







UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

**Valor clínico potencial de  
microRNA-30c como biomarcador  
y diana terapéutica para el dolor  
neuropático.**

**Tesis doctoral presentada por Roberto de la Fuente Royano  
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria**

Santander, abril 2017





UNIVERSIDAD DE CANTABRIA  
Facultad de Medicina  
Departamento de Fisiología y Farmacología

Dña. **M<sup>a</sup> Amor Hurlé González**, Catedrática de Farmacología y Dña. **Mónica Tramullas Fernández**, Profesora Ayudante Doctora, del departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

**CERTIFICAN:**

Que han llevado a cabo las funciones de dirección de la tesis doctoral de D. Roberto de la Fuente Royano, Licenciado en Medicina, y que lleva por título:

**Valor clínico potencial de microRNA-30c como biomarcador y diana terapéutica para el dolor neuropático.**

Que consideran que dicho trabajo se encuentra terminado, y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se expide la presente certificación

En Santander, a 20 de abril de 2017

Fdo. M<sup>a</sup> Amor Hurlé González

Fdo. Mónica Tramullas Fernández



Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2013-47434-R), Instituto de Salud Carlos III (RD12/0042/0018 y PI12/00999) y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).





## **Agradecimientos**

---



## Agradecimientos

---

Puede parecer que este apartado es el más fácil de escribir, pero nada más lejos de la realidad. La creación de la tesis, sobre todo teniendo en cuenta que mi actividad habitual es meramente clínica, hubiera sido imposible sin el trabajo, el consejo, la profesionalidad, el tiempo y la colaboración de una gran cantidad de personas a muchas de las cuales no conocía previamente. Es esto precisamente lo que más debo agradecer, que me hayan acogido en lo personal como si yo siempre hubiese estado ahí.

Estoy seguro de que no os mencionaré a todos. Espero que me perdonéis porque os estoy muy agradecido pero, de ir de uno en uno, este apartado sería el más extenso de la tesis y pretendo ser breve.

Todo camino tiene un fin, que es donde ahora me encuentro, pero también un principio. En mi caso todo empezó con una sencilla frase pronunciada por el Dr. Nistal durante una intervención quirúrgica y esa frase fue “oye Roberto... ¿tú no estarías interesado en hacer la tesis?”. No detallaré aquí mi respuesta, pero ese fue el inicio del camino que me llevó a terminar este trabajo y mi primer agradecimiento es por tanto para él.

A los pacientes que han participado en el estudio quiero agradecerles su generosidad. Sin su participación altruista este trabajo no hubiera sido posible.

Cuando llegué al Departamento de Fisiología y Farmacología, me encontré con un amplio grupo de personas; algunos desarrollando su actividad laboral, otros realizando sus propias tesis. Unos ya estaban allí cuando yo llegué y otros se incorporaron con posterioridad, pero lo cierto es que a todos tengo algo que agradecer.

En primer lugar, tengo que agradecer a la Prof<sup>a</sup> Maruja Hurlé aceptar la dirección de mi Tesis Doctoral y guiarme siempre con acierto y paciencia, siempre con tiempo para mí, a pesar de tener una gran cantidad de trabajo mucho más importante que la dirección de mi tesis.

Exactamente lo mismo tengo que decir de mi co-directora la Dra. Mónica Tramullas que ha dedicado una impagable cantidad de horas tanto en guiarme como colaborando en las cirugías de las ratas.

## Agradecimientos

---

A ambas, Maruja y Mónica agradezco su profesionalidad, pero sobre todo valoro el hecho de haberme incorporado como un miembro más de la “familia” del laboratorio.

Precisamente a la “familia” del laboratorio (y no sólo al grupo de Maruja) tengo mucho que agradecer. Empezando por Sara por enseñarme el modelo animal y porque mi trabajo asienta sobre el suyo, continuándolo. A Aki y David por su simpatía y ofrecerse siempre a ayudar, a Ros y Raquel por su ayuda y por continuar la investigación, a Nieves, Ana y María porque a pesar de dar trabajo sin embargo me han tratado tan bien, a Ana Villar por ofrecerse siempre a ayudarme en lo que necesite con una sonrisa (siempre he declinado la oferta por no sobrecargarla, pero el gesto se lo agradezco infinitamente), a Álvaro por dejarme utilizar su instalación y por enseñarme a usar algunos programas... Es en este apartado del personal de los distintos grupos precisamente donde es imposible ir de uno en uno por todos, pero lo cierto es que agradezco la acogida de absolutamente todos los que me han ayudado con su trabajo, con su consejo, o con su acogida.

También quiero tener unas palabras de agradecimiento para mis compañeros del Hospital Valdecilla. Son muchos los que han recogido muestras de pacientes para incluirlas en el estudio y nuevamente es imposible ir uno por uno, pero sobre todo agradezco la ayuda a mis compañeros de sección Jorge, Alberto, Gaby, Rodri, Eduardo y Carolina, a algunas de otras secciones como Marta y Noemi (que son las verdaderas diseñadoras de la portada), Eva, Isa y otros más, que recogieron casi tantas muestras como yo mismo.

Al Prof. Javier Llorca del Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, por aclarar mis dudas sobre aspectos relacionados con la estadística de los pacientes.

A mis padres, a mis suegros, a mis hermanos, a mis sobrinos y a mi cuñado Sergio, que es el autor de la modificación de algunas imágenes incluidas en el presente trabajo.

A ti que estás leyendo este apartado de la tesis que normalmente suele ser ignorado.

## **Agradecimientos**

---

Para la realización de esta tesis tuve que pedir un préstamo consistente en una gran cantidad de tiempo que no me pertenecía. Fueron muchas horas que física o mentalmente no he compartido con Eva (mi mujer) ni con Claudia y Miguel (mis hijos). Para ellos mi mayor agradecimiento por este tiempo común que voluntariamente han cedido con generosidad y por ser siempre mi gran apoyo. Trataré de devolver una parte de lo prestado a partir de ahora.



A Eva, a Claudia y a Miguel





# Índice

---



ABREVIATURAS .....	21
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	25
ESTADO ACTUAL DEL TEMA .....	31
1. EL DOLOR.....	33
1.1. Fisiología del sistema nociceptivo .....	33
1.2. Tipos de dolor .....	44
1.3. El dolor neuropático .....	46
1.3.1. Mecanismos productores de dolor neuropático .....	47
1.3.2. Epidemiología del dolor neuropático .....	55
1.3.3. Diagnóstico del dolor neuropático .....	56
1.3.4. Tratamiento farmacológico del dolor neuropático .....	58
2. MICRO RNAs .....	60
2.1. Descubrimiento y características de los miRNAs .....	60
2.2. Biogénesis de los miRNAs .....	61
2.3. Función de los miRNAs .....	64
2.4. miRNAs y enfermedad .....	66
2.5. miRNAs y dolor neuropático .....	69
2.6. Micro RNA-30c .....	72
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	79
MATERIAL Y MÉTODOS .....	83
1. SUJETOS DE ESTUDIO .....	85
1.1. Pacientes .....	85
1.2. Animales de experimentación .....	86
2. MODELO EXPERIMENTAL: NEUROPATÍA TRAUMÁTICA DEL NERVI CIÁTICO.....	87
3. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTÍMULOS MECÁNICOS: TEST DE MONOFILAMENTOS DE VON FREY.....	87
4. TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES .....	88
5. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO .....	90
6. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs MEDIANTE PCR CUANTITATIVA .....	91
6.1. Extracción de RNA de fluidos (Plasma y LCR) .....	91

6.2.	Determinación de la concentración y pureza del miRNA .....	91
6.3.	Transcripción inversa del miRNA .....	92
6.4.	PCR cuantitativa .....	92
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	93
RESULTADOS .....		95
1.	ESTUDIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	97
1.1.	Curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica.....	97
1.2.	Efecto del tratamiento crónico con un inhibidor específico de miR-30c administrado por vía intracisternal .....	99
1.2.1.	La administración precoz de LNA-miR-30c inhibidor atenúa el desarrollo de dolor neuropático y revierte la alodinia mecánica previamente establecida en un modelo de lesión del nervio ciático en ratas .....	99
1.2.2.	La administración tardía de LNA-miR-30c inhibidor revierte la alodinia mecánica previamente establecida en un modelo de lesión del nervio ciático en ratas .....	104
2.	ESTUDIO EN PACIENTES .....	107
2.1.	Características demográficas y clínicas de los pacientes .....	107
2.2.	Incremento de niveles circulantes de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y en plasma en pacientes que padecen dolor neuropático vs. pacientes libres de dolor .....	108
2.3.	Ausencia de Influencia de la isquemia arterial en los niveles circulantes de miR-30c .....	109
2.4.	Ausencia de Influencia de edad, sexo y diabetes en los niveles circulantes de miR-30c .....	110
2.5.	Valor de los niveles circulantes de miR 30c en plasma y en líquido cefalorraquídeo como biomarcadores de dolor neuropático .....	112
DISCUSIÓN .....		117
CONCLUSIONES.....		133
BIBLIOGRAFÍA .....		137
ANEXOS .....		167

## **Abreviaturas**

---



AINE: Antiinflamatorio no esteroideo.

AMPA:  $\alpha$ -amino -3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiónico.

AMPAr: Receptor de  $\alpha$ -amino -3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiónico.

AMPc: Adenosín-monofosfato cíclico.

ATP: Adenosín-trifosfato.

ASIC: Familia de receptores sensibles a ácidos.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.

CCA: Córtex cingular anterior.

CGRP: Proteína relacionada con el gen de la calcitonina.

CIE: Sistema de clasificación internacional de enfermedades.

CSF1: Factor estimulante de colonias 1.

EPSP: Potencial excitatorio postsináptico.

GABA: Ácido  $\gamma$ -amino-butírico.

GABAr: Receptor de ácido  $\gamma$ -amino-butírico.

GlyR: Receptor de glicina.

GlyRa3: Receptor  $\alpha$ -3 de glicina.

GTP: Guanosín trifosfato.

HCN: Canales con compuerta de nucleótidos.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

HSP: Proteína del shock térmico.

HT: Hidroxi-triptamina, serotonina.

IL: Interleuquina.

IRMf: Imagen de resonancia magnética funcional.

KCC2: Co-transportador de potasio y cloro.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

MAPK: Proteín-kinasa activada por mitógenos.

## Agradecimientos

---

NA: Noradrenalina.

Nav: Canal de sodio dependiente de voltaje.

NeuPSIG: Grupo de interés especial sobre dolor neuropático de la asociación internacional para el estudio del dolor.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NMDAr: Receptor de N-metil-D-aspartato.

PGE: Prostaglandina E.

PI3K: Fosfoinositol 3 kinasa.

PKA: Proteinkinasa A.

PKC: Proteinkinasa C.

PKC $\delta$ : Proteinkinasa C tipo delta.

PKM $\zeta$ : Proteinkinasa C tipo Z.

PLC: Fosfolipasa C.

SGP: Sustancia gris periacueductal.

Src: Proteín-kinasa del oncogén del virus del sarcoma de Rous.

TET: Tracto espino-talámico.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TrK: Tirocin-Kinasa.

TrKA: Tirocín-kinasa A.

TRP: Receptor de potencial transitorio

TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

WDR: Neuronas de rango dinámico amplio.



## **Justificación y objetivos**

---



“El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión tisular real o potencial, o descrita como la ocasionada por dicha lesión” (IASP 1986). El dolor, en condiciones fisiológicas, alerta al organismo de la presencia de una lesión tisular o enfermedad, es proporcional al estímulo desencadenante, y provoca respuestas orientadas a la defensa del organismo. En condiciones normales, el dolor desaparece tras la curación de la lesión que lo provocó. Sin embargo, en algunos individuos, y en determinadas situaciones de daño neural o inflamación, el dolor puede persistir mucho tiempo después de la curación de la lesión, debido al establecimiento de fenómenos de plasticidad patológica en el sistema nervioso. El dolor crónico carece de función biológico-defensiva y es considerado por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad en sí mismo. La Sociedad Española del Dolor refiere que el 20% de la población española padece dolor crónico, con un tiempo medio de evolución del dolor es de seis años y medio. La elevada prevalencia del dolor crónico entre la población, su gran impacto en términos humanos, y la escasa eficacia de los tratamientos analgésicos disponibles convierten al dolor crónico en un problema socio-sanitario de primera magnitud que consume, entre costes directos e indirectos, casi el 3 % del PIB Europeo.

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico, causado por la lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial. Algunos individuos, tras la curación de una lesión nerviosa, desarrollan un cuadro de dolor persistente caracterizado por respuestas exageradas a los estímulos dolorosos (hiperalgesia), dolor en respuesta a estímulos inocuos (alodinia) y dolor espontáneo, que se mantienen durante meses e incluso años. Es altamente refractario a la terapia con analgésicos convencionales, particularmente en sus fases evolucionadas. Son causa frecuente de dolor neuropático la neuropatía secundaria a la isquemia crónica de las extremidades inferiores, el miembro fantasma tras la amputación de un miembro, los procesos tumorales, la neuropatía diabética, la neuralgia postherpética, el síndrome de dolor regional complejo, la fibromialgia, etc.

El dolor neuropático puede ser difícil de diagnosticar precozmente ya que carece de signos y síntomas patognomónicos. Su diagnóstico, generalmente cuando ya está plenamente establecido, se basa exclusivamente

## Justificación y objetivos

---

en la exploración física y la anamnesis, que entrañan un importante componente de subjetividad, tanto por parte del paciente como del médico. A pesar del interés evidente, en la actualidad carecemos de pruebas diagnósticas y biomarcadores accesibles que ayuden a un diagnóstico eficiente y objetivo del dolor neuropático.

El abordaje farmacológico del dolor crónico se lleva a cabo fundamentalmente con cinco grupos de fármacos: paracetamol y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), antidepresivos, antiepilépticos, anestésicos locales y opioides. Los fármacos disponibles en la actualidad no son eficaces en todos los pacientes, no tienen capacidad para modificar el curso evolutivo del dolor, y carecen de propiedades preventivas/curativas. La complejidad que entraña identificar las dianas más apropiadas sobre las que sustentar nuevos abordajes etiológicos para el tratamiento del dolor crónico ha condicionado que el progreso en el desarrollo de nuevos fármacos no haya dado los frutos deseados. Es por todo ello que el diseño de terapias dirigidas a la prevención/curación/alivio del dolor crónico constituye un reto científico prioritario.

Los miRNAs son RNAs cortos, monocatenarios, no codificantes, con función inhibidora post-transcripcional de la expresión de sus genes diana. La unión del miRNA, basada en la complementariedad de secuencias, a la región 3' no traducida (3'UTR) del RNA mensajero da lugar a su degradación o a la inhibición de la traducción. Mediante este mecanismo, cada miRNA controla cientos de genes implicados en gran variedad de procesos celulares y vías de señalización, lo que los convierte elementos reguladores clave de la expresión génica. En los últimos años se ha producido una explosión de actividad investigadora dirigida a desvelar el papel de miRNAs específicos en la biología del desarrollo, fisiología y fisiopatología de órganos y sistemas. El reciente descubrimiento de perfiles específicos de expresión aberrante de miRNAs en modelos experimentales y patologías del humano ha impulsado el desarrollo acelerado de aproximaciones terapéuticas dirigidas a normalizar la expresión de miRNAs, mediante oligonucleótidos sintéticos (miR-mimics), en caso de expresión reducida, o anti-miRNAs en caso de sobre-expresión.

Un número creciente de trabajos ha desvelado la contribución de diversos miRNAs al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático en modelos experimentales. Nuestro grupo demostró un papel relevante para miR-30c-5p en el desarrollo de alodinia tras la lesión del nervio ciático, así como su potencial como biomarcador y diana terapéutica en el animal de experimentación. Mediante secuenciación masiva se puso en evidencia un grupo discreto de miRNAs desregulados en el asta dorsal de la médula espinal tras la lesión del nervio ciático. Entre los miRNAs más desregulados, miR-30c-5p aparecía intensamente sobre-expresado en condiciones de dolor neuropático respecto a los ratones con nocicepción reducida. Los resultados preliminares en ratas mostraron la utilidad de silenciar precozmente miR-30c en el sistema nervioso para retrasar el desarrollo de hiperalgesia y alodinia, al menos en el corto plazo tras la lesión del nervio ciático.

Continuando con este proyecto, en la presente Tesis Doctoral nos planteamos como objetivos generales aspectos tan relevantes como:

(i) Establecer la capacidad de una terapia precoz, dirigida a neutralizar miR-30c en el sistema nervioso central, para prevenir el desarrollo de dolor neuropático durante un periodo prolongado de seguimiento tras la lesión del nervio ciático en ratas.

(ii) Determinar el potencial valor curativo del antagonista específico de miR-30c administrado una vez que el dolor neuropático ya está completamente establecido y valorar la persistencia del efecto antialodínico a lo largo de un periodo prolongado de seguimiento.

(iii) Determinar la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos en el animal de experimentación en un grupo de pacientes con dolor neuropático secundario a isquemia severa de las extremidades inferiores.

(iv) Establecer el valor de los niveles circulantes de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y/o plasma como biomarcadores accesibles a pie de cama, para discriminar con sensibilidad y especificidad a aquellos individuos que padecen dolor neuropático de los que están libres de dolor.



**Estado actual del tema**

---





### 1. EL DOLOR

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP) el dolor es una “experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión tisular real o potencial, o descrita como la ocasionada por dicha lesión”. El dolor, en condiciones fisiológicas, es una sensación desagradable que alerta al cuerpo de la presencia de daño tisular o enfermedad. La sensación dolorosa fisiológica, o dolor nociceptivo, es proporcional a la intensidad del estímulo y desencadena respuestas protectoras dirigidas a la defensa del organismo. Normalmente, el dolor desaparece tras la curación de la lesión que lo provocó. Sin embargo, en algunos individuos, y en determinadas situaciones de daño neural o inflamación, el dolor puede persistir mucho tiempo después de la curación de la lesión, debido al establecimiento de fenómenos de plasticidad patológica en el sistema nervioso (Basbaum y cols., 2009).

#### 1.1. Fisiología del sistema nociceptivo

El impulso doloroso nace a nivel del sistema nervioso periférico donde se sitúa la primera neurona o neurona de primer orden de la vía del dolor. El soma de esta neurona pseudounipolar se localiza en los ganglios raquídeos de las raíces dorsales. Su prolongación axónica periférica, o nociceptor, forma parte del nervio periférico que recoge la sensibilidad nociceptiva. Su prolongación central transmite la señal a la segunda neurona de la vía del dolor. La segunda neurona, o neurona de segundo orden, se localiza en la raíz dorsal de la médula espinal y su proyección axónica, tras decusarse, asciende por los cordones laterales de la médula y transmiten el impulso nervioso a centros supramedulares. La principal vía de proyección ascendente es el tracto espino-talámico, que conecta con la neurona de tercer orden de la vía nociceptiva localizada en el tálamo. También hay vías indirectas que, partiendo de la neurona de segundo orden, conectan con núcleos del tronco cerebral y mesencéfalo, como el tracto espino-reticular, el tracto espino-mesencefálico y el tracto espino-hipotalámico (Almeida y cols., 2004). La neurona de tercer orden tiene su soma en el tálamo y es la encargada de enviar la información a distintas áreas cerebrales que integran la señal dolorosa. Además de estas vías aferentes, hay un circuito nervioso eferente descendente que parte de

## Estado actual del tema

---

distintas áreas del encéfalo, sinapta en la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo, de la que parten conexiones a la región reticular ventrobulbar, y de ésta parte una vía descendente por el cordón dorso-lateral al asta posterior de la médula espinal donde modula la señal dolorosa aferente (Dinakar y Stillman, 2016).

### 1.1.1. La neurona de primer orden.

Sus somas se encuentran en los ganglios sensitivos raquídeos o en los de los pares craneales. Sus prolongaciones periféricas forman los receptores del dolor, sus proyecciones centrales conducen los estímulos nerviosos aferentes a través de las raíces sensitivas espinales o craneales y alcanzan el asta dorsal de la médula espinal o el núcleo sensitivo del trigémino, donde establecen sinapsis con las neuronas de segundo orden.

Los nociceptores son las terminaciones libres de las prolongaciones axónicas periféricas mielínicas A- $\delta$  y amielínicas C de las neuronas sensitivas primarias. Recogen la actividad lesiva, transformando el estímulo doloroso en un impulso nervioso. Responden a cambios de presión (mecanorreceptores), químicos (quimiorreceptores) o térmicos (termorreceptores) de alta intensidad (Raja y cols., 1998; Basbaum y cols., 2000). De acuerdo a su localización los nociceptores se clasifican en:

**a) Cutáneos:** A nivel cutáneo, las fibras A- $\delta$  suelen corresponderse con mecanorreceptores de alto umbral de activación. Se localizan en las capas superficiales de la dermis y epidermis; responden exclusivamente a estímulos mecánicos (pinchazos, pellizcos) de gran intensidad. Están conectados con fibras mielinizadas finas A- $\delta$  que conducen a velocidad de 5-30 m/s. Generalmente transmiten el dolor de tipo punzante. Los receptores polimodales dependen de fibras amielínicas C que conducen a una velocidad menor (1,5 m/s) y responden a diferentes estímulos (mecánicos, químicos y térmicos). Son los más numerosos. Generalmente transmiten el dolor de tipo quemante.

**b) Musculares-articulares:** Situados entre las fibras musculares, en las paredes de los vasos y los tendones. Responden a estímulos como tracción, presión, químicos, calor, isquemia y contracción muscular. En el músculo, los nociceptores A- $\delta$  son mecanorreceptores de alto umbral y polimodales. Los de

tipo C suelen actuar como receptores polimodales. En las articulaciones también existen estos dos tipos de nociceptores y se sitúan en la cápsula articular, ligamentos, periostio y grasa, pero no en el cartílago.

**c) Viscerales:** Forman parte de las aferencias de los nervios simpáticos. Responden a estímulos mecánicos, como la distensión y tracción, y químicos, como en la inflamación de las vísceras. El dolor visceral suele presentarse con una pobre localización y discriminación, y se acompaña con frecuencia de reflejos vegetativos y somáticos. Suele asociar dolor referido en otras estructuras somáticas, principalmente en la piel, debido a la convergencia de aferencias viscerales y musculocutáneas sobre una misma neurona espinal. En ocasiones la convergencia puede deberse a que una misma neurona espinal presenta ramificaciones viscerales y cutáneas.

En cualquier localización (piel, articulaciones o vísceras) existen receptores silentes que no responden a ningún estímulo en condiciones normales, pero en presencia de inflamación se vuelven sensibles a estímulos mecánicos (Schmidt y cols 1995).

Las fibras nerviosas se dividen en tres tipos A, B y C, de más gruesas y más mielinizadas a menor mielinización y grosor (**Tabla1**). Cuanto mayor grosor y mielinización, mayor es la velocidad de conducción. A su vez, las fibras A se subdividen siguiendo el mismo criterio de grosor y mielinización en A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\gamma$  y A $\delta$ . Las fibras encargadas de la transmisión del impulso nociceptivo son las A $\delta$  (para el dolor rápido y bien localizado) y las C (para el dolor lento, sordo y de localización más difusa).

**Tabla 1: Tipos de fibras nerviosas.** Diámetro, velocidad de conducción e inervación.

Tipo	Grosor ( $\mu\text{m}$ )	Vel cond. (m/s)	Inervación
A $\alpha$	15	100	Motora extrafusil.
A $\beta$	8	50	Tacto-presión.
A $\gamma$	6	20	Motora intrafusil
A $\delta$	<3	15	Mecano, termo y nociceptoras.
B	3	7	Simpático preganglionar
C	1	1	Mecano, termo y nociceptoras. Simpático postganglionar

## Estado actual del tema

---

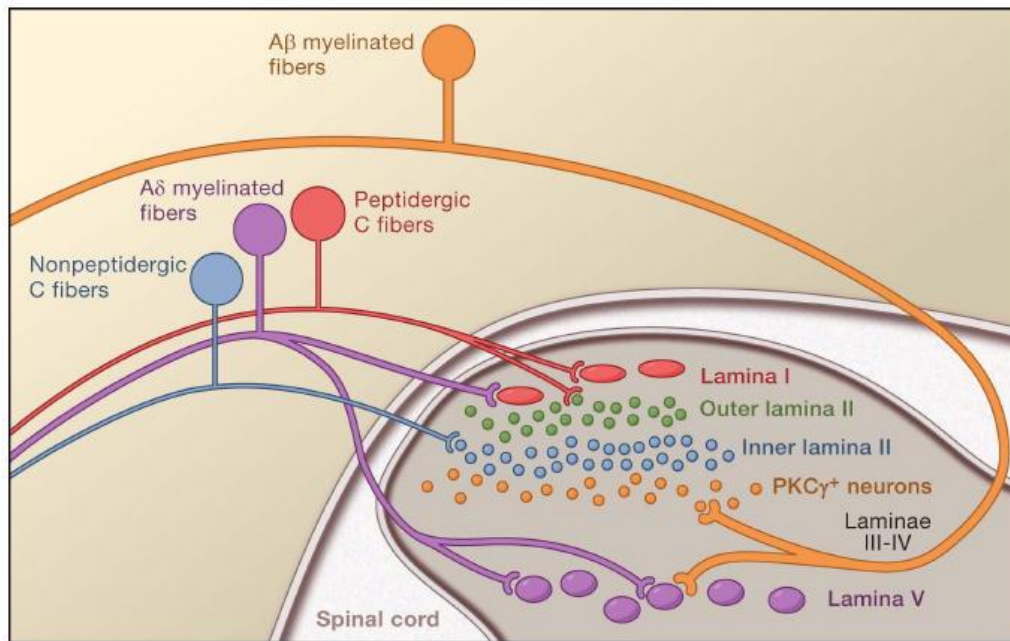
### 1.1.2. La neurona de segundo orden.

La proyección central de la neurona nociceptiva de primer orden penetra en la médula por la raíz posterior a través del surco postero-lateral. Establece sinapsis con la neurona de segundo orden o neurona de proyección, cuyo soma está situado en la sustancia gris del asta posterior de la médula, y transmite el impulso a centros superiores. La disposición de estas sinapsis en la médula se conoce (**Figura 1**) y está recogida en la revisión de Basbaum y cols. (2009). En general, las aferencias nociceptivas sinaptan con neuronas de las láminas I (neuronas marginales o nociceptivas específicas), II (sustancia gelatinosa) y V (neuronas de rango dinámico amplio [WDR]). Las fibras A $\delta$  cutáneas terminan fundamentalmente en las láminas I y V, y las fibras Tipo C terminan en las láminas II y V. Las fibras procedentes de los nociceptores musculares y articulares sinaptan en las láminas I y V y los nociceptores viscerales de tipo C, en las láminas I, V, y X.

En la lámina V se reciben impulsos de neuronas nociceptoras A $\delta$  y no nociceptoras A $\beta$  y de neuronas nociceptoras C. Es decir, en esta localización hay neuronas que reciben aferencias tanto nociceptivas como no nociceptivas. Estas neuronas se conocen como neuronas de amplio rango dinámico y son las responsables del dolor referido como por ejemplo el dolor anginoso referido al brazo izquierdo.

En la sustancia gelatinosa (lámina II) hay interneuronas inhibitorias que sinaptan con aferencias nociceptivas y no nociceptivas por un lado y, por otro, con neuronas de segundo orden de la lámina I. Se estimulan por el tacto y se inhiben por estímulos de alta intensidad.

En la parte más ventral de la lámina II se sitúan interneuronas excitatorias que expresan la forma delta de la proteinkinasa C (PKC $\delta$ ) y reciben aferencias de fibras no nociceptivas. Estas neuronas están implicadas en la persistencia del dolor y explican en parte el mecanismo de la alodinia (Neumann y cols, 2008).



**Figura 1. Conexiones de las fibras nociceptoras en el asta posterior.** Tomado de Basbaum 2009.

La transmisión del estímulo doloroso desde los nociceptores periféricos a las neuronas del asta dorsal de la médula se realiza mediante neurotransmisores liberados por las terminaciones centrales de los nociceptores. Estos neurotransmisores son de dos tipos: aminoácidos y neuropéptidos. El principal aminoácido excitador de las fibras sensoriales aferentes a nivel de la médula, tanto para las neuronas nociceptoras como para las no nociceptoras, es el glutamato. En condiciones normales, la liberación de glutamato en la sinapsis estimula receptores ionotrópicos de tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), permeables a  $\text{Na}^+$ ; la apertura de este canal es la responsable del potencial excitatorio postsináptico.

Los neuropéptidos mejor estudiados son la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), que Inician potenciales sinápticos más lentos en las neuronas del asta dorsal. El glutamato y los neuropéptidos se liberan conjuntamente, pero su efecto es diferente sobre las neuronas post-sinápticas; los neuropéptidos amplifican y prolongan el efecto del glutamato. El glutamato es recaptado rápidamente por las terminaciones nerviosas y células gliales por lo que su radio de acción se limita a la sinapsis

## Estado actual del tema

---

en la cual se libera. Los neuropéptidos no son recaptados, sino que difunden y ejercen efecto a distancia. Ello, unido a un incremento en la tasa de liberación de neuropéptidos, conduce al aumento de la excitabilidad del asta dorsal de la médula y a la localización difusa del dolor en muchas situaciones clínicas.

La primera neurona no sólo libera neurotransmisores a nivel de la sinapsis en la médula, sino que los nociceptores en respuesta a su activación, liberan a nivel periférico sustancias que están implicadas en el proceso de inflamación neurogénica. Las mejor estudiadas son el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P, que inducen vasodilatación, extravasación de proteínas e inflamación, e influyen en la propia activación del nociceptor (Basbaum y cols., 2009).

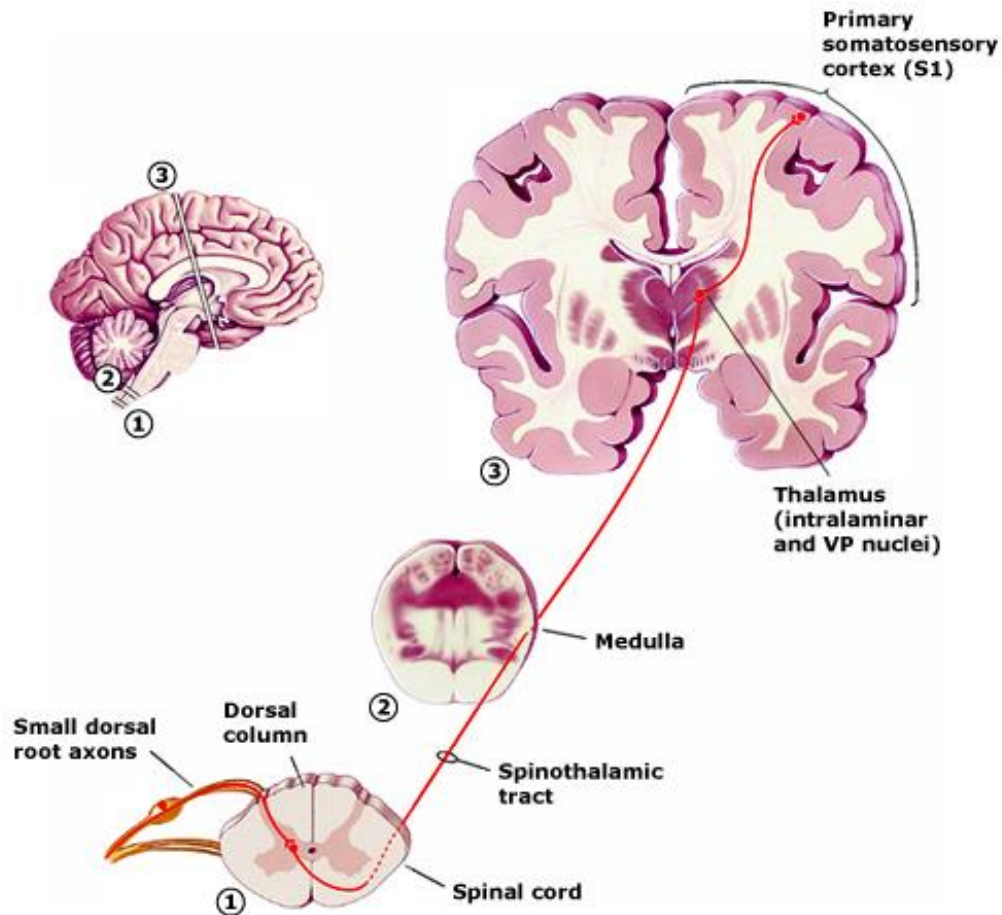
### **1.1.3. Las vías ascendentes espinales del dolor.**

Las vías de proyección ascendente están formadas por los axones de las segundas neuronas. Conducen el impulso nervioso nociceptivo ascendente por la médula para sinaptar con los núcleos encefálicos encargados de la percepción e integración de la señal dolorosa. Aunque su función principal es la conducción del estímulo doloroso, simultáneamente participa en la modulación eferente del dolor.

#### **a. Tracto espinotalámico (TET).**

Comunica la médula espinal con el tálamo, donde se encuentra la tercera neurona de la vía. El TET contiene axones procedentes de los siguientes tipos de neuronas: 75% neuronas nociceptivas de amplio rango dinámico de la lámina V, 25% neuronas nociceptivas específicas de la lámina I, y escasas neuronas no nociceptivas A $\beta$  y A $\delta$ . Cuantitativamente es la vía más importante (Cheung y Morris 2000). Se trata de una vía cruzada, de modo que la interrupción quirúrgica del haz de un lado de la médula disminuye de forma considerable las sensaciones dolorosas de la mitad contralateral del cuerpo, mientras que su estimulación eléctrica provoca una sensación dolorosa. Ya en el tálamo, el TET contacta con los núcleos ventral posterolateral (VPL) ventral posteromedial (VPM), central lateral (CL), ventral posterior inferior (VPI). A su vez, las neuronas de estos núcleos proyectan sus

axones sobre el córtex somatosensorial primario, ínsula, corteza prefrontal, amígdala, corteza cingulada anterior, etc.



**Figura 2. Recorrido del impulso nervioso doloroso desde su entrada en la médula a la corteza sensorial, siguiendo el tracto espiño-talámico.** Cortes a nivel medular (1), bulbar (2) y cerebral (3) Tomado de Bear 2001.

El TET también está conectado directa e indirectamente con la ínsula. La vía indirecta pasa por el córtex parietal posterior, un córtex asociativo multimodal (auditivo, visual y somatosensorial) que permite al cerebro elaborar una representación sensorial que incluye todos los elementos sensoriales de entrada en un momento dado, además de elementos procedentes de la memoria, que permite al individuo evaluar la amenaza real que constituye la fuente origen de la sensación dolorosa. Esta representación global se comparte con el córtex asociativo multimodal frontal, encargado de definir las prioridades

## Estado actual del tema

---

y elaborar una estrategia para hacer frente a la situación, teniendo en cuenta el contexto general y la experiencia pasada. En paralelo, el córtex de la ínsula, que proyecta sobre la amígdala y el hipotálamo, modula el componente emocional subcortical. La ínsula y el córtex parietal posterior estimulan a su vez el CCA, una estructura que forma parte de la red emocional y motivacional del cerebro, relacionado con el sistema límbico. Podría tener una función de integración, estableciendo un valor emocional que permitiría definir las prioridades de acción, completando la acción del córtex multimodal frontal, lo que capacita al individuo a definir si debe afrontar la situación que generó el dolor o bien huir, según las circunstancias.

Asociadas al TET discurren fibras que conectan con el tronco del encéfalo, el mesencéfalo, la formación reticular, y la sustancia gris periacueductal.

### **b. Tracto Espinorreticular.**

Está formado sobre todo por axones de neuronas nociceptivas y neuronas WDR y por muy pocos axones de neuronas sensoriales no nociceptivas. Participan en los mecanismos de integración del componente afectivo del dolor, las respuestas conductuales y vegetativas, y tiene especial relevancia en la modulación del dolor ya que sinapta con estructuras del tronco que envían estímulos inhibitorios descendentes (Ossipov 2012).

### **c. Tracto Espinomesencefálico.**

Se origina sobre todo de neuronas de las láminas I, II, IV, V y VI, pero también de la VII y X y comprende neuronas sensoriales de todo tipo, WDR, nociceptivas específicas y no nociceptivas. Proyecta a dos niveles, uno de ellos en láminas profundas del colículo superior activa mecanismos inhibitorios. El otro, formado por neuronas WDR y nociceptoras específicamente sinapta a nivel de la sustancia gris periacueductal produciendo respuestas de aversión, cardiovasculares y afectivas y activando vías inhibitorias descendentes sobre el asta dorsal.



### **d. Tracto Espinohipotalámico.**

Se origina en las láminas I, V y X a partir de neuronas WDR, nociceptoras y no nociceptoras. Los estímulos no nociceptivos se transmiten directamente por medio del tracto trigémino-hipotalámico, mientras que los nociceptivos lo hacen tanto por este tracto, como por el retículo-hipotalámico. Contribuye a la respuesta autónoma neuroendocrina, la respuesta de alerta y la afectiva.

#### **1.1.4. Vías descendentes moduladoras.**

En su trayecto hacia estructuras supraespinales, las vías ascendentes que conducen la sensibilidad nociceptiva, en conjunción con señales procedentes de corteza, tálamo, amígdala, etc. pueden activar una serie de sistemas descendentes que controlan las aferencias nociceptivas a nivel de la médula espinal, modulando el ascenso de nuevas señales (**Figura 3**). Los elementos mejor estudiados de estos sistemas descendentes son la sustancia gris periacueductal, la formación reticular ventrobulbar y el núcleo magno del rafe. Sus proyecciones descendentes alcanzan el asta posterior de la médula espinal donde ejercen un control inhibitorio, aunque recientes estudios han identificado sistemas descendentes que facilitan la transmisión del dolor (François y cols., 2017).

Los neurotransmisores implicados son noradrenalina, serotonina, opioides, cannabinoides y GABA. El sistema descendente tiene tres componentes mayores, interrelacionados funcionalmente: el sistema opioide, el sistema noradrenérgico y el sistema serotoninérgico. El sistema opioide está presente en la amígdala, el hipotálamo, la sustancia gris periacueductal, el núcleo rafe magno y el asta posterior de la médula. Las neuronas noradrenérgicas proyectan desde el locus coeruleus y otras células noradrenérgicas hasta el asta posterior, a través del cordón dorsolateral. La estimulación de estas áreas produce analgesia. En el sistema serotoninérgico, las neuronas del rafe contienen serotonina y envían sus proyecciones a la médula por el cordón dorsolateral; el bloqueo farmacológico o la lesión del rafe magnus puede reducir los efectos de la morfina y la administración de serotonina en la médula produce analgesia (Serrano-Atero y cols. 2002).

## Estado actual del tema

---

### a. Sustancia gris periacueductal (SPG).

La SGP es una zona muy rica en péptidos opioides (encefalinas, dinorfina, y alfa neoendorfina), y recibe terminaciones hipotalámicas ricas en  $\beta$ -endorfina. La analgesia producida por estimulación de esta área precisa la participación de estas endorfinas y es susceptible de inhibición por naloxona. (Sims-Williams y cols., 2017).

Esta área es el principal modulador de la señal nociceptiva, integrando la información que recibe del hipotálamo, córtex prefrontal medial y la amígdala, así como conexiones catecolaminérgicas del propio tronco del encéfalo, sobre todo del núcleo cuneiforme, la formación reticular y el locus coeruleus. Y emitiendo proyecciones que modulan la señal dolorosa a nivel del área rostral ventromedial (Heinricher y cols., 2009).

### b. Área Rostral Ventromedial.

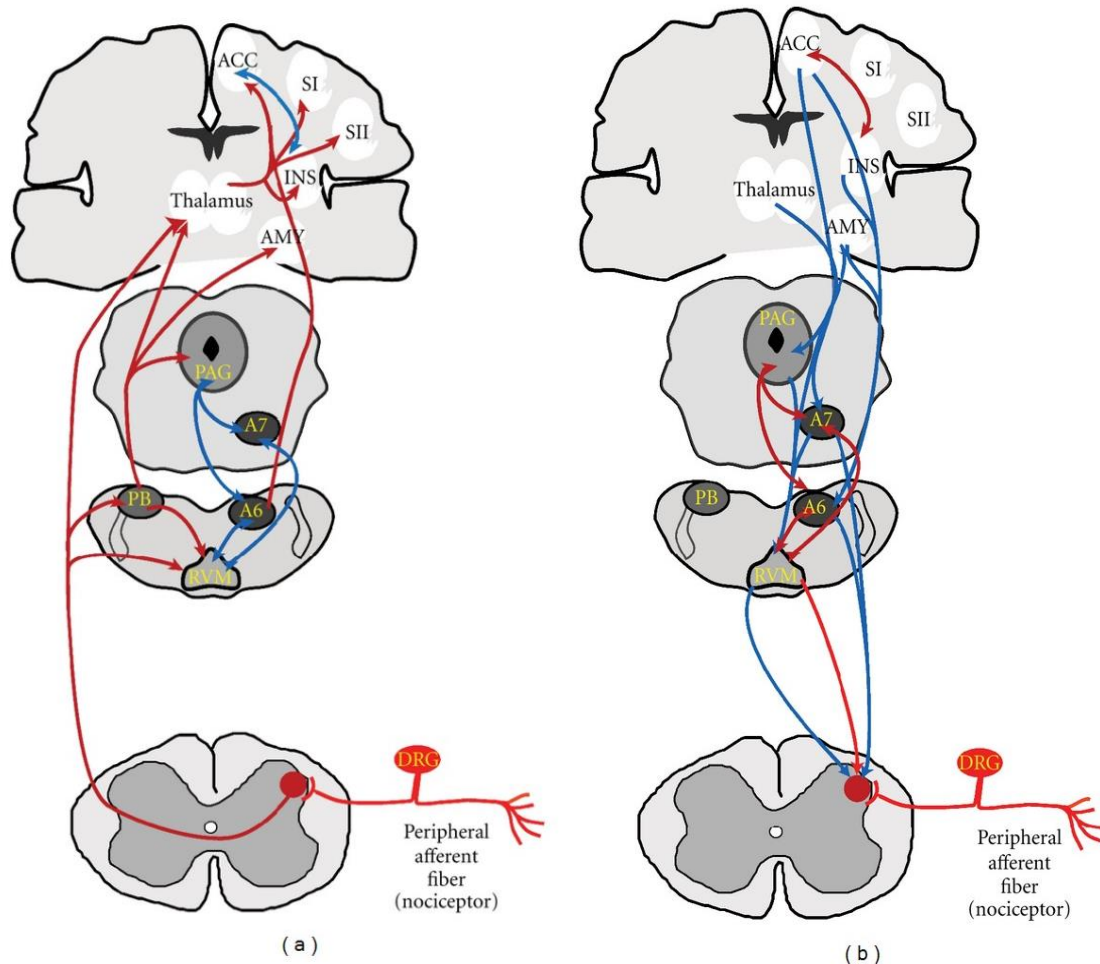
Está situada en la zona bulbar del tronco del encéfalo e incluye al núcleo magno del rafe y la formación reticular adyacente. Esta área recibe conexiones de la sustancia gris periacueductal y de núcleos noradrenérgicos troncoencefálicos y conexiones desde la vía aferente del dolor. Contiene células On, células Off y células neutras. Las células On proyectan sobre el asta dorsal medular, favoreciendo la señal dolorosa, y envían conexiones gabaérgicas que inhiben células Off. Las células Off liberan serotonina con efecto activador sobre otras células Off, e inhibidor sobre células On. Las células Off activan interneuronas inhibitorias del asta posterior medular, inhibiendo la señal dolorosa. (de Felice y Ossipov, 2016).

De este modo esta estructura se comporta como un interruptor que o bien facilita o bien inhibe la señal dolorosa en función de que los estímulos descendentes recibidos favorezcan el predominio de tono de células On u Off.

Las células neutras no se relacionan con la señal dolorosa, pero se ha postulado que se pueden diferenciar en células On u Off participando en la cronificación del dolor (Miki y cols., 2002).

Las fibras descendentes que parten de esta área liberan serotonina, noradrenalina o dinorfina (Tan-No y cols., 2009) y, recientemente, también se han descrito fibras descendentes que liberan GABA (François y cols., 2017). La

serotonina a este nivel será proalgésica o analgésica dependiendo del receptor con el que interactúe (Viguiet y cols., 2013).



**Figura 3. Sistemas moduladores del dolor ascendentes (a) y descendentes (b).** AAC (córtez cingulado anterior), SI (córtez somatosensorial primario), SII (córtez somatosensorial secundario), INS (córtez de la ínsula), AMY (amígdala), PAG (sustancia gris periacueductal), PB (núcleo parabraquial) A6 y A7 (núcleos noradrenérgicos), RVM (área rostral ventromedial). Modificado de Ossipov 2012.

La noradrenalina actúa a nivel de receptores  $\alpha_1$  presinápticos de interneuronas inhibitoras medulares facilitando la liberación de GABA y glicina, actuando como inhibidor de la sensación dolorosa (Baba y cols., 2000). La activación de receptores  $\alpha_2$  presinápticos en la terminación central de las fibras nociceptoras disminuye la liberación de glutamato reduciendo la activación aferente de la segunda neurona de la vía ascendente del dolor. La inhibición de

## Estado actual del tema

---

interneuronas medulares excitatorias también reduce la actividad de la neurona de proyección (Yoshimura y Furue, 2006).

### c. Asta posterior de la médula espinal.

Es el actor final donde hace sinapsis el haz dorso-lateral que transmite la señal inhibitoria descendente a la segunda neurona a través de fibras que liberan noradrenalina (Tan-No y cols., 2009) o serotonina (Ito y cols., 2000). A este nivel, las conexiones se establecen sobre las terminaciones sinápticas nociceptivas de las láminas I y V y sobre las interneuronas GABA-érgicas y encefalinérgicas de la lámina II. La estimulación de interneuronas GABA-érgicas produce reducción en la intensidad de la señal dolorosa a nivel medular, mientras su inhibición por sinapsis de neuronas inhibitorias de la vía descendente amplifica la intensidad de la señal dolorosa (François y cols., 2017).

## 1.2. Tipos de dolor

Hay varias formas de clasificar el dolor, en nuestro caso lo clasificaremos por su mecanismo de producción, origen anatómico, por su duración y por su intensidad. (IASP; clasificación internacional de enfermedades [CIE] 11; Basbaum y cols., 2000; Woolf 2010)

### a. Según el mecanismo que lo produce

Dolor nociceptivo. Es el dolor que aparece como consecuencia de estímulos que producen daño o lesión somática o visceral. Se debe siempre a la activación del nociceptor y normalmente cumple una función de protección.

Dolor inflamatorio. Algunos autores lo consideran una entidad propia, ya que aunque se produce por activación de nociceptores, se produce una sensibilización del nociceptor por mediadores inflamatorios (Woolf 2010).

Dolor neuropático. En este caso, el dolor está provocado por una lesión o trastorno funcional del propio sistema nervioso, ya sea central o periférico, que activa o incrementa inadecuadamente la señal dolorosa. No tiene ninguna función de advertencia defensiva. Este tipo de dolor será tratado más adelante por ser el objeto de estudio del presente trabajo.

### **b. Según la estructura anatómica que lo origina**

Dolor somático. Originado en la piel, músculos, articulaciones, ligamentos o huesos, se caracteriza por ser selectivo, metamérico y no referido. Hay participación de nociceptores específicos y del sistema nervioso periférico. Existen dos tipos de dolor somático, dolor somático superficial y dolor somático profundo. El superficial nace en la piel y mucosas, los estímulos principales que lo originan incluyen calor o frío intensos, tensiones mecánicas (corte, estiramiento, inflamación) y sustancias cáusticas. Clásicamente, se diferencia en dolor superficial primario: dolor rápido, localizado, conducido a través de fibras A-delta; y dolor superficial secundario: dolor más lento, conducido a través de fibras C. Da origen a reacciones consistentes en un aumento de la actividad muscular y de la descarga simpática adrenal. El dolor somático profundo nace en los músculos, aponeurosis, articulaciones y periostio. Los estímulos causantes principales son los mismos que los del dolor superficial, y la isquemia muscular. Es un dolor sordo, pero bastante bien localizado, que origina reacciones de quietud, acompañada de contracturas musculares dirigidas a la fijación de la región dolorosa, y de manifestaciones vegetativas, como bradicardia y sudoración.

Dolor visceral. Originado en los órganos internos (aunque no todas las vísceras son sensibles al dolor), es la forma de dolor que con mayor frecuencia aparece como consecuencia de enfermedades. Los estímulos principales que lo desencadenan son: distensión o dilatación brusca, espasmo o contracción del músculo liso (en particular, si hay isquemia) e irritantes químicos. Hay participación de nociceptores inespecíficos y del sistema nervioso autónomo. Clínicamente, se caracteriza por ser sordo y mal localizado. A menudo, se refiere a la superficie del organismo en zonas distantes de la víscera que lo origina, siguiendo las leyes de la organización segmentaria. Se suele acompañar de respuestas neurovegetativas.

La diferencia entre dolor somático y dolor visceral, no sólo implica diferente origen anatómico sino un distinto mecanismo de producción a nivel molecular. Ello justifica la respuesta diferencial a los analgésicos (Hockley y cols., 2017).

## Estado actual del tema

---

### c. Según su duración

Dolor agudo. Es aquel dolor que no suele durar más de lo que tarda en resolverse la lesión causante y, en todo caso, menos de un período, arbitrariamente establecido entre 3 y 6 meses. Se inicia por la estimulación nociceptiva del tejido somático o visceral y tiene una función defensiva. (Scholz y Woolf., 2002).

Dolor crónico. Se mantiene durante un periodo superior a 3-6 meses, a pesar de que la causa que lo produjo ha desaparecido y, por tanto, ha dejado de cumplir su función biológico-defensiva (Dinakar y Stillman, 2016). El dolor crónico suele clasificarse en: primario, neoplásico, postquirúrgico/traumático, neuropático, orofacial, cefaleas, y musculoesquelético (Treede y cols., 2015).

### d. Según su intensidad

El dolor se clasifica en (i) ligero: puntuado por el paciente con intensidad de 1 a 4 sobre 10 en las escalas analógicas visuales y no interfiere con la actividad habitual; (ii) moderado: puntuado con 5 ó 6 y dificulta la ejecución de la actividad habitual; y (iii) severo: puntuado de 7 a 10 y dificulta el descanso (Woo y cols., 2015).

## 1.3. El dolor neuropático

La definición actual de dolor neuropático de la IASP es "aquel dolor que tiene su origen en un daño del tejido nervioso somato-sensorial, central o periférico, con alteración en los mecanismos moduladores descendentes que actúan en las vías de transmisión del dolor". La expresión sistema nervioso se sustituye por el sistema somatosensorial para distinguir el dolor neuropático de los dolores causados por lesiones en otras partes del sistema nervioso, como ocurre con el dolor provocado por la espasticidad muscular asociada lesiones de las vías motoras centrales. El concepto de dolor neuropático engloba todo tipo de dolor producido por enfermedad del sistema nervioso somato-sensorial o del sistema nervioso simpático, a nivel periférico o central. Se trata de un dolor anormal descrito como sensación de quemazón, de frío doloroso, de descarga eléctrica y/o punzante "alfileres", "agujas". Es muy frecuente que estímulos táctiles no dolorosos desencadenen una sensación dolorosa (alodinia) y que estímulos normalmente dolorosos sean percibidos con mayor

intensidad de lo normal (hiperalgesia). Es común que el dolor aparezca espontáneamente y de forma paroxística. Este tipo de dolor persiste, o incluso se intensifica, a lo largo de semanas, meses o años, a pesar de la ausencia de lesión o de que ésta se haya resuelto. El daño nervioso que produce el dolor neuropático puede afectar además de a estructuras relacionadas con el dolor a otras áreas sensitivas o motoras produciendo también alteraciones sensitivas con déficit de percepción (hipoestesia) o ausencia de sensibilidad (anestesia) (Freeman, 2009) o motoras con pérdida de fuerza parcial (paresia) o total (parálisis) en algunas regiones acompañando al dolor neuropático o en ocasiones precediendo su aparición (Baron, 2000).

El dolor neuropático puede aparecer de forma crónica o aguda; hay una corriente que considera que el dolor neuropático agudo o ANP (acute neuropathic pain) es una entidad propia (Gray, 2008), implicada en la cronificación de dolor (Kehlet y cols., 2006; Jain y cols., 2014).

La etiología del dolor neuropático es múltiple e incluye cualquier causa de daño nervioso: congénita, inflamatoria, metabólica, infecciosa, traumática, tóxica, neoplásica, isquémica, o mixta.

### **1.3.1. Mecanismos productores de dolor neuropático**

Para la producción del dolor neuropático es necesario que la generación y/o transmisión del estímulo nociceptivo se vean potenciadas. Esto se relaciona tanto con cambios a nivel celular, que alteran la arquitectura normal de la vía de transmisión del dolor, como con cambios moleculares que afectan a la expresión y distribución de receptores de membrana, canales iónicos y liberación de neurotransmisores (Colloca y cols., 2017). Estos cambios celulares y moleculares tienen lugar a nivel del sistema nervioso periférico afectando a la primera neurona de la vía del dolor (sensibilización periférica) o a nivel central (sensibilización central) donde favorecen bien la hiperactivación de la segunda neurona de la vía nociceptiva, o bien a nivel de la tercera neurona y en áreas corticales o subcorticales encefálicas donde su patogenia es menos conocida (Treister y cols., 2017).

## Estado actual del tema

---

### a. Sensibilización periférica tras lesión nerviosa.

La sensibilización periférica conlleva una mayor facilidad de generar el impulso eléctrico doloroso por el estímulo de los receptores del dolor o incluso descarga espontánea de la fibra a nivel del nervio periférico en ausencia de estímulo nociceptivo.

Tras la lesión nerviosa, algunos axones degeneran, mientras que otros, estimulados por el factor de crecimiento nervioso (NGF), emiten nuevas proyecciones que en parte alcanzan zonas con inervación intacta, aumentando así la señal nociceptiva. El crecimiento no sólo afecta a neuronas nociceptivas, sino también a neuronas simpáticas, cuyas fibras postganglionares invaden el neuroma y se ramifican en sentido proximal hasta el soma de las neuronas sensitivas en el ganglio raquídeo. Ello aumenta la sensibilidad de las fibras aferentes lesionadas mediada por receptores adrenérgicos tipo  $\alpha$  (Vranken, 2012).

Por otro lado, el NGF, entre otros mediadores liberado por las células inflamatorias y las células de Schwann en la zona lesionada, aumenta la expresión en la membrana de la neurona nociceptora de algunos receptores y canales iónicos y disminuye la de otros (**Figura 5**), facilitando la generación del impulso nervioso nociceptivo y su transmisión axonal, hasta el punto de que se puede llegar a producir una señal dolorosa sin estímulo nociceptivo o con estímulo de baja intensidad (Mantyh y cols., 2011; Tibbs y cols., 2016). Estos cambios afectan tanto a fibras lesionadas como sanas (Wu y cols., 2002) y, de hecho, las fibras sanas pueden producir actividad ectópica neuropática (Djouhri y cols., 2006).

De los receptores sobrerregulados los mejor estudiados, en cuanto a su papel en la génesis del dolor neuropático, son los de la familia TRP (transient receptor potential cation channel) que forman canales permeables a cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Caterina y Pang, 2016). Son especialmente relevantes el TRPV1 que es la diana de la capsaicina en el dolor neuropático (Yang y cols., 2015) y el TRPM3 que se relaciona con hiperalgesia térmica (Held y cols., 2015). Hay otros canales iónicos que también pueden estar sobrerregulados, contribuyendo a la hipersensibilidad del dolor neuropático, como el purinérgico



P2X3 (Xu y cols., 2011) o la familia de los receptores sensibles a ácidos (ASIC) (Deval y Lingueglia, 2015).

Son varios los canales iónicos desregulados a nivel de la primera neurona de la vía nociceptiva que favorecen la despolarización de la fibra. Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Nav), se sobreexpresan (Mantyh y cols., 2011) e incrementa su actividad en la membrana dañada (Morris y Joos, 2016). Los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje experimentan una reducción de un 30-40% en la membrana (Tulleuda y cols. 2011) mediada por la activación por el factor de crecimiento nervioso (NGF) de la isoforma Z de la proteína quinasa C (PKMζ) (Zhang y cols., 2012); su descenso facilita la activación de la fibra nociceptora (Pereira y cols., 2014). Los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo T aumentan su expresión en la neurona nociceptora dañada (Yue y cols., 2013) contribuyendo a facilitar la generación de potenciales de acción y a incrementar la liberación de neurotransmisores en la membrana presináptica (Bourinet y cols., 2016). También se sobreexpresan canales HCN (activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos son permeables a Na<sup>+</sup> y a K<sup>+</sup>, cuya hiperactividad produce despolarización lenta de la fibra (Herrmann y cols., 2015).

### **b. Sensibilización central.**

El descubrimiento de la sensibilización central, una forma de plasticidad sináptica de larga duración en el asta dorsal que facilita el procesamiento nociceptivo (Woolf 1983), llevó a la conclusión de que la amplificación de las señales entrantes en el SNC tiene un papel muy importante en la generación de hipersensibilidad clínica del dolor, incluyendo el dolor neuropático. La sensibilización central ha proporcionado una explicación mecanicista de los hallazgos que la caracterizan: (i) la reducción de umbral de activación de las fibras A o C para producir dolor, (ii) el aumento de la sensibilidad en zonas alejadas del daño tisular o fuera del territorio del nervio dañado, (iii) por qué estímulos repetidos de una intensidad fija pueden conducir a un aumento progresivo en el dolor, y (iv) por qué el dolor puede durar mucho más tiempo que el estímulo periférico que lo produce (García, 2011; Nijs y cols., 2014; Treede, 2016).

## Estado actual del tema

Aunque la estructura donde se amplifica la señal dolorosa es el asta dorsal de la médula en la mayor parte de las ocasiones, se han implicado en la sensibilización central muchas otras estructuras anatómicas supraespinales que se han relacionado con el dolor neuropático, aunque el mecanismo no es bien conocido (Boadas-Vaello y cols., 2017).

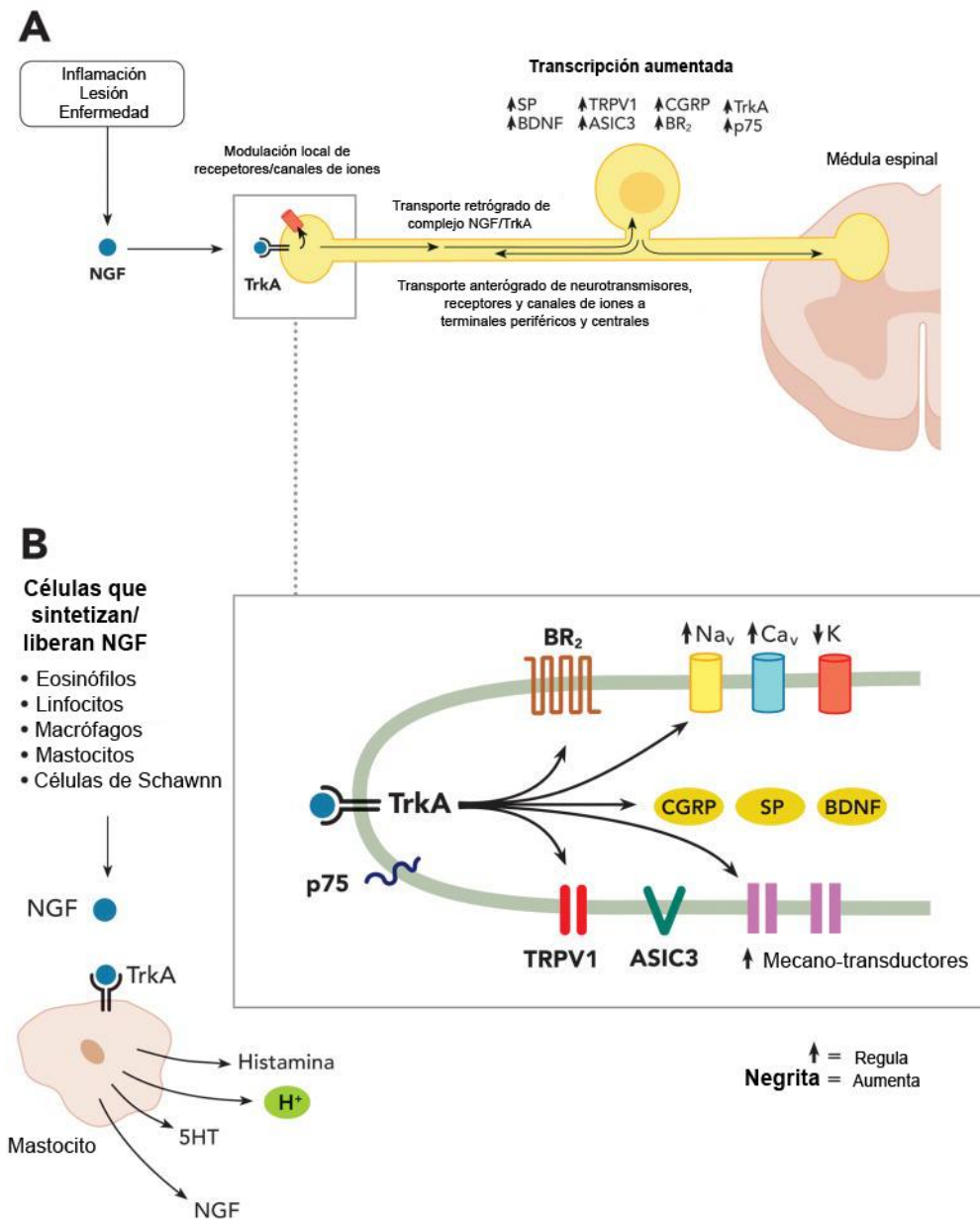


Figura 5. Neurotransmisores, receptores y canales iónicos sobrerregulados o modulados por NGF-TrkA a nivel de la fibra aferente. Modificado de Mantyh 2011.

La sensibilización central ocurre a nivel del asta posterior por incremento en la activación de la segunda neurona de la vía nociceptiva, ya sea por potenciación en la transmisión sináptica entre primera y segunda neurona (homosináptica), por activación de la segunda neurona desde otras sinapsis anormalmente establecidas con neuronas sensitivas A $\beta$  (heterosináptica), o por decremento de actividad inhibitoria tanto a nivel medular como de la vía descendente. En esta sensibilización no sólo se ven implicadas las propias células neuronales, sino que la activación de la microglía en respuesta a la liberación de mediadores inflamatorios, un papel muy importante (Von Henn y cols., 2012).

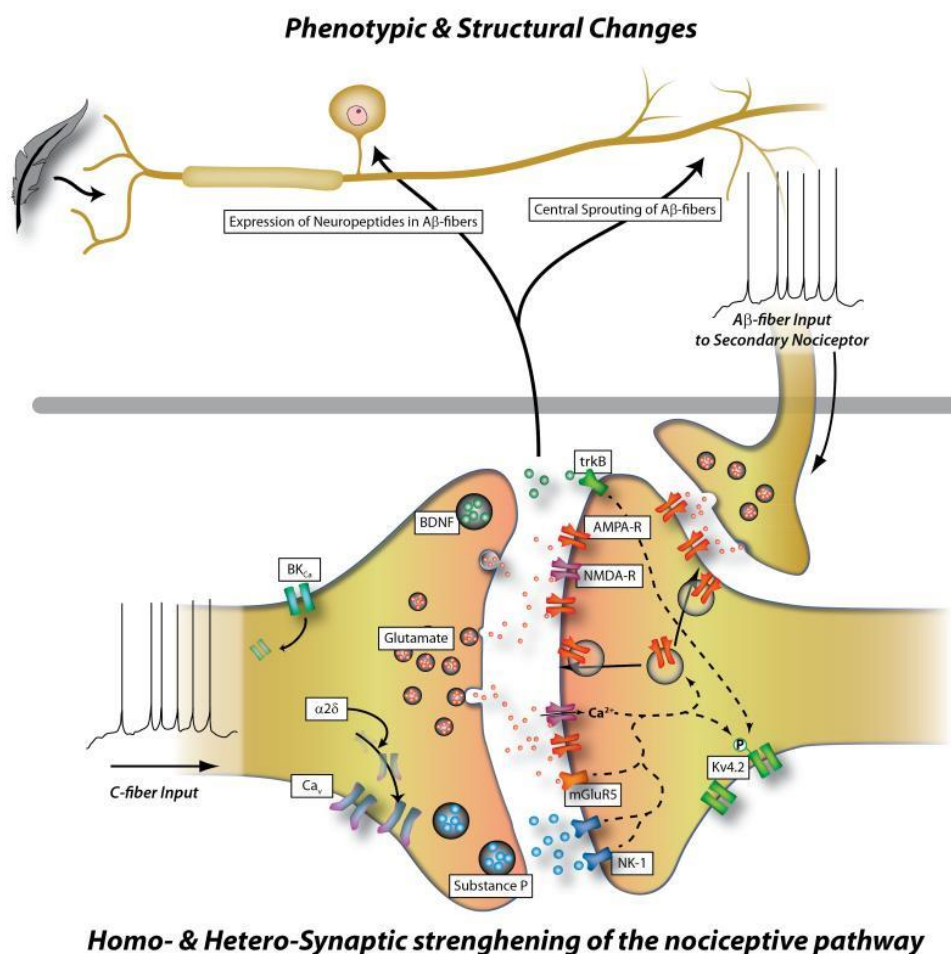
### **c. Hiperactivación de la segunda neurona de la vía nociceptora.**

El aumento en la señal dolorosa a nivel segunda neurona de la vía nociceptiva se produce por cambios a nivel presináptico y postsináptico (Latremliere y Woolf, 2009). En lo que se refiere a la facilitación homosináptica (sinapsis entre primera y segunda neurona de la vía del dolor), parece que el principal factor que aumenta la eficacia sináptica es el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular postsináptico que se produce por la activación de receptores AMPA y NMDA, y liberación de Ca<sup>2+</sup> desde sus depósitos intracelulares en respuesta a activación de receptores de glutamato o receptores con actividad tirosina-quinasa (Cheng y cols., 2010; Ohnami y cols., 2011). La repetición mantenida de estímulos dolorosos provoca la adición de potenciales sinápticos excitatorios. Si la despolarización alcanza un nivel suficiente, se activa el receptor NMDA ionotrópico del glutamato, presente en las neuronas de la lámina I. Este receptor se activa cuando el grado de despolarización celular alcanzado desplaza al Mg<sup>2+</sup> de su unión al receptor, dejando el canal permeable a los iones Ca<sup>2+</sup>. La entrada de Ca<sup>2+</sup> favorece la generación del potencial de acción de la segunda neurona, facilitando el impulso doloroso y la aparición de hiperalgesia. Además, activa una cascada de segundos mensajeros intracelulares, en particular proteína-quinasa asociadas al sistema Ca<sup>2+</sup>/calmodulina y/o fosfatasa dependientes de Ca<sup>2+</sup> (calcineurina), (MAPK, PKA, PKC, PI3K y Src). Las respuestas secundarias contribuyen a la potenciación de la señal dolorosa en parte mediante la sensibilización del propio receptor NMDA (Latremliere y Woolf, 2009). Además de la entrada de

## Estado actual del tema

$\text{Ca}^{2+}$ , la proteína quimiotáctica de monocitos CCL2 liberada por los astrocitos tras la lesión, se une al receptor CCR2 de las neuronas nociceptoras del asta dorsal, donde incrementa la respuesta de los receptores NMDA (Xie y cols., 2017).

La hiperactivación heterosináptica ocurre cuando la pérdida de neuronas nociceptoras primarias, hace que neuronas sensitivas no nociceptoras A $\beta$  emitan proyecciones que sinaptan con las segundas neuronas de la vía del dolor situadas en capas superficiales del asta posterior de la médula, liberando en estas sinapsis glutamato, sustancia P y péptido intestinal vasoactivo (VIP), con la consecuencia de que estímulos inocuos se transmiten como dolorosos (García, 2011; von Henn y cols, 2012). La sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo además son neurotransmisores “lentos”, que hacen que la activación sea más persistente y activan además sinapsis vecinas por difusión (Basbaum y cols., 2009).



**Figura 6. Sensibilización central a nivel medular. Mecanismo homo y heterosináptico.** Tomado de von Hehn 2012.

Se han descrito cambios en las proyecciones dendríticas de las neuronas del asta posterior mediados por una proteína G (la Rac1 o Ras), que ponen de manifiesto cambios en la propia arquitectura de la vía aferente nociceptiva (Tan y cols., 2011). En relación con la lesión medular, se produce aumento y crecimiento y redistribución de espinas dendríticas (Tan y waxman, 2015), afectando a todas las neuronas sensoriales nociceptivas independientemente de cual sea su localización en la médula (Cao y cols., 2017). No se conoce bien el mecanismo, pero este cambio en las dendritas se relaciona con la aparición de dolor neuropático y tanto los cambios celulares como el dolor neuropático revierten al inhibir la Rac 1 (Zhao y cols., 2016).

#### **d. Descenso de inhibición a nivel medular.**

El aumento de eficacia sináptica y excitabilidad de membrana no son los únicos mecanismos contribuyentes a la sensibilización central, sino que también tiene lugar una pérdida de inhibición en el asta dorsal. Tras la lesión nerviosa se evidencia una disminución de actividad inhibitora GABA (Janssen y cols., 2011), debida en parte a la pérdida de neuronas inhibitoras (Scholz y cols., 2005), pero también a una disminución de la excitabilidad de las interneuronas inhibitoras, mediada por la activación por el TNF $\alpha$  de la proteína activada por mitógenos p38 (Zhang y cols., 2010), y al aumento de calcio en las mitocondrias, que incrementa la producción de radicales libres, que a su vez reducen la liberación de GABA en el asta dorsal (Yowtak y cols., 2011). Además, la lesión nerviosa reduce la expresión de algunos canales de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (KCC2), haciendo que el GABA pierda efecto como inhibidor (Coull y cols., 2003).

La neuroinflamación juega un papel importante en el desarrollo de la pérdida de inhibición del estímulo doloroso a nivel del asta dorsal. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras la lesión, migran hacia el asta posterior de la médula y allí liberan citoquinas y especialmente interferón- $\gamma$ . El interferón incrementa la expresión del factor regulador de interferón 8 (IRF8), que a su vez aumenta la expresión del receptor purinérgico P2X4 activando la microglía (Masuda y cols., 2012; Tsuda, 2016). La activación de la microglía requiere tanto de la existencia de lesión nerviosa como de la presencia de estímulos nociceptivos aferentes (Hathway y cols., 2009; Suter y cols., 2009).

## Estado actual del tema

---

La neuregulina 1 (NRG1) liberada a nivel del asta posterior por las fibras dañadas conduce a la quimiotaxis, proliferación y activación microglial (Calvo y cols., 2011), aunque estudios más recientes sugieren activación de las células locales inducida por liberación de CSF1 por las neuronas lesionadas (Guan y cols., 2016; Gu y cols., 2016) en lugar de quimiotaxis.

La inhibición de la activación de la microglía reduce tanto la alodinia como la hiperalgesia subsiguientes a una lesión nerviosa, pero no se conoce bien de qué forma los cambios microgliales alteran la nocicepción (Beggs y Salter, 2010; Calvo y Bennet, 2012), aunque en parte implica liberación de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), que reduce la expresión de canales KCC2 produciendo un desequilibrio en el gradiente de membrana que altera la capacidad Inhibitoria del GABA, o incluso la invierte (Coull y cols., 2005; Prescott y cols., 2006).

### **e. Cambios supraespinales.**

La plasticidad sináptica que contribuye a la sensibilización central es mejor conocida en la médula espinal, pero también ocurre en otras regiones del sistema nervioso central. La neuroimagen funcional permite evaluar cambios in vivo en la activación de las áreas estudiadas identificando por experimentos con estímulos nocivos la denominada "matriz del dolor", que incluye la corteza prefrontal medial, núcleo accumbens, la corteza cingulada anterior, la ínsula, la amígdala, sustancia gris periacueductal, locus coeruleus y la protuberancia rostroventral (May, 2007) Lo que unido a los modelos experimentales ayuda a identificar las áreas implicadas en el dolor (Kim y cols., 2017). Las áreas supraespinales que participan en la percepción anómala del dolor incluyen las que forman parte del sistema modulador descendente y el tálamo, el hipotálamo, la amígdala el septum, los tubérculos mamilares los ganglios basales, el cerebelo y la corteza cerebral somatosensorial, de la ínsula, del cíngulo y prefrontal. Todos ellos se han relacionado con el dolor neuropático aunque el mecanismo no es bien conocido (Boadas-Vaello y cols., 2017).

Las regiones cerebrales activadas por dolor nociceptivo agudo difieren de las activadas en el dolor crónico (Schweinhart y cols., 2006) y las mismas áreas se activan de forma diferente por un estímulo nocivo idéntico administrado a sujetos sanos en comparación con sujetos con dolor crónico

(Baliki y cols., 2011). Los patrones de conectividad funcional durante las distintas experiencias dolorosas son flexibles y dependen del contexto, lo que pone de relieve el carácter dinámico de la red de dolor (Ploner y cols., 2011).

Usando resonancia magnética, se ha identificado una reducción volumétrica de distintas regiones cerebrales en varios grupos de pacientes con dolor crónico (Apkarian y cols., 2011); este fenómeno no implica degeneración neuronal, ya que los cambios revierten al tratar el dolor con éxito (Gwilym y cols., 2010). No se conoce la relevancia de esta reducción más allá de servir como biomarcador, pero sí está implicada en la patogénesis del dolor neuropático ya que hay diferencias entre pacientes con dolor neuropático y con dolor no neuropático (Gustin y cols., 2011). Además, cuando se comparan diferentes trastornos neuropáticos, se observan diferentes cambios de densidad de la materia gris (Baliki y cols., 2011). Todo esto, aunque no bien comprendido mecanísticamente, ayuda a determinar fenotipos individuales en la plasticidad central implicada en el dolor. La estimulación a nivel del tálamo, la sustancia gris periacueductal, el septum, la cápsula interna, el hipotálamo el córtex motor o el córtex cingular anterior, produce efecto analgésico, dejando patente su implicación en la modulación de la nocicepción (Keifer y cols., 2014).

La reducción de actividad de las vías inhibitorias descendentes por descenso de tono inhibitorio a nivel del área rostral protuberancial (de Felice y cols., 2011), que al menos en parte ocurre por apoptosis inducida a varios niveles del neuroeje (Leong y cols., 2011), produce reducción de la inhibición del estímulo doloroso a nivel del asta posterior, explicando en parte el mecanismo por el que las alteraciones encontradas a nivel supraespinal producen dolor neuropático.

### **1.3.2. Epidemiología del dolor neuropático**

No se conoce la incidencia y la prevalencia real del dolor neuropático. Su prevalencia es muy difícil de determinar de manera global, ya que en la bibliografía prácticamente sólo hay datos referentes a países desarrollados. Por otro lado, se puede sobreestimar en las búsquedas bibliográficas ya que la mayoría de los estudios están hechos en pacientes, en los cuales la prevalencia es más elevada que en la población general.

## Estado actual del tema

---

En un metaanálisis de estudios realizados en la población general, fundamentalmente europea y norteamericana, se estimó una prevalencia en torno al 7-10% de la población general (Colloca y cols., 2017). No obstante, en los estudios se describen dos grupos de pacientes claramente definidos. Uno de ellos está constituido por personas con dolor neuropático puro, en el que se incluyeron la neuralgia postherpética y la neuropatía del trigémino, que aportan un 0.07% de prevalencia y pacientes con neuropatía diabética, que aporta un 0.8% de la prevalencia. El otro grupo está formado por casos de dolor mixto, en los que el dolor neuropático es un componente más del dolor crónico en el ámbito de un cuadro oncológico, isquémico, etc.; en este grupo, la prevalencia oscila entre el 3 y el 17% (Bouhassira y cols., 2008; van Hecke y cols., 2014; Gilron y cols., 2015). Un estudio epidemiológico internacional, refrendado por la Sociedad Española del Dolor, puso de manifiesto que en España la prevalencia es del 7,7% de la población general, algo superior a la media europea (Breivik y cols., 2006). Las polineuropatías, y dentro de ellas la diabética, son la causa más frecuente de dolor neuropático puro en la población. En cuanto a incidencia hay aún menos datos en población general, el metaanálisis de Colloca y cols. (2017) la estima en torno a 8,4 por cada 1.000 personas-año, basándose en un estudio de Dieleman y cols (2008).

### **1.3.3. Diagnóstico del dolor neuropático**

El diagnóstico de dolor neuropático continúa siendo más complicado que el del dolor nociceptivo. Su sospecha a menudo se basa únicamente en la historia clínica y en la exploración del paciente, sobre todo si tenemos en cuenta que es un dolor que frecuentemente no es puro, sino que aparece como un componente más de dolor dentro de cuadros de dolor crónico isquémico, oncológico, etc. Hay características comunes a los síndromes de dolor neuropático y presentan algunos síntomas característicos. Aunque ninguno de ellos es patognomónico, ayudan a sospechar la presencia de dolor neuropático.

El dolor neuropático puede aparecer de forma espontánea o ser provocado por estímulos sensitivos. Los dolores espontáneos pueden ser continuos o paroxísticos, y ocurren sin ningún desencadenante aparente. Un ejemplo de dolor espontáneo lo constituyen las disestesias cutáneas, que son sensaciones anormales y desagradables, descritas como calor, hormigueos,



pinchazos, etc. Los dolores evocados se presentan en forma de alodinia (un estímulo inocuo es capaz de producir dolor) e hiperalgesia (respuesta exagerada a un estímulo doloroso). Otros datos que pueden apoyar el diagnóstico de dolor neuropático son la hipoestesia, anestesia o la presencia de síntomas motores o autonómicos concurrentes. Es importante detectar activamente estos signos y síntomas, especialmente en pacientes en los que la naturaleza del dolor sea difícil de esclarecer. Existen cuestionarios que recogen estos síntomas y ayudan al diagnóstico, pero su utilidad es limitada y es necesario apoyarlos con la exploración clínica. Una revisión sistemática (Mathieson y cols., 2015) establece el DN4 como el cuestionario más apropiado para evaluar el dolor neuropático en la clínica. Este test recoge 10 síntomas típicos y puntúa de 0 a 10 según el paciente refiera el dolor como quemazón, frío o descargas eléctricas, se asocie con hormigueo, sensación de pinchazos, entumecimiento o escozor, la exploración muestre hipoestesia al tacto o a los pinchazos y el dolor se desencadene por cepillado o tacto ligero en la zona (bouhassira y cols., 2005). Este test ha sido validado para la población Española (Pérez y cols., 2007).

En la historia clínica debe identificarse la presencia de síntomas positivos como alodinia e hiperalgesia y de síntomas negativos como debilidad e hipoestesia, todos ellos sugestivos de dolor neuropático. Dado que en torno al 50% de los pacientes con dolor musculoesquelético también presenta parestesias, es necesaria una evaluación clínica para valorar la presencia o ausencia de dolor neuropático. Esta evaluación clínica debe incluir la exploración de la sensibilidad a pie de cama, para detectar síntomas congruentes con una lesión nerviosa concreta, como los descritos anteriormente. El patrón oro para el diagnóstico del dolor neuropático es el juicio clínico experimentado. El diagnóstico de dolor neuropático clasifica como: (i) posible, cuando se recogen los suficientes síntomas y signos clínicos que determinan los distintos cuestionarios; (ii) probable, cuando la exploración del paciente pone de manifiesto alteraciones neurológicas compatibles con la distribución del dolor; y (iii) seguro, en las raras ocasiones que permiten obtener evidencias objetivas de la lesión neurológica (Finnerup y cols., 2016). Los expertos, debido a la dificultad diagnóstica de este tipo de dolor, recomiendan iniciar el tratamiento específico ante la sospecha clínica.

## Estado actual del tema

---

### 1.3.4. Tratamiento farmacológico del dolor neuropático

El dolor neuropático, al contrario que el nociceptivo, no responde a analgésicos de tipo AINE o paracetamol y lo hace sólo parcialmente a analgésicos opioides.

Existen diversas opciones terapéuticas que actúan a nivel de las distintas dianas posibles y que se resumen en la **tabla 2**.

Los fármacos que han demostrado ser útiles en los ensayos clínicos randomizados son los antidepresivos tricíclicos, antidepresivos inhibidores duales de la recaptación de serotonina y noradrenalina, pregabalina, gabapentina, opioides, lidocaína en parches y parches de capsaicina a altas concentraciones (Attal y Bouhassira, 2015). El tratamiento se escalona según un metaanálisis que analiza la capacidad de reducir en un 50% el dolor y actualiza las recomendaciones de NeuPSIG (Finnerup y cols., 2015), aconsejando como primer escalón de tratamiento los antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina venlafaxina y duloxetina, los antidepresivos tricíclicos, la gabapentina y la pregabalina. El segundo escalón incluye tramadol, parches de capsaicina al 8% y parches de lidocaína. El tercer escalón incluye los opioides mayores y la toxina botulínica A (esta última con escasa evidencia).

A pesar de la diversidad de tratamientos en estudio, dirigidos hacia varios mecanismos patogénicos, lo cierto es que estamos lejos de controlar adecuadamente el dolor neuropático. Entre las razones de este fracaso terapéutico podemos reseñar: la implicación de varios mecanismos en cada paciente en particular; la evolución temporal cambiante de los mecanismos fisiopatológicos y manifestaciones dolor; y, fundamentalmente, nuestro inadecuado conocimiento de los mecanismos que lo producen (Baron, 2000). Por otro lado, el tratamiento frecuentemente se inicia cuando el paciente ya tiene un síndrome de dolor neuropático evolucionado, y es muy probable que, en este punto, las posibilidades de éxito sean menores que actuando al inicio del proceso (Mousavi y cols., 2015). En la actualidad se recomienda elegir el tratamiento en función de las manifestaciones específicas del dolor neuropático en cada paciente, ya que se considera que éstas son indicativas de los

mecanismos desregulados subyacentes (Bouhassira y Attal, 2016; Baron y cols., 2017).

**Tabla 2. Relación entre mecanismos, síntomas, dianas terapéuticas y tratamientos del dolor neuropático.** Modificada de la Sociedad Europea de Anestesia Regional y Tratamiento del Dolor (ESRA).

MECANISMO	SIGNO/SÍNTOMA	DIANA TERAPÉUTICA	TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO
CANALES DE SODIO	Dolor espontáneo, parestesia	Canales de sodio sensibles a tetrodotoxina	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anestésicos locales</li> <li>2. Antiepilépticos</li> <li>3. Antidepresivos tricíclicos</li> </ol>
SENSIBILIZACIÓN CENTRAL	Hiperalgnesia	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Receptores NMDA (glutamato)</li> <li>2. Receptores de las neurokininas</li> <li>3. Receptores del CGRP</li> <li>4. Sintetasa de óxido nítrico</li> <li>5. Proteinkinasa</li> <li>6. Receptores B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>(bradikina)</li> <li>7. Canales de Ca voltaje dependientes tipo N</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Antagonistas NMDA: ketamina, memantina, amantadina, dextrometorfano, algunos opioides (metadona)</li> <li>2. Antisustancia P (antagonistas: Lanepitant, depletors: capsaicina)</li> <li>3. Sustancias relacionadas con el CGRP: inhibición de liberación (agonistas cannabinoides, agonistas <math>\alpha_2</math> adrenérgicos, clortine) y antagonistas (BIBN4096BS)</li> <li>4. Inhibidores de la sintasa del óxido nítrico</li> <li>5. Inhibidores de proteína quinasas</li> <li>6. Antagonistas de la bradikina (FR173657, benzodiacepinas)</li> <li>7. Bloqueantes de los canales de Ca tipo N: ziconotide, gabapentina, pregabalina, sulfato de magnesio</li> </ol>
SENSIBILIZACIÓN PERIFÉRICA	Hiperalgnesia, inflamación neurogénica	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Receptor vanilloide</li> <li>2. Receptores CB1 y CB2</li> <li>3. Receptor trk A</li> <li>4. Receptores de las neurokininas</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Capsaicina</li> <li>2. Cannabinoides</li> <li>3. Antagonistas del NGF</li> <li>4. Antisustancia P (antagonistas: lanepitant, depletors: capsaicina)</li> </ol>
ACTIVIDAD SIMPÁTICA	Dolor espontáneo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Receptores adrenérgicos</li> <li>2. Receptor trk A</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bloqueantes adrenérgicos: fentolamina, guanetidina</li> <li>2. Agonistas <math>\alpha_2</math> adrenérgicos: clonidina, tizanidina</li> <li>3. Antagonistas del NGF</li> </ol>
INHIBICIÓN REDUCIDA	Hiperalgnesia	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Receptores opioides:</li> <li>2. Receptores serotoninérgicos</li> <li>3. Receptores adrenérgicos</li> <li>4. Receptores GABAérgicos</li> <li>5. Receptores nicotínicos</li> <li>6. Receptores CB1, CB2</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Opioides: morfina</li> <li>2. Antidepresivos</li> <li>3. Agonistas <math>\alpha_2</math> adrenérgicos: clonidina, tizanidina</li> <li>4. Anticomociales: gabapentina, pregabalina</li> <li>5. Cannabinoides</li> <li>6. Inhibidores anticolinesterásicos</li> </ol>

### 2. MicroRNAs

#### 2.1. Descubrimiento y características de los miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) fueron descubiertos en el año 1993, durante la caracterización de los genes que controlan la coordinación del desarrollo larvario del gusano *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). En este estudio, realizado en el laboratorio de Ambros, se describieron dos pequeños RNAs con capacidad reguladora denominados *lin-4* y *let-7* (Lee y cols., 1993; Reinhart y cols., 2000) no codificantes para ninguna proteína pero con un papel clave en el desarrollo. Posteriormente se detectaron miRNAs homólogos de *let-7* y altamente conservados tanto estructuralmente como en su función en durante el desarrollo embrionario en múltiples especies, incluidos vertebrados, sugiriendo un papel de *let-7* y otros RNAs de pequeño tamaño en la filogenética animal (Pasquinelli y cols. 2000; Vella y cols., 2004). Siguiendo con la misma línea de investigación, otros estudios mostraron que *lin-4* y *let-7* representan a una clase extendida de RNAs endógenos de pequeño tamaño presentes en animales invertebrados y vertebrados, incluidos los humanos, que finalmente se denominaron miRNAs (Lee y Ambros, 2001; Lagos-Quintana y cols., 2001; Lau y cols., 2001).

Posteriormente, se han identificado un número de miRNAs que crece de forma exponencial en todo tipo de especies animales, vegetales, hongos e incluso bacterias (Ambros, 2004; Baulcombe 2004; Kozomara y Griffiths-Jones, 2014), los cuales poseen un patrón de expresión dependiente del tipo de célula y del tejido (Lagos-Quintana y cols., 2002).

Los miRNAs son RNAs monocatenarios no codificantes, de 19-25 nucleótidos, cuya función es la regulación post-transcripcional de la expresión génica, inhibiendo la traducción de mRNAs diana o promoviendo su degradación (Hobert, 2008). El resultado es una reducción de la expresión de proteínas diana. Un mismo miRNA puede regular numerosos RNAs mensajeros (mRNAs) y cada mRNA puede estar regulado por más de un miRNA. Este hecho dificulta la identificación de dianas de miRNAs. Sin embargo, el análisis bioinformático es efectivo para la predicción de interacciones miRNA/mRNA,

que posteriormente pueden ser confirmadas en el animal de experimentación y/o en pacientes.

Los últimos análisis bioinformáticos predicen que aproximadamente el 60% de los mRNAs está regulado por miRNAs (Qabaja y cols., 2013 y cada miRNA regula cientos de genes. En la actualidad, se han identificado 1881 miRNAs en el genoma humano (Kozomara y Griffiths-Jones, 2014), pero sólo en 500 de ellos se ha establecido de forma robusta que provienen de genes de miRNAs (Fromm y cols., 2015).

No sólo se han identificado distintos miRNAs sino que además, en los últimos años se han publicado un gran número de trabajos dirigidos a desvelar el papel de miRNAs específicos en múltiples procesos fisiológicos, más allá del desarrollo embrionario donde fueron descritos, como son el crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación y la supervivencia (Valencia-Sánchez y cols., 2006; Kloosterman y Plasterk, 2006; Stefani y Slack, 2008; Gangaraju y Lin, 2009; Li y Jin, 2010). Igualmente, estudios recientes demuestran perfiles de miRNAs cuya expresión alterada está implicada en patologías humanas como el cáncer, enfermedades metabólicas, virales, cardiovasculares o del SNC (Sayed y cols., 2011; Liu y cols., 2011; Dangwal y cols., 2012; van Rooij y cols., 2012; Ullah y cols., 2014; Cao y cols., 2016). Algunos de estos miRNAs ya están siendo investigados tanto para el diagnóstico clínico, como para su uso como dianas terapéuticas (Hammond, 2015).

### 2.2. Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs maduros tiene lugar en dos fases. La primera se inicia en el núcleo, la segunda ocurre en el citoplasma donde realizan su función.

Son transcritos por la RNA polimerasa II que produce una larga molécula de RNA conocida con el nombre de miRNA primario (**pri-miRNA**) con una estructura en tallo-bucle (*hairpin stem-loop*) (Cai, y cols., 2004, Lee y cols., 2004). El pri-miR sufre un procesamiento a nivel nuclear por un complejo proteínico microprocesador formado por la endonucleasa Drosha y una proteína de unión a RNA de doble hélice denominada DGCR8 (de DiGeorge syndrome critical region gene 8) en humanos o Pasha en *Drosophila*. La

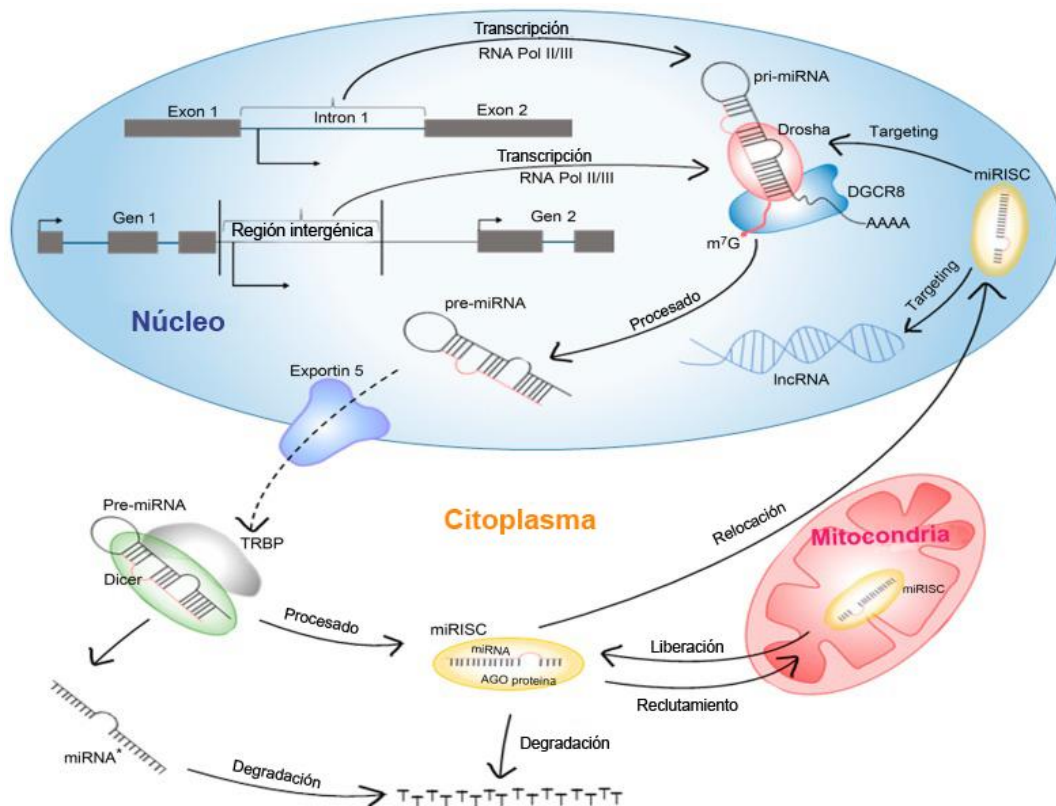
## Estado actual del tema

---

función de DGCR8 es posicionar a la nucleasa a una vuelta de hélice de la zona donde la doble hélice pasa a RNA monocatenario para que ésta realice el corte. Este complejo escinde del transcrito primario la doble hélice de micro RNA, dando lugar a un molécula que consta de unos 60-70 nucleótidos con estructura en tallo-bucle denominada RNA precursor (**pre-miRNA**) (Lee y cols., 2003; Han y cols., 2004; Denli y cols., 2004; Morlando y cols., 2008). Una vez obtenido el pre-miR, éste es sacado del núcleo por una proteína denominada exportina 5 dependiente de RAN-GTP, la cual es una proteína miembro de la familia karyopherin, que reconoce un saliente de dos nucleótidos dada por Drosha en el extremo 3' de la horquilla de pre-miR. RAN es un cofactor que une GTP durante la exportación nuclear de RNA. En el citoplasma, la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miR es liberado del complejo exportador (Yi y cols. 2003, Bohnsack y cols.2004). Ya en el citoplasma el pre-miR es nuevamente procesado por Dicer, una RNAsa tipo III, la cual corta en primer lugar el bucle, dando lugar a una molécula de doble cadena conocida como miR dúplex. De este miR dúplex, se separan las dos cadenas y una de ellas da lugar al miRNA maduro (**miR**) de unos 20-25 nucleótidos, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3', que se incorpora al complejo ribonucleoprotéico miRISC (miRNA-induced silencing complex), el cual es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción. Por otro lado, queda la cadena complementaria al miRNA, que es degradada (Zeng, 2006; Khvorova y cols., 2003; Hwang y Mendel, 2004; Bartel, 2004; Krol y cols., 2010)

El complejo ribonucleoprotéico miRISC aúna el propio miR, Dicer y las proteínas Argonauta (AGO), TRBP (HIV-1 transactivation responsive element TAR RNA-binding protein) y PACT (una proteína de unión a RNA de doble cadena). Dicer contiene varios dominios entre ellos, un dominio DEAD-box RNA-helicase (dominio conservado en la familia de enzimas que usan la hidrólisis de ATP para abrir RNA de doble cadena), un dominio DUF283 (de función desconocida), un dominio RIII (dominio conservado que participa en la reacción endonucleasa que produce la rotura de sustratos de RNA de doble cadena), un dominio de unión a RNAs de doble cadena (dsRNA) y un dominio

PAZ (dominio conservado que se une específicamente a hélices de RNAs pequeños) (Meister y Tuschl, 2004; Carthew y Sontheimer, 2009).



**Figura 7. Biogénesis de los miRNAs.** Modificado de Cao y cols. 2016.

AGO es el enzima catalítico que corta el mRNA diana y es necesaria para la producción de miR maduro, teniendo un papel en la biogénesis de los miRNAs (Zhai y cols., 2016). Se han identificado numerosos homólogos de AGO en diferentes especies, en mamíferos se han identificado cuatro (AG1-AGO4), siendo AGO2 la única con actividad endonucleolítica, capaz de cortar el mRNA diana independientemente de Dicer (Liu y cols., 2004; Meister y cols. 2004, Cifuentes y cols. 2010). Las proteínas AGO contienen dos dominios de unión a ARN: un dominio PAZ que se une al extremo 3' monocatenario de los miRNA maduros (Song y cols., 2003; Yan y cols., 2003; Lingel y cols., 2004; Carthew y Sontheimer 2009) y un dominio PIWI que se une al mRNA diana (Ma y cols., 2005; Parker y cols., 2005; Mallory y Bouche 2008).

# Estado actual del tema

## 2.3. Función de los miRNAs

Una vez que el miRNA se ha incorporado al complejo miRISC, éste puede regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales; la degradación del miRNA diana o la represión traduccional. La utilización de un mecanismo u otro dependerá de la complementariedad del miRNA con su mRNA diana. Cuando la complementariedad es total o alta con una región codificante o una región 3'UTR del mRNA, se produce una degradación de éste (Zeng 2006; Bartel 2009). Cuando la complementariedad es parcial, el miRNA se une a la región 3' del mRNA, resultando en una inhibición de la traducción (He y Hannon, 2004). En este caso dado que la complementariedad no es perfecta, un miRNA puede inhibir muchos mRNAs diana que contengan secuencias que sean complementarias a las posiciones 2-7 del extremo 5' del miRNA, región que se conoce como *seed sequence* o región semilla (Brenneke y cols., 2005; Lewis y cols., 2005; Chen y Rajewsky 2006; Grimson y cols. 2007). Los micro RNAs producen una desadenilación rápida de los RNA mensajeros, que facilita que sean degradados con mayor rapidez (Wu y cols., 2006; Djuranovic y cols., 2012). Una vez degradado el mRNA, el miR puede unirse a un nuevo mensajero. En contadas ocasiones, los miRNAs pueden facilitar la traducción de mRNA a proteína (Cao y cols., 2016).

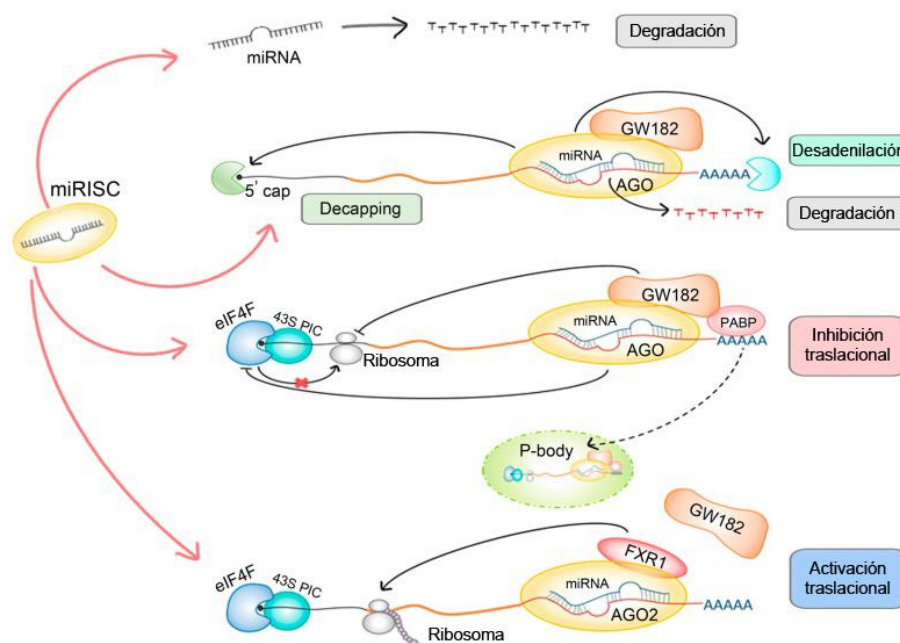


Figura 8. Función de los miRNAs. Modificado de Cao y cols. 2016.



La estabilidad y la permanencia de las moléculas de miRNAs maduras son relativamente desconocidas. Parece que los miRNAs unidos a Ago2 son estables y la mayoría de ellos tienen una vida media de más de 14 horas (Lee y cols., 2003; Hwang y cols., 2007). Sin embargo, algunos miRNAs parecen presentar cinéticas de degradación muy rápidas (Hwang y cols., 2007; Pedersen y cols., 2007) sugiriendo la existencia de fenómenos de regulación específicos para cada miRNA o grupo de ellos.

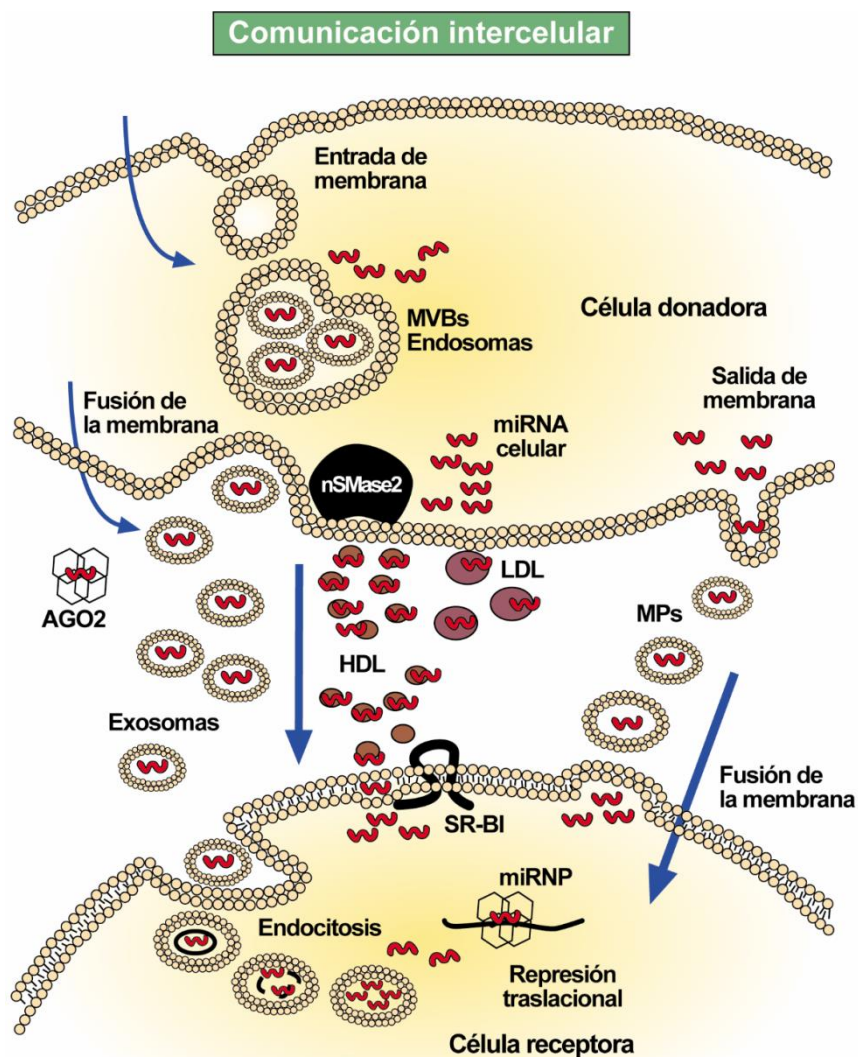
En 2008 se describió que los miRNAs no solo se encuentran en el interior celular sino que también están presentes en diversos fluidos corporales, como la sangre (Mitchell y cols., 2008). Se sabe que estos miRNAs extracelulares son muy estables a la acción de las ribonucleasas presentes en suero o plasma (Zhu y cols., 2012). Esta sorprendente estabilidad se debe a que los miRNAs circulantes van envasados en micro partículas como exosomas, micro vesículas o cuerpos apoptóticos y también se pueden transportar formando complejos con lipoproteínas, en su mayoría HDL (Vickers y cols., 2011) o asociados a proteínas de unión como Argonauta 2 (Ago2) o nucleoplasmina 1 (NMP1), protegiéndose así de la degradación (Arroyo y cols., 2011).

La presencia de miRNAs en micro partículas llevó a la idea de que los miRNAs circulantes podrían tener una función en la comunicación entre células. Si este es el caso, los miRNAs deben de ser selectivamente envasados en los transportadores apropiados y activamente secretados. En segundo lugar, los miRNAs deben ser transferidos a las células receptoras específicas y en tercer lugar y lo más importante, estos miRNAs deben conservar la capacidad de reconocer y reprimir los mRNAs diana dentro de las células receptoras. Aunque en la actualidad se sabe poco acerca de cómo los miRNAs se empaquetan y se exportan de forma selectiva hay estudios que parecen demostrar una secreción selectiva y específica de cada tipo de órgano o tipo celular (Boon y Vickers 2013). A día de hoy se sabe que los micro RNAs circulantes no sólo reflejan su expresión, sino que son funcionales y participan en la regulación a distancia de múltiples procesos (Waldestrom y cols., 2012; Khan y cols., 2015).

## Estado actual del tema

### 2.4. MiRNAs y enfermedad

En la actualidad hay descritos más de 2000 miRNAs en los seres humanos, que se cree que regulan colectivamente un tercio de los genes. Los miRNAs se han relacionado con muchas enfermedades humanas y están siendo investigados tanto para el diagnóstico clínico, como para su uso como dianas terapéuticas (Hammond 2015).



**Figura 9. Comunicación intercelular a través de miRNAs.** Modificado de Boon y Vickers 2013.

No sólo se han ido identificando distintos miRNAs, sino que se han ido implicando en múltiples procesos fisiológicos, más allá del desarrollo embrionario donde fueron descritos, así como en un número creciente de

procesos patológicos. Detallar las funciones y procesos fisiológicos o patológicos en los que se han implicado a los miRNAs excede con mucho la capacidad del presente estudio debido al incremento exponencial de la bibliografía al respecto (la búsqueda micro RNA y enfermedad obtiene más de 14000 resultados en pubmed) y no aporta nada a su objetivo, pero baste decir que tal es la importancia reguladora de los miRNAs, que incluso se describe que los factores ambientales a los que se somete a los progenitores conllevan cambios fenotípicos en la progenie mediados por miRNAs presentes en los gametos (Mc Pherson y cols., 2015, Rodger y cols., 2015).

Los miRNAs han sido hallados en múltiples fluidos biológicos, donde pueden ser medidos sus niveles de expresión. En un análisis de 12 biofluidos (Weber y cols. 2010), por orden de mayor a menor cantidad en µg/L, se han detectado en (entre paréntesis el número de miRNAs hallado): leche materna (429), semen (436), saliva (458), lavado bronquial (260), líquido peritoneal (397), calostro (386), líquido amniótico (359), lágrimas (320), líquido pleural (210), plasma (349), líquido cefalorraquídeo (212) y orina (304).

La utilidad de los miRNAs desde el punto de vista clínico ofrece dos vertientes:

a. Nuevos elementos de diagnóstico y predicción de pronóstico. Dado que estas moléculas se han demostrado implicadas en la etiopatogenia de innumerables patologías, se pensó que, al menos a nivel teórico, la determinación de miRNAs desregulados en biofluidos puede tener un valor diagnóstico. En este campo fue pionera, y está muy desarrollada, la investigación en el área de la oncología en la que se han identificado numerosos miRNAs en diferentes fluidos susceptibles de ser utilizados como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico. De hecho, la primera descripción de los miRNAs circulantes fue de los micro RNAs 21, 155 y 210 en suero de pacientes con linfomas B (Lawrie y cols., 2008), pero también se han descrito en otros fluidos y otros tipos de cáncer como en orina en cáncer vesical el miR-126, miR-152 y miR-182 (Hanke y cols., 2010), en saliva con descenso de miR-125a y miR-200a (Park y cols., 2009) y aumento de miR-31 en pacientes con cáncer oral (Liu y cols., 2010). Al igual que en el cáncer, diversas revisiones recogen el uso de micro RNAs en el diagnóstico de enfermedades neuro-

## Estado actual del tema

---

degenerativas (Shah y cols., 2017), cardio-vasculares (Ding y cols., 2017; Viereck y Thum 2017) o enfermedad pulmonar obstructiva o restrictiva (Liao y cols., 2017). En cuanto a su uso como marcadores de pronóstico, en cáncer de pulmón no microcítico una baja supervivencia se asocia con la sobreexpresión de miR-30d y miR-286 junto con una reducción en la expresión de miR-1 y miR-499 (Hu y cols., 2010). Una revisión reciente implica a los micro RNAs en los mecanismos de resistencia a los antineoplásicos (An y cols., 2017).

b. Uso como terapia. Si los miRNAs desregulados está ya claro que tienen un papel en la patogenia de múltiples enfermedades, el siguiente planteamiento fue si se puede modificar el curso de éstas mediante la administración de mi RNAs o sus antagonistas. En este sentido ya se han utilizado con éxito en tratamiento en modelos animales de múltiples patologías e incluso se han hecho ensayos también en humanos, por ejemplo en tratamiento de la hepatitis C con un inhibidor del miR-122 (Janssen y cols., 2013) y con miRNA mimics que se están probando en el cáncer como es el caso del miR-34 que está en ensayo en fase I (Bader 2012, Chen y cols. 2015).

En cualquier caso es en el tratamiento del cáncer donde la terapia con micro RNAs o sus antagonistas ofrece un mayor campo dado que es una enfermedad con alta mortalidad, con escaso arsenal terapéutico eficaz y donde se han descrito múltiples dianas terapéuticas potenciales para los miRNAs (Smolle y cols. 2017). Además, las revisiones más recientes otorgan un papel relevante a los miRNAs también en enfermedades pulmonares (Montgomery y cols. 2014, Liao y cols. 2017), cerebrovasculares (Martínez y Peplow, 2017), cardiovasculares (Laffont y Rainer, 2017), sepsis (Kingsley y Bhat, 2017), trastornos psiquiátricos (Zhuo y cols., 2017), entre muchos otras (Paul y cols., 2017).

Al igual que ocurre con el resto de aparatos y sistemas, distintos miRNAs han sido identificados en el sistema nervioso e implicados en varios aspectos tanto de su fisiología como de su patología (Cao y cols. 2016).

Los miRNAs participan en el desarrollo, diferenciación celular e interconexión neuronal, y ha sido descrita su participación en el desarrollo embrionario del sistema nervioso (Giraldez y cols., 2005), en la proliferación y diferenciación de células nerviosas (Mondanizadeh y cols., 2015), en la

migración neuronal en el desarrollo de la corteza cerebral (Rago y cols. 2015), en el establecimiento del árbol dendrítico (Schraft y cols., 2006; Magill y cols., 2010), en el crecimiento axonal (Vo y cols., 2005; Dajas-Bailador y cols., 2012; Zhang y cols., 2013), y en el establecimiento de sinapsis y plasticidad sináptica (Lugli y cols., 2008; Aksoy-Aksel y cols., 2014).

Igualmente han sido implicados en varios procesos patológicos que afectan al sistema nervioso como son patologías que cursan con neuroinflamación (Li y cols., 2011), alteraciones del desarrollo neurológico como el síndrome de X frágil (Dictemberg y cols., 2008), el síndrome de Rett (Urduingio y cols., 2010) y el autismo (Seno y cols., 2011), y por último en patologías neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer (Denk y cols., 2015) y el Parkinson (Cho y cols., 2013).

### 2.5. MiRNAs y dolor neuropático

Las dianas potenciales descritas para los distintos miRNAs son miles, por lo que nos centraremos en aquellos que se han relacionado con distintos modelos de dolor neuropático y que se recogen en la **tabla 3**. No sólo se han identificado cambios en la expresión de micro RNAs, sino que se han postulado como dianas terapéuticas habiéndose descrito que la modificación de algunos de ellos, modula el dolor neuropático, como se recoge en la **tabla 4**

**Tabla 3. miRNAs desregulados en modelos de dolor neuropático.** Modelo experimental empleado, miRNA implicado, estructura donde se identifica y autores.

MODELO	ESTRUCTURA	MIR	AUTOR
SCI (ciático) rata	Asta dorsal torácica	↓ Mir-128	Yang y cols., 2017
SNL	Ganglio dorsal	↓ miR-668 y 672 ↑ mir-21 y miR-31	Chang y cols., 2017
CCI (ciático) rata	Ganglio dorsal	↓ miR-141	Zhang y cols., 2015
SNI	Médula lumbar	↓ miR-132	Zhang y cols., 2015
Neuropatía diabética inducida con STZ ratón	Asta dorsal lumbar	42 miRNAs especialmente miR-184-5p y miR-190 <sup>a</sup> -5p	Gong y cols. 2015

## Estado actual del tema

**Tabla 3 (cont). miRNAs desregulados en modelos de dolor neuropático.** Modelo experimental empleado, miRNA implicado, estructura donde se identifica y autores.

MODELO	ESTRUCTURA	AUTOR	MIR
CCI (bilateral ciático) rata	Asta dorsal	Li y cols., 2015	↓ miR-203
SNI rata	Ganglio dorsal lumbar	Norcini y cols., 2014	↑ miR-133b, 145, 193b, 143, 335-5p, 191 y miR-1
SNL (spinal nerve ligation) rata	Ganglio dorsal	Bali y cols., 2014	↓ miR-30d, miR-125b y mir-379
CCI (ciático) rata	Hipocampo	Hori y cols., 2013	8 miRNAs
CCI (ciático) rata	Hipocampo	Arai y cols., 2013	↓ miR-125b y 132 y luego ↑
CCI (bilateral ciático) rata	Ganglio dorsal Medula espinal	Li y cols., 2013	↑ miR-341 ↓ miR-203, 181a y 541
CCI (ciático) rata	Asta dorsal	Genda y cols., 2013	miR-500, 221 y 21
CCI (ciático) rata	Médula espinal	Branderburguer y cols., 2012	↑ miR-494, 720, 690 y 668 ↓ miR-124
CNL (ciático) Axotomía completa (ciático) rata	Ganglio dorsal Ganglio dorsal Médula espinal	Kusuda y cols., 2011	↓ miR-1, 16 y 206 ↑ miR-1, 16 y 206 ↓ miR-1
Axotomía n. ciático rata	Ganglio dorsal	Strickland y cols., 2011	↑ miR-21
CNL (ciático) raton	Núcleo acumbens Prosencéfalo	Imai y cols., 2011	↓ miR-200b y 429 7 días post cirugía: ↑ miR-200b y 429

CNL: Ligadura parcial del nervio, CCI: lesión por constricción crónica del nervio, SNL: ligadura de nervio espinal, SCI lesión médula espinal, SNI: ligadura y sección de ramas del nervio ciático, preservando el safeno.

**Tabla 4. Modificación del dolor neuropático mediante uso de análogos o inhibidores de miRNAs.** Modelo experimental, intervención realizada, hallazgos y autor.

MODELO	HALLAZGOS	INTERVENCIÓN	AUTOR
CCI rata	Descenso alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica, ↓ BDNF	miR-206 mimic	Sun y cols., 2017
Neuropatía por oxaliplatino. rata	Aumento de alodinia mecánica. ↓β-secretasa 1	Mir-15b mimic ganglio dorsal	Ito y cols., 2017
SNI rata	Disminución de alodinia mecánica ↓ Nav1.7	miR-30b mimic intratecal	Shao y cols., 2016
	Aumento de alodinia mecánica ↑ Nav1.7	miR-30b inhibidor intratecal	
CCI (Cronic constriccion injuiry) (ciático) rata	Disminución de alodinia mecánica, hiperalgnesia térmica y citoquinas proinflamatorias y NF-κB y p38 MAPK	miR-221 inhibidor. Intratecal	Xia y cols. 2016
CCI (Cronic constriccion injuiry) (ciático) rata	Descenso de alodinia mecánica, hiperalgnesia térmica y citoquinas proinflamatorias	miR-218 inhibidor. Intratecal	Li y Zhao 2016
CCI (Cronic constriccion injuiry) (ciático) rata	Descenso de alodinia mecánica, hiperalgnesia térmica y citoquinas proinflamatorias	miR- 141mimic. Intratecal.	Zhang J y cols 2015
Bilateral CCI (Chronic constriccion injuiry) (ciático) rata.	Descenso de alodinia mecánica, hiperalgnesia térmica y alodinia por frío.	miR-19A mimic. Intratecal	Wang y cols. 2015
CCI (Cronic constriccion injuiry) (ciático) rata	Disminución de alodinia mecánica e hiperalgnesia térmica	miR-155 inhibidor. intratecal	Tan y cols. 2015
SNL (spinal nerve ligation) ratón	Disminución de alodinia mecánica	miR146a mimic. intratecal	Lu y cols., 2015
CCI (Cronic constriccion injuiry) (ciático) rata	Disminución de expresión de Nav1.3	miR-96 mimic. intratecal	Chen y cols. 2014

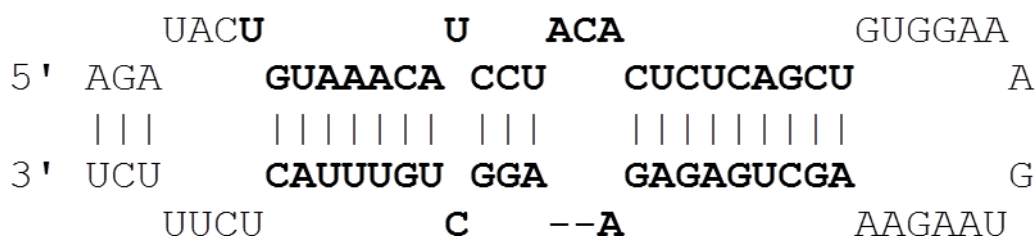
## Estado actual del tema

La relación entre miRNAs y dolor neuropático no sólo se ha hallado en el modelo animal, sino que empieza a haber autores que reportan esta asociación en pacientes. En este sentido se ha identificado un incremento en la expresión de miR-34c-5p, miR-107, miR-892b, miR-486-3p y miR-127-5p en suero de pacientes con neuralgia postherpética vs. Pacientes con episodio de herpes zóster agudo (Huang y cols., 2017).

En un experimento en pacientes y modelo animal, se ha identificado un incremento en la expresión de miR-132-3p en leucocitos y en biopsias de nervio sural de pacientes con dolor neuropático vs. controles en el modelo animal ( lesión nervio ciático rata), el miR-132-3p se encontró sobre expresado en ganglio dorsal y médula espinal de los animales con dolor. La administración intratecal de inhibidor disminuyó la alodinia mecánica, mientras que la del análogo incrementó la alodinia (Leinders y cols., 2016).

### 2.6. Micro RNA 30c (miR-30c):

La familia miR-30 consiste en 5 miembros de miR-30a hasta miR-30e, que están muy conservados entre especies. La importancia de esta familia fue descrita originalmente en el campo de la oncología, debido a que la desregulación de sus miembros es clave en la producción de algunos tumores (Yao y cols. 2010). Esta familia está implicada en el descenso de la apoptosis reduciendo la activación de p53 por TGF $\beta$  (Yu y cols. 2010), mecanismo por el cual se han relacionado con el descenso de apoptosis de cardiomiocitos (Li y cols. 2010). Por otra parte también están implicados en la diferenciación celular (Hand y cols. 2009, Agrawal y cols. 2009), por lo que su desregulación también se ha relacionado con incremento en el grado de malignidad tumoral.



**Figura 10. Estructura de primiR 30c.** En negrita las bases conservadas tras procesamiento por Drosha y Dicer. Modificada de miRBase.



La secuencia finalmente activa de miR-30c tiene 23 bases y es idéntica en la rata y en el humano: 5´**UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC** 3´ ([http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna\\_entry.pl?acc=MI0000254](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000254)).

La función del miR-30c y su desregulación ha sido relacionada con múltiples procesos biológicos y patologías: (i) Desarrollo de órganos y tejidos: está implicado en el desarrollo del hígado y vía biliar (Hand y cols., 2009), la angiogénesis (Bridge y cols., 2012), en la osificación (Vimalraj y Selvamurugan, 2014), tejido muscular (Guess y cols., 2015), adiposo (Hu y cols., 2015), cardíaco (Liu y cols., 2016) y en la proliferación y diferenciación neuronal (Sun y cols., 2016). (ii) Patologías cardíacas: hipertrofia cardíaca (Raut y cols., 2016), fibrosis (Yang y cols., 2016), en la miocardiopatía dilatada (Isserlin y cols., 2015) y en la remodelación tras infarto cardíaco (Niccolini y cols., 2015), relacionándose con una mejor evolución postinfarto (Liu y cols., 2015). (iii) Hipertensión pulmonar (Xing y cols., 2015). (iv). Cáncer: en este campo hay estudios que dan a miR-30c un papel en el desarrollo de tumores por su efecto inhibidor de la apoptosis (Jiang y cols., 2016), aunque el mayor número de referencias le sitúan como antitumoral, ya que se relaciona con reducción de la mitosis (Zhao y cols., 2014; Shukla y cols., 2015) y de la capacidad metastásica (Suh y cols., 2014; Zhang y cols., 2015), así como por estar infra regulado en los tumores que tienen menor respuesta a radioterapia o quimioterapia (Hummel y cols., 2010) y el cáncer hereditario de mama (Tanic y cols., 2012). (v) Trastornos del metabolismo lipídico y arteriosclerosis: participa en la síntesis de lipoproteínas (Sodi y cols., 2017), favoreciendo un perfil lipídico hipo aterogénico (Eastwood y cols., 2016; Zhou y cols., 2016) y menor arteriosclerosis (Irani y cols., 2016). (vi) Trombosis arterial (Luo y cols., 2016). (vii) Obesidad: favorece su aparición (Peng y cols., 2014) y está implicado en la lipodistrofia del VIH (Squillace y cols., 2014). (viii) Patología y metabolismo hepático: el miR-30c está implicado en la regulación de la fibrosis hepática (Roy y cols., 2015) y su infra regulación se relaciona con la cirrosis (Wen y cols., 2016), con la esteatosis hepática (Mehta y cols., 2016) y con el desarrollo de hepatocarcinoma en pacientes con infección por virus de la hepatitis C (Liu y cols., 2015). (ix) Enfermedad inflamatoria intestinal (Chen y cols., 2014). (x) Infección por virus. (Zhang y cols., 2016).

## Estado actual del tema

---

Comentaremos de forma específica su implicación en la fisiología y las patologías del sistema nervioso. Se ha demostrado que miR-30c tiene un efecto protector frente al daño causado por isquemia medular en la rata (Li y cols. 2015). Está implicado en la esclerosis hipocampal en el anciano (Nelson y cols., 2015). Se ha relacionado su infra regulación con dificultad de aprendizaje en el ratón (Sun y cols., 2016) y su sobrerregulación con la epilepsia (Alsharafi y Xiao., 2015). También puede estar implicado en el trastorno bipolar (Zhou y cols., 2009).

Trabajos previos de nuestro grupo, sugieren la existencia de una relación de causalidad entre miR-30c y dolor neuropático en ratas sometidas a lesión del nervio ciático. Además, los niveles circulantes de miR-30c en plasma, líquido cefalorraquídeo y tejido aparecen elevados y se correlacionan directamente con el grado de alodinia desarrollado. Sobreexpresión y silenciamiento de miR-30c tienen efectos opuestos sobre el desarrollo de alodinia tras la lesión nerviosa. miR-30c mimic se comporta como proalodínico, mientras que anti miR-30c retrasa el desarrollo de alodinia (Velategui, 2015). Por el contrario, estudios en modelos experimentales de dolor neuropático señalan a miR-30d (Bali y cols., 2014) y miR-30b (Shao y cols., 2016) como antialodínicos.

### **2.6.1. El miR-30 como marcador diagnóstico.**

Durante la realización de este trabajo de Tesis doctoral se han publicado diversos trabajos que postulan el papel de miR-30c como marcador diagnóstico en combinación con otros miRNAs en patologías diversa índole que incluyen: (i) cáncer pulmonar no microcítico (Giallombardo y cols., 2016); de tiroides (Saiselet y cols., 2015); de endometrio (Yanokura y cols., 2015); de próstata (Kachacova y cols., 2015) y de colon (Ostenfeld y cols., 2016) asociado a un incremento en los niveles plasmáticos. (ii) Desarrollo de cirrosis y hepatocarcinoma en pacientes con infección por virus de la hepatitis C con aumento de sus niveles en suero (Oksuz y cols., 2015). (iii) Estenosis aórtica calcificada, hallándose incremento de expresión en células progenitoras osteogénicas circulantes (Takahashi y cols., 2016). (iv) Insuficiencia cardiaca con niveles reducidos en suero (Watson y cols., 2015). (v) Infección por virus influenza, con niveles reducidos en exudado faríngeo (Peng y cols., 2016). (vi)

Glomerulonefritis por cambios mínimos con aumento de expresión en plasma (Ramezani y cols., 2015). (vii) Síndrome de ovario poliquístico con un aumento de su expresión en suero (Long y cols., 2014). (viii) Policitemia vera con niveles reducidos en reticulocitos (Bruchova y cols., 2008). (ix) Síndrome de fatiga crónica con aumento de expresión en linfocitos Natural Killer (Petty y cols., 2016). (x) Enfermedad de Parkinson, con niveles reducidos en suero (Vallelunga y cols., 2014).

En el diagnóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas es donde se ha encontrado mayor utilidad diagnóstica a la determinación de niveles de miR-30c de manera aislada, produciéndose un incremento de niveles de expresión en torno a 10 veces la mediana de los controles, consiguiendo una sensibilidad del 73% y especificidad del 96% medido en plasma, y sobre todo medido en bilis donde la sensibilidad es del 96% y la especificidad del 98% (Cote y cols., 2014; Lai y cols., 2017).

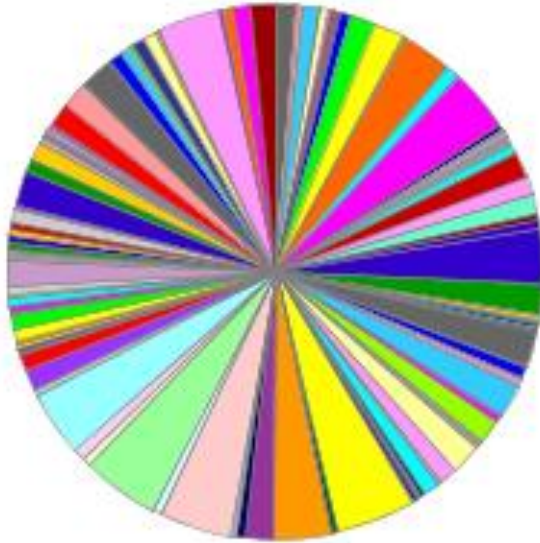
### **2.6.2. Predicción de genes diana de miR30c**

Cada miRNA puede interactuar con numerosos mRNAs y cada mRNA puede ser regulado por numerosos miRNAs, lo que complica enormemente su estudio (Bartel 2009; Lötch y cols., 2013). La predicción de dianas de miRNAs se puede llevar a cabo de forma fiable mediante programas informáticos que calculan la complementariedad de las secuencias 3'-UTR presentes en los mRNAs y la secuencia de la "seed región" del correspondiente miRNA. Existen numerosas páginas web que facilitan información acerca de los miRNAs. Algunos ejemplos representativos son: TargetScan, PicTar, miRanda, (Lewis y cols. 2003, Grun y cols. 2005, Friedman y cols. 2009, Ekimler y cols. 2014). En cualquier caso, el mRNA predicho debe ser validado tanto "in vitro" como "in vivo" utilizando diferentes métodos de identificación (Hafner y cols. 2010, Leung y cols. 2011, Riley y cols. 2012, Orom y cols. 2008, Lal y cols. 2011).

Usando target scan se identifican 1720 mRNAs dianas de miR-30c predichas en humanos y, mediante el programa panther (<http://www.pantherdb.org/>), se han agrupado los genes diana en función de las rutas biológicas en las que están implicados. El resultado se detalla a cen forma de lista; cada código de color indica una ruta y en el gráfico de sectores se representa la proporción de mRNAs diana implicados en cada ruta.

## Estado actual del tema

---



- [2-arachidonoylglycerol biosynthesis](#)
- [5-Hydroxytryptamine degradation](#)
- [5HT1 type receptor mediated signaling pathway](#)
- [5HT2 type receptor mediated signaling pathway](#)
- [5HT3 type receptor mediated signaling pathway](#)
- [5HT4 type receptor mediated signaling pathway](#)
- [ATP synthesis](#)
- [Adenine and hypoxanthine salvage pathway](#)
- [Adrenaline and noradrenaline biosynthesis](#)
- [Alanine biosynthesis](#)
- [Alpha adrenergic receptor signaling pathway](#)
- [Alzheimer disease-amyloid secretase pathway](#)
- [Alzheimer disease-presenilin pathway](#)
- [Aminobutyrate degradation](#)
- [Angiogenesis](#)
- [Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins](#)
- [Apoptosis signaling pathway](#)
- [Arginine biosynthesis](#)
- [Asparagine and aspartate biosynthesis](#)
- [Axon guidance mediated by Slit/Robo](#)
- [Axon guidance mediated by netrin](#)
- [Axon guidance mediated by semaphorins](#)
- [B cell activation](#)
- [Beta1 adrenergic receptor signaling pathway](#)
- [Beta2 adrenergic receptor signaling pathway](#)
- [Beta3 adrenergic receptor signaling pathway](#)
- [Blood coagulation](#)

- [CCKR signaling map](#)
- [Cadherin signaling pathway](#)
- [Carnitine metabolism](#)
- [Cell cycle](#)
- [Cholesterol biosynthesis](#)
- [Circadian clock system](#)
- [Coenzyme A linked carnitine metabolism](#)
- [Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway](#)
- [Cytoskeletal regulation by Rho GTPase](#)
- [DNA replication](#)
- [De novo purine biosynthesis](#)
- [De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis](#)
- [Dopamine receptor mediated signaling pathway](#)
- [EGF receptor signaling pathway](#)
- [Endogenous cannabinoid signaling](#)
- [Endothelin signaling pathway](#)
- [Enkephalin release](#)
- [FAS signaling pathway](#)
- [FGF signaling pathway](#)
- [Fructose galactose metabolism](#)
- [GABA-B receptor II signaling](#)
- [Gamma-aminobutyric acid synthesis](#)
- [General transcription by RNA polymerase I](#)
- [General transcription regulation](#)
- [Glycolysis](#)
- [Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway](#)
- [Hedgehog signaling pathway](#)
- [Heme biosynthesis](#)
- [Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway](#)
- [Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway](#)
- [Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction](#)
- [Histamine H1 receptor mediated signaling pathway](#)
- [Histamine H2 receptor mediated signaling pathway](#)
- [Huntington disease](#)
- [Hypoxia response via HIF activation](#)
- [Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway](#)
- [Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase/MAP kinase cascade](#)
- [Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade](#)
- [Integrin signalling pathway](#)
- [Interferon-gamma signaling pathway](#)
- [Interleukin signaling pathway](#)
- [Ionotropic glutamate receptor pathway](#)
- [Isoleucine biosynthesis](#)

## Estado actual del tema

---

- [JAK/STAT signaling pathway](#)
- [Leucine biosynthesis](#)
- [Metabotropic glutamate receptor group I pathway](#)
- [Metabotropic glutamate receptor group II pathway](#)
- [Metabotropic glutamate receptor group III pathway](#)
- [Methylcitrate cycle](#)
- [Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway](#)
- [Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway](#)
- [N-acetylglucosamine metabolism](#)
- [Nicotine pharmacodynamics pathway](#)
- [Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway](#)
- [Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway](#)
- [Notch signaling pathway](#)
- [O-antigen biosynthesis](#)
- [Opioid prodynorphin pathway](#)
- [Opioid proenkephalin pathway](#)
- [Opioid proopiomelanocortin pathway](#)
- [Oxidative stress response](#)
- [Oxytocin receptor mediated signaling pathway](#)
- [P53 pathway feedback loops 1](#)
- [PDGF signaling pathway](#)
- [PI3 kinase pathway](#)
- [Parkinson disease](#)
- [Pentose phosphate pathway](#)
- [Phenylethylamine degradation](#)
- [Plasminogen activating cascade](#)
- [Purine metabolism](#)
- [Pyrimidine Metabolism](#)
- [Pyruvate metabolism](#)
- [Ras Pathway](#)
- [T cell activation](#)
- [TCA cycle](#)
- [TGF-beta signaling pathway](#)
- [Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway](#)
- [Toll receptor signaling pathway](#)
- [Transcription regulation by bZIP transcription factor](#)
- [Ubiquitin proteasome pathway](#)
- [VEGF signaling pathway](#)
- [Valine biosynthesis](#)
- [Vasopressin synthesis](#)
- [Wnt signaling pathway](#)
- [p38 MAPK pathway](#)
- [p53 pathway by glucose deprivation](#)
- [p53 pathway feedback loops 2](#)
- [p53 pathway](#)

## **Objetivos específicos**

---





Los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral son:

1. Estudios en el animal de experimentación:

1.1. Establecer el curso temporal y duración de la alodinia mecánica en ratas sometidas a lesión del nervio ciático, a lo largo de un periodo prolongado de seguimiento.

1.2. Determinar el potencial valor preventivo de terapias dirigidas a neutralizar miR-30c, administradas precozmente por vía intracisternal, y su evolución temporal a lo largo de un periodo prolongado de seguimiento.

1.3. Analizar la capacidad del tratamiento intracisternal tardío con anti-miR-30c para revertir el dolor neuropático una vez establecido y la persistencia del efecto a lo largo de un periodo prolongado de seguimiento.

2. Estudios en pacientes:

2.1. Determinar la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos en el animal de experimentación en un grupo de pacientes con dolor neuropático secundario a isquemia severa de las extremidades inferiores.

2.2. Establecer la existencia de alteraciones en los niveles circulantes de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y/o plasma en relación con la presencia de dolor neuropático.

2.3. Definir el valor de miR-30c circulante en líquido cefalorraquídeo y/o plasma como biomarcador de dolor neuropático y desarrollar modelos predictivos para discriminar con sensibilidad y especificidad a aquellos individuos que padecen dolor neuropático de los que están libres de dolor.



## **Material y métodos**

---



### 1. Sujetos de estudio

#### 1.1. Pacientes

Se reclutaron de forma prospectiva un total de 34 pacientes con patología isquémica severa de la extremidad inferior, referidos a la Unidad de Cirugía Cardiovascular del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Cantabria) para ser sometidos a cirugía de amputación o revascularización bajo anestesia regional (raquianestesia). Durante el proceso de raquianestesia se recogió una muestra de 500 µl. de LCR y una muestra de sangre venosa cubital para la obtención de plasma. Dentro de esta cohorte, 25 pacientes presentaban dolor neuropático de más de 3 meses de duración, y 9 pacientes no mostraban dolor neuropático. Este último grupo de pacientes fue considerado el grupo control isquémico. Además, se reclutaron como controles 25 pacientes sin isquemia de las extremidades inferiores, sometidos a cirugía con raquianestesia por patologías libres de dolor. Esta cohorte incluyó pacientes sometidos a cirugía urológica (corrección de incontinencia urinaria, resección endoscópica de adenoma de próstata, resección transuretral de tumores vesicales no infiltrantes e intervenciones de litotricia invasiva) o a cirugía general (hernioplastia de pared abdominal y patología anal no maligna).

El diagnóstico de dolor neuropático se realizó en base a la puntuación obtenida en el cuestionario DN4 descrito por Bouhassira y cols. (2005) y Perez y cols. (2007). Se incluyeron en el estudio los pacientes con una puntuación igual o mayor a 3 en dicho cuestionario. Fueron criterios de exclusión en todos los grupos de estudio la neoplasia maligna infiltrante y/o metastásica, embarazo, traumatismo, edad (<18 años) e incapacidad física o intelectual para responder a las preguntas subjetivas del cuestionario. En la **tabla 5** se muestran los datos demográficos de todos los pacientes incluidos en el estudio.

## Material y métodos

**Tabla 5. Características de los pacientes del estudio.** Se incluye la distribución por grupos de las principales características demográficas, patologías y tratamientos relacionados con el dolor.

	Isquemia Dolor neuropático (n=25)	No isquemia No dolor (n=25)	Isquemia No dolor (n=9)
Edad (media $\pm$ EEM)	75, 4 $\pm$ 2	67,9 $\pm$ 9,5	68,3 $\pm$ 9,3
Sexo	14 hombres (56%) 11 mujeres (44%)	20 hombres (80%) 5 mujeres (20%)	8 hombres (90%) 1 mujer (10%)
Diabetes mellitus	11 (44%)	3 (12%)	2 (22%)
Obesidad	12 (48%)	12 (48%)	5 (56%)
Hipertension	19 (76%)	17 (68%)	8 (89%)
AINEs y/o paracetamol	24 (96%)	-	2 (22%)
Opioides	20 (80%)	-	1 (11%)
Fármacos específicos para dolor neuropático	8 (32%)	0	0

El estudio se ajustó a las directrices de la declaración Helsinki relativa a la investigación en humanos y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria. Todos los pacientes fueron informados de forma exhaustiva, oralmente y por escrito, acerca de la finalidad del estudio, molestias suplementarias que se le pudieran ocasionar y posibilidad de retirarse en cualquier momento del estudio. Una vez otorgada su aquiescencia, el paciente firmó por triplicado el preceptivo consentimiento informado (ver Anexo I).

### 1.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho con un peso comprendido entre 200 y 350 gramos, criadas en el Servicio de Estabulación y Experimentación animal de la Universidad de Cantabria. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria y la Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca de la Comunidad de Cantabria. Las ratas fueron estabuladas en grupos de tres animales, expuestas a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura ambiente de  $22 \pm 1^{\circ}$  C y humedad relativa del 60-70%. La comida y el agua

fueron suministradas *ad libitum*. El cuidado y la manipulación experimental de los animales se realizó de acuerdo a la normativa vigente nacional (Real Decreto 1201/2005) y Europea (Declaración de Helsinki y Directiva de la CEE 2012/707/EU), y siguiendo las pautas establecidas por el Comité de Investigación y Ética de la International Association for the Study of Pain (Zimmermann 1983).

### **2. Modelo experimental: Modelo de neuropatía traumática del nervio ciático (SNI: spared nerve injury)**

El modelo de neuropatía traumática elegido para provocar dolor crónico neuropático en rata fue descrito por Decosterd y Woolf (2000). Bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane®, 2-3 %), se realizó una incisión, de aproximadamente 2 cm, en la cara externa de la piel del muslo de la pata izquierda, a la altura del fémur y paralela a él, previa depilación y desinfección con povidona yodada. Se disecó el músculo femoral y se expuso el nervio ciático a la altura de la trifurcación de sus ramas sural, tibial y peroneal. En este modelo, se realizan dos ligaduras con sutura de las ramas tibial y peroneal, una en la zona más próxima a la trifurcación y otra más distal separada 2-3 mm, y se procede a la axotomía de ambas ramas. Se mantuvo intacta la rama sural, limitándose al máximo posible su manipulación y/o estiramiento para evitar una posible neuroapraxia, ya que dificultaría la ulterior valoración de la respuesta a estímulos mecánicos. Una vez realizada la lesión nerviosa, se suturó la musculatura y la piel con sutura Vicryl® 5-0s (Ethicon, Johnson & Johnson). En los animales control (sham), se realizó el mismo proceso, evitando la disección, estiramiento y manipulación de las tres ramas nerviosas descritas.

### **3. Valoración de la respuesta a estímulos mecánicos: Test de monofilamentos de von Frey.**

Se valoró el grado de hiperalgesia y alodinia mecánicas desarrolladas mediante estimulación con monofilamentos de von Frey de fuerza creciente calibrada (Semmes Weinstein von Frey Aesthesiometer for Touch Assessment, Stoelting Co, Illinois EEUU) aplicados en la zona inervada por la rama sural (zona externa de la superficie plantar de las patas traseras, correspondiente a los dedos 4º y 5º). Se valoraron las respuestas nocifensivas el día antes de la

## Material y métodos

---

intervención (basal) y los días posteriores hasta el sacrificio. Los animales se introdujeron de forma individualizada en un compartimento con suelo de rejilla, donde su movilidad quedaba reducida. Tras un periodo de adaptación de 10 min al nuevo habitáculo, se aplicó la batería de monofilamentos de von Frey. Se consideró respuesta positiva la sacudida, retirada o lamido de la pata tras la aplicación del estímulo mecánico. Se estimularon las patas 5 veces con cada uno de los monofilamentos y se valoró el porcentaje de respuestas positivas para cada fuerza aplicada. Inicialmente, se estimuló la pata con un monofilamento de fuerza intermedia y se continuó con monofilamentos de fuerza progresivamente descendente, hasta que no se obtuvo respuesta. Posteriormente, se aplicaron estímulos de fuerza ascendente, partiendo del monofilamento consecutivo al inicial, hasta que se provocó un 100% de respuestas (Bonin y cols., 2014). El umbral nociceptivo se expresó como los gramos que evocaron respuesta de retirada de la pata en 3 de los 5 estímulos aplicados.

### 4. Tratamientos y grupos experimentales.

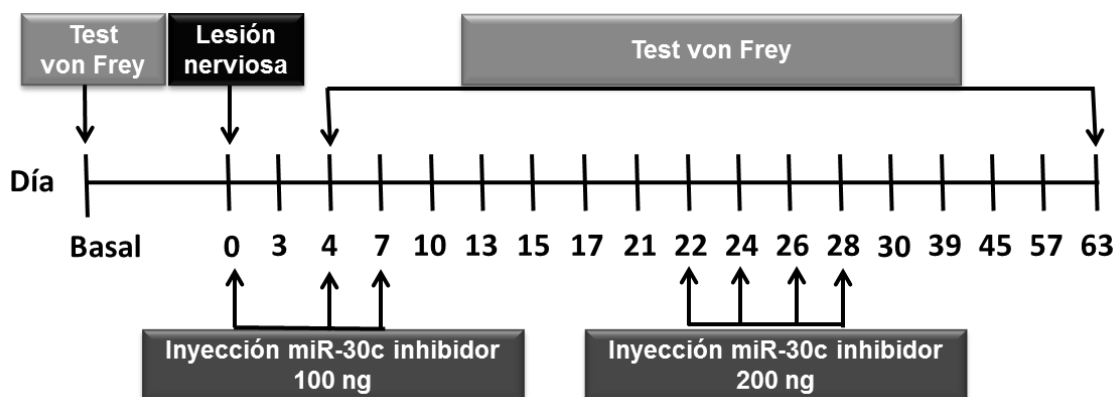
Se determinó el efecto del tratamiento con miR-30c inhibidor sobre la percepción nociceptiva en el modelo de dolor crónico neuropático previamente descrito. Todos los grupos experimentales estuvieron constituidos por un mínimo de 5-8 ratas. Los tratamientos se administraron en la cisterna magna en ciclos de inyecciones en días alternos) disueltos en lipofectamina (Life Technologies, Invitrogen) y líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial. Su composición fue una mezcla (1:1) de la solución A y B:

Solución A	Solución B
5ml de H <sub>2</sub> O destilada	5ml de H <sub>2</sub> O destilada
NaCl 0,0866 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O 0,00214 g
KCl 0,00224 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O 0,00027 g
CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O 0,00206 g	
MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O 0,00163 g	

Las ratas, bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane®, 1L/min al 2,5-3 %), se colocaron en un cuadro esterotáxico, con el cuerpo en posición



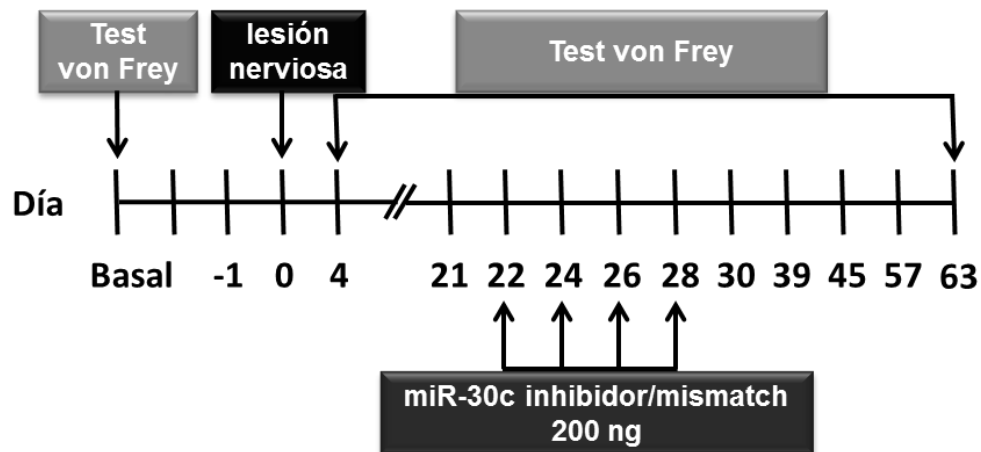
horizontal y la cabeza inclinada 45°. Se depiló y desinfectó con etanol al 70% la zona occipital. Se introdujo una aguja de 25G, conectada a una jeringa Hamilton de 10 µl, en la línea media de la cresta occipital, en una superficie depresible por palpación entre las protuberancias occipitales y el atlas. Se administró miR-30c inhibidor (mirVana® miR-inhibidor, Life Technologies) disuelto en lipofectamina (1:1) y completado a un volumen final de 10 µl con LCR artificial. Se emplearon dosis de 100 ng y 200 ng siguiendo los siguientes protocolos de administración (**Figuras 11 y 12**). En un primer estudio, se administró un ciclo de tres inyecciones de miR30c inhibidor a una dosis de 100ng, comenzando el día que se realizó la lesión nerviosa y el 2º y 4º día. Cuando las ratas presentaron hiperalgesia y alodinia mecánica, recibieron un segundo ciclo de cuatro inyecciones de 200ng los días 22, 24, 26 y 28 tras la lesión nerviosa (**Figura 11**).



**Figura 11. Protocolo experimental 1.** Tratamiento crónico con mir-30c inhibidor: un primer ciclo a una dosis de 100 ng y un segundo ciclo a una dosis de 200 ng. Se valoró el efecto mediante de test de von frey en días alternos posteriores a la lesión nerviosa hasta el sacrificio para valorar el grado de hiperalgesia y alodinia mecánicas desarrolladas.

En un segundo estudio, un grupo de ratas fue sometida a la lesión del nervio ciático y transcurrido un periodo de 3 semanas sin tratamiento y cuando todas las ratas mostraban el máximo grado de hiperalgesia y alodinia mecánica se administró un ciclo de 4 inyecciones los días 22, 24, 26 y 28 (**Figura 12**)

## Material y métodos



**Figura 12. Protocolo experimental 2.** Tratamiento con mir-30c inhibidor de neuropatía evolucionada: ciclo a una dosis de 200 ng. Se valoró mediante el test de von frey en días alternos el grado de hiperalgesia y alodinia mecánicas desarrolladas. Los animales sham recibieron inyecciones de una secuencia de miR desordenada en lipofectamina y LCR artificial (vehículo) siguiendo protocolos similares.

### 5. Extracción de muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo

#### 5.1. LCR

Se utilizaron los mismos procedimientos de anestesia e inmovilización descritos en la sección de tratamientos. Se introdujo en la cisterna magna una aguja tipo mariposa (25 G) unida a un catéter fino de plástico conectado a una jeringuilla de 1ml para aspirar y recoger el LCR. El LCR se almacenó a  $-80^{\circ}$  C hasta su posterior utilización. Se recogieron muestras de LCR el día de la realización de la cirugía (basal) y el día del sacrificio de los animales. Las muestras contaminadas con restos de sangre fueron descartadas.

#### 5.2. Plasma

Bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (Forane®, 11/min al 2,5-3 %) se extrajo sangre del seno retro orbital. Por capilaridad se recogió la sangre para determinación basal del microRNA (12-14 gotas) en un tubo estéril que contenía una solución de 50mg/ml de EDTA (40  $\mu$ l). El día del sacrificio la sangre se obtuvo de la misma manera, pero mayor cantidad (2 ml) y se recogió en tubos estériles que contenían una solución de 50mg/ml de EDTA (60  $\mu$ l). En ambos casos las muestras se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 10 min

separándose las células y el plasma, tras lo cual se recogió el plasma y posteriormente el plasma se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

### **6. Determinación de la expresión de miRNAs mediante PCR cuantitativa**

#### **6.1. Extracción de RNA de fluidos (Plasma y LCR)**

Se extrajo el RNA total de las muestras de plasma y LCR mediante Trizol (TRI Reagent T9429; SIGMA Life Science). Para ello se añadieron 800  $\mu\text{l}$  de Trizol a 250  $\mu\text{l}$  de plasma o 100  $\mu\text{l}$  de LCR. Las muestras se homogeneizaron en un vórtex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió a cada muestra C-elegans miR-39 (25 fmol/ 5  $\mu\text{l}$ ) como control interno. Seguidamente, se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol, se agitó la mezcla y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , que da lugar a tres fases diferenciadas; una fase acuosa que contiene el RNA, una interfase con DNA y una fase orgánica con proteínas. Se recogió la fase acuosa, evitando la contaminación con proteínas, y se transfirió a un tubo estéril. Se añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol añadido, se agitó suavemente la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se procedió a una nueva centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 10 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recogió el pellet precipitado que contiene el RNA y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se añadió 1ml de etanol al 75% en  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC, y se volteó para arrastrar los restos de isopropanol que pudieran quedar en el pellet. Se centrifugaron las muestras a 7.500 r.p.m. durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el etanol por decantación y evaporación (aproximadamente 30 min) y se resuspendieron las muestras en 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC. Las muestras se incubaron a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **6.2. Determinación de la concentración y pureza del miRNA**

Para determinar la concentración y pureza del miRNA, se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific Inc) que permite trabajar con 2  $\mu\text{l}$  de muestra. Para determinar la pureza se valoró la relación obtenida entre las absorbancias medidas a 260 nm (absorción por ácidos nucleicos) y a

## Material y métodos

---

280 nm (absorción por proteínas). El índice 260/280 ha de encontrarse en un rango comprendido entre 1,7 y 2,0 para garantizar la pureza. Todas las muestras empleadas estaban en este rango.

### 6.3. Transcripción inversa del miRNA

La reacción de la transcripción inversa del miRNA (microRT-PCR) es el método por el cual se obtienen las cadenas de DNA complementario o DNAC a partir del RNA extraído. Para la transcripción inversa de los miRNAs se utilizó un kit comercial de RT-PCR (Revert-aid, Fermentas). Para la reacción se usaron 100 ng de RNA del plasma y LCR y. Se añadieron la cantidad de H<sub>2</sub>O DEPC necesaria para alcanzar un volumen final de 9,16 µl y 2,84 µl de una mezcla que contenía 0,15 µl de dNTPs, 1 µl de la enzima transcriptasa inversa (multiscribe RT enzima), 1,5 µl de tampón de reacción (10X) y 0,19 µl de enzima inhibidora de RNAasas (Ribolock Ribonuclease Inhibitor). Finalmente, se añadieron a la mezcla 3 µl del cebador específico correspondiente al miRNA objeto de estudio. El miRNA utilizado como control interno fue cell-miR39 añadido a las muestras durante el proceso de extracción. La muestra total (15 µl) se centrifugó y se incubó durante 5 min en hielo. Una vez completados estos pasos, se introdujeron las muestras en un termociclador y se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: 30 min a 16° C; 30 min a 42° C; 5 min a 85° C; un último ciclo para el mantenimiento de las muestras a 4° C. El DNAC se conservó a -20° C hasta su utilización.

### 6.4. PCR cuantitativa

Los niveles de expresión de miRNAs se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: polimerase chain reaction) de tipo cuantitativo, que constituye uno de los métodos más sensibles para la cuantificación de la expresión de genes a partir de DNAC. La expresión de los miRNAs normalizó a RNU6B y en el caso de los fluidos (plasma o LCR) a cell-mir-39. Se utilizaron sondas comerciales TaqMan® (Applied Biosystems, Life Technologies) y el reactivo que contiene Mg<sup>2+</sup> y nucleótidos (Premix Ex Taq™ Perfect Real Time, Takara Bio Inc). Las amplificaciones se hicieron en un termociclador para PCR cuantitativa a tiempo real (Applied Biosystems 7500 v2.0.4; Life technologies). Para cuantificar la expresión de miRNAs, la reacción se llevó a cabo por duplicado, en un volumen de 10 µl que contenían 0,5 µl del

producto de la  $\mu$ RT-PCR, 5  $\mu$ l de mastermix, 0,25  $\mu$ l de sonda TaqMan® y 4,25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC. El número de copias de los miRNAs problema y de referencia se cuantificaron en paralelo en diferentes muestras, utilizando marcadores fluorescentes con longitudes de onda FAM.

El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante de las sondas:

- a) Un primer segmento compuesto de un ciclo:
  - I. 2 min a 50° C.
  - II. 10 min a 95° C.
- b) Un segundo segmento, compuesto de 40 ciclos:
  - I. 15 s a 95° C para la desnaturalización del DNA complementario.
  - II. 1 min a 60° C para la unión de los cebadores a la cadena de DNA complementario.

Los niveles de expresión se determinaron por duplicado en tres experimentos independientes, como mínimo. Los resultados se expresaron como:  $2^{(Ct \text{ de referencia} - Ct \text{ problema})}$ , siendo Ct el ciclo umbral. Posteriormente todos los valores obtenidos fueron multiplicados por  $10^5$  para un mejor manejo de los datos. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  EEM de las expresiones relativas obtenidas en los diferentes experimentos.

### 7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con los paquetes estadísticos GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Inc., CA, USA) y SPSS 22 de IBM. Los valores se expresaron como la media  $\pm$  EEM. Los datos de los estudios conductuales se compararon mediante ANOVA (de una vía o de dos vías, de medidas repetidas), seguido del test de Bonferroni. Para valorar la diferencia en una variable numérica entre dos grupos se utilizó el test de la *t* de Student y para valorar diferencias entre más de dos grupos se utilizó la prueba ANOVA de una vía. La relación entre variables numéricas, se determinó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. La comparación entre variables cualitativas (expresadas como porcentajes en nuestro caso) se realizó usando

## Material y métodos

---

el test Chi-cuadrado. El análisis de persistencia de alodinia en distintos grupos de ratas se hizo mediante regresión de Cox. Para la elaboración de modelos predictivos del estado de dolor neuropático en los pacientes se usó la regresión logística múltiple, las curvas ROC y el criterio de información de Akaike. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p$  (bilateral) menor de 0,05.

## Resultados

---

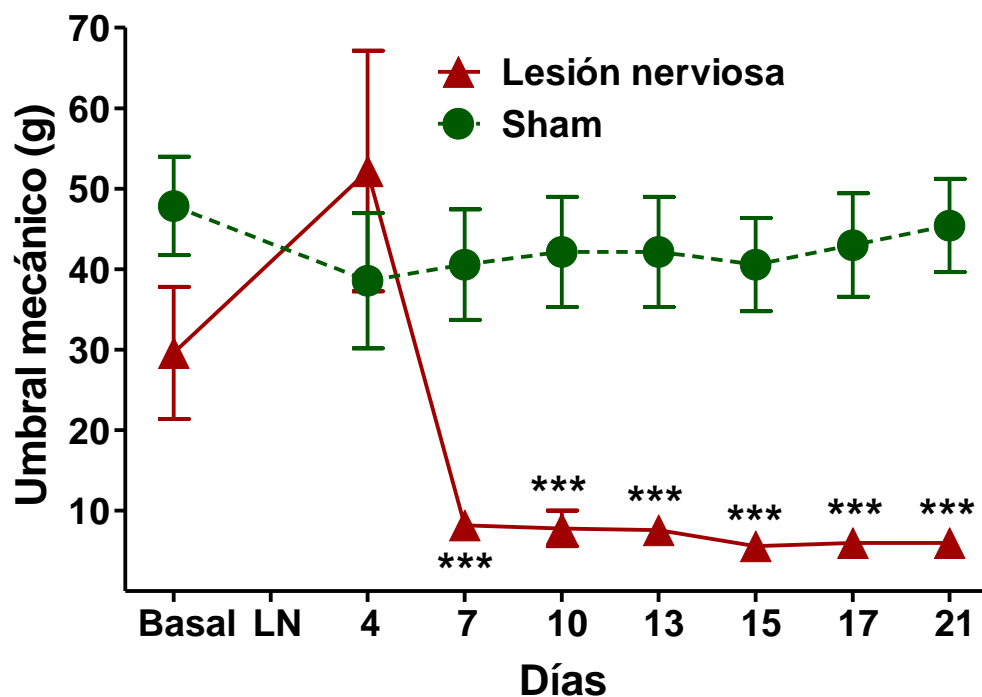




## 1. Estudio en animales de experimentación

### 1.1. Curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica

Se evaluó el desarrollo de alodinia mecánica en un modelo experimental de lesión nerviosa mediante axotomía parcial del nervio ciático (Decosterd y Woolf 2008). Se valoró la respuesta frente a estímulos mecánicos de fuerza creciente aplicando monofilamentos de von Frey en las patas traseras ipsilateral y contralateral a la lesión un día antes (respuesta basal) y en días alternos, durante un periodo de 21 días a partir de la sección parcial del nervio ciático. En los animales control (sham) se evaluó la sensibilidad táctil basal y tras la exposición del nervio ciático sin provocar lesión (*sham-operated*). Denominamos umbral mecánico a aquella fuerza que evoca respuesta nocifensiva en 3 de las 5 aplicaciones sucesivas del estímulo.

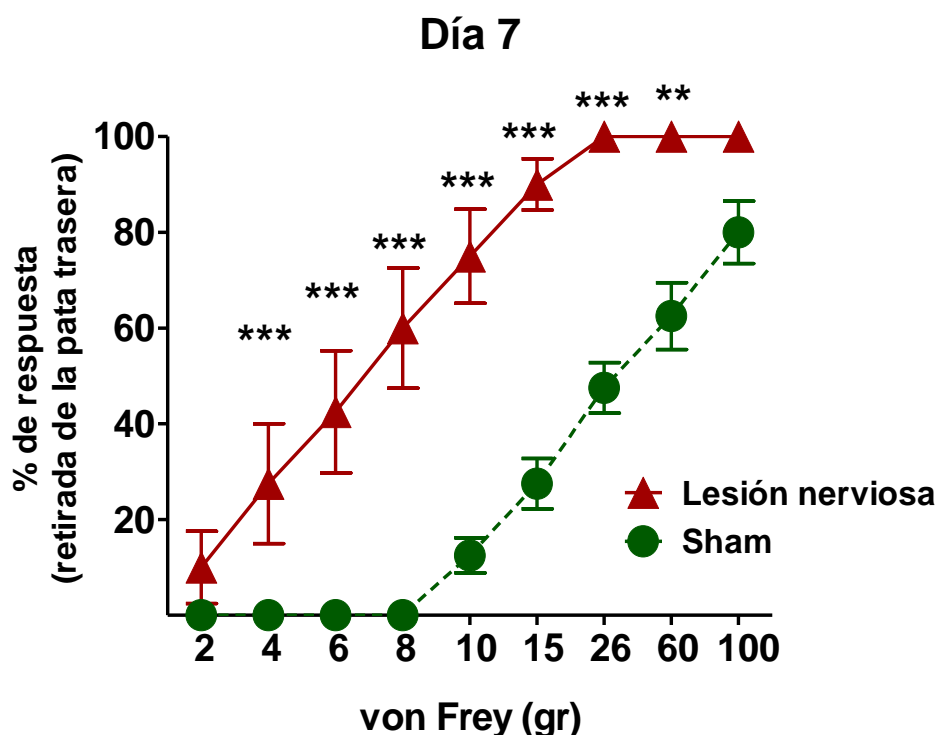


**Figura 13. Curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica tras la lesión nerviosa en ratas.** La figura muestra la evolución temporal del umbral de respuesta a estímulos mecánicos valorada mediante el test de von Frey en ratas tras la lesión del nervio ciático (LN) (N=5) o simulación (*sham*) (N=7). \*\*\* $p < 0,001$  vs. sham, prueba de Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas.

Las ratas expuestas a lesión del nervio ciático mostraron un decremento progresivo y significativo del umbral de retirada de la pata trasera ipsilateral a la lesión, y alcanzaron una respuesta alodínica máxima a los 7 días de la lesión

## Resultados

(“tiempo”:  $F_{(7,70)}=3,78$ ,  $p<0,01$ ; “lesión nerviosa”:  $F_{(1,70)}=27,84$ ,  $p<0,001$ ; “tiempo x lesión nerviosa”:  $F_{(7,70)}=4,07$ ,  $p<0,001$ , **Figura 13**). A partir de éste día, el umbral nociceptivo frente al estímulo mecánico fue significativamente menor comparado con las ratas *sham* y se mantuvo inalterado hasta el día 21, momento en el que las ratas fueron sacrificadas. Los animales control no modificaron su umbral de retirada de la pata ipsilateral trasera en todo el periodo de tiempo estudiado. En la **Figura 14** se muestra la respuesta de las ratas el 7º día tras la lesión ciática. Las ratas lesionadas mostraron un incremento significativo en el porcentaje de respuestas a estímulos mecánicos de fuerza creciente comparado con las ratas control (“lesión nerviosa”:  $F_{(1,112)}=41,06$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza”:  $F_{(8,112)}=70,19$ ,  $p<0,001$ ; “lesión nerviosa x fuerza”:  $F_{(8,112)}=6,86$ ,  $p<0,001$ ).



**Figura 14. Desarrollo de alodinia mecánica en respuesta a la lesión del nervio ciático.** Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. Curva fuerza-respuesta obtenida en el test de von Frey transcurridos 7 días desde la lesión nerviosa (N=5), \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , vs. Sham (N=7); Prueba Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas.

### 1.2. Efecto del tratamiento crónico con un inhibidor específico de miR-30c administrado por vía intracisternal

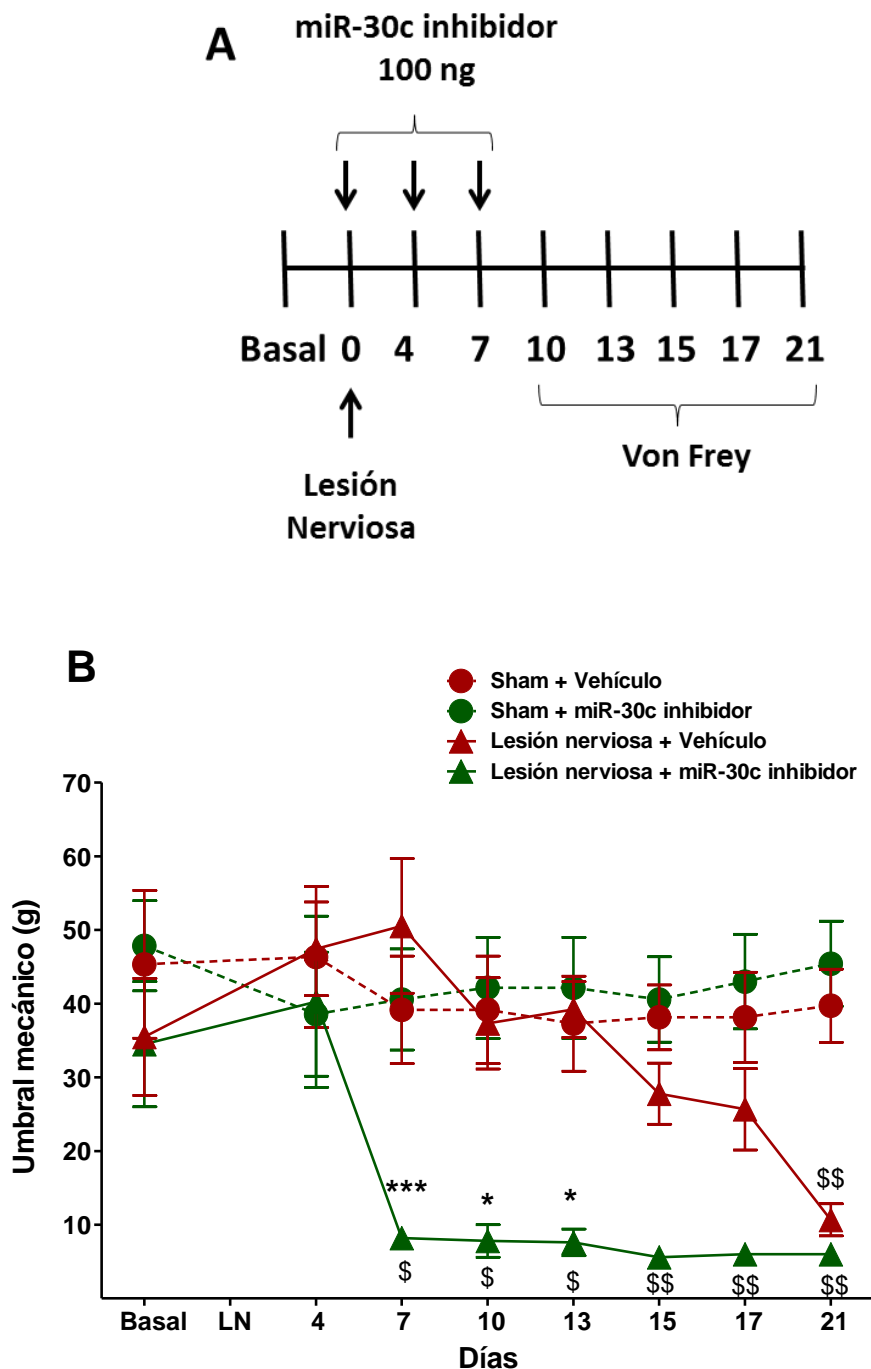
#### 1.2.1. La administración precoz de LNA-miR-30c inhibidor atenúa el desarrollo de dolor neuropático y revierte la alodinia mecánica previamente establecida en un modelo de lesión del nervio ciático en ratas

Estudios previos del laboratorio mostraron que ratas sometidas a lesión del nervio ciático tratadas con LNA-miR30c inhibidor. Se valoró mediante el test de Von Frey, el efecto de LNA-miR-30c inhibidor sobre la velocidad de desarrollo de alodinia mecánica en ratas sometidas a lesión traumática del nervio ciático. Un grupo de ratas sometido a lesión nerviosa fue tratado con LNA-miR-30c inhibidor (100 ng/10 $\mu$ l) o con vehículo el mismo día de la intervención, el 4<sup>o</sup> y el 7<sup>o</sup> día tras la cirugía. Otro grupo de ratas (sham-operated) fue sometido al mismo proceso de cirugía, pero sin lesionar el nervio ciático y tratado con LNA-miR-30c inhibidor y vehículo, siguiendo el mismo protocolo experimental. La sensibilidad mecánica de los animales fue evaluada con monofilamentos de von Frey durante 21 días. A lo largo de este periodo de seguimiento, los animales sometidos a lesión del nervio ciático y tratados con LNA-LNA-miR-30c inhibidor mostraron un umbral de retirada de la pata significativamente mayor que los animales tratados con vehículo (“Tiempo”:  $F_{(6,138)}=6,1$ ,  $p<0,001$ ; “Tiempo x lesión nerviosa”:  $F_{(6,138)}=3.4$ ,  $p<0,01$ ; “Tratamiento x lesión nerviosa”:  $F_{(1,23)}=11,7$ ,  $p<0,001$  **Figura 15**).

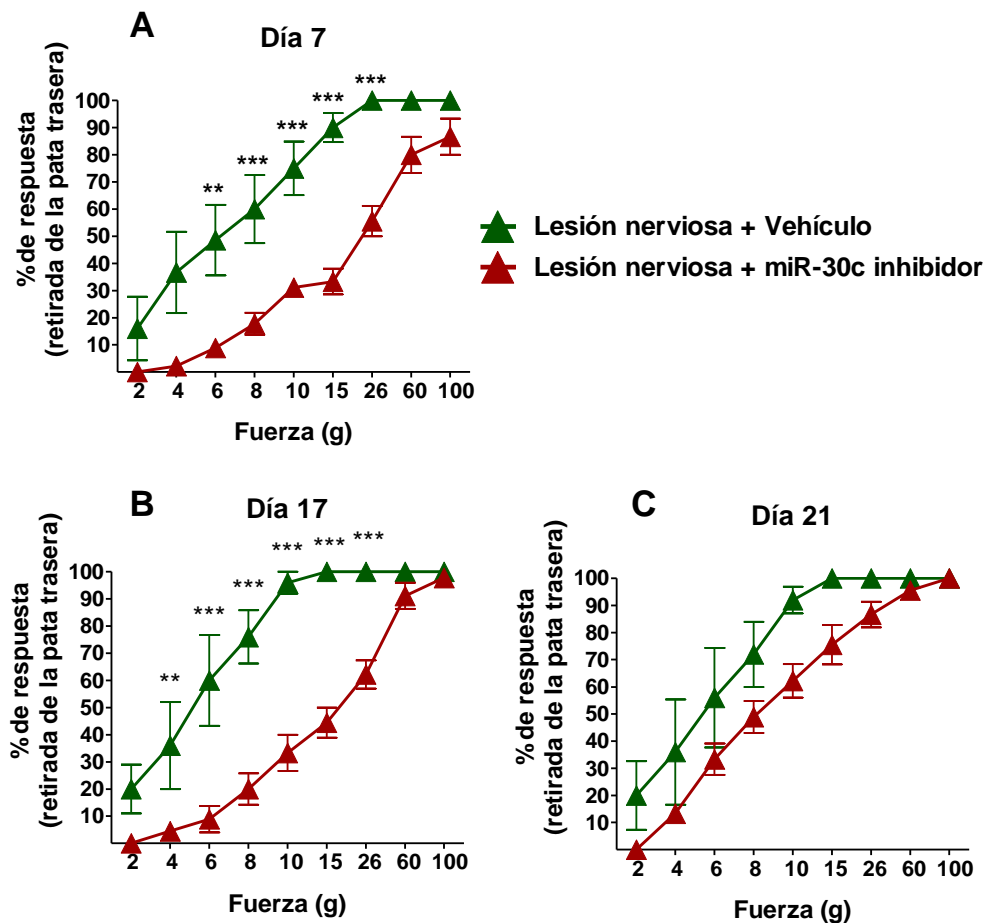
A los 7 días de la cirugía, las ratas expuestas a lesión del nervio ciático y tratadas con vehículo ya mostraron alodinia mecánica mientras que las tratadas con LNA-miR-30c inhibidor se mantenían libres de alodinia (“tratamiento”:  $F_{(1,120)}=26,77$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza”:  $F_{(8,120)}=74,99$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza x tratamiento”:  $F_{(8,120)}=4,56$ ,  $p<0,001$  **Figura 16A**). Transcurridos 17 días desde la lesión nerviosa, los animales tratados con LNA-miR-30c inhibidor aún no han desarrollado alodinia mecánica (“tratamiento”:  $F_{(1,120)}=33,76$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza”:  $F_{(8,120)}=98,66$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza x tratamiento”:  $F_{(8,120)}=9,94$ ,  $p<0,001$ , **Figura 16B**). Sin embargo, 21 días tras la cirugía ya no se observaron diferencias entre los grupos tratados con LNA-miR-30c inhibidor y con vehículo (**Figura 16C**). Es decir, las ratas tratadas con LNA-miR-30c inhibidor experimentaron un

## Resultados

retraso de dos semanas en el desarrollo de alodinia respecto a las tratadas con vehículo.



**Figura 15. Desarrollo de alodinia mecánica tras la lesión nerviosa en animales tratados con vehículo y LNA-miR-30c inhibidor.** La figura muestra el protocolo experimental (A) y la evolución temporal del umbral de respuesta a estímulos mecánicos (B) valorada mediante el test de von Frey en ratas expuestas a lesión del nervio ciático ( $n=14$ ) o simulación (*sham*) ( $n=14$ ) tratadas con LNA-miR-30c inhibidor ( $n=14$ ) o vehículo ( $n=14$ ). \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$  vs. LNA-miR-30c inhibidor; \$ $p<0,05$ , \$\$ $p<0,01$  vs. sham Prueba Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

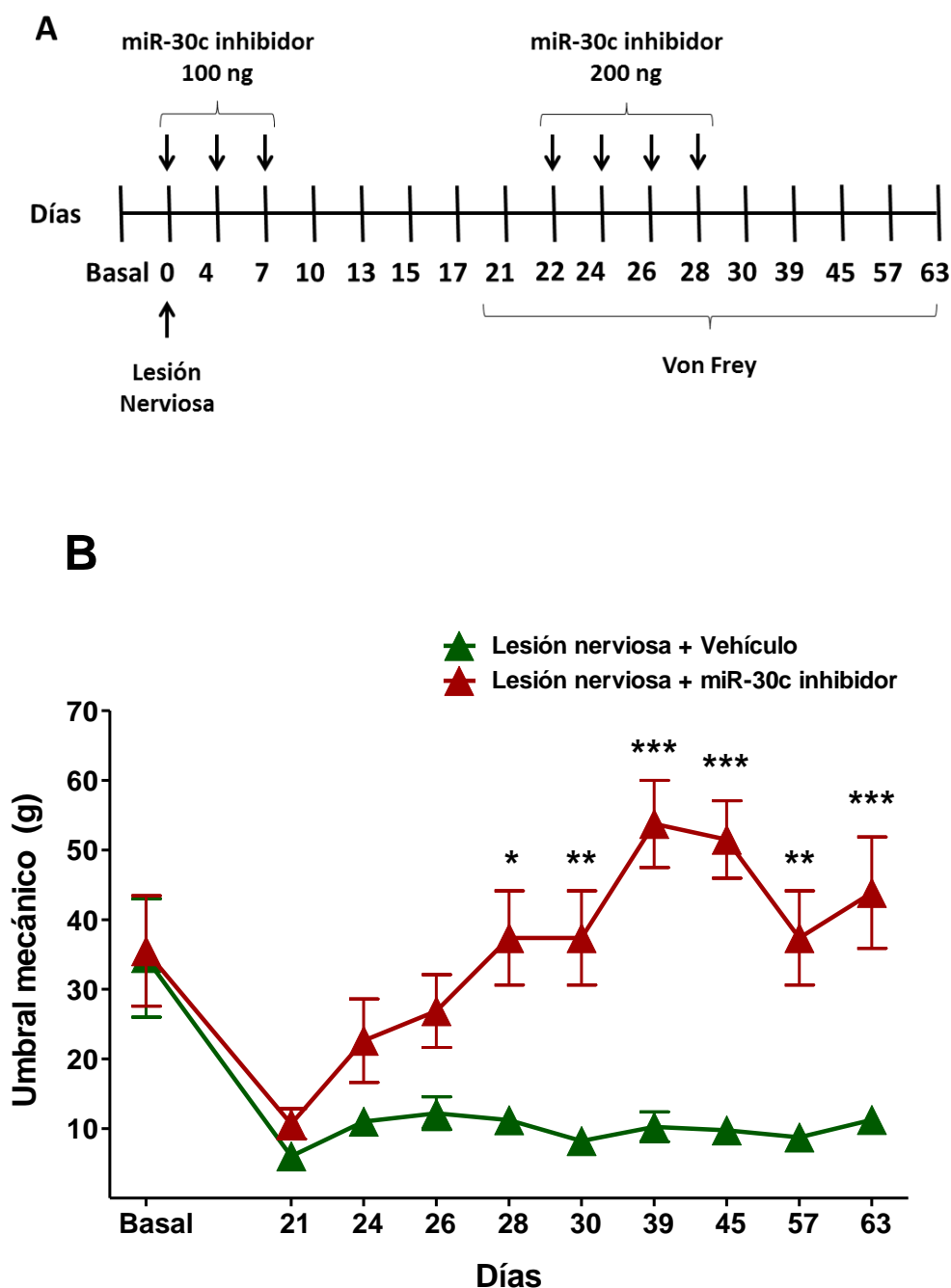


**Figura 16. Desarrollo de alodinia mecánica en animales sometidos a lesión nerviosa tratados con vehículo o LNA-miR-30c inhibidor.** Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocada mediante estímulos con monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. Curva fuerza-respuesta obtenida en el test de von Frey transcurridos 7 (A), 17 (B) y 21 días (C) tras la lesión del nervio ciático en ratas tratadas con LNA-miR-30c inhibidor (n=9) o vehículo (n=8). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. Lesión nerviosa + LNA-miR-30c inhibidor. Prueba Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

Para evaluar si el tratamiento con LNA-miR-30c inhibidor podía revertir la alodinia desarrollada a los 21 días tras el inicio del primer ciclo de tratamiento, las ratas recibieron un segundo ciclo de 4 inyecciones en la cisterna Magna de LNA-miR-30c inhibidor (200ng/10 $\mu$ l) o de vehículo los días 22, 24, 26 y 28 tras la lesión nerviosa. Se valoró la respuesta de la pata ipsilateral a estímulos mecánicos mediante el test de von Frey. Los animales tratados con LNA-miR-30c inhibidor mostraron un incremento progresivo y significativo en el umbral de retirada de la pata, que comenzó transcurridas 24h desde la primera inyección y se mantuvo durante un periodo máximo de seguimiento de dos meses

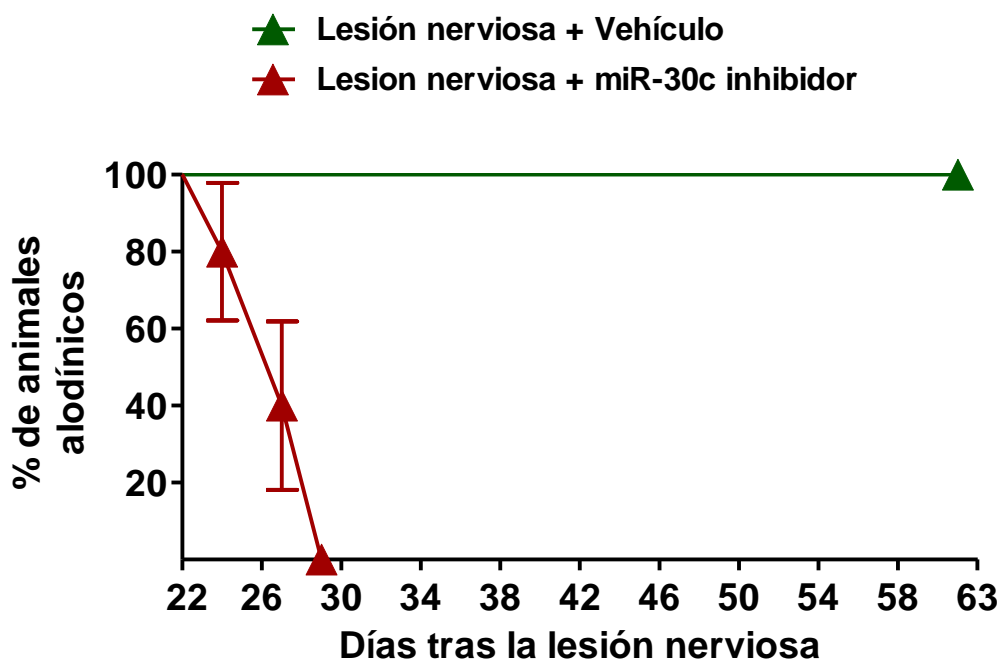
## Resultados

("tratamiento":  $F_{(1,88)}=32,99$ ;  $p<0,001$ , "tiempo":  $F_{(8,88)}=4,38$ ,  $p<0,001$ ; "tiempo x tratamiento":  $F_{(8,88)}=3,70$ ,  $p<0,001$ , **Figura 17**).



**Figura 17. Evolución de la alodinia mecánica en animales sometidos a lesión nerviosa tratados con vehículo o con LNA-miR-30c inhibidor.** Se representa un esquema del protocolo experimental (A) y la evolución temporal del umbral de respuesta a estímulos mecánicos, valorada mediante el test de von Frey (B) en ratas expuestas a lesión del nervio ciático, tratadas con LNA-miR-30c inhibidor ( $n=8$ ) o vehículo ( $n=8$ ). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , vs. Vehículo. Prueba Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

Como se observa en la **figura 18**, todos los animales sometidos a lesión del nervio ciático, tratados o no con un primer ciclo de LNA-miR-30c inhibidor, presentaron alodinia mecánica transcurridos 22 días de la lesión. Los animales tratados con un segundo ciclo de vehículo permanecieron alodínicos 40 días después, es decir 63 días tras la lesión ciática. Por el contrario, la administración de un segundo ciclo de LNA-miR-30c inhibidor revirtió la alodinia en un 20% de los animales ya tras la primera dosis, y el 100% de los animales estaban libres de alodinia tras la 4ª dosis del inhibidor. Todos los animales tratados con un segundo ciclo de miR-30c se mantuvieron libres de alodinia durante los 40 días de seguimiento ulterior ( $\chi^2=9,039$ ,  $p<0,01$ ; **Figura 18**).



**Figura 18.** Curvas de Kaplan Meier del porcentaje de animales expuestos a lesión del nervio ciático que presentan alodinia mecánica tras el inicio del segundo ciclo de tratamiento con LNA-miR-30c inhibidor o vehículo. miR-30c se administró por vía intracisternal los días 22, 24, 26 y 28 después de la lesión nerviosa. Regresión de Cox  $p<0.01$ .

Los resultados indican que cuando los animales tratados con un primer ciclo de LNA-miR-30c inhibidor desarrollan alodinia, un segundo ciclo de tratamiento con LNA-miR-30c inhibidor consiguió revertir completamente la alodinia en el 100% de los animales durante, al menos, 40 días desde comenzado el segundo ciclo de tratamiento.

## Resultados

---

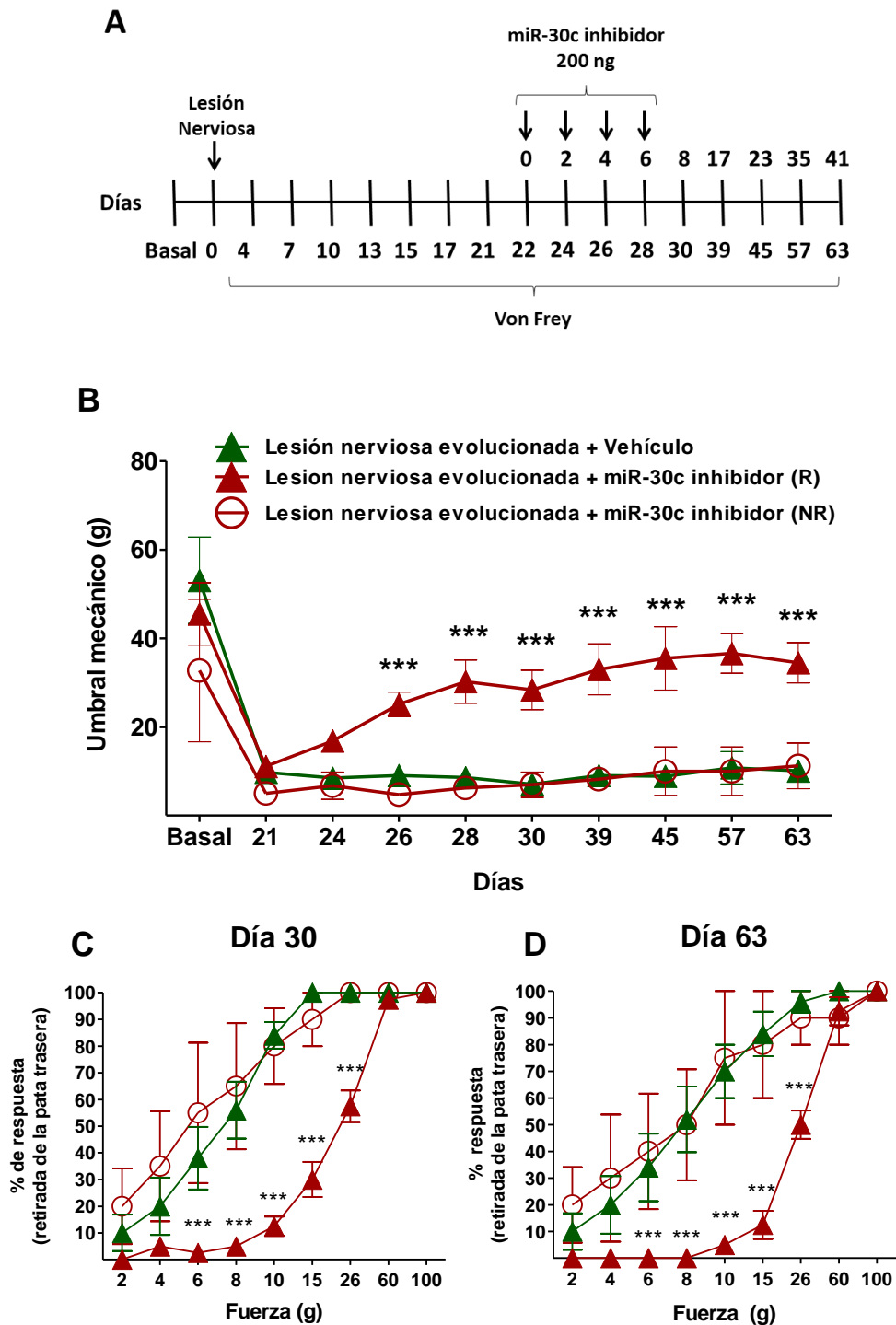
### 1.2.2. La administración tardía de LNA-miR-30c inhibidor revierte la alodinia mecánica previamente establecida en un modelo de lesión del nervio ciático en ratas

En base a estos resultados, quisimos evaluar si un único ciclo de miR-30c era capaz de revertir una alodinia evolucionada en el tiempo. Para ello, un grupo de ratas fue sometido a lesión nerviosa del ciático y mantenido durante 3 semanas sin tratamiento. El día 22 tras la lesión, cuando todas las ratas habían desarrollado un grado de alodinia máximo (“fuerza”:  $F_{(10,210)}=210,6$ ,  $p<0,001$ ; “tratamiento”:  $F_{(2,21)}=20,25$ ,  $p<0,001$  y “tratamiento x fuerza”:  $F_{(20,210)}=11,25$ ,  $p<0,001$ , un grupo de ratas fue tratado con LNA-miR-30c inhibidor (200ng/10 $\mu$ l) los días 22, 24, 26 y 28 tras la cirugía o con vehículo (secuencia desordenada de mRNA), siguiendo el mismo protocolo experimental.

Un grupo de animales tratado con LNA-miR-30c inhibidor (70 %) (N=8) revirtió completamente la alodinia mecánica comparado con el grupo tratado con vehículo (“tratamiento”:  $F_{(2,19)}=17,56$ ,  $p<0,001$ ; “tiempo”:  $F_{(8,152)}=6,88$ ,  $p<0,001$ ; “tiempo x tratamiento”:  $F_{(16,152)}=4,88$ ,  $p<0,001$  **Figura 19B**). Sin embargo, otro grupo de ratas (30%) (N=4) no respondió tras la administración de las cuatro dosis de LNA-miR-30c inhibidor.

Como se muestra en las curva fuerza-respuesta, transcurridos 30 días desde la lesión nerviosa del nervio ciático y 8 desde el inicio del tratamiento, las ratas tratadas con LNA-miR-30c inhibidor respondedoras mostraron un descenso significativo en el porcentaje de respuestas evocadas tras la estimulación con monofilamentos de von Frey de intensidades crecientes comparado con el grupo de animales tratados con vehículo (“tratamiento”  $F_{(2,152)}=15,96$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza”  $F_{(8,152)}=81,96$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza x tratamiento”  $F_{(16,152)}=7,33$ ,  $p<0,001$  **Figura 19C**). Esta ausencia del alodinia mecánica se mantuvo hasta transcurridos 63 días desde la lesión nerviosa (“tratamiento”:  $F_{(2,152)}=9,97$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza”  $F_{(8,152)}=66,74$ ,  $p<0,001$ ; “fuerza x tratamiento”  $F_{(8,152)}=5,63$ ,  $p<0,001$  **Figura 19D**).

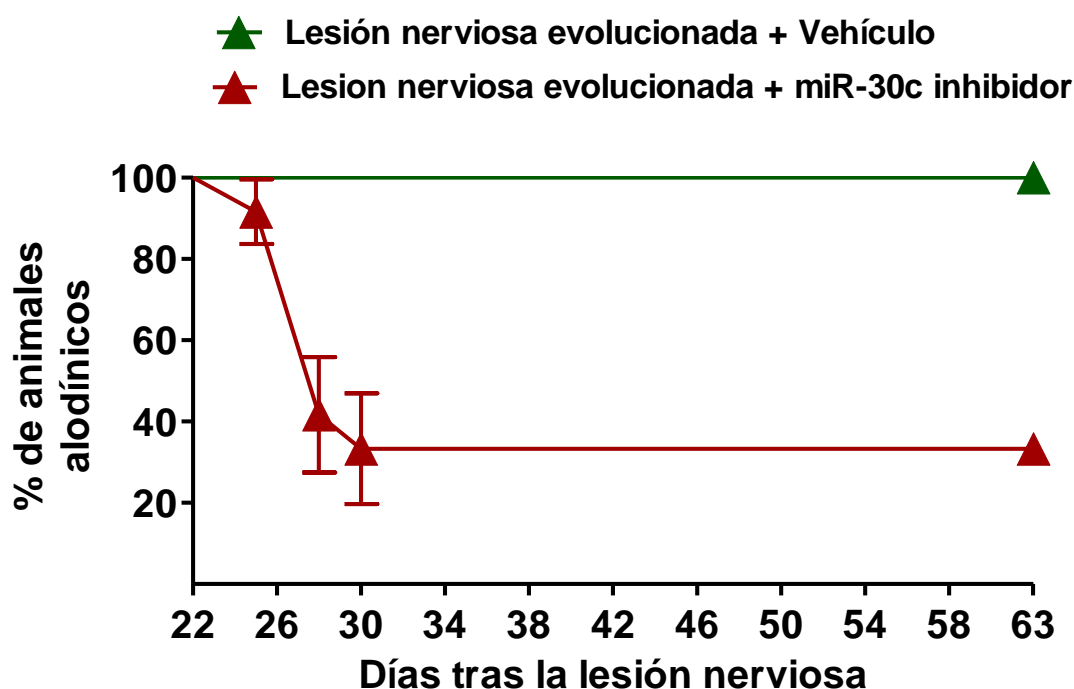




**Figura 19. Efecto del tratamiento con LNA-miR-30c inhibidor en ratas con alodinia establecida tras la lesión del nervio ciático.** Protocolo experimental (A) y evolución temporal del umbral nocifensivo frente a estímulos mecánicos (B) en ratas sometidas a lesión del nervio ciático. Las ratas tratadas con vehículo (n=10) se representan en triángulos verdes. Las ratas que respondieron al tratamiento (R; n=8) se muestran en triángulos rojos. Las ratas que no respondieron al tratamiento (NR; n=4) se muestran en círculos blancos. Se muestra en detalle la curva de respuesta a los filamentos del test de von Frey el día que se alcanza la respuesta máxima (C) y el día en que finaliza el seguimiento (D). \*\*\* $p < 0,001$  vs vehículo. Prueba de Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

## Resultados

En el grupo de animales sometidos a lesión nerviosa, dejados evolucionar durante 3 semanas y tratados con miR-30c inhibidor, un 10% de los animales revirtieron la alodinia mecánica a las 48 horas de iniciado el tratamiento y a los 8 días se había revertido la alodinia en el 67% (N=8) de los animales. Sin embargo, en un 33% (N=4) de los animales (no respondedores) la alodinia persistió todo el periodo de seguimiento (40 días). Las ratas sometidas a lesión nerviosa tratadas con vehículo se mostraron alodínicas a lo largo de todo el periodo de seguimiento estudiado ( $\chi^2=9,62$ ,  $p<0,01$  **Figura 20**).



**Figura 20.** Curvas de Kaplan Meier del porcentaje de animales expuestos a lesión del nervio ciático que presentan alodinia mecánica tras el inicio del tratamiento con LNA-miR-30c inhibidor o vehículo. miR-30c se administró por vía intracisternal los días 22, 24, 26 y 28 después de la lesión nerviosa. Regresión de Cox  $p<0,01$ .

Es decir, en los animales tratados con un único ciclo de LNA-miR-30c inhibidor cuando han desarrollado alodinia mecánica durante un periodo prolongado (3 semanas) solo en el 70% de los animales la alodinia es completamente revertida, permaneciendo las ratas sin dolor neuropático durante al menos 40 días desde comenzado el segundo ciclo de tratamiento. Sin embargo, el 30% de las ratas tratadas con el LNA-miR-30c inhibidor, no muestran ningún signo de mejoría durante todo el periodo de seguimiento, siendo su alodinia mecánica similar a las ratas tratadas con vehículo.

### 2. Estudio en pacientes

#### 2.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes

Una vez demostrados en el animal de experimentación la contribución de miR-30c al desarrollo de dolor neuropático y la relación entre sus niveles circulantes en plasma y LCR con la severidad de la alodinia desarrollada, nuestro siguiente objetivo fue valorar la potencial traslación de los resultados experimentales a la clínica. Para ello se reclutaron 25 pacientes con isquemia crónica severa de las extremidades, diagnosticados de dolor crónico (>4 meses) con características semiológicas neuropáticas determinadas mediante el cuestionario DN4 (puntuación >3). Como controles se incluyeron 9 pacientes sin dolor con isquemia severa de las extremidades inferiores y 25 pacientes sin dolor y sin isquemia. Ninguno de los pacientes control tomaba fármacos antidepresivos ni antiepilépticos, dos tomaban AINE y uno tomaba opioide. En cuanto al grupo con dolor neuropático, los fármacos prescritos eran AINEs (n=24), opioides (n=20), aticonvulsivantes (n=7) y antidepresivos tricíclicos (n=1). Existieron diferencias entre el grupo sin dolor y con dolor en la edad (t=2,90; p=0,005), sexo ( $\chi^2=4,88$ ; p=0,027) y prevalencia de diabetes ( $\chi^2= 6,26$ , p=0,012). La isquemia arterial estuvo presente en el 100% de los pacientes con dolor, por ser un criterio de selección, y en el 26% de los controles. Las características demográficas y clínicas de los sujetos de estudio se recogen en la **Tabla 6**.

## Resultados

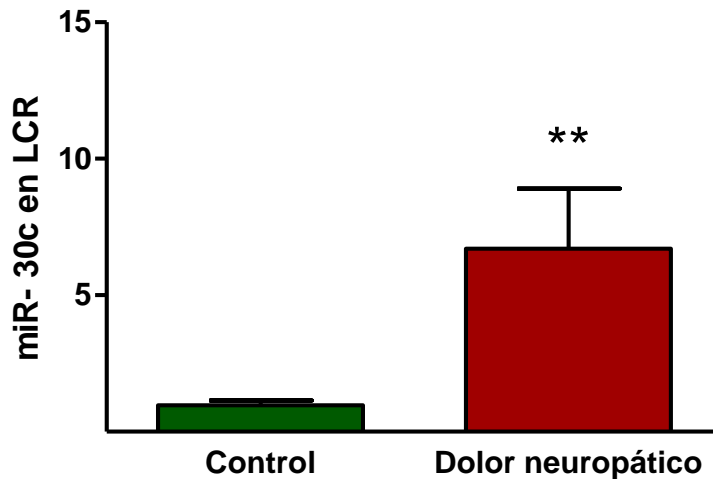
**Tabla 6. Características demográficas y clínicas de los pacientes.** Distribución de los grupos de estudio por edad, sexo y presencia de diabetes mellitus, hipertensión arterial y obesidad.

		Cohorte completa (n=59)	Dolor (n=25)	No dolor (n=34)
<b>Edad (media±SEM)**</b>		71,2±1,3	75,4±2,01	68,03±1,59
<b>Isquemia</b>		34 (58%)	25 (100%)	9 (26%)
<b>Sexo*</b>	hombre	42 (70%)	14 (56%)	28 (82%)
	mujer	17 (30%)	11 (44%)	6 (18%)
<b>Diabetes*</b>	no	43 (73%)	14 (56%)	29 (84%)
	si	16 (27%)	11 (44%)	5 (14%)
<b>Hipertensión arterial</b>	no	15 (25%)	6 (24%)	9 (26%)
	si	44 (74%)	19 (76%)	25 (74%)
<b>Obesidad</b>	no	30 (51%)	13 (52%)	17 (50%)
	si	29 (49%)	12 (48%)	17 (50%)

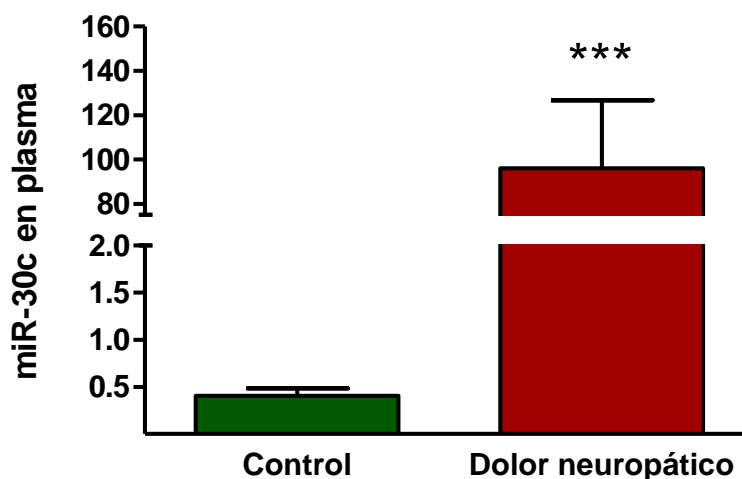
Los test estadísticos para comparar las variables entre los grupos control y dolor fueron t de Student para edad y Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) para sexo, diabetes, HTA y obesidad (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

### 2.2. Incremento de niveles circulantes de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y en plasma en pacientes que padecen dolor neuropático vs. pacientes libres de dolor

Los pacientes con dolor neuropático mostraron niveles circulantes de miR-30c en plasma y LCR significativamente superiores que los pacientes control (**Figuras 21 y 22**). Los niveles de miR-30c en LCR fueron 6,9 veces superiores (t=3,02, p<0,01) en los pacientes con dolor neuropático [6,70±2,20 UR; (n=25)] que en los pacientes libres de dolor [0,97±0,1 UR; (n=34)]. En plasma, la expresión promedio de miR-30c fue 234 veces superior (t=3,6, p<0,001) en los pacientes con dolor neuropático (96,04±30,6 UR) que en los controles (0,41±0,08 UR).



**Figura 21. Niveles circulantes de miR30c en LCR en pacientes con dolor neuropático y en pacientes control sin dolor.** El gráfico representa los niveles de expresión relativa de miR-30c en líquido cefalorraquídeo de pacientes con dolor neuropático (n=25) vs. pacientes sin dolor (n=34). \*\*p<0,01; t de Student para grupos independientes.



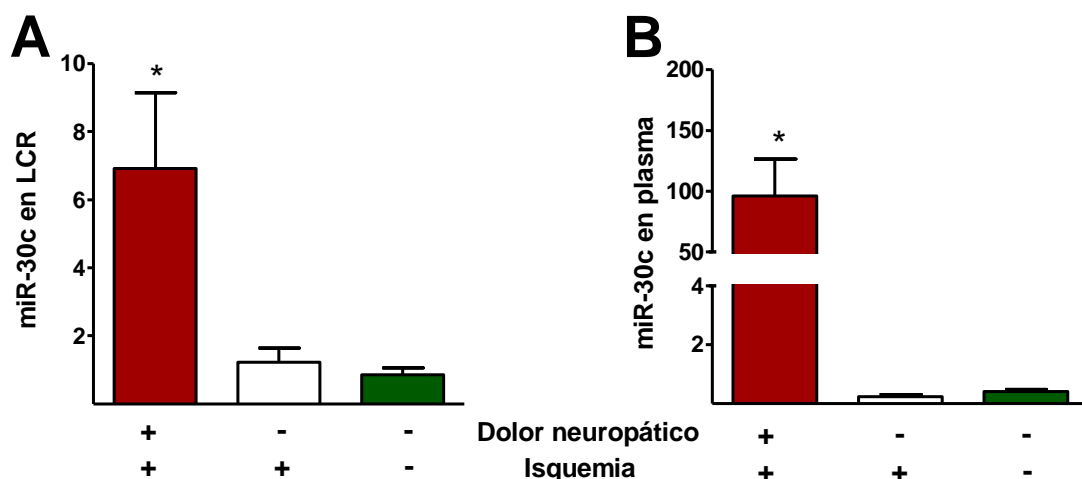
**Figura 22. Niveles circulantes de miR30c en plasma en pacientes con dolor neuropático y en pacientes control sin dolor.** El gráfico representa los niveles de expresión relativa de miR-30c en plasma de pacientes con dolor neuropático (n=25) vs. pacientes sin dolor (n=34). \*\*p<0,01; t de Student para grupos independientes.

### 2.3. Ausencia de Influencia de la isquemia arterial en los niveles circulantes de miR-30c

Puesto que, a diferencia de los pacientes neuropáticos, no todos los pacientes control padecían isquemia arterial, se valoró el posible efecto de confusión sobre los niveles de miR-30c relacionado con la presencia o no de isquemia. Para ello, se compararon por separado los niveles circulantes de

## Resultados

miR-30c de los pacientes con dolor (n=25) con los de los pacientes control sin dolor y con isquemia (n=9) y con los de los pacientes control sin dolor y sin isquemia (n=25). Los pacientes con dolor presentaron niveles circulantes de miR-30c superiores a los de ambos grupos de pacientes control, tanto en plasma ( $F_{(2,57)}=8,172$ ,  $p<0,01$ ) como en LCR ( $F_{(2,57)}=4,481$ ,  $p<0,05$ ). No se observaron diferencias significativas en los niveles circulantes de miR-30c entre los controles con y sin isquemia **Figura 23A y B**). Podemos concluir que la presencia de dolor neuropático se asoció con un incremento en la expresión de miR-30c tanto en plasma como en LCR. Por el contrario, el factor isquemia no se relacionó con cambios en la expresión de miR-30c en ninguno de los dos fluidos.

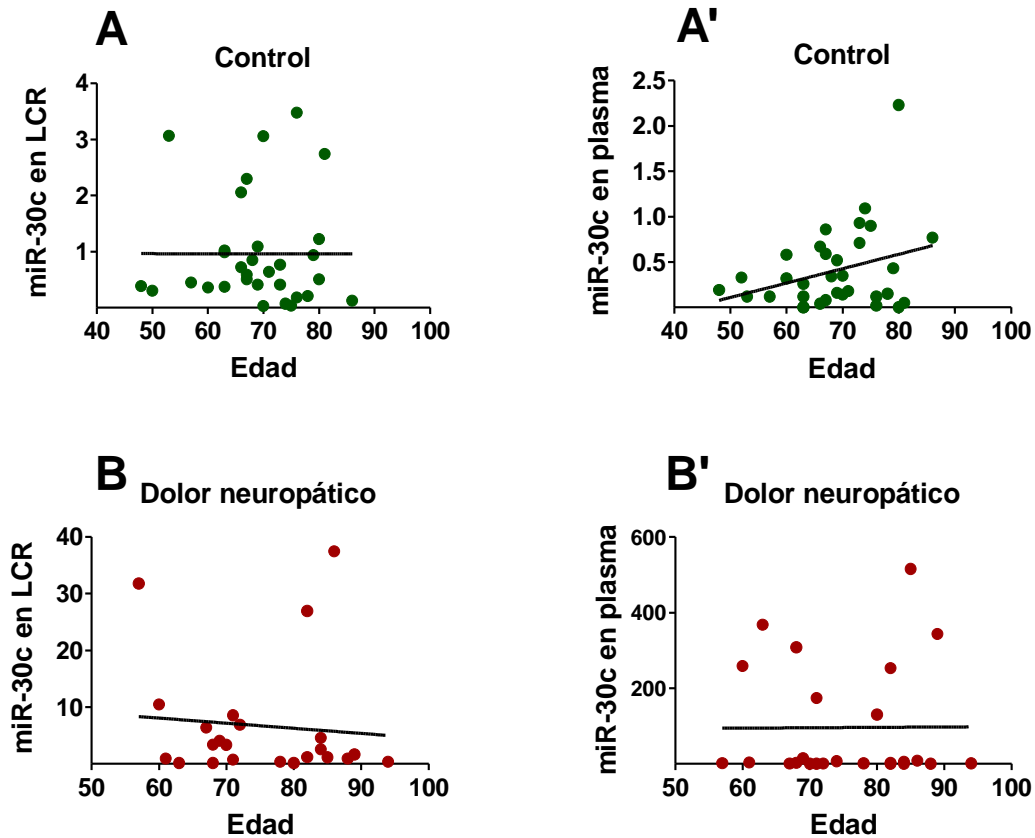


**Figura 23. Niveles circulantes de miR-30c en LCR y en plasma en pacientes con dolor neuropático y en pacientes control sin dolor, isquémicos o no.** El gráfico representa la expresión relativa de miR-30c en líquido cefalorraquídeo (LCR) (**A**) y plasma (**B**) en pacientes con dolor neuropático e isquemia arterial (rojo, n=25), pacientes sin dolor con isquemia (blanco, n=9) y pacientes sin isquemia ni dolor (verde, n=25). \* $p<0,05$ , Prueba Bonferroni tras ANOVA.

### 2.4. Ausencia de Influencia de edad, sexo y diabetes en los niveles circulantes de miR-30c

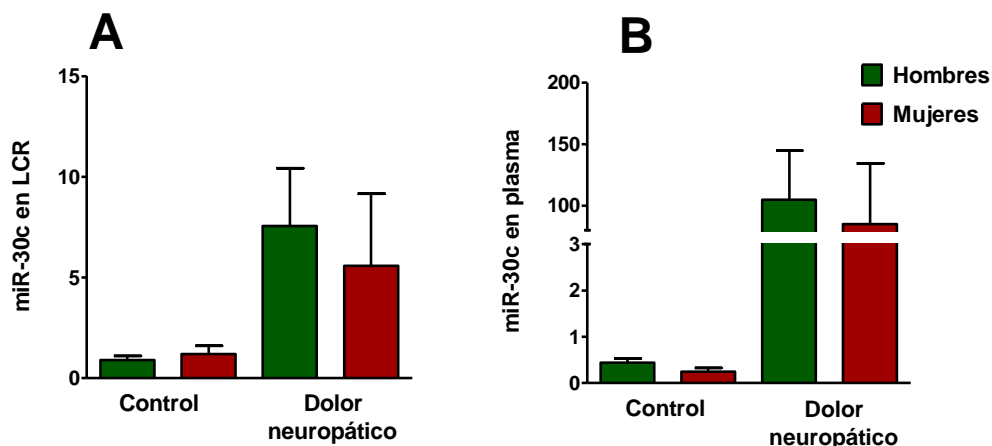
Puesto que existieron diferencias significativas en edad, sexo y diabetes entre los grupos de estudio, se procedió a valorar la posible influencia de dichas variables en la expresión de miR-30c. El efecto de la edad fue valorado mediante análisis de regresión lineal y correlación entre edad y niveles de

expresión de miR-30c en LCR y en plasma (**Figura 24**). No se observó relación significativa entre edad y expresión de miR-30c ni en LCR ni en plasma, en ninguno de los grupos de pacientes.



**Figura 24. Rectas de regresión de los niveles de expresión de miR-30c circulante en relación con la edad.** Los gráficos representan la relación entre la edad y la expresión relativa de miR-30c en líquido cefalorraquídeo (LCR) y en plasma en la cohorte de pacientes control (**A** y **A'**) y en la cohorte con dolor neuropático (**B** y **B'**). No hubo significación estadística en ninguno de los coeficientes de correlación de Pearson.

La influencia del factor sexo en la expresión de miR-30c se evaluó comparando por separado, en función del sexo, los niveles circulantes de miR-30c de los pacientes neuropáticos y controles (**Figura 25**). No se hallaron diferencias relacionadas con el factor sexo en la expresión de miR-30c ni en LCR ni en plasma, en ninguno de los grupos.



**Figura 25. Expresión de miR-30c circulante en función del sexo.** Los gráficos representan los valores de expresión relativa de miR-30c en líquido cefalorraquídeo (LCR) (A) y en plasma (B) de hombres y mujeres en la cohorte control y en la de pacientes con dolor neuropático. No hubo diferencias entre hombres y mujeres en ninguno de los grupos (*t* de Student para muestras independientes).

### 2.5. Valor de los niveles circulantes de miR 30c en plasma y en líquido cefalorraquídeo como biomarcadores de dolor neuropático

Una vez validada la regulación de miR-30c en biofluidos de pacientes con dolor neuropático, decidimos estudiar el posible valor de los niveles circulantes de miR-30c como biomarcadores de presencia de dolor neuropático, así como identificar el tipo de muestra más adecuado para hacer las determinaciones.

En primer lugar, se determinó en cuál de los dos fluidos miR-30c muestra niveles aumentados de forma consistente en pacientes neuropáticos. Se consideró nivel anormalmente elevado aquel que superó el percentil 95 respecto al valor de los pacientes control. Este nivel de corte correspondió en plasma a 1,60 UR y en LCR a 3,26 UR. En los pacientes con dolor neuropático, el fluido donde se detectaron niveles elevados de miR-30c con mayor frecuencia fue el plasma, donde la elevación se produjo en 17 de los 24 pacientes con dolor (68%). En el caso del LCR se observaron niveles elevados de miR-30c en 12 de los 24 casos (48%). miR-30c no se elevó en ningún fluido en 5 de los pacientes neuropáticos (20%).





## Resultados

Tabla 7. Modelos predictivos, bondad de ajuste y capacidad predictiva según curva ROC y criterio de información de Akaike (AIC).

Variables	Hosmer-Lemeshow		Área bajo la curva ROC (AUC)	AIC
	$\chi^2$	$p$		
miR-30c en LCR	14,429	0,071	0,736±0,147 $p<0,01$	70,70
miR-30c en LCR + edad	9,808	0,279	0,677±0,157 $p<0,05$	62,95
miR-30c en LCR + edad + diabetes	10,086	0,259	0,770±0,136 $p<0,01$	58,38
miR-30c en plasma	21,917	0,003	0,857±0,103 $p<0,001$	66,93
miR-30c en plasma + edad	7,689	0,361	0,828±0,134 $p<0,001$	52,60
miR-30c en plasma + edad + diabetes	4,601	0,709	0,904±0,196 $p<0,001$	50,25
miR-30c en plasma + miR-30c en LCR	30,42	<0,001	0,945 (0,885-1) $p<0,001$	59,11
miR-30c en plasma + miR-30c en LCR + edad	8,41	0,394	0,903±0,066 $p<0,001$	34,546
miR-30c en plasma + miR-30c en LCR + edad + diabetes	7,573	0,476	0,941 (0,871-1) $p<0,001$	31,36

En sombreado se muestran los mejores modelos predictivos con cada uno de los fluidos biológicos.

Se elaboraron las ecuaciones predictivas de probabilidad de padecer dolor neuropático utilizando los parámetros obtenidos en la regresión logística de los tres modelos más representativos (tabla 8), basándose en los niveles circulantes de miR-30c en:

$$(i) \text{ LCR } p = \frac{1}{1+e^{(0.021Xedad)-(0.45X30c \text{ en LCR})-5,298 \text{ si diabetes}}}$$

$$(ii) \text{ Plasma } p = \frac{1}{1+e^{(0.034Xedad)-(1.458X30c \text{ en plasma})-1.646 \text{ si diabetes}}}$$

$$(iii) \text{ LCR y plasma } p = \frac{1}{1+e^{(0.054Xedad)-(1.617X30c \text{ en plasma})-(0.706X30c \text{ en LCR})-2.086 \text{ si diabetes}}}$$

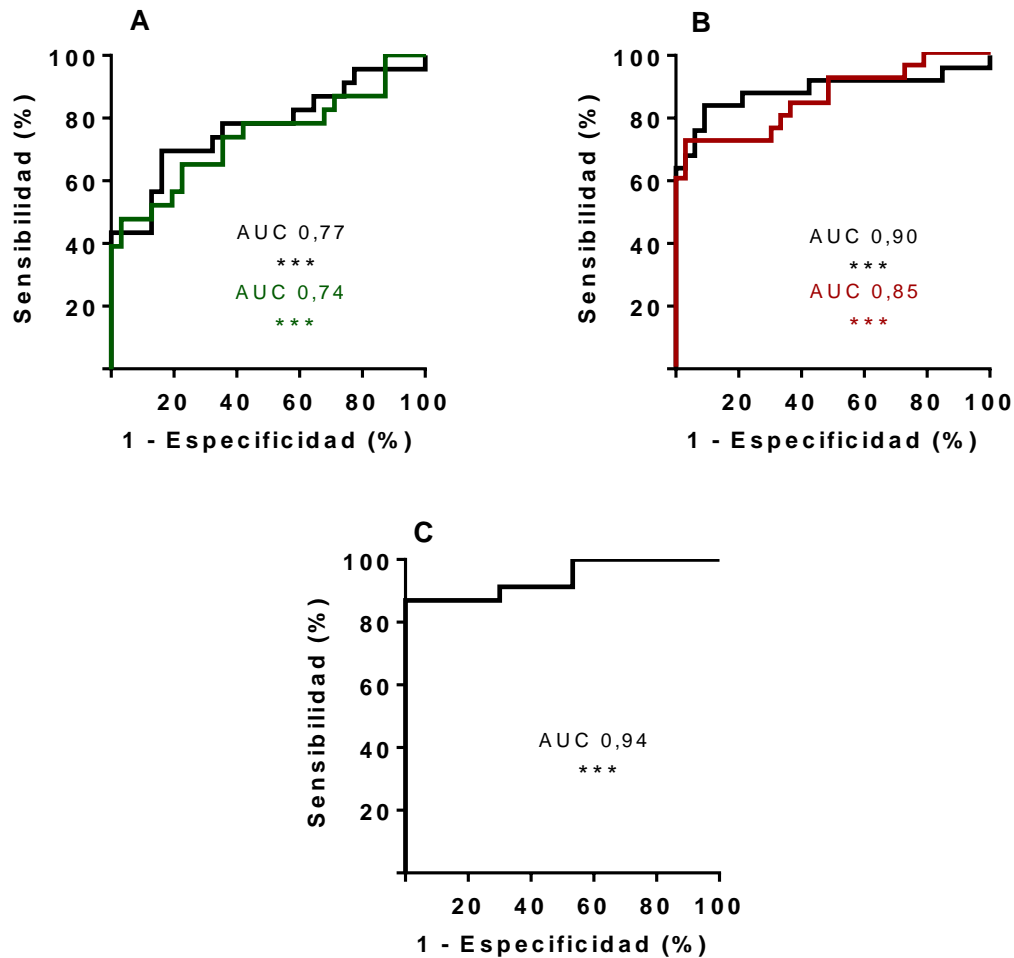
En conjunto, nuestros resultados en pacientes indican que el incremento en los niveles circulantes de miR-30c, tanto en LCR como en plasma, aumenta la probabilidad de que el paciente esté afectado por la condición dolor neuropático. Los modelos predictivos que incluyeron como variable independiente los niveles de miR-30c en plasma mostraron sensibilidades y especificidades superiores a los modelos que incluyeron los niveles en LCR (**Tabla 7 y Figura 27**). Las curvas ROC (**Figura 27**) ponen de manifiesto que el modelo con mayor área bajo la curva (AUC), sensibilidad (S) y especificidad (E) en el diagnóstico de dolor neuropático es aquel en el que se combinaron los niveles circulantes de miR-30c tanto en plasma como en LCR, junto con la edad y la diabetes mellitus AUC=0,941(0,871-1); S=87,3; E=96,7.

**Tabla 8. Regresión logística de los tres modelos seleccionados.**

Variables	B	Wald (p)	OR	95% I.C. para OR	
				Inferior	Superior
miR-30c en LCR	0,450	0,039	1,568	1,024	2,401
edad	-0,021	0,002	0,979	0,966	0,993
diabetes	1,667	0,023	5,298	1,253	22,394
miR-30c en plasma	1,458	0,015	4,298	1,326	13,930
edad	-0,032	0,001	0,968	0,951	0,986
diabetes	1,646	0,041	5,188	1,073	25,079
miR-30c en plasma	1,617	0,054	5,037	0,969	26,165
miR-30c en LCR	2,086	0,046	8,056	1,038	62,502
edad	-0,054	0,001	0,947	0,918	0,977
diabetes	0,706	0,041	2,026	1,029	3,985

OR: Odds ratio. IC: intervalos de confianza.

## Resultados



**Figura 27. Curvas ROC (receiver operating characteristic) de los modelos predictores de la condición dolor neuropático.** Los modelos en negro incluyen las variables edad, diabetes mellitus y niveles circulantes de miR-30c en líquido cefalorraquídeo (LCR) (A), en plasma (B), y en LCR y plasma (C). En verde se muestra la curva ROC obtenida cuando miR-30c en LCR es utilizado como única variable independiente. En rojo se muestra la curva ROC obtenida cuando miR-30c en plasma es utilizado como única variable independiente. AUC= área bajo la curva. \*\*\* $p < 0,001$ .

**Discusión**

---



El dolor neuropático tiene su origen en un daño o enfermedad que afecta al sistema nervioso somato-sensorial, periférico o central (IASP). Su etiología es muy variada y puede aparecer en el contexto de traumatismos, isquemia, neurotóxicos, enfermedades metabólicas, autoinmunes, infecciosas, procesos tumorales, etc. Tras la curación de una lesión nerviosa, algunos individuos desarrollan un síndrome doloroso extraordinariamente incapacitante por su intensidad y refractariedad a los tratamientos, que se mantiene de forma persistente durante meses o incluso años (Cerveró y cols., 2009, Baron y cols., 2010). La prevalencia de dolor neuropático es difícil de determinar por la multiplicidad de etiologías que lo provocan y porque frecuentemente está recogido en el contexto de cuadros dolorosos mixtos (lumbalgia crónica, tumores, isquemia, etc.), en los que el componente neuropático por daño neural se asocia a un componente nociceptivo (Van Hecke y cols. 2014). En general, se considera una prevalencia del 7-8% en la población general y del 20-25% en los pacientes con dolor crónico (Bouhassira y cols., 2008).

### **Tratamiento del dolor neuropático: necesidad de nuevas dianas.**

El dolor neuropático constituye uno de los procesos dolorosos más difíciles de tratar (Gilron y cols. 2015; Finnerup y cols. 2015). Estamos lejos de lograr un alivio adecuado, en parte porque el éxito es mayor cuanto antes se instaure el tratamiento y el dolor neuropático constituye una patología de evolución insidiosa y frecuentemente diagnosticada con mucho retraso. Además, no responde a los analgésicos convencionales y solo lo hace parcialmente a algunos fármacos antidepresivos, antiepilépticos, anestésicos locales y opioides mayores (Gilron y cols. 2015). Todos estos tratamientos son empíricos o sintomáticos, y carecemos de abordajes terapéuticos basados en paradigmas etiopatogénicos (Finnerup y cols. 2015). El principal factor que ha penalizado el desarrollo de nuevas moléculas eficaces para la prevención y/o el alivio del dolor neuropático es nuestro escaso conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la hipersensibilización del sistema nervioso, que aboca a la perpetuación del dolor disestésico solamente en algunos individuos. La mayoría de los avances en este ámbito derivan de estudios en modelos experimentales de dolor neuropático en animales que nos han desvelado mecanismos importantes relacionados con la

## Discusión

---

hipersensibilización del sistema nervioso central y periférico, que contribuyen al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (Burma y cols., 2016).

### RESULTADOS EN EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

#### miR-30c: candidato a diana terapéutica

Los miRNAs son RNAs pequeños (20-25 nucleótidos) no codificantes que regulan la expresión de numerosos genes a través de su hibridación específica con secuencias localizadas en la región 3'UTR de los RNAm diana. La consecuencia de esta unión es la degradación del mensajero o el bloqueo de su traducción a proteína (Bartel, 2009). La unión del miRNA con el RNAm no requiere una complementariedad estricta, lo que condiciona que cientos de mensajeros puedan ser regulados por un mismo miRNA. Correspondientemente, cada mensajero es diana de numerosos miRNAs. (Hayden, 2008). Aunque el efecto individual de cada miRNA sobre su diana es pequeño, los efectos combinados dan lugar a importantes consecuencias fenotípicas. El elevado grado de conservación entre especies (desde plantas a vertebrados) de numerosos miRNAs pone de manifiesto su importancia evolutiva como moduladores de vías y procesos biológicos críticos (Gurtan y Sharp, 2013). Los miRNAs desempeñan papeles reguladores integrales de numerosas funciones biológicas durante el desarrollo y en la edad adulta (McNeill y Van Vactor, 2012). Además, no son pocos los miRNAs cuya expresión aparece alterada, a la alza o a la baja, en asociación con entidades patológicas que afectan, virtualmente, a todos los órganos y sistemas (Mendell y Olson, 2012).

Cada vez cobra más fuerza que la desregulación de miRNAs juega un papel patogénico relevante en el dolor patológico (Lötsch y Niederberger, 2015). Tal y como se detalla en el apartado Estado Actual, un número creciente de estudios en modelos animales muestran expresiones aberrantes de miRNAs en estructuras neurales en relación con el desarrollo de dolor neuropático (Fabreux y cols., 2011; Imai y cols., 2011; Strickland y cols., 2011; Kusuda y cols., 2011; Branderburger y cols., 2012; Genda y cols., 2013; Li y cols., 2013; Arai y cols., 2013; Hori y cols., 2013; Li y cols., 2014; Norcini y cols., 2014; Chen y cols., 2014; Tan y cols., 2015; Wang y cols., 2015; Zhang y cols., 2015; Gong y cols., 2015; Leinders y cols., 2016; Li y Zhao, 2016; Xia y cols., 2016;



Shao y cols., 2016; Sun y cols., 2017; Ito y cols., 2017; Chang y cols., 2017). Aunque mucho más escasos, los estudios llevados a cabo en pacientes también ponen en evidencia la existencia de miRNAs desregulados en plasma, en células inflamatorias de sangre periférica o en biopsias de piel y nervios periféricos, en relación con la presencia de dolor neuropático de etiología variada como la fibromialgia (Bjersin y cols., 2013; Cerdá-Olmedo y cols., 2015; Leinders y cols., 2016; Massotti y cols., 2016), las neuropatías dolorosas de diferentes etiologías (Leinders y Üçeyler, 2016; Huang y cols., 2017), o el síndrome de dolor regional complejo (Orlova y cols., 2011; McDonald y cols., 2014; Douglas y cols., 2015; Shenoda y cols., 2016).

Experimentos previos llevados a cabo en el laboratorio de la Profesora Hurlé (Velategui, 2015) pusieron de manifiesto en ratas y ratones sometidos a lesión del nervio ciático una sobreexpresión de miR-30c en estructuras íntimamente relacionadas con la percepción del dolor, como son el asta dorsal de la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal, en relación con el desarrollo de alodinia mecánica. Además, observaron que los niveles de expresión de miR-30c en el sistema nervioso se correlacionan de forma directa con el grado de alodinia desarrollado por los animales. Estos resultados sugieren fuertemente un papel relevante para miR-30c en el desarrollo de dolor neuropático, al menos en aquél inducido por la sección parcial de un nervio periférico.

En los últimos años se ha producido un importante despliegue de actividad para estudiar la posibilidad de utilizar los miRNAs como dianas terapéuticas (Christopher y cols., 2016). En la actualidad disponemos de herramientas para manipular la expresión de los miRNAs desregulados y elevar niveles patológicamente reducidos o reducir niveles anormalmente elevados. (Czech, 2006). El restablecimiento de niveles de miRNAs regulados a la baja se puede conseguir utilizando vectores virales o mediante transfección de miRNAs de doble cadena sintéticos, denominados miR-mimic. Por el contrario, los oligonucleótidos antisentido complementarios del miRNA diana permiten neutralizar niveles excesivos de un determinado miRNA. Entre los tipos de antimiRNA, para nuestro estudio hemos seleccionado un LNA (locked nucleic acid)-miR-30c-5p inhibidor. Los LNA-antimiRNAs están modificados mediante

## Discusión

---

un ácido nucleico bloqueado, lo que les confiere: (i) elevada afinidad por la secuencia diana, (ii) gran selectividad por su capacidad de discriminar entre ácidos nucleicos con un nucleótido de diferencia, (iii) gran estabilidad por su resistencia a exo y endonucleasas (Fluiter y cols., 2009).

Los resultados preliminares de nuestro laboratorio en ratas sugerían la utilidad de silenciar precozmente miR-30c mediante un LNA-miR30c inhibidor intracisternal para prevenir el desarrollo de hiperalgesia tras una lesión neural (Velategui, 2015). Sin embargo, ese estudio se centró en efectos a corto plazo (10 días) y no se analizaron aspectos tan relevantes como el curso temporal y estabilidad del efecto antialodínico, ni tampoco la capacidad del anti-miR para revertir el dolor neuropático ya instaurado. Nuestro primer objetivo fue, por tanto, establecer si la administración intracisternal precoz de LNA-miR-30c inhibidor es capaz de evitar completamente el desarrollo de dolor neuropático tras la lesión del nervio ciático. En nuestro estudio, las ratas lesionadas que no recibieron tratamiento experimentaron niveles máximos de alodinia mecánica en el test de von Frey a partir del 7º día, y la alodinia persistió sin cambios durante el periodo completo de seguimiento (63 días) en todos los animales. Nuestros resultados muestran que los animales sometidos un ciclo de tratamiento precoz con LNA-miR-30c inhibidor (3 inyecciones de 100 ng, administradas en el momento de la lesión y los días 4 y 7 post-lesión nerviosa) ejerció un efecto antialodínico transitorio. Así, el tratamiento retrasó la alodinia mecánica hasta los 21 días tras la lesión nerviosa pero, pasado este tiempo, todas las ratas desarrollaron alodinia mecánica de máxima intensidad. De cara a establecer o descartar el potencial valor preventivo de terapias dirigidas a neutralizar miR-30c en la clínica del dolor, son necesarios nuevos estudios para comprobar si podemos conseguir un efecto protector total utilizando dosis más elevadas o un tratamiento más prolongado.

Si bien los modelos experimentales de lesión neural provocan alodinia de larga duración en todos los animales (Decosterd y Woolf 2000), en la práctica clínica es imposible predecir cuáles son los pacientes que van a desarrollar neuropatía dolorosa tras una lesión o enfermedad del sistema nervioso. Resulta evidente que, en el ámbito clínico, sería más relevante una diana terapéutica que permitiera aliviar el dolor neuropático ya establecido y,

frecuentemente, de muy larga evolución (Colloca y cols., 2017). Por ello, nuestro siguiente objetivo fue valorar la capacidad del LNA-miR-30c inhibidor para revertir la alodinia ya instaurada en ratas sometidas a lesión del nervio ciático. Para ello, un grupo de ratas tratadas precozmente con un ciclo de LNA-miR-30c inhibidor se dejó evolucionar durante 21 días hasta que desarrollaron de nuevo alodinia. En estos animales, un segundo ciclo de tratamiento con dosis superiores de LNA-miR-30c inhibidor (4 inyecciones intracisternales de 200 ng, los días 22, 24, 26 y 28 post-lesión nerviosa) revirtió completamente la alodinia y todos los animales se mantuvieron libres de dolor durante las 6 semanas siguientes al segundo ciclo de tratamiento (hasta el día 63 de seguimiento post-lesión nerviosa). Este efecto antialodínico tan prolongado en el tiempo nos permite sugerir que la neutralización de miR-30c alivia el dolor neuropático en ratas, no por un efecto analgésico (tratamiento sintomático), sino modificando el curso de la enfermedad (tratamiento etiopatogénico). Esta proposición se ve apoyada por los resultados de Velategui (2015) que demuestran la ausencia de efecto antinociceptivo de LNA-miR-30c inhibidor en los test de dolor agudo en ratas.

En comparación con las ratas tratadas con dos ciclos de LNA-miR-30c inhibidor administrados precoz y tardíamente, las ratas neuropáticas que recibieron un solo ciclo tardío (a partir del día 21) del antimir ofrecieron resultados menos consistentes. Un 67% de las ratas (8 de 12) respondieron al tratamiento y normalizaron paulatinamente la nocicepción. Cabe destacar que ninguno de los animales respondedores desarrolló de nuevo alodinia durante las 6 semanas de seguimiento ulterior. Sin embargo, un 33% de las ratas (4 de 12) no respondieron en absoluto al tratamiento con LNA-miR-30c inhibidor administrado en un único ciclo tardío y se mantuvieron plenamente alodínicas durante todo el seguimiento (63 días). Para explicar nuestros hallazgos, podemos especular con la posibilidad de que los mecanismos desencadenantes del dolor neuropático dependientes de miR-30c se ponen en marcha en el momento de la lesión nerviosa y tienen un periodo de desarrollo durante el cual el tratamiento silenciador puede revertirlos. Sin embargo, con el tiempo la plasticidad patológica dependiente de miR-30c podría haberse completado, cobrando protagonismo en el proceso otros actores, y/o los

## Discusión

---

cambios podrían haber adquirido la condición de difícilmente reversibles. Ello podría justificar la incapacidad de LNA-miR30c inhibidor para revertir la alodinia en algunas ratas cuando se inició el tratamiento tardíamente. Por el contrario, ninguna de las ratas sometidas a lesión del nervio ciático que respondió al tratamiento con LNA-miR-30c inhibidor administrado desde el día 22 al 28 desarrolló nuevamente alodinia. Estos resultados señalan el primer mes tras la lesión como el periodo necesario para consolidarse la alodinia dependiente de miR-30c, en nuestro modelo de lesión nerviosa en la rata. Es probable que cualquier tratamiento futuro que incida sobre mecanismos patogénicos de producción del dolor neuropático tenga una ventana temporal de actuación limitada entre el inicio de la lesión y la consolidación de los cambios que la correspondiente diana terapéutica desencadena.

La capacidad de modificar el curso de la alodinia mecánica en el modelo animal mediante el tratamiento con un silenciador de miR-30c, deja patente su implicación en la neuropatía dolorosa por lesión nerviosa en el animal de experimentación. Con la cautela debida, nuestros resultados nos permiten sugerir el potencial terapéutico de herramientas farmacológicas dirigidas a silenciar miR-30c o a modular la expresión de sus RNA mensajeros diana para la prevención y/o tratamiento de la neuropatía dolorosa en la clínica. Evidentemente, son imprescindibles análisis de toxicidad y, en el caso de los miRNAs, estos estudios son particularmente importantes ya que amplio abanico de genes y sistemas regulados por un miRNA puede traducirse en un importante riesgo de efectos no deseados (off-target) en el propio sistema nervioso y en otros órganos y sistemas, accesibles al antimir, donde también se exprese el miRNA diana.

### **TRASLACIÓN A LA CLÍNICA DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES**

Los resultados obtenidos en estudios de investigación básica no siempre son extrapolables al humano. Frecuentemente, el modelo experimental presenta un número limitado de alteraciones fisiopatológicas, mientras la enfermedad pareja del humano es multifactorial y con una fisiopatología compleja (Burns y cols. 2015). El problema de la traslación clínica es particularmente notorio en los síndromes de dolor neuropático (Percie du Sert y Rice 2014). Por ello, nuestro siguiente, y más relevante objetivo fue valorar si

los resultados obtenidos en el animal de experimentación eran trasladables a la neuropatía dolorosa del humano. Para ello, seleccionamos pacientes referidos al Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Universitario Valdecilla por isquemia severa de las extremidades inferiores, para su intervención quirúrgica (amputación o revascularización). Este grupo de pacientes nos pareció particularmente interesante por diversos motivos. Por un lado, se trata de una población abundante de pacientes en los que el dolor neuropático es muy prevalente (Lindgren y cols., 2016). Por otro lado, la cirugía para amputación o revascularización en estos pacientes frecuentemente se lleva a cabo con raquianestesia, lo que nos daba acceso a una muestra de LCR. El hecho de que los pacientes de nuestro estudio presenten una neuropatía dolorosa que no tiene causa traumática sino isquémica, o más probablemente tiene varias causas (diabética, isquémica o mixta), podría considerarse una limitación del estudio. Sin embargo, nuestro interés en pacientes con dolor neuropático que fueran susceptibles de raquianestesia para poder obtener muestras de LCR, nos hizo decantarnos por esta población de pacientes neuropáticos isquémicos, a pesar de las limitaciones. Por otro lado, con la idea de facilitar la comparación entre animal de experimentación y pacientes, pusimos en marcha un modelo de neuropatía isquémica en la rata (Velategui, 2015). Sin embargo, llegamos a la conclusión de que el modelo (Westerweel y cols. 2005) no es adecuado para valorar a largo plazo la respuesta a los tratamientos, ya que las ratas revascularizan significativamente la extremidad en dos semanas a través de colaterales y recuperan la normalidad nociceptiva de forma heterogénea.

### **Papel etiopatogénico potencial de miR30c en el desarrollo de dolor neuropático en pacientes**

Numerosos miRNAs están presentes de forma estable en fluidos corporales, incluidos plasma y LCR, incorporados en vesículas extracelulares (exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos), y asociados a proteínas como Argonauta o proteínas HDL, lo que les confiere una alta resistencia a la degradación. En el SNC se ha demostrado que las vesículas extracelulares constituyen un medio de transporte para moléculas de diversa índole (proteínas no secretadas, lípidos, ácidos nucleicos incluidos miRNAs, etc.), con función de comunicación intercelular (neuro-neural, neuro-glial, neuro-muscular, neuro-

## Discusión

---

inmune), y con trascendencia fisiopatológica en procesos neurodegenerativos, tumorales, neuroinflamatorios, autoinmunes, etc. Las moléculas transferidas tienen capacidad de modificar el transcriptoma y posiblemente el estado epigenético de las células receptoras (Budnik y cols., 2016; Zappulli y cols., 2016).

Los miRNAs circulantes se pueden detectar y cuantificar en fluidos biológicos (Weber y cols., 2010; Rao y cols., 2013). No obstante, su expresión puede verse afectada por algunos factores de confusión como la hemólisis o la degranulación plaquetaria. En el caso de miR-30c, se ha demostrado que la hemólisis no influye sobre sus niveles plasmáticos (Pizzamiglio y cols., 2017). Sin embargo, miR-30c se expresa abundantemente en las plaquetas (Luo y cols., 2016) por lo que, para evitar su activación, la sangre se extrajo sin torniquete de la vena cubital, utilizando jeringa con aguja de calibre moderado, y la sangre se recogió delicadamente en un tubo con EDTA sin vacío, conservándose a temperatura ambiente hasta su procesamiento en un plazo inferior a una hora desde su recogida.

Nuestros resultados muestran que los pacientes que sufren de dolor neuropático tienen niveles circulantes de miR-30c significativamente superiores a los pacientes del grupo control, tanto en plasma (234 veces superiores) como en LCR (7 veces superiores). Esta elevación en los niveles circulantes de miR-30c en los pacientes con dolor frente a los controles libres de dolor es de una magnitud tan elevada que sugiere fuertemente su participación en la patogenia del dolor neuropático. Sin embargo, dadas ciertas heterogeneidades clínicas en nuestra cohorte de pacientes, procedimos a valorar la existencia de factores de confusión que, independientemente de la presencia de dolor, pudieran estar alterando los niveles circulantes de miR-30c. Nuestros resultados ponen de manifiesto que, salvo el padecimiento de dolor neuropático, ninguno de los factores que se distribuyen de manera asimétrica entre el grupo de pacientes con dolor y el grupo control (presencia de isquemia, edad, diabetes mellitus y distribución por sexos) se relacionó con cambios en la expresión de miR-30c. En el caso de la diabetes mellitus, nuestros resultados apuntan a que podría reducir los niveles circulantes de miR-30c tanto en LCR como en plasma, si bien es un hallazgo sin significación estadística. Un estudio reciente en el que

se analizan alteraciones en los niveles circulantes de miRNAs en pacientes con diabetes mellitus no detectó diferencias en los niveles plasmáticos de miR-30c en pacientes diabéticos versus controles (Jansen y cols. 2016).

En contraste con lo observado previamente por nuestro grupo en el animal de experimentación (Velategui, 2015), los niveles de miR-30c en plasma y LCR de nuestra cohorte de pacientes no mostraron correlación entre ellos, lo que sugiere que la fuente productora de miR-30c pueda no ser homogénea. En nuestro estudio, no todos los pacientes con dolor neuropático presentan elevación de miR-30c circulante en ambos fluidos: 9 pacientes tienen miR-30c elevado sólo en plasma; 4 pacientes presentan sobreexpresión sólo en LCR; en 7 pacientes miR-30c se elevó en ambos fluidos; y 5 pacientes no muestran elevación en ninguno de los dos fluidos.

Sería de gran interés conocer qué células son responsables del incremento de miR-30c circulante tanto en plasma como en LCR. Sabemos que la mayoría de los RNAs circulantes en suero/plasma proceden de células hemáticas y endoteliales, lo que dificulta la valoración de otros orígenes, salvo en el caso de miRNAs específicos de tejido que no están presentes en células sanguíneas. En el caso del LCR, los principales contribuyentes se postula que son oligodendrocitos, microglía, macrófagos y neuronas (Rao y cols., 2013). Sin embargo, las vesículas extracelulares se ha visto que atraviesan la BHE en ambas direcciones. Exosomas inyectados por vía intranasal o en la vena de la cola acceden al SNC y liberan su cargamento en el parénquima cerebral. Por otro lado, se ha detectado en pacientes la presencia en LCR y en sangre periférica de vesículas extracelulares y miRNAs procedentes de tumores cerebrales (García-Romero y cols., 2017), o de microglía en pacientes con esclerosis múltiple. Además, la BHE en los procesos neuroinflamatorios como es el caso del dolor neuropático muestra propiedades alteradas permitiendo acceso bidireccional de moléculas y células inflamatorias (Skaper, 2016). Sin embargo, si en nuestro caso miR-30c tuviera un origen cerebral y accediera a la sangre periférica, sus niveles circulantes en plasma se verían diluidos y posiblemente enmascarados por el miR-30c de origen periférico. Lo mismo sucedería en sentido contrario (Stoicea y cols., 2016). Una explicación simplista de nuestros resultados sería que los pacientes, dependiendo del origen de

## Discusión

---

producción de miR-30c [sistema nervioso central, células periféricas (nociceptor, células de Schwann, glía satélite, células endoteliales, células inflamatorias) o mixto], mostrarían niveles elevados de miR-30c en LCR, plasma o ambos fluidos. Ello podría estar en relación con la teoría de que el dolor neuropático es un síndrome común a diversas etiologías que producen daño nervioso a través de diferentes mecanismos (Bouhassira y Attal 2016). Tampoco podemos descartar la existencia de variación interindividual en la respuesta a miR-30c. Puesto que el nivel para considerar elevados los niveles circulantes de miR-30c fue meramente estadístico (superar el percentil 95 de los controles), podría suceder que para algunas personas, un nivel de miR-30c por debajo del nivel de corte sea suficiente para promover dolor neuropático. No obstante, no podemos perder de vista que miR-30c, a pesar de su eficacia antialodínica en el animal de experimentación, no puede ser contemplado como actor exclusivo o conmutador maestro de los cambios génicos desencadenantes de dolor neuropático. Además, nuestros pacientes con dolor neuropático asocian numerosas comorbilidades que podrían modificar, a través de variados mecanismos, las respuestas biológicas a miR-30c.

En conjunto, nuestros resultados en pacientes confirman los hallazgos en el animal de experimentación, prestando solidez a nuestra hipótesis de que miR-30c juega un papel relevante en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático. También sugiere un papel nuclear para este miRNA, puesto que su regulación ocurre independientemente de su etiología isquémica o traumática. Nuestros resultados apuntan hacia el potencial valor terapéutico del silenciamiento farmacológico de miR-30c como nuevo abordaje del dolor neuropático.

### **miR-30c: candidato a biomarcador con valor diagnóstico de dolor neuropático en la clínica**

Una revisión reciente pone de manifiesto la dificultad del diagnóstico de dolor neuropático a través de la anamnesis y la exploración (Finnerup y cols., 2016). Existen diversos cuestionarios que facilitan la recogida sistemática de síntomas sensoriales sugestivos de dolor neuropático (parestesias, disestesias, dolor espontáneo disestésico, etc.). Mediante la exploración, se puede apreciar la existencia de respuestas aberrantes provocadas por estímulos, como son la



alodinia, la hiperalgesia, la hipoestesia, o la anestesia. La certidumbre de que un dolor crónico sea de tipo neuropático se gradúa en posible, cuando hay síntomas claros; probable, cuando la exploración detecta alteraciones sensoriales, motoras o vegetativas sugestivas de daño nervioso; y segura, en aquellas raras ocasiones en que se objetiva una lesión del sistema nervioso concordante con los síntomas y la exploración (Lynch y cols., 2011). La ausencia de semiología patognomónica y el importante componente de subjetividad, tanto por parte del paciente que describe el dolor como del explorador que lo valora, hace muy necesario el establecimiento de biomarcadores accesibles, objetivamente cuantificables, que faciliten el diagnóstico, la estratificación del riesgo y la valoración de la respuesta a los tratamientos de los pacientes (Borsook y cols., 2011).

Por otro lado, no está claro si los síndromes neuropáticos de diferente etiología (traumática, metabólica, tóxica, farmacológica, autoinmune, inflamatoria, infecciosa, etc.) comparten mecanismos patogénicos. Se ha intentado relacionar el patrón individual de anomalías sensitivas en cada paciente (hiperalgesia al calor o al frío, dolor quemante espontáneo, descargas eléctricas, alodinia mecánica, paroxismos de dolor espontáneos, hipoestesia, anestesia, etc.), independientemente de su patología de base, con el mecanismo fisiopatológico subyacente y con la respuesta diferencial a los fármacos (Attal y cols. 2008, Bouhassira y cols. 2014, Baron y cols., 2017). El predominio de unos u otros síntomas y la respuesta diferencial a los tratamientos sustentan la teoría de que el dolor neuropático no es una entidad nosológica única, sino un síndrome doloroso común a distintas patologías, cuyo fenotipo algico depende del mecanismo neurobiológico responsable. Éste puede ser compartido por patologías diferentes, pero también puede ser diferente en pacientes con una misma enfermedad (Bouhassira y Attal 2016, Baron y cols., 2017). De confirmarse esta hipótesis, sería particularmente importante disponer de biomarcadores que permitieran discriminar mecanismos patogénicos y pronosticar y/o valorar repuesta a tratamientos. Sin embargo, hasta el momento, no se ha encontrado ningún biomarcador que ayude al diagnóstico del dolor. Si bien hay muchas sustancias detectables en LCR en

## Discusión

---

sujetos con dolor, no se ha conseguido una determinación en sangre útil desde el punto de vista diagnóstico (Bäckryd, 2015).

En los últimos años, son numerosos los estudios que han puesto en evidencia el potencial de los niveles circulantes de miRNAs como agentes etiopatogénicos y biomarcadores mínimamente invasivos de numerosas patologías del humano (García y cols., 2013; Rao y cols., 2013; Stoicea y cols., 2016;). Sin embargo, hay escasas referencias bibliográficas dedicadas al estudio de síndromes dolorosos crónicos en el humano [migraña (Andersen y cols., 2016), lumbalgia crónica (Luchting y cols., 2017), síndrome de colon irritable (Fourie y cols., 2014; Zhou y cols., 2016), dolor vesicular crónico (Sanchez Freire y cols., 2010), osteoartritis (Li y cols., 2011; Borgonio Cuadra y cols., 2014)], y aún menos estudios analizan biomarcadores de dolor crónico con componente neuropático [fibromialgia (Cerdá-Olmedo y cols., 2015), síndrome de dolor regional complejo (Orlova y cols., 2011; McDonald y cols., 2014; Douglas y cols., 2015; Shenoda y cols., 2016); neuropatías periféricas dolorosas (Leinders y cols., 2016; Huang y cols., 2017)].

Nuestro último objetivo en esta Tesis Doctoral fue valorar la utilidad de los niveles circulantes de miR-30c en plasma y/o LCR como biomarcadores para el apoyo al diagnóstico del dolor neuropático. Puesto que la obtención de LCR de los pacientes no es inocua, otro aspecto relevante, es definir cuál es el fluido biológico que ofrece mayor poder discriminatorio de presencia de dolor. Para ello, procedimos a elaborar modelos predictivos mediante regresión logística múltiple, incluyendo como variables independientes los niveles circulantes de miR-30c en plasma o/y en LCR, la edad, el sexo, la obesidad, la diabetes y la hipertensión arterial.

Nuestros resultados muestran que los niveles circulantes de miR-30c, tanto en plasma como en LCR, se comportan como predictores significativos de padecer dolor neuropático en nuestra cohorte de pacientes isquémicos. La curva ROC obtenida a partir del modelo de regresión logística que incluye como variable independiente miR-30c en plasma genera un área bajo la curva ROC un 13% superior al que incluye miR-30c en LCR. La sensibilidad y especificidad son también superiores en el modelo que incluye niveles plasmáticos de miR-30c. Podemos afirmar que la capacidad predictiva de dolor

neuropático de los niveles circulantes de miR-30c tanto en plasma (86%) como en LCR (74%) es elevada y robusta. Además, ninguno de los factores clínico-demográficos que hemos analizado en este estudio (edad, isquemia arterial, hipertensión, sexo, diabetes mellitus y obesidad) condicionó cambios en los niveles de expresión de miR-30c. Todo ello nos permite sugerir que los niveles circulantes de miR-30c en ambos fluidos son predictores independientes de riesgo extrapolables a otras poblaciones de pacientes.

En base al criterio de información de Akaike, los modelos predictivos mejoran cuando se incluyen en la ecuación la diabetes y la edad junto con miR30c en plasma o en LCR. Tanto la edad avanzada como la presencia de diabetes mellitus son más frecuentes en la cohorte de pacientes con dolor que en los controles, lo cual es congruente con los estudios que muestran una prevalencia de dolor neuropático del 19% en la población de pacientes diabéticos (Davies y cols., 2006). También la edad de los pacientes ya sean diabéticos (Román-Pintos y cols., 2016) o no (Bouhassira y cols., 2008; VanDenKerkhof y cols., 2016) constituye un factor independiente de riesgo de dolor neuropático, de manera congruente con el hallazgo de que la plasticidad tras la lesión nerviosa varía con la edad (Fitzgerald y Mc Kelvey, 2016). De nuevo, la capacidad predictiva del modelo que incluye los niveles de miR-30c en plasma (sensibilidad=72%; especificidad=91%; AUC=0,90) fue superior a la del modelo que incluye los niveles en LCR [sensibilidad=70%; especificidad=84%; AUC=0,77].

El mejor modelo predictivo derivado de nuestros resultados el que incluye los niveles de miR-30c tanto en plasma como en LCR junto con la edad y la diabetes mellitus. Este modelo predice adecuadamente la presencia de dolor neuropático en el 94% de nuestra cohorte de pacientes con una sensibilidad del 87% y una especificidad del 97%.

Se requieren estudios ulteriores para validar estos modelos en una cohorte más numerosa de pacientes. Además, sería extraordinariamente útil comprobar si los modelos aquí descritos son capaces de predecir el riesgo individual de desarrollar dolor neuropático post-amputación con el fin de implementar terapias antiálgicas agresivas precozmente. El síndrome del miembro fantasma y el dolor persistente residual de la región cicatricial son

## Discusión

---

complicaciones muy invalidantes y refractarias a los tratamientos que desarrollan frecuentemente los pacientes isquémicos sometidos a cirugía de amputación (Hsu y Cohen, 2013).

En resumen, nuestros resultados dan soporte a la idea de que los niveles circulantes de miR-30c, tanto en plasma como en LCR, en conjunción con variables clínicas, permiten elaborar un modelo predictivo de riesgo individual de padecer dolor neuropático en pacientes con isquemia severa de las extremidades inferiores. Los modelos desarrollados basados en la edad y la diabetes mellitus que no incluyen niveles circulantes de miR-30c, tienen un valor de criterio de información de Akaike muy elevado y pueden rechazarse. Los modelos que incluyen los niveles circulantes de miR-30c en plasma superan a los modelos que incluyen miR-30c en LCR, lo que favorece la aplicabilidad de miR-30c como biomarcador mínimamente invasivo.

**Conclusiones**

---



1. El silenciamiento de miR-30c en el sistema nervioso central, mediante la administración en la cisterna magna de un inhibidor específico LNA, protege contra el desarrollo de dolor neuropático a las ratas sometidas a lesión traumática del nervio ciático.
2. La administración intracisternal precoz de un ciclo de LNA-miR-30c inhibidor, en el momento de la lesión ciática, retrasa el desarrollo de alodinia mecánica.
3. La administración intracisternal de un segundo ciclo de LNA-miR-30c inhibidor en el momento en que se instaura alodinia mecánica, revierte el dolor neuropático en el 100% de las ratas.
4. La administración intracisternal tardía de un único ciclo de LNA-miR-30c inhibidor, una vez instaurada la alodinia mecánica tras la lesión del nervio ciático, revierte el dolor neuropático en el 67% de las ratas tratadas.
5. Los pacientes con isquemia severa de la extremidad inferior que padecen dolor neuropático muestran niveles circulantes de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y en plasma significativamente superiores a los de los pacientes libres de dolor.
6. La edad, el sexo, la isquemia de la extremidad inferior y la presencia de diabetes mellitus no influyen de forma significativa los niveles circulantes de miR-30c, ni en plasma ni en líquido cefalorraquídeo.
7. Los niveles circulantes de miR-30c en plasma y en líquido cefalorraquídeo muestran alta capacidad predictiva de la condición dolor neuropático. La capacidad predictiva de los modelos mejora añadiendo las variables clínicas edad y diabetes mellitus.
8. Los modelos predictivos que incluyen como variable independiente los niveles circulantes de miR-30c en plasma superan en sensibilidad y especificidad a los modelos que incluyen los niveles en líquido cefalorraquídeo.
9. En conjunto, nuestros resultados permiten postular a miR-30c como biomarcador diagnóstico de dolor neuropático, accesible, sensible y específico, y como diana terapéutica potencial para el tratamiento del dolor neuropático.





## **Bibliografía**

---



- Agrawal R, Tran U, Wessely O (2009). "The miR-30 miRNA family regulates *Xenopus* pronephros development and targets the transcription factor *Xlim1/Lhx1*". *Development*. 136: 3927-3936.
- Aksoy-Aksel A, Zampa F, Schrott G. (2014). "MicroRNAs and synaptic plasticity—a mutual relationship". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 369(1652): 20130515.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. (2004) "Afferent pain pathways: a neuroanatomical review". *Brain Res*. Mar 12;1000(1-2):40-56.
- Alsharafi W, Xiao B. (2015). "Dynamic Expression of MicroRNAs (183, 135a, 125b, 128, 30c and 27a) in the Rat Pilocarpine Model and Temporal Lobe Epilepsy Patients". *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 14(8):1096-102.
- An X, Sarmiento C, Tan T, Zhu H. (2017). "Regulation of multidrug resistance by microRNAs in anti-cancer therapy". *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 7(1), 38–51.
- Ambros V. (2004). "The functions of animal microRNAs". *Nature*. 2004431(7006):350-5.
- Andersen HH, Duroux M, Gazerani P. (2016). "Serum MicroRNA Signatures in Migraineurs During Attacks and in Pain-Free Periods". *Mol Neurobiol*. 53(3):1494-500.
- Apkarian AV, Hashmi JA, Baliki MN. (2011) "Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain". *Pain*. 152:S49–64.
- Arai M, Genda Y, Ishikawa M, Shunsuke T, Okabe T, Sakamoto A. (2013) "The miRNA and mRNA changes in rat hippocampi after chronic constriction injury". *Pain Medicine*. 14(5):720-729.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL. (2011) "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma". *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar 22; 108(12):5003-8.
- Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T. (2010) "EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain 2010 revision". *Eur J Neurol*; 17(9):1113-e88.
- Attal N, Bouhassira D. (2015) "Pharmacotherapy of neuropathic pain: which drugs, which treatment algorithms?" *Pain*. Apr;156 Suppl 1:S104-14.
- Baba H, Shimoji K, Yoshimura M. (2000) "Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons". *Anesthesiology*. 92(2):473-84.
- Bäckryd E. (2015). "Pain in the Blood? Envisioning Mechanism-Based Diagnoses and Biomarkers in Clinical Pain Medicine". *Diagnostics*. 5(1): 84–95.
- Bader AG. (2012) "miR-34 — a microRNA replacement therapy is headed to the clinic", *Front. Genet*. 3 120.

## Bibliografía

---

- Bali KK, Hackenberg M, Lubin A, Kuner R, Devor M. (2014). "Sources of individual variability: miRNAs that predispose to neuropathic pain identified using genome-wide sequencing". *Mol Pain*. 2014 Mar 19;10:22.
- Baliki MN, Schnitzer TJ, Bauer WR, Apkarian AV. (2011) "Brain morphological signatures for chronic pain". *PLoS ONE*. 6:e26010.
- Baron R. (2000) "Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms". *Clin J Pain*. Jun;16(2 Suppl):S12-20.
- Baron R, Binder A, Wasner G. (2010). "Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment". *The Lancet Neurology*. 9(8):807-819
- Baron R, Maier C, Attal N, Binder A, Bouhassira D, Cruccu G, Finnerup NB, Haanpää M, Hansson P, Hüllemann P, Jensen TS, Freynhagen R, Kennedy JD, Magerl W, Mainka T, Reimer M, Rice AS, Segerdahl M, Serra J, Sindrup S, Sommer C, Tölle T, Vollert J, Treede RD. (2017) "Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles". *Pain*, 158(2), 261–272.
- Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297).
- Bartel DP. (2009) "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions". *Cell* 136(2):215-233.
- Basbaum AI, Jessell T. "The Perception of Pain". En: Kandel ER, Schwartz J, Jessell T. (2000) *Principles of Neuroscience*. New York: Appleton and Lange; 472–491.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. (2009) "Cellular and molecular mechanisms of pain". *Cell*; 139(2):267-84.
- Baulcombe D. (2004) "RNA silencing in plants". *Nature*. 431,56–363.
- Bear MF, Connors BW, Parasido, MA. *Neuroscience - Exploring the Brain*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Beggs S, Salter MW. (2010) "Microglia-neuronal signalling in neuropathic pain hypersensitivity 2.0. *Current opinion in neurobiology*". 20:474–480.
- Berindan-Neagoe I, Monroig P del C, Pasculli B, Calin GA. (2014). "MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy" *CA Cancer J. Clin*. 64 311–336.
- Bjersing JL, Lundborg C, Bokarewa MI, Mannerkorpi K. (2013). "Profile of cerebrospinal microRNAs in fibromyalgia". *PLoS One*.8(10):e78762.
- Boadas-Vaello P, Homs J, Reina F, Carrera A, Verdú E. (2017). "Neuroplasticity of Supraspinal Structures Associated with Pathological Pain". *Anat Rec (Hoboken)*. 2017 Mar 6. doi: 10.1002/ar.23587.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. (2004) "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs". *RNA* 10 185–191.

- Bonin RP, Bories C, De Koninck Y. "A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments". *Molecular Pain*. 2014; 10:26.
- Boon R A. y Vickers K C. (2013). "Intercellular transport of microRNAs". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(2).
- Borgonio Cuadra VM, González-Huerta N C, Romero-Córdoba S, Hidalgo-Miranda A, Miranda-Duarte A. (2014). "Altered Expression of Circulating MicroRNA in Plasma of Patients with Primary Osteoarthritis and In Silico Analysis of Their Pathways". *PLoS ONE*, 9(6), e97690.
- Borsook D, Becerra L, Hargreaves R. (2011). "Biomarkers for chronic pain and analgesia. Part 1: the need, reality, challenges, and solutions". *Discov Med*.11(58):197-207.
- Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, Cunin G, Fermanian J, Ginies P, Grun-Overdyking A, Jafari-Schluep H, Lantéri-Minet L, Laurent B, Mick G, Serrie A, Valade D, Vicaut E. (2005). "Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new Neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4".) *Pain*.114:29–36.
- Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. (2008) "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population". *Pain Jun*;136(3):380-7.
- Bouhassira D. (2015) "Pharmacotherapy of neuropathic pain: which drugs, which treatment algorithms?" *Pain*. Apr;156 Suppl 1:S104-14.
- Bouhassira D, Attal N. (2016) "Translational neuropathic pain research: A clinical perspective". *Neuroscience*. 03.029.
- Bourinet E, Altier C, Hildebrand M E, Trang T, Salter M W, Zamponi G W. (2014) "Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling" *Physiological Reviews*. 94(1): 81-140
- Brandenburger T, Castoldi M, Brendel M, Grievink H, Schlösser L, Werdehausen R, Bauer I, Hermanns H. (2012) "Expression of spinal cord miRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain". *Neuroscience Letters* 506(2):281-286.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. (2006) "Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment". *Eur J Pain*. 10(4):287-333.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005). "Principles of microRNA-target recognition". *PLoS Biology* 3(3):e85.
- Bridge G, Monteiro R, Henderson S, Emuss V, Lagos D, Georgopoulou D, Patient R, Boshoff C. (2012). "The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis". *Blood*.120(25):5063-72.
- Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. (2008). "Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera". *Haematologica*. 93(7):1009-16.

## Bibliografía

---

- Budnik V, Ruiz-Cañada C, Wendler F. (2016). "Extracellular vesicles round off communication in the nervous system". *Nat Rev Neurosci.*17(3):160-72.
- Burma NE, Leduc-Pessah H, Fan CY, Trang T. (2016) "Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation". *J Neurosci Res.* 2016 Jul 4. doi: 10.1002/jnr.23768.
- Burns TC, Li MD, Mehta S, Awad AJ, Morgan AA. (2015). "Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: A systematic bioinformatics-based critique of preclinical models". *Eur J Pharmacol.* Jul 15;759:101-17.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs" *RNA* 10 1957–1966.
- Calvo M, Bennett DL. (2012) "The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury". *Exp Neurol.* 234:271–282.
- Calvo M, Zhu N, Grist J, Ma Z, Loeb JA, Bennett DL. (2011) "Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain via the MEK/ERK pathway". *Glia.* 59:554–568.
- Cao DD, Li L, Chan WY. (2016). "MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases". *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 842.
- Cao XC, Pappalardo LW, Waxman SG, Tan AM. (2017). "Dendritic spine dysgenesis in superficial dorsal horn sensory neurons after spinal cord injury". *Mol Pain.* 13:1744806916688016.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs" *Cell.* Feb 20; 136(4): 642–655.
- Caterina M J, Pang Z. (2016). "TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology". *Pharmaceuticals*, 9(4), 77.
- Cerdá-Olmedo G, Mena-Durán AV, Monsalve V, Oltra E. (2015). "Identification of a microRNA signature for the diagnosis of fibromyalgia". *PLoS One.* 2015.10(3):e0121903.
- Cervero F. (2009) "Pain: friend or foe? A Neurobiologic: the 2008 Bonica Award Lecture". *Regional Anesthesia and Pain Medicine.* 34(6):569-574.
- Chang HL, Wang HC, Chunag YT, Chou CW, Lin IL, Lai CS, Chang LL, Cheng KI. (2017) "miRNA Expression Change in Dorsal Root Ganglia After Peripheral Nerve Injury". *J Mol Neurosci.* 61(2):169-177.
- Chen K, Rajewsky N. (2006). "Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data". *Nat Genet.*38(12):1452-6.
- Chen HP, Zhou W, Kang LM, Yan H, Zhang L, Xu BH, Cai WH. (2014). "Intrathecal miR-96 inhibits Nav1.3 expression and alleviates neuropathic pain in rat following chronic construction injury". *eurochem Res.* Jan;39(1):76-83.

- Chen WX, Ren LH, Shi RH. (2014). "Implication of miRNAs for inflammatory bowel disease treatment: Systematic review". *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 5(2): 63–70.
- Chen Y, Gao D, Huang L (2015) "In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies" *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81C: 128–141.
- Cheng LZ, Lu N, Zhang YQ, Zhao ZQ. (2010) "Ryanodine receptors contribute to the induction of nociceptive input-evoked long-term potentiation in the rat spinal cord slice". *Mol Pain*. 6:1.
- Cheunsuang O, Morris R. (2000) "Spinal lamina I neurons that express neurokinin 1 receptors: morphological analysis". *Neuroscience*. 97(2):335-45.
- Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. (2016). "MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy". *Perspect Clin.*7(2):68-74.
- Cho HJ, Liu G, Jin SM, Parisiadou L, Xie C, Yu J, Cai, H. (2013). "MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein". *Human Molecular Genetics*. 22(3): 608–620.
- Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson N. and others (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires Argonaute2 catalytic activity". *Science* 328 (5986): 1694-1698.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. (2017) "Neuropathic pain". *Nat Rev Dis Primers*. Feb 16;3:17002.
- Cote GA, Gore AJ, McElyea SD, Heathers LE, Xu H, Sherman S, Korc M. (2014). "A Pilot Study to Develop a Diagnostic Test for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Differential Expression of Select miRNA in Plasma and Bile". *The American Journal of Gastroenterology*, 109(12), 1942–1952.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y. (2003) "Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain". *Nature*. 424:938–942.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. (2005) "BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain". *Nature*. 438:1017–1021.
- Czech MP. (2006). "MicroRNAs as therapeutic targets". *N Engl J Med*. 354:1194-5.
- Dajas-Bailador F, Bonev B, Garcez P, Stanley P, Guillemot F, Papalopulu N. (2012). "MicroRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting map1b in mouse cortical neurons". *Nat. Neurosci*. 15:697–699.
- Dangwal S, Bang C, Thum T. (2012) "Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research". *Cardiovasc Res*; 93:545-554.

## Bibliografía

---

- Davies M, Brophy S, Williams R, Taylor A. (2006). "The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes". *Diabetes Care*. 29(7):1518-22.
- De Felice M, Sanoja R, Wang R, Vera-Portocarrero L, Oyarzo J, King T, Ossipov MH, Vanderah TW, Lai J, Dussor GO. (2011) "Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain". *Pain*. 152:2701–2709.
- De Felice M, Ossipov MH. (2016). "Cortical and subcortical modulation of pain". *Pain Manag*. 6(2):111-20.
- Decosterd I, Woolf CJ. (2000) "Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain". *Pain* 87(2):149-158.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004). "Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex". *Nature* 432 231–235.
- Denk J, Boelmans K, Siegismund C, Lassner D, Arlt S, Jahn H. (2015). "MicroRNA Profiling of CSF Reveals Potential Biomarkers to Detect Alzheimer's Disease". *PLoS ONE*, 10(5), e0126423.
- Deval E, Lingueglia E. (2015) "Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems". *Neuropharmacology*. 94:49-57.
- Dicthenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ. (2008). "A Direct Role for FMRP in Activity-Dependent Dendritic mRNA Transport Links Filopodial-Spine Morphogenesis to Fragile X Syndrome". *Developmental Cell*, 14(6), 926–939.
- Dieleman JP, Kerklaan J, Huygen FJ, Bouma PA, Sturkenboom MC. (2008) "Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population". *Pain*; 137(3):681-8.
- Dinakar P, Stillman AM. (2016). "Pathogenesis of Pain". *Semin Pediatr Neurol*. 23(3):201-208.
- Ding S, Huang H, Xu Y, Zhu H, Zhong C. (2017) "MiR-222 in Cardiovascular Diseases: Physiology and Pathology". *Biomed Res Int*. 2017:4962426.
- Djoughri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN.(2006) "Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors". *J Neurosci*. 26:1281–1292.
- Djuranovic S, Nahvi A, Green R. (2012). "miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay." *Science* 336(6078).
- Douglas SR, Shenoda BB, Qureshi RA, Sacan A, Alexander GM, Perreault M, Barrett JE, Aradillas-Lopez E, Schwartzman RJ, Ajit SK. (2015). "Analgesic Response to Intravenous Ketamine Is Linked to a Circulating microRNA Signature in Female Patients With Complex Regional Pain Syndrome". *J Pain*.16:814-24.



- Eastwood J, Caslake MJ, Sodi R. (2016). "The association of circulating microRNA-30c with atherogenic lipoprotein subfractions and composition". *Clin Chim Acta*. 462:135-139.
- Ekimler S, Sahin K. (2014). "Computational methods for microRNA target prediction" *Genes (Basel)*. 5(3): 671–683.
- European bioinformatics database [http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/mirna.pl?genome\\_id=5171](http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/mirna.pl?genome_id=5171).
- Ferracin M, Negrini M. (2015). "Micromarkers 2.0: an update on the role of microRNAs in cancer diagnosis and prognosis". *Expert Rev Mol Diagn*. 15(10):1369-81.
- Finnerup N B, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin R H, ... Wallace M. (2015). "Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations". *The Lancet. Neurology*, 14(2), 162–173.
- Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DLH, Bouhassira D, Jensen TS. (2016). "Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice". *Pain*, 157(8), 1599–1606.
- Fitzgerald M, McKelvey R. (2016). "Nerve injury and neuropathic pain — A question of age". *Exp Neurol*. 275: 296–302.
- Fluiter K, Mook OR, Baas F. (2009). "The therapeutic potential of LNA-modified siRNAs: reduction of off-target effects by chemical modification of the siRNA sequence". *Methods Mol Biol*. 487:189-203.
- Fourie NH, Peace RM, Abey SK, Sherwin LB, Rahim-Williams B, Smyser PA, Wiley JW, Henderson WA. (2014). "Elevated Circulating miR-150 and miR-342-3p in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Experimental and Molecular Pathology*, 96(3), 422–425".
- François A, Low SA, Sypek EI, Christensen AJ, Sotoudeh C, Beier KT, Ramakrishnan C, Ritola KD, Sharif-Naeini R, Deisseroth K, Delp SL, Malenka RC, Luo L, Hantman AW, Scherrer G.A (2017). "Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins". *Neuron*. 93(4):822-839.e6.
- Freeman R. (2009) "Not all neuropathy in diabetes is of diabetic etiology: differential diagnosis of diabetic neuropathy". *Curr Diab Rep*. 9:423–431.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs" *Genome Res*. 19: 92–105.
- Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, Peterson KJ. (2015). "A Uniform System For The Annotation Of Human microRNA Genes And The Evolution Of The Human microRNAome". *Annual Review of Genetics*, 49, 213–242.
- Gangaraju VK, Lin H. (2009) "MicroRNAs: key regulators of stem cells". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(2):116–125.

## Bibliografía

---

- García RC. (2011). "Fisiopatología del dolor neuropático". *Actual. Med.* 784:45-59.
- García R, Villar AV, Cobo M, Llano M, Martín-Durán R, Hurlé MA, Nistal JF. (2013) "Circulating levels of miR-133a predict the regression potential of left ventricular hypertrophy after valve replacement surgery in patients with aortic stenosis". *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(4):e000211.
- García-Romero N, Carrión-Navarro J, Esteban-Rubio S, Lázaro-Ibáñez E, Peris-Celda M, Alonso MM, Guzmán-De-Villoria J, Fernández-Carballal C, de Mendivil AO, García-Duque S, Escobedo-Lucea C, Prat-Acín R, Belda-Iniesta C, Ayuso-Sacido A. (2017). "DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients". *Oncotarget.* 8(1):1416-1428.
- Genda Y, Arai M, Ishikawa M, Tanaka S, Okabe T, Sakamoto A. (2013) "microRNA changes in the dorsal horn of the spinal cord of rats with chronic constriction injury: A TaqMan® Low Density Array study". *International Journal of Molecular Medicine* 31(1):129-137.
- Giallombardo M, Chacártegui Borrás J, Castiglia M, Van Der Steen N, Mertens I, Pauwels P, Peeters M, Rolfo CJ. (2016) "miRNA Analysis in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients' Plasma Through qPCR: A Feasible Liquid Biopsy Tool". *Vis Exp.* May 27;(111). doi: 10.3791/53900.
- Gilron I, Baron R, Jensen T. (2015) "Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment". *Mayo Clin Proc.* Apr;90(4):532-45.
- Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF. (2005). "MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish". *Science.*308:833–838.
- Glinge C, Clauss, S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B., ... Tfelt-Hansen, J. (2017). "Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs – Pre-Analytic Methodological Considerations". *PLoS ONE*, 12(2), e0167969.
- Gong Q, Lu Z, Huang Q, Ruan L, Chen J, Liang Y, Wang H, Yue Y, Feng S. (2015) "Altered microRNAs expression profiling in mice with diabetic neuropathic pain". *Biochem Biophys Res Commun.* 456(2):615-20.
- Gray P. (2008). "Acute neuropathic pain: diagnosis and treatment". *Curr Opin Anaesthesiol.* 21(5):590-5.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing". *Molecular Cell* 27(1):91-105.
- Grun D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus KC, Rajewsky N. (2005). "MicroRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets", *PLoS Comput. Biol.* 1 e13.
- Gu N, Peng J, Murugan M, Wang X, Eyo UB, Sun, D., ... Wu, L J. (2016). "Spinal microgliosis due to resident microglial proliferation is required for pain hypersensitivity after peripheral nerve injury". *Cell Reports.* 16(3): 605–614.

- Guan Z., Kuhn JA, Wang X, Colquitt B, Solorzano C, Vaman S, Basbaum AI. (2016). "Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglia proliferation and DAP12-dependent pain". *Nature Neuroscience*. 19(1), 94–101.
- Guess MG, Barthel KKB, Harrison BC, Leinwand LA. (2015). "miR-30 Family microRNAs Regulate Myogenic Differentiation and Provide Negative Feedback on the microRNA Pathway". *PLoS ONE*. 10(2), e0118229.
- Gurtan AM, Sharp PA. (2013) "The role of miRNAs in regulating gene expression networks". *J Mol Biol*. 2013;425(19):3582-600.
- Gustin SM, Peck CC, Wilcox SL, Nash PG, Murray GM, Henderson LA. (2011). "Different pain, different brain: thalamic anatomy in neuropathic and non-neuropathic chronic pain syndromes". *J Neurosci*. 31:5956–5964.
- Gwilym SE, Filippini N, Douaud G, Carr AJ, Tracey I. (2010). "Thalamic atrophy associated with painful osteoarthritis of the hip is reversible after arthroplasty: a longitudinal voxel-based morphometric study". *Arthritis and rheumatism*. 62:2930–2940.
- Hafner M, Landthaler M, Burger L, M. Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, M. Ascano JR., Jungkamp AC , Munschauer M, A. Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T. (2010). "Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP". *Cell* 141 129–141.
- Hand NJ, Master ZR, EauClaire SF, Weinblatt DE, Matthews RP, Friedman JR. (2009). "The microRNA-30 family is required for vertebrate hepatobiliary development". *Gastroenterology*. 136(3): 1081–1090.
- Hayden EC. (2008) "Thousands of proteins affected by miRNA". *Nature*. 454(7204): 5625.
- Hammond SM. (2015) "An overview of microRNAs". *Adv Drug Deliv Rev.* ; 87:3-14.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. (2004) " The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing". *Genes Dev*. 18 3016–3027.
- Hand NJ, Master ZR, Eauclaire SF, Weinblatt DE, Matthews RP. (2009). "The microRNA-30 family is required for vertebrate hepatobiliary development". *Gastroenterology*. 136: 1081-1090.
- Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, Sczakiel G. (2010). "A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer". *Urol Oncol*. 28(6):655-61.
- Hathway GJ, Vega-Avelaira D, Moss A, Ingram R, Fitzgerald M. (2009) "Brief, low frequency stimulation of rat peripheral C-fibres evokes prolonged microglial-induced central sensitization in adults but not in neonates". *Pain*. 144:110–118.
- He L y, Hannon GJ. (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation". *Nature Review Genetics* 5(7):522–531.

## Bibliografía

---

- Held K, Voets T, Vriens J. (2015). "TRPM3 in temperature sensing and beyond". *Temperature: Multidisciplinary Biomedical Journal*, 2(2), 201–213.
- Heinricher M M, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. (2009). "Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity". *Brain Research Reviews*, 60(1), 214–225.
- Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A. (2015). "HCN Channels—Modulators of Cardiac and Neuronal Excitability". *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1429–1447.
- Hobert O. (2008). "Gene regulation by transcription factors and microRNAs". *Science* 319(5871): 1785 1786.
- Hockley JR, González-Cano R, McMurray S, Tejada-Giraldez MA, McGuire C, Torres A, Wilbrey AL, Cibert-Goton V, Nieto FR, Pitcher T, Knowles CH, Baeyens JM, Wood JN, Winchester WJ, Bulmer DC, Cendán CM, McMurray G. (2017). "Visceral and somatic pain modalities reveal NaV 1.7-independent visceral nociceptive pathways". *J Physiol*. 2017 Jan 20. doi: 10.1113/JP272837.
- Hori Y, Goto G, Arai-Iwasaki M, Ishikawa M, Sakamoto A. (2013) "Differential expression of rat hippocampal microRNAs in two rat models of chronic pain. *International Journal of Molecular Medicine* 32(6):1287-1292.
- Hsu E, Cohen SP. (2013). "Postamputation pain: epidemiology, mechanisms, and treatment". *Journal of Pain Research*, 6, 121–136.
- Hu HJ, Gereau RW (2011). "Metabotropic glutamate receptor 5 regulates excitability and Kv4.2-containing K channels primarily in excitatory neurons of the spinal dorsal horn". *Journal of neurophysiology*. 105:3010–3021.
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H. (2010). "Serum microR-NA signatures identified in a genome-wide se- rum microRNA expression profiling predict sur- vival of non-small-cell lung cancer." *J.Clin.Oncol*. 28(10): 1721-1726.
- Huang Y, Li X, Tao G, Zhu T, Lin J. (2017). "Comparing serum microRNA levels of acute herpes zoster patients with those of postherpetic neuralgia patients". *Medicine (Baltimore)*. 2017 Feb;96(8):e5997.
- Hummel R, Hussey DJ, Haier J. (2010). "MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types". *Eur J Cancer*. 46(2):298-311.
- Hwang HW, Mendell JT. (2004) "MicroRNAs cell proliferation, cell death and tumorigénesis". *British Journal of Cancer* 94(6):776–780.
- Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. (2007) "A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import". *Science* 315(5808):97-100.
- IASP taxonomy. 2012 <http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>. Assessed June 24, 2014.
- Imai S, Saeki M, Yanase M, Horiuchi H, Abe M, Narita M, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M. (2011). "Change in MicroRNAs associated with neuronal adaptive

- responses in the nucleus accumbens under neuropathic pain". *The Journal of Neuroscience* 31(43):15294-15299.
- Irani S, Pan X, Peck BC, Iqbal J, Sethupathy P, Hussain MM. (2016). "MicroRNA-30c Mimic Mitigates Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Mice". *J Biol Chem.* 291(35):18397-409.
- Isserlin R, Merico D, Wang D, Vuckovic D, Bousette N, Gramolini AO., Emili A. (2015). "Systems analysis reveals down-regulation of a network of pro-survival miRNAs drives the apoptotic response in dilated cardiomyopathy". *Molecular bioSystems*, 11(1), 239–251.
- Ito A, Kumamoto E, Takeda M, Shibata K, Sagai H, Yoshimura M.(2000) "Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT1A-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord". *J Neurosci.*20(16):6302-8.
- Ito N, Sakai A, Miyake N, Maruyama M, Iwasaki H, Miyake K, Okada T, Sakamoto A, Suzuki H. (2017). "miR-15b mediates oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain through BACE1 down-regulation". *British Journal of Pharmacology.* 174: 386–395.
- Jain P, Padole D, Bakshi S. (2014). "Prevalence of acute neuropathic pain after cancer surgery: A prospective study". *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(1), 36–42.
- Janssen SP, Truin M, Van Kleef M, Joosten EA. (2011) "Differential GABAergic disinhibition during the development of painful peripheral neuropathy". *Neuroscience.* 184:183–194.
- Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K. (2013). "Treatment of HCV infection by targeting microRNA". *N Engl J Med.* 368:1685–94.
- Jansen F, Wang H, Przybilla D, Franklin BS, Dolf A, Pfeifer P, Schmitz T, Flender A, Endl E, Nickenig G, Werner N. (2016). "Vascular endothelial microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus". *Cardiovascular Diabetology*, 15, 49.
- Jiang L, Zang D, Yi S, Li X, Yang C, Dong X, Liu, J. (2016). "A microRNA-mediated decrease in eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  promotes cell survival during PS-341 treatment". *Scientific Reports*, 6, 21565.
- Kachakova D, Mitkova A, Popov E, Popov I, Vlahova A, Dikov T, ... Kaneva R. (2015). "Combinations of Serum Prostate-Specific Antigen and Plasma Expression Levels of let-7c, miR-30c, miR-141, and miR-375 as Potential Better Diagnostic Biomarkers for Prostate Cancer". *DNA and Cell Biology.* 34(3): 189–200.
- Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Verma SK, Krishnamurthy P. (2015). "Embryonic Stem Cell-Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction". *Circulation Research.* 117:52–64.

## Bibliografía

---

- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003) "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias". *Cell Journal Home* 115(2):209–216.
- Kehlet H, Jensen T S, Woolf CJ. (2006). "Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention" *The Lancet*. 367:1618-1625.
- Keifer OP Jr, Riley JP, Boulis NM. (2014). "Deep brain stimulation for chronic pain: intracranial targets, clinical outcomes, and trial design considerations". *Neurosurg Clin N Am*. 25(4):671-92. doi: 10.1016/j.nec.2014.07.009.
- Kingsley SM, Bhat BV. (2017). "Role of microRNAs in sepsis". *Inflamm Res*. 2017 Mar 3. doi: 10.1007/s00011-017-1031-9.
- Kim W, Kim SK, Nabekura J. (2017). "Functional and structural plasticity in the primary somatosensory cortex associated with chronic pain". *J Neurochem*. 2017 Mar 9. doi: 10.1111/jnc.14012.
- Kloosterman WP, Plasterk RH. (2006) "The diverse functions of microRNAs in animal development and disease". *Developmental Cell* 11(4):441–450.
- Kozomara A y Griffiths-Jones S. (2014). "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data". *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D68–D73.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010) "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay". *Nature Reviews Genetics* 11(9):597-610.
- Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli MI, Sousa TA, Zanon S, De Lucca FL, Lucas G. (2011). "Differential expression of miRNAs in mouse pain models". *Molecular Pain*. 7:17.
- Laffont B, Rayner KJ. (2017). "MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis". *Can J Cardiol*. 33(3):313-324.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs". *Science*. Oct 26;294(5543):853-8.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. (2002) "Identification of tissue specific microRNAs from mouse". *Current Biology* 12(9):735-739.
- Lai X, Wang M, McElyea SD, Sherman S, House M, Korc M. (2017). "A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer". *Cancer Lett*. 393:86-93.
- Lal A, Thomas MP, Altschuler G, Navarro F, O'Day E, Li XL, Concepcion C, Han YC, Thierry J, Rajani DK, Deutsch A, Hofmann O, Ventura A, Hide W, Lieberman J. (2011) "Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling". *PLoS Genet*. 7 e1002363.
- Latremoliere A, Woolf CJJ. (2009) "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity". *Pain*. Sep; 10(9):895-926.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. (2001) "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *C. Elegans*". *Science* 294(5543):858-862.

- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B cell. lymphoma". *Br.J.Haematol.* 141(5): 672-675.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). «The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.». *Cell* 75: 843–854.
- Lee RC y, Ambros V. (2001) "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis Elegans*". *Science* 294(5543):862-864.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. (2003) "The nuclear RNase Drosha initiates microRNA processing". *Nature* 425(6956):415–419.
- Leinders M, Doppler K, Klein T, Deckart M, Rittner H, Sommer C, Üçeyler N. (2016). "Increased cutaneous miR-let-7d expression correlates with small nerve fiber pathology in patients with fibromyalgia syndrome". *Pain*.157: 2493-2503.
- Leinders M, Üçeyler N, Pritchard RA, Sommer C, Sorkin LS.(2016) "Increased miR-132-3p expression is associated with chronic neuropathic pain". *Exp Neurol.* 283(Pt A):276-86.
- Leong ML, Gu M, Speltz-Paiz R, Stahura EI, Mottey N, Steer CJ, Wessendorf M. (2011) "Neuronal loss in the rostral ventromedial medulla in a rat model of neuropathic pain". *J Neurosci.* 31:17028–17039.
- Leung AK, Young AG, Bhutkar A, Zheng GX, Bosson AD, Nielsen CB, Sharp PA (2011). "Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs" *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 237–244.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades, Bartel DP, Burge CB (2003) "Prediction of mammalian microRNA targets" *Cell* 115. 787–798.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets". *Cell* 120(1):15-20.
- Li X, Jin P. (2010) "Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity". *Nature Reviews Neuroscience* 11(5):329–338.
- Li J, Donath S, Li Y, Qin D, Prabhakar BS. (2010). "miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway". *PLOS Genet.* 6: e1000795
- Li H, Shen L, Ma C, Huang Y. (2013) "Differential expression of microRNAs in the nervous system of a rat model of bilateral sciatic nerve chronic constriction injury". *International Journal of Molecular Medicine* 32(1):219-226.
- Li X, Gibson G, Kim JS, Kroin J, Xu S, van Wijnen AJ, Im HJ. (2011). "MicroRNA-146a is Linked to Pain-related Pathophysiology of Osteoarthritis". *Gene*, 480(1-2), 34–41.

## Bibliografía

---

- Li L, D Zhu Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, Liu Y, Zhang CY, Zen K. (2012). "Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles." *PLoS One* 7(10).
- Li H, Huang Y, Ma C, Yu X, Zhang Z, Shen L. (2015) "MiR-203 Involves in Neuropathic Pain Development and Represses Rap1a Expression in Nerve Growth Factor Differentiated Neuronal PC12 Cells". *Clin J Pain*. 2015. 31(1):36-43.
- Li L, Jiang H, L, Y, Guo Y. (2015). "Hydrogen sulfide protects spinal cord and induces autophagy via miR-30c in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury". *Journal of Biomedical Science*. 22(1), 50.
- Li L., Zhao G. (2016). "Downregulation of microRNA-218 relieves neuropathic pain by regulating suppressor of cytokine signaling 3". *International Journal of Molecular Medicine* 37.3: 851-858.
- Liao W, Dong J, Peh HY, Tan LH, Lim KS, Li L, Wong WF. (2017) "Oligonucleotide Therapy for Obstructive and Restrictive Respiratory Diseases". *Molecules*. Jan 17;22(1).
- Lindgren H, Gottsäter A, Qvarfordt P, Bergman S. (2016). "All Cause Chronic Widespread Pain is Common in Patients with Symptomatic Peripheral Arterial Disease and is Associated with Reduced Health Related Quality of Life". *Eur J Vasc Endovasc Surg*.
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. (2004) "Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain". *Nature Structural y Molecular Biology* 11(6):576-577.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. (2004) "Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi". *Science* 305(5689):1437-1441.
- Liu XJ, Gingrich JR, Vargas-Caballero M, Dong YN, Sengar A, Beggs S, Wang SH, Ding HK, Frankland PW, Salter MW. (2008) "Treatment of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling Src from the NMDA receptor complex". *Nat Med*. 14:1325–1332.
- Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC. (2010) "Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer". *Oral Diseases*, 16: 360–364.
- Liu Q, Du GQ, Zhu ZT, Zhang C, Sun XW, Liu JJ, Li X, Wang YS, Du WJ. (2015). "Identification of apoptosis-related microRNAs and their target genes in myocardial infarction post-transplantation with skeletal myoblasts". *Journal of Translational Medicine*. 13, 270.
- Liu D, Wu J, Liu M, Yin H, He J, Zhang B. (2015). "Downregulation of miRNA-30c and miR-203a is associated with hepatitis C virus core protein-induced epithelial-mesenchymal transition in normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells". *464(4):1215-21*.



- Long W, Zhao C, Ji C, Ding H, Cui Y, Guo X, Shen R, Liu J. (2014). "Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers". *Cell Physiol Biochem*.33(5):1304-15.
- Lötsch J, Niederberger E, Ultsch A. (2015) "Computational functional genomics based analysis of pain-relevant micro-RNAs". *Hum Genet*.134:1221-38.
- Lu Y, Cao DL, Jiang BC, Yang T, Gao YJ. (2015) "MicroRNA-146a-5p attenuates neuropathic pain via suppressing TRAF6 signaling in the spinal cord". *Brain Behav Immun*.49:119-29.
- Luchting B, Heyn J, Hinske LC, Christina S. (2017). "Expression of miRNA-124a in CD4 Cells Reflects Response to a Multidisciplinary Treatment Program in Patients With Chronic Low Back Pain". *Spine*. 42(4):E226-E233.
- Lugli G, Torvik VI, Larson J, Smalheiser NR. (2008). "Expression of microRNAs and their Precursors in Synaptic Fractions of Adult Mouse Forebrain". *Journal of Neurochemistry*. 106(2): 650–661.
- Luo M, Li R, Ren M, Chen N, Deng X, Tan X, Li Y, Zeng M, Yang Y, Wan Q, Wu J. (2016) "Hyperglycaemia-induced reciprocal changes in miR-30c and PAI-1 expression in platelets". *Sci Rep*. 2016 Nov 7;6:36687.
- Lynch ME, Clark AJ, Moulin DE, Watson CP. (2011). "Modifications are suggested for the Special Interest Group (SIG) on Neuropathic Pain proposed definition and guidelines for neuropathic pain". *Pain*. 2011.152(7):1682; author reply 1683-4.
- Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein". *Nature* 434(7033):666-670.
- Mallory AC, Bouche N. (2008) "MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave". *Trends in Plant Science* 13(7):359-367.
- Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL. (2011) "Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain". *Anesthesiology*. 115:189–204.
- Martinez B, Peplow PV. (2017). "Blood microRNAs as potential diagnostic markers for hemorrhagic stroke". *Neural Regeneration Research*, 12(1), 13–18.
- Masotti A, Baldassarre A, Guzzo MP, Iannuccelli C, Barbato C, Di Franco M.(2016). "Circulating microRNA Profiles as Liquid Biopsies for the Characterization and Diagnosis of Fibromyalgia Syndrome". *Mol Neurobiol*. 2016 Oct 29.
- Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K. (2012). "IRF8 Is a Critical Transcription Factor for Transforming Microglia into a Reactive Phenotype". *Cell Reports*, 1(4), 334–340.
- Magill ST, Cambronne XA, Luikart BW, Liroy DT, Leighton BH, Westbrook GL, Goodman RH. (2010). "microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(47):20382–20387.

## Bibliografía

---

- Mathieson S, Maher CG, Terwee CB, Folly de Campos T, Lin CW. (2015). "Neuropathic pain screening questionnaires have limited measurement properties. A systematic review". *J Clin Epidemiol*. Aug;68(8):957-66.
- Matsuzaki J, Ochiya T. (2017). "Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review". *Int J Clin Oncol*. 2017 Feb 27. doi: 10.1007/s10147-017-1104-3.
- May A. (2007). "Neuroimaging: visualising the brain in pain". *Neurol Sci*.28(2):101-7.
- McDonald MK, Tian Y, Qureshi RA, Gormley M, Ertel A, Gao R, Aradillas Lopez E, Alexander GM, Sacan A, Fortina P, Ajit SK. (2014) "Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain". *Pain*.155(8):1527-39.
- McNeill E, Van Vactor D. (2012). "MicroRNAs shape the neuronal landscape". *Neuron*. 75(3):363-79.
- Mc Pherson NO, Owens JA, Fullston T, Lane M. (2015). "Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring". *Am J Physiol Endocrinol Metab*.308(9):E805-21.
- Mehta R, Otgonsuren M, Younoszai Z, Allawi H, Raybuck B, Younossi Z. (2016). "Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease". *BMJ Open Gas Gut*.65(9):1546-54.
- Meister G, Tuschl T(2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA". *Nature*. 431(7006):343-9.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T.(2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs". *Mol Cell*. 15(2):185-97.
- Melzack R, Wall PD.(1965) "Pain mechanisms: a new theory". *Science*. 150:971–979.
- Mendell JT, Olson EN. (2012). "MicroRNAs in stress signaling and human disease". *Cell*.148(6):1172-87.
- Miki K, Zhou QQ, Guo W, Guan Y, Terayama R, Dubner R, Ren K. (2002) "Changes in gene expression and neuronal phenotype in brain stem pain modulatory circuitry after inflammation". *J Neurophysiol*. Feb;87(2):750-60.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008)."Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci USA*. 10).
- Mondanizadeh M, Arefian E, Mosayebi G, Saidijam M, Khansarinejad B, Hashemi SM. (2015). "MicroRNA-124 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by targeting SP1 mRNA". *J. Cell Biochem*.116:943–953.

- Montgomery RL, Yu G, Latimer PA, Stack C, Robinson K, Dalby CM, Aminski N, van Rooij E (2014) "MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis" *EMBO Mol. Med.* 6 1347–1356.
- Morlando M, Ballarino M, Gromak N, Pagano F, Bozzoni I (2008) "Proudfoot, Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally". *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 902–909.
- Morris CE, Joos B. (2016). "Nav Channels in Damaged Membranes". *Curr Top Membr.* 2016;78:561-97.
- Mousavi SH, Niranjan A, Huang MJ, Laghari FJ, Shin SS, Mindlin JL, Flickinger JC, Lunsford LD. (2015) "Early radiosurgery provides superior pain relief for trigeminal neuralgia patients". *Neurology.* Dec 15;85(24):2159-65.
- Nelson PT, Wang WX, Wilfred BR, Wei A, Dimayuga J, Huang Q, Ighodaro E, Artiushin S, Fardo DW. (2015). "Novel human ABCC9/SUR2 brain-expressed transcripts and an eQTL relevant to hippocampal sclerosis of aging". *J Neurochem.* 134(6):1026-39.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AL. (2008) "Innocuous, not noxious, input activates PKC $\gamma$  interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers". *Al J Neurosci* 28(32):7936-44.
- Nicolini G, Forini F, Kusmic C, Pitto L, Mariani L, Iervasi G. (2015). "Early and Short-term Triiodothyronine Supplementation Prevents Adverse Postischemic Cardiac Remodeling: Role of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Antifibrotic miRNA Signaling". *Molecular Medicine.* 21(1), 900–911.
- Nijs J, Torres-Cueco R, van Wilgen CP, Girbes EL, Struyf F, Roussel N, van Oosterwijck J, Daenen L, Kuppens K, Vanwerwee L, Hermans L, Beckwee D, Voogt L, Clark J, Moloney N, Meeus M. (2014). "Applying modern pain neuroscience in clinical practice: criteria for the classification of central sensitization pain". *Pain Physician.* 17(5):447-57.
- Norcini M, Sideris A, Martin Hernandez LA, Zhang J, Blanck TJJ, Recio-Pinto E.(2014) "An approach to identify microRNAs involved in neuropathic pain following a peripheral nerve injury". *Frontiers in Neuroscience.* 8:266.
- Ohnami S, Tanabe M, Shinohara S, Takasu K, Kato A, Ono H. (2011) "Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in spinal long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials. *Pain*". 152:623–631.
- Oksuz Z, Serin MS, Kaplan E, Dogen A, Tezcan S, Aslan G, Emekdas G, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. (2015). "Serum microRNAs; miR-30c-5p, miR-223-3p, miR-302c-3p and miR-17-5p could be used as novel non-invasive biomarkers for HCV-positive cirrhosis and hepatocellular carcinoma". *Mol Biol Rep.* 42(3):713-20.
- Orlova IA, Alexander GM, Qureshi RA, Sacan A, Graziano A, Barrett JE, Schwartzman RJ, Ajit SK. (2011). "MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome". *J Transl Med.* 9:195.

## Bibliografía

---

- Orom UA, F.C. Nielsen, A.H. Lund. (2008). "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation". *Mol. Cell.* 30: 460–471.
- Ossipov M H. (2012). "The Perception and Endogenous Modulation of Pain". *Scientifica*, 2012, 561761.
- Ostenfeld MS, Jensen SG, Jeppesen DK, Christensen LL, Thorsen SB, Stenvang J, Hvam ML, Thomsen A, Mouritzen P, Rasmussen MH, Nielsen HJ, Ørntoft TF, Andersen CL. (2016). "miRNA profiling of circulating EpCAM(+) extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer". *J Extracell Vesicles.* 5:31488.
- Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT (2009). "Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection". *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17), 5473–5477.
- Parker JS, Roe SM, Barford D. (2005). "Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex". *Nature* 434(7033):663-666.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA". *Nature.* Nov 2;408(6808):86-9.
- Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, Singha RK, Malakar AK, Chakraborty S. (2017). "Interplay between miRNAs and Human Diseases: A Review". *J. Cell. Physiol.* Feb 9. doi: 10.1002/jcp.25854.
- Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M. (2007). "Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism". *Nature* 449(7164):919-922.
- Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, Jiang S. (2014). "MicroRNAs: emerging roles in adipogenesis and obesity". *Cell Signal.* 26(9):1888-96.
- Peng F, He J, Loo JFC, Yao J, Shi L, Liu C, ... Gu D. (2016). "Identification of microRNAs in Throat Swab as the Biomarkers for Diagnosis of Influenza". *International Journal of Medical Sciences.* 13(1): 77–84.
- Percie du Sert N, Rice ASC (2014). "Improving the translation of analgesic drugs to the clinic: animal models of neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, 171(12), 2951–2963".
- Pereira V, Busserolles J, Christin M, Devilliers M, Poupon L, Legha W, Alloui A, Aissouni Y, Bourinet E, Lesage F, Eschalier A, Lazdunski M, Noël J. (2014). "Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception". *Pain.* 155(12):2534-44.

- Perez C, Galvez R, Huelbes S, Insausti J, Bouhassira D, Diaz S, Rejas J. (2007) "Validity and reliability of the Spanish version of the DN4 (Douleur Neuropathique 4 questions) questionnaire for differential diagnosis of pain syndromes associated to a neuropathic or somatic component". *Health Qual Life Outcomes*. Dec 4;5:66.
- Petty RD, McCarthy NE, Le Dieu R, Kerr JR. (2016). "MicroRNAs hsa-miR-99b, hsa-miR-330, hsa-miR-126 and hsa-miR-30c: Potential Diagnostic Biomarkers in Natural Killer (NK) Cells of Patients with Chronic Fatigue Syndrome (CFS)/ Myalgic Encephalomyelitis (ME)". *PLoS One*. 11(3):e0150904.
- Pizzamiglio S, Zanutto S, Ciniselli CM, Belfiore A, Bottelli S, Gariboldi M, Verderio P. (2017). "A methodological procedure for evaluating the impact of hemolysis on circulating microRNAs". *Oncol Lett*. 13(1):315-320.
- Ploner M, Lee MC, Wiech K, Bingel U, Tracey I. (2011). "Flexible cerebral connectivity patterns subserve contextual modulations of pain". *Cereb Cortex*. 21:719–726.
- Prescott SA, Sejnowski TJ, De Koninck Y. (2006) "Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain". *Mol Pain*. 2:32.
- Qabaja A, Alshalalfa M, Bismar TA, Alhaji R. (2013). "Protein network-based Lasso regression model for the construction of disease-miRNA functional interactions". *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology*. 2013(1), 3.
- Rago L, Beattie R, Taylor V, Winter J. (2014). "miR379–410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin". *The EMBO Journal*, 33(8), 906–920.
- Raja S, Meyer R, Campbell A. (1998) "Peripheral Mechanisms of Somatic Pain". *Anesthesiology*; 68: 571-590.
- Ramezani A, Devaney JM, Cohen S, Wing MR, Scott R, Knoblach S, ... Raj DS. (2015). "Circulating and urinary microRNA profile in focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study". *European Journal of Clinical Investigation*. 45(4): 394–404.
- Rao P, Benito E, Fischer A. (2013) "MicroRNAs as biomarkers for CNS disease". *Front Mol Neurosci*. Nov 26;6:39.
- Raut SK, Singh GB, Rastogi B, Saikia UN, Mittal A, Dogra N, Singh S, Prasad R, Khullar M. (2016). "miR-30c and miR-181a synergistically modulate p53-p21 pathway in diabetes induced cardiac hypertrophy". *Mol Cell Biochem*. 417(1-2):191-203.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. (2000) "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*". *Nature*. 403(6772):901-906.
- Riley KJ, T.A. Yario TA, J.A. Steitz JA. (2012) "Association of Argonaute proteins and microRNAs can occur after cell lysis". *RNA* 18 1581–1585.

## Bibliografía

---

- Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, Bale TL. (2015). "Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(44): 13699–13704.
- Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. (2016). "Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function". *Journal of Diabetes Research*, 2016, 3425617. <http://doi.org/10.1155/2016/3425617>.
- Roy S, Benz F, Vargas Cardenas D, Vucur M, Gautheron J, Schneider A, Hellerbrand C, Pottier N, Alder J, Tacke F, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. "miR-30c and miR-193 are a part of the TGF- $\beta$ -dependent regulatory network controlling extracellular matrix genes in liver fibrosis". *Dig Dis*.16(9):513-24.
- Saiselet M, Gacquer D, Spinette A, Craciun L, Decaussin-Petrucci M, Andry G, Detours V, Maenhaut C. (2015). "New global analysis of the microRNA transcriptome of primary tumors and lymph node metastases of papillary thyroid cancer". *BMC Genomics*. 16:828.
- Sanchez Freire V, Burkhard FC, Kessler TM, Kuhn A, Draeger A, Monastyrskaya K. (2010). "MicroRNAs May Mediate the Down-Regulation of Neurokinin-1 Receptor in Chronic Bladder Pain Syndrome". *The American Journal of Pathology*, 176(1), 288–303.
- Sayed D, Abdellatif M (2011). "MicroRNAs in development and disease". *Physiol Rev* 91(3):827-887.
- Shao J, Cao J, Wang J, Ren X, Su S, Li M, Zang W. (2016). "MicroRNA-30b regulates expression of the sodium channel Nav1.7 in nerve injury-induced neuropathic pain in the rat". *Molecular Pain*, 12, 1744806916671523. <http://doi.org/10.1177/1744806916671523>.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H. (1995) "Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin". *J Neurosci*; 15:333–341.
- Scholz J, Woolf CJ. (2002). "Can we conquer pain?". *Nat Neurosci*. 5 Suppl:1062-7.
- Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ. (2005) "Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury". *J Neurosci*. 25:7317–7323.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME.(2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development". *Nature*.439:283–289.
- Schweinhardt P, Glynn C, Brooks J, McQuay H, Jack T, Chessell I, Bountra C, Tracey I. (2006) "An fMRI study of cerebral processing of brush-evoked allodynia in neuropathic pain patients. *Neuroimage*". 32:256–265.

- Seno MMG, Hu PZ, Gwadry FG, Pinto D, Marshall CR, Casallo G, Scherer SW. (2011) "Gene and miRNA expression profiles in autism spectrum disorders". *Brain Res.*1380:85–97.
- Serrano-Atero M S, Peramo F A, Cañas P, García-Saura C, Serrano-Álvarez C, Caballero J. (2002) "Modulación descendente de la información nociceptiva" *R e v. Soc. Esp. Dolor* 9: 382-390.
- Shah P, Cho SK, Thulstrup PW, Bjerrum MJ, Lee PH, Kang JH, Bhang YJ, Yang SW. (2017) "MicroRNA Biomarkers in Neurodegenerative Diseases and Emerging Nano-Sensors Technology". *J Mov Disord.* 2017 Jan;10(1):18-28.
- Shenoda BB, Alexander GM, Ajit SK. (2016) "Hsa-miR-34a mediated repression of corticotrophin releasing hormone receptor 1 regulates pro-opiomelanocortin expression in patients with complex regional pain syndrome". *J Transl Med.*14:64.
- Shukla K, Sharma AK, Ward A, Will R, Hielscher T, Balwierz A, Breunig C, Münstermann E, König R, Keklikoglou I, Wiemann S. (2015) "MicroRNA-30c-2-3p negatively regulates NF-κB signaling and cell cycle progression through downregulation of TRADD and CCNE1 in breast cancer". *Mol Oncol.*9(6):1106-19.
- Skaper SD. (2016). "Mast Cell - Glia Dialogue in Chronic Pain and Neuropathic Pain: Blood-Brain Barrier Implications". *CNS Neurol Disord Drug Targets.*15(9):1072-1078.
- Sims-Williams H, Matthews JC, Talbot PS, Love-Jones S, Brooks JC, Patel NK, Pickering AE. (2017). "Deep brain stimulation of the periaqueductal gray releases endogenous opioids in humans". *Neuroimage*, 146, 833–842.
- Smolle MA, Calin HN, Pichler M, Calin GA. (2017) "Noncoding RNAs and immune checkpoints: clinical implications as cancer therapeutics" *FEBS J.* 2017 Jan 28.
- Sodi R, Eastwood J, Caslake M, Packard CJ, Denby L. (2017). "Relationship between circulating microRNA-30c with total- and LDL-cholesterol, their circulatory transportation and effect of statins". *Clin Chim Acta.*466:13-19.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L. (2003). "The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes". *Nature Structural Biology* 10(12):1026-1032.
- Squillace N, Bresciani E, Torsello A, Bandera A, Sabbatini F, Giovannetti C, Giunta G, Rovati L, Del Bene M, Locatelli V, Gori A. (2014). "Changes in subcutaneous adipose tissue microRNA expression in HIV-infected patients". *J Antimicrob Chemother.* 69(11):3067-75.
- Stoicea N, Du A, Lakis DC, Tipton C, Arias-Morales CE, Bergese SD. (2016). "The MiRNA Journey from Theory to Practice as a CNS Biomarker". *Front Genet.* 7:11.

## Bibliografía

---

- Strickland IT, Richards L, Holmes FE, Wynick D, Boney J, Wong LF. (2011). "Axotomy induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons". *Plos One* 6(8):e23423.
- Stefani G, Slack FJ. (2008) "Small non-coding RNAs in animal development". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(3):219–230.
- Suh SS, Yoo JY, Cui R, Kaur B, Huebner K, Lee TK, Aquilino RI, Croce CM. (2014). "FHIT Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Metastasis in Lung Cancer through Modulation of MicroRNAs". *PLoS Genetics*, 10(10), e1004652.
- Sun T, Li W, Ling S. (2016). "miR-30c and semaphorin 3A determine adult neurogenesis by regulating proliferation and differentiation of stem cells in the subventricular zones of mouse". *Cell Prolif.* 49(3):270-80.
- Sun T, Li T, Davies H, Li W, Yang J, Li S, Ling S. (2016). "Altered Morphologies and Functions of the Olfactory Bulb and Hippocampus Induced by miR-30c". *Frontiers in Neuroscience*. 10, 207.
- Sun W, Zhang L, Li R. (2017). "Overexpression of miR-206 ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats via the MEK/ERK pathway by targeting brain-derived neurotrophic factor". *Neurosci Lett.* 2017 Jan 24. pii: S0304-3940(16)30995-8.
- Suter MR, Berta T, Gao YJ, Decosterd I, Ji RR. (2009) "Large A-fiber activity is required for microglial proliferation and p38 MAPK activation in the spinal cord: different effects of resiniferatoxin and bupivacaine on spinal microglial changes after spared nerve injury". *Mol Pain*. 5:53.
- Takahashi K, Satoh M, Takahashi Y, Osaki T, Nasu T, Tamada M, Okabayashi H, Nakamura M, Morino Y, Vachirayonstien T, Yan B. (2016). "Dysregulation of ossification-related miRNAs in circulating osteogenic progenitor cells obtained from patients with aortic stenosis". *Clin Sci (Lond)*. 130(13):1115-24.
- Tan AM, Chang YW, Zhao P, Hains BC, Waxman SG. (2011) "Rac1-regulated dendritic spine remodeling contributes to neuropathic pain after peripheral nerve injury". *Exp Neurol*. 232:222–233.
- Tan-No K, Takahashi H, Nakagawasai O, Nijima F, Sakurada S, Bakalkin G, Terenius L, Tadano T. (2009) "Nociceptive behavior induced by the endogenous opioid peptides dynorphins in uninjured mice: evidence with intrathecal N-ethylmaleimide inhibiting dynorphin degradation". *Int Rev Neurobiol*. 85:191-205.
- Tan Y, Yang J, Xiang K, Tan Q, Guo Q. (2015) "Suppression of microRNA-155 attenuates neuropathic pain by regulating SOCS1 signalling pathway". *Neurochem Res*. 40(3):550-60.
- Tan AM, Waxman SG. (2015). "Dendritic spine dysgenesis in neuropathic pain". *Neurosci Lett*. 601:54-60.



- Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andrés R, Márquez-Rodas I, Osorio A, Benítez J, Martinez-Delgado B. (2012). "Deregulated miRNAs in Hereditary Breast Cancer Revealed a Role for miR-30c in Regulating KRAS Oncogene". 2012;7(6):e38847.
- Tibbs GR, Posson DJ, Goldstein PA. (2016). "Voltage-Gated Ion Channels in the PNS: Novel Therapies for Neuropathic Pain?" Trends Pharmacol Sci. 37(7):522-42.
- Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett M I, Benoliel R., ... Wang SJ. (2015). "A classification of chronic pain for ICD-11". Pain, 156(6), 1003–1007.
- Treede RD. (2016) "Gain control mechanisms in the nociceptive system". Pain. 157(6):1199-204.
- Treister AK, Hatch MN, Cramer SC, Chang EY. "Demystifying Poststroke Pain: From Etiology to Treatment". PM R. 9(1):63-75.
- Tsuda, M. (2016). Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. Journal of Diabetes Investigation, 7(1), 17–26. <http://doi.org/10.1111/jdi.12379>
- Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J, Gasull X. (2011) "TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury". Mol Pain. 7:30.
- Ullah S, John P, Bhatti A. (2014) "MicroRNAs with a role in gene regulation and in human diseases". Molecular Biology Reports 41(1):225-232.
- Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. (2006) "Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs". Genes y Development 20(5):515-524.
- Vallélunga A, Ragusa M, Di Mauro S, Iannitti T, Pilleri M, Biundo R, ... Antonini A. (2014). "Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy". Frontiers in Cellular Neuroscience. 8, 156.
- van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. (2014) "Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies". Pain; 155 (4): 654–662.
- Van Den Kerkhof EG, Mann EG, Torrance N, Smith BH, Johnson A, Gilron I. (2016). "An Epidemiological Study of Neuropathic Pain Symptoms in Canadian Adults". Pain Research & Management. 2016, 9815750. <http://doi.org/10.1155/2016/9815750>
- van Rooij E, Purcell A, Levin AA. (2012) "Developing microRNA therapeutics". Circ Res 110:496-507.
- Velategui S. (2015) "Papel del microRNA-30c en la percepción dolorosa". Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria.
- Vella MC, Choi EY, Lin SY, Reinert K, Slack FJ. (2004) "The C. Elegans microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR". Genes y Development 18(2):132-137.

## Bibliografía

---

- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. (2011) "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins". *Nat. Cell Biol.* 13:423–433.
- Viereck J, Thum T. (2017) "Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury". *Circ Res.* 2017 Jan 20;120(2):381-399.
- Viguier F, Michot B, Hamon M, Bourgoin S (2013). "Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT<sub>7</sub> and other 5-HT receptor types". *Eur J Pharmacol.* 716(1-3):8-16.
- Vimalraj S, Selvamurugan N. (2014). "MicroRNAs expression and their regulatory networks during mesenchymal stem cells differentiation toward osteoblasts". *Int J Biol Macromol.* 66:194-202.
- Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S. (2005). "A camp-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:16426–16431.
- Von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012). "Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms". *Neuron,* 73(4), 638–652.
- Vranken JH. (2012). "Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain". *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 12(4):304-14.
- Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G. (2012). "Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells". *PLoS One.* 7:e34653.
- Wang C, Jiang Q, Wang M, Li D. (2015). "MiR-19a targets suppressor of cytokine signaling 1 to modulate the progression of neuropathic pain". *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 8(9): 10901–10907.
- Watson CJ, Gupta SK, O'Connell E, Thum S, Glezeva N, Fendrich J, ... Thum T. (2015). "MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure". *European Journal of Heart Failure.* 17(4): 405–415.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. (2010). "The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids". *Clinical Chemistry,* 56(11), 1733–1741.
- Wen M, Men R, Liu X, Yang L. (2016). "Involvement of miR-30c in hepatic stellate cell activation through the repression of plasminogen activator inhibitor-1". *Life Sci.* 155:21-8.
- Westerweel PE, Rookmaaker MB, van Zonneveld AJ, Bleys RL, Rabelink TJ, Verhaar MC. (2005). "A study of neovascularization in the rat ischemic hindlimb using Araldite casting and Spalteholz tissue clearing". *Cardiovasc Pathol.* 14(6):294-7.
- Woo A, Lechner B, Fu T, Wong CS, Chiu N, Lam H, Pulezas N, Soliman H, DeAngelis C, Chow E. (2015) "Cut points for mild, moderate, and severe pain among cancer and non-cancer patients: a literature review". *Annals of Palliative Medicine.* 4(4):176-83.

- Woolf CJ. (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*. 306:686–688.
- Woolf C J. (2010). “What is this thing called pain?” *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3742–3744.
- Wu G, Ringkamp M, Murinson BB, Pogatzki EM, Hartke TV, Weerahandi HM, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA. (2002) “Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents”. *J Neurosci*. 22:7746–7753.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. (2006). “MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103(11):4034–4039.
- Xia L, Zhang Y, Dong T. (2016) “Inhibition of MicroRNA-221 Alleviates Neuropathic Pain Through Targeting Suppressor of Cytokine Signaling 1”. *J Mol Neurosci*. 59(3):411-20.
- Xie RG, Gao YJ, Park CK, Lu N, Luo C, Wang WT, Wu SX, Ji RR. (2017). “Spinal CCL2 Promotes Central Sensitization, Long-Term Potentiation, and Inflammatory Pain via CCR2: Further Insights into Molecular, Synaptic, and Cellular Mechanisms”. *Neurosci Bull*. 2017 Mar 6. doi: 10.1007/s12264-017-0106-5.
- Xing Y, Zheng X, Li G, Liao L, Cao W, Xing H, Shen T, Sun L, Yang B, Zhu D. (2015). “MicroRNA-30c contributes to the development of hypoxia pulmonary hypertension by inhibiting platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  expression”. *Int J Biochem Cell Biol*. 64:155-66.
- Xu GY, Li G, Liu N, Huang LY. (2011) “Mechanisms underlying purinergic P2X3 receptor-mediated mechanical allodynia induced in diabetic rats”. *Mol Pain*. 7:60.
- Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. (2003) “Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain”. *Nature* 426(6965):468-474.
- Yang F, Xiao X, Cheng W, Yang W, Yu P, Song Z, ... Zheng J. (2015). “Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of TRPV1 ion channel”. *Nature Chemical Biology*, 11(7), 518–524.
- Yang Q, Cui J, Wang P, Du X, Wang W, Zhang T, Chen Y. (2016). “Changes in interconnected pathways implicating microRNAs are associated with the activity of apocynin in attenuating myocardial fibrogenesis”. *Eur J Pharmacol*. 784:22-32.
- Yang Z, Xu J, Zhu R, Liu L. (2017). “Down-Regulation of miRNA-128 Contributes to Neuropathic Pain Following Spinal Cord Injury via Activation of P38”. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 23: 405–411.

## Bibliografía

---

- Yanokura M, Banno K, Iida M, Irie H, Umene K, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D. (2015). "MicroRNAs in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications". *EXCLI J.* 14:190-8.
- Yao J, Liang L, Huang S, Ding J, Tan N et al. (2010). "MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting Galphai2 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 51: 846-856.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs". *Genes Dev.* 17 3011–3016.
- Yoshimura M, Furue H. (2006) "Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord". *J Pharmacol Sci.* 101(2):107-17.
- Yowtak J, Lee KY, Kim HY, Wang J, Kim HK, Chung K, Chung JM. (2011) "Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release". *Pain.* 152:844–852.
- Yu F, Deng H, Yao H, Liu Q, Su F et al. (2010). "Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells". *Oncogene.* 29: 4194-4204.
- Yue J, Liu L, Liu Z, Shu B, Zhang Y. (2013). "Upregulation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury". *Spine (Phila Pa 1976).* 38(6):463-70.
- Zappulli V, Friis KP, Fitzpatrick Z, Maguire CA, Breakefield XO. (2016). "Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system". *J Clin Invest.* 126(4):1198-207.
- Zeng Y. (2006) "Principles of micro-RNA production and maturation". *Oncogene* 25:6156–6162.
- Zhai L, Wang L, Teng F, Zhou L, Zhang W, Xiao J, Liu Y, Deng W. (2016) "Argonaute and Argonaute-Bound Small RNAs in Stem Cells". *Int J Mol Sci.* Feb 4;17(2).
- Zhao P, Hill M, Liu S, Chen L, Bangalore L, Waxman SG, Tan AM. (2016). "Dendritic spine remodeling following early and late Rac1 inhibition after spinal cord injury: evidence for a pain biomarker". *J Neurophysiol.* 115(6):2893-910.
- Zhang H, Nei H, Dougherty PM. (2010) "A p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of disinhibition in spinal synaptic transmission induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ ". *J Neurosci.* 30:12844–12855.
- Zhang YH, Kays J, Hodgdon KE, Sacktor TC, Nicol GD. (2012) "Nerve growth factor enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the atypical protein kinase C isoform, PKMzeta". *Journal of neurophysiology.* 107:315–335.
- Zhang Y, Ueno Y, Liu XS, Buller B, Wang X, Chopp M, Zhang ZG. (2013). "The microRNA-17-92 cluster enhances axonal outgrowth in embryonic cortical

- neurons". *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 33(16): 6885–6894.
- Zhang J, Zhang H, Zi T. (2015) "Overexpression of microRNA-141 relieves chronic constriction injury-induced neuropathic pain via targeting high-mobility group box 1. *Int J Mol Med*". Nov;36(5):1433-9.
- Zhang R, Huang M, Cao Z, Qi J, Qiu Z, Chiang LY. (2015). "MeCP2 plays an analgesic role in pain transmission through regulating CREB / miR-132 pathway". *Molecular Pain*.11,19.
- Zhang Q, Yu L, Qin D, Huang R, Jiang X, Zo, C, Gao, X. (2015). "Role of microRNA-30c Targeting ADAM19 in Colorectal Cancer". *PLoS ONE*, 10(3), e0120698.
- Zhang Q, Huang C, Yang Q, Gao L, Liu HC, Tang J, Feng WH. (2016) "MicroRNA-30c Modulates Type I IFN Responses To Facilitate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection by Targeting JAK1". *J Immunol*.196(5):2272-82.
- Zhao JJ, Lin J, Zhu D, Wang X, Brook, D, Chen M, Carrasco, R. (2014). "miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/ $\beta$ -catenin/BCL9 pathway". *Cancer Research*, 74(6), 1801–1813.
- Zhou R, Yuan P, Wang Y, Hunsberger JG, Elkahoun A, Wei Y, ... Manji HK. (2009). "Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers". *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(6), 1395–1405.
- Zhou L, Irani S, Sirwi A, Hussain MM. (2016). "MicroRNAs regulating apolipoprotein B-containing lipoprotein production". *Biochim Biophys Acta*. 1861(12 Pt B):2062-2068.
- Zhu H, Fan GC. (2013). "Whether Circulating miRNAs or miRNA-Carriers Serve as Biomarkers for Acute Myocardial Infarction". *Journal of Biomarkers in Drug Development*, 1(1), 1000e103.
- Zhuo C, Hou W, Hu L, Lin C, Chen C, Lin X. (2017). "Genomic Editing of Non-Coding RNA Genes with CRISPR/Cas9 Ushers in a Potential Novel Approach to Study and Treat Schizophrenia". *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 28.
- Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16(2):109-10.



**Anexos**

---





## **ANEXO I.**

### **IMPRESO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA**

#### **Solicitamos su colaboración en este estudio.**

***Título del estudio:*** MicroRNAs en dolor neuropático: biomarcadores moleculares y terapias dirigidas

***Investigadora principal del proyecto:***

Dra. María Amor Hurlé González

Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Santander (Tel. 942201981).

***Médicos responsables de la obtención de las muestras***

Dra. Rosa Santillán Fernández

Médico adjunto de la Unidad del Dolor, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander (Tel.: 942315160).

Dr. Roberto de la Fuente Royano

Médico adjunto del Servicio de Anestesia y Reanimación, Unidad de Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander (Tel.: 942202874).

***Información general del estudio***

Los investigadores del Departamento Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de Santander, en colaboración con médicos de la Unidad del Dolor y anestesiólogos del Servicio de Anestesiología y Reanimación del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, hemos puesto en marcha un proyecto de investigación en el que estudiamos los mecanismos moleculares que provocan dolor crónico. El estudio tiene como objetivo final, diseñar nuevos medicamentos que mejoren la respuesta de aquellos pacientes resistentes a los tratamientos utilizados habitualmente para aliviar el dolor crónico.

El dolor crónico es la causa más frecuente por la que los pacientes acuden al médico de atención primaria. Más de la mitad de la población ha padecido dolor en los últimos meses y entre un 40% y un 80% de las consultas están relacionadas con esta sintomatología. El dolor neuropático es una forma de dolor crónico que puede aparecer tras el daño de un nervio en el curso de traumatismos, enfermedades infecciosas, enfermedades como la diabetes o la isquemia periférica, etc. Se trata de un dolor particularmente resistente a los analgésicos convencionales, por lo que el descubrimiento de nuevas moléculas eficaces para aliviarlo supondría una mejora importantísima en la calidad de vida de los pacientes afectados por este tipo de dolor. Nuestro objetivo es encontrar moléculas de microRNA cuya expresión alterada en la sangre y/o en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con dolor neuropático se relacionaría con el desarrollo de dolor, con objeto de diseñar nuevos fármacos dirigidos a neutralizarlas.

Este estudio tiene una duración prevista de 10 años y se prevé reclutar 100 pacientes.

#### **¿Qué me supone participar en el estudio?**

Para llevar a cabo el estudio, precisamos obtener muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo de los pacientes, con el fin de analizar si hay una relación entre su dolor y la presencia de unas moléculas, denominadas microRNAs, que juegan un papel regulador del dolor crónico.

Para obtener la **muestra de sangre** (10 mililitros), la extracción se hará coincidir con la analítica que le practiquen de rutina para evitar molestias y pinchazos innecesarios.

Para la obtención de la pequeña muestra de **líquido cefalorraquídeo** que necesitamos (3 gotas que equivalen a unos 0,15 mililitros), se aprovechará la punción intratecal que vaya a serle practicada para la administración del tratamiento analgésico específico de su proceso doloroso o, si va a ser sometido a un procedimiento quirúrgico con anestesia regional (raquianestesia). **En ningún caso se le practicará este procedimiento con el fin exclusivo de obtener muestras para el estudio.**

Tanto los datos obtenidos de su Historia Clínica como sus muestras recibirán un código que no permitirá identificarlos como suyos salvo por el investigador principal. La manipulación y el análisis de los datos obtenidos durante el estudio se harán manteniendo en todo momento la confidencialidad acerca de la identidad de los pacientes de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y el Real Decreto 1720/2007 de 21 de diciembre. Su identidad permanecerá confidencial y los datos no podrán ser relacionados con usted aunque los resultados del estudio sean publicados en revistas científicas.

En el periodo de 10 años que durará el estudio, cualquier sub-estudio que se quiera llevar a cabo y que implique el uso de las muestras de la colección del estudio principal será evaluado por un Comité Ético de Investigación Clínica. El paciente tiene derecho a conocer en qué sub-estudios han sido utilizadas sus muestras contactando con el investigador principal del estudio.

Sus muestras serán almacenadas en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina. Una vez finalizado el estudio, si existiera muestra sobrante será destruida. No se proporcionarán sus muestras a terceros. Si usted desea retirarse del estudio y que su muestra sea destruida, sólo tiene que contactar con el investigador principal y solicitarlo.

Con fecha 17 de enero de 2014, el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria ha aprobado la realización de este estudio (acta 2/2014).

Su participación en este estudio es voluntaria, de tal forma que usted puede decidir no participar y también puede retirarse en cualquier momento del desarrollo del estudio, sin que esa decisión afecte en ningún sentido la atención que usted recibe de sus médicos.

### **Beneficios y posibles riesgos de su participación en el estudio**

Estas extracciones de sangre y líquido cefalorraquídeo no suponen ningún riesgo para su salud ya que no se añade ningún procedimiento extraordinario derivado del estudio.

Este estudio no va a repercutir directa e inmediatamente sobre su enfermedad. Sin embargo, puede tener un enorme valor para futuros pacientes con dolor crónico gracias al avance científico en el diseño de nuevos tratamientos.

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación.

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad, y el saber que ha colaborado en este proceso.

**Consentimiento Informado**

He sido informado/a de que mis datos personales serán protegidos de acuerdo con lo que dispone la Ley Orgánica reguladora de esta materia y no serán usados sin mi consentimiento previo.

Entiendo que la información que se obtenga de los análisis que se efectuarán en mis muestras no aportará beneficios directos sobre la evolución de mi enfermedad.

He leído en su totalidad este impreso del que se me ha explicado, además, su contenido.

Comprendo que mi participación es voluntaria y altruista.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera

Sin tener que dar explicaciones

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio, donando sangre y líquido cefalorraquídeo

En Santander, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Fdo. El paciente D.....

D.N.I. número.....

Nombre y firma del médico que da la información:

.....

## REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo,

.....  
....., revoco el consentimiento de participación en el proceso, arriba firmado y solicito que mi muestra sea destruida.

Firma y Fecha de la revocación: