase-R-like ER quinase)*

PGE2 → *prostaglandina E2 (prostaglandin E2)*

PTX → *paclitaxel*

PVDF → *fluoruro de polivinilideno (polyvinylidene fluoride)*

Rpm → *revoluciones por minuto (revolutions per minute)*

SEM → *error estándar de la media (estándar error of the mean)*

STF-083010 → 15H11NO3S2

TLRs → receptores tipo toll (*toll like receptors*)

UPR → respuesta a proteínas desplegadas (*unfolded protein response*)

XBP1s → proteína 1 de unión a la caja x empalmada (*x-box protein 1 "Spliced"*)

XBP1u → proteína 1 de unión a la caja x sin empalme (*x-box protein 1 "unspliced"*)

RESUMEN

El paclitaxel (Taxol®) se usa ampliamente en el tratamiento de cáncer de mama, ovario, pulmón, entre otros. Aunque es muy eficaz para bloquear la progresión del tumor, causa como efecto secundario una neuropatía periférica dolorosa en un 60-70% de los pacientes. En estos pacientes, se ha documentado acumulación de proteínas desplegadas. La acumulación de proteínas desplegadas en el lumen del ER puede ser causada por diversos motivos (falta de oxígeno, cambios de pH, niveles bajos de glucosa, quimioterapia, etc.). La respuesta a proteínas desplegadas (UPR) se compone por tres sensores del retículo endoplásmico (ER); la quinasa del retículo endoplásmico de tipo del tipo quinasas dependientes de ARN (PERK), el factor 6 activador de la transcripción (ATF6), y la enzima 1 α que requiere de inositol (IRE1 α). En el caso de IRE1 α , su actividad ribonucleasa produce el empalme del RNAm de XBP1 (XBP1S), un potente factor de transcripción que induce la producción de mediadores pro-inflamatorios. Este trabajo se desarrolló para investigar si la activación de la UPR, en específico de XBP1s en el ER contribuye al desarrollo de dolor neuropático en pacientes tratados con paclitaxel. Ratones macho de la cepa C57BL/6 recibieron un tratamiento sub-crónico con: (i) vehículo (solución salina 70% + etanol 20% + tween 80 10%); o (ii) paclitaxel (4 mg/kg y 8 m/kg) cada 2 días por 8 días. Se evaluó la presencia de dolor espontáneo y sensibilidad a estímulos mecánicos y térmicos. Además, se evaluó el efecto profiláctico y terapéutico de 4 μ 8c, un fármaco inhibidor de la actividad ribonucleasa de IRE1 α ; sobre el dolor espontáneo, y la sensibilidad a estímulos mecánicos y térmicos generados por paclitaxel. Además, mediante la técnica de *Western blot*, se evaluó la activación de XBP1s en los GRD de ratones tratados con vehículo + paclitaxel y la combinación 4 μ 8c + paclitaxel.

ABSTRACT

Paclitaxel (Taxol®) is widely used in the treatment of different types of cancer, such as breast, ovarian, and lung. Although it's very effective in blocking tumor progression, as a side effect it causes painful peripheral neuropathy in 60-70% of patients. It has been proposed that the endoplasmic reticulum (ER) stress response contributes to the development of neuropathic pain. The IRE1 α protein is an ER sensor with ribonuclease activity that, when activated, produces a recovery response to stress caused by unfolded proteins (UPR); specifically, the ribonuclease activity of IRE1 α produces the splicing of XBP1 mRNA (XBP1s), a potent transcription factor that under chronic ER stress induces the production of proinflammatory mediators. Through the intraperitoneal administration of paclitaxel in mice, the participation of the IRE1 α pathway in the development of painful peripheral neuropathy was evaluated in C57BL/6 male mice. Animals were administered with vehicle (70% saline solution +20% ethanol + 10% tween80) or paclitaxel (4mg/kg and 8 mg/kg) every 2 days for 8 days. The presence of spontaneous pain, as well as sensitivity to mechanical and thermal stimuli were evaluated. Using the Western blot technique, the activation of XBP1s was evaluated in the dorsal root ganglia (DRG) of mice treated with vehicle or paclitaxel. In addition, it was also evaluated whether the intraperitoneal administration of 4 μ 8c, a drug that inhibits the ribonuclease activity of IRE1 α , prevents or reverses the activation of spontaneous pain, and the sensitivity to mechanical and thermal stimuli generated by paclitaxel; this when 4 μ 8c was administer the prophylactically, or therapeutically.

TÍTULO

Estudio de la neuropatía dolorosa inducida por paclitaxel y su relación con el sensor del retículo endoplásmico IRE1 α

INTRODUCCIÓN

El retículo endoplasmático (ER) se puede describir como un organelo abundante, dinámico, y capaz de captar energía. Cuenta con amplias membranas que se pueden dividir en rugosa y lisa, y éstas se distribuyen de manera diferente según el tipo celular y sus necesidades. Otras de sus funciones son las de sintetizar proteínas, lípidos, y además es el mayor almacén de Ca²⁺ intracelular. Sin embargo, una carga excesiva de calorías y una glucolipototoxicidad causada por una dieta hipercalórica, puede conducir a la activación de

lo que se conoce como la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). Se trata de una respuesta al estrés del ER que pretende restablecer la homeostasis mediante la disminución del estrés oxidativo, la síntesis proteica, y la fuga de calcio. Lamentablemente, cuando las condiciones de estrés son crónicas, la UPR conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno, inflamación, y apoptosis; provocando un efecto negativo en otros organelos (Cortés-Gines *et al.*, 2021).

Para una correcta función biológica, es necesario que el plegado y estructura tridimensional de las proteínas sea la correcta. Cuando existe algún tipo de mutación, o al presentarse condiciones de estrés en el ambiente intra o extracelular, se puede producir un plegado incorrecto de las proteínas. Lo anterior puede asociarse a una pérdida en las funciones fisiológicas de las proteínas implicadas, generando productos tóxicos para la célula y pudiendo promover el desarrollo de enfermedades de difícil diagnóstico y/o tratamiento (Rivera-Krstulović y Durán-Aniotz, 2020).

Una consecuencia de un estado de estrés crónico del ER es la muerte celular por apoptosis, lo que puede llevar a condiciones como la hiperlipidemia, hiperhomocisteinemia, hiperglucemia, y a la activación inflamatoria; lo cual ha sido observado tanto en humanos como en modelos preclínicos murinos. Por lo anterior, se le ha considerado como un pilar para entender diferentes estados patológicos y diversas enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades metabólicas, inflamación, desordenes neurodegenerativos, y cáncer (Wang y Kaufman, 2012).

En los mamíferos se han descubierto tres cascadas de señalización que son activadas como respuestas al estrés causado por los errores en el plegado de proteínas. El inicio de dichas vías de respuesta está dado por tres sensores proteínicos transmembranales del ER: la enzima 1α que requiere de inositol (IRE1 α), la quinasa del retículo endoplásmico de tipo de la quinasa de proteínas dependientes de ARN (PERK), y el factor de transcripción activador 6 (ATF6). Dichos sensores tienen dominios situados en el lumen del ER que son capaces de detectar péptidos de proteínas desplegadas y regiones citosólicas que en condiciones fisiológicas protegen a la célula del estrés del ER. Lo anterior por modulación del aparato de traducción o transcripción, o por interacción con moléculas de señalización (Hetz *et al.*, 2020).

Recientemente, se ha descubierto que al activar la vía IRE1 α -proteína 1 de unión a la caja x (XBP1) en leucocitos se promueve la generación de prostaglandina E2 (PGE2) y dolor. Tanto el estrés del retículo endoplasmático, como las condiciones inflamatorias, o la participación de receptores que reconocen patrones, como los receptores tipo toll (TLRs), detonan la activación de IRE1 α y la generación de la proteína 1 de unión a la caja x empalmada (XBP1s) funcional en leucocitos mieloides. Este factor de transcripción multitarea induce la expresión tanto de ciclooxigenasa-2 (COX-2), como de prostaglandina E sintasa microsomal-1 (mPGES-1), que son enzimas con la función de catalizar la síntesis de PGE2 a partir del ácido araquidónico. PGE2 es conocido por actuar como un potente mediador lipídico que provoca dolor al activar y sensibilizar nociceptores. La desactivación de la señalización de IRE1 α -XBP1 disminuye las respuestas de comportamientos dolorosos postcirugía y de dolor visceral inflamatorio en modelos de ratón dependientes de PGE2 (Chopra *et al.*, 2019).

El paclitaxel (PTX) es un fármaco perteneciente al grupo de los taxanos que se utiliza de manera común para tratar varias enfermedades neoplásicas, como lo son el cáncer de mama, de pulmón, y de ovario. Este quimioterapéutico tiene su efecto antitumoral por su capacidad para unirse a los microtúbulos del citoesqueleto de la célula, y por aumentar la polimerización de la tubulina; llevando a que el ciclo celular se detenga, y, por último, se lleve a una muerte celular por apoptosis. Los resultados observados en pacientes de cáncer tratados con este medicamento han dejado evidencia de que es capaz de incrementar la proporción de sobrevivientes libres de progresión, y de aquellos que llegan a una recuperación completa. Sin embargo, también existe evidencia de que un efecto adverso del tratamiento es la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN). Esta neuropatía involucra degeneración o disfunción de las fibras nerviosas periféricas, y se ha calculado que un 59-78% de las personas presentan algún nivel de daño agudo y un 30% genera daño crónico (Toma *et al.*, 2017). Por todo lo anterior, resulta relevante el desarrollo de tratamientos que eviten o prevengan los efectos adversos de paclitaxel y de la quimioterapia en general.

ANTECEDENTES

Las ramas de la respuesta a proteínas desplegadas ante el estrés del retículo endoplásmico
El ER está constituido por una red tubular dinámica que realiza algunos procesos metabólicos como la gluconeogénesis y la síntesis de lípidos. Otras de sus funciones son

la de servir como el principal almacén de calcio de la célula, y contribuir con la formación de autofagosomas y peroxisomas. Además, en el ER se llevan a cabo los procesos iniciales para la maduración de las proteínas (cruciales para su correcto plegado) sintetizadas por la vía secretora, que representan al 30% de proteínas expresadas por el genoma (proteoma) de células eucariontes. Por lo anterior, la función del plegado de proteínas desarrollada por el ER se ve puesta a prueba en las células secretoras especializadas (e.g., neuronas, células endócrinas, etc.) debido a su alta demanda de síntesis de proteínas, que lleva a un estrés constante (Hetz, 2012).

La UPR ha sido bien estudiada en el ER, y se trata de una vía o respuesta de dicho organelo cuando se encuentra bajo estrés. En condiciones fisiológicas, la proteína PERK es estabilizada por las proteínas proteína de shock térmico de 90 kDa (HSP90) y la proteína de unión a inmunoglobulinas (BiP). Pero bajo condiciones de estrés del retículo se produce una liberación, dimerización, y autofosforilación de PERK, que después fosforila al complejo eIF2 en la posición Ser51, dirigiéndolo a una serie de procesos que llevan a la disminución de la síntesis de proteínas. El complejo factor de iniciación eucariota 2 fosforilado (eIF2) tiene una mayor afinidad por guanósín difosfato (GDP), lo que podría evitar el reinicio de la traducción por falta de intercambio de guanósín trifosfato (GTP) mediado por eIF2; que sería necesario para la volver a formar el complejo eIF2-GTP-tRNA_{met}. En este proceso, sucede una disminución de la traducción de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) junto con un aumento de la regulación de genes para proteínas anti-estrés y transportadores de aminoácidos, como el factor de transcripción activador 4 (ATF4). Esta proteína interactúa con el ER y aumenta la regulación de genes de la respuesta al estrés asociados tanto con la supervivencia celular, como con la apoptosis (Manalo y Medina, 2018).

Además de que la UPR se relaciona con la respuesta del ER ante las proteínas desplegadas, y que puede darse tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, también se ha observado que juega un papel importante en otras funciones; entre las que se incluyen el metabolismo de lípidos y colesterol, la homeostasis de energía, y la diferenciación celular. Se puede decir que las UPR se conforman por una estructura de señalización dinámica que mantienen la homeostasis de los organelos en un ambiente dónde se llevan a cabo fluctuaciones y diversificaciones de las variables que determinan su estado fisiológico (Hetz, 2012).

La proteína de unión a inmunoglobulinas (BiP) es una chaperona que también es conocida como proteína reguladora de la glucosa (GRP), y bajo condiciones nativas, se une a cada uno de los tres sensores de la UPR inhibiendo su actividad (Figura 1). Pero bajo condiciones de estrés del ER, BiP se separa de los sensores y se une a proteínas mal plegadas o sin ensamblar dentro del ER; lo que causa que la UPR se active. Al separarse la Bip de PERK, se produce la dimerización y autofosforilación de la quinasa contenida, lo que lleva a la activación de dicha vía y a un consecuente decremento del flujo de proteínas en el interior del ER. La disociación de Bip del factor de transcripción ATF6 lleva a su translocación al aparato de Golgi, dónde se lleva a cabo una proteólisis secuencial por medio de proteasas del sitio 1 y del sitio 2. Lo anterior causa que el fragmento de ATF6 en el citosol sea translocado al núcleo, y ahí se induce la transcripción de proteínas chaperonas similares a ATF4. Por último, al disociarse BiP de IRE1 α , se provoca su dimerización y autofosforilación, causando que la actividad endoribonucleasa de IRE1 α se una al mRNA de la XBP1 para cortar un intrón de 26 nucleótidos. El ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de XBP1S es traducido, y es trasladado al núcleo para iniciar la transcripción de proteínas chaperonas relacionadas con la degradación de proteínas asociada al ER (ERAD). Los tres mecanismos anteriores funcionan en conjunto para regular o disminuir el estrés del ER, con el objetivo de reestablecer la función normal de dicho organelo (O'Brien *et al.*, 2014).

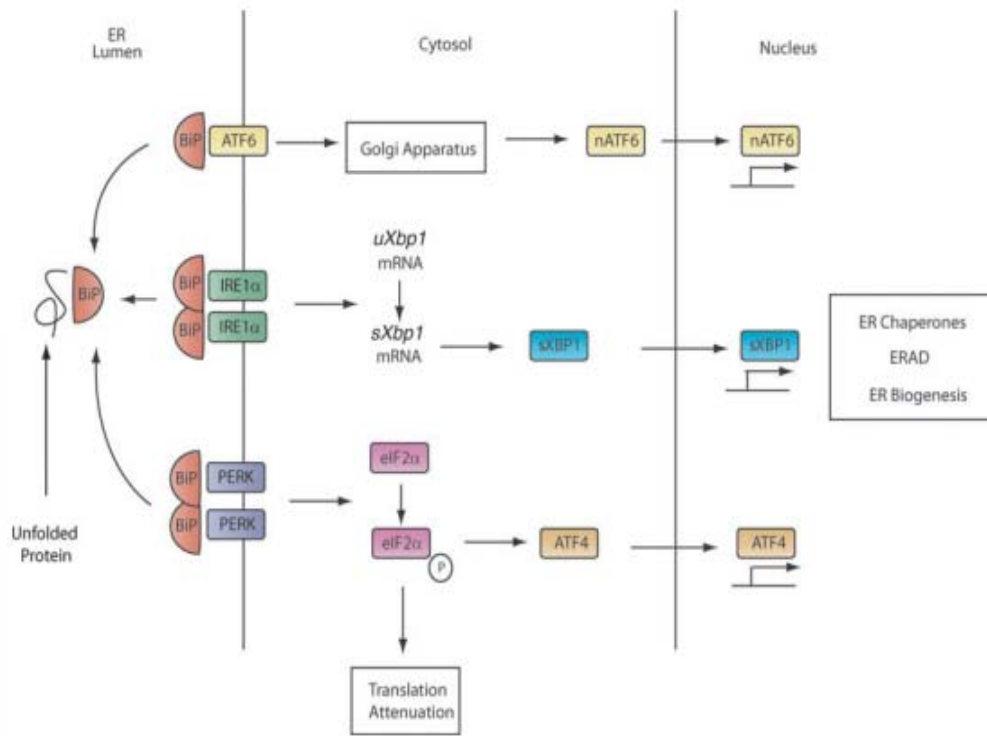


Figura 1.- Activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). Imagen representativa de los mecanismos y funciones de los receptores IRE1 α , PERK, y ATF6. Note que, en condiciones de estrés del ER, la UPR se activa al darse la dimerización de BiP, dando lugar a la activación de las tres vías de respuesta de la UPR (O'Brien, *et al.* 2014).

Dolor neuropático

Este tipo de dolor afecta a entre el 7 y 10% de la población y se produce por un daño o enfermedad del sistema somatosensorial, que incluye a las fibras A β , A δ , y C. Se han descrito diversas causas que conducen a esta afectación, y se cree que la incidencia de este padecimiento aumentará debido al envejecimiento de la población mundial, a la diabetes mellitus, y al aumento en la supervivencia de pacientes con cáncer. En cuanto al aspecto fisiológico, se han identificado algunos factores implicados en este tipo de dolor, como lo son los desbalances entre la señalización somatosensorial excitatoria e inhibitoria, las alteraciones de los canales iónicos, y la forma en que son moduladas las señales dolorosas del sistema nervioso (Colloca *et al.*, 2011).

Existen diferentes condiciones que causan dolor neuropático, como la neuropatía periférica dolorosa por diabetes, la neuropatía dolorosa no diabética, la neuralgia posherpética, la neuralgia trigémina, la radiculopatía, el síndrome de cirugía fallida de espalda, el dolor

central después de un accidente cerebrovascular, la lesión de la médula espinal, y la esclerosis múltiple. A pesar de que el padecimiento es considerado un síntoma común en el ámbito de la neurología, es frecuente que los pacientes no se sientan satisfechos con los resultados de su tratamiento. Lo que se debe principalmente a la persistencia del dolor, a los efectos adversos y a que los pacientes suelen tener expectativas de recuperación poco realistas (Zilliox, 2017).

Dolor neuropático inducido por quimioterapia

El dolor neuropático inducido por quimioterapia (CIPN, por sus siglas en inglés) hace referencia al efecto adverso que se presenta de forma común debido a la alta toxicidad de varios medicamentos utilizados en la quimioterapia, en los que se incluyen agentes a base de platino (oxaliplatino, cisplatino, y carboplatino), taxanos (paclitaxel, y docetaxel), vinca alcaloides, inhibidores del proteosoma, y análogos de la talidomida. Estos fármacos se utilizan con el fin de tratar diversos tipos de cáncer como el de mama, pulmón, cervical, próstata, ovario, testículo, gastrointestinal, sangre, y médula ósea. Este efecto adverso, es causado por una toxicidad relacionada con la dosis, lo que lleva a que en algunos casos se llegue a interrumpir el tratamiento, a una disminución de la dosis a niveles subterapéuticos, o incluso a terminar de forma definitiva con su administración; llevando a que la recuperación no sea óptima. Dicho efecto adverso puede llegar a afectar de forma importante la calidad de vida de los pacientes. Además del gasto económico para tratar este padecimiento, aumentando considerablemente los ya de por sí altos costos del tratamiento contra el cáncer (Omran *et al.*, 2021).

Paclitaxel

El paclitaxel es un medicamento que se obtuvo por primera vez de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*. Se le considera uno de los ejemplos de los compuestos obtenidos de plantas que inicialmente fueron utilizados por la herbolaria, y posteriormente, al estudiarse sus componentes químicos, se encontró sustento en su aplicación por la industria farmacéutica. Por lo anterior, resulta evidente la importancia que pueden llegar a tener los compuestos creados por los diferentes organismos vegetales para el desarrollo de compuestos medicinales (Centelles e Imperial, 2010).

Este fármaco se utiliza con frecuencia para tratar varias enfermedades neoplásicas, como lo son el cáncer de mama, de pulmón, y de ovario. Este quimioterapéutico tiene su efecto antitumoral al ser capaz de unirse a los microtúbulos del citoesqueleto de la célula, y al

augmentar la polimerización de la tubulina; llevando a que el ciclo celular se detenga, y, por último, se lleve a una muerte celular por apoptosis (Toma *et al.*, 2017).

La compleja estructura química del paclitaxel (*Figura 2*), está conformada por un esqueleto hidrocarbonado que se compone por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituidos con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas; entre ellas, una b-fenilisoerina que esterifica la posición C-13, y la molécula contiene en total once estereocentros (Centelles e Imperial, 2010).

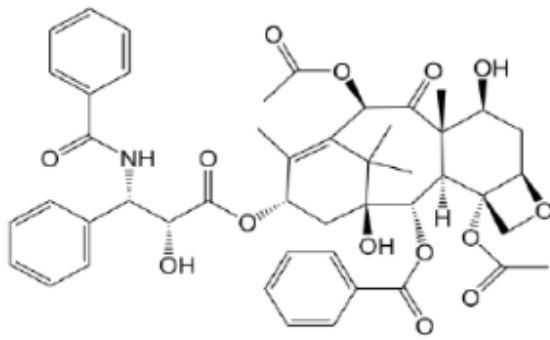


Figura 2.- Estructura química del paclitaxel. Se ejemplifica lo descrito en párrafos anteriores (Katsuki, *et al.* 2019).

Neuropatía periférica causada por Paclitaxel

La magnitud de la neuropatía periférica causada por el paclitaxel está en la dosis y el tiempo de administración del fármaco. Puede ser facilitada por condiciones previas al tratamiento, o por la administración simultánea con otros medicamentos; lo que hace que sea difícil predecir su aparición y la gravedad. Algunos de los síntomas que se manifiestan al principio suelen ser el entumecimiento, hormigueo y/o alodinia tanto en los dedos de manos y pies; que pueden llegar a presentarse entre las 24 y 72 horas previas a la inyección. Los síntomas antes mencionados pueden extenderse hasta la parte inferior de la pierna y muñecas, llegando a presentarse en hasta un 97% de los pacientes con cáncer ginecológico y urológico, sobre todo si la dosis acumulada es mayor a los 1400 mg/m². Y en general, la neuropatía periférica se desarrolla en un 60% de las personas con cáncer tratadas con quimioterapia (Klein y Lehmann, 2021).

Modelos de neuropatía en ratones tratados con paclitaxel

Se han logrado desarrollar de manera exitosa modelos de CIPN con ratones C57BL/6 macho expuestos a paclitaxel por vía intraperitoneal. Y, a partir de éstos, se ha podido

evaluar la conducta de alodinia tanto mecánica como térmica, así como algunas conductas parecidas a la anhedonia y la depresión relacionadas con el dolor neuropático que sufren los organismos tratados con este fármaco (Toma *et al.*, 2017).

Un modelo ampliamente aceptado que buscó explicar la neurotoxicidad del paclitaxel expuso que éste fenómeno se provoca por una degeneración del axón al dañar las mitocondrias en interior del mismo axón, y provocar la formación de especies reactivas de oxígeno. Esto fue observado en células cancerosas que fueron tratadas *in vitro* con paclitaxel, en las que se observó daño de mitocondrias y especies reactivas de oxígeno, que las llevó a la apoptosis. Sin embargo, no se tiene certeza de si el daño mitocondrial observado fue la causa de la degeneración axonal o si es una consecuencia de los procesos degradativos inducidos durante el daño del axón; por lo que estudios *in vivo* pueden ser de utilidad para esclarecer las cuestiones que no se han aclarado en la actualidad (Cirrincione *et al.*, 2020).

JUSTIFICACIÓN

El paclitaxel (Taxol®) es un medicamento recetado para el tratamiento de enfermedades neoplásicas como cáncer de mama, pulmón y ovario. Sin embargo, un efecto adverso que se le asocia es el desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa, la cual afecta de manera importante la calidad de vida de los pacientes. Se ha relacionado la rama de respuesta a proteínas desplegadas del retículo endoplásmico IRE1 α con la degeneración de las fibras periféricas. Por lo tanto, podría existir relación entre dicho padecimiento y el eje IRE1 α -XBP1s en ganglios de la raíz dorsal (DRG). Debido a lo antes mencionado, este proyecto se diseñó para investigar el efecto de inhibidores selectivos de la rama IRE1 α en modelos de neuropatía inducida por paclitaxel sobre la conducta nociceptiva evocada por estimulación mecánica y térmica; y así determinar si dicha neuropatía involucra la participación de la rama IRE1 α . Lo anterior, podría llevar al desarrollo de nuevos tratamientos coadyuvantes para que, en los pacientes con cáncer que reciben el paclitaxel como tratamiento, se prevenga o revierta la degeneración de fibras nerviosas periféricas que conduce a la aparición de la neuropatía periférica dolorosa.

HIPÓTESIS

La administración de inhibidores de la rama IRE1 α previene y/o revierte la neuropatía causada por la administración de paclitaxel en modelos animales de ratones C57BL/6, esto

debido a que el eje de proteínas desplegadas IRE1 α -XBP1s está relacionado con el desarrollo de este padecimiento al administrar dosis de dicho fármaco proporcionales a las aplicadas en la clínica.

OBJETIVOS

General

- Determinar si la activación del eje IRE1 α -XBP1s está asociada al desarrollo de la neuropatía periférica dolorosa inducida por paclitaxel en ratones C57BL/6.

Específicos

- Obtener un modelo *in vivo* de neuropatía periférica dolorosa por medio de la administración de paclitaxel en ratones C57BL/6J macho.
- Analizar la presencia de dolor espontáneo y el desarrollo de sensibilidad a estímulos mecánicos y térmicos en los ratones tratados con paclitaxel en comparación con el grupo control.
- Determinar si la administración intraperitoneal de 4 μ 8C y/o STF-083010 previenen o revierten la activación de XBP1s *in vivo*.
- Evaluar la activación de XBP1s en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratones tratados con vehículo y paclitaxel.

METAS

Realizar una serie de estudios que permitan identificar si el eje IRE1- α -XBP1s tiene relación con el desarrollo de neuropatía dolorosa inducida por paclitaxel, esto utilizando inhibidores de dicha vía de respuesta a proteínas con errores de plegado, y realizando pruebas conductuales y bioquímicas.

METODOLOGÍA

Animales

Se emplearon ratones C57BL/6 macho de entre 8 y 10 semanas provenientes del bioterio principal de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los animales se habituaron al nuevo bioterio por un lapso de una semana antes de comenzar con cualquier experimento. Se controlaron las condiciones del bioterio, manteniendo una temperatura ambiental de 21 grados *Celsius* aproximadamente, una humedad del 52%, y un ciclo invertido de 12 horas de luz/oscuridad (encendido a las 9:00 h).

Para los análisis de alodinia mecánica, térmica, y expresiones faciales; se utilizaron 54 ratones. Al terminar dichos experimentos se utilizaron los mismos individuos para tomar las muestras de los DRG necesarias para el western blot. Adicionalmente, 7 ratones más, que no fueron administrados con ningún fármaco fueron sacrificados para obtener las muestras correspondientes a los valores fisiológicos de proteína a partir de las DRG. Se les colocó en jaulas transparentes con aserrín como sustrato para que no estuvieran en contacto directo con el plástico de la jaula, y el número máximo de ratones por jaula fue de 6. Los ratones se agruparon al azar al momento de agruparlos en sus jaulas, y se les brindó agua y alimento sin restricción.

Pruebas conductuales

Previo a cualquier administración de fármacos se realizaron las pruebas conductuales, dejando a los ratones aclimatarse al cuarto y condiciones de medición por al menos 1 hora antes de comenzar con los análisis. Después se inició con las observaciones de la escala grimace para determinar la presencia de dolor espontáneo y la prueba por medio de filamentos de Von Frey para determinar sensibilidad a estímulos mecánicos. Por último, se realizó la prueba de la plancha caliente para determinar evaluar la respuesta nociceptiva a estímulos térmicos. Las pruebas conductuales se realizaron los días 1, 3, 5, 7, 10, 14, y 21 y se evaluaron los efectos del paclitaxel (8 mg/kg y 4 mg/kg), los inhibidores de la vía IRE1 α (4 μ 8c y STF-083010) y los respectivos vehículos.

Escala grimace

Se utilizó la metodología propuesta por Langford *et al.* (2010), para lo que se usaron las imágenes de referencia brindadas por los autores. Para esto, se cubrió con papel estraza la superficie de una mesa de 70 cm x 60 cm, sobre la cual se colocó una estructura con una superficie de malla metálica (con poros de 5 cm x 5 cm). Se colocó a cada ratón por separado en jaulas de plástico transparente (de 18 cm x 18 cm de base, y 22 cm de altura). De esta manera, los ratones quedaron a la altura del observador, y también se pudo caminar alrededor de la mesa para una mejor observación. Se les habituó por 1 hora, y después se observó a cada ratón para registrar su nivel de expresión facial de dolor (del 0 al 2), como se señala en la literatura.

Medición de alodinia mecánica

Después de haber registrado los valores de la prueba escala Grimace, se prosiguió con la prueba de Von Frey; que utiliza filamentos de diferentes grosores. Se dejó a los ratones

sobre la estructura en la que se les aclimató. Esto permitió medir la respuesta de los ratones a los estímulos mecánicos a partir de los lineamientos descritos por Deuis *et al.* (2017).

Cada filamento se aplicó en la pata izquierda del roedor, en el punto central entre sus almohadillas. Se comenzó utilizando el filamento de 3.84 gramos fuerza, y el siguiente filamento a utilizar se determinó dependiendo de la respuesta del roedor. Si respondió ante dicho filamento se probó el filamento que representara el valor inmediato inferior, y si no respondió se continuó con el siguiente de valor más alto. Se registraron un total 5 mediciones por individuo. El filamento más alto a utilizado fue el de 4.31 gramos fuerza, y se consideró que no hubo respuesta en los casos que el roedor no respondió a dicho filamento antes de completar las 5 mediciones.

Medición de alodinia térmica

Para evaluar la presencia de alodinia térmica ante altas temperaturas, en todos los tratamientos se realizó la prueba de la plancha térmica, como lo indican Langford *et al.* (2008). La plancha se programó a 50 °C. Se colocó a cada roedor en la base a la temperatura elegida y se comenzó a medir el tiempo por medio de un cronómetro digital.

Se observó cuidadosamente al individuo y se detuvo el cronómetro cuando se observó cualquier respuesta de tipo dolorosa; como puede ser el retirar la pata, agitarla, lamerla, o saltar para evitar el contacto con la plancha. Y se registró el tiempo de latencia en segundos.

Disolución de los fármacos

El paclitaxel se compró en Sigma-Aldrich, y se disolvieron 40 mg/ml de DMSO al 100%, y se realizaron alícuotas que fueron conservadas a -20 °C hasta el momento de las administraciones. El vehículo consistió en 70% de solución salina + 20% de etanol + 10% de Tween80 y se inyectó un volumen de 100 µl por 30 g de masa corporal.

El inhibidor 4µ8c se compró en Sigma-Aldrich, y se disolvieron 25 mg/ml de DMSO al 100%, se realizaron alícuotas que se conservaron a -20 grados centígrados hasta el momento de su aplicación. El inhibidor STF-083010, se compró en Sigma-Aldrich, y en se disolvieron 5 mg/ml de DMSO al 100% antes de realizar las alícuotas, que también se conservaron a -20 °C. Después de que se calcularon las dosis de cada individuo, ambos inhibidores fueron diluidos con agua inyectable. Por lo que la concentración final de DMSO fue siempre menor a 20%.

Tratamientos

Curva dosis respuesta de paclitaxel

El vehículo (i.e., solución salina, etanol, y tween80) y el paclitaxel (4 mg/kg y 8 mg/kg) se administraron por vía intraperitoneal cada 48 horas, los días 1, 3, 5, y 7 después de concluir con las pruebas conductuales (Figura 3).

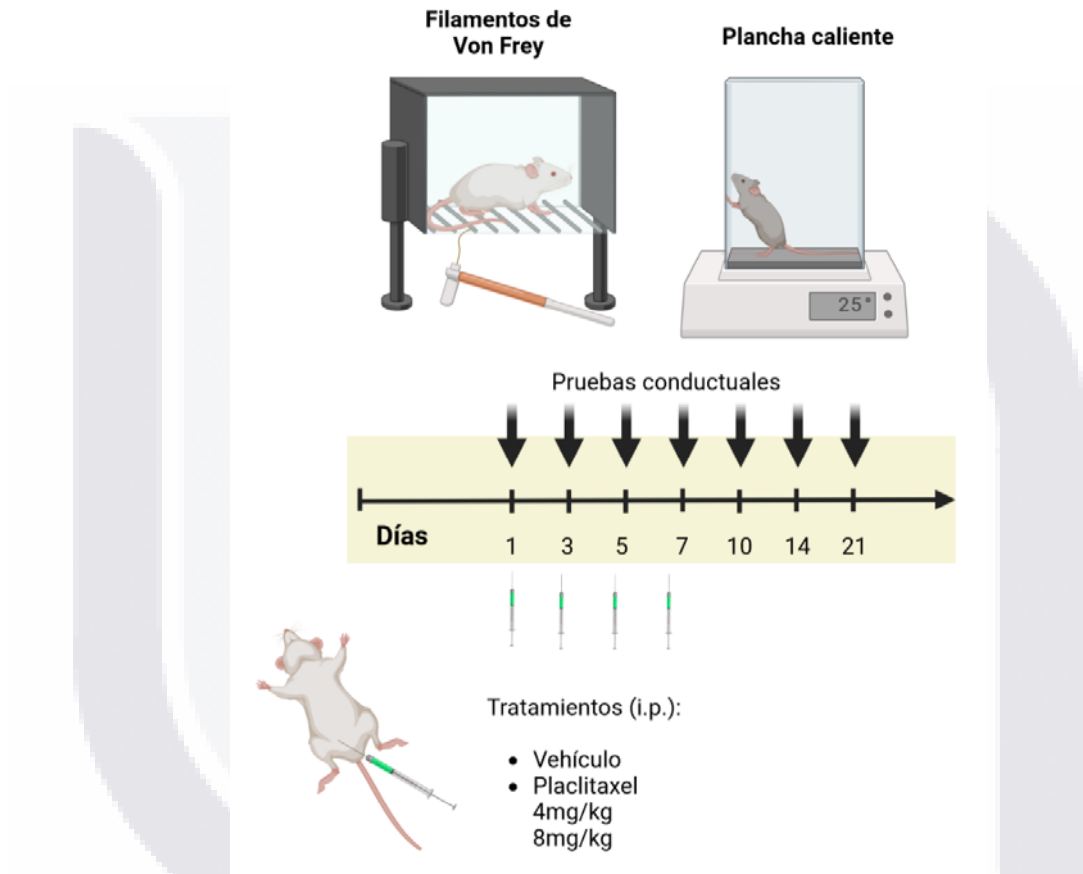


Figura 3.- Diseño experimental de la curva dosis respuesta con paclitaxel (PTX).
Figura hecha con Biorender.com.

Efecto terapéutico del 4μ8c

Los ratones se administraron por vía intraperitoneal con una dosis de 8 mg/kg de paclitaxel cada 48 horas durante los días 1, 3, 5 y 7. Los animales recibieron vehículo o 10 mg/kg de 4μ8c los días 11, 13, 15, 17, 19. Mismos días en los que se realizaron las pruebas conductuales, excepto por la primer medición, que fue el día 1 antes de las administraciones. (Figura 4).

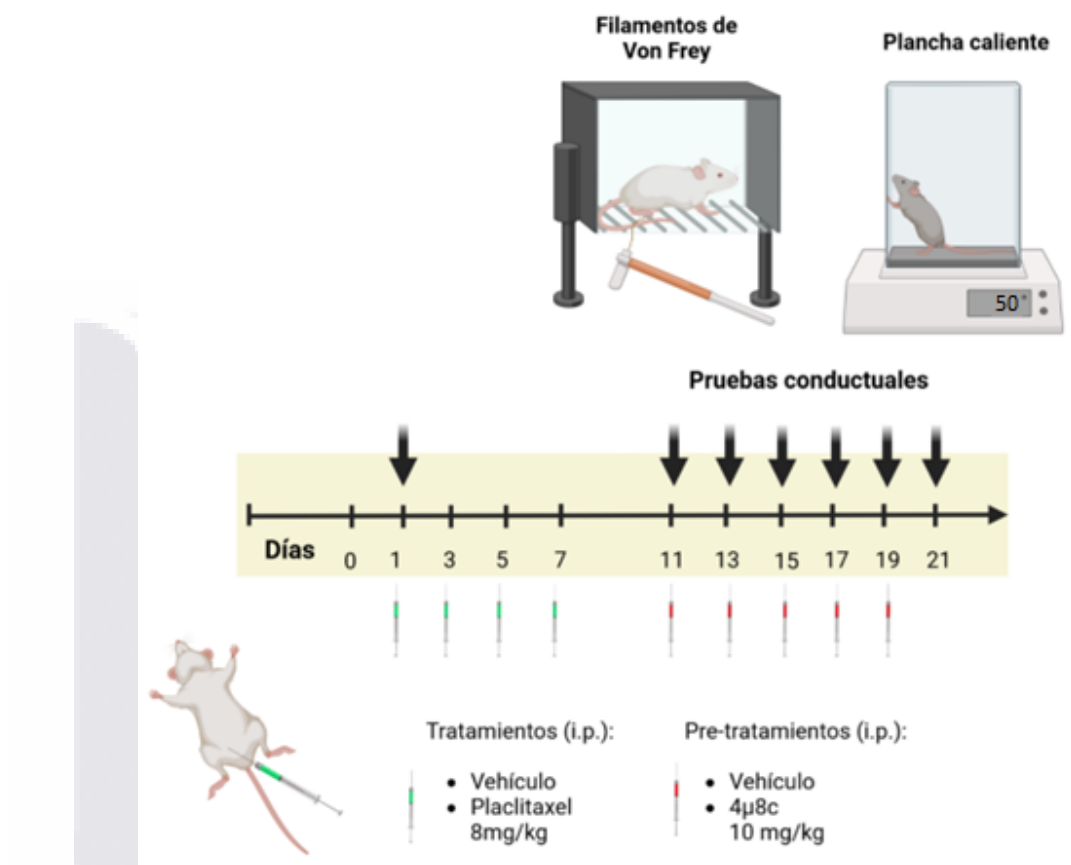


Figura 4.- Diseño experimental de los efectos terapéuticos del 4μ8c administrado de forma terapéutica sobre la neuropatología periférica inducida por paclitaxel. Figura hecha con Biorender.com.

Efecto profiláctico del 4μ8c y del STF-083010

Para evaluar la posible actividad profiláctica del inhibidor 4μ8c, se administró vehículo (DMSO 20% + agua inyectable) o 10 mg/kg 4μ8c un día previo al inicio del protocolo con paclitaxel (día 0) y una hora antes de la inyección de 8 mg/kg de paclitaxel durante los días 1, 3, 5, y 7 (*Figura 5*). Se realizaron 4 inyecciones de ambos fármacos, dejando un periodo de 48 horas entre cada administración.

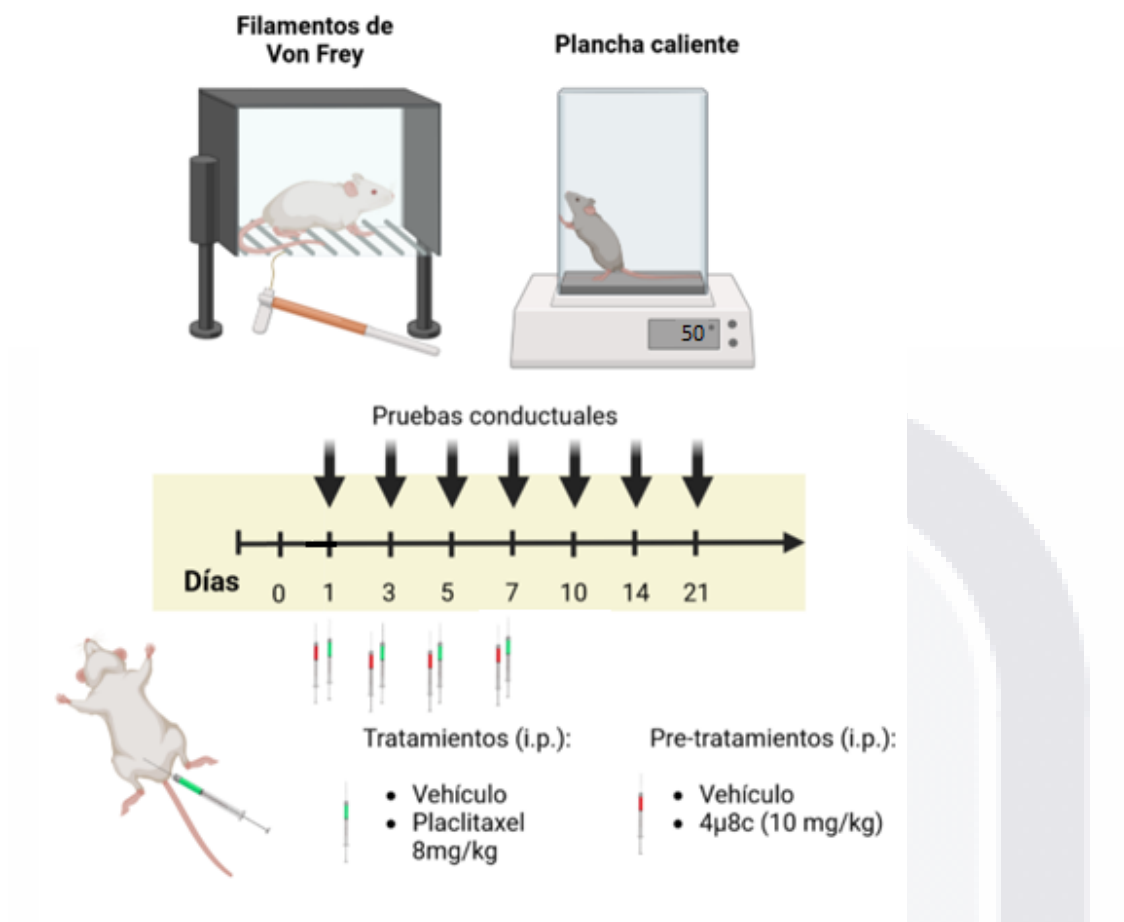


Figura 5. Diseño experimental de los efectos profilacticos de 4μ8c sobre la neuropatología periférica inducida por paclitaxel. Figura hecha con Biorender.com.

Por último, se administró vehículo (DMSO 20%) o STF-083010 (15 mg/kg) de manera profiláctica. La primera inyección se realizó 24 horas antes de la primera administración de paclitaxel (8mg/kg), y 1 hora antes de la inyección con paclitaxel en los días 1, 3 y 5 (*Figura 6*).

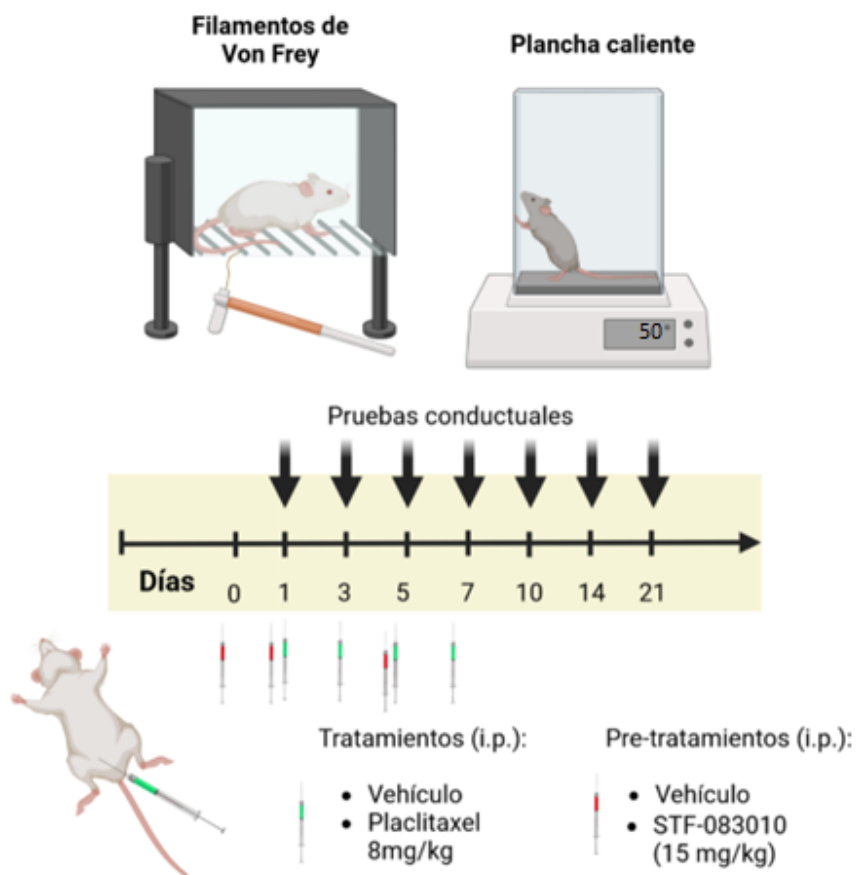


Figura 6. Diseño experimental de los efectos profilácticos de STF-083010 la neuropatología periférica inducida por paclitaxel. Figura hecha con Biorender.com.

Extracción de ganglios de la raíz dorsal

La extracción de los DRG se realizó con base en el protocolo creado por Sleight *et al.* (2016). Los animales se anestesiaron en una cámara de isoflurano y se decapitaron para la subsecuente extracción de los DRG. Se extrajeron los ganglios de las regiones lumbares (L4 - L5) y se mantuvieron en hielo seco hasta su homogeneización.

Procesamiento de los tejidos

Los ganglios del GRD se homogeneizaron en 250 μ L de buffer de lisis RIPA a 4 °C conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma Aldrich) usando un homogeneizador Benckmak (describir modelo) a potencia 1. Se realizaron 10 ciclos con el homogeneizador (o hasta que el tejido se disgregara). Cada ciclo consistió en 3 segundos con el homogeneizador encendido, seguido de un periodo de descanso de 5 segundos.

Las muestras se centrifugaron por 10 minutos, y la centrifuga se programó a 1000 rpm, a una temperatura de 4 °C, con una aceleración y desaceleración de 0. Al terminar, todas las muestras se pusieron en hielo lo más rápido posible, y con ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante y éste se colocó en un tubo eppendorf nuevo. Los tubos con el sobrenadante se colocaron en hielo seco hasta terminar de procesar el total de muestras, y posteriormente se conservaron a -80 °C.

Cuantificación total de proteína

La cuantificación total de proteínas de cada muestra se realizó mediante el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ de Thermo Scientific™. Para lo cual se utilizó como diluyente el buffer de lisis RIPA, y se siguieron las indicaciones brindadas por el fabricante. La absorbancia se midió a 571 nm.

Western Blot

La técnica fue realizada como se describe por Agnes et al. (2021), con algunas modificaciones. Los lisados de ganglios de la raíz dorsal se dejaron descongelar sobre hielo. Se calculó un volumen que correspondiera a 20 µg de proteína por muestra, y cada una se calentó a 95 °C por 10 minutos. Se utilizó un buffer de muestra Laemmi de 4x, y se usó un volumen de 3.5 µL del marcador de peso molecular. Cuando se terminó de llenar cada pocillo del gel, se corrió a 50 V hasta que las muestras pasaron la región del gel concentrador, y cuando llegaron al gel separador se subió el voltaje a 120 V. La transferencia se realizó en membranas de PVDF (que previamente se activaron con metanol durante 10 minutos), y se dejó transfiriendo dentro de la cámara fría a 25 volts V toda la noche a una temperatura de 4 °C. El bloqueo se realizó con leche Svelty en polvo disuelta en TBS 1X a una concentración de 5%, y se dejó en agitación por 2 horas. El anticuerpo primario Anti-XBP1 (sc-8015) de Santa Cruz se utilizó a una dilución de 1:500, en BSA a 5%; y se dejó incubando en agitación toda la noche a 4 °C. Como segundo anticuerpo secundario se utilizó anti-mouse acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch) a una dilución de 1:1000 en leche a 5% de concentración, y se dejó en agitación por 2 horas a temperatura ambiente. Para la proteína constitutiva se utilizó como anticuerpo primario GAPDH a una dilución de 1:1000 en BSA al 5%, y como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:1000 de anti-rabbit acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson immunoresearch en una dilución de 1:1000 en leche a al 5%. Las membranas se revelaron usando un lector de C-DiGit Blot Scanner de la marca LI-COR, cuenta con un

diseño capaz de detectar emisiones de luz visible a partir de substratos a partir de substratos quimioluminiscentes.

Análisis estadísticos

Para la realización de las gráficas se utilizó el software Graphpath Prism 8, mientras que los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SigmaPlot 12. La cantidad de ratones por tratamiento fue de 6, y los datos se presentaron de forma gráfica como la media \pm SEM. La normalidad se verificó por medio de la prueba de Shapiro-Wilk, y además de esto se realizó una prueba de igualdad de varianzas. Para determinar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó una ANOVA de dos vías de mediciones múltiples, y para identificar las diferencias significativas se realizaron comparaciones pareadas múltiples entre las interacciones de variables (tiempo de medición y tratamiento), por medio del método *Student-Newman-Keuls* o *Bonferroni t-test* según lo recomendado por el programa utilizado; lo anterior a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, y por lo tanto las diferencias se consideraron significativas mediante un valor $p < 0.05$.

RESULTADOS

Modelo de alodinia mecánica y térmica causada por paclitaxel

Ambas dosis de paclitaxel (4 y 8 mg/kg) disminuyeron significativamente el umbral de retiro de la pata por estimulación mecánica ($p < 0.05$) a partir del séptimo día (*Figura 7*). Dicho efecto se mantuvo inalterado durante la duración del experimento en los animales tratados con 8 mg/kg de paclitaxel. Mientras que aquellos que recibieron 4 mg/kg recuperaron el umbral normal a partir del día 21 ($p > 0.05$ vs. control; *Figura 7*).

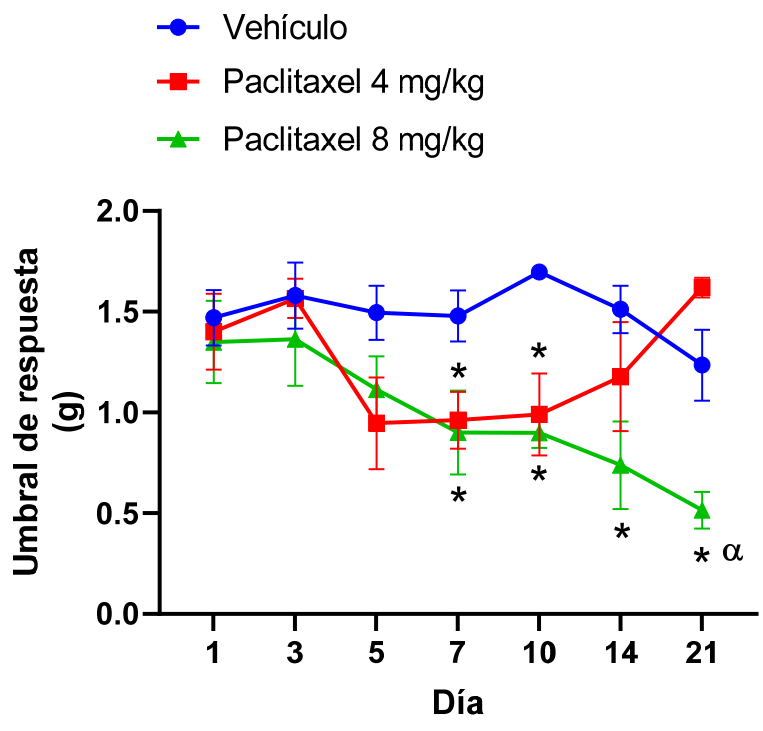
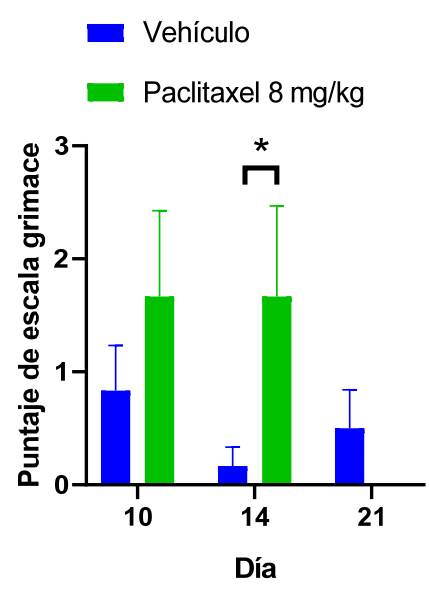
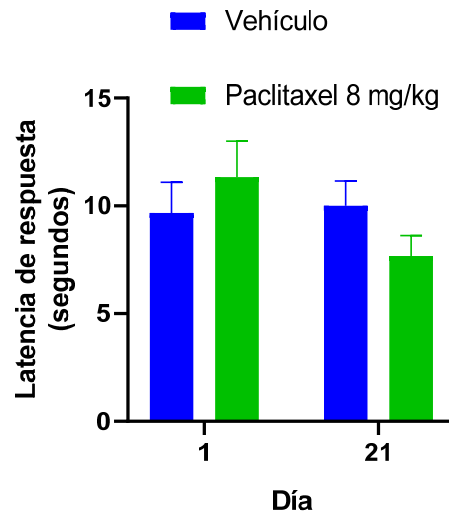


Figura 7.- Efecto del paclitaxel sobre el umbral de retiro de la pata de la raton en la prueba de Von Frey. Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizado mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. *, $p < 0.05$ vs vehiculo; α , $p < 0.05$ vs 4mg/kg.



*Figura 8.- Efecto del paclitaxel sobre la escala grimace. Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizado mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$.*



*Figura 9.- Efecto del paclitaxel sobre la latencia de respuesta dolorosa en la prueba de la plancha caliente. Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizado mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$.*

Efectos terapéuticos del inhibidor 4 μ 8c

Se observó que el grupo tratado de forma terapéutica con el inhibidor 4 μ 8c revirtió el progreso de la alodinia mecánica a partir del día 19 y hasta la duración del experimento ($p < 0.05$ vs. paclitaxel 8 mg/kg + vehículo; *Figura 10*).

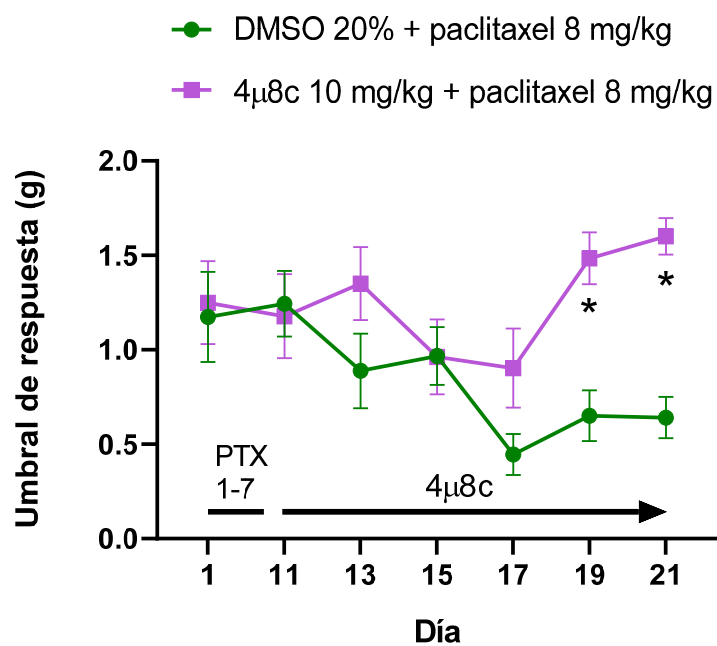


Figura 10.- Efecto del 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel. Los datos se muestran como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$.

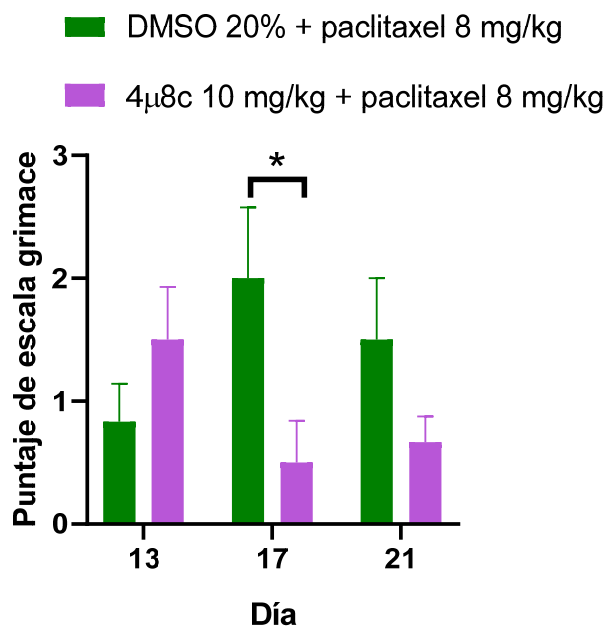
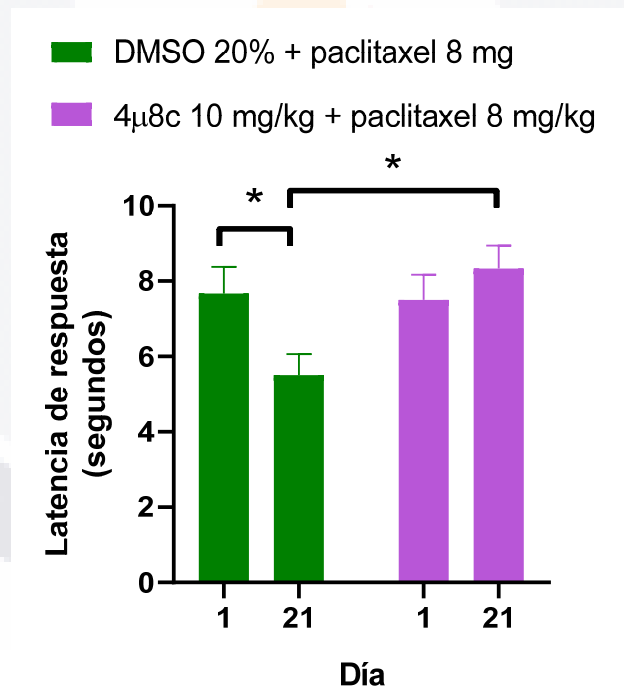


Figura 11.- Efecto de 4 μ 8c sobre las expresiones de sensaciones nociceptivas causadas por el paclitaxel. Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medida repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$.

En la prueba de la plancha térmica se observaron algunas diferencias significativas, primero en el grupo tratado con el vehículo usado para disolver el inhibidor 4 μ 8c y al que se administró también con paclitaxel se observó una disminución significativa en cuanto al tiempo de latencia para que el ratón expresara intenciones de retirar las patas de la superficie caliente, esto al comparar el día 21 con el día 1. Además, se observó que al día 21, los ratones administrados con el inhibidor mostraron valores de duración promedio significativamente mayores que los ratones administrados con el vehículo y el paclitaxel, esto al día 21 de medición (*figura 12*).



[Figura 12.- Efecto del 4 \$\mu\$ 8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de la plancha caliente.](#) Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$.

Efectos profilácticos del inhibidor 4μ8c

En las pruebas de administración profiláctica de 4μ8c, se observó que los valores de respuesta ante estímulos mecánicos obtenidos mediante los filamentos de Von Frey; el grupo tratado con el inhibidor junto con paclitaxel mantuvo los valores de umbral de respuesta promedio estables durante la duración del experimento, mientras que el grupo administrado con el vehículo y el paclitaxel mostraron una disminución de los valores promedio significativamente menores desde el día 10 hasta el 21 (Figura 13). * p < 0.05.

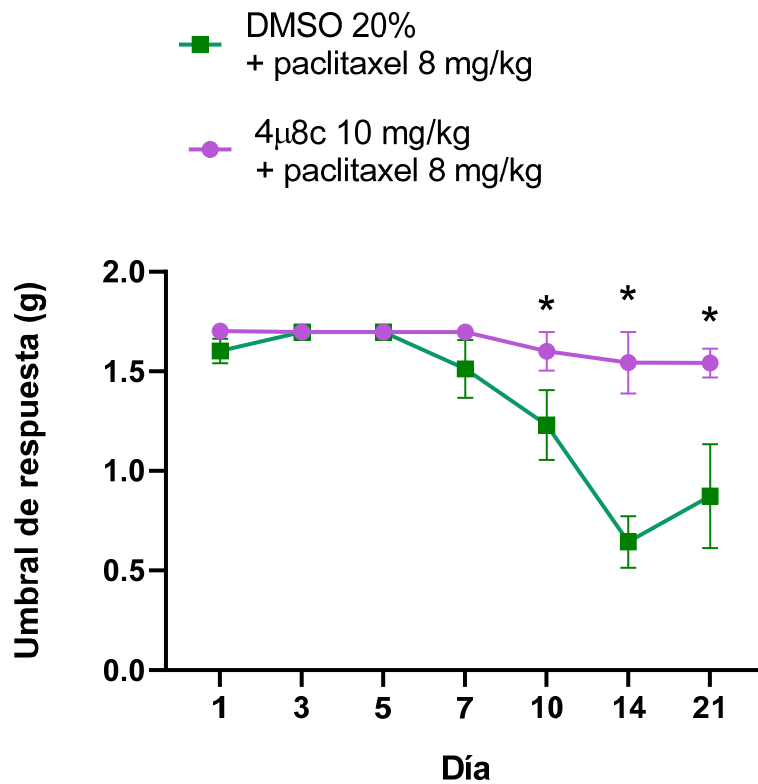


Figura 13.- Efecto profiláctico de 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de Von Frey. Los datos se muestran como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y Student-Newman-Keuls. * p < 0.05.

En cuanto a la prueba de la escala grimace de este grupo experimental, solamente se observó que en el día 10 hubo una diferencia significativamente mayor en cuanto a las

expresiones de dolor espontaneo en el grupo administrado con el vehiculo del inhibidor y con el paclitaxel (*Figura 14*).

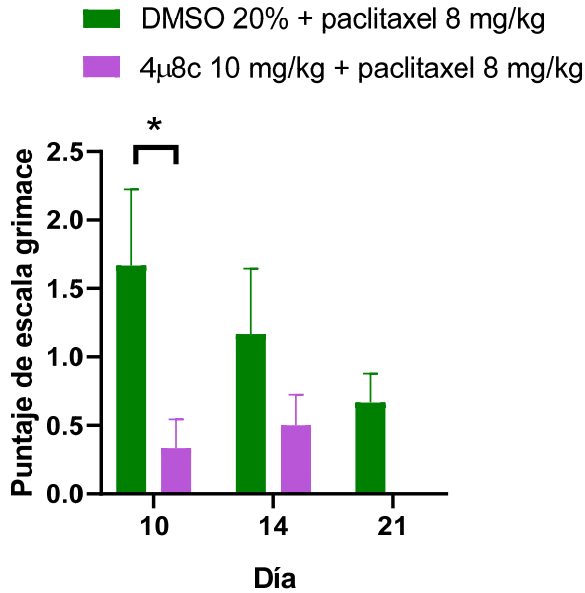
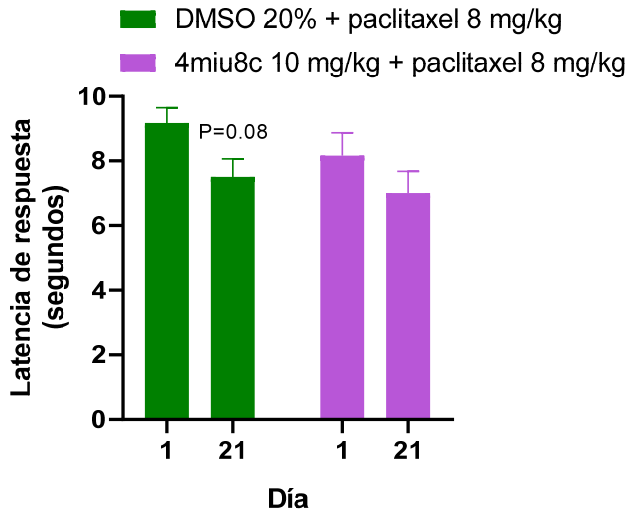


Figura 14.- Efecto profiláctico del 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la escala gimace. Los datos se muestran como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$.

Los resultados de analizar los datos de los estímulos térmicos (*Figura 14*) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos entre los días de medición. Pero en el grupo control se observó una tendencia a disminuir el tiempo de latencia de retirada de las patas

de los animales en el día 21 al ser comparado con el 1 del mismo grupo.



[Figura 15.- Efecto profiláctico del 4μ8c sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de la plancha caliente.](#) Los datos se muestran como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$.

Pruebas con la administración profiláctica del inhibidor STF-083010.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en el grupo tratado profilácticamente con el inhibidor de IRE1α denominado STF-08301, esto en cuanto a las pruebas de Von Frey. Mostrándose en la *Figura 16*, que el grupo tratado con el inhibidor STF-083010 resultó en un valor significativamente mayor el día 7 de medición en comparación con el grupo control. Además, se observó que el día 1 y el día 21 resultaron en valores significativamente menores que el día 5 del grupo administrado con el inhibidor.

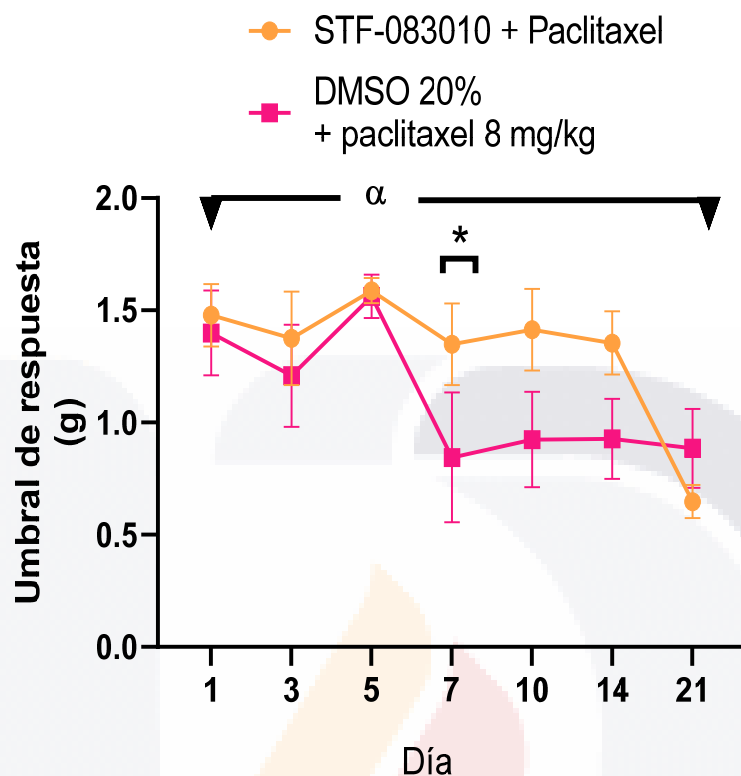


Figura 16.- Efecto profiláctico del STF-083010 sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de Von Frey. Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y *Student-Newman-Keuls*. * $p < 0.05$. $\alpha < 0.05$, día 1 vs día 21.

Los resultados de la escala grimace para el mismo grupo experimental se muestran en la siguiente figura. Y se observaron resultados significativamente menores al día 21 de medición en el grupo administrado 1 hr antes con en el inhibidor STF-083010, en comparación con el no administrado (Figura 17).

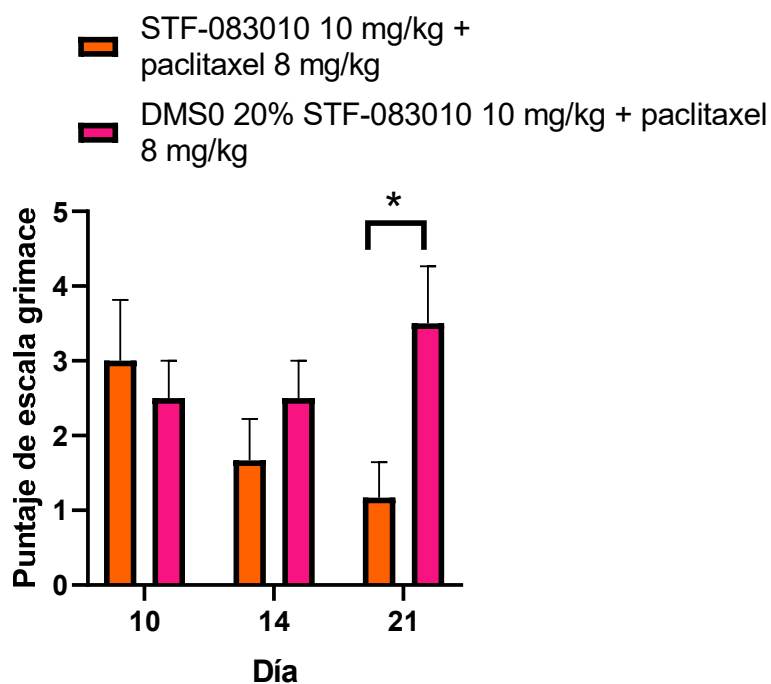


Figura 17.- Efecto profiláctico del STF-083010 sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la escala grimace. Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y *Bonferroni t-test*. * $p < 0.05$.

En cuanto a la prueba de la plancha térmica no se obtuvieron diferencias significativas al comparar el día 1 con el 21 (figura 18).

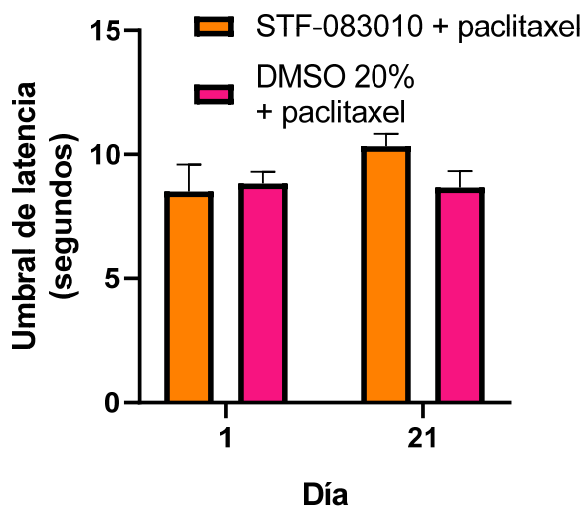


Figura 18.- Efecto profiláctico del STF-083010 sobre los efectos nociceptivos del paclitaxel en la prueba de la plancha caliente. Los datos se muestran como la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas y *Bonferroni t-test*. * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

En cuanto a la prueba de Von Frey, los ratones tratados solamente con paclitaxel (4 mg/kg y 8 mg/kg) resultaron en una disminución del umbral promedio de retirada de la pata ante la presencia de estímulos mecánicos (*Figura 7*), lo que se observó desde el día de medición 7, y en el caso de la dosis más alta; este efecto se extendió hasta el día 21. Lo que es cercano a lo reportado por Segat *et al.* (2017), que al administrar una dosis de 2 mg/kg de paclitaxel en ratones Swiss macho de 12 semanas de edad, notaron que 10 días posterior a la primera administración del fármaco, los ratones desarrollaron una neuropatía periférica que perduró por al menos 31 días; lo cual fue determinado por medio de la prueba de los filamentos de Von Frey. Sin embargo, en el presente estudio, al día 21 de medición ya no se observaron diferencias significativas en el umbral de retirada de la pata en la dosis de 4 mg/kg de paclitaxel al compararse con el grupo al que solamente se le administró el vehículo; solo se mantuvieron las diferencias significativas hasta ese día en la dosis de 8 mg/kg de paclitaxel con el grupo control; por tal razón se eligió dicha dosis para la realización de los protocolos experimentales subsecuentes.

Mediante todos los tratamientos realizados, la determinación de la presencia de un aumento en la sensibilidad ante estímulos mecánicos (con los filamentos de Von Frey), resultaron en que el paclitaxel efectivamente llevó a que los ratones mostraran un comportamiento parecido al de la neuropatía periférica dolorosa; esto debido a que en todos los tratamientos se encontraron valores significativamente menores en los grupos tratados solamente con paclitaxel, y en los grupos que no recibieron administración de ninguno de los inhibidores de IRE1 α , pero sí vehículo y paclitaxel. Lo antes mencionado podría deberse al aumento de especies reactivas de oxígeno que se han observado durante la activación de dicha vía de la UPR (Yao *et al.*, 2018).

Es sabido que los atrociitos son esenciales para mantener la homeostasis en el sistema nervioso central, ya que en general promueven la correcta función de las neuronas y permiten que funcionen de forma apropiada. Sin embargo, lo anterior puede verse interrumpido bajo ciertas circunstancias, como en HIV-1 y otras patologías, además del consumo de algunos fármacos; llevando a inflamación y/o neurotoxicidad. Lo anterior, porque es necesario que exista una buena retroalimentación entre el ER y las mitocondrias para que las células se recuperen y se regrese al estado de homeostasis; por lo que resulta de suma importancia que existan sitios directos en los que las mitocondrias asociadas a membranas del ER mantengan su correcta función, para que sea posible la recuperación durante estados de estrés celular; actuando en conjunto con la UPR; de hecho, en este esquema IRE1 α se asocia con la respuesta celulares de inflamación, con la transferencia de calcio y la regulación de la respiración mitocondrial (Proulx *et al.*, 2022) Por lo que, al ser todas estas razones del desarrollo de neuropatía periférica dolorosa; todo lo antes mencionado podría explicar que su inhibición durante periodos controlados de tiempo podría ayudar en ciertos tratamientos, como en evitar el desarrollo de la CINP.

Así mismo, existe evidencia de que el PTX produce fenotipos pro-inflamatorios en los nervios periféricos al infiltrar macrófagos, que conducen también a la CINP, aumenta los niveles del ARNm de XBP1s al generar leucocitos con fenotipos inflamatorios y comportamientos relacionados con la CINP; por lo que según lo observado en los grupos tratados (sobre todo en pruebas de alodinia mecánica), y lo descrito por algunos autores; la vía IRE1 α /XBP1 podría ser un objetivo de interés para el desarrollo de tratamientos que prevengan o busquen revertir la CINP (Fonseca *et al.*, 2023). Lo anterior podría explicar los resultados obtenidos (*Figura 7*), donde los tratamientos de los ratones administrados

con paclitaxel mostraron un desarrollo de neuropatía periférica dolorosa al tercer día después de la última administración de PTX, por lo que se podría afirmar que IRE1 α si es un buen predictor del desarrollo de la neuropatía.

Se puede decir que los organismos de los grupos tratados con paclitaxel de la *figura 7* desarrollaron un padecimiento comparable a la neuropatía periférica dolorosa, ya que estos mostraron un decremento significativo de los valores promedio que requerían para obtener una respuesta de latencia ante estímulos mecánicos desde al día 10 de administración, lo que en días anteriores y en el nivel basal no se observaba; y esto se podría interpretar como un malestar provocado por un estímulo que antes de la administración de paclitaxel no estaba presente, o al menos al menos no en ese grado de sensibilidad. Lo cual tiene sentido con lo reportado con los autores, ya que se menciona que el paclitaxel y el docetaxel con frecuencia causan neuropatía sensorial que se expresa en el paciente como parestesia, entumecimiento, y dolor neuropático en manos y/o pies (Ohtake *et al.*, 2018)

También, como puede verse en el *Anexo A*), aunque las diferencias no fueron significativas, se observa que en 2 de las 3 réplicas del grupo de nivel basal de proteínas muestran una menor densidad que el grupo de 8 mg/kg de paclitaxel, siendo siempre este grupo el que obtuvo los valores más altos entre los grupos de réplicas (NB-PTX-Veh). Además, también se observó que en las tres réplicas correspondientes a el vehículo también de densitometría promedio se encontraron siempre por debajo de los del grupo tratado con PTX. Y, todo lo anterior era lo que se esperaba si hubiera una relación entre la vía IRE1 α y la neuropatía dolorosa periférica; sin embargo, los valores no representan diferencias estadísticamente válidas para afirmar lo anterior. Sin embargo, es posible decir que existe cierta relación entre la vía IRE1 α , los efectos adversos del paclitaxel, y la neuropatía periférica dolorosa. Lo cual tendría sentido con lo encontrado por Oñate *et al.* (2016), donde se encontró que los niveles de XBP1s se ven aumentados al provocarse en ratones un daño mecánico en la espina dorsal, lo que llevó a un aumento en la regeneración axonal *in vivo*, y puede asumirse que el aumento de dicha proteína tiene relación con el restablecimiento del estado de homeostasis, pero también se ha observado en diferentes enfermedades como algunas crónicas del hígado, lo que hace difícil predecir su papel y su efecto en las diferentes células (Oñate *et al.*, 2021).

En cuanto a la escala grimace, que fue utilizada para medir las expresiones faciales relacionadas con el dolor espontánea en el ratón, solamente se observaron diferencias significativas al comparar los días 10 y 14 con el 21 del grupo tratado con 8 mg/kg de paclitaxel (*Figura 8*). Sin embargo, las pocas diferencias encontradas en los tratamientos pueden deberse a que las mediciones a tiempo real producen cierto estrés en el ratón, lo que causa que la expresión facial del roedor sea cambiante durante las observaciones; lo cual podría deberse a que el ratón naturalmente percibe al humano como un posible depredador, llevando a que sus ojos se abran y que sus orejas se mantengan erguidas, y como consecuencia se registren valores bajos en la escala (Mota-Rojas *et al.*, 2020).

Además, Sorge *et al.* (2014), reporta que el sexo del investigador encargado de realizar las mediciones de los ratones a tiempo real, influye en las mediciones de expresiones dolorosas de la escala grimace en rata y ratón. Esto porque observó que, en presencia de un investigador del sexo masculino, los ratones expresan una inhibición del dolor; lo que lleva a una analgesia inducida por estrés, lo cual se pudo replicar con playeras previamente utilizadas por hombres, y por material de cama de diferentes especies, y con compuestos secretados por la axila humana. Y, por si fuera poco, se observó que la presencia de dichos estímulos aumentó los niveles de corticosterona a concentraciones equivalentes con los presentados al exponer al ratón a una prueba de natación forzada de 3 minutos; además, hubo un aumento significativo de las deposiciones fecales en presencia de playeras usadas por hombres, pero no en presencia de playeras usadas por mujeres. Lo que podría significar que las pocas diferencias significativas observadas en los valores promedio de las pruebas de escala grimace (*Figuras 8, 11 14, y 17*) podrían haber sido enmascarado por los ratones durante la mayoría de los días de medición al percibir al evaluador como una posible amenaza; sin embargo lo anterior podría también significar que las expresiones de dolor espontáneo en los que se observaron valores significativamente diferentes se deben a la presencia de un nivel de dolor espontáneo que resultó más difícil de disimular para los organismos analizados.

Concorde a esto, los autores que realizaron el estudio a partir del cual se basó la metodología para medir las expresiones faciales de dolor espontáneo (Langford *et al.*, 2010), mencionan que los estímulos dolorosos de duración moderada (10 min- 4 hrs) suelen llevar a que los ratones expresen con mayor frecuencia una expresión facial de

dolor. Además, encontraron que los estímulos dolorosos aplicados a tejidos profundos (como en articulaciones y vísceras) llevaron a diferencias mayores de los puntajes de la escala grimace en dichos organismos de experimentación; lo que fue atribuido a una incapacidad del organismo para suprimir las expresiones faciales de dolor ante estímulos de duración prolongada y/o a aquellos que son provocados por un estímulo originado de manera interna, esto debido a que de otra forma se daría una inhibición adaptativa de la expresión dolorosa con el objetivo de no parecer vulnerables ante posibles depredadores. Pero en contraste con lo antes mencionado, también encontraron que la supuesta neuropatía dolorosa provocada por un daño al nervio de forma experimental por medio de grapas (que suele tener un efecto de larga duración), no causaron expresiones faciales de dolor; lo que se atribuye a la naturaleza paroxismal de dichos efectos, y a una incapacidad del investigador para reconocer este tipo de efectos; lo cual podría explicar las pocas diferencias significativas en las mediciones realizadas para la escala grimace entre los diferentes tratamientos.

Aparte de lo antes mencionado, Strigo y colaboradores (2002) reportan que la ausencia de las expresiones de dolor en los casos antes mencionados puede atribuirse a que tanto el dolor cutáneo como el visceral cuentan con escasa caracterización comparativa, y a que difieren en aspectos afectivos, sensoriales, y motivacionales. También observaron que el dolor causado por distensión del esófago resultó en umbrales de intensidad de dolor con valores significativos más altos que los observados por desagrado; mientras que ante el contacto directo con una fuente de calor, los umbrales de retirada de la pata no mostraron diferencias ante estímulos fásicos (10 seg) ni tónicos (36 seg) en comparación con el grupo control, lo que puede traducirse como una mayor expresión de desagrado relativo y desagrado durante la distensión del esófago que ante las dos formas de contacto con calor antes mencionadas; por lo que los autores encontraron que independientemente de la duración del estímulo, el dolor visceral es más desagradable, difuso, y variable que el dolor cutáneo. Las diferencias de las experiencias dolorosas antes mencionadas pueden deberse a contrastes en la inervación periférica de los tejidos viscerales y cutáneos, o en la forma en que se procesa la información sensorial; lo cual podría explicar los resultados que se obtuvieron en las pruebas con filamentos de Von Frey (*Figuras 7, 10, 13, y 16*), en los que se observa que los comportamientos relacionados con la alodinia mecánica fueron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

más notorios que los cambios sensitivos expresados ante altas temperaturas (*Figuras 9, 12, 15, y 18*).

A diferencia de lo reportado por Quabazard *et al.* (2020), que, por medio de la prueba de la plancha térmica, indican haber observado hiperalgesia térmica al día 7 después de la primer administración de paclitaxel a una dosis de 2 mg/kg, y con un total de 5 días consecutivos de administración; en el presente estudio solo se observó una disminución significativa del promedio de latencia de retirada de la pata al compararse los resultados obtenidos en el día 1 y 21 de medición del grupo tratado con 4 mg/kg de paclitaxel, lo que puede atribuirse a que los autores utilizaron una temperatura de 55° C para las mediciones, a la administración diaria del fármaco, o al sexo y cepa de ratones utilizados (hembras BALB/c). Cabe mencionar que en el grupo tratado con 8 mg/kg se observó una tendencia de disminución del tiempo de latencia, sin embargo, la diferencia no fue significativa. Las posibles diferencias antes mencionadas coinciden con lo observado por Ward *et al.* (2011), que al administrar dosis de 1 a 8 mg/kg de paclitaxel los días 1, 3, 5, y 7 (i.p.) en ratones C57Bl/6 hembra y macho; observaron que los efectos de la alodinia térmica y mecánica, se presentaron de forma más pronunciada en las hembras, obteniendo resultados significativos de alodinia térmica solo en el sexo femenino, y una de alodinia mecánica a dosis menores que en los machos (1 mg/kg).

Dougherty y colaboradores (2004), mencionan que, en general, se ha relacionado a la neuropatía causada por quimioterapia con las fibras mielinizadas largas, pero en cuanto a los receptores implicados y su grado de relación con el padecimiento aún no está claro; por lo que su objetivo fue el reunir información sensorial y cuantitativa sobre la percepción dolorosa de la neuropatía causada por quimioterapia en relación con los estímulos mecánicos, y térmicos para obtener una medición de los tipos de fibras específicas que se ven implicadas tanto dentro como fuera de las áreas de alteración sensorial expresadas por pacientes que desarrollaron dolor posterior a la terapia con paclitaxel. En cuanto a las pruebas sobre sensibilidad y detección térmica, y en comparación con el grupo control, los autores solo observaron pequeños cambios en la percepción de calor en la piel; y de forma similar, los estímulos a temperaturas frías tampoco reflejaron diferencias significativas con relación al grupo control. Sin embargo, al realizar pruebas con filamentos de Von Frey en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los mismos pacientes, si se observaron diferencias significativas, lo que representa que la activación de los mecanorreceptores resultó en efectos más notorios que los observados ante la activación de los termorreceptores. Lo anterior concuerda con los resultados que se obtuvieron en las pruebas de Von Frey en el presente estudio (*Figuras 7, 10, 13, y 16*) y con los obtenidos mediante la plancha térmica (*Figuras 9, 12, 15, y 18*), donde los efectos obtenidos mediante estímulos mecánicos provocaron promedios del umbral de retirada de la pata más notorios que los obtenidos mediante estímulos térmicos, siendo estos últimos solo observados al comparar los días de medición 1 y 21 del grupo tratado con 4 mg/kg de paclitaxel; y de forma similar en el grupo de las pruebas de administración terapéutica de 4 μ 8c, donde se observaron diferencias significativas al comparar el día 21 del grupo control (DMSO + paclitaxel), con el mismo día pero del grupo de 10 mg/kg del inhibidor

CONCLUSIONES

Los ratones tratados con 8 mg/kg de paclitaxel resultaron en comportamientos relacionados con la alodinia mecánica, dando lugar a efectos más pronunciados y prolongados que en los grupos tratados solo con el vehículo o con 4mg/kg de paclitaxel. Además, tanto la prueba de administración terapéutica como la de administración profiláctica de 4 μ 8c resultaron en una reversión como en una prevención del desarrollo de comportamientos nociceptivos relacionados con la alodinia mecánica.

La prueba de la escala grimace resultó en pocas diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y entre los días de medición (al compararse los días 10 y 14 contra el día 21 de medición del grupo tratado con 8 mg/kg de paclitaxel), Y, en los grupos administrados con el inhibidor de la vía IRE1 α , se observó una tendencia de los individuos a expresar valores promedio menores de la puntuación. En la administración terapéutica se observaron valores promedio de la puntuación significativamente menores que los presentados por el grupo control en el día 17 de medición, mientras que mediante la administración profiláctica se expresaron resultados significativamente menores del umbral de retirada de la pata solamente en el día 10 de las mediciones

En cuanto a los resultados obtenidos mediante la prueba de la plancha térmica, solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararse los niveles de respuesta basal (antes de la administración de cualquier fármaco) contra el último día de medición; esto en el grupo tratado con 4 mg/kg de paclitaxel en comparación con el basal del mismo grupo; y en cuanto a la administración de 4 μ 8c se observaron valores

estadísticamente significativos mediante la administración terapéutica, esto al presentarse una disminución de los valores promedio del umbral de retirada de la pata en el día 21 del grupo control en comparación con el umbral basal presentado por el mismo grupo; y el grupo administrado con el inhibidor se obtuvieron valores promedio del umbral significativamente mayores en el día 21 al comparar los valores del grupo control presentados el mismo día.

Se propone que el estudio sea ampliado por medio de la administración tanto de paclitaxel como de inhibidores de la vía en cultivos *in vitro* de neuronas obtenidas a partir de los DRG de ratones C57BL/6.

Además, se recomienda que en futuros estudios se recomienda que las pruebas de la escala grimace sean realizadas por medio de 2 evaluadores distintos para disminuir el posible enmascaramiento de los valores, y obtener datos más certeros. Además, en las pruebas de la plancha térmica también se recomienda que de forma simultánea sean dos observadores los que registren las mediciones.

REFERENCIAS

Agnes, J., Santos, V., das Neves, R., Gonçalves, R., Delgobo, M., Girardi, C., ... y Zanotto-Filho, A. (2021). Antioxidants Improve Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Tumor-Bearing Mice Model: Role of Spinal Cord Oxidative Stress and Inflammation. *The Journal of Pain*, 22(8), 996–1013. doi:10.1016/j.jpain.2021.03.142

Cirrincone, A., Pellegrini, A., Dominy, J. *et al.* (2020) Paclitaxel-induced peripheral neuropathy is caused by epidermal ROS and mitochondrial damage through conserved MMP-13 activation. *Sci Rep* 10, 3970. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60990-8>

Centelles, J., e Imperial, S. (2010). Paclitaxel, descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Fitoterapia*, 29, 69–75.

Chopra, S, Giovanelli, P., Alvarado-Vazquez, P., Alonso, S., Song, M., Sandoval, T., ... y Cubillos-Ruiz, J. (2019). IRE1 α -XBP1 signaling in leukocytes controls prostaglandin biosynthesis and pain. *Science*, 365(6450), eaau6499. doi:10.1126/science.aau6499

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., ... y Raja, S. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17002. doi:10.1038/nrdp.2017.2.

Cortés-Ginez, Baiza-Gutman, Manuel-Apolinar, Cruz-López, Ibáñez-Hernández, y Díaz-Flores (2022). Activación de sensores del estrés del retículo endoplásmico por dietas asociadas a enfermedades metabólicas y COVID-19. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2022;60(2):211-23.

Deuis, J., Dvorakova, L., y Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. doi:10.3389/fnmol.2017.00284

Dougherty, P., Cata, J., Cordella, J., Burton, A., y Weng, H. (2004). Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain*, 109(1), 132–142. doi:10.1016/j.pain.2004.01.021.

Fonseca, M., Gelblung, O., Morgan, J., Brooks, T., Strowd, R., Cubillod-Ruiz, j. y Romero-Sandoval. E. (2023) Endoplasmic reticulum stress sensor in chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CINP). Department of anesthesiology. Pain mechanisms, lanoratory, Wake Forest University Scholl of medicine. *The Journal of Pain Bolume 24 laaue 4 Supplement*. Pp. 37. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.02.118>

Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), 89–102. doi:10.1038/nrm3270.

Hetz, C., Zhang, K., y Kaufman, R. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/s41580-020-0250-z.

Katsuki, M., Irikura, M., Morinchi, H., Ohmitsu, M., Knbota T., Iohara, D., Hirayama, F., Ctori, T., y Matsuyama, J. (2019) Improvement of the wáter-solubility of paclitaxel tiwh an amorphous solid dispersing technique using polyvilpyttolinone as hydrophilic carrier.january. *International journal of pharmacy & technology*. ISSN: 0975-766X.

Klein I, Lehmann H. (2021) Pathomechanisms of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics*. Sep 22;9(10):229. doi: 10.3390/toxics9100229. PMID: 34678925; PMCID: PMC8540213.

Langford, D., y Mogil, J. (2008). Pain Testing in the Laboratory Mouse. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 549–560. doi:10.1016/b978-012373898-1.50027-9

Langford, D., Bailey, A., Chanda, M., Clarke, S., Drummond, T., Echols, S., ... y Mogil, J. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447–449. doi:10.1038/nmeth.1455

Manalo, R., y Medina, P. (2018). The endoplasmic reticulum stress response in disease pathogenesis and pathophysiology. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 19(2), 59-68. doi:10.1016/j.ejmhg.2017.07.004

Mota-Rojas, D., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., Hernández, E., Martínez-Burnes, J., y Whittaker, A. (2020). The Utility of Grimace Scales for Practical Pain Assessment in Laboratory Animals. *Animals (Basel)*. Oct 9;10(10):1838. doi: 10.3390/ani10101838. PMID: 33050267; PMCID: PMC7600890.

O'Brien, P., Hinder, L., Sakowski, S., y Feldman, E. (2014). ER Stress in Diabetic Peripheral Neuropathy: A New Therapeutic Target. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(4), 621–633. doi:10.1089/ars.2013.5807.

Ohtake, Y., Matsuhisa, K., Kaneko, M., Kanemoto, S., Asada, R., Imaizumi, K., & Saito, A. (2018). Axonal Activation of the Unfolded Protein Response Promotes Axonal Regeneration Following Peripheral Nerve Injury. *Neuroscience*, 375, 34–48. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.02.003

Omran M., Belcher E., Mohile N., Kesler S., Janelins M., Hohmann A., y Kleckner I. (2021). Review of the Role of the Brain in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Front Mol Biosci*. 2021 Jun 11;8:693133. doi: 10.3389/fmolb.2021.693133. PMID: 34179101; PMCID: PMC8226121.

Oñate M, Catenaccio A, Martínez G, Armentano D, Parsons G, Kerr B, Hetz C, Court FA. Activation of the unfolded protein response promotes axonal regeneration after peripheral

nerve injury. *Sci Rep.* 2016 Feb 24;6:21709. doi: 10.1038/srep21709. Erratum in: *Sci Rep.* 2021 Dec 20;11(1):24424. PMID: 26906090; PMCID: PMC4764858.

Qabazard, B., Masocha, W., Khajah, M., y Phillips, O. (2020). H₂S donor GYY4137 ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110210. doi:10.1016/j.biopha.2020.110210

Proulx J, Stacy S, Park IW, Borgmann K. A Non-Canonical Role for IRE1 α Links ER and Mitochondria as Key Regulators of Astrocyte Dysfunction: Implications in Methamphetamine use and HIV-Associated Neurocognitive Disorders. *Front Neurosci.* 2022 Jun 17;16:906651. doi: 10.3389/fnins.2022.906651. PMID: 35784841; PMCID: PMC9247407.

Rivera-Krstulović, C., y Duran-Aniotz, C. (2020). La respuesta a proteínas mal plegadas como blanco terapéutico en la enfermedad de Alzheimer. *Revista médica de Chile*, 148(2), 216-223. <https://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872020000200216>.

Segat, G., Manjavachi, M., Matias, D., Passos, G., Freitas, C., Costa, R., & Calixto, J. (2017). Antiallodynic effect of β -caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. *Neuropharmacology*, 125, 207–219. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.07.015

Sleigh, J., Weir, G., y Schiavo, G. (2016). A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Research Notes*, 9(1). doi:10.1186/s13104-016-1915-8

Sorge, R., Martin, L., Isbester, K., Sotocinal, S., Rosen, S., Tuttle, A., ... y Mogil, J. (2014). Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nature Methods*, 11(6), 629–632. doi:10.1038/nmeth.2935.

Strigo, I., Bushnell, C., Boivin, M., y Duncan, G. (2002). Psychophysical analysis of visceral and cutaneous pain in human subjects. *Pain*, 97(3), 235–246. doi:10.1016/s0304-3959(02)00023-4

Toma, W., Kyte, S., Bagdas, D., Alkhlaif, Y., Alsharari, S., Lichtman, A., ... y Damaj, M. (2017). Effects of paclitaxel on the development of neuropathy and affective behaviors in the mouse. *Neuropharmacology*, 117, 305–315. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.02.

Wang, S., & Kaufman, R. J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of Cell Biology*, 197(7), 857–867. doi:10.1083/jcb.201110131

Ward, S., Ramirez, M., Neelakantan, H., y Walker, E. A. (2011). Cannabidiol Prevents the Development of Cold and Mechanical Allodynia in Paclitaxel-Treated Female C57Bl6 Mice. *Anesthesia & Analgesia*, 113(4), 947–950. doi:10.1213/ane.0b013e3182283486
10.1213/ANE.0b013e3182283486

Yao W, Yang X, Zhu J, Gao B, Shi H, Xu L. IRE1 α siRNA relieves endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and alleviates diabetic peripheral neuropathy in vivo and in vitro. *Sci Rep*. 2018 Feb 7;8(1):2579. doi: 10.1038/s41598-018-20950-9. PMID: 29416111; PMCID: PMC5803253.

Zilliox, L. (2017). Neuropathic Pain. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 23(2), 512–532. doi:10.1212/con.0000000000000462.

ANEXOS

ANEXO A)

A continuación, se presentan los resultados de western blot:

Se utilizaron muestras por triplicado de ratones a los que no se les administró nada (nivel basal de proteína), 8 mg/kg de paclitaxel, y vehículo (70% de solución salina + 20% de etanol + 10% de Tween80). La expresión de las proteínas se analizó a los 21 días después de la administración de paclitaxel.

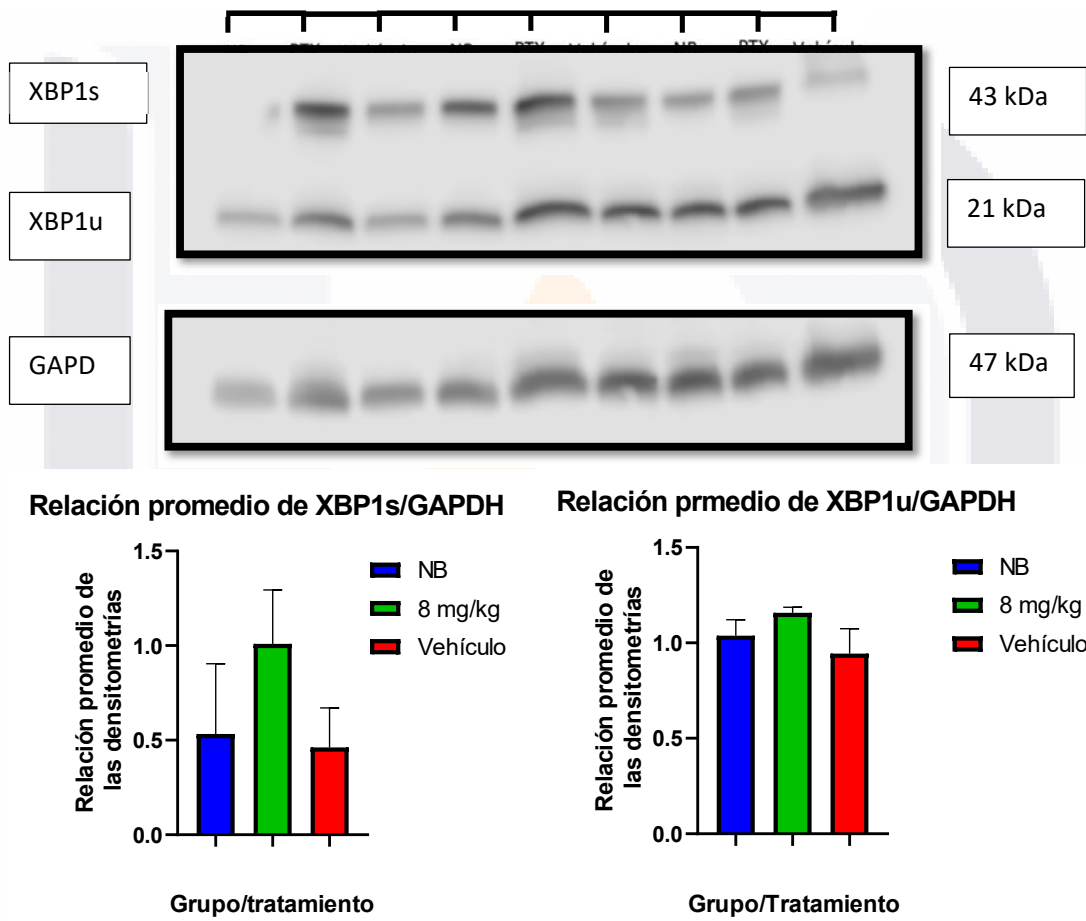


Figura 19. Efecto de la administración de paclitaxel en la regulación de XBP1s/XBP1u en ratones tratados con paclitaxel.

ANEXO B)

Pruebas con 4 μ 8c administrado de forma profiláctica

Se utilizaron muestras por triplicado de ratones a los que no se les administró nada (nivel basal de proteína), vehículo (20% DMSO) + 8 mg/kg de paclitaxel, y 10 mg/kg de 4 μ 8c + 8 mg/kg de paclitaxel. La expresión de las proteínas se analizó a los 21 días después de la administración de paclitaxel.

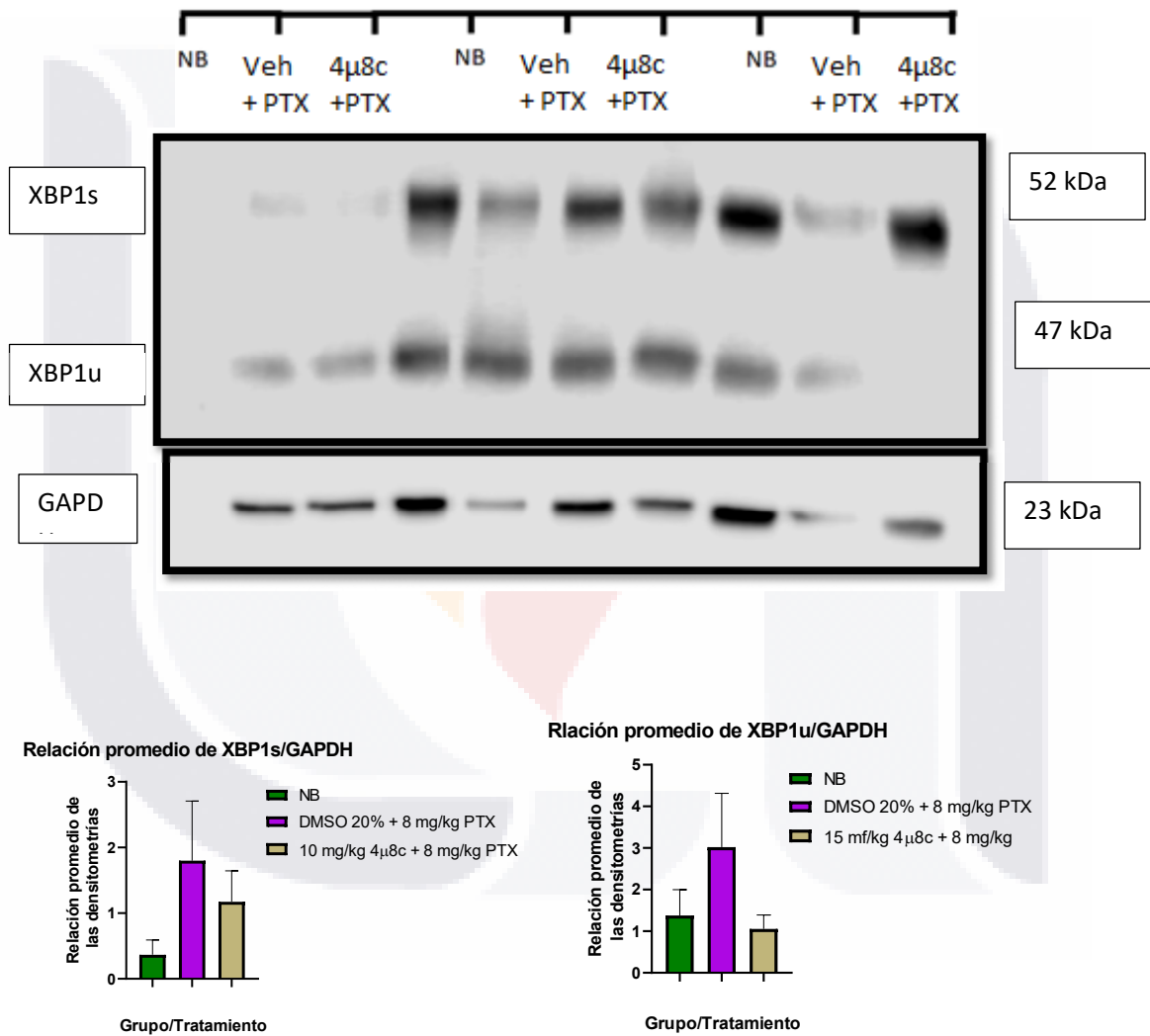


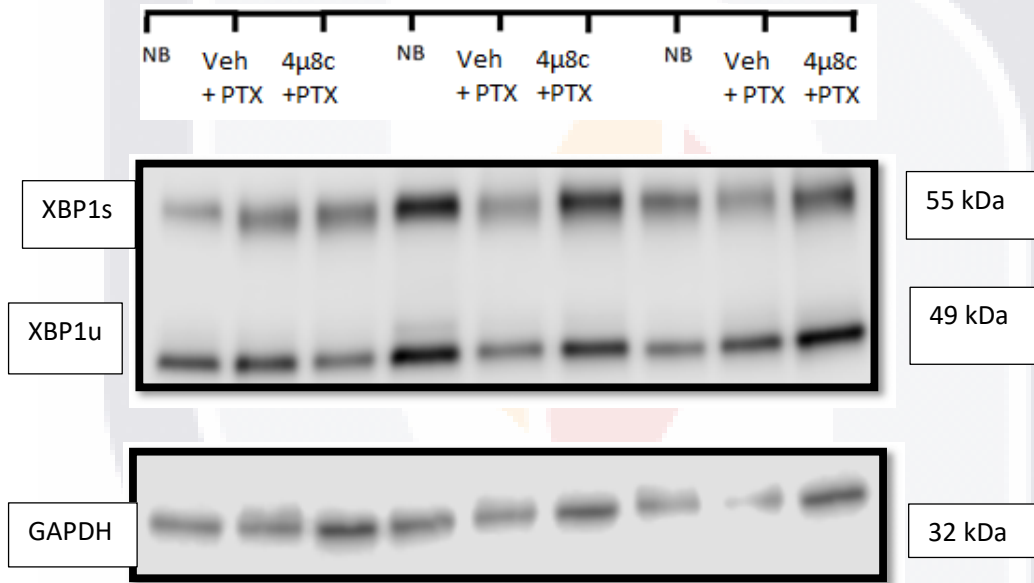
Figura 20.- Efecto de la administración de paclitaxel en la regulación de XBP1s/XBP1u en ratones tratados con paclitaxel.

Anexo C)

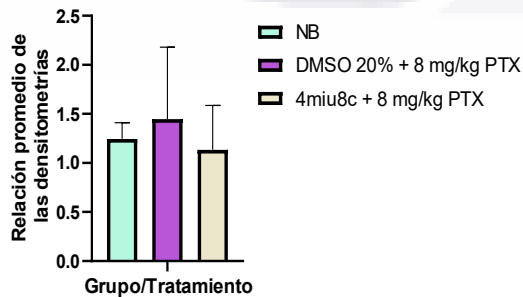
Pruebas de 4miu8c administrado de forma terapéutica

Anexo D) Efecto de la administración del inhibidor 4μ8c en la regulación de XBP1s/XBP1u. Utilizando ratones sin tratar con ningún fármaco, otros tratados con el inhibidor + 8mg de paclitaxel, y otros tratados con inhibidor + paclitaxel de forma terapéutica.

Pruebas con STF-083010 profilactico



Relación promedio de XBP1s/Gapdh



Relación promedio de XBP1Su/GAPDH

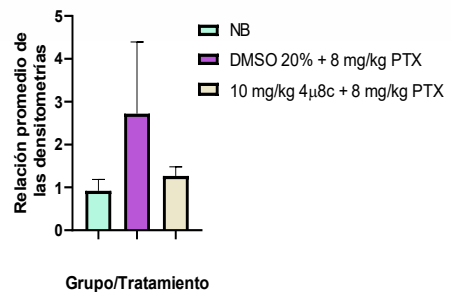
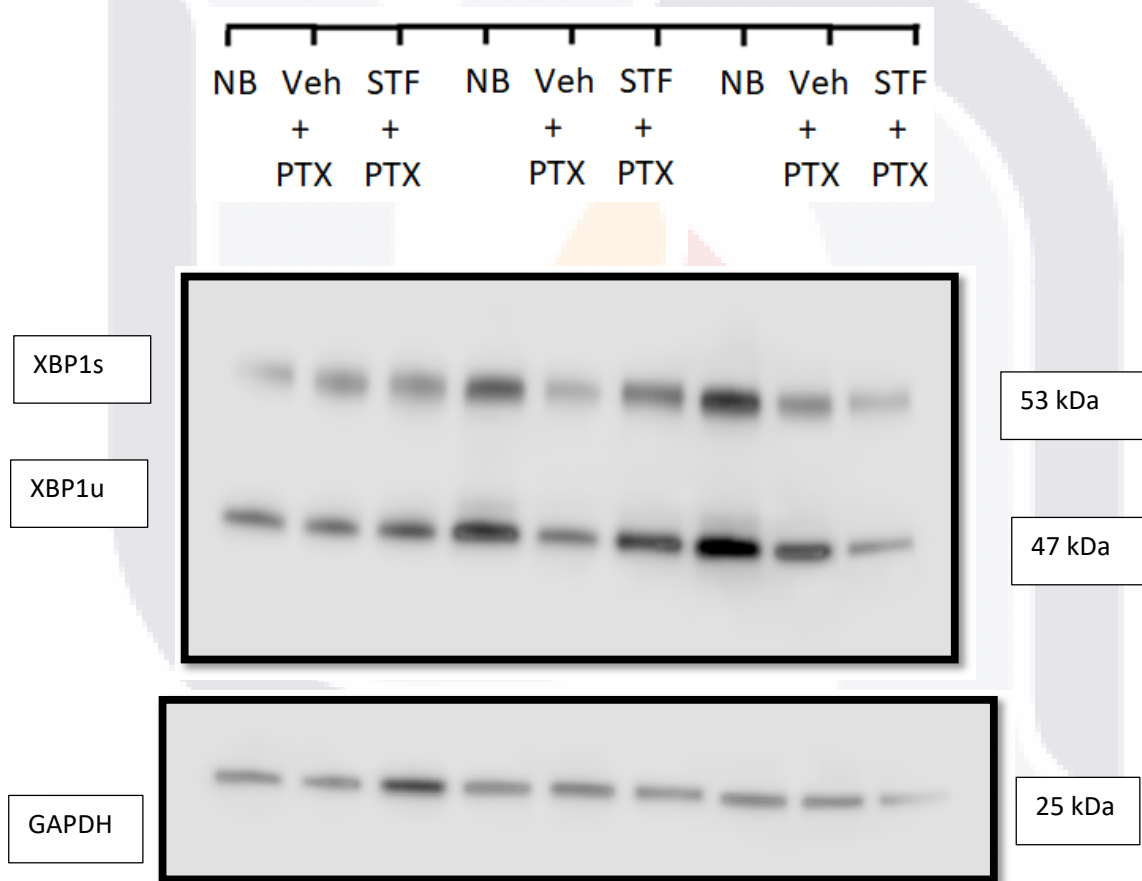


Figura 21.- Efecto de la administración del inhibidor 4 μ 8cde forma terapéutica en la regulación de XBP1s/XBP1u en ratones tratados con paclitaxel.

Anexo E)

Efecto de la administración del inhibidor STF-083010 en la regulación de XBP1s/XBP1u.

Utilizando ratones sin tratar con ningún fármaco, otros tratados con el inhibidor + 8mg de paclitaxel, y otros tratados con inhibidor + paclitaxel de forma profiláctica



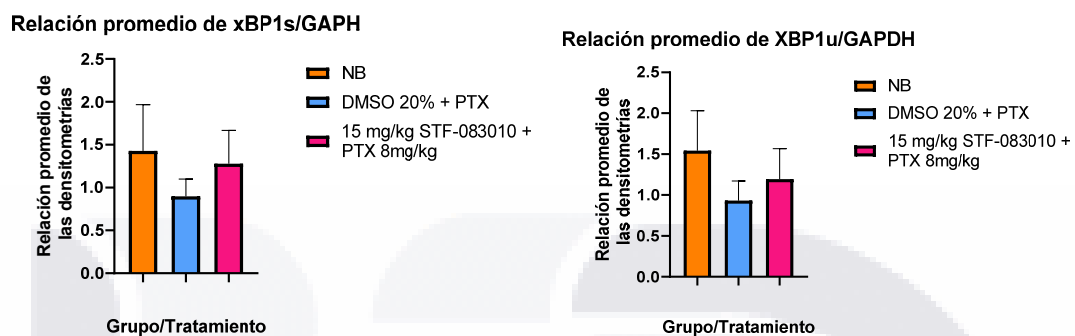


Figura 22.- Efecto de la administración del inhibidor STF083010 de forma profiláctica en la regulación de XBP1s/XBP1u en ratones tratados con paclitaxel.