



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Facultad de medicina
Departamento de Fisiología y Farmacología

Papel del microRNA-30c en la percepción dolorosa

**Tesis doctoral presentada por Sara Velategui Camus
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de
Cantabria**

Santander, Mayo 2015



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Facultad de medicina
Departamento de Fisiología y Farmacología

Dña. **M^a Amor Hurlé González**, Catedrática de Farmacología de la Universidad de Cantabria y coordinadora del grupo de investigación de “Citoquinas y factores de crecimiento en los fenómenos de plasticidad tisular patológica” y Dña. **Mónica Tramullas Fernández**, Investigadora Postdoctoral 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 Dña. Sara Velategui Camus Diplomada en Fisioterapia con el título:
Papel del microRNA-30c en la percepción dolorosa.

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

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos la presente certificación en Santander, a.15 de mayo de 2015.

Fdo. M^a Amor Hurlé González

Fdo. Mónica Tramullas Fernández

Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- Instituto de Salud Carlos III (RTICS: RD06/001/1016), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-16894) y Fundació La Marató de TV3 (Ayuda 072131).
- Premio al mejor proyecto de investigación en Farmacología 2010 de la Sociedad Española de Farmacología y Laboratorios Almirall.

Agradecimientos

Acabar la tesis ha sido un trabajo duro, lleno de dificultades personales y profesionales, que todavía hacen que el esfuerzo sea mayor, aunque la sensación de recompensa al mérito en el aporte que has hecho también lo sea. Siempre digo que si cada persona dedicara una mínima parte de su vida a la investigación o a la ayuda de los demás, la vida nos iría mejor a todos, y yo ya he cumplido una de mis promesas. Pero esta, no hubiera sido posible sin la participación de personas que han facilitado las cosas para que este trabajo llegara a su feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justa y consecuente con ellas.

Debo agradecer de manera especial y sincera a mi directora, Maruja Hurlé, por apostar por mí para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Las ideas, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad han sido clave del buen trabajo que hemos realizado juntas. Gracias por entender mi situación laboral y personal en todo momento, y por nunca darme un mal gesto y comprenderme.

Darle las gracias a mi co-directora Mónica Tramullas por haber dedicado tantas horas de su tiempo en la ayuda de esta tesis, y por su gran profesionalidad.

A Ana Villar por darme tantos buenos consejos, enseñarme y darme tanta paz que en algunos momentos me era muy necesario y estar dispuesta a ayudarme en todo momento, gracias por haberme brindado una parte de ti en este tiempo sin tu apoyo, y sin tus ánimos no lo hubiera conseguido.

Agradecimientos

A mis compañeros de laboratorio: a Aquilino Lantero por todo lo que me enseñó sobre el dolor y que junto con David Merino me he echado las mejores risas de este tiempo, a Raquel García que fue la impulsora de enseñarme lo referente a los miRNAs y que luego he echado tanto de menos, a Ana por ser mi gran confidente y amiga, ha sido un gran apoyo; a Nieves García por estar ahí y escucharme; a Begoña por su ayuda y colaboración con los nervios y siempre estar con una sonrisa; a Laura por todas las PCR con las que me ayudó; a María por su simpatía; a Roberto, sin el no hubiera sido posible seguir la línea de investigación; y a Rosmari por querer embarcarse en este mundo duro pero gratificante.

Al grupo del Dr. Ángel Pazos, en especial a Álvaro Díaz, por enseñarme a sacar líquido cefalorraquídeo a las ratas y a Elsa Valdizán por permitirme usar sus infraestructuras.

Al grupo de la Dra. Carmen Martínez-Cué, Eva, Paula Vero y Susana, por preguntar y estar siempre pendiente de mí, son unas chicas geniales.

A los Dres. Miguel Lafarga y M^a Teresa Berciano, por su ayuda en la obtención de ratas y del estudio de los nervios, transmitiéndome generosamente sus conocimientos, y por permitirme usar sus infraestructuras. Y también una especial mención se merece Ana por siempre estar dispuesta a ayudarme desinteresadamente y con una gran sonrisa y a Raquel que sin su colaboración nunca hubiera podido demostrar la lesión en los nervios.

Al grupo del Dr. Juan Hurlé, por ayudarme siempre que los necesite con gran amabilidad.

A mis amigos, compañeros de trabajo y pacientes, por estar ahí cerquita y ayudarme a creer en mis posibilidades, preguntándose e interesándose por lo que hacía pese a que no entendieran de lo que

hablaba, pero que veían que me hacían feliz cuando me preguntaban por ello.

A mis padres, que han dado todo en la vida para que yo ahora este culminando esta etapa de mi vida, y darles las gracias por apoyarme y motivarme en todos los momentos de mi vida, tales como la felicidad y la tristeza y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, ellos siempre han estado junto a mí y gracias a ellos les debo lo que ahora soy. Espero que estén orgullosos de mí y de lo que hemos conseguido, sin su sacrificio no hubiera podido ser lo que más deseaba una gran profesional en fisioterapia con una tesis de investigación. Siempre tendrán mi corazón y agradecimiento.

Este trabajo también es vuestro. Gracias.

A mis padres

Índice

ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	27
ESTADO ACTUAL DEL TEMA	33
1.DOLOR	35
<i>1.1 Conceptos generales sobre el dolor</i>	35
1.1.1 El sistema nociceptivo.....	36
1.1.2 Los sistemas de modulación del dolor.....	49
<i>1.2 Tipos de dolor</i>	51
1.2.1 Dolor nociceptivo.....	51
1.2.2 Dolor neuropático.....	51
2.MiRNAs	61
<i>2.1 Descubrimiento y características de los miRNAs</i>	61
<i>2.2 Biogénesis de los miRNAs</i>	62
<i>2.3 miRNAs y enfermedad</i>	67
<i>2.4 miRNAs en el Sistema Nervioso</i>	71
MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. SUJETOS DE ESTUDIO	79
<i>1.1 Animales de experimentación</i>	79
2. ESTUDIOS CONDUCTUALES DE NOCICEPCIÓN	79
<i>2.1 Valoración de la respuesta a estímulos térmicos: Test de retirada de la cola</i>	79
<i>2.2 Valoración de la respuesta a estímulos mecánicos: Test de von Frey</i>	80
<i>2.3 Valoración de la respuesta a estímulos químico-inflamatorios: Test de la formalina</i>	82
3. MODELOS DE DOLOR CRÓNICO NEUROPÁTICO	83
<i>3.1 Modelo de neuropatía periférica traumática:denervación parcial del nervio ciático (Spared Nerve Injury)</i>	83
<i>3.2 Modelo de neuropatía periférica: trombosis de la arteria femoral</i>	85
4. SEGUIMIENTO ECOGRÁFICO	87
5 TRATAMIENTOS Y GRUPOS EXPERIMENTALES	89
6 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA, LÍQUIDO CEFALORAQUIDEO Y TEJIDO	92
6.1 LCR.....	92
6.2 Plasma.....	92
6.3 Médula espinal.....	92
6.4 Arteria femoral.....	93
6.5 Nervio ciático femoral y safeno.....	94

7. TINCIÓN DE LA ARTERIA FEMORAL CON HEMATOSILINA-EOSINA.....	94
8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIONES.....	95
9. DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DE RNAM Y MIRNAS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.....	97
9.1 <i>Extracción de RNAm y miRNA.....</i>	97
9.1.1 Extracción de RNA en fluidos (Plasma y LCR).....	97
9.1.2 Extracción de RNAm y miRNAs de médula espinal.....	98
9.2 <i>Determinación de la concentración y pureza del RNAm y miRNAs.....</i>	99
9.3 <i>Transcripción inversa de RNA y miRNA.....</i>	100
9.4 <i>PCR cuantitativa.....</i>	101
10 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	102
RESULTADOS.....	105
1 MODELOS DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUCIDA POR LESIÓN DEL NERVI0 CIATICO.....	107
1.1 <i>Curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica.....</i>	107
1.2 <i>Niveles de expresión de miR-30c en médula espinal, líquido cefalorraquídeo y plasma.....</i>	108
2 MODELO DE NEUROPATIA PERIFERICA INDUCIDA POR ISQUEMIA DEL TERRITORIO DE LA ARTERIA FEMORAL.....	112
2.1 <i>Alteraciones ecograficas.....</i>	112
2.2 <i>Analisis histológicos.....</i>	112
2.3 <i>Desarrollo de alodinia mecánica.....</i>	116
2.4 <i>Niveles de expresión de miR-30c en médula espinal, líquido cefalorraquídeo y plasma.....</i>	117
3 EFECTO DE miR-30C MIMIC Y miR-30C INHIBIDOR EN LA RESPUESTA NOCICEPTIVA EVOCADA EN MODELOS DE DOLOR AGUDO.....	117
3.1 <i>Sensibilidad a estímulos mecánicos.....</i>	120
3.2 <i>Nocicepción evocada por estímulos térmicos.....</i>	121
3.3 <i>Respuestas evocadas por estímulos químico /inflamatorios.....</i>	122
4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE miR-30C MIMIC Y miR-30C INHIBIDOR EN L NEUROPATIA TRAUMÁTICA.....	124
4.1 <i>Efecto del tratamiento con miR-30c mimic.....</i>	124
4.2 <i>Efecto del tratamiento con miR-30c inhibidor.....</i>	126
5 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON miR-30C INHIBIDOR SOBRE LA EXPRESIÓN DE miR-30C EN LA MÉDULA ESPINAL DE RATAS SOMETIDAS A LESIÓN DEL NERVI0 CIATICO.....	128
6 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON miR-30C INHIBIDOR SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DIANA DE miR-30C.....	129

DISCUSIÓN.....	131
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153

Abreviaturas

ACC: Corteza cingular anterior.

AINES: Antiinflamatorio no esteroideo.

AGO: Protein argonaute.

AMPA: Acido α -amino-3-hidoxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.

AMYG: Amígdala.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: Adenosin trifosfato.

B2: Bradicinina.

BAMBI: BMP and activin membrane bound inhibitor.

BDNF: Factor de crecimiento neurofinas.

BMP: Bone morfogenetic proteins.

°C: Grados centigrados.

Ca²⁺: Molécula calcio.

CaCl₂ o Cl₂Ca: Cloruro calcico.

CaMKII: Calcio calmodulina kinasa.

Canales TRP: Transient receptor potential channels.

cm: Centímetros.

cols.: Colaboradores.

CPK: Creatinfosfoquinasa.

Dead box RNA-helicare: Dominio Dicer

DGCR8: Digeorge syndrome chromosomal or critical region 8(microprocessor complex).

DICER: Double strand RNA binding domain.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DNAc: DNA complementario.

DROSHA: Ribonuclease type III.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

DPX: Medio de inclusión.

DUF 283: Dominio Dicer.

EDTA: Acido etilendiaminotetraacetico.

F: Fuerza.

FeCl₂: Cloruro ferroso.

g: Gauge.

g: gramos

GDNF: Glial-derived neurotrophic factor.

GDP: Guanosina-5-difosfato.

GRD: Ganglio de la raíz dorsal.

GTP: Guanosina-5-trifosfato.

h: Hora.

H⁺: Molécula hidrogeno.

H₂O: Agua.

H₂O DEPC: Agua diethylpyrocarbonate.

HCV: Virus hepatitis C.

HIV: Virus inmunodeficiencia humana.

HSV: Virus herpes simple.

HT: Hipotálamo.

IASP: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor.

K⁺: Molécula potasio.

KCl: Cloruro potásico.

kb: Kilo bytes.

L5: 5° vértebra lumbar.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

M: Molar.

MAPK: Mitogen activated protein Kinasas.

mg: Miligramos.

nt: Nucleótidos.

MDvc: Núcleo dorso medial del tálamo.

Mg²⁺: Molécula magnesio.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

min: Minutos.

miRNA: MicroRNAs.

ml: Mililitros.

mm: Milímetros.

mRNA: RNA mensajero.

Na⁺: Molécula sodio.

Na₂HPO₄: Monofosfato sódico.

NaH₂PO₄: Difosfato sódico.

NaCl: Cloruro sódico.

Nav 1.3: Canales sodio.

NaOH: Hidróxido de sodio.

ng: Nanogramos.

NK1: Receptor neuro-kinina 1.

nm: Nanómetro.

NMDA: Acido N-metil-D-aspartico.

NO: Monóxido de nitrógeno.

NOX4: gene family of NADPH oxidases.

n.s.: No significativo.

O₄Os: Tetróxido de osmio.

PACT: Protein Kinase R activating protein.

PAG o SGPA: Sustancia gris periacueductal.

PAZ: Dominio Dicer o dominio de AGO.

PB: Núcleos parabraquiales.

PBS: Solución de tampón fosfato.

PCC: Corteza cingular posterior.

PCR: Polimerase chain reaction.

PF: Corteza prefrontal.

PFA: Paraformaldehido.

PGS: Prostaglandinas.

PIWI: Dominio AGO.

PKC: Proteína kinasa C.

PCC: Complejo parietal posterior.

PRGC: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

PRGC1: Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1-alpha.

pre-miRNA: MicroRNA precursor.

pri-miRNA: MicroRNA primario.

RAN-GTP: Ras- related nuclear protein Guanosina-5-trifosfato.

RDA: Neuronas de rango dinámico amplio.

RISC: RNA induced silencing complex

RNA: Ácido ribonucleico.

RNA_m: RNA mensajero.

r.p.m: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Retrotranscripción inversa.

s: Segundos

SBE: Smad-binding elements

SGPA: Sustancia gris periacueductal.

S1: área somatoestésica primaria.

S2: Área somatoestésica secundaria.

SMA: Área motora suplementaria.

SMAD: Mothers against decapentaplegic homolog 1.

SN: Sistema nervioso.

SNC: Sistema nervioso central.

SNI: Separated nerve injury.

SNP: Sistema nervioso periférico.

T^a: Temperatura.

TGF-β: Transforming growth factors-β.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TRBP: TAR RNA binding protein.

TRKB: Receptor tirosino kinasa.

TRPA1: Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1.

TRPM8: Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8.

TRPV1: Receptor vaniloide.

UTR: Untranslated región.

VMpo: Núcleo ventro medial del tálamo.

VPL: Núcleo lateral ventro posterior del tálamo.

μl: Microlitros.

μm: Micromilímetros.

Introducción y objetivos

El dolor, en condiciones fisiológicas, es una sensación desagradable que alerta al cuerpo ante la presencia de daño tisular o enfermedad. La sensación dolorosa fisiológica es proporcional a la intensidad del estímulo y desencadena respuestas protectoras dirigidas a la defensa del organismo. El dolor normalmente desaparece tras la curación de la lesión que lo provocó. Sin embargo, 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 (SN). El dolor crónico es contemplado como un proceso patológico en sí mismo, refractario a la terapia con fármacos analgésicos convencionales. El sufrimiento prolongado provocado por el dolor patológico es un serio lastre para la calidad de vida de los individuos que lo padecen, constituyendo la causa más frecuente de demanda de cuidados médicos. La Sociedad Española del Dolor refiere que el 20% de la población española padece dolor crónico. El tiempo medio de evolución del dolor es de seis años y medio y, como consecuencia del mismo, el 30% de los pacientes se ven obligados a acogerse a la baja laboral. Un estudio epidemiológico, realizado con más de 46.000 individuos de 16 países de la UE, revela que uno de cada cinco ciudadanos europeos padece dolor crónico. Este estudio pone de manifiesto la elevada prevalencia del dolor crónico entre la población, su gran coste en términos humanos, el impacto socio-económico y las limitaciones de los tratamientos analgésicos actuales (prácticamente dos tercios de estos pacientes refieren un control inadecuado del dolor).

El dolor crónico neuropático es un proceso patológico prevalente, refractario a la terapia con analgésicos convencionales, que genera un gran impacto en términos humano y socio-económico (Bouhassira y cols., 2008). El abordaje terapéutico del dolor crónico se concentra básicamente

en cuatro grupos farmacológicos: los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), los antidepresivos, los antiepilépticos y los opioides. Estos fármacos no son universalmente eficaces, no tienen capacidad para modificar el curso evolutivo del dolor, y carecen de propiedades preventivas/curativas. Además, hay determinados tipos de dolor crónico, como el de tipo neuropático, que son altamente resistentes a cualquier tipo de tratamiento. 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. El tratamiento del dolor crónico continúa siendo una asignatura pendiente y el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de dolor crónico es uno de los campos con más amplia repercusión social y sanitaria que se pueden abordar dentro de la medicina.

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. Las publicaciones demuestran perfiles de miRNAs cuya expresión alterada está implicada en patologías humanas como el cáncer, enfermedades metabólicas, virales, cardiovasculares o del SNC. Recientemente, se ha puesto de manifiesto la importancia de los miRNAs en las alteraciones de la regulación de la expresión génica que ocurre en diversas patologías, incluidas algunas que afectan al sistema nervioso. Además, cada vez hay más datos convincentes en relación con el potencial terapéutico de las intervenciones dirigidas a modular la expresión de los miRNAs. Todo ello ha propiciado que la comunidad biotecnológica incluyera como dianas terapéuticas preferentes a los miRNAs. Aunque la investigación relacionada con la participación de miRNAs en procesos dolorosos se

encuentra en un estado incipiente, los hallazgos publicados nos permiten postular su implicación en la plasticidad neural patológica que subyace al dolor neuropático y su utilidad como dianas terapéuticas para el tratamiento del dolor.

En base a nuestra hipótesis, nos propusimos los siguientes objetivos:

1°. Determinar los niveles de expresión de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal en modelos animales de dolor neuropático de diferente etiología (traumática e isquémica).

2°. Determinar los niveles circulantes de miR-30c en plasma y LCR en los modelos de dolor neuropático en ratas.

3°. Analizar la correlación entre expresión de miR-30c en médula espinal, LCR y plasma.

4°. Valorar la influencia sobre la respuesta nociceptiva de tratamientos con anti-miR30c o miR30c mimic, administrados en la cisterna magna frente a estímulos nociceptivos, tanto en modelos agudos como de dolor crónico neuropático.

5°. Determinar los niveles de expresión de genes diana de mir-30c en asta dorsal de la médula espinal en animales sometidos a dolor neuropático traumático.

Estado actual del tema

1. Dolor

1.1 Conceptos generales sobre el dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (“International Association for the Study of Pain”, IASP) define el dolor como “una experiencia sensorial y emocional subjetiva desagradable, asociada con una lesión tisular, presente o potencial”. El dolor, a diferencia de otras condiciones, es el elemento más importante de interferencia en la vida de la persona afectada a nivel biológico, psicoemocional y social. Por esta razón se considera un indicador clave de salud, bienestar y calidad de vida. El dolor, en condiciones fisiológicas, cumple una función protectora, que alerta al cuerpo ante la presencia de daño tisular o enfermedad. La sensación dolorosa fisiológica es proporcional a la intensidad del estímulo y desencadena respuestas protectoras dirigidas a la defensa del organismo. El dolor normalmente desaparece tras la curación de la lesión que lo provocó. Sin embargo, en determinadas situaciones de daño neural o inflamación se establecen fenómenos de plasticidad patológica en el sistema nervioso (SN) (Woolf y Ma., 2007; Basbaum y cols., 2009), y esto a su vez provoca en el sistema nociceptivo sensaciones dolorosas anómalas tales como la persistencia de dolor cuando ha desaparecido la lesión que lo provocó o cuando la respuesta dolorosa es desproporcionada al estímulo causal. En estas situaciones, el dolor pierde su función defensiva, y se erige como un proceso patológico en sí mismo que requiere tratamiento específico (Cerveró., 2009). El sufrimiento prolongado provocado por el dolor crónico constituye una de las principales causas de consulta médica ya que el dolor crónico puede causar un impacto negativo en el plano físico, psicoemocional, personal, familiar, laboral, social y económico de la

persona afectada y de su entorno. El dolor crónico es contemplado como un proceso patológico en sí mismo, refractario a la terapia con fármacos analgésicos convencionales (Cerveró., 2009).

1.1.1 El sistema nociceptivo

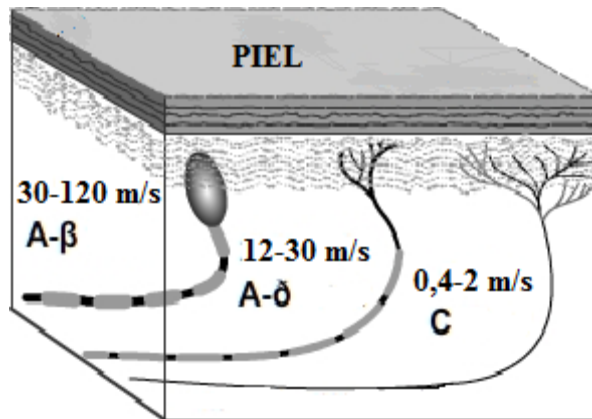
El sistema nociceptivo es el encargado de detectar y procesar las sensaciones dolorosas. Los procesos neurofisiológicos que participan en el dolor son:

a) Activación y sensibilización de los nociceptores periféricos.

Un nociceptor es una neurona nociceptiva-sensorial primaria que responde a los estímulos potencialmente dañinos mediante el envío de señales nerviosas al asta dorsal de la médula espinal. Los cuerpos celulares de estas neuronas están ubicados en los ganglios de la raíz dorsal o los ganglios del trigémino. (Flórez., 2007; Woolf y Ma., 2007). Los nociceptores son capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y estímulos nocivos ya que son capaces de codificar la intensidad de un estímulo dentro del rango de intensidades nocivas, mientras que no responden o responden irregularmente a estímulos de intensidad baja (Woolf y Ma., 2007). Los nociceptores se encuentran en muchos tejidos corporales como la piel, vísceras, vasos sanguíneos, músculo, fascias, tejido conectivo, periostio y meninges. Los demás tejidos corporales apenas cuentan con terminaciones nociceptivas. Estos receptores transmiten la información a través de fibras nerviosas que son clasificadas atendiendo a la velocidad de conducción, que está relacionada directamente con el diámetro del axón y con la presencia o ausencia de mielina. De acuerdo a las velocidades de conducción, diferenciamos tres grupos de neuronas sensoriales primarias. (Meyer y cols., 2006; Flórez., 2007; Aliaga y cols., 2009; Dubin y Patapoutian 2010) (Figura 1).

- El grupo A α / β (mecanorreceptores de umbral bajo), sus axones son gruesos (6-20 μ m) y mielinizados con alta velocidad de conducción (30-120 m/s). Suelen responder a estímulos inocuos, aunque también pueden responder a estímulos lesivos (calor aplicado en la piel).
- El grupo A δ , cuyos axones tienen calibre mediano (1-5 μ m) y están finamente mielinizados por lo que conducen a velocidad intermedia (12-30 m/s). Suelen responder a estímulos nocivos mecánicos y térmicos aunque también pueden responder a estímulos inocuos. Transmiten la sensación de “primer dolor” o “dolor rápido” (tarda unos 300ms) y median la primera respuesta adaptativa al dolor (retirada). Se trata de un dolor bien delimitado y localizado (epicrítico) y punzante.
- El grupo C, caracterizado por poseer axones de pequeño grosor (0,3-1,5 μ m), no mielinizados que conducen a velocidad lenta (0,4-2 m/s). Suelen responder a estímulos nocivos o sustancias liberadas tras daño tisular (bradiquinina, acetilcolina, iones de potasio...), aunque también pueden responder a estímulos inocuos. Transmiten el denominado “segundo dolor” o “dolor lento” (tarda unos 0,7-1,2 s). Se trata de un dolor mal localizado (protopático) generalmente quemante. Existe una población de nociceptores C denominados “peptidérgicos” los cuales presentan inmunoreactividad positiva a la sustancia P o PRGC (péptido relacionado con el gen de la calcitonina). Los nociceptores C “no peptidérgicos”, expresan receptores que responden a sustancias como GDNF, neurturina y artemina.

A



B

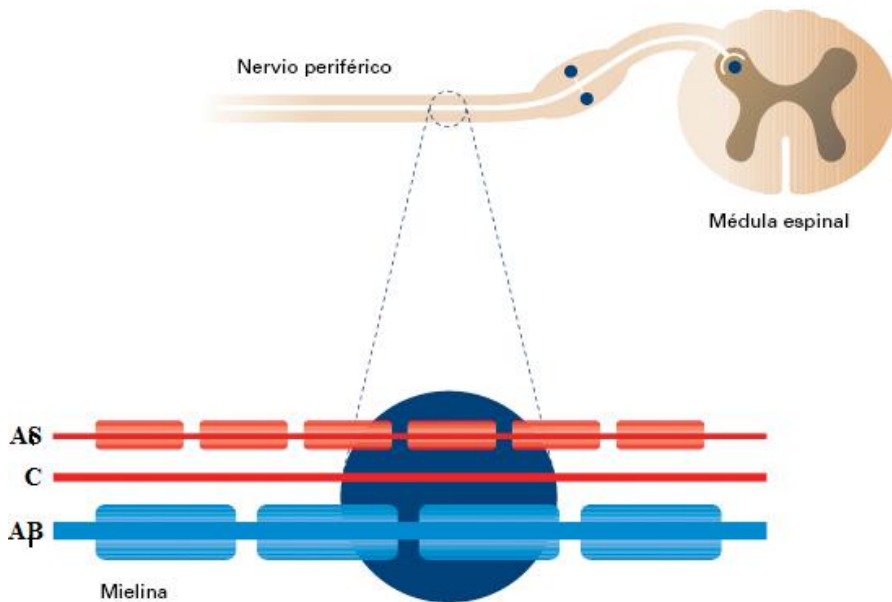


Figura 1. Anatomía de los nociceptores. A) Tipos de neuronas sensoriales primarias y su velocidad de conducción. B) Grado de mielinización de las distintas neuronas sensoriales (Tomado y modificado de Banco de imágenes CHANGE PAIN: www.changepain.org).

En función de su localización y la modalidad de estímulo que son capaces de transmitir, podemos distinguir cuatro grupos de nociceptores:

- Nociceptores cutáneos: Presentan un alto umbral de estimulación, sólo se activan ante estímulos intensos y no tienen actividad en ausencia de estímulo nocivo. Existen dos tipos:
 - Nociceptores de fibras A δ : Se localizan en las capas superficiales de la dermis, con ramificaciones que se extienden hasta la epidermis y responden a estímulos nocivos de tipo mecánico (dolor punzante).
 - Nociceptores de fibras C: Son terminaciones libres en la piel y responden a estímulos nocivos mecánicos, térmicos (dolor quemante y urente) o químicos. Son muy sensibles, provocando el fenómeno denominado hiperalgesia primaria. Por su capacidad de respuesta a una gran variedad de estímulos nocivos se les ha denominado “nociceptores polimodales”. Los nociceptores pueden diferenciarse también de acuerdo a la diferente expresión de canales que proporcionan las sensaciones de calor (TRPV1), frío (TRPM8) y los que se activan por sustancias químicas (TRPA1) (Basbaum y cols., 2009).
- Nociceptores viscerales: Se localizan en el corazón, pulmones, tracto respiratorio, testículos, sistema biliar, uréter y útero. Otras vísceras, especialmente las del tracto gastrointestinal están inervadas por receptores sensoriales no específicos. Se ha demostrado la presencia de hasta tres tipos de nociceptores: receptores sensoriales de alto umbral que se activan por estímulos nocivos, los nociceptores silentes que se sensibilizan por la inflamación y los nociceptores que responden a un amplio rango de intensidades de estímulos desde inocuos hasta nocivos. La mayor

parte de los nociceptores viscerales son terminaciones libres de fibras C y en algunos casos A δ .

- Nociceptores articulares: La capsula articular, los ligamentos, el periostio y la grasa articular presentan terminaciones de fibras C y A δ que responden a movimientos articulares de bajo umbral o nocivos y a factores liberados por el daño tisular como la inflamación.
- Nociceptores musculares: Los músculos están inervados por nociceptores de fibras A δ que responden a sustancias algogénicas (iones de potasio, bradicinina o serotonina) y a contracciones sostenidas del músculo y terminaciones de fibras C que responden a estímulos nocivos musculares tales como presión, calor o la isquemia muscular. Se trata de dolor difuso, difícil de localizar, sordo y continuado.

b) Transmisión de los estímulos nociceptivos a través de las aferencias primarias.

Entre la activación del nociceptor y la integración de la información nociceptiva en el asta dorsal de la medula espinal, existe un proceso en el cual participan innumerables mediadores químicos y procesos fisiológicos. El daño tisular libera sustancias químicas con capacidad algogénica en el entorno inmediato de las terminaciones sensoriales periféricas o nociceptores. Entre estas sustancias se encuentran: iones (H⁺ y K⁺), la bradicinina, prostaglandinas (PGS), leucotrienos, serotonina, noradrenalina, histamina, sustancia P, tromboxanos, factor activador de la plaqueta, protones y radicales libres, citoquinas como las interleucinas, el factor de necrosis tumoral (TNF), y neurotrofinas (especialmente el factor de crecimiento nerviosos), son también producidos durante la inflamación (Figura 2).

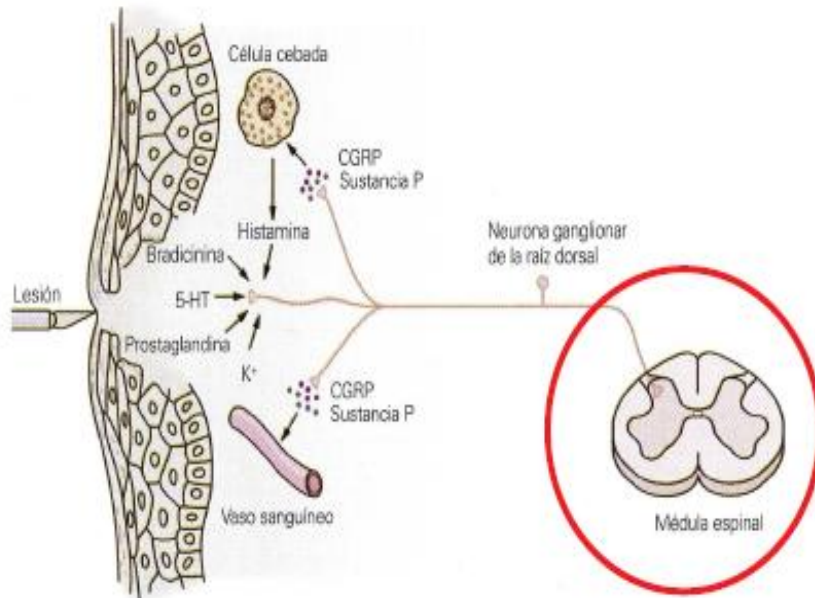


Figura 2: Sustancias algogénicas que facilitan procesos inflamatorios y estimulan la transmisión dolorosa. (Tomado de Julius y Basbaum., 2010).

Algunas de estas sustancias excitan directamente la membrana del nociceptor, activándolo, mientras que otras actúan de forma sinérgica, potenciando la respuesta del nociceptor, sensibilizándolo, jugando un papel crucial en los procesos de hiperalgesia primaria. Los mediadores liberados también pueden actuar sobre células no nerviosas del entorno, facilitando procesos inflamatorios que, a su vez, promueven la secreción de agentes algógenos, capaces de estimular o sensibilizar los nociceptores periféricos y las vías medulares de la transmisión dolorosa (Woolf y Ma., 2007; Julius y Basbaum., 2010).

c) Modulación e integración de la respuesta nociceptiva a nivel del asta dorsal medular.

Las fibras aferentes primarias que contienen los nociceptores periféricos ingresan a la médula espinal por el surco posterolateral y a nivel del tracto de Lissauer se ramifica hacia arriba y abajo introduciéndose en las láminas del asta posterior de la médula espinal terminando en la sustancia gris del asta posterior. La primera neurona de las vías de transmisión del dolor, tiene una terminación en la periferia, el cuerpo en el ganglio raquídeo y la terminación central en el asta posterior de la médula espinal. Sin embargo, la médula espinal no es solo un punto en la transmisión de la nocicepción, sino que representa un lugar de importantes interacciones en las que se permite que un impulso nociceptivo siga su curso hacia estructuras superiores o sea total o parcialmente bloqueado (Meyer y cols., 2006; Todd y Koerber., 2006).

Los principales neurotransmisores liberados en la transmisión del impulso nociceptivo desde la periferia hasta la neurona de segundo orden del asta posterior de la médula son; la sustancia P que interacciona con receptores de taquicininas, el glutamato que interacciona con receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos y el PRGC.

La sustancia gris de la médula espinal se puede dividir en una serie de capas o láminas de Rexed. Las neuronas nociceptivas primarias terminan casi exclusivamente en las láminas I, II y V del asta dorsal (Figura 3), donde establecen la primera sinapsis con la segunda neurona para llevar al cerebro la información dolorosa (Todd y Koerber., 2006; Flórez, 2007).

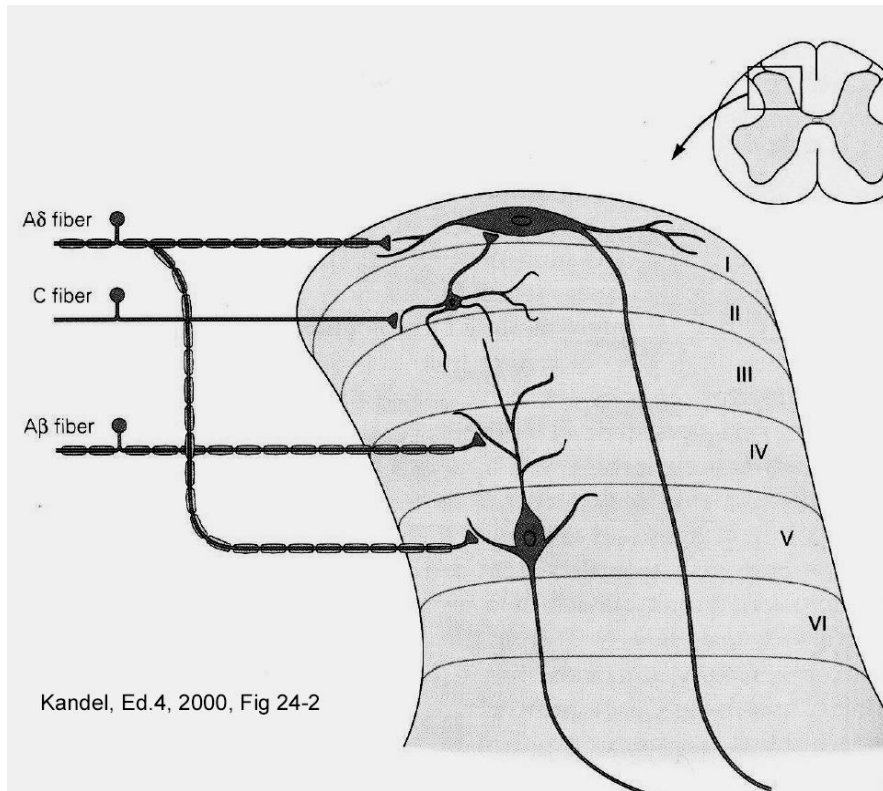


Figura 3: Representación esquemática del asta dorsal de la médula espinal y fibras aferentes de tipo A β , A δ y C. (Tomado de Kandel., 2000).

La lámina I, también denominada zona marginal de Waldeyer, contiene principalmente neuronas de proyección supraespinal y responden exclusivamente a estímulos nociceptivos, enviando conexiones directas al tálamo y a los diferentes segmentos espinales. La lámina II es la sustancia gelatinosa de Rolando que contiene interneuronas excitatorias (glutamatérgicas) e inhibitorias (glicinérgicas y GABAérgicas), que son fundamentales en el procesamiento de la nocicepción. En la lámina V predominan las neuronas de rango dinámico amplio (RDA) encargadas de identificar las diferentes intensidades de dolor. Las fibras A δ terminan en las láminas I y V, las fibras C en la lámina I, II y V y las fibras A β en las

láminas III, IV y V. En general las aferencias nociceptivas terminan en las láminas I y II con alguna contribución en la lámina V y las aferencias no nociceptivas de bajo umbral terminan en las láminas profundas III, IV y V. La lámina X también se relaciona con la transmisión nociceptiva del dolor visceral.

d) Transmisión por las vías de proyección ascendentes (espino-encefálicas)

Las proyecciones ascendentes se encargan de unir anatómicamente la neurona de segundo orden de la médula espinal y los centros nerviosos superiores, estas proyecciones en su mayoría discurren por los cordones medulares posterior y lateral (Figura 4). (Bonica., 2001; Dostrovsky y Craig., 2006; Flórez., 2007; Garcia-Porrero y Hurlé., 2014):

CORDON POSTERIOR

El fascículo de Goll y Burdach, transcurren por el cordón posterior de la médula espinal hasta llegar al dorso del bulbo encefálico (Goll por dentro; Burdach por fuera). Se encarga de transmitir el dolor epicrítico, la cinestesia y la esterognosia. Los axones se decusan para formar el lemnisco medial y ascender hasta el tálamo.

CORDON LATERAL (de superficial a profundo)

El fascículo espinocerebeloso, transcurre por el asta posterior de la medula y asciende por el cordón medular lateral, el haz directo (Flechering; homolateralmente) y el cruzado (Gowers: se acusa al contralateral). Ambos terminan en el cerebelo dándole sensibilidad propioceptiva inconsciente, necesaria para la coordinación del movimiento: longitud, velocidad y fuerza de la contracción muscular.

El fascículo espinoolivar, transcurre por la sustancia gris intermedia de la médula, los axones se acusan y ascienden por el cordón anterolateral, terminando en la oliva bulbar. La porción ventral está ocupada por tractos ascendentes, y la porción dorsal por tractos descendentes. Los tractos descendentes de la porción dorsal forman parte de las vías motoras y son los tractos: corticoespinal lateral (contribuye en el control de la información sensitiva), reticuloespinal lateral (controla la movilidad de las extremidades y modula la actividad de las motoneuronas mediante la noradrenalina y la serotonina) y rubroespinal (controla la movilidad distal de la extremidad superior).

El tracto espinotalámico, se dispone próximo al asta anterior e invade parte del cordón anterior. Está relacionado con la transmisión del dolor, temperatura y picor. Las neuronas que lo originan se encuentran en un 50% en la lámina I, aunque también hay en la lámina IV-V y en la V-VIII. El 90% de las neuronas se decusan a la porción contralateral de la medula, las que lo hacen en la lámina I forman el *tracto espinotalámico lateral* (aférencias A δ y C; sensibilidad termoanalgésica) y los de la lámina V-VII forman el *tracto espinotalámico anterior* (aférencias A β , A δ y C; tacto grueso). Las principales proyecciones se dirigen a la neurona de tercer orden en los núcleos mediales e intralaminares del tálamo.

El fascículo espinotectal, se decusa al lado contralateral de la medula, ascendiendo por el cordón anterolateral hasta el mesencéfalo (sustancia gris periacueductal y tubérculos cuadrigéminos). Se relaciona con la fisiología del dolor y la analgesia.

CORDON ANTERIOR

Exclusivamente para las vías descendentes que se encargan del control motor.

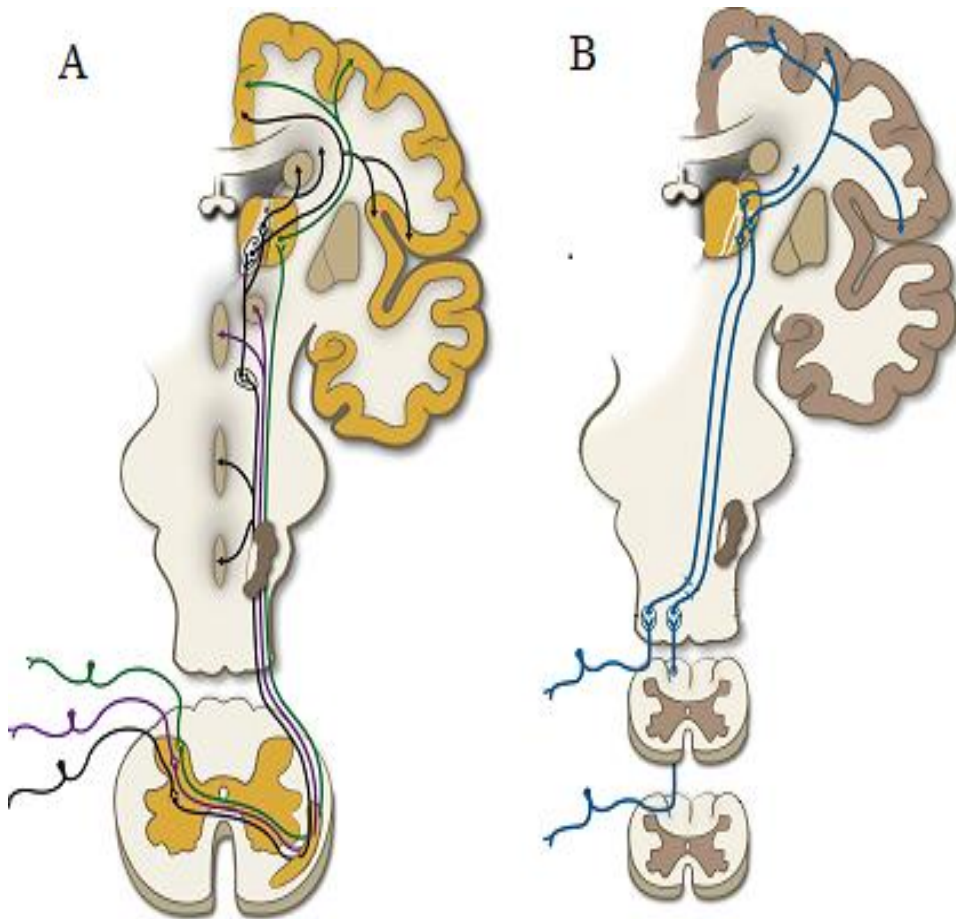


Figura 5: Vías de dolor ascendente y descendente. **A)** Sistema somatoestésico anterolateral-espinotalámico. Las fibras del tracto espinotalámico se representan en verde; el tracto espinoreticular, en negro; y el tracto espinomesencefálico, en violeta. **B)** Sistema somatoestésico del cordón posterior-lemnisco medial. (Tomado de García Porrero y Hurlé, 2015).

e) Integración de la respuesta en los centros superiores (estructuras encefálicas).

Las proyecciones ascendentes permiten la conexión anatómica entre la neurona de segundo orden de la médula espinal y los centros nerviosos superiores, de modo que la intensidad percibida de los impulsos

dolorosos se correlaciona con un incremento de actividad en numerosas estructuras cerebrales (Apkarian y cols., 2011) (Figura 5).

Las áreas cerebrales principalmente implicadas en la percepción del dolor son:

- El *área somatostésica primaria* (SI) es el principal sitio en que se percibe, se localiza y se valora intensidad del dolor, su activación es modulada por factores cognitivos, por ejemplo la atención o las experiencias previas, que alteran la percepción del dolor.
- El *tálamo* medial se activa con procesos afectivos y emocionales relacionados con estímulos dolorosos y el lateral, con los sensoriales y discriminantes (Melzack y Casey, 1968), los núcleos ventromediales se activan ante sensaciones térmicas tanto inocuas como nocivas.
- La *amígdala* integra el componente aversivo de la experiencia dolorosa, como la ansiedad, la evitación por miedo, situaciones peligrosas o dolorosas.
- El *Rafe magnus* está encargado del control descendente del dolor y la estimulación directa sobre esta área produce analgesia.
- El *locus coeruleus* es el centro noradrenérgico cuya función es el control descendente del dolor y del componente emocional del dolor.
- La *sustancia gris periacueductal* (SGPA o PAG) cuya función es el control homeostático del dolor y comportamiento defensivo, la activación de esta área libera encefalinas por parte de neuronas que proyectan a los núcleos del rafe, provocando a su vez, la liberación de serotonina que se transporta por las vías descendentes produciendo un efecto inhibitorio sobre la entrada de estímulos nocivos.
- El *hipotálamo* cuyos núcleos ventromediales controlan la saciedad, del hartazgo, y comportamientos como la ira, la agresividad, la defensa, la agresión y la huida, por otro lado los núcleos

paraventriculares y los núcleos ventrolaterales poseen funciones neuroendocrinas, como la consciencia del dolor o arousal, la termoregulación, el cambio en la presión arterial y otras funciones homeostáticas.

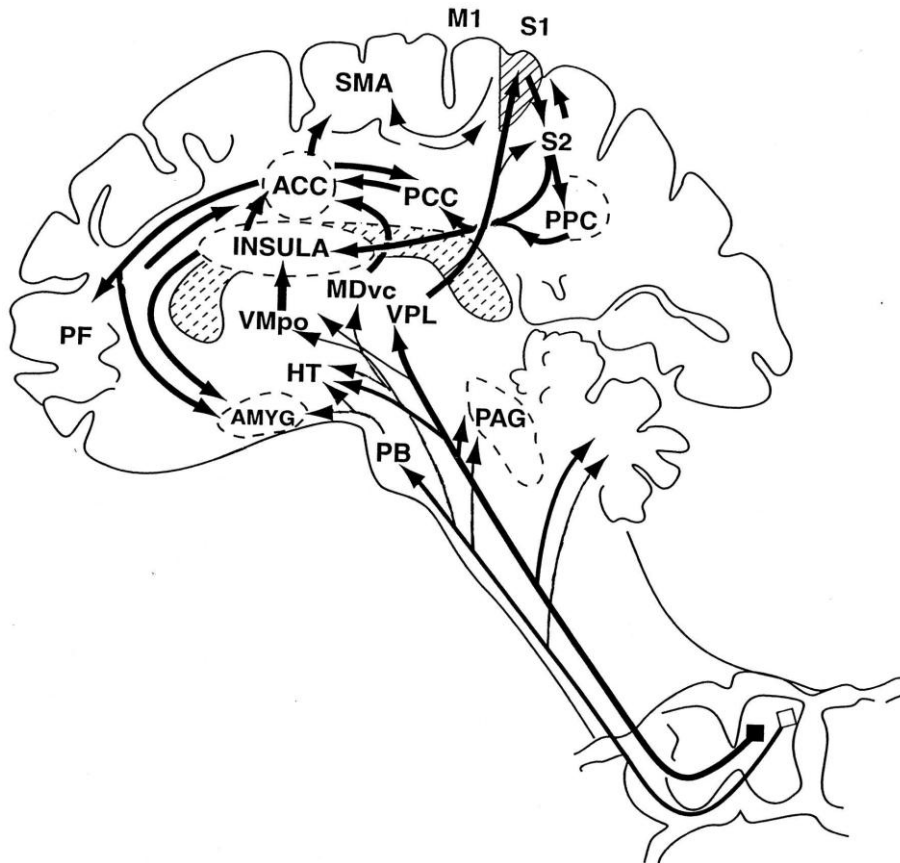


Figura 5: Vías ascendentes, estructuras subcorticales y corticales relacionadas con el procesamiento del dolor PAG, sustancia gris periacueductal; PB, núcleos parabraquiales; VMpo, núcleo ventromedial del tálamo; MDvc: núcleo dorso medial del tálamo; VPL, núcleo lateral ventro-posterior del tálamo; ACC, corteza cingular anterior; PCC, corteza cingular posterior; HT, hipotálamo; S-1 y S-2, áreas corticales somatosensoriales primera y segunda; PPC, complejo parietal posterior; SMA, área motora suplementaria; AMYG, amígdala; PF, corteza prefrontal. (Tomado de Price., 2000).

- Los procesos de atención se asocian con la corteza anterior del cíngulo, la corteza somatosensorial primaria y la corteza premotora ventral. Las respuestas vegetativas por el dolor se relacionan con la corteza anterior del cíngulo y la corteza anterior de la ínsula. Las respuestas motoras desencadenadas por dolor están relacionadas con cerebelo, putamen, globo pálido, corteza motora suplementaria, corteza premotora ventral y la corteza anterior del cíngulo (Basbaum y cols., 2009; Apkarian y cols., 2011; García-Porrero y Hurlé, 2014).

Es el conjunto de la actividad en todas esas áreas lo que constituye la base de la experiencia del dolor (Fields y cols., 2006).

1.1.2 Los sistemas de modulación del dolor

A diferencia del sistema de transmisión nociceptiva de características centrípetas y ascendente, el sistema inhibitor endógeno es descendente y centrifugo. La analgesia no es solo la interrupción de la transmisión nociceptiva, existen mecanismos de control de la información nociceptiva. Uno de los mecanismos provoca inhibición postsináptica a nivel segmentario, ya que las interneuronas inhibitorias presentes en el asta dorsal contactan con dendritas o somas de neuronas de proyección ascendente. El otro mecanismo provoca inhibición presináptica a nivel suprasegmentario a través de sinapsis axoaxónicas, este sistema de inhibición presináptica afecta a todas las fibras aferentes primarias y no sólo a las de origen nociceptivo y actúa como mecanismo de autocontrol de los impulsos aferentes de fibras sensoriales complementarias (Aliaga y cols., 2009).

Los sistemas descendentes moduladores del dolor ejercen una acción inhibitoria y activadora sobre la influencia aferente nociceptiva para ello utiliza varias sustancias como son la noradrenalina, serotonina, opioides y cannabinoides (Ossipov y cols., 2010). Los sistemas

descendentes se originan en el mesencéfalo (SGPA), región bulbar ventromedial rostral, que incluye el núcleo magno del rafe, la amígdala (Rouwette y cols., 2012), el núcleo reticular paragigantocelular y neuronas de la formación reticular adyacente. La SGPA recibe aferencias de la corteza límbica prefrontal, la amígdala, el hipotálamo y de las neuronas espinales. De este modo, convergen sobre la SGPA información acerca del estado emocional y motivacional del sujeto junto con información de la actividad de las aferencias somáticas. El balance de esta actividad sobre la SGPA permitirá regular la sensibilidad dolorosa. Existen también neuronas en la SGPA que proyectan axones descendentes al locus coeruleus, los núcleos noradrenérgicos A5 y A7 y la región bulbar ventromedial rostral. Dentro de la región rostrbulboventro medial, las señales descendentes establecen relevo en el núcleo magno del rafe y la formación reticular adyacente, desde donde parten vías descendentes que terminan en el asta posterior de la médula espinal inhibiendo o facilitando la actividad de las neuronas nociceptivas medulares. Se han descrito dos tipos de sistemas neuronales en el núcleo magno del rafe: el sistema de células on que aumenta la actividad después de un estímulo nociceptivo, permaneciendo todo el tiempo que dura la respuesta motora y favorece la transmisión del dolor, y el sistema de células off que ejerce una influencia inhibitoria sobre dicha transmisión. Ambos sistemas se influyen mutuamente y su actividad es alternante, de modo que, cuando unas se activan, las otras se inhiben. Las células off se caracterizan por interrumpir su actividad antes de que se produzca la respuesta refleja y su actividad es promovida por opioides endógenos y exógenos. (Bonica., 2001; Florez., 2007; Ossipov y cols., 2010).

1.2 Tipos de dolor

1.2.1 Dolor nociceptivo

También denominado dolor fisiológico, aparece como causa directa ante un daño somático o visceral. El *dolor somático* afecta a piel, musculo, ligamentos, articulaciones o huesos (bien localizado y circunscrito a la zona dañada y no acompañado de reacciones vegetativas). El *dolor visceral* afecta a órganos (mal localizado, referido y acompañado de reacciones vegetativas) (Bonica., 2001). El *dolor nociceptivo de tipo inflamatorio* es desencadenado por rupturas tisulares, presiones intensas, quemaduras, frío intenso y prolongado, y lesiones químicas, que dan lugar a una respuesta inflamatoria, la cual libera una gran variedad de sustancias que, a su vez, estimula directamente a los nociceptores.

Se trata de un dolor agudo, sordo, de intensidad media fuerte, de corta duración que normalmente puede controlarse si se elimina la causa de la irritación y cuya función es alertar ante estímulos nocivos intensos de tipo térmico, mecánico y químico (endógenos y exógenos). El dolor nociceptivo puede ser un estado temporal, pero a veces dependiendo de la patología puede generar estímulos recurrentes provocando un dolor nociceptivo crónico. Este tipo de dolor activa fibras de tipo C y A δ y son mediados por canales TRPV en su mayoría (Basbaum y cols., 2009) (Figura 6).

1.2.2 Dolor neuropático

De acuerdo con la IASP, el dolor neuropático resulta de una *lesión*, la cual hace referencia al daño directo del sistema sensorial o a una *enfermedad*, la cual hace referencia al daño indirecto provocado por alteraciones metabólicas, toxicidad química, procesos autoinmunes o inflamatorios, tumores, etc.

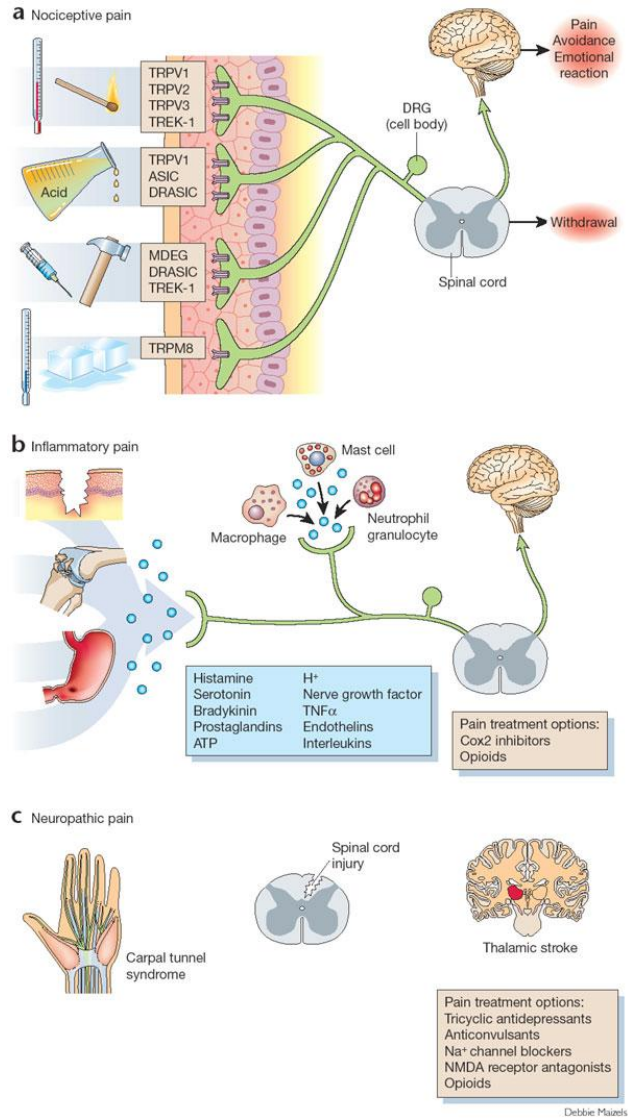


Figura 6: Dolor nociceptivo, dolor inflamatorio y dolor neuropático. A) Los estímulos nocivos son transducidos en actividad eléctrica por fibras C y A δ sensibles al calor, estímulos mecánicos, protones y frío. Esta actividad se transmite al asta dorsal de la médula espinal y a través de las vías centrales, llega a la corteza, donde se experimenta la sensación de dolor. B) Dolor inflamatorio: el tejido al dañarse libera células inflamatorias y tumorales que a su vez liberan mediadores químicos que crean una “sopa inflamatoria” que activa o modifica las propiedades de respuesta de estímulos aferentes nociceptivos. C) Dolor neuropático: surge de lesiones a o disfunción del sistema nervioso (Tomado de Scholz y Woolf, 2002).

Así, el dolor neuropático se puede clasificar en dolor neuropático periférico afecta al SNP, dolor neuropático central afecta al SNC o dolor neuropático mixto afecta al SNC y SNP (Costigan y cols., 2009; Jensen y cols., 2011). La lesión que induce la aparición del dolor neuropático debe involucrar directamente a las vías nociceptivas, aunque no todas las lesiones de las vías nociceptivas inducen dolor neuropático (Campbell y Meyer., 2006). Los principales síntomas característicos del dolor neuropático son: parestesias, dolor espontáneo, sensación de calambres, corrientes y quemazón, normalmente también refieren hipersensibilidad mecánica, al calor y en ocasiones también al frío (Baron y cols., 2010). El dolor neuropático es uno de los más complejos, es refractario a la terapia farmacológica convencional y se desconoce aún por qué después de una lesión nerviosa, sólo una pequeña proporción de pacientes desarrollan dolor neuropático, mientras que la mayoría de los pacientes no lo hace (Campbell y Meyer., 2006). Se trata de un dolor patológico que carece de función defensiva y es común que aparezca espontáneamente y de forma paroxística, es persistente ya que se puede intensificar durante semanas, meses o años, a pesar de que la lesión que lo origina ya está curada, a veces hay ausencia total de relación entre el grado de estimulación o lesión provocada y la intensidad de dolor que el paciente refiere presentando áreas en las que la sensibilidad está reducida con otras áreas que presentan un dolor exagerado (Von Hehn y cols., 2006; Bouhassira y cols., 2008) (Figura 6).

El dolor neuropático se puede clasificar según la localización de la lesión neuronal en:

- Dolor neuropático periférico; afecta al sistema somatosensorial periférico. La diabetes es la causa más común de este tipo de neuropatía, aunque también puede ser causado por lesiones

traumáticas, herpéticas, trastornos autoinmunitarios, enfermedad renal crónica, metabulopatía, exposiciones prolongadas a un frío extremo, presión directa en algún nervio, etc.

- Dolor neuropático central; afecta al sistema somatosensorial central, en la cual se produce un daño físico en el cerebro o en la medula espinal. Las causas más comunes son entre otras las lesiones medulares, infarto cerebral, esclerosis múltiple, etc.

Independientemente del sitio de origen de la lesión neuronal, existe una plasticidad anómala que afecta tanto a las sinapsis centrales como periféricas lo que provoca que ambos sistemas nerviosos se vean afectados (Costigan y cols., 2009). En el dolor neuropático la percepción patológica de las señales nociceptivas se mantiene en el tiempo, de forma que persiste esta percepción aun habiendo curado la lesión que lo origino, y esto a su vez provoca en el sistema nervioso un estado de hipersensibilidad dolorosa (hiperalgesia primaria y secundaria). El umbral nociceptivo se reduce drásticamente y puede provocar una respuesta exacerbada frente a un estímulo que en condiciones normales ya es doloroso (hiperalgesia) o provocar dolor por un estímulo que en condiciones normales no es doloroso (alodinia). Además, tras la respuesta al daño tisular se han observado cambios en la respuesta inmune y en los mecanismos de control descendentes (Campbell y Meyer., 2006).

Sensibilización periférica (hiperalgesia primaria)

Denominamos hiperalgesia primaria a la que se origina en el lugar donde se ha producido el daño y es debida, en parte, a la sensibilización del nociceptor. Los cambios periféricos que se producen en el dolor neuropático producen dolor espontaneo y brotes de dolor agudo, esto es debido a impulsos ectópicos dentro de los canales de señalización

nociceptivos. Dos poblaciones diferentes de fibras aferentes son las responsables de estas descargas ectópicas, las neuronas propiamente dañadas y sus vecinas intactas (Gracely y cols., 1992); de hecho, existen evidencias de que la actividad en las aferencias no lesionadas tiene un importante papel en el desarrollo del dolor neuropático (Yoon y cols., 1996; Liu y cols., 2000). Tras la lesión de un nervio periférico, se produce una ramificación axonal (sprouting) de las fibras dañadas, que crecerán amielinizadas hacia todas las direcciones, en un intento de regenerar la fibra nerviosa; mientras que en el extremo distal de la lesión se produce degeneración Walleriana (Zimmermann., 2001).

En el lugar donde se ha producido la lesión nerviosa se produce un aumento de las descargas ectópicas, así como un aumento en el umbral de activación de estas fibras, es decir, se activan con estímulos menores (disminución del umbral al dolor de los nociceptores) (Costigan y cols., 2009), sobre todo mecánicos en el caso de las fibras A δ (Sanders y Zimmermann., 1986) y térmicos en las C (Dickhaus y cols., 1976). Se produce una disminución del umbral de activación de diversos canales iónicos presentes en el nociceptor, destacando el TRPV1 o receptor vaniloide el cual juega un papel relevante en la sensibilización periférica permitiendo la entrada de Na⁺ y Ca⁺², tanto de la zona dañada como en la zona próxima a la lesión del tejido (Davis y cols., 2000; O'Neill y cols., 2012). La sobreexpresión de canales TRPV1 se relaciona con el desarrollo de hiperalgesia térmica neuropática, mientras que la disminución de su expresión intenta inhibir el desarrollo de hiperalgesia. La sobreexpresión de canales de Na⁺ dependientes de voltaje en las fibras lesionadas y no lesionadas condiciona un incremento de su excitabilidad que se ha relacionado con la activación ectópica de las fibras aferentes (Devor y cols., 1989; England y cols., 1996; Levinson y cols., 2012). Además, el

descenso de los canales de K^+ dependientes de voltaje contribuyen a una hiperexcitabilidad de los nervios dañados y no dañados ya que su función es la de restaurar el potencial de membrana hiperpolarizándolo y por lo tanto reduciendo la excitabilidad de la neurona (Everrill y Kocsis., 1999; Baron y cols., 2010; Tulleuda y cols., 2011). Los canales de Ca^{2+} también juegan un papel importante en la aparición de hiperlagesia y alodinia (Bridges y cols., 2001b). Así pues los cambios que se producen en el dolor neuropático en los canales Na^+ , Ca^{2+} y K^+ podría explicar no solo el dolor espontaneo sino también otro fenómeno propio del dolor neuropático, la sensibilización central.

Sensibilización central (hiperalgesia secundaria)

La alodinia e hiperalgesia secundaria adyacente a la zona de inervación de los nervios lesionados requiere que esté involucrado el SNC. Esta hiperalgesia secundaria se caracteriza por aparecer frente a estímulos mecánicos pero no térmicos. La sensibilización central es consecuencia de la hiperactividad ectópica de las fibras nerviosas que están intactas tras el daño neural (Woolf y Salter., 2006). Es responsable de un estado de facilitación y amplificación de las señales nociceptivas, que conllevan a la aparición de dolor ante un estímulo inocuo, no doloroso (alodinia) y dolor ante un estímulo que en condiciones normales es doloroso, el cual se vuelve mucho más doloroso (hiperalgesia), y esto se produce tanto en la zona de la lesión como en el territorio de inervación de los nervios lesionados (Campbell y cols., 2006; Latremoliere y Woolf., 2009) (Figura 7).

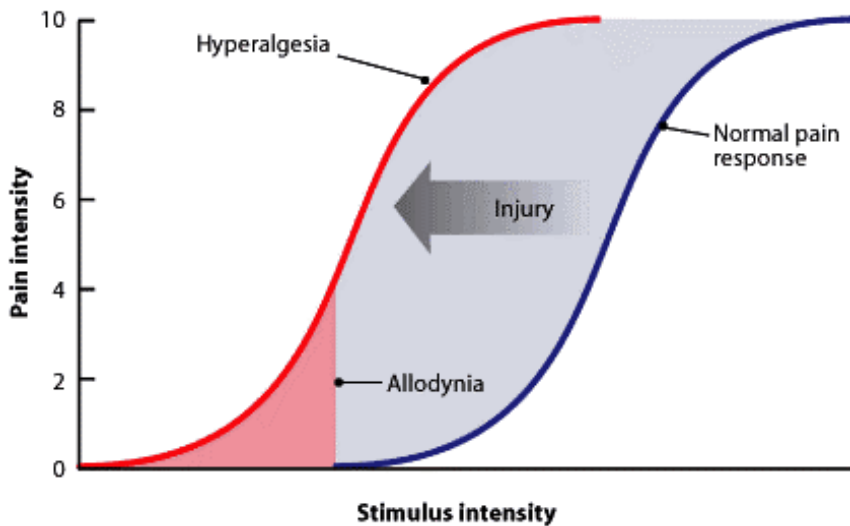


Figura 7: Grafica de hiperalgesia versus alodinia (Tomado y modificado de Cohen y cols., 2014).

Las constantes descargas de las fibras aferentes periféricas, siendo las fibras C las que fundamentalmente van a sostener y mantener esta hiperexcitabilidad, producen la liberación de aminoácidos y neuropéptidos excitatorios (sustancia P, glutamato y óxido nítrico) dentro del asta dorsal de la médula espinal que llevan a cambios postsinápticos de las neuronas nociceptoras de segundo orden, así como a una fosforilación de los receptores NMDA y AMPA y a una sobreexpresión de los canales de Na^+ dependientes de voltaje. El glutamato interactúa con receptores NMDA postsinápticos, que favorecen los efectos transcripcionales a largo plazo y también favorecen la liberación de óxido nítrico que a su vez aumenta la expresión de canales de Ca^{2+} favoreciendo la aparición del wind-up, fenómeno que supone que las fibras C respondan a estímulos más bajos que en estados no patológicos, favoreciendo así la aparición de alodinia e hiperalgesia (Liu y cols., 2012). El Ca^{2+} es el responsable de la activación

de la PKC y de la calcio calmodulina kinasa (CaMKII), principales efectores de la sensibilización central. La activación de receptores NK1 (sustancia P), TrkB (BDNF), PRGC1 (PRGC), B2 (bradicinina), etc., a través de su acoplamiento a proteínas G, promueve la liberación de Ca^{2+} de sus depósitos intracelulares, lo que también contribuye al reclutamiento de PKC y CaMKII y a la amplificación de la transmisión sináptica excitadora (Latremoliere y Woolf, 2009). Numerosas cascadas intracelulares se ven implicadas en el fenómeno de la sensibilización central, en especial el sistema de la protein-quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Ji y Wolf, 2001). Las neuronas nociceptivas específicas se convierten en neuronas de rango dinámico amplio pudiendo responder a estímulos tanto dolorosos como a inocuos. Se produce un estado de hiperexcitabilidad neuronal e incremento de la eficacia sináptica que reduce el umbral mecano-sensitivo de las fibras aferentes $A\beta$ y $A\delta$ para así activar las neuronas nociceptivas de segundo orden. Esto provoca la aparición y prevalencia en el tiempo de alodinia e hiperalgesia en el área donde se ha producido la lesión así como en las zonas adyacentes. Estos mecanismos ocurren no solo en la médula espinal, sino también en niveles supraespinales (Aloisi y cols., 1997; Baron y cols., 2010).

Sistemas inhibitorios

Las neuronas inhibitorias se encargan de restringir el desarrollo de hiperalgesia y alodinia tras lesiones neurales. La disminución de la expresión de receptores inhibitorios (en las aferencias primarias y en las neuronas postsinápticas) después de la lesión nerviosa contribuye a una sensibilización y exacerbación del dolor debido a la reducción de la transmisión de las señales supraespinales inhibitorias (Kohn y cols., 2005). El asta dorsal de la medula espinal recibe fibras aferentes desde centros supraespinales que ejercer un papel modulador en el control

descendente del dolor: una pérdida de función por parte de vías descendentes inhibitorias (opiáceas y también serotoninérgicas y noradrenérgicas) cuyo origen fundamentalmente se encuentra en la SGPA y en el locus coeruleus, contribuye en los procesos de hiperalgesia y en la sensibilización central así como en la cronificación del dolor (Fields y cols., 2006). Además de estos clásicos sistemas inhibitorios, evidencias experimentales demuestran la participación de sistemas descendentes facilitatorios de tipo serotoninérgico en las manifestaciones somáticas y emocionales del dolor neuropático (Suzuki y cols., 2004).

El dolor neuropático no sólo involucra vías neuronales, sino también a células de Schwann, células satélite del ganglio dorsal, microglía, astrocitos y componentes del sistema inmunitario (sustancia P, bradicinina, PRGC, NO, macrófagos, linfocitos T, citoquinas, etc.) (Scholz y cols., 2007; Austin y Mohalem-Taylor, 2010). Estos mediadores ocasionan una reacción inflamatoria, hiperemia y quimiotaxis contribuyendo a la sensibilidad nociceptiva e induciendo la aparición de hiperalgesia y alodinia (Costigan y cols., 2009; Chiu y cols., 2012). Estos procesos inflamatorios así como otros mecanismos como la desmielinización de los nervios dañados y la degeneración walleriana contribuyen a la activación de señales ectópicas tanto en las zonas afectadas por la lesión como en las zonas contiguas que no han sido dañadas ya que la desmielinización puede afectar a nervios donde se unen diversos nociceptores los cuales pueden no haber sido dañados. La microglía constituye una fuente importante de mediadores inflamatorios por que promueve la liberación de sustancias algogénicas y, a su vez, responde a las señales proinflamatorias liberadas por otras células no neuronales, principalmente las de origen inmune (Grace y cols., 2011; Mika y cols., 2013). La modulación de la intercomunicación neurona-

astrocito-microglía tras la lesión del SNC parece estar basada en el intercambio de moléculas como las citoquinas (Milligan y Watkins, 2009, Baron R y cols., 2010; Calvo y cols., 2012; Skaper y cols., 2012; Taves y cols., 2013). La citoquina antiinflamatoria TGF- β constituye un elemento protector clave frente al proceso de interacción neuroinmune implicado en el desarrollo de dolor neuropático, el empleo de estrategias farmacológicas ha contribuido al conocimiento de la participación de diversos miembros de la familia TGF- β en el control de la transmisión de la señal nociceptiva (Echeverry y cols., 2009; Tramullas y cols., 2010; Lantero y cols., 2012; Echeverry y cols., 2013).

Recientemente se ha demostrado la existencia de interacciones cruzadas entre la señalización TGF- β y diversos miRNAs, mediante circuitos de retroalimentación (Butz y cols., 2012). La mayoría de los elementos de la vía de señalización TGF- β están sometidos a regulación a través de miRNAs y, a su vez, la señalización TGF- β incrementa la biogénesis de un subgrupo de miRNAs, dando lugar a una interacción bidireccional. La vía de señalización de TGF- β mediada por SMADs (vía de señalización canónica) regula la biogénesis de un subgrupos de miRNAs denominados tanto a nivel transcripcional, a través de la interacción con SBE (Smad-binding elements), como a nivel post-transcripcional a través de la interacción con el complejo microprocesador Drosha (Davis y cols., 2008; Butz y cols., 2012). Es interesante destacar que algunos de los miRNAs interrelacionados con TGF- β han sido vinculados con la plasticidad neuronal aberrante que subyace al desarrollo de tolerancia a la analgesia opioide (Rodríguez., 2012). Postulamos que terapias dirigidas a modular el “crosstalk” entre señalización TGF- β y miRNAs relevantes podría constituir una estrategia alternativa para el tratamiento del dolor crónico.

2. MicroRNAs (miRNAs)

2.1 Descubrimiento y características de los miRNAs

El descubrimiento de los microRNAs (miRNAs) se produjo en 1993 durante la caracterización de los genes que controlan la coordinación del desarrollo larvario en el gusano *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Se hallaron dos pequeños RNAs regulatorios, 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 encontraron homólogos de *let-7* en otros animales, incluidos los mamíferos, con patrones de expresión similares a los observados en *C. elegans*, lo que sugería que *let-7* y quizás otros pequeños RNAs similares podrían estar desempeñando papeles ortólogos en metazoos (Pasquinelli y cols., 2000; Vella y cols., 2004). Más adelante, se observó que *lin-4* y *let-7* representan a una clase extendida de RNAs endógenos pequeños presentes en gusanos, moscas y mamíferos que se denominaron miRNAs (Lee y Ambros, 2001; Lagos-Quintana y cols., 2001; Lau y cols., 2001). Desde entonces, se han ido descubriendo miRNAs en otras especies y se conoce que múltiples organismos multicelulares expresan cientos de RNAs (Kozomara y Griffiths-Jones, 2011), los cuales poseen un patrón de expresión dependiente del tipo de célula y del tejido (Lagos-Quintana y cols., 2002).

Los miRNAs son moléculas de RNA monocatenarios, no-codificante, de 19-25 nucleótidos, cuya función es la regulación post-transcripcional de la expresión génica a través de dos mecanismos: la ydegradación del RNA mensajero diana (mRNA) o la represión traduccional del mRNA. El resultado final es una reducción de la expresión de las proteínas diana (Hobert, 2008). Se expresan en una

amplia variedad de organismos, desde plantas hasta humanos. Muchos de ellos están bien conservados entre especies, y su origen es común (Bartel, 2004; Krol y cols., 2010). En la última década, se ha puesto de manifiesto la importancia de los miRNAs como elementos reguladores clave de la expresión génica en una gran variedad de procesos fisiológicos que incluyen la supervivencia, la diferenciación, crecimiento celular y apoptosis (Valencia-Sánchez y cols., 2006; Kloosterman y Plasterk, 2006; Stefani y Slack, 2008; Gangaraju y Lin, 2009; Li y Jin, 2010). Aproximadamente el 3% de los genes humanos codifican para miRNAs, y cada miRNA regula cientos de genes. Los últimos análisis bioinformáticos predicen que aproximadamente el 50% de los mRNAs están regulados por miRNAs. En la actualidad, se han identificado más de 1700 miRNAs en el genoma humano (Qabaja y cols., 2013) y cambios en su perfil de expresión están asociados con diversas patologías humanas (Sayed y Abdellatif, 2011; Ullah y cols., 2014).

2.2 Biogénesis de los miRNAs

La mayoría de los RNAs que se han identificado en humanos son intragénicos intrónicos (44%, se localizan dentro de sus genes huésped que codifican para proteínas) e intergénicos (42%, se localizan entre los genes codificantes de proteínas) (Rodríguez y cols., 2004; Zeng, 2006; Wang, 2010). En el primer caso, la expresión de los miRNAs puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen huésped y de esta manera explicaría una especificidad tisular debida a la expresión de diferentes grupos de genes (Lin y cols., 2006; Bartel, 2009). En el segundo caso, la expresión de los miRNAs viene regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores (Zeng, 2006). También se

ha observado que los miRNAs pueden estar derivados de secuencias repetitivas de DNA (Smalheiser y Torvik, 2005).

Los miRNAs maduros derivan de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma donde realizan su función. Son transcritos por la RNA polimerasa II que produce una larga molécula de RNA que puede exceder 1kb, conocida con el nombre de miRNA primario (*pri-miRNAs*) (Lee y cols., 2004; Cai y cols., 2004). El pri-miRNA forma una estructura en *hairpin stem-loop*, la cual es cortada en el núcleo por la RNA polimerasa III conocida con el nombre de Drosha, que está asociada con la proteína DGCR8 (Síndrome de DiGeorge región crítica 8) en mamíferos o Phasa (en *Drosophila* y *C. elegans*), formando un complejo de proteínas microprocesador. Drosha escinde de forma asimétrica los pri-miRNAs dando lugar a una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada miRNA precursor (*pre-miRNAs*).

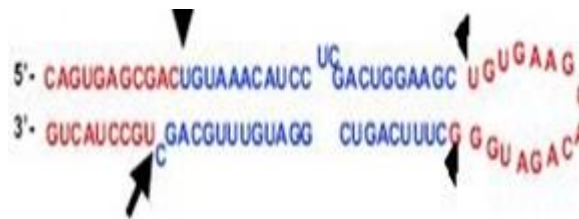


Figura 8: Estructura de tallo y burbuja de pre-miRNA 30 de humano. Los sitios de digestión de Drosha son los indicados con flecha y los de Dicer son indicados con triángulos (Tomado y modificado de Cullen., 2004).

Este pre-miRNA resultante presenta un saliente de dos nucleótidos en su extremo, un grupo hidroxilo 3' y un grupo fosfato 5' (Lee y cols., 2003; Denli y cols., 2004). El pre-miR es transportado al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP, la exportina 5, 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-miRNA. 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-miRNA es liberado del complejo exportador (Yi y cols., 2003; Lund y cols., 2004) (Figura 8). Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por la endonucleasa RNasa III Dicer, dando lugar a una molécula de doble cadena conocida como miRNA dúplex. De este miRNA dúplex, se separan las dos cadenas y una de ellas da lugar al miRNA maduro de unos 20-25 nt, 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 (Zeng, 2006; Bartel, 2009; Krol y cols., 2010). La otra cadena, conocida como miRNA*, es normalmente degradada por fragmentación o por un mecanismo de bypass (Khvorova y cols., 2003; Hwang y cols., 2004). Los componentes conocidos del complejo miRISC humano incluyen a Dicer, a las proteínas Argonata (AGO), a TRBP (HIV-1 transactivation responsive element TAR RNA-binding protein) y a PACT (una proteína de unión a ARN de doble cadena). Dicer es una enzima muy conservada en casi todos los eucariotas. 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). AGO es el enzima catalítico que corta el mRNA diana y es necesaria para la producción de

miRNA maduro, teniendo un papel en la biogénesis de los miRNAs. Se han identificado numerosos homólogos de AGO en diferentes especies, en mamíferos se han identificado cuatro (AGO1-AGO4), siendo AGO2 la única con actividad endonucleolítica, capaz de cortar el mRNA diana. (Liu y cols., 2004; Meister y cols., 2004). Las proteínas AGO contienen dos dominios de unión a RNA: un dominio PAZ que se une al extremo 3' monocatenario de los miRNA maduro (Song y cols., 2003; Yan y cols., 2003; Lingel y Izaurralde, 2004) y un dominio PIWI que se une al mRNA diana (Ma y cols., 2005; Parker y cols., 2005; Mallory y Bouche, 2008).

Los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA diana o mediante la represión traduccional (Zeng, 2006; Bartel y cols., 2009). La utilización de un mecanismo u otro dependerá del mRNA diana. Una vez el miRNA se ha incorporado al complejo citoplasmático RISC, actuará un mecanismo u otro dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con su mRNA diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del mRNA, mientras que si la complementariedad no es total o insuficiente se producirá una inhibición de la traducción (He y cols., 2004) (Figura 9). Según esto, un miRNA puede actuar sobre muchas zonas 3' UTR de un gran número de genes. Estudios de microarrays han mostrado que los miRNAs pueden inhibir muchos mRNAs diana que contengan secuencias que sean complementarias a las posiciones 2-7 del extremo 5' de un miRNA, región que se conoce como *seed sequence* o región semilla (Brennecke y cols., 2005; Lewis y cols., 2005; Chen y Rajewsky, 2006; Grimson y cols., 2007) Después de la degradación del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede guiar hacia el reconocimiento y la destrucción de mRNAs adicionales. En general, en este mecanismo de acción, la

complementariedad se puede dar tanto en regiones codificantes como en regiones 3' UTR, mientras que cuando actúa inhibiendo la traducción suele unirse a la región 3' UTR del mRNA.

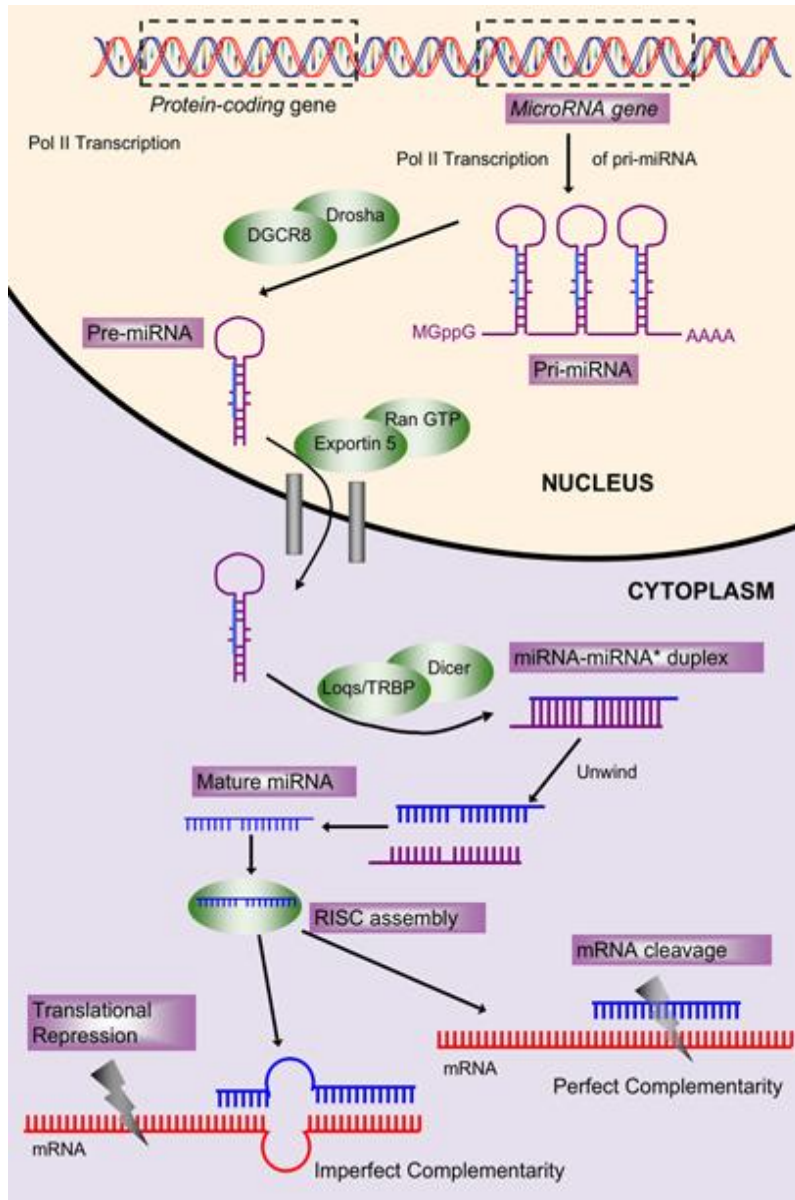


Figura 9: Biogénesis y procesamiento de los microRNAs. Los miARNs se producen a partir de miRNA precursores (pre-miRNA), que a su vez se forma a partir de un transcrito de miRNA primario (pri-miRNA). (Tomado de Kandri y cols., 2009).

En los últimos años, se ha visto que los miRNAs también dirigen la deadenilación rápida de los mRNA diana, conduciendo a un deterioro rápido del mRNA y a la reducción de sus niveles (Wu y cols., 2006).

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos que operan durante la biogénesis de los miRNAs, todavía estamos lejos de entender el proceso en su totalidad. Poco se sabe acerca de la estabilidad y la permanencia de las moléculas de miRNAs maduras. Parece que los miRNAs unidos a Ago2 son relativamente 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.

2.3 miRNA y enfermedad

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. Las publicaciones demuestran perfiles de miRNAs cuya expresión alterada está implicada en patologías humanas como el cáncer, enfermedades metabólicas, virales, cardiovasculares o del SNC (Sayed y Abdellatif, 2011; Liu y Xu, 2011; Dangwal y cols., 2012; Van Rooij y cols., 2012; Andersen y cols., 2014; Zhang y Banerjee., 2015).

Se ha observado que los miRNAs son necesarios para el desarrollo embrionario temprano, el mantenimiento de las células madre pluripotentes en el embrión, el desarrollo tisular y el desarrollo neuronal (Hallam y Jin, 1998; Bernstein y cols., 2003; Johnston y Hobert, 2003; Wienholds y cols., 2003; Yekta y cols., 2004; Horstein y cols., 2005; Ozcan, 2009; Kawahara y cols., 2012; Wu y cols., 2012).

La hematopoyesis es un proceso de diferenciación de las células sanguíneas que tiene lugar en la médula ósea, donde derivan las líneas celulares linfóide, eritroide y precursores mieloides. Algunos miRNAs pueden actuar previniendo la diferenciación de células progenitoras tempranas; otros actúan en el control de estadios terminales del desarrollo hematopoyético y otros controlan la diferenciación mieloide y eritrocitaria (Georgantas y cols., 2007).

La expresión anormal de miRNAs es una característica común de las neoplasias (Calin y Croce 2006) y los miRNAs se encuentran en prácticamente todos los tejidos del cuerpo humano. La primera enfermedad humana que se asoció con la desregulación de los miRNAs fue la leucemia linfocítica crónica (Calin y cols., 2005). Se han encontrado más tarde muchos miRNAs que tienen vínculos con algunos tipos de cáncer: cerebro, gástrico, pulmón, colon, páncreas, glioblastoma, testículos, mama, vejiga y ovario (Volinia y cols., 2006; Voorhoeve y cols., 2006; Si y cols., 2007; Yamasaki y cols., 2012; Bali y cols., 2013; Ben-Hamo y cols., 2013; Ahmed, 2014; Eissa y cols., 2014; Floyd y Purow, 2014; Hayes y cols., 2014; Thorns y cols., 2014; Zhang y cols., 2014; Syring y cols., 2015).

Los miRNAs están implicados en la regulación, desarrollo y función de las células del sistema inmune y las interacciones huésped-patógeno (Lodish y cols., 2008). Se han descrito diferentes miRNAs en el virus Epstein-Barr, en el virus asociado al sarcoma de Kaposi, en el virus de la hepatitis C y en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Jopling y cols., 2005; Lecellier y cols., 2005; Pfeffer y cols., 2005; Samols y cols., 2005; Chable-Bessia y cols., 2009; Murakami y cols., 2009).

Los miRNAs están asociados a varias enfermedades autoinmunes: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diabetes autoinmune, enfermedades de la piel, neurológicas y psiquiátrica (Stanczyk y cols., 2008; Hezova y cols., 2010; Caporali y cols., 2011; Ha., 2011; Andersen y cols., 2015; Cerda-Olmedo y cols., 2015; Gong Q y cols., 2015).

Los estudios sobre miRNAs específicos en modelos animales han identificado papeles distintos para miRNAs, tanto durante el desarrollo del corazón como en condiciones patológicas, incluyendo la regulación de los factores clave importantes para cardiogénesis, la respuesta de crecimiento hipertrófica, y la conductancia cardiaca (Corsten y cols., 2010; Kuwabara y cols., 2011; Zampetaki y cols., 2010; Fichtescherer y cols., 2010). En nuestro laboratorio hay resultados que apoyan el papel emergente de miR-21 y miR133a como reguladores de la fibrosis cardiaca y el posible valor de su nivel de expresión como biomarcador con potencial terapéutico (Villar y cols., 2012; García y cols., 2013; García y cols., 2015).

Los miRNAs juegan un papel crucial en la regulación de los progenitores de células madre, y en la diferenciación de adipocitos. Esto sugiere posibles tratamientos de la obesidad y la diabetes a nivel genético (Poy y cols., 2009; Tang y cols., 2009; Fichtescherer y cols., 2010; Frost y Olson, 2011). La pérdida progresiva de la audición, la catarata polar y los defectos esqueléticos y del crecimiento como causa hereditaria provoca la mutación de ciertos microRNAs (Lewis y cols., 2009; Mencia y cols., 2009; Hughes y cols., 2011).

Una característica que convierte a los miRNAs en moléculas particularmente atractivas desde el punto de vista clínico es su presencia en los fluidos corporales, incorporados en microvesículas y asociados a

complejos proteicos (Jin y cols., 2013). El 90% de los miRNAs extracelulares se asocian a proteínas como Ago2 (argonata 2) y el 10% están incluidos en pequeñas partículas denominadas exosomas (Hébert y cols., 2009). Los miRNAs circulantes son muy estables y se pueden detectar con gran especificidad y sensibilidad en distintos fluidos corporales; suero, plasma, saliva, orina, leche materna y lágrimas. Sin embargo, el origen y sobre todo la función de estos miRNAs circulantes sigue siendo poco conocida. Estudios recientes han demostrado que niveles circulantes de miRNAs desregulados están directamente relacionados con enfermedades o alteraciones específicas (Hébert y cols., 2009; Weber y cols., 2010; Zhu y cols., 2011; Gallego y cols., 2012; García y cols., 2013; Trebicka y cols., 2013; Xu y cols., 2015). Por ejemplo, los niveles séricos de miR-141, se han utilizado como marcador diagnóstico para diferenciar pacientes con cáncer de próstata avanzado de individuos sanos (Mitchel y cols., 2008); la relación de miR-126 y miR-182 en muestras de orina se puede utilizar para detectar el cáncer de vejiga (Hanke y cols., 2010) y la disminución de los niveles de miR-125a y miR-200a en la saliva se relaciona con el carcinoma oral de células escamosas (Park y cols., 2009). Además de estos usos potenciales para la detección de varios tipos de cáncer, otra posibilidad interesante es la utilización de los niveles de expresión de miRNAs en los fluidos específicos de cada órgano del cuerpo, para controlar las condiciones fisiopatológicas de dichos órganos. Los miRNAs extracelulares circulantes ofrecen varias ventajas potenciales como biomarcadores informativos en comparación con los biomarcadores sanguíneos basados en proteínas, ya que la mayoría de los miRNAs circulantes puede ser fácilmente detectados por PCR cuantitativa. El perfil de expresión altamente específico de varios miRNAs como miR-122 en el hígado (Trebicka y cols., 2013) y miR-499 en el

corazón (Adachi y cols., 2010), conllevaría la posibilidad de utilizar los niveles séricos de estos miRNAs para controlar con precisión el “estado de salud” de órganos específicos. La investigación de miRNAs en el LCR puede ayudar a avanzar en la comprensión de las enfermedades neurológicas, pudiendo llegar a utilizarse como biomarcador de alteraciones cerebrales como epilepsia, enfermedad de Alzheimer, como por ejemplo el miR-15b y miR-21 que se pueden medir en el líquido cefalorraquídeo (Gallego y cols., 2012). Mediante la técnica de cuantificación de la PCR se han identificado importantes niveles en LCR de miRNAs en pacientes con linfoma primario del sistema nervioso central (LPSNC), como por ejemplo miR-21, miR-19 y miR-92a. Dichos microRNAs también se han hallado en procesos inflamatorios cerebrales u otras enfermedades neurológicas (Baraniskin, 2011). Estas características han dirigido la atención a desvelar su potencial utilidad como biomarcadores de a pie de cama, con valor diagnóstico y/o pronóstico y de estratificación terapéutica en numerosas patologías (Bali y cols., 2014). Resultados recientes en nuestro laboratorio ponen de manifiesto la relación entre los niveles de expresión circulantes de miR-21 y miR 133a, y la fibrosis miocárdica en pacientes (García y cols., 2013, Villar y cols., 2011 y 2013).

2.4 miRNA en el Sistema Nervioso

Los microRNAs están altamente expresados en el SNC, e implicados en todas las funciones, incluyendo la neurogénesis, el desarrollo neural, y las respuestas celulares que tiene lugar en los procesos de plasticidad neural patológica (Li y Jin., 2010; Smith y cols., 2010; Cochella y Hobert, 2012; Goldie y Cairns, 2012; Nieto-Diaz y cols 2014; Elramah y cols., 2015). En el sistema nervioso, los miRNAs regulan

numerosos procesos durante el desarrollo embrionario (Kosik, 2006). Los miRNAs neurales están implicados en diversas etapas del desarrollo sináptico, incluyendo dendritogénesis, la formación de sinapsis y la maduración de la sinapsis (Agostini y cols., 2011).

En el humano, la expresión aberrante de diversos miRNAs se ha asociado con procesos neurodegenerativos tales como las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson, de esquizofrenia o el síndrome de Tourette (Kosik, 2006; Saugstad, 2010; Liu y Xu, 2011; Meza-Sosa y cols., 2012). Existen algunos estudios en humanos que ponen de manifiesto un papel para diversos miRNAs en las alteraciones de expresión génica asociadas a patologías inflamatorias (Alevizos y Illei 2010; Yu y cols., 2011; Gheinani y cols., 2013), por ejemplo miR-146 ha demostrado su efecto en el dolor crónico en la osteoartritis, ya que regula la respuesta inflamatoria de los receptores tipo Toll y el factor nuclear kappa B (Li y cols., 2011). Además, en pacientes con síndrome de dolor regional complejo, la correlación entre perfiles de miRNAs en sangre y marcadores de inflamación ha supuesto una herramienta útil para establecer criterios de estratificación de los pacientes (Orlova y cols., 2011; Li y cols., 2011), lo mismo ocurre en los pacientes con fibromialgia (Cerdá-Olmedo y cols., 2015).

Estudios recientes en modelos animales muestran que alteraciones en la expresión de determinados miRNAs en el SNC contribuyen a esta plasticidad patológica que subyace al dolor. Una prueba de la asociación entre miRNAs y dolor inflamatorio deriva del estudio que muestra como la delección condicionada de DICER en los nociceptores evita el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa en un modelo murino de dolor inflamatorio (Zhao y cols., 2010), tras provocar dolor inflamatorio en ratones se han observado cambios en los microRNAs en la corteza

prefrontal (Poh y cols., 2011), tras un dolor inflamatorio crónico la expresión de miR-134 se ve disminuida en el ganglio dorsal (Ni y cols., 2013), la contribución de miR-124 en la regulación de la hiperalgesia y la microglía, y el efecto en el dolor inflamatorio y neuropático (Kynast y cols., 2013), la inflamación inducida por carragenina redujo significativamente la expresión de miR-1 y miR-16 en el GRD, mientras que los niveles de miR-206 se redujeron de forma dependiente del tiempo (Kusuda y cols., 2011). Además, estudios realizados en modelos animales de dolor neuropático provocado mediante contusión medular muestran niveles de expresión de miRNAs desregulados en la médula espinal (Strickland y cols., 2015). Existen evidencias de que los miRNAs participan en los mecanismos de regulación genética, relacionados con la fisiopatología del dolor crónico, así como en el procesamiento nociceptivo tras la estimulación dolorosa aguda (Li, 2011). El dolor neuropático, resulta de lesiones o alteraciones crónicas en vías nerviosas periféricas o centrales. Se acompaña de alteraciones significativas en los patrones de expresión génica en el sistema nervioso somatosensorial, dando lugar a numerosos cambios neuroplásticos en la médula espinal, miR-133b es un determinante importante en la regeneración de los axones de la medula espinal en los peces cebra adultos (Yu y cols., 2011). Progresivamente en el tiempo se fueron realizando estudios en los que se observaba la importancia de los microRNAs en los modelos animales de dolor neuropático de diferente etiología (Von Shack y cols, 2011; Kusuda y cols., 2011; Chattopadhyay y cols., 2012; Kynast y cols., 2013 Bali y cols., 2014; Nieto-Diaz y cols., 2014; Gong y cols., 2015; McDonald y Ajit., 2015). En la Tabla 1 se resumen los miRNAs estudiados en diferentes modelos animales de dolor neuropático. Así, estudios recientes muestran la existencia de alteraciones en la expresión de varios miRNAs

(miR-96, miR-182 y miR-183, mir-30d, mir-30a, miR-125b, miR-379) en el ganglio dorsal tras la ligadura del nervio espinal, postulándose su contribución en el desarrollo de dolor neuropático crónico (Aldrich y cols., 2009; Von Schack y cols., 2011; Bali y cols., 2014). El miR-23b tiene un papel crucial en la mejora del dolor neuropático, mediante la inactivación de su gen diana NOX4, y la protección de las neuronas gabaérgicas de la muerte celular (Im y cols., 2012). El miR-195 se ve aumentado notablemente en ratas sometidas a ligadura del nervio espinal L5, representando así una nueva vía de regulación de la neuroinflamación y el dolor neuropático, ya que inhibe la activación autofágica y suprime la neuroinflamación (Shi y cols., 2013). MiR-21 está sobreexpresado en las neuronas del ganglio dorsal en la fase tardía del dolor neuropático (Sakai y cols., 2013).

Del mismo modo, se han realizado estudios que muestran la desregulación de varios miRNAs utilizando modelos de dolor neuropático tras la ligadura parcial del nervio ciático. Se ha observado una disminución en los niveles de expresión de miR-1, miR-16 y miR-206 en el GRD, sin afectar a los niveles de expresión en el asta dorsal de la medula espinal. Por el contrario, animales sometidos a una axotomía o ligadura completa del nervio ciático mostraron un incremento en los niveles de expresión de miR-1, miR-16 y miR-206, que fue directamente relacionada con el tiempo transcurrido tras la lesión nerviosa. Además, los niveles de expresión de mir-1 en el asta dorsal estaban disminuidos (Kusuda y cols., 2011). Otro estudio muestra un incremento en los niveles de expresión de miR-200b y miR-429 en las neuronas del núcleo accumbens, y transcurridos siete días de la intervención, en el proencéfalo (Imai y cols., 2011). Animales sometidos a constricción crónica del nervio ciático, mostraron un desregulación en los niveles de expresión de miR-

124, miR-494, miR-720, miR-690, miR-668, miR-500, miR-221 y miR21 en la medula espinal (Branderburger y cols., 2012; Genda y cols., 2013) un incremento en los niveles de expresión de mir-125b y mir-132 en el hipocampo (Arai y cols., 2013; Hori y cols., 2015).

MODELO (ESPINAL)	ESTRUCTURA	MIR	AUTOR
SNL (Liga. parcial espinal) rata	Ganglio dorsal	↑ miR 30d, 125b y 379	Bali y cols.,2014
SNL (Liga. parcial espinal) L5 rata	Médula espinal	↑miR21	Sakai y cols., 2013
SNL (Liga. parcial espinal) L5 rata	Médula espinal	↑miR195	Shi y cols., 2013
SNL (Liga. parcial espinal) L5 rata	Médula espinal	↓miR23b	Im y cols., 2012
SNL (Liga. parcial espinal) L5 rata	Ganglio dorsal	63 micromnas, mir-30d, 30a.....	Von Schak y cols.,2012
SNL (Liga. parcial espinal) L5rata	Ganglio dorsal	↓miR 96, 182 y 183	Aldrich y cols.,2009
MODELO (CIATICO)	ESTRUCTURA	MIR	AUTOR
CCI (ciático) rata	Hipocampo	8 micrRNAs	Hori y cols., 2015
CCI (bilateral ciático) rata	Asta dorsal	↓ miR-203	Li y cols., 2014
CCI (ciático) rata	Hipocampo	51 micromnas:↓ miR-125b y 132 y luego ↑	Arai y cols., 2013
CCI (bilateral ciático) rata	Ganglio dorsal Medula espinal	↑ miR-341 ↓ miR-203, 181a y 541	Li y cols., 2013
CCI (cronica ciático) rata	Asta dorsal	miR-500, 221 y 21	Genda y cols., 2013
CCI (ciático) rata	Médula espinal	↑ miR-494, 720, 690 y 668 ↓ miR-124	Branderburger y cols.,2012
CNL (liga. parcial ciático) Axotomia completa ciático rata	Ganglio dorsal Ganglio dorsal Médula espinal	↓ miR-1,16 y 206 ↑ miR-1, 16 y 206 ↓ miR-1	Kusuda y cols., 2011
Axotomia	Ganglio dorsal	↑mi21	Strickland y cols., 2011
CNL (liga. parcial ciático) raton	Núcleo acumbens Prosencéfalo	↓ miR-200b y 429 7 días post cirugía: ↑ miR-200b y 429	Imai y cols., 2011

Tabla 1: Dolor neuropático por lesión nerviosa y los miRNAs actualmente estudiados, y estructura en la que se ha estudiado.

La conducta nociceptiva de los animales y su respuesta a fármacos analgésicos son moduladas manipulando los niveles de expresión de miRNAs específicos con anti-miRs o miRNAs sintéticos (Niederberger y cols., 2011; Nieto-Diaz y cols., 2015). Se han desarrollado aproximaciones terapéuticas dirigidas a normalizar la expresión de miRNAs mediante oligonucleótidos sintéticos (miR-mimics), en caso de expresión reducida,

o anti-miRNAs y antagomiRNAs en caso de sobre-expresión (Van Rooij y cols., 2012; Kynast y cols., 2013; Lötsch y cols., 2013). Cada vez hay más datos convincentes en relación con el potencial terapéutico de las intervenciones dirigidas a modular la expresión de los miRNAs. Todo ello ha propiciado que la comunidad biotecnológica incluyera como dianas terapéuticas preferentes a los miRNAs (Van Rooij y cols., 2012; Kress y cols., 2013; Tan y cols., 2013; McDonald y Ajit., 2015). Así, los estudios del anti-miRNA-122 para el tratamiento de la hepatitis C se encuentran ya en la fase II de ensayos clínicos (Hydbring y Badalian., 2013).

Estudios recientes avalan el uso de diversos miRNAs en la modulación de la conducta nociceptiva. MiR-124 administrado intratecalmente en roedores previene el dolor inflamatorio inducido por carragenina y el dolor neuropático provocado por lesión nerviosa (Willemen y cols., 2012; Yunta y cols., 2012; Huo y cols., 2013); la administración intratecal de miR-96 revierte la alodinia mecánica en ratas con dolor neuropático inducido por constricción crónica del nervio ciático, asociado a la inhibición de la expresión de Nav 1.3 en el ganglio dorsal (Chen y cols., 2014); a miR-7a se le atribuye la función de aliviar el mantenimiento del dolor neuropático mediante la regulación de la excitabilidad neuronal (Sakai y cols., 2013); la administración intratecal de miR 23b, miR-103 o miR-124 alivia el dolor inflamatorio y/o neuropático (Favereaux y cols., 2011; Ponomarev y cols., 2011; Willemen y cols., 2012; Im., 2012).

Material y métodos

1. Sujetos de estudio

1.1 Animales de experimentación

El estudio se llevó a cabo en ratas Sprague Dawley, de peso comprendido entre 200 y 350 gramos, criados en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria. Hasta su utilización en el proceso experimental o su sacrificio, los animales se estabularon en grupos de tres, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ \text{C}$ 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 86/609/EEC) y siguiendo las líneas del Comité de Investigación y Ética de la International Association for the Study of Pain (Zimmermann 1983). 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.

2. Estudios conductuales de nocicepción

2.1 Valoración de la respuesta a estímulos térmicos:

Test de retirada de la cola.

Se utilizó un analgesiómetro (Letica, LI7106) que consta de una unidad de estimulación mediante una lámpara térmica y una unidad de control electrónica (figura 1). Los animales se inmovilizaron con una caja de restricción colocada en la unidad de estimulación del equipo, con la cola sobresaliendo. Se aplicó el foco calórico generado por la lámpara sobre la zona distal de la cola en tres puntos diferentes localizados a 7 cm,

5 cm y 3 cm de la punta. Una célula fotoeléctrica detectó la retirada de la cola, cuya latencia se visualizó en la unidad de control. La intensidad calórica de la lámpara se ajustó para que los valores basales de latencia de los animales se mantuvieran en 6 ± 1 s. Se estableció un tiempo de corte de 8 s para evitar daño tisular.



Figura 1. Analgesímetro utilizado para realizar el test de retirada de la cola. Aparato donde se inmoviliza al animal y se cuantifica el tiempo que tarda en retirar su cola cuando se le aplica directamente sobre ella un haz de luz de una intensidad deseada.

2.2 Valoración de la respuesta a estímulos mecánicos: Test de von Frey.

Los animales se introdujeron de forma individualizada en un compartimento con suelo de rejilla, donde su movilidad quedaba reducida. Tras un periodo de adaptación al nuevo habitáculo de 10 min, se aplicaron a la superficie plantar de las patas traseras una batería de monofilamentos de von Frey (Semmes Weinstein von Frey Aesthesiometer for Touch Assessment, Stoelting Co, Illinois EEUU) graduados en función de la presión en gramos que generan (figura 2).

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 el 50% de las respuestas de retirada de la pata trasera.



Figura 2. Juego de monofilamentos de von Frey utilizado para inducir estímulos mecánicos en la superficie plantar de las patas traseras de los animales.

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 el 50% de las respuestas de retirada de la pata trasera.

2.3 Valoración de la respuesta a estímulos químico-inflamatorios: test de la formalina

Para la valoración de la respuesta nociceptiva en un modelo de inflamación agudo se utilizó el test de la formalina. Este test consiste en la inyección subcutánea de 50 μ l de formalina (formaldehído 5% en H₂O destilada) en la planta de la pata trasera. La primera fase de la prueba (0-5 min) refleja dolor nociceptivo provocado por la irritación química de la formalina. La segunda fase (20-60 min) refleja dolor inflamatorio con sensibilización central (Shields y cols., 2010) (figura 3). En ambas fases se valoró como conducta dolorosa el tiempo de lamido.

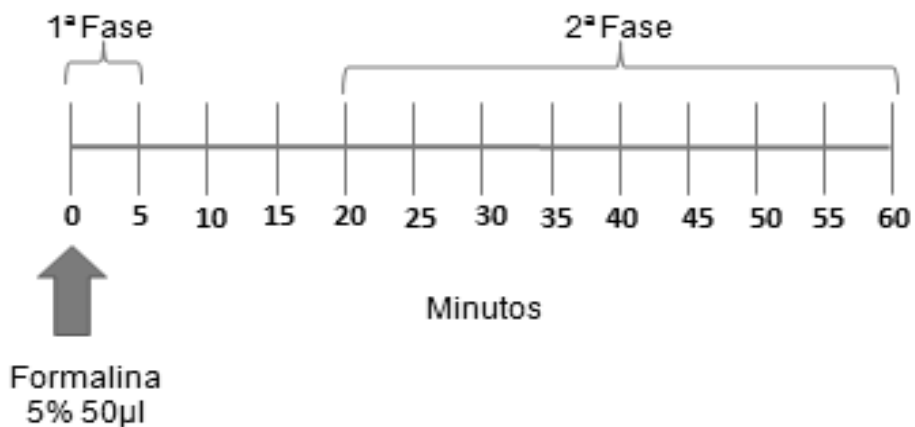


Figura 3: Protocolo experimental del test de la formalina.

3. Modelos de dolor crónico neuropático

Para la realización de esta Tesis Doctoral se eligieron dos modelos de neuropatía periférica, uno de ellos de origen traumático, mediante la lesión del nervio ciático y otro de origen isquémico, mediante la obstrucción por trombosis de la arteria femoral.

3.1 Modelo de neuropatía periférica traumática: denervación parcial del nervio ciático (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®, 11/min al 2,5-3 %) se realizó una incisión en la piel del muslo de la pata izquierda de aproximadamente 2 cm a la altura del fémur y paralela a él. Se disecó el músculo femoral, exponiendo el nervio ciático a la altura de la trifurcación de sus tres ramas: sural, tibial y peroneal. En este modelo de dolor crónico neuropático, 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 posteriormente se realiza la axotomía de ambas ramas, dejando intacta la rama sural (figura 4). Se tuvo especial cuidado en evitar el contacto o el estiramiento de la rama sural. Una vez realizada la lesión nerviosa, se suturó la musculatura y la piel con sutura Vicryl® 5-0s (Ethicon, Johnson and Johnson). En los animales control (*sham*), se realizó el mismo proceso quirúrgico de exposición del nervio ciático y sus tres ramas terminales, pero no se provocó lesión nerviosa.



Figura 4. Fotografías representativas de la intervención quirúrgica. A) Se muestra el nervio ciático con sus tres ramas: tibial, peroneal (ligadas) y sural (libre) antes de la lesión B) y tras la axotomía de las ramas tibial y peroneal. La rama sural se mantuvo intacta.

Los animales con neuropatía presentaron hiperalgesia y alodinia a estímulos mecánicos en la zona inervada por la rama sural (zona externa de la pata, correspondiente a los dedos 4° y 5°), y evitan apoyarse en la pata lesionada, modificando su postura tratando de protegerla (figura 5). Se valoró el grado de hiperalgesia y alodinia mecánicas desarrolladas mediante estimulación con monofilamentos de von Frey. Se realizó la valoración el día antes de la intervención (basal) y todos los días posteriores a la intervención hasta el sacrificio. La neuropatía se hizo evidente a partir del 5° día tras la cirugía, siendo el día 10° el punto álgido, en cuanto a la severidad de alodinia e hiperalgesia. La alodinia y la hiperalgesia mecánicas se mantuvieron durante al menos 2 meses tras la cirugía.

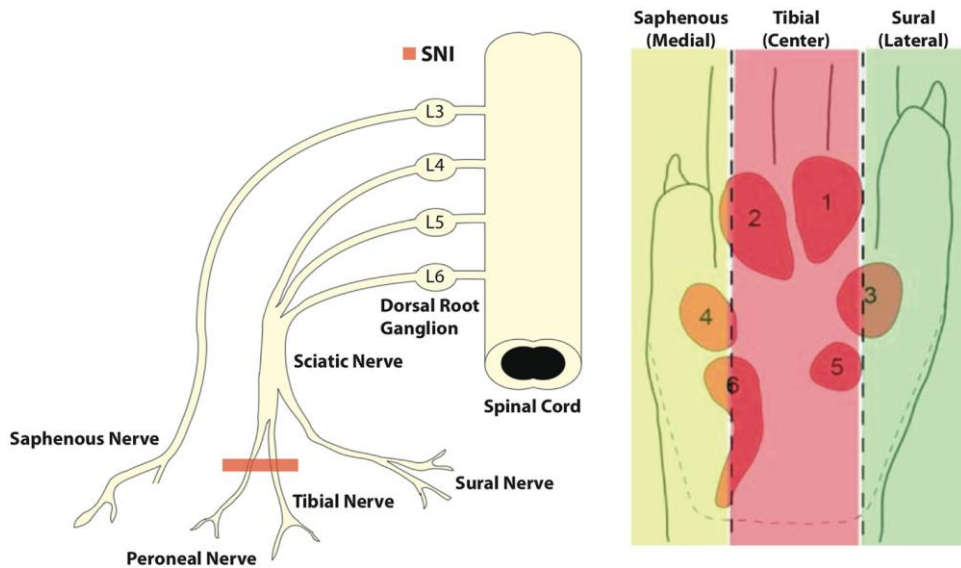


Figura 5. Diagrama de los nervios ciático y safeno, con sus ramas terminales y sus orígenes en los ganglios raquídeos dorsales. Diferentes zonas de la zona dorsal y ventral de la pata del animal inervadas por las ramas del nervio ciático y el nervio safeno. Tomado de Duraku y cols., 2012.

No se observaron conductas de autotomía de dedos o uñas. Los animales sometidos a lesión nerviosa también presentaron alodinia e hiperalgesia en la pata contralateral (dolor en espejo) (Koltzenburg y cols., 1999; Obata y cols., 2010).

3.2 Modelo de neuropatía periférica isquémica: trombosis de la arteria femoral

El modelo de neuropatía isquémica fue descrito en ratas por Hyoung-Sig Seo (2008). Este modelo de dolor isquémico se provocó por la trombosis de la arteria femoral mediante aplicación de cloruro ferroso (Figura 6).

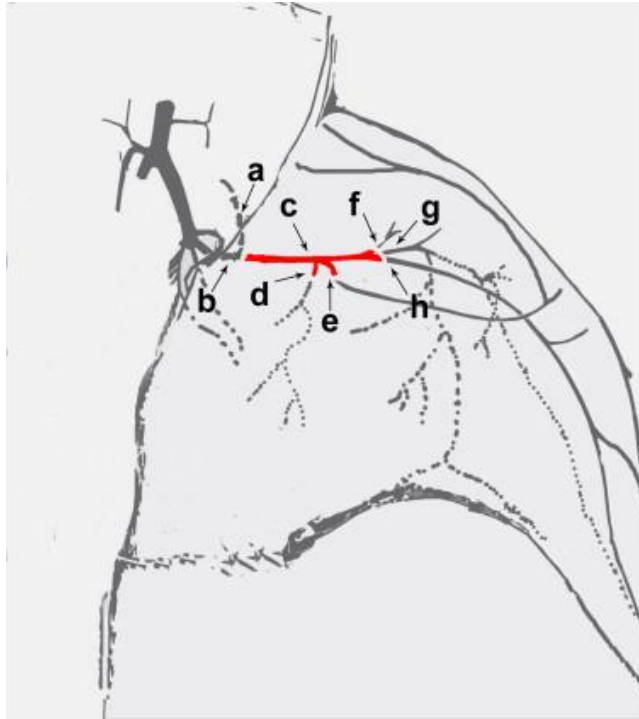


Figura 6: Imagen arterias rata: A) Arteria circunfleja iliaca superficial B) Arteria iliaca externa C) Arteria femoral D) Arteria femoral profunda E) Arteria epigástrica superficial F) Rama genicular descendente G) Arteria poplítea H) Arteria safena.

Bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane®, 11/min al 2,5-3 %), se realizó una incisión en el triángulo femoral de la extremidad posterior izquierda de 1cm aproximadamente, exponiendo el nervio, la arteria y la vena femoral. Se disecó la arteria femoral y se colocó un fragmento (1 x 2,5cm) de film resistente a la humedad (Parafilm, Chicago, IL, USA) para prevenir posibles daños por cloruro ferroso en las estructuras próximas. Se envolvió la arteria femoral con un pedazo (0,5 x 0,5 cm) de papel de filtro; No.2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japón) empapado con una solución de cloruro ferroso al 20% ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma, St Louis, MO, USA) durante 20 min. Tras la retirada del FeCl_2 ,

lavamos la zona con H₂O destilada (con pipeta de 20 µl) para eliminar posibles restos que pudieran dañar las estructuras de alrededor. Una vez realizada la lesión se suturó la musculatura y la piel con Vicryl® 5-0s (Ethicon; Johnson and Johnson) (Figura 7). En los animales control (*sham*), se realizó el mismo proceso de exposición del paquete arteriovenoso, pero no se provocó lesión.

Los animales con neuropatía presentaron hiperalgesia y alodinia mecánica en la zona interna de la pata (dedos 1° y 2°), inervada por el nervio sensitivo safeno, rama del nervio femoral. Se valoró el grado de hiperalgesia y alodinia mecánicas desarrolladas mediante estímulos con monofilamentos de von Frey. Se realizó la valoración el día antes de la intervención (basal) y todos los días posteriores a la intervención hasta su sacrificio. La neuropatía se hizo evidente a partir de las 72 h de la operación, siendo el día 13° el punto álgido, en cuanto a la severidad de alodinia e hiperalgesia. La neuropatía se mantuvo durante al menos 30 días tras la lesión. No se observaron conductas de autotomía de dedos o uñas. Al igual que en el modelo de denervación traumática, los animales mostraron alodinia e hiperalgesia mecánicas en la pata contralateral (dolor en espejo).

4. Seguimiento ecográfico

Para verificar la formación de un trombo en la arteria femoral y sus consecuencias, se utilizó un ecógrafo Vevo 770 (Visual Sonics) con transductores de 30 MHz de alta resolución y software de análisis específico. Se realizaron registros ecográficos preoperatorios y transcurridos 13 días tras la cirugía. Los animales se anestesiaron por vía inhalatoria con Isoflurano (Forane®, 11/min, al 2-2,5% en oxígeno). El animal, una vez anestesiado, y depilada la pata ipsilateral, se colocó en

decúbito supino sobre una plataforma micromanipulable, a 37° C. Se registraron el diámetro y el flujo de la arteria femoral.

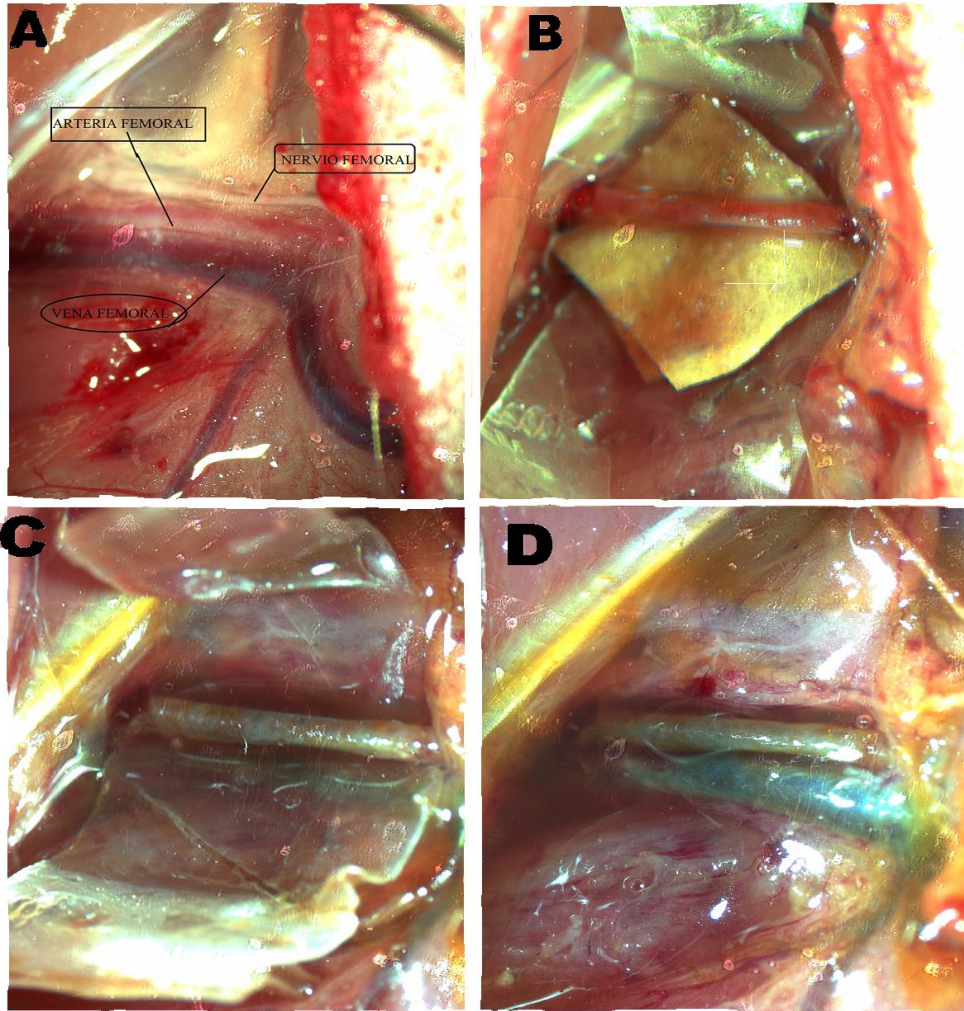


Figura 7. Fotografías representativas de la intervención quirúrgica. A) Se muestra el paquete arterio-venoso, con el nervio femoral (parte superior), la arteria femoral y la vena femoral (parte inferior). B) Arteria femoral una vez disecada y cubierta con el film y el papel de filtro empapado con FeCl₂ antes de la lesión y C) transcurridos 20 min. D) Imagen de la zona tras haber limpiado todo resto de FeCl₂.

5. Tratamientos y grupos experimentales

Se determinó en ratas los efectos del tratamiento con miR-30c y su antagonismo sobre la percepción nociceptiva, en modelos de dolor agudo y crónico neuropático. Todos los grupos experimentales estuvieron constituidos por un mínimo de 8 ratas. Los tratamientos se administraron en la cisterna magna de forma aguda (inyección única) o crónica (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 (en 5ml de H₂O destilada)

NaCl-----0,0866 g

KCl-----0,00224 g

CaCl₂ + 2H₂O-----0,00206 g

MgCl₂ + 6H₂O-----0,00163 g

- Solución B (en 5ml de H₂O destilada)

Na₂HPO₄ + 7H₂O-----0,00214 g

NaH₂PO₄ + H₂O-----0,00027 g

Las ratas, bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane®, 11/min al 2,5-3 %), se colocaron en un cuadro esterotáxico, con el cuerpo en posición horizontal y la cabeza inclinada 45° con respecto al cuerpo (figura 8).

Se depiló y desinfectó con etanol al 70% la zona occipital. Se introdujo una aguja de 25 g 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.



Figura 8. Extracción de LCR en rata, colocada en el aparato de extereotáxia.

Mir-30c mimic (mirVana[®] miR-mimic, Life Technologies, UGUAACAUCUACACUCUCAGC), mir-30c inhibidor (mirVana[®] miR-inhibidor, Life Technologies) se administraron a la dosis de 100 ng en un volumen de 10 μ l. 24h después de su administración se valoraron los efectos en las diferentes pruebas de dolor agudo (dosis única) (figura 9).

Para los ensayos de dolor crónico, se administró una dosis inicial antes de la cirugía y se repitió la administración en días alternos tras la lesión nerviosa durante 5 días en el caso de la administración de mir-30c y de 10 días en el caso de la administración de mir-30c inhibidor (figura 10). Los animales sham recibieron inyecciones de vehículo compuesto por LCR artificial (9.26 μ l) y lipofectamina (0.74 μ l) siguiendo protocolos idénticos.

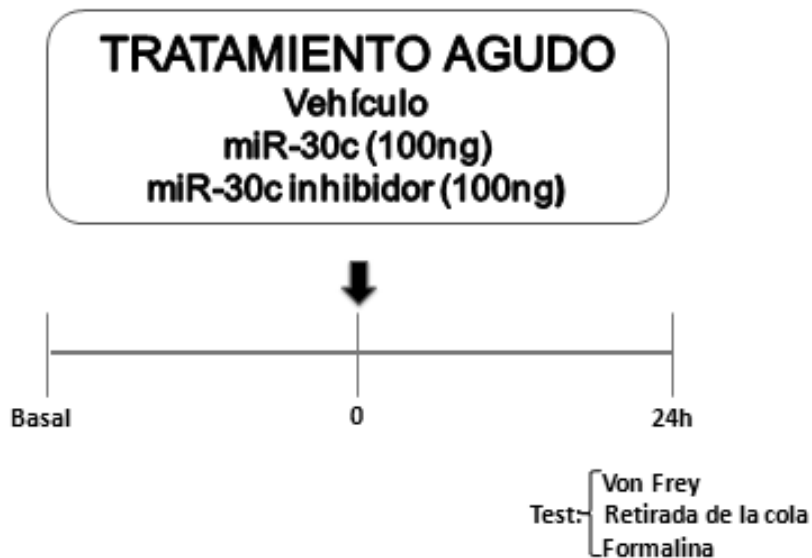


Figura 9: Protocolo experimental tratamiento agudo, dosis de 100ng de tratamiento a un volumen final de 10 µl. Se valoró su efecto tras una dosis única, 24h después de su administración en diferentes pruebas de dolor agudo.

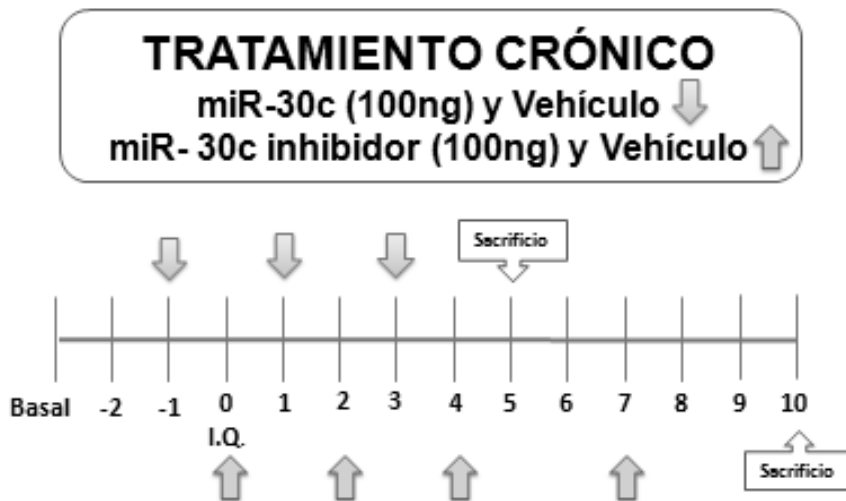


Figura 10. Protocolo experimental tratamiento crónico, dosis de 100ng de tratamiento a un volumen final de 10 µl. Se valoró su efecto mediante estímulos con monofilamentos de von Frey todos los días posteriores a la intervención hasta el sacrificio para valorar el grado de hiperalgesia y alodinia mecánicas desarrolladas.

6. Extracción de muestras de plasma, líquido cefalorraquídeo y tejidos

6.1 LCR

Se utilizaron los mismos procedimientos de anestesia e inmovilización descritos en la sección de tratamientos. Se introdujo en la cisterna magna (Figura 7) 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° 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.

6.2 Plasma

Bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane®, 11/min al 2,5-3 %) se extrajo sangre mediante dos técnicas, una utilizada mientras se realiza el estudio experimental por el seno retroorbital y otra cuando el animal va a ser sacrificado a través de las venas yugulares. Por capilaridad del seno retroorbital se recogió la sangre (12-14 gotas) en un tubo estéril que contenía una solución de 50mg/ml de EDTA (40 μ l). El día del sacrificio la sangre (2 ml) se obtuvo por decapitación con guillotina y se recogió en tubos estériles que contenían una solución de 50mg/ml de EDTA (60 μ l). A continuación, en ambos casos las muestras se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 10 min y posteriormente el plasma se almacenó a -80° C hasta su posterior uso.

6.3 Médula espinal

Los animales se decapitaron bajo anestesia inhalatoria con isofluorano 2%. Las medulas espinales se extrajeron mediante

hidroextrusión. Tras la decapitación del animal, se realizó un corte transversal de la columna vertebral a la altura de la cresta iliaca; a través del orificio distal del canal vertebral se conectó una aguja de punción lumbar conectada a una jeringa de 15 ml con suero fisiológico (0.9 % NaCl) y se ejerció presión hasta que la médula espinal salió por el orificio proximal. Las médulas se diseccionaron por la línea media para separar las dos hemi médulas espinales (ipsilateral y contralateral) de las que se extrajo la región lumbar. Las muestras se congelaron en nieve carbónica para su posterior almacenamiento a -80° C hasta ser procesadas para la obtención de miRs y RNAm.

6.4 Arteria femoral

Una vez obtenidas las muestras de LCR, plasma y médula espinal, se extrajeron las arterias femorales mediante una incisión en el triángulo femoral de la extremidad posterior ipsilateral a la lesión. Las arterias se fijaron en paraformaldeído (PFA) preparado fresco al 4% en PBS (solución de tampón fosfato, pH 7) durante 24h, en cámara fría a 4° C, en agitación. Una vez fijado, el tejido fue lavado con PBS para eliminar restos de PFA y se incubó en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en PBS en agitación a 4° C durante 3 días aproximadamente. Finalmente, los tejidos se incluyeron en moldes con medio O.C.T.TM (Tissue-TeKc, Sakura) y se almacenaron a -80° C hasta su posterior uso. En estos bloques se realizaron cortes de 8 a 15 µm de grosor en un criostato (Microm HM 550P) y se montaron en portaobjetos ionizados (Thermo Scientific, Menzel-Gläser Superfrost Plus). Los cortes se conservaron a -20° C hasta su uso.

6.5 Nervios ciático, femoral y safeno.

Se extrajeron los nervios mediante una incisión en el triángulo femoral de la extremidad posterior ipsilateral a la lesión. Se fijaron en PFA al 4% en PBS durante 2h. Se realizaron cortes de 2mm de los nervios con un bisturí que se postfijaron en PFA al 4% durante 1h más. Posteriormente, las muestras se lavaron en una solución de tampón fosfato 0,12M (2 X 15 min) y se almacenaron a 4° C durante 2-3 días hasta su procesamiento.

7. Tinción de la arteria femoral con hematoxilina-eosina

Para la tinción con hematoxilina-eosina se utilizaron secciones de arteria femoral fijadas y criopreservadas, incluidas en bloques de Tissu-Tek. Los tejidos se descongelaron gradualmente y se hidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones decrecientes de etanol (100%: 3min; 96%: 3 min; 70%: 3 min; 50%: 3 min); y en H₂O destilada durante 1 min. Los tejidos se introdujeron en una solución de hematoxilina durante 9 min (la hematoxilina se preparo diluyendo hematoxilina alcohólica del 10% al 0.5 % en H₂O destilada). Se realizaron dos lavados, uno con alcohol acido al 1% (durante unos segundos) y otro en H₂O destilada (5 min), observando un color azulado en las muestras. A continuación se introdujeron los tejidos en una solución de eosina durante 3 min (la preparación de la eosina se realiza mezclando 100 ml de eosina Y acuosa comercial al 3%, con 125ml de etanol al 100%, 375 ml de H₂O destilada y unas gotas de ácido acético glacial). Una vez completado el proceso de tinción, se realizó un lavado con H₂O destilada y los cortes se deshidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de etanol (96%: 2 min; 100%: 2 X 2 min), seguidos por dos baños de xilol de 5 min cada uno. Las preparaciones se montaron con medio de inclusión

DPX (Fluka Sigma-Aldrich) y se observaron al microscopio óptico acoplado a una cámara fotográfica (Leica DMIRB).

8. Microscopía electrónica de transmisión

Se utilizaron muestras de nervio ciático, femoral y safeno fijadas y mantenidas en tampón fosfato 0,12M (pH 7,4). Los tejidos se fijaron en una solución de tetróxido de osmio al 2%, protegido de la luz, durante 3-4 h a temperatura ambiente, hasta que las muestras estuvieron completamente negras. Se realizaron dos lavados con solución de lavado (pH 4,5-4,6) de 15 min a 4° C. A continuación, los tejidos se incubaron en una solución de contraste de uranilo a 4° C durante 90 min. Se lavaron las muestras con solución de lavado (2 X 15 min) a 4° C y se deshidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de acetona (15%: 5s; 30%: 10 min; 50%:10 min; 70%: 10 min; 80%: 15 min; 95%: 2 X 10 min; 100% anhidra: 2 X 10 min). A continuación, se procedió a la inclusión en araldita (Durcupan) mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes de araldita en acetona anhidra (25%: 2 h; 50%: 2h; 90%: 2h; 100%: toda la noche) a T^a ambiente, siguiendo las indicaciones del fabricante (ACM, Fluka AG, Suiza). A la mañana siguiente, los nervios se embebieron en araldita nueva durante 2h a T^a ambiente. Finalmente se incluyeron los nervios en moldes de silicona con araldita a 60° durante 3 días para la adecuada polimerización. Se realizaron cortes semifinos de 1 µm, se montaron en portaobjetos ionizados y se tiñeron con azul de toluidina al 1%. Se tomaron imágenes en un microscopio óptico (AxiosKop2 plus) acoplado a una cámara de video (AxioCam HRC Zeiss), para posteriormente acoplarlas a un analizador de imágenes.

Tampones y soluciones utilizados

Ácido ósmico.

Glucosa.....	0,07 gr
H ₂ O destilada	150 µl
Tampón Fosfato 0,4M (pH 7,2-7,4)	250 µl
Cl ₂ Ca 0,5%.....	12,5 µl
O ₄ Os 4%.....	500 µl

Solución Madre

Acido maléico.....	0,232 gr
NaOH.....	0.080 gr
H ₂ O destilada hasta.....	10 ml

Se almacena a 4° C.

Solución de lavado

Solución madre.....	2 ml
NaOH 0,2N	180 µl
H ₂ O destilada.....	5 ml

Solución de contraste con uranilo

H ₂ O destilada.....	1,3 ml
Solución Madre (pH 4,5-4,6).....,.....	600 µl
NaOH 0,2N	400 µl
Acetato de uranilo.....	50 mg

La solución se filtra con un filtro minisart de 0,20 µm acoplado a una jeringa. Se mantiene en oscuridad a 4° C.

Preparación resina sintética Durcupan Fluka (araldita)

Mezcla A

- Componente A/M o epoxiresina (chemika 4411).....100 ml
- Componente B o endurecedor (chemika 44612).....100 ml
- Componente D o plastificante (chemika 44614).....10 ml

Mezcla B

- Mezcla A.....210 ml
- Componente C o acelerador (44613).....1,8 ml

9. Determinación de la expresión de RNAm y miRNAs mediante PCR cuantitativa**9.1 Extracción de RNAm y miRNA****9.1.1 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 770 μ l de Trizol, 20 μ l de ácido Acético 5N y 1,6 μ l de glicógeno (19-22 mg/ml; SIGMA Aldrich) a 250 μ l de plasma o 100 μ 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 μ 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° 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° 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 H₂O 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° C. Se eliminó el etanol por decantación y evaporación (aproximadamente 30 min) y se resuspendieron las muestras en 20 µl de H₂O DEPC. Las muestras se incubaron a 50° C durante 5 min y se almacenaron a -80° C hasta su uso.

9.1.2 Extracción de RNAm y miRNAs de médula espinal

Se utilizó el kit (Nucleo Spin[®] miRNA; Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. A las muestras se les añadieron 800 µl de Trizol y se homogeneizaron en un politrón. Se agitaron en un vórtex durante 15s y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de Trizol, se agitaron en un vortex durante 15s y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 15 min a 4° C. Se recogió la fase acuosa sobrenadante (aproximadamente 400 µl) y se añadieron 200 µl de etanol al 100%. Se agitó la mezcla durante 5s y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se eluyeron a través de columnas de purificación suministradas por el kit y se centrifugaron a 11.000 r.p.m. durante 30 s. En la columna queda retenido el RNA y en el eluido se recoge el miRNA.

El RNAm se purificó usando los diferentes tampones suministrados en el kit (MDB, MX, MW1 y MW2). Las columnas se colocaron en tubos estériles, se añadieron 350 µl de MDB y se centrifugaron a 11.000 r.p.m. durante 1 min. A continuación, se añadieron 60 µl de DNasa y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Las columnas se lavaron con 600 µl de MW1 y se centrifugaron a 11.000 r.p.m. durante 30 s. Se realizó un segundo lavado de las columnas con 700 µl de MW2 y se centrifugaron a 11.000 r.p.m. durante 60 s. Las eluciones, que contienen los miRNAs, se conservaron para su posterior purificación.

Finalmente, se colocaron las columnas en tubos estériles y se añadieron 30 μ l de H₂O libre de RNasa. Las muestras recogidas se centrifugaron a 11.000 r.p.m. 1 min y se incubaron durante 1 min a temperatura ambiente. El eluido final, que contiene el RNA, se guardó a -80° C hasta su uso.

Para la purificación de miRNAs se añadieron 800 μ l de MX a las eluciones obtenidas previamente, se agitaron las mezclas en un vortex durante 5 s y pasaron a través de nuevas columnas de purificación. Se centrifugaron a 11.000 r.p.m. durante 30 s, descartando el eluido para posteriormente lavar la columna con diferentes tampones suministrados en el kit. Se lavaron las columnas con 600 μ l de MW1 y se centrifugaron a 11.000 r.p.m. durante 30 s. Se descartó el eluido y se repitió el proceso de lavado de la columna añadiendo 700 μ l de MW2 y centrifugando nuevamente a 11000 r.p.m. durante 60 s. Se transfirió la columna a un tubo estéril y se lavó con 30 μ l de H₂O libre de RNasa. Se centrifugaron a 11000 r.p.m. durante 1 min y se incubaron durante 1 min a temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron a -80° C para su posterior uso.

9.2 Determinación de la concentración y pureza del RNAm y miRNA

Para determinar la concentración y pureza del RNAm y miRNA, se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific Inc) que permite trabajar con 2 μ 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 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.

9.3 Transcripción inversa de RNA y miRNA

La reacción de la transcripción inversa del RNA (RT-PCR) y 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 del RNA se utilizó un kit comercial de RT-PCR (Revert-aidTM Minus First Strand cDNA Synthesis kit, Fermentas). Para la reacción se usó 1 µg de RNA al que se añadió 1 µl de cebadores genéricos y la cantidad de H₂O DEPC necesaria para alcanzar 12 µl. Esta primera mezcla se incubó a 70° C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 4 µl de tampón de reacción (5X), 1 µl de enzima inhibidora de RNAasas (Ribolock Ribonuclease Inhibitor) y 2 µl de una solución 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente y se añadió 1 µl de la enzima transcriptasa inversa, responsable del proceso de retrotranscripción. Una vez completados estos pasos, las muestras se introdujeron en un termociclador (MyCycler, Bio-Rad Laboratories Inc) programando las siguientes condiciones de reacción: 10 min a 25° C; 60 min a 42° C; 10 min a 70° C; un último ciclo para el mantenimiento de las muestras a 4° C. El DNAc obtenido se conservó a -20° C hasta su utilización.

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 50 ng en el caso del tejido. Se añadieron la cantidad de H₂O 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.

Los miRNAs utilizados como control interno fueron, RNU6B (tejidos) y cell-miR39 (fluidos) añadidos a las muestras durante el proceso de extracción. La muestra total (15 μ l) 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.

9.4 PCR cuantitativa

Los niveles de expresión de genes y 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 RNAm se normalizó utilizando como gen de referencia el que codifica la subunidad ribosomal 18S. La expresión de los miRNAs en tejido se 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 Mg²⁺ 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 μ l que contenían 0,5 μ l del producto de la μ RT-PCR, 5 μ l de mastermix, 0,25 μ l de sonda TaqMan® y 4,25 μ l de H₂O 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. Para cuantificar la expresión

de RNAm, la reacción se llevó a cabo por duplicado, en un volumen de 10 μl que contenían 0,5 μl del producto de la RT-PCR, 5 μl de mastermix, 0,25 μl de la sonda TaqMan® problema, 0,5 μl de la sonda de la subunidad ribosomal 18S y 3,75 μl de H₂O DEPC. El número de copias de los genes problema y de referencia se cuantificó simultáneamente en cada muestra, utilizando marcadores fluorescentes con longitudes de onda diferentes: HEX para el gen de referencia y FAM para el gen problema.

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: $2^{(\text{Ct de referencia} - \text{Ct problema})}$; 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.

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Inc., CA, USA). Los valores se expresaron como la media \pm EEM de la n definitiva de animales por grupo. Se utilizó el test de la t de Student para valorar las diferencias entre

dos medias de variables continuas. Los datos de los estudios conductuales se compararon mediante ANOVA de 1 vía de medidas repetidas seguido del test de Bonferroni. Para la comparación de los valores de expresión génica entre más de dos grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Se realizó análisis de regresión lineal simple de Pearson para correlacionar niveles de expresión génica entre sí. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05.

Resultados

1. Modelo de neuropatía periférica inducida por lesión del nervio ciático

1.1. Curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica

Se evaluó el desarrollo de alodinia mecánica en un modelo experimental de axotomía parcial del nervio ciático (**spared nerve injury**) que pretende reproducir el dolor crónico neuropático provocado por una lesión nerviosa en humanos. Se valoró la respuesta nocifensiva de las patas traseras ipsilateral y contralateral frente a estímulos mecánicos de fuerza creciente mediante monofilamentos de von Frey, un día antes (respuesta basal) y diariamente durante un periodo de 10 días a partir de la lesión del nervio ciático. En los animales control (sham-operated) se evaluó la sensibilidad táctil en condiciones basales y transcurridos 10 días desde la exposición del nervio ciático sin lesión.

Los animales sometidos a lesión del nervio ciático mostraron un decremento progresivo y significativo del umbral de retirada de la pata trasera ipsilateral a la lesión, alcanzando una respuesta alodínica máxima a los 10 días de la lesión (Lesión nerviosa: $9,4 \pm 2.3$ vs Control: 70 ± 10 , $t=8,4$, $p < 0,001$, Figura 1A). Por el contrario, los animales control no modificaron su umbral de retirada de la pata ipsilateral trasera. Las ratas sometidas a lesión ciática mostraron un umbral nociceptivo frente al estímulo mecánico menor que las ratas control durante todo el periodo de seguimiento. (“lesión nerviosa”: $F_{(1,11)} = 10,6$, $p < 0,01$).

En la Figura 1C se muestran los resultados obtenidos el día 10 tras la lesión nerviosa, momento en el cual las ratas mostraron una intensa alodinia mecánica (“lesión nerviosa”: $F_{(1,11)} = 28,9$ $p < 0,001$) que se reflejó

en un incremento del porcentaje de respuestas positivas conforme se aumentó la intensidad de la fuerza aplicada (“intensidad de fuerza por lesión nerviosa”: $F_{(9,99)}= 9,5$ $p<0,001$). La respuesta nocifensiva de las ratas control no se modificó. En los animales sometidos a la lesión ciática observamos que la pata contralateral también mostraba alodinia e hiperalgesia mecánicas durante los 10 días de seguimiento (“lesión nerviosa”: $F_{(1,9)}=35,0$ $p<0,001$, Figura 1B), aunque de menor intensidad que en la pata ipsilateral (“lesión nerviosa”: $F_{(1,10)}= 20,4$ $p<0,001$; “intensidad de fuerza por lesión nerviosa”: $F_{(9,99)}= 6,1$ $p<0,001$, Figura 1D).

1.2. Niveles de expresión de miR-30c en médula espinal, líquido cefalorraquídeo y plasma.

En las ratas sometidas a lesión del nervio ciático (Figura 2) se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal lumbar ($t=2,826$; $p<0,05$), líquido cefalorraquídeo ($t=2,938$; $p<0,01$) y plasma ($t=4,300$; $p<0,001$). Además, como muestra la Figura 3, los niveles de expresión de miR-30c en plasma se correlacionaron positiva y significativamente con los de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y los valores de umbral mecánico se correlacionaron de forma inversa y significativa con los niveles de expresión de mir-30c en plasma y LCR.

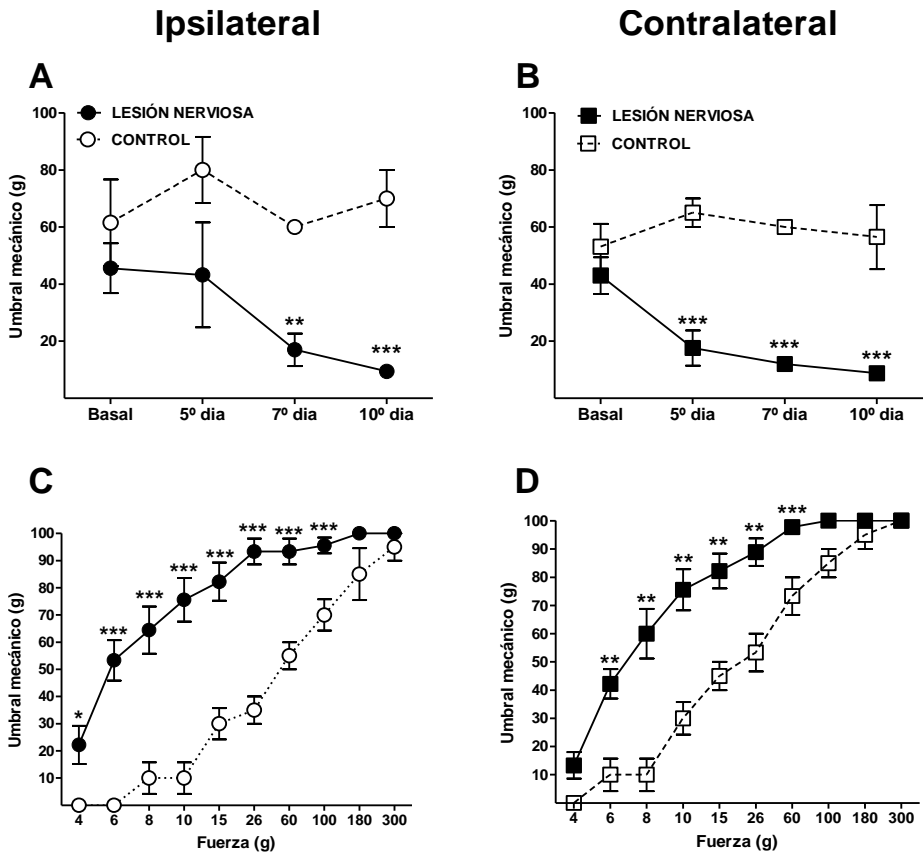


Figura 1. Desarrollo de alodinia mecánica tras la lesión del nervio ciático y en animales control. A y B) Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. La curva representa la evolución del umbral nociceptivo, expresado como presión que produce un 50% de respuestas, a lo largo de 10 días tras la lesión del nervio ciático. C y D) Curva fuerza-respuesta a los 10 días de la lesión del nervio ciático * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control; Prueba Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas. Lesión nervio: $n=9$; Control: $n=4$.

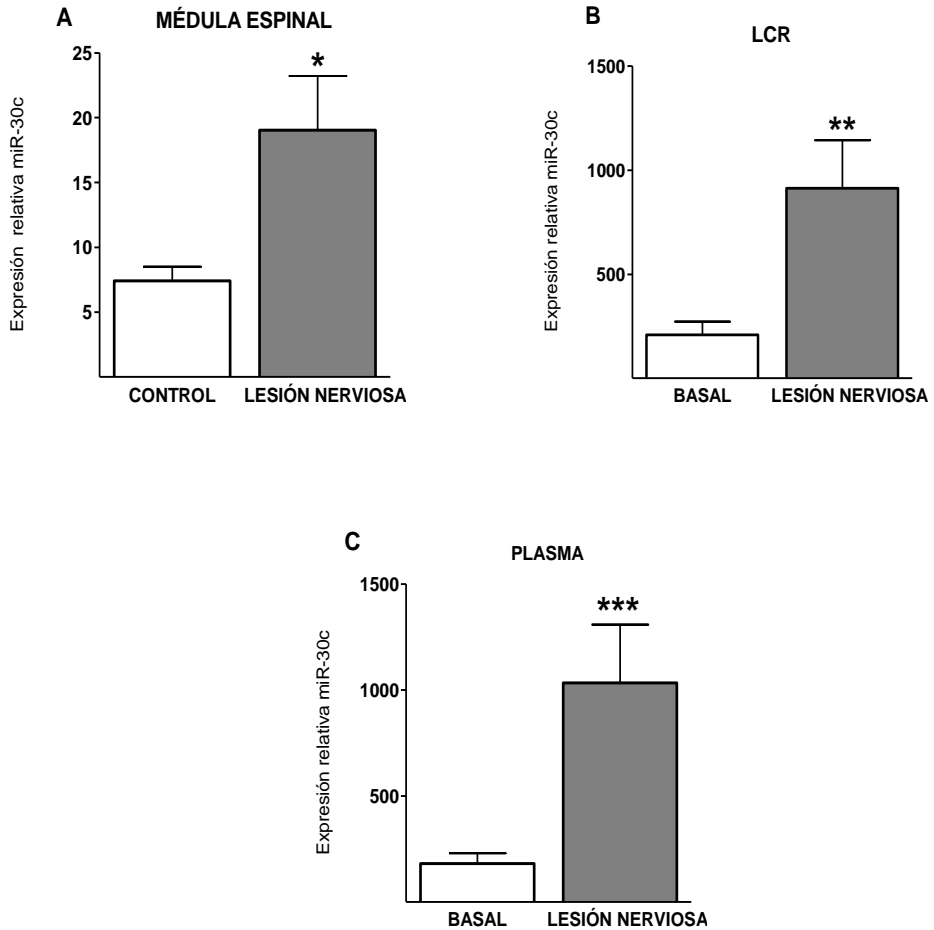


Figura 2. Expresión relativa de miR-30c en médula espinal, líquido cefalorraquídeo y plasma. **A)** Expresión relativa de miR-30c en asta dorsal de la médula espinal (N=11 control, N=9 lesión nervio; control vs. lesión nervio $*p < 0,05$, **B)** Expresión relativa de miR-30c en líquido cefalorraquídeo (N=9 pre lesión nervio, N=9 lesión nervio; control vs. lesión nervio; $**p < 0,01$) y **C)** Expresión relativa de miR-30c en plasma (N=19 controles y basales, N= 9 lesión nervio; control vs. lesión nervio; $***p < 0,001$ en plasma); Prueba t de Student de dos colas.

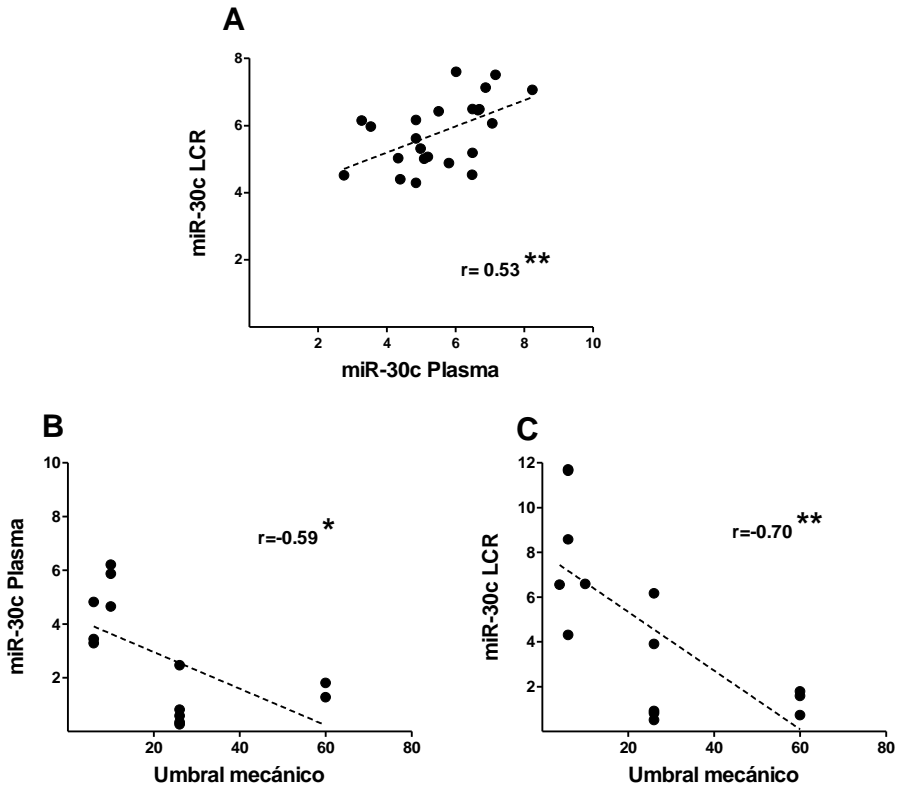


Figura 3. Análisis de regresión lineal y correlación entre niveles de expresión de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y plasma. A) Correlación positiva entre la expresión de miR-30c en plasma y en LCR (N= 23; $r=0,53$; $**p<0,01$). **B)** Correlación significativa entre la expresión de miR-30c en plasma y el umbral mecánico (N=13; $r = 0,59$; $*p<0,05$). **C)** Correlación significativa entre la expresión de miR-30c en líquido cefalorraquídeo y el umbral mecánico (N=14; $r = 0,70$; $**p<0,01$).

2. Modelo de neuropatía periférica inducida por isquemia del territorio de la arteria femoral

2.1 Alteraciones ecográficas

El modelo de neuropatía isquémica del nervio femoral y su rama sural se basa en la limitación del flujo a través de la arteria femoral provocada por la trombosis inducida mediante aplicación local de FeCl_2 . Con el fin de comprobar la reducción del flujo y el diámetro arterial femoral en los animales sometidos a trombosis inducida por FeCl_2 se realizaron registros ecográficos basales y al 13° día tras su aplicación, que pusieron de manifiesto una reducción significativa del flujo arterial y una disminución en el diámetro de la arteria femoral en los tratados con FeCl_2 (Figura 4). No se observaron cambios ni del flujo ni del diámetro arterial femoral en los animales control (Figura 5).

2.2 Análisis histológico.

La presencia de un trombo en la luz de la arteria femoral se verificó en secciones arteriales teñidas mediante hematoxilina/eosina. Como se muestra en la figura 5, la arteria de los animales control mantiene intacta la luz arterial, mientras que en los animales tratados con FeCl_2 se observó la presencia de un trombo que provocó una obstrucción parcial de la luz del vaso.

Estudiamos si la trombosis y reducción del flujo en la arteria femoral inducía daño isquémico en nervios vascularizados por dicha arteria. Mediante microscopía electrónica observamos zonas con degeneración walleriana–desmielinización en los nervios femoral y safeno en los animales sometidos a trombosis de la arteria femoral. Por el contrario, el nervio ciático permaneció intacto (Figura 6).

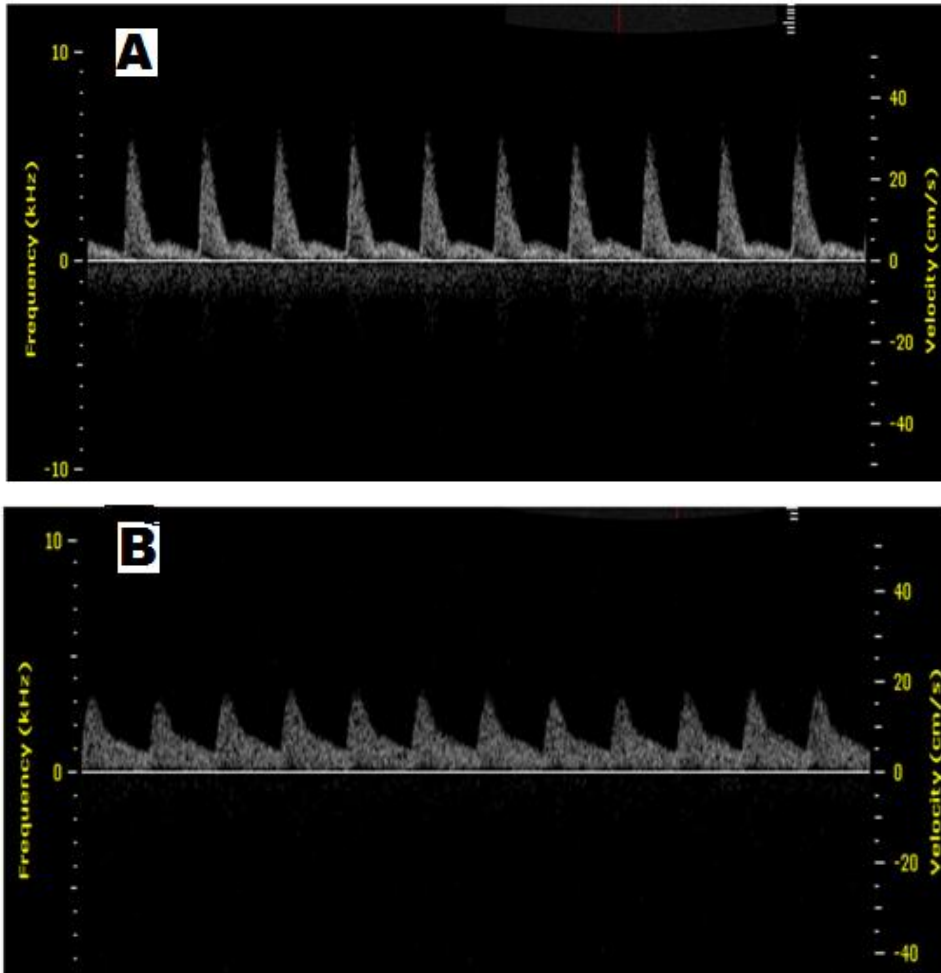


Figura 4. Imágenes ecográficas del flujo de la arteria femoral. A) Flujo basal de la arteria femoral de animal. **B)** Flujo de la arteria femoral de animal el día 13° tras la lesión isquémica con FeCl_2 .

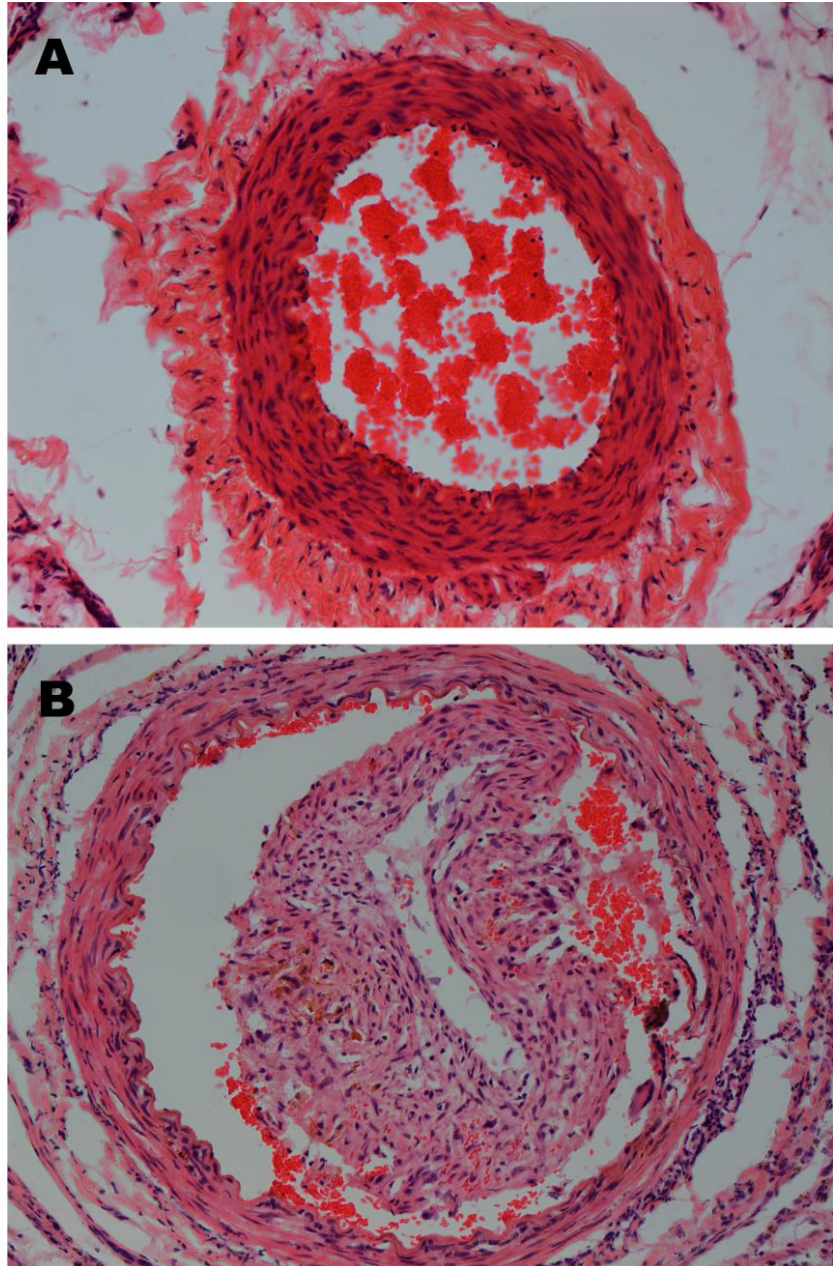


Figura 5 .Tinción de la arteria femoral con hematoxilina/ eosina.
A: Arteria femoral de animal control, se observa que el vaso de luz de la arteria está limpio. **B:** Arteria femoral trombosada de un animal tratado con FeCl₂. Se observa que la luz de la arteria esta obstruida por el trombo.

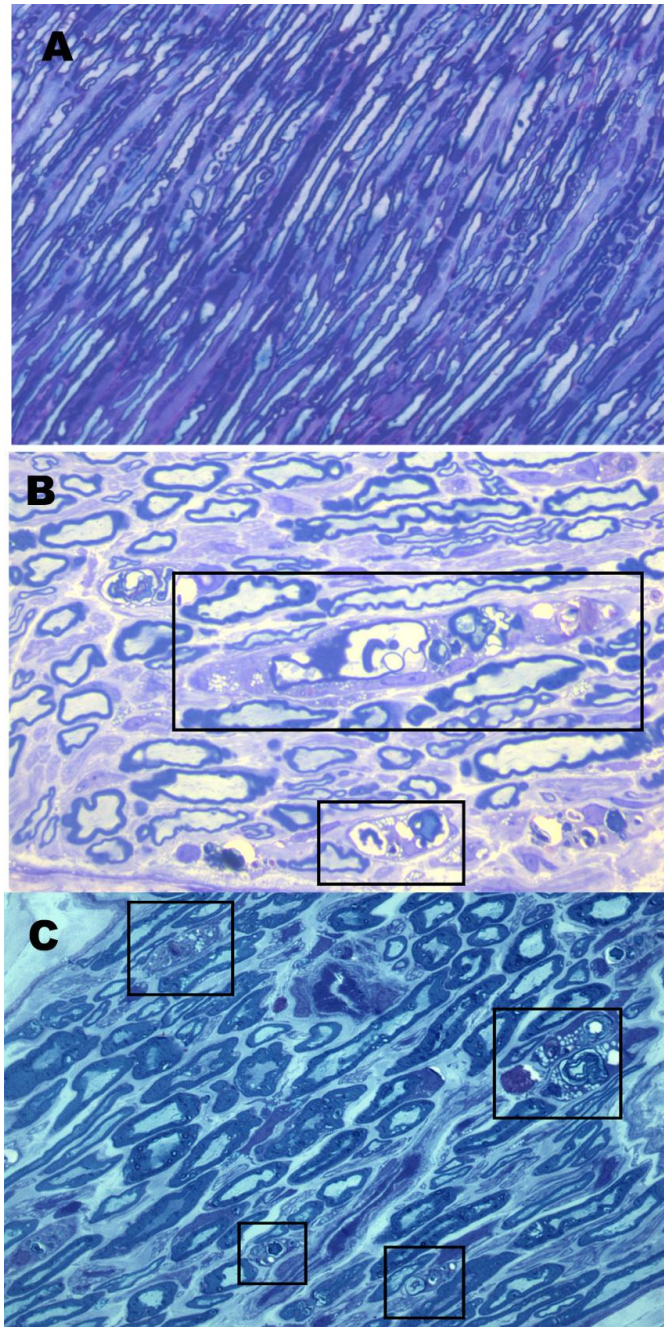


Figura 6. Nervios incluidos en araldita de animal sometido a **trombosis femoral con FeCl_2** . En el nervio ciático (**A**) no se observa degeneración walleriana. En los nervios femoral (**B**) y safeno (**C**) se observan focos de degeneración walleriana (recuadros).

2.3 Desarrollo de alodinia mecánica

Se evaluó el desarrollo de alodinia mecánica en el territorio inervado por el nervio safeno (1° y 2° dedos). Para ello, se valoró la respuesta nociceptiva de las patas traseras frente a estímulos mecánicos de fuerza creciente mediante monofilamentos de von Frey, un día antes (respuesta basal) y diariamente durante un periodo de 13 días a partir de la trombosis femoral con FeCl₂ y en los animales control (sham).

Durante este periodo, los animales sometidos a trombosis arterial femoral mostraron un decremento progresivo en el umbral de retirada de la pata trasera ipsilateral, que alcanzó una respuesta alodínica máxima a los 13 días (Lesión isquémica 5 vs. Control 53) de la lesión (“lesión isquémica”: $F_{(1,11)}=20,5$, $p<0,001$, Figura 7A). Por el contrario, los animales control no modificaron su umbral de retirada de la pata. El umbral nociceptivo mecánico en las ratas sometidas a lesión isquémica del nervio femoral se mantuvo significativamente menor que las ratas control durante todo el periodo de seguimiento (“tiempo x lesión isquémica”: $F_{(4,44)}=8,9$, $p<0,001$).

En la figura 7C se muestran los resultados obtenidos el día 13 tras la lesión de la arteria femoral con FeCl₂, momento en el cual mostraron una intensa alodinia mecánica (“intensidad de fuerza x lesión nerviosa”: $F_{(9,126)}= 28,7$, $p<0,001$; “lesión nerviosa”: $F_{(1,14)}= 77,7$, $p<0,001$) caracterizada por un incremento significativo del porcentaje de respuestas positivas conforme se aumentó la intensidad de la fuerza aplicada. La respuesta nociceptiva en las ratas control (sham) no se vio afectada.

En los animales sometidos a la lesión isquémica, observamos que la pata contralateral también mostró alodinia e hiperalgesia mecánicas, aunque menos intensas que las observadas en la pata ipsilateral

(“intensidad de fuerza x lesión nerviosa”: $F_{(9,117)} = 23,7$, $p < 0,001$; “lesión nerviosa”: $F_{(1,13)} = 68,4$, $p < 0,001$, Figura 7B-D).

2.4 Niveles de expresión de miR-30c en médula espinal, líquido cefalorraquídeo y plasma.

Con el fin de valorar si miR-30c estaba desregulado en el modelo de neuropatía periférica inducido por isquemia del territorio de la arteria femoral, analizamos su expresión en muestras de médula espinal, plasma y LCR en animales control y sometidos a neuropatía isquemia. Los niveles de expresión de miR-30c aumentaron significativamente en el plasma ($t=2,07$; $p < 0,05$), mientras que en el LCR disminuyeron significativamente ($t=2,438$; $p < 0,05$) respecto a los animales control. La expresión de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal en las ratas sometidas a lesión de la arteria femoral estaba ligeramente incrementada sin llegar a alcanzar significación estadística en comparación con el grupo control ($t=1,369$; n.s.) (Figura 8). No se observaron correlaciones significativas entre niveles circulantes en plasma o LCR y tisulares de miR-30c.

3. Efecto de miR-30c mimic y miR-30c inhibidor en la respuesta nociceptiva evocada en modelos de dolor agudo.

Con la finalidad de determinar el papel de miR-30c en la modulación de las conductas nocifensivas evocadas por estímulos mecánico (test de von Frey), térmico (test de retirada de la cola), y químico/inflamatorio (test de formalina), evaluamos los efectos de miR-30c mimic y miR-30c inhibidor administrados por vía intracisternal a la dosis de 100ng.

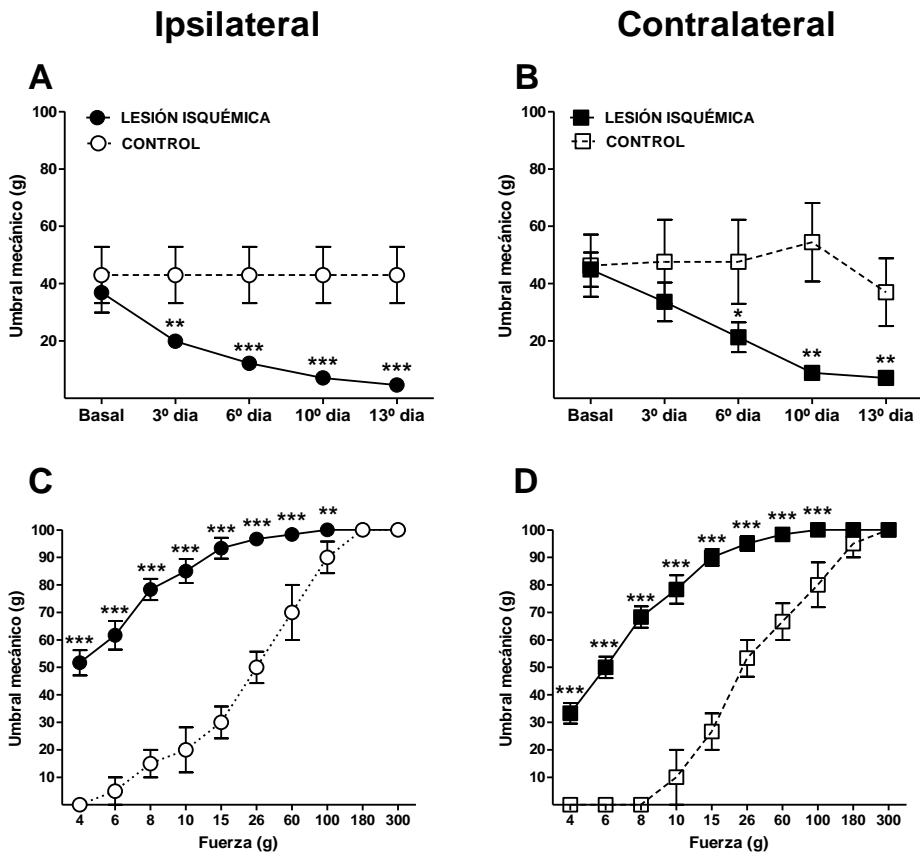


Figura 7. Desarrollo de alodinia mecánica en respuesta a la trombosis de la arteria femoral con FeCl₂. Ha y B) Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. La curva representa la evolución del umbral nociceptivo, expresado como presión que produce un 50% de respuestas, a lo largo de 13 días tras la lesión de la arteria femoral con FeCl₂. C y D) Curva fuerza-respuesta transcurridos 13 días desde la lesión de la arteria femoral con FeCl₂ **p*<0,05, *p*<0,01, ****p*<0,001, vs. Control; Prueba Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas. N=12 Lesión isquémica, N=4 Control.**

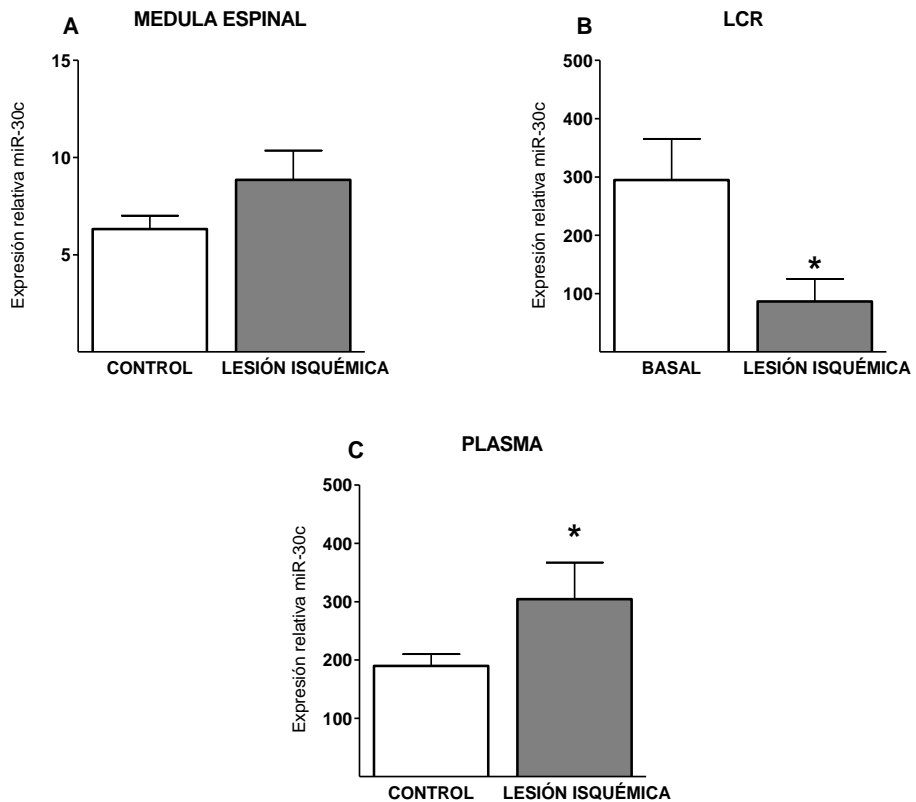


Figura 8. Expresión relativa de miR-30c en médula espinal, líquido cefalorraquídeo y plasma. A) Expresión relativa de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal (N= 7 Control, N=9 lesión isquémica; Control vs. lesión isquémica ms.) B) Expresión relativa de miR-30c en líquido cefalorraquídeo (N= 12 pre isquemia, N= 12 post isquemia; Pre isquemia vs. post isquemia; * $p < 0,05$) y C) Expresión relativa de miR-30c en plasma (N=20 Control, N= 12 lesión isquémica; Control vs. lesión isquémica; * $p < 0,05$). Prueba t de Student de dos colas). Para la normalización de los niveles de expresión en plasma y LCR se utilizó célula miR-39, y para los de la médula espinal, 18S.

3.1 Sensibilidad a estímulos mecánicos

La sensibilidad mecánica se valoró mediante el test de von Frey, a las 4h y 24h de la administración de miR-30c mimic o miR-30c inhibidor. Como se observa en la figura 9, todos los animales, independientemente del tratamiento, incrementaron significativamente el porcentaje de respuestas positivas conforme se aumentó la intensidad de la fuerza aplicada. Sin embargo, los diferentes tratamientos no modificaron la respuesta a estímulos mecánicos, ni a las 4h ni a las 24h de su administración.

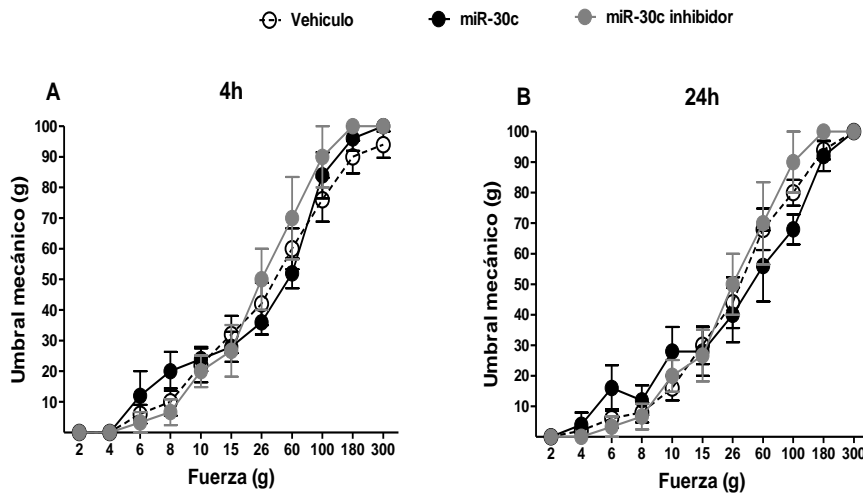


Figura 9. Respuestas a estímulos mecánicos en animales tratados con vehículo, miR-30c mimic (100ng/10µl) o miR-30c inhibidor (100ng/10µl). Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. **A)** Curva fuerza-respuesta en la pata a las 4h de haber recibido los distintos tratamientos. **B)** Curva fuerza-respuesta en la pata a las 24h de haber recibido los distintos tratamientos. N=10 Vehículo, N=5 miR-30c mimic, N=6 miR-30c inhibidor.

3.2 Nocicepción evocada por estímulos térmicos

Para valorar los efectos sobre la sensibilidad térmica, se realizó la prueba de retirada de la cola (tail flick) a las 24 h de la administración de miR-30c y miR-30c inhibidor. Se valoró la latencia de retirada de la cola en respuesta a la aplicación de un foco calórico en la zona distal de la cola del animal. Como se muestra en la figura 10, ninguno de los tratamientos modificó la latencia de retirada de la cola en comparación con el grupo tratado con vehículo.

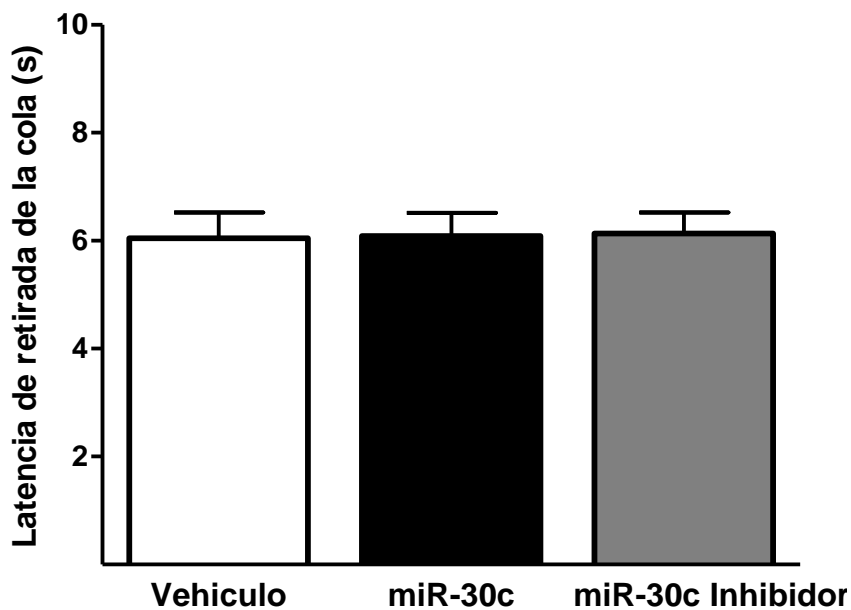


Figura 10. Efecto del tratamiento con miR-30c mimic (100ng/10 μ l) y miR-30c inhibidor (100ng/10 μ l) en respuesta a estímulos térmicos en un modelo de dolor agudo. Los resultados muestran la latencia de retirada de la cola 24 h tras la administración de vehículo, miR-30c mimic y miR-30c inhibidor. N=11 Vehículo, N=19 miR-30c mimic, N=6 miR-30c inhibidor.

3.3 Respuestas evocadas por estímulos químico / inflamatorios

El efecto del tratamiento con miR-30c y miR-30c inhibidor sobre la respuesta nociceptiva inducida por estímulos químico/inflamatorios se estudió mediante la prueba de la formalina (figura 11A). En esta prueba se valoró la latencia de lamido de la pata trasera de la rata durante los primeros 5 minutos (primera fase: refleja el dolor nociceptivo provocado por la irritación química de la formalina) y entre los 20 y 60 min (segunda fase: fase inflamatoria que cursa con sensibilización central) desde la inyección intraplantar de formalina. La prueba se realizó 24 horas después de la administración de una dosis única de miR-30c o miR-30c inhibidor.

En la figura 11B, podemos observar que los animales tratados con miR-30c inhibidor mostraron una reducción significativa en la respuesta nociceptiva durante todo el periodo de tiempo analizado (60min) en comparación con los animales tratados con vehículo ($F_{(2,35)}=7,1; p<0,01$). En la segunda fase, la latencia de lamido fue significativamente menor en los animales tratados con miR-30c inhibidor ($F_{(2,14)}=5,20; p<0,05$; figura 11B). Sin embargo, no se observaron diferencias entre el grupo tratado con miR-30c y el grupo tratado con vehículo.

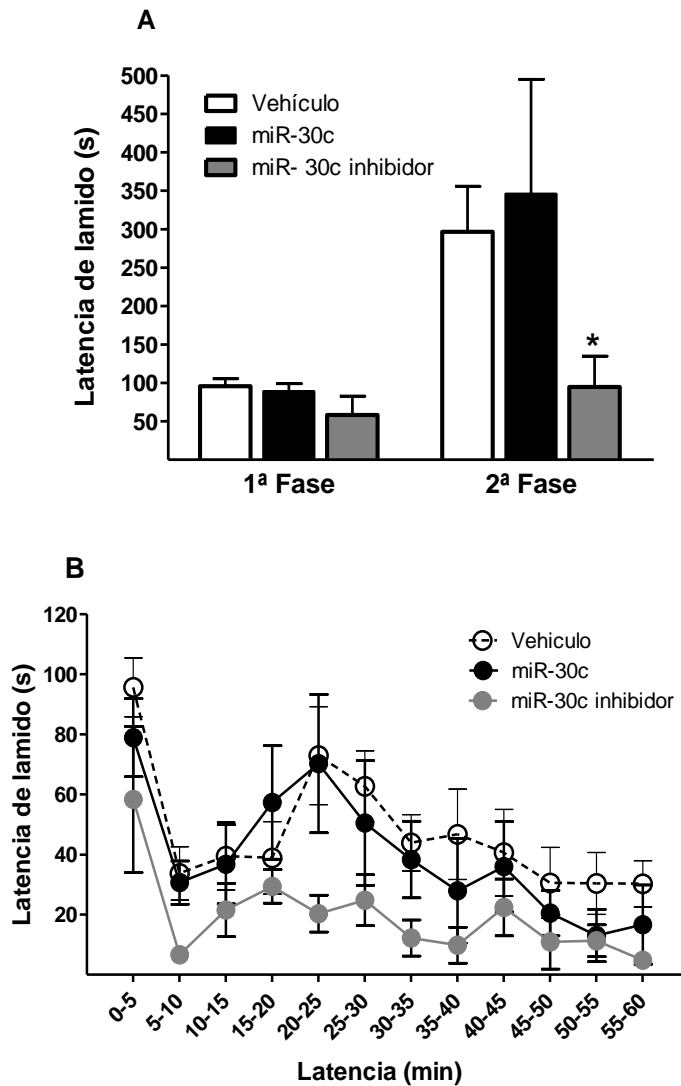


Figura 11. Efecto del tratamiento con miR-30c mimic y miR-30c inhibidor en respuesta a estímulos químico/inflamatorios en la prueba de la formalina. A) Latencia de lamido de la pata trasera 24 h tras la administración de vehículo, miR-30c mimic y miR-30c inhibidor en la primera fase (0-5 min) y en la segunda fase (20-60 min) tras la inyección de formalina (50 μ l al 5%) intraplantar. miR-30c vs. Vehículo; * $p < 0,05$ Prueba Bonferroni tras ANOVA de una vía. **B)** Evolución de la latencia de lamido de la pata expresado en segmentos de 5 min de duración. Prueba Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas. N=9 Vehículo, N=6 miR-30c mimic, N=6 miR-30c inhibidor.

4. Efecto de la administración crónica de miR-30c mimic y miR-30c inhibidor en la neuropatía traumática

4.1 Efectos del tratamiento con miR-30c mimic

Se valoró el efecto de miR-30c mimic sobre la velocidad de desarrollo de alodinia mecánica en ratas sometidas a lesión traumática del nervio ciático.

Para ello, un grupo de ratas fue tratado con vehículo o con miR-30c mimic (100ng/10 μ l) dos días antes de la lesión y los días 1 y 3 tras la cirugía. Los animales sometidos a lesión del nervio ciático y tratados con miR-30c mimic mostraron durante todo el periodo estudiado un decremento progresivo y muy significativo en el umbral de retirada de la pata mientras que los animales sometidos a lesión nerviosa y tratados con vehículo mostraron un incremento del umbral nociceptivo durante los primeros días tras la lesión nervio ciático (Figura 12A). Es decir, las ratas tratadas con miR-30c mimic desarrollaron alodinia mecánica máxima a partir del 5° día tras la lesión del nervio ciático, mientras que los animales tratados con vehículo no mostraron los primeros síntomas de neuropatía hasta el 7° día de la lesión). (“intensidad de fuerza x tratamiento”: $F_{(10,100)}=7,7, p<0,001$; “tratamiento: $F_{(1,10)}=15,7, p<0,01$; Figura 12 A y C). Además, como se muestra en la figura 12D, observamos que la pata contralateral el día 5° tras la cirugía desarrolló alodinia mecánica aunque de un grado menor que el observado en la pata ipsilateral. Los umbrales fueron significativamente inferiores a los de los animales control durante todo el periodo evaluado (“intensidad de fuerza x tratamiento”: $F_{(10,100)}=337, p<0,001$; “tratamiento: $F_{(1,10)}=9,5, p<0,01$; Figura 12 y D).

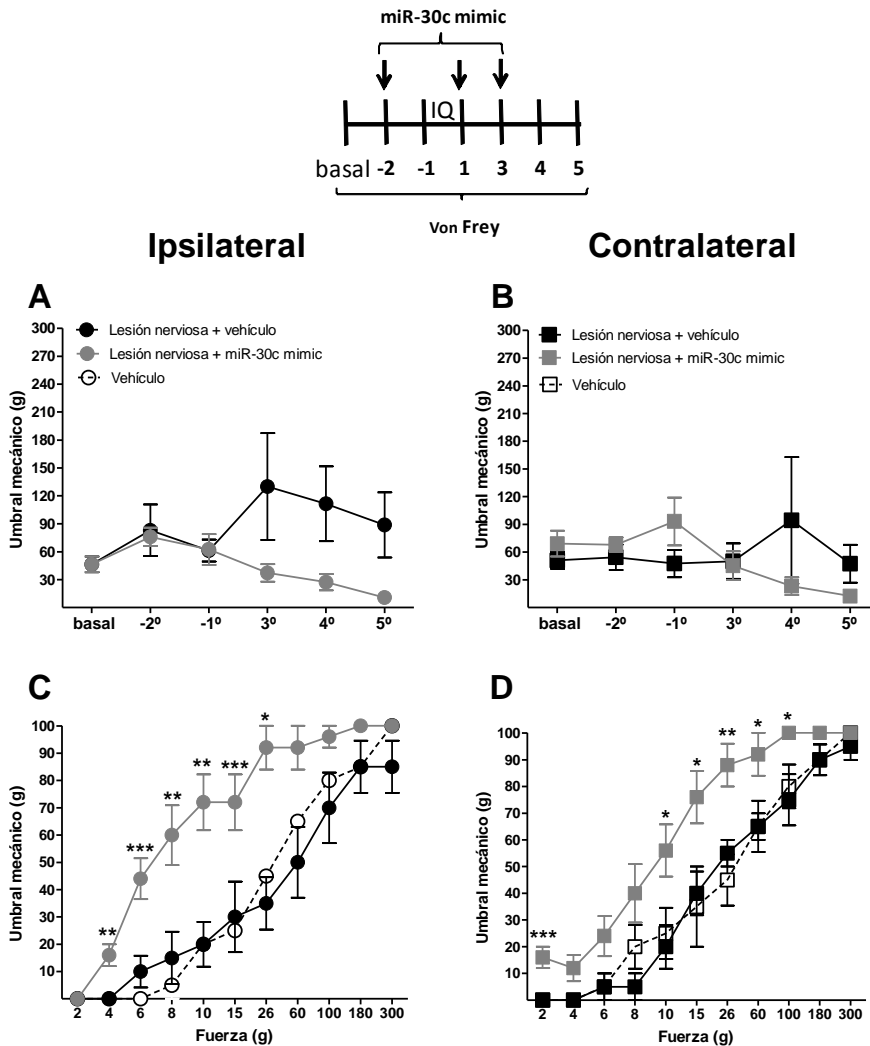


Figura 12. Desarrollo de alodinia mecánica en respuesta a la lesión del nervio ciático en animales tratados con vehículo o con miR-30c mimic. Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de las patas provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. Las flechas indican los días en los que se administró vehículo o miR-30c mimic. **A y B)** La curva representa la evolución del umbral nociceptivo, expresado como la presión que produce un 50% de respuestas, a lo largo de 5 días tras la lesión del nervio ciático. **C y D)** Curva fuerza-respuesta a los 5 días de la lesión nerviosa del ciático... miR-30c vs. Vehículo; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Prueba Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas.

4.2 Efectos del tratamiento con miR-30c inhibidor

Se valoró el efecto de miR-30c inhibidor sobre la velocidad de desarrollo de alodinia mecánica en ratas sometidas a lesión traumática del nervio ciático. Para ello, un grupo de ratas fue tratado con vehículo o con miR-30c inhibidor (100ng/10 μ l) el día de la cirugía y los días 2, 4 y 7 tras la misma.

Al contrario de lo observado con miR-30c mimic, las ratas expuestas a lesión del nervio ciático y tratadas con miR-30c inhibidor mostraron una reducción significativa del grado de alodinia mecánica desarrollada en comparación con el grupo de animales tratados con vehículo (“intensidad de fuerza x tratamiento”: $F_{(10,240)}=8,9$, $p<0,001$; “tratamiento”: $F_{(1,24)}= 104,5$, $p<0,001$; figura 13A). Es decir, las ratas tratadas con miR-30c inhibidor mostraron un umbral de retirada de la pata significativamente mayor que los animales tratados con vehículo durante todo el periodo de seguimiento (“tiempo x tratamiento”: $F_{(4,172)}= 29,7$, $p<0,001$; “tratamiento”: $F_{(1,18)}= 125,9$, $p<0,001$, figura 13C). Las ratas tratadas con miR-30c inhibidor no desarrollaron alodinia mecánica.

Los animales expuestos a la lesión nerviosa y tratados con el miR-30c inhibidor no desarrollaron alodinia mecánica en la pata contralateral trascurridos 10 días de la cirugía y los umbrales mecánicos fueron significativamente mayores que los de los animales tratados con vehículo, durante todo el periodo evaluado, aunque los resultados no son tan reseñables como los que ocurren en la pata ipsilateral (“tiempo x tratamiento”: $F_{(4,60)}= 6,6$, $p<0,001$; “tratamiento”: $F_{(1,15)}= 17,3$, $p<0,001$, Figura 13B-D).

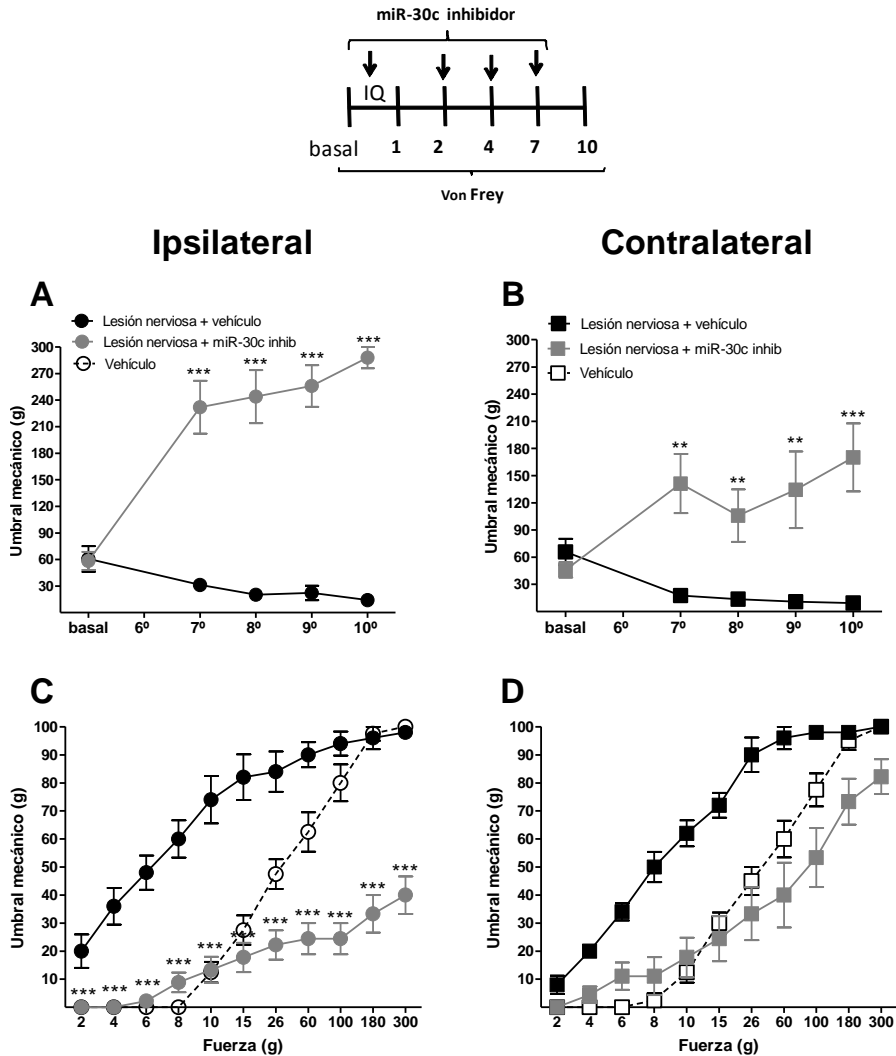


Figura 13. Desarrollo de alodinia mecánica en respuesta a la lesión del nervio ciático en animales tratados con vehículo o con miR-30c inhibidor. Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de las patas provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. Las flechas indican los días en los que se administró vehículo o miR-30c inhibidor. **Ha y B)** La curva representa la evolución del umbral nociceptivo, expresado como la presión que produce un 50% de respuestas, a lo largo de 10 días tras la lesión del nervio ciático. **C y D)** Curva fuerza-respuesta a los 10 días de la lesión nerviosa del ciático. MiR-30c inhibidor vs. vehículo; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Prueba Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas.

5. Efecto del tratamiento con miR-30c inhibidor sobre la expresión de miR-30c en la médula espinal de ratas sometidas a lesión del nervio ciático

Para reforzar la idea de que un incremento en la expresión de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal lumbar de animales sometidos a lesión del nervio ciático está asociado con el desarrollo de alodinia, se estudió el efecto del tratamiento con miR-30c inhibidor en los niveles de expresión de miR-30c en la médula espinal de ratas sometidas a dolor neuropático. Como se observa en la figura 14, los niveles de expresión de miR-30c eran significativamente superiores en el grupo de ratas sometidas a lesión nerviosa y tratadas con vehículo que en el grupo control.

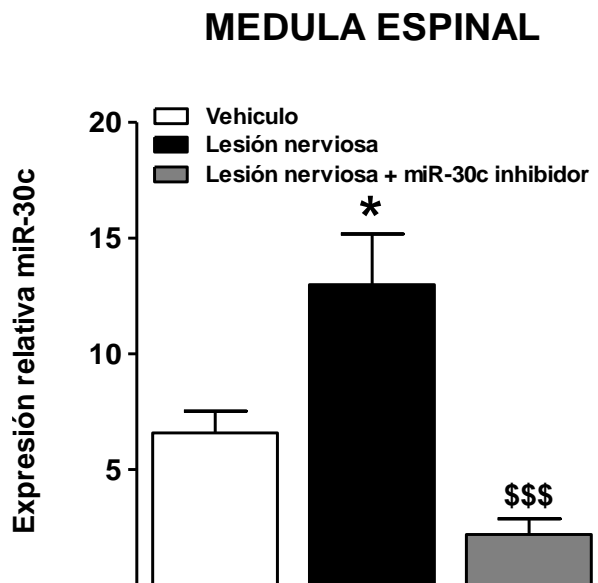


Figura 14. Efecto del tratamiento con miR-30c inhibidor sobre la expresión de miR-30c en la médula espinal de ratas sometidas a lesión del nervio ciático. * $p < 0,05$, Lesión nerviosa vs. Vehículo; \$\$\$ $p < 0,001$, Lesión nerviosa vs. Lesión nerviosa + miR-30c inhibidor Prueba Bonferroni tras ANOVA de una vía.

El tratamiento con miR-30c inhibidor disminuyó significativamente los niveles de expresión de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal en comparación con el grupo de animales tratado con vehículo ($F_{(2,16)}=14,0$, $p<0,001$).

6. Efecto del tratamiento con miR-30c inhibidor sobre la expresión de genes diana de miR-30c.

Analizamos los niveles de expresión de dos genes diana de miR-30c, TGF- β 1 y SMAD-1, en la médula espinal de ratas sometidas a lesión del nervio ciático y tratadas con miR-30c inhibidor o con vehículo. Como muestra la figura 15, los niveles de RNAm de TGF- β 1 y SMAD-1 fueron significativamente superiores en el grupo de ratas expuestas a lesión nerviosa y tratadas con miR-30c inhibidor comparado con las ratas tratadas con vehículo (TGF- β 1: lesión nerviosa + vehículo: 80,42 vs. lesión nerviosa + miR-30c inhibidor: 206,78; $t=4,336$, $p<0,001$; SMAD-1: lesión nerviosa + vehículo: 140,20 vs. lesión nerviosa + miR-30c inhibidor: 263,336; $t= 4,336$, $p<0,001$; prueba t de Student). Además, los niveles de miR-30c se correlacionaron significativa e inversamente con la expresión génica de SMAD-1 y TGF- β 1 en el asta dorsal de la médula espinal.

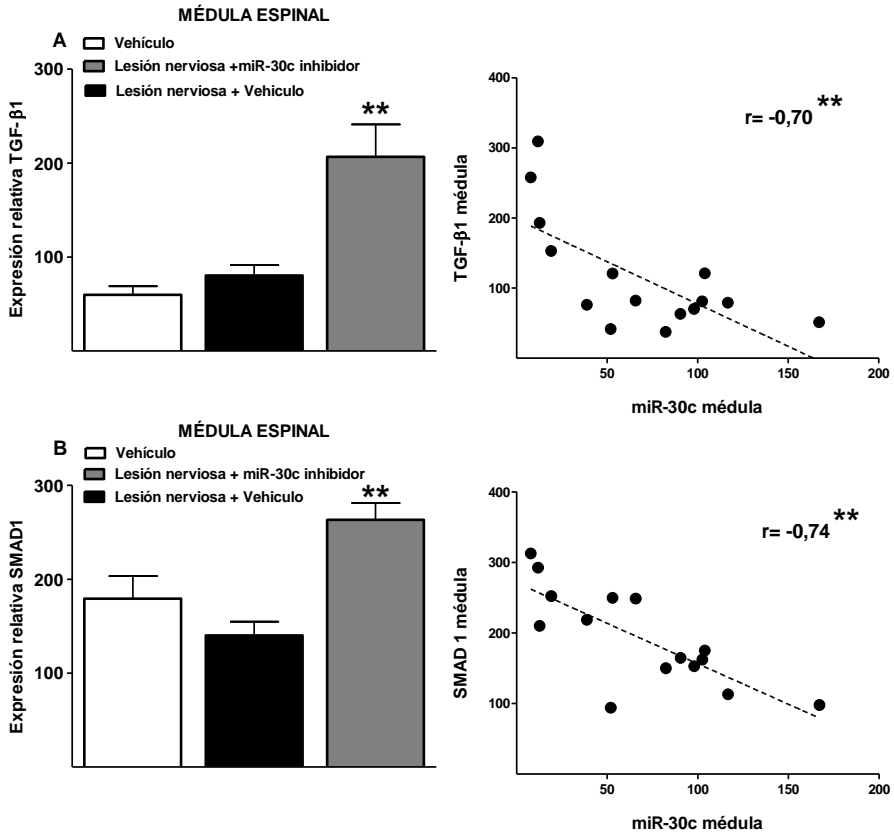


Figura 15. Expresión génica en la médula espinal de animales; vehículo (blanco), Lesión nerviosa + vehículo (negro) y Lesión nerviosa + miR-30c inhibidor (gris). **A:** La expresión relativa de SMAD 1 en los animales Lesión nerviosa + miR-30c inhibidor aumenta con respecto a los Lesión nerviosa + vehículo $**p < 0,01$; Prueba *t* de Student de 2 colas. **B:** La expresión relativa de TGF β -1 e los animales Lesión nerviosa + miR-30c inhibidor se ve aumentada con respecto a los Lesión nerviosa + vehículo $**p < 0,01$; Prueba Bonferroni tras ANOVA de una vía.

Discusión

El dolor agudo es un mecanismo de defensa que pone en marcha el sistema nervioso para proteger al organismo de daños actuales o potenciales. En algunas personas, tras la curación del daño tisular, el dolor se cronifica y persiste durante periodos prolongados de tiempo. Se califica como crónico a aquel dolor que, con una duración superior a seis meses, se mantiene cuando la causa que lo produjo ha desaparecido o a pesar de carecer de función biológico-defensiva. El dolor crónico, al contrario que el dolor agudo, es considerado por la Organización Mundial de la Salud como una patología en sí mismo. Estudios epidemiológicos ponen de manifiesto que uno de cada cinco europeos adultos padece dolor crónico (Breivik y cols., 2006). El sufrimiento prolongado provocado por el dolor patológico es un lastre para la calidad de vida de los individuos afectados, genera un gran impacto en términos humanos y socio-económicos, y es la causa más frecuente de demanda de cuidados médicos. El dolor crónico es un problema socio-sanitario de primer orden, por lo que el diseño de terapias dirigidas a su prevención/curación/alivio constituye un reto científico prioritario para el Sistema Nacional de Salud.

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico (Bouhassira y cols., 2008) causado por la lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial (Von Hehn y cols., 2012). 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 disestésico en respuesta a estímulos inocuos (alodinia) y dolor espontáneo, que se mantienen durante meses e incluso años. El dolor neuropático es un proceso patológico muy prevalente, altamente refractario a la terapia con analgésicos convencionales, que es resultado de múltiples etiologías y puede presentarse como una gran variedad de síndromes (Cerveró y cols., 2009; Gilron y cols., 2015). Entre

las variadas causas de dolor neuropático se encuentran la neuropatía diabética, la neuropatía secundaria a la isquemia crónica de las extremidades inferiores, el miembro fantasma posterior a la amputación de un miembro, la neuralgia postherpética, el síndrome de dolor regional complejo, la fibromialgia, etc. Existe una gran heterogeneidad en la eficacia analgésica de los fármacos dependiendo de la etiología y forma de expresión del dolor neuropático (Gilron y cols., 2015). Aunque los mecanismos fisiopatológicos implicados son poco conocidos, en términos generales el dolor neuropático se considera una enfermedad neuro-inmune causada por complejas interacciones cruzadas entre neuronas, glía activada (microglía y astrocitos) y células inmunes del SN (Calvo y cols., 2012). Factores tróficos, mediadores inflamatorios y citoquinas liberados por glía y neuronas juegan un papel fundamental en la plasticidad patológica que condiciona la hiperexcitabilidad de las neuronas sensoriales que subyace al dolor patológico (Ren y cols., 2010). Sin embargo, las características específicas relevantes de cada tipo particular de dolor neuropático, que podrían permitir proponer nuevas dianas terapéuticas etiológicas han sido muy escasamente analizadas.

En esta tesis, hemos abordado el estudio del papel etiopatogénico de miR-30c en el animal de experimentación, utilizando dos modelos de dolor neuropático en ratas, uno de origen traumático y otro de origen isquémico.

La neuropatía por lesión traumática del nervio ciático utilizada se basa en el modelo de axotomía parcial del nervio ciático descrito por Decosterd y Wolf (2000), que ha sido ampliamente validado en numerosos estudios. En este modelo se seccionan las rama tibial y peroneal, dejando intacta la rama sural (Decosterd y Woolf, 2000). Los animales a los que se les provocó la axotomía parcial del nervio ciático presentaron hiperalgesia

y alodinia evocadas por estímulos mecánicos aplicados en la región lateral de la superficie plantar ipsilateral a la lesión, territorio inervado en la rata por el nervio sural (Figura 5; Remoortere y cols., 2007; Duraku y cols., 2012). La neuropatía se hizo evidente a partir del quinto día de la axotomía, alcanzándose la máxima severidad alodínica diez días después de la intervención, que se mantuvo durante todo el periodo de seguimiento.

A pesar de la elevada prevalencia de vasculopatía arterial periférica en la clínica, frecuentemente acompañada de dolor neuropático, solo encontramos en la bibliografía un modelo animal que estudia el dolor neuropático inducido por isquemia (Seo y cols., 2008). El modelo se basa en la inducción de trombosis en la arteria femoral mediante la aplicación local de FeCl_2 sobre la superficie de la arteria. Este modelo ha sido muy poco utilizado (Seo y cols. 2008, 2010; Lee y cols., 2012), por lo que decidimos caracterizar de forma concluyente su validez para inducir neuropatía isquémica. En primer lugar, llevamos a cabo un análisis ecográfico in vivo en el que demostramos la reducción del flujo sanguíneo a través de la arteria femoral, en la región distal al lugar de trombosis. En segundo lugar, tras el sacrificio del animal, visualizamos el trombo organizado mediante histología en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Dado que la rata desarrolla circulación colateral post-isquemia en la pata de forma profusa (Hellingman y cols., 2010), es imprescindible demostrar que el modelo genera daño neural. Para ello realizamos estudios de microscopía óptica en cortes semifinos incluidos en araldita y teñidos con azul toluidina (Palay y Chan-Palay., 1974) del nervio femoral y de su rama, el nervio safeno interno. Como control negativo utilizamos el nervio ciático, cuya vascularización depende de la arteria iliaca interna.

Transcurrida una semana desde la trombosis, tanto el nervio femoral como el safeno interno presentaban claros signos patológicos (alteraciones en las vainas de mielina e infiltración por macrófagos), mientras que el nervio ciático mantenía preservada su estructura. El nervio safeno interno es de particular interés para nuestro estudio porque es exclusivamente sensitivo y algunos autores consideran su constricción un modelo óptimo de alodinia por neuropatía sensitiva sin afectación motora (Walczak y cols., 2006). El nervio safeno interno en la rata inerva, entre otras regiones, la superficie plantar medial (Figura 5; Van Remoortere y cols., 2007; Duraku y cols., 2012), lugar donde hemos valorado el desarrollo de dolor neuropático. Los animales sometidos a trombosis femoral presentaron hiperalgesia y alodinia en los test mecánicos. La neuropatía fue evidente a partir de las 72 horas de la aplicación de FeCl_2 , la máxima severidad alodínica se alcanzó a los 13 días y, a partir de ese momento, la alodinia comenzó a remitir gradualmente desapareciendo a los 28 días tras la intervención. Este curso temporal es similar al descrito por Seo y cols., (2008).

En ambos modelos de neuropatía, los animales también desarrollaron alodinia mecánica en la pata contralateral a la lesión. Este fenómeno se conoce como dolor en imagen especular (“mirror image pain”). Aunque el estímulo desencadenante del dolor neuropático surge primariamente del nervio lesionado, la alodinia bilateral es frecuente en los modelos experimentales de neuropatía traumática, inflamatoria, tumoral, etc. También ha sido descrita en el modelo de neuropatía isquémica utilizado en nuestro estudio (Seo y cols., 2008). En general, en el animal de experimentación el dolor contralateral suele ser de menor intensidad y más recortado en el tiempo (Koltzenburg y cols., 1999). En la clínica, la alodinia bilateral manifiesta es un fenómeno muy poco

frecuente que desarrollan algunos pacientes tras la lesión traumática de un nervio (Huang y Yu., 2010).

Los circuitos neuronales y mediadores implicados en la alodinia contralateral a la lesión neural han sido muy escasamente estudiados y tampoco son objeto de este estudio. Aunque el dolor neuropático especular se considera un fenómeno de plasticidad patológica central, el mecanismo celular subyacente es virtualmente desconocido. Parece jugar un papel relevante el procesamiento aberrante de la información sensorial entrante a nivel de la médula espinal (Koltzenburg y cols., 1999; Watkins y Maier., 2002). La hipótesis más aceptada es que neuronas y/o células gliales ipsilaterales activadas liberarían mediadores yuxtacrininos que, a través de señales transmitidas transcelularmente vía interneuronas y/o células gliales comisurales, sensibilizarían a las neuronas homónimas contralaterales (Jancalek., 2011). La implicación glial en el fenómeno de dolor en espejo se ha descrito en modelos de dolor neuropático de origen traumático (Seltzer y cols., 1990; Shir y cols., 1991; Spataro y cols., 2004; Wang y cols., 2008; Obata y cols., 2010), inflamatorio (Milligan y cols., 2003, 2004; Twining y cols., 2004, Spataro y cols., 2004), e isquémico (Seo y cols., 2008). Así, la activación de astrocitos y microglia en el asta dorsal no solo está implicada en la persistencia patológica de hiperexcitabilidad neuronal tras la curación de la lesión originaria, sino que también participa en su extensión tanto ipsi como contralateral.

Los miRNAs ejercen importantes efectos reguladores de la transcripción génica que controla los diferentes sistemas de neurotransmisión (Higa y cols., 2014). En la última década, la desregulación de un número creciente de miRNAs se ha asociado como elemento etiológico de primer orden con diversas patologías neuropsiquiátricas (Liu y Xu., 2011; Jin y cols., 2013; Maciotta y cols.,

2013; Malan-Müller y cols., 2013; Nowak y Michlewski., 2013). La investigación relacionada con la participación de miRNAs en procesos dolorosos de diferentes etiologías se encuentra en un estado incipiente (Kress y cols., 2013; Kynast y cols., 2013; Andersen y cols., 2014; Bali y cols., 2013; Bali y Kuner., 2014; Elramah y cols., 2014). No obstante, los hallazgos publicados hasta el momento sugieren fuertemente su papel en la desregulación patológica de la expresión génica implicada en la plasticidad neural aberrante que subyace al dolor neuropático. Una prueba de la asociación global entre miRNAs y dolor deriva del estudio de Zhao y cols (2010) que muestra como la eliminación condicionada de la secuencia de DICER en los nociceptores evita el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa en un modelo murino de dolor inflamatorio. Como se muestra en la tabla 1, los estudios de secuenciación masiva y expresión génica mediante PCR cuantitativa ponen de manifiesto alteraciones en la expresión de un número todavía discreto de miRNAs en estructuras del SN, fundamentalmente ganglios dorsales y asta dorsal de la médula, de animales sometidos a modelos de dolor neuropático (Kusuda y cols., 2011; Chatopadhyay y cols., 2012; Arai y cols., 2013; Hori y cols., 2013; Li y cols., 2013; Sakai y Suzuki., 2013; Bali y Kuner., 2014; Bali y cols., 2014).

Una de las líneas de investigación desarrolladas por el grupo de la Profª Hurlé se centra en el papel de miRNAs en procesos de plasticidad tisular patológica del sistema cardiovascular y del SNC (Villar y cols., 2013a y b; Garcia y cols., 2013, 2015). En este contexto, estudios de secuenciación masiva de nueva generación llevados a cabo en este laboratorio en dos líneas de ratones modificados genéticamente, cuyos fenotipos nociceptivos son opuestos (hiperalgésico y antialodínico respectivamente), presentan un patrón de expresión diferencial de un

grupo pequeño de miRNAs en el asta dorsal de la médula espinal, en respuesta a la lesión traumática del nervio ciático. Entre los miRNAs más intensamente desregulados se encontraba miR-30c, que aparecía sobreexpresado en los animales con fenotipo hiperalgésico mientras que se regulaba a la baja en los ratones protegidos frente al desarrollo de alodinia (resultados no publicados). Estos resultados dirigieron nuestra selección de miR-30c como candidato a estudiar, ya que sugieren un papel relevante de dicho miRNA en el proceso de plasticidad patológica del asta dorsal de la médula espinal que conduce al desarrollo de dolor neuropático. Los resultados de esta Tesis refuerzan esta idea ya que demuestran que las ratas sometidas a neuropatía traumática del nervio ciático desarrollan sobreexpresión de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal, tal y como se observó en los ratones hiperalgésicos. Más aún, la correlación inversa entre los niveles de expresión medular de miR-30c y el umbral nociceptivo frente a estímulos mecánicos sugiere fuertemente que miR-30c es un miRNA proálgico y que está implicado en el desarrollo de hiperalgesia y alodinia mecánicas tras la lesión nerviosa. Hasta el momento, no hemos encontrado referencias en la bibliografía que relacionen a miR-30c con dolor de ninguna etiología, en modelos animales o en pacientes. Sólo un estudio reciente, llevado a cabo en dos cepas de ratas caracterizadas por sus diferencias en cuanto al grado de alodinia capaces de desarrollar tras la lesión de un nervio espinal, muestra la existencia de diferencias significativas en el nivel de expresión de otro miembro de la familia miR-30, miR-30d-5p, en los correspondientes ganglios dorsales. Sin embargo, las diferencias descritas en este estudio van en dirección contraria a nuestros hallazgos de sobreexpresión en el asta dorsal, ya que miR-30d-5p sufre regulación a la baja en los ganglios espinales en la cepa de rata que desarrolla más alodinia (Bali y cols.,

2014). Estos resultados podrían indicar: (i) funciones diferentes para los miRNAs de la misma familia, (ii) regulación diferencial dependiendo de tipos celulares o estructuras neurales, (iii) variaciones en el curso temporal de la regulación, o (iv) la lesión del nervio como factor de confusión.

Una característica que convierte a los miRNAs en moléculas particularmente atractivas desde el punto de vista clínico es su presencia en los fluidos corporales, incorporados en vesículas extracelulares (exosomas y microvesículas) o asociados a complejos proteicos (Lorenzen y cols., 2013). Los miRNAs circulantes son muy estables y se pueden detectar con gran especificidad y sensibilidad, en el plasma y LCR, entre otros fluidos. Estas características han dirigido la atención a desvelar su potencial utilidad como biomarcadores de “a pie de cama”, con valor diagnóstico y/o pronóstico y de estratificación terapéutica en numerosas patologías, incluidas las neuropsiquiátricas (Dangwal y cols., 2012; Jin y cols., 2013 Lorenzen y cols., 2013). Aunque el desarrollo de paneles de miRNAs circulantes con aplicabilidad clínica como biomarcadores se encuentra en un estado incipiente, comienzan a publicarse prometedores resultados al respecto, que podrían convertirlos en una realidad en el futuro próximo. En pacientes con dolor de diversas etiología (fibromialgia, migraña, síndrome de dolor regional complejo, enfermedades inflamatorias, síndrome del colon irritable) se ha observado la existencia de perfiles característicos de miRNAs desregulados en suero, plasma y/o LCR, y algunos miRNAs en particular se relacionan positivamente con la intensidad y/o presencia de dolor (Li y cols., 2011; Orlova y cols., 2011; Bjersing y cols., 2013; Fourie y cols, 2014; Andersen et al., 2014 y 2015; Cerdá-Olmedo y cols., 2015; McDonald y Ajit., 2015).

En el animal de experimentación los estudios sobre el valor de miRNAs circulantes en LCR como biomarcadores de dolor son

virtualmente inexistentes; ello puede ser debido a que la dificultad para obtener LCR sin contaminación hemática, particularmente en ratones. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue determinar si los niveles circulantes de miR-30c en plasma y LCR reflejan, por un lado, los cambios observados en el asta dorsal de la médula espinal y, por otro, la presencia de dolor neuropático. Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de miR-30c también tiene lugar en el plasma y en el LCR de los animales sometidos a neuropatía traumática del ciático. Más aún, los niveles circulantes de miR30c en ambos fluidos se correlacionan entre ellos de forma directa y significativa y, lo que es más importante, ambos se correlacionan inversamente con el umbral nociceptivo de los animales. Estos hallazgos sugieren el valor potencial de los niveles circulantes de miR-30c en plasma y LCR como biomarcadores de dolor neuropático de origen traumático, siendo particularmente relevante desde el punto de vista clínico el resultado obtenido en plasma por tratarse de una prueba poco invasiva. Es evidente que estos hallazgos requieren confirmación en pacientes, tarea en la que nuestro grupo de investigación se encuentra trabajando.

Cada vez hay más datos convincentes en relación con el potencial terapéutico de las intervenciones dirigidas a modular la expresión de los miRNAs. Como resultado, la comunidad biotecnológica ha incluido como dianas terapéuticas preferentes a los miRNAs de forma que, a pesar del escaso tiempo transcurrido desde su descubrimiento, ya se han desarrollado moléculas moduladoras que se encuentran en fases avanzadas de investigación clínica (Van Rooij y cols., 2012; Van Rooij y Kauppinen., 2014). Las aproximaciones terapéuticas se dirigen a normalizar la expresión de miRNAs mediante oligonucleótidos sintéticos (miR-mimics) en el caso de expresión reducida, o mediante anti-miRNAs

en caso de sobreexpresión (Van Rooij y cols., 2012; Kynast y cols., 2013; Lotsch y cols., 2013; Van Rooij y Kauppinen, 2014).

En lo que al dolor se refiere, las respuestas nociceptivas de los animales en distintos modelos han sido moduladas manipulando los niveles de expresión de algunos miRNAs específicos con anti-miRs o miRNAs sintéticos (Niederberger y cols., 2011; Faveraux y cols., 2012; Im y cols., 2012; Willemen y cols., 2012; Chen y cols., 2014; Kress y cols., 2013; Sakai y cols., 2013; Tan y cols., 2015; Xiao y cols., 2015). También se han detectado miRNAs que, a través de la regulación de los receptores opioides, modifican la respuesta analgésica a los fármacos opioides (Wu y cols., 2008; He y cols., 2010; Zheng y cols., 2010; Rodriguez y cols., 2012; Ni y cols., 2013; Wu y cols., 2013; Li y cols., 2014; Barbierato y cols., 2015).

En base a la regulación observada en los niveles de expresión de miR-30c, nuestro siguiente objetivo fue establecer su valor potencial como nueva diana terapéutica, eficaz en el tratamiento del dolor. En primer lugar, determinamos los efectos que provocan miR-30c-mimic y anti-miR-30c en el modelo de dolor neuropático traumático inducido por axotomía parcial del nervio ciático. La dosis utilizada (100 ng en 10 μ l) se basó en un trabajo publicado que valoraba en ratas los efectos de miR-124 intratecal en modelos de dolor inflamatorio y dolor neuropático (Willemen y cols., 2012). En nuestro caso, la administración se llevó a cabo en la cisterna magna ya que la fiabilidad de la inyección es muy superior. Inicialmente, valoramos la capacidad de una única inyección intracisternal de miR-30c o anti-miR-30c para modificar la sensibilidad de la rata a estímulos mecánicos aplicados en el territorio inervado por el nervio sural. Transcurridas 4 o 24 h no observamos cambios en el umbral de respuesta a los filamentos de Von Frey, lo que descarta efectos sobre la sensibilidad

mecánica basal. La ausencia de efectos sobre la nocicepción aguda basal de miR-30c y anti-miR-30c se confirmó en un test de estímulo térmico, como es el de inmersión de la cola.

En los animales sometidos a neuropatía traumática del ciático, la administración de tres dosis repetidas de miR-30c (antes de la cirugía y los días 1 y 3 tras la lesión nerviosa) adelantó de forma significativa el desarrollo de hiperalgesia y alodinia mecánicas. Así, las ratas tratadas con miR-30c comenzaron a mostrar reducciones del umbral nociceptivo a partir del tercer día y alcanzaron el máximo nivel de alodinia el quinto día tras la lesión ciática, mientras que los animales tratados con vehículo no mostraron los primeros síntomas de neuropatía hasta el séptimo día y alcanzan la alodinia máxima a partir del décimo. En sentido contrario, la administración de cuatro dosis del anti miR-30c (antes de la cirugía y los días 2, 4 y 7 posteriores a la lesión) provocó una reducción significativa del grado de alodinia mecánica desarrollada en comparación con el grupo de animales tratados con vehículo que se acompañó de niveles de expresión medular de miR-30c significativamente inferiores. Los resultados funcionales, junto con los de expresión génica en la médula espinal, demuestran claramente que miR-30c ejerce una acción facilitadora de los procesos de regulación génica implicados en la plasticidad patológica del SNC que conducen al desarrollo de dolor neuropático. Asimismo, sugieren sólidamente que las maniobras dirigidas a reducir su expresión y/o función podrían constituir herramientas farmacológicas dirigidas a prevenir el desarrollo de dolor neuropático. Desde un punto de vista clínico, es evidente la necesidad de comprobar si aquellas moléculas que neutralizan a miR-30c son capaces también de revertir el dolor neuropático ya instaurado. Un abordaje terapéutico preventivo, pero con un importante potencial de efectos secundarios por

acciones a nivel de otras células/genes diferentes a las dianas deseadas, podría tener una relación coste/beneficio inaceptable, máxime tratándose de una patología que desarrollan sólo una proporción menor de los pacientes que sufren una lesión del SN.

Realizamos una segunda serie experimental dirigida a valorar el efecto pronociceptivo y antinociceptivo de miR-30c y anti-miR-30c, respectivamente, en el modelo de dolor químico-inflamatorio inducido por la inyección de formalina en la superficie plantar de la pata posterior. Típicamente, la administración intraplantar de formalina provoca una conducta nociceptiva bifásica; la primera fase se debe a la activación directa de receptores TRPA1 localizados en nociceptores tipo C, mientras que la segunda fase es consecuencia del proceso inflamatorio, y a ella contribuyen la estimulación mantenida de los nociceptores y la hiperexcitabilidad de la neuronas del asta dorsal de la médula (McNamara y cols., 2007; Tjølsen y cols., 1992). La administración de miR-30c o anti-miR-30c por vía intravenosa, 24 h antes del test, no modificó la primera fase de respuestas tras la administración de la formalina, que refleja el dolor nociceptivo provocado por la irritación química local. Por el contrario, en la segunda fase del test, que es reflejo del fenómeno de sensibilización central que provoca la inflamación periférica, anti-miR-30c produjo un efecto analgésico significativo. La ausencia de efecto algogénico de miR-30c podría deberse a la dificultad de incrementar una respuesta dolorosa tan intensa como la inducida por la formalina.

Como hemos expuesto en el “Estado actual del tema” los miRNAs ejercen sus efectos a través de la inhibición de la transcripción de sus genes diana. La interacción entre miRNAs y RNA mensajeros diana tiene lugar a través del emparejamiento de una secuencia de 6-8 bases localizadas en el extremo 5’ del miRNA con los elementos de

reconocimiento de miRNAs localizados en la región 3'-UTR del mRNA. La consecuencia es la represión de la traducción del RNA mensajero a proteína, y la desestabilización y posterior degradación del mRNA. La predicción de dianas de miRNAs se puede llevar a cabo de forma bastante fiable mediante programas informáticos que utilizan algoritmos para la detección de las probabilidades de interacción probables entre las secuencias 3'-UTR presentes en los mRNAs y la secuencia de la "seed región" del correspondiente miRNAs. Cada miRNA puede interactuar y regular numerosos mRNAs y cada mRNA puede ser regulado por numerosos miRNAs, lo que complica enormemente su estudio (Bartel 2009; Lötch y cols., 2013).

Hoy en día, existen un gran número de páginas web de acceso libre con aplicaciones que facilitan información acerca de los miRNAs: sus patrones de expresión tisular, dianas predichas y dianas validadas experimentalmente, procesos biológicos y enfermedades con las que se han relacionado, etc. Algunos ejemplos representativos de estas páginas web son: HMDD; miRanda, miRBase; miR2Disease; miRSearch; miRWalk, miRecords; PicTar; PITA; TarBase; Targetscan; etc. Sin embargo, todas las dianas predichas in silico deben ser validadas in vitro e in vivo.

Entre las dianas predichas de miR-30c y validadas en células no neurales (miRWalk) se encuentran algunos elementos de la vía de señalización de la familia TGF- β de citoquinas, como son el propio TGF- β 1, así como SMAD-1, una de las proteínas efectoras de BMPs (bone morphogenetic proteins), que es el otro gran grupo de la superfamilia de citoquinas (Macias y cols., 2015). Estas dianas nos han resultado particularmente atractivas para su validación in vivo en el SNC, ya que trabajos previos de nuestro grupo demuestran que miembros de la familia TGF- β protegen

frente al desarrollo de dolor crónico en modelos animales (Tramullas y cols., 2010; Lantero y cols., 2012). La estrategia de incrementar la actividad TGF- β utilizando ratones modificados genéticamente deficientes en el pseudo-receptor de TGF- β s, BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor), nos ha permitido demostrar el papel inhibitorio de la señalización de TGF- β en la percepción nociceptiva, tanto en condiciones de dolor agudo como en condiciones de dolor inflamatorio y neuropático (Tramullas y cols., 2010; Lantero y cols., 2012, 2014). Además, TGF- β 1 recombinante tiene un efecto protector frente al desarrollo de dolor neuropático a través de la inhibición de la activación glial y consiguiente disminución en la liberación de citoquinas proinflamatorias (Echeverry y cols., 2009, 2013), y a través de la activación de las vías inhibitorias descendentes de naturaleza opioide (Tramullas y cols., 2010; Lantero y cols., 2012, 2014). En lo que a BMPs se refiere, resultados no publicados de nuestro laboratorio muestran que los ratones deficientes en BMP-7 en heterocigosis (BMP-7^{+/-}) desarrollan más alodinia mecánica en respuesta a la lesión traumática del nervio ciático, y este fenotipo hiperalgésico asocia una sobreexpresión medular de miR-30c. Estos hallazgos sugieren efectos protector y antialodínico no solo para TGF- β 1, sino también para otras citoquinas de la familia como BMP-7. En base a estos datos, nuestro siguiente objetivo fue correlacionar en ratas la sobreexpresión medular de miR-30c en condiciones de neuropatía traumática con la represión traduccional de sus dianas: (i) la citoquina neuroprotectora y antialodínica TGF- β 1 y (ii) la proteína efectora de BMP-7, SMAD-1 (Macias y cols., 2015). Nuestros estudios de expresión génica pusieron de manifiesto que la expresión de los RNAs mensajeros codificantes de TGF- β 1 y SMAD-1 en la médula espinal se correlacionan inversamente y de forma significativa con la expresión de miR-30c, lo que está en consonancia con

el efecto desestabilizador provocado por la unión de miR-30c a sus mensajeros diana. Más aún, los animales tratados con anti miR-30c muestran una importante elevación de los niveles medulares de expresión génica de TGF- β 1 y SMAD-1. En conjunto, nuestros resultados ponen de manifiesto que la sobreexpresión de miR-30c en la médula espinal juega un papel relevante en el desarrollo de dolor neuropático de origen traumático y entre los mecanismos implicados, se encuentra la inhibición traduccional de sus dianas TGF β 1 y SMAD-1.

La relación miR-30c y desarrollo de alodinia tras la neuropatía traumática resulta fuertemente soportada por nuestros resultados. Sin embargo, surge la pregunta de cuál es su vinculación: el dolor (miR-30c como agente sintomático) o la neuropatía (miR-30c como agente etiológico). Para resolver esta cuestión abordamos el estudio de la regulación de miR-30c en un modelo diferente de neuropatía que cursa con alodinia mecánica pero cuya etiología es isquémica. Como ya hemos discutido, el modelo se basa en la producción de trombosis en la arteria femoral común que genera isquemia en el nervio safeno y alodinia en la región inervada por dicho nervio. Nuestros resultados en este modelo indican que miR-30c no experimenta regulación significativa en el asta dorsal de los segmentos medulares correspondientes a las raíces del nervio femoral y su presencia en el LCR tampoco aumenta. Estos resultados sugieren, por un lado, una ausencia de relación de miR-30c con el síntoma dolor y, por otro, un papel específico para miR-30c en la neuropatía de origen traumático. De confirmarse estos datos, podríamos estar ante un biomarcador etiológico de dolor, capaz de discriminar alodinia de diferente origen, con potencial valor pronóstico y de respuesta al tratamiento.

Conclusiones

1. Las ratas sometidas a lesión traumática del nervio ciático desarrollaron dolor neuropático asociado a una expresión incrementada de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal, líquido cefalorraquídeo y plasma. Los niveles circulantes de miR-30c fueron directamente proporcionales al umbral nociceptivo de los animales frente a estímulos mecánicos.
2. En el modelo de neuropatía periférica de origen isquémico no se produjeron cambios significativos en los niveles de expresión medular mir-30c.
3. Estos resultados sugieren un papel para miR-30c en el proceso de plasticidad medular patológica responsable del desarrollo de alodinia tras la neuropatía traumática pero no tras la neuropatía isquémica.
4. El tratamiento con miR-30c o anti-miR-30c no modificó las respuestas nociceptivas evocadas en modelos de dolor agudo de tipo térmico, mecánico y químico.
5. El tratamiento con el inhibidor de miR-30c redujo las respuestas nociceptivas asociadas a la sensibilización central provocada por un estímulo inflamatorio periférico.
6. El tratamiento crónico con miR-30c intracisternal aceleró y potenció la alodinia mecánica desarrollada tras la lesión traumática del nervio ciático.
7. Por el contrario, el tratamiento con anti-miR-30c atenuó y retrasó la alodinia tras la neuropatía traumática. Este efecto se asoció a una reducción significativa de la expresión de miR-30c en el asta dorsal de la médula espinal.
8. Los niveles de expresión medular de los RNA mensajeros diana de miR-30c, TGF- β 1 y SMAD-1, se correlacionaron inversamente con los de

miR-30c. Además, el tratamiento con el inhibidor de miR-30c incrementó significativamente la expresión medular de ambos RNAs mensajeros.

9. Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de miR-30c en la médula espinal juega un papel relevante en el desarrollo de dolor neuropático de origen traumático y entre los mecanismos implicados, se encuentra la inhibición traduccional de sus dianas TGF β 1 y SMAD-1.

10. Nuestros resultados permiten postular el valor de miR-30c como diana terapéutica potencial para el tratamiento del dolor neuropático de origen traumático, y sugieren su utilidad como biomarcador diagnóstico/pronóstico y/o de respuesta tratamientos.

Bibliografía

- Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. (2010) "Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction". *Clinical Chemistry* 56(7):1183-1185.
- Agostini M, Tucci P, Steinert JR, Shalom-Feuerstein R, Rouleau M, Aberdam D, Forsythe ID, Young KW, Ventura A, Concepción CP, Han YC, Candi E, Knight RA, Mak TW, Melino G. (2011) "MicroRNA-34a regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function". *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 108:21099–21104
- Ahmed FE. (2014) "miRNA as markers for the diagnostic screening of colon cancer". *Expert Review Anticancer Therapy* 14(4):463-485.
- Aldrich BT, Frankes EP, Kasuya J, Hammond DL, Kitamoto T. (2009) "Changes in expression of sensory organ specific microRNAs in rat dorsal root ganglia in association with mechanical hyper-sensitivity induced by spinal nerve ligation". *Neuroscience* 164(2):711-723.
- Alevizos I, Illei GG. (2010) "MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases". *Nature Reviews Rheumatology* 6(7):391-398.
- Aliaga L, Baños JE, De Barutell C, Molet J, Rodríguez de la Serna A. *Tratamiento del dolor. Teoría y práctica. 3ª edición* Permanyer, 2009.
- Aloisi AM, Zimmermann M, Herdegen T. (1997) "Sex-dependent effects of formalin and restraint on c-Fos expression in the septum and hippocampus of the rat". *Neuroscience* 81(4):951-958.
- Andersen HH, Duroux M, Gazerani P. (2014) "MicroRNAs as modulators and biomarkers of inflammatory and neuropathic pain conditions". *Neurobiology of Disease* 71:159-168.
- Andersen HH, Duroux M, Gazerani P. (2015) "Serum MicroRNA Signatures in Migraineurs During Attacks and in Pain-Free Periods" *Molecular Neurobiology*.
- Apkarian AV, Hashmi JA, Baliki MN. (2011) "Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain". *Pain* 152(3):S49-S64.
- 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.
- Austin PJ, Moalem-Taylor G. (2010) "The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines". *Journal of Neuroimmunology* 229:26-50.

- 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". *Neurochemistry International* 10:22
- Bali KK, Selvaraj D, Satagopam VP, Lu J, Schneider R, Kuner R. (2013) "Genome-wide identification and functional analyses of microRNA signatures associated with cancer pain". *Embo Molecular Medicine* 5(11):1740-1758.
- Bali KK, Kuner R. (2014) "Noncoding RNAs: key molecules in understanding and treating pain". *Trends Molecular Medicine* 20(8):437-448.
- Baraniskin A, Kuhnenn J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, Maghnouj A, Zöllner H, Reinacher-Schick A, Schmiegel W, Hahn SA, Schroers R. (2011) "Identification of MiRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system". *Blood* 117(11):3140-3146.
- Barbierato M, Zusso M, Skaper SD, Giusti P. (2015) "MicroRNAs: emerging role in the endogenous μ opioid system". *CNS Neurology Disorder Drug Targets* 14(2):239-250
- Baron R, Binder A, Wasner G. (2010) "Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment". *The Lancet Neurology* 9(8):807-819.
- Bartel, DP. (2004) "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function". *Cell* 116(2):281-297.
- Bartel DP. (2009) "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions". *Cell* 136(2):215-233.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. (2009) "Cellular and molecular mechanisms of pain". *Cell* 139(2):267-284.
- Bee LA, Dickenson AH. (2007) "Neuropathic Pain: Multiple Mechanisms at Multiple Sites". *Future Neurology* 2(6):661-671.
- Ben-Hamo R, Efroni S. (2013) "MicroRNA-gene association as a prognostic biomarker in cancer exposes disease mechanisms". *PLoS Comput Biology* 9(11):e1003351.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. (2003) "Dicer is essential for mouse development". *Nature Genetics* 35:215-17.

- Bjersing JL, Lundborg C, Bokarewa MI, Mannerkorpi K. (2013) "Profile of cerebrospinal microRNAs in fibromyalgia". *PLoS One* 8(10):e78762.
- Bonica JJ. "Bonica's Management of Pain". Lippincott Williams y Wilkins, 2010. Eds. Scott Fishman, Jane Ballantyne, and James P. Rathmell.
- Bonin RP, Bories C, De Koninck Y. (2014) "A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments". *Molecular Pain* 10:26.
- Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. (2008) "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population". *Pain* 136(3):380-387.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. (2006) "Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment". *European Journal of Pain* 10(4):287-333.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005) "Principles of microRNA-target recognition". *PLoS Biology* 3(3):e85.
- 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.
- Bridges D, Thompson SW, Rice AS. (2001) "Mechanisms of neuropathic pain". *British Journal of Anaesthesia* 87(1):12-26.
- Butz H, Rácz K, Hunyady L, Patócs A. (2012) "Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery". *Trends in Pharmacological Sciences* 33(7):382-393.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. (2004) "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs". *RNA* 10(12):1957-1966.
- Calin GA, Croce CM. (2006) "MicroRNA signatures in human cancers". *Nature Reviews Cancer* 6(11): 857-866.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. (2005) "A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia". *New England Journal of Medicine* 353(17):1793-1801.

- Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. (2012) “The role of the immune system in the generation of neuropathic pain”. *Lancet Neurology* 11(7):629-642.
- Campbell JN, Meyer RA. (2006) “Mechanisms of neuropathic pain”. *Neuron* 52(1):77-92.
- Caporali A, Meloni M, Völlenkle C, Bonci D, Sala-Newby GB, Addis R, Spinetti G, Losa S, Masson R, Baker AH, Agami R, le Sage C, Condorelli G, Madeddu P, Martelli F, Emanuelli C. (2011) “Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia”. *Circulation* 123(3):282-291.
- Cerdá-Olmedo G, Mena-Duran AV, Monsalve V, Oltra E. (2015) “Identification of a MicroRNA Signature for the Diagnosis of Fibromyalgia”. *Plos One* 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.
- Chable-Bessia C, Meziane O, Latreille D, Triboulet R, Zamborlini A, Wagschal A, Jacquet JM, Reynes J, Levy Y, Saib A, Bennasser Y, Benkirane M. (2009) “Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors”. *Retrovirology* 6:26.
- Chattopadhyay M, Zhou Z, Hao S, Mata M, Fink DJ. (2012) “Reduction of voltage gated sodium channel protein in DRG by vector mediated miRNA reduces pain in rats with painful diabetic neuropathy”. *Molecular Pain* 8:17.
- 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”. *Neurochemical Research* 39(1):76-83.
- Chen WS, Leung CM, Pan HW, Hu LY, Li SC, Ho MR, Tsai KW. (2012) “Silencing of miR-1-1 and miR-133a-2 cluster expression by DNA hypermethylation in colorectal cancer”. *Oncology Reports* 28(3):1069-1076.
- Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. (2012) “Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology”. *Nature Neuroscience* 15(8):1063-1067.
- Cochella L, Hobert O. (2012) “Diverse functions of microRNAs in nervous system development”. *Current Topics in Developmental Biology* 99:115–143.

- Cohen S , Mao J. (2014) “Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications”. *Bristish Medical Journal* 348:f7656
- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. (2010) “Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease”. *Circulation Cardiovascular Genetics* 3(6):499-506.
- Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M. (2009) “T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity”. *Journal Neuroscience* 29(46):14415-14422.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. (2009) “Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage”. *Annual Review of Neuroscience* 32:1-32.
- Cullen BR. (2004) “Transcription and processing of human microRNA”. *Molecular Cell* 16(6):861-865.
- Dangwal S, Bang C, Thum T. (2012) “Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research”. *Cardiovascular Research* 93(4):545-554.
- Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. (2010) “Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha”. *Molecular Cell* 39(3):373-384.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. (2000) “Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia”. *Nature* 405(6783):183-187.
- 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(7014):231-235.
- Devor M, Keller CH, Deerinck TJ, Levinson SR, Ellisman MH. (1989) Na⁺ channel accumulation on axolemma of afferent endings in nerve end neuromas in *Apteronotus*. *Neuroscience Letters* 102(2-3):149-154.
- Díaz SM, Anton LM. (2004) “The Role of Micrnas in Cancer”. *Molecular Cell* 16:861-865.

- Dickhaus H, Zimmermann M, Zotterman Y. (1976) "The development in regenerating cutaneous nerves of C fiber receptors responding to noxious heating of the skin". Zotterman Y, editor. *Sensory Functions of the Skin in Primates*. Oxford: Pergamon, 415–425.
- Dostrovsky JO, Craig AD in Wall and Melzack's textbook of pain. (2006) "Ascending projection systems". McMahon SB, Kolzenburg M (Elsevier, Philadelphia), 187-203.
- Dubin AE, Patapoutian A. (2010) "Nociceptors: the sensors of the pain pathway". *The Journal Clinical Investigation* 120(11):3760-3772.
- Duraku LS, Hossaini M, Hoendervangers S, Falke LL, Kambiz S, Mudera VC, Holstege JC, Walbeehm ET, Ruigrok TJH.(2012)"Spatiotemporal dynamics of re-innervation and hyperinnervation patterns by uninjured CGRP fibers in the rat foot sole epidermis after nerve injury". *Molecular Pain* 8:61.
- Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J. (2009) "Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effect". *Molecular Pain* 5:16.
- Echeverry S, Wu Y, Zhang J. (2013) "Selectively reducing cytokine/chemokine expressing macrophages in injured nerves impairs the development of neuropathic pain". *Experimental Neurology* 240:205-218.
- Eissa S, Matboli M, Shehata HH. (2014) "Breast tissue-based microRNA panel highlights microRNA-23a and selected target genes as putative biomarkers for breast cancer". *Translational Research* 165(3):417-427.
- Eltamah S, Landry M, Favereaux A. (2014) "MicroRNAs regulate neuronal plasticity and are involved in pain mechanisms". *Front Cell Neuroscience* 8:31.
- Elliott AM, Smith BH, Penny KI, Smith WC, Chambers WA. (1999) "The epidemiology of chronic pain in the community". *Lancet* 354(9186):1248-1252.
- England JD, Happel LT, Kline DG, Gamboni F, Thouron CL, Liu ZP, Levinson SR. (1996) "Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas". *Neurology* 47(1):272-276.
- Etheridge A , Lee I , Hood L , Galas D , Wang K. (2011) "Extracellular microRNA : a new source of biomarkers". *Mutation Research* 717(1-2):85-90.
- Favreau AJ, Cross EL, Sathyanarayana P. (2012) "miR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p

- correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia". *Am Journal Hematology* 87(4):442-446.
- Favereaux A, Thoumine O, Bouali-Benazzoua R, Roques V, Papon MA, Salam SA, Drutel G, Leger C, Calas A, Nagy F and Landry M. (2011) "Bidirectional integrative regulation of Cav 1.2 calcium channel by microRNA mir 103: role in pain". *The EMBO Journal* 30:3830-3841.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. (2010) "Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease". *Circulation Research* 107(5):677-684.
- Fields HK, Basbaum A, Heinrich RL. (2006) "Central nervous system mechanisms of pain modulation". En McMahon SB, Koltzenburg M, editors. *Wall and Melzack's textbook of pain*, 5a edition. Philadelphia: Elsevier:125-142.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH. (2005) "Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal". *Pain* 118(3):289-305
- Florez, J. *El tratamiento farmacológico del dolor*. Ars Medica, 2007.
- Floyd D, Purow B. (2014) "Micro-masters of glioblastoma biology and therapy: increasingly recognized roles for microRNAs". *Neuro Oncology* 16(5):622-627.
- 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.
- Frost RJA, Olson EN. (2011) "Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs". *Proceedings of the National Academy Sciences* 108(52):21075-21080.
- Gallego JA, Gordon ML, Claycomb K, Bhatt M, Lencz T, Malhotra AK. (2012) "In Vivo MicroRNA Detection and Quantitation in Cerebrospinal Fluid". *Journal of Molecular Neuroscience* 47(2):243-248.
- Gangaraju VK, Lin H. (2009) "MicroRNAs: key regulators of stem cells". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(2):116-125
- García R, Villar AV, Cobo M, Llano M, Martín-Durán R, Hurlé MA, Francisco Nistal J. (2013) "Circulating levels of miR-133a predict the regression potential of left ventricular hypertrophy after valve

- replacement surgery in patients with aortic stenosis”. *Journal of the American Heart Association* 2(4).
- García R, Nistal JF, Merino D, Price NL, Fernández-Hernando C, Beaumont J, González A, Hurlé MA, Villar AV. (2015) “p-SMAD2/3 and DICER promote pre-miR-21 processing during pressure overload-associated myocardial remodeling”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852(7):1520-1530.
- García-Porrero JA, Hurlé JM. (2015) “Neuroanatomía Humana”. Editorial médica Panamericana.
- 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.
- Georgantas RW, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, Calin GA, Croce CM, Civin CI. (2007) “CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control”. *Proceedings of the National Academy Sciences* 104(8):2750-2755.
- Gheinani AH, Burkhard FC, Monastyrskaya K. (2013) “ Deciphering microRNA code in pain and inflammation: lessons from bladder pain syndrome”. *Cell Molecular Life Science* 70(20):3773-3789.
- Gilron I, Baron R, Jensen T. (2015) “Neuropathic Pain: Principles of Diagnosis and Treatment”. *Mayo Clin Proc* 90(4):532-545.
- Goldie BJ, Cairns MJ. (2012) “Post-transcriptional trafficking and regulation of neuronal gene expression”. *Molecular Neurobiology* 45: 99–108.
- Gong Q, Lu Z, Huang Q, Ruan L, Chen J, Liang Y Wang H, Yue Y, Feng S. (2015) “Altered microRNAs expression in mice with diabetic neuropathic pain”. *Biochemical Biophys Res Commun* 456(2): 615-620.
- Grace PM, Rolan PE, Hutchinson MR. (2011) “Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain”. *Brain Behavior and Immunity* 25(7):1322-1332.
- Gracely RH, Lynch SA, Bennett GJ. (1992) “Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input”. *Pain* 51(2):175-194.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP.(2007) “MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing”. *Molecular Cell* 27(1):91-105.

- Ha TY. (2011) "MiRNAs in Human Diseases: From Autoimmune Diseases to Skin, Psychiatric and Neurodegenerative Diseases". *Immune Network* 11(5):227-244.
- Hallam SJ, Jin Y. (1998) "Lin-14 regulates the timing of synaptic remodelling in *Caenorhabditis*". *Nature* 395:78-82.
- 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". *Urologic Oncology* 28(6):655-661.
- Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. (2014) "MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy". *Trends Molecular Medical* 20(8):460-469.
- He L y, Hannon GJ. (2004) "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation". *Nature Review Genetics* 5(7):522-531.
- He Y, Yang C, Kirkmire CM, Wang ZJ. (2010) "Regulation of opioid tolerance by let-7 family microRNA targeting the mu opioid receptor". *Journal of Neuroscience* 30(30):10251-10258.
- Hébert SS, De Strooper B. (2009) "Alterations of the MicroRNAs network cause neurodegenerative disease". *Trends in Neurosciences* 32(4):199-206.
- Hellingman AA, Bastiaansen AJ, de Vries MR, Seghers L, Lijkwan MA, Löwik CW, Hamming JF, Quax PH. (2010) "Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation". *European Journal Vascular Endovascular Surg* 40(6):796-803
- Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, Mikulkova Z, Buresova I, Raja KR, Hodek J, Ovesna J, Michalek J. (2010) "MicroRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients". *Cellular Immunology* 260(2):70-74.
- Higa GS, de Sousa E, Walter LT, Kinjo ER, Resende RR, Kihara AH. (2014) "MicroRNAs in neuronal communication". *Molecular Neurobiology* 49(3):1309-26.
- Hobert O. (2008) "Gene regulation by transcription factors and microRNAs". *Science* 319(5871):1785-1786.
- 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.
- Hornstein E, Mansfield JH, Yekta S, Hu JK, Harfe BD, McManus MT, Baskerville S, Bartel DP, Tabin CJ. (2005) "The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development". *Nature* 438(7068):671-674.
- Huang D, Yu B. (2010) "The mirror-image pain: an unclered phenomenon and its possible mechanism". *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34(4):528-532.
- Hughes AE, Bradley DT, Campbell H, Lecher J, Dash DP, Simpson DA, Willoughby CE. (2011) "Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract". *American Journal of Human Genetics* 89(5):628-633.
- Huo X, Mao Ying Q, Zhou W, Danzter R, Heijnen CJ, Kavelaars A. (2013) "Intrathecal administration of microRNA-124 alleviates both neuropathic pain and depression like behavior in mice". *Elsevier, Brain Behavior and Immunity* 32:19.
- Hwang HW, Mendell JT. (2004) "MicroRNAs cell proliferation, cell death and tumorigenesis". *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.
- Hydbring P, Badalian-Very G. (2013) "Clinical applications of microRNAs". *Version 3. F1000Res*, 2:136.
- Im YB, Jee MK, Choi JI, Cho HT, Kwon OH, Kang SK. (2012) "Molecular targeting of NOX4 for neuropathic pain after traumatic injury of the spinal cord". *Cell Death and Disease* 3:426.
- 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.
- Jancalek R. (2011) "Signaling mechanisms in mirror image pain pathogenesis." *Ann Neuroscience* 18(3):123-127.
- Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. (2011) "A new definition of neuropathic pain". *Pain* 152(10):2204-2205.
- Ji RR, Woolf CJ. (2001) "Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain". *Neurobiology of Disease* 8(1):1-10.

- Jin XF, Wu N, Wang L, Li J. (2013) "Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases". *Cellular and Molecular Neurobiology* 33(5):601-613.
- Johnston RJ, Hobert O. (2003) "A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *C. Elegans*". *Nature* 426(6968):845-849.
- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. (2005) "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA". *Science* 309(5740):1577-1581.
- Julius D, Basbaum AI. (2001) "Molecular mechanisms of nociception". *Nature* 413(6852):203-210.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T. (2000) "Principles of Neural Science". McGraw-Hill Medical; 4 edition 2000.
- Kadri S, Himmanv V, Benos PV. (2009) "HHMMIR: efficient de novo prediction of microRNAs using hierarchical hidden Markov models". *BMC Bioinformatics* 10(1):S35.
- Kawahara H, Imai T, Okano H. (2012) "MiRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis". *Frontiers in Neuroscience* 6(3).
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003) "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias". *Cell* 115(2):209-216.
- Kohn T, Ji RR, Ito N, Allchorne AJ, Befort K, Karchewski LA, Woolf CJ. (2005) "Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord". *Pain* 117(1-2):77-87.
- Koltzenburg M, Wall PD, McMahon SB. (1999) "Does the right side know what the left is doing?". *Trends in Neurosciences* 22(3):122-127.
- Kosik KS. (2006) "The neuronal microRNA system". *Nature Reviews Neuroscience* 7(12):911-920.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. (2011) "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data". *Nucleic Acids Research* 39:D152-157.
- Kloosterman WP, Plasterk RH. (2006) "The diverse functions of microRNAs in animal development and disease". *Developmental Cell* 11(4):441-450.
- Kress M, Hüttenhofer A, Landry M, Kuner R, Favereaux A, Greenberg D, Bednarik J, Heppenstall P, Kronenberg F, Malcangio M, Rittner H, Uçeyler N, Trajanoski Z, Mouritzen P, Birklein F, Sommer C, Soreq

- H. (2013) “MicroRNAs in nociceptive circuits as predictors of future clinical applications”. *Front Molecular Neuroscience* 6:33.
- 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.
- Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T. (2011) “Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage”. *Circulation Cardiovascular Genetics* 4(4):446-454.
- Kynast KL, Russe OQ, Möser CV, Geisslinger G, Niederberger E. (2013) “Modulation of central nervous system-specific microRNA-124a alters the inflammatory response in the formalin test in mice”. *Pain* 154(3):368–376.
- Kynast KL, Russe OQ, Geisslinger G, Niederberger E. (2013) “Novel findings in pain processing pathways: implications for miRNAs as future therapeutic targets”. *Expert Review of Neurotherapeutics* 13(5):515-525.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001) “Identification of novel genes coding for small expressed RNAs”. *Science* 294(5543):853-858
- 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.
- Lantero A, Tramullas M, Díaz A, Hurlé MA. (2012) “Transforming growth factor- β in normal nociceptive processing and pathological pain models”. *Molecular Neurobiology* 45(1):76-86.
- Lantero A, Tramullas M, Pílar-Cuellar F, Valdizán E, Santillán R, Roques BP, Hurlé MA. (2014) “TGF- β and opioid receptor signaling crosstalk results in improvement of endogenous and exogenous opioid analgesia under pathological pain conditions. *Journal of Neuroscience* 34(15):5385-5395.
- Latremoliere A y, Woolf CJ. (2009) “Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity”. *Journal Pain* 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.
- Leadley RM, Armstrong N, Lee YC, Allen A, Kleijnen J. (2012) “Chronic diseases in the European Union: the prevalence and health cost implications of chronic pain”. *Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy* 26(4):310-325.
- Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb A, Voinnet O. (2005) “A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells”. *Science* 308(5721):557-560.
- 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(5):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.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim N. (2004) “MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II”. *EMBO Journal* 23(20):4051–4060.
- Lee JH. (2012) “A new rat pain model of thrombus-induced ischemia”. *Methods Mol Biol.* 2012;851:213-22.
- Levinson SR, Luo S, Henry MA. (2012) “The role of sodium channels in chronic pain”. *Muscle Nerve* 46(2):155-165.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. (2003) “Prediction of mammalian microRNA targets”. *Cell* 115(7):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.
- Lewis MA, Quint E, Glazier AM, Fuchs H, De Angelis MH, Langford C, van Dongen S, Abreu-Goodger C, Piipari M, Redshaw N, Dalmay T, Moreno-Pelayo MA, Enright AJ, Steel KP. (2009) “An ENU-induced mutation of miR-96 associated with progressive hearing loss in mice”. *Nature Genetics* 41(5):614-618.
- 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 H, Huang Y, Ma C, Yu X, Zhang Z, Shen L. (2014) "MiR-203 Involves in Neuropathic Pain Development and Represses Rap1a Expression in Nerve Growth Factor Differentiated Neuronal PC12 Cells". *Clinical Journal of Pain* 2014.
- 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.
- Li X, Jin P. (2010) "Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity". *Nature Reviews Neuroscience* 11(5):329–338.
- Lin SL, Miller JD, Ying SY. (2006) "Intronic microRNA (miRNA)". *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006(4):26818
- 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 X, Eschenfelder S, Blenk KH, Janig W, Habler H. (2000) "Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats". *Pain* 84(2-3):309-318.
- Liu Y, Zheng Y, Gu X, Ma Z. (2012) "The efficacy of NMDA receptor antagonists for preventing remifentanyl-induced increase in postoperative pain and analgesic requirement: a meta-analysis". *Minerva Anestesiologica* 78(6):653-667.
- Liu CN, Michaelis M, Amir R, Devor M. (2000) "Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain". *Journal of Neurophysiology* 84(1):205-215.
- Liu NK, Xu XM. (2011) "MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders". *Physiological Genomics* 43(10):571-580.
- Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ. (2008) "Micromanagement of the immune system by microRNAs". *Nature Reviews Immunology* 8(2):120-130.
- Lötsch J, Doehring A, Mogil J.S , Arndt T, Geisslinger G, Ultsch A. (2013) "Functional genomics of pain in analgesic drug development and therapy". *Pharmacology y Therapeutics* 139(1):60-70

- Lorenzen JM, Martino F, Thum T. (2013) “Detection and transport mechanisms of circulating microRNAs in neurological, cardiac and kidney diseases”. *Current Medicinal Chemistry* 20(29):3623-3628.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. (2004) “Nuclear export of microRNA precursors”. *Science* 303(5654):95–98.
- 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.
- Macias MJ, Martin-Malpartida P, Massagué J. (2015) “Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling”. *Trends Biochemical Science* 2015 Apr 29. pii: S0968-0004(15)00061-4
- Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y. (2013) “The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases”. *Front Cell Neuroscience* 7:265.
- Malan-Müller S, Hemmings SM, Seedat S. (2013) “Big effects of small RNAs: a review of microRNAs in anxiety”. *Molecular Neurobiology* 47(2):726-739.
- Mallory AC, Bouche N. (2008) “MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave”. *Trends in Plant Science* 13(7):359-367.
- McDonald MK, Ajit SK. (2015) “MicroRNA biology and pain”. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 131: 215-249.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. (2007) “TRPA1 mediates formalin-induced pain”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33):13525-13530.
- Melzack R, Casey KL. (1968) Sensory, motivational and central control determinants of chronic pain: A new conceptual model. En: Kenshalo, DR. *The Skin Senses*. Springfield, Illinois, 1968. p. 432-449.
- Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Aguirre LA, del Castillo I, Steel KP, Dalmay T, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. (2009) “Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss”. *Nature Genetics* 41(5):609-613.
- Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN. *Peripheral mechanisms of nociception*. 5ª edición. Elsevier, 2006.
- Meza-Sosa KF, Valle-Garcia D, Pedraza-Alva G, Perez-Martinez L. (2012) “Role of microRNAs in central nervous system development and pathology”. *Journal of Neuroscience Res*. 90:1–12.

- Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. (2013) "Importance of glial activation in neuropathic pain". *European Journal of Pharmacology* 716(1-3):106-119.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. (2003) "Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats". *Journal of Neuroscience* 23(3):1026-1040.
- Milligan ED, Maier SF, Watkins LR. (2004) "Sciatic inflammatory neuropathy in the rat: surgical procedures, induction of inflammation, and behavioral testing". *Methods in Molecular Medicine* 99:67-89.
- Milligan ED, Watkins LR. (2009) "Pathological and protective roles of glia in chronic pain". *Nature Reviews Neuroscience* 10(1):23–36.
- 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". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(30):10513-10518.
- Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. (2009) "Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a". *Journal of Hepatology* 50(3):453-460.
- Nana-Sinkam SP, Croce CM. (2013) "Clinical applications for microRNAs in cancer". *Clinical Pharmacology y Therapeutics* 93(1):98-104.
- Ni J, Gao Y, Gong S, Guo S, Hisamitsu T, Jiang X. (2013) "Regulation of μ -opioid type 1 receptors by microRNA 134 in dorsal root ganglion neurons following peripheral inflammation". *European Journal of Pain* 17(3):313-323.
- Niederberger E, Kynast K, Lötsch J, Geisslinger G. (2011) "MicroRNAs as new players in the pain game". *Pain* 152(7):1455-1458.
- Nieto-Diaz M, Esteban F, Reigada D, Muñoz-Galdeano T, Yunta M, Caballero-López M, Navarro-Ruiz R, del Águila A, Maza RM. (2014) "MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: causes, consequences ,and therapeutics". *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8(53):1-19.
- Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Bhyrapuneni G, Muddana N, Saralaya R, Benade V. (2009) "A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment

- of drug penetration into the central nervous system". *Journal of Neuroscience Methods* 178(1):116-119.
- Nowak JS, Michlewski G. (2013) "miRNAs in development and pathogenesis of the nervous system". *Biochemical Soc Trans* 41(4):815-820.
- Obata H, Sakurazawa S, Kimura M, Saito S. (2010) "Activation of astrocytes in the spinal cord contributes to the development of bilateral allodynia after peripheral nerve injury in rats". *Brain Research* 1363:72-80.
- O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. (2012) "Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain". *Pharmacological Reviews* 64(4):939-971.
- Orlova IA, Alexander GM, Qureshi RA, Sacan A, Graciano A, Barret JE, Schwartzman RJ, Ajit SK. (2011) "MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome". *Journal of Translational Medicine* 9:195.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. (2010) "Central modulation of pain". *Journal of Clinical Investigation* 120(11):3779-3787.
- Ozcan S. (2009) "MiR-30 family and EMT in human fetal pancreatic islets". *Islets, Landes Bioscience* 1(3):283-285.
- Palay SL, Chan-Palay V. (1974) "A guide to the synaptic analysis of the neuropil". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 40:1-16
- Park NJ, Zhou H, Blastoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT. (2009) "Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection". *Clinical 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* 408(6808):86-89.
- 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

- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T. (2005) "Identification of microRNAs of the herpesvirus family". *Nature Methods* 2(4):269-276.
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner H L. (2011) "MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway". *Nature Medicine* 17(1):64–70.
- Poh KW, Yeo JF, Ong WY. (2011) "MicroRNA changes in the mouse prefrontal cortex after inflammatory pain". *European Journal of Pain* 15(8):801.
- Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M. (2009) "miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass". *Proceedings National Academy Science* 106(14):5813-5818.
- Price D. (2000) "Psychological and Neural Mechanisms of the Affective Dimension of Pain". *Science* 288: 1769-1772.
- Qabaja A, Alshalalfa M, Bismar TA, Alhadj R. (2013) "Protein network-based Lasso regression model for the construction of disease-miRNA functional interactions". *EURASIP Journal on Bioinformatics y Systems Biology* 2013(1):3.
- Rajewsky N. (2006) "MicroRNA target predictions in animals". *Nature Genetics Suppl*:S8-13.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000) "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*". *Nature* 403(6772):901-906.
- Ren K, Dubner R. (2010) "Interactions between the immune and nervous systems in pain". *Nature Medicine* 16(11):1267-1276.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. (2004) "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units". *Genome Research* 14(10A):1902-1910
- Rodríguez RE. (2012) "Morphine and microRNA Activity: Is There a Relation with Addiction?" *Frontiers in Genetics* 3:223.
- Rouwette T, Vanelderden P, Roubos EW, Kozicz T, Vissers K. (2012) "The amygdala, a relay station for switching on and off pain". *European Journal of Pain* 16(6):782-792.

- Sakai A, Saitow F, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Suzuki H. (2013) "Mir 7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability". *Brain a Journal of Neurology* 136 (Pt 9):2738-2750.
- Sakai A, Suzuki H. (2013) "Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 435(2):176-181.
- Samols MA, Hu J, Skalsky RL, Renne R. (2005) "Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus". *Journal of Virology* 79(14): 9301-9305.
- Sanders KH, Zimmermann M. (1986) "Mechanoreceptors in rat glabrous skin: redevelopment of function after nerve crush". *Journal of Neurophysiology* 55(4):644-659.
- Saugstad JA. (2010) "MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration". *Journal Cerebral Blood Flow Metabolic* 30:1564–1576.
- Sayed D, Abdellatif M. (2011) "MicroRNAs in development and disease". *Physiological Reviews* 91(3):827-887.
- Scholz J, Woolf CJ. (2002) "Can we conquer pain?". *Nature Neuroscience. Supplement volume 5*.
- Scholz J, Woolf CJ. (2007) "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia". *Nature Neuroscience* 10(11):1361-1368.
- Seo HS, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Kwon YB, Han HJ, Chung JM, Beitz AJ, Lee JH. (2008) "new rat model for thrombus-induced ischemic pain (TIIP); development of bilateral mechanical allodynia" *Pain*. 2008 Oct 31;139(3):520-532.
- Shields SD, Cavanaugh DJ, Lee H, Anderson DJ, Basbaum AI. (2010) "Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors". *Pain* 151(2):422-429
- Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. (2007) "MiR-21 mediated tumor growth". *Oncogene* 26(19):2799-2803.
- Skaper SD, Giusti P, Facci L. (2012) "Microglia and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation". *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 26(8):3103-3117.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. (1990) "A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury". *Pain* 43(2):205-218.

- Seo HS, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Kwon YB, Han HJ, Chung JM, Beitz AJ, Lee JH. (2008) "A new rat model for thrombus-induced ischemic pain (TIIP); development of bilateral mechanical allodynia". *Pain* 139(3):520-532.
- Seo HS, Roh DH, Yoon SY, Kang SY, Moon JY, Kim HW, Han HJ, Chung JM, Beitz AJ, Lee JH. (2010) "Peripheral acid-sensing ion channels and P2X receptors contribute to mechanical allodynia in a rodent thrombus-induced ischemic pain model". *Journal Pain*.11(8):718-27
- Shi G, Shi J, Liu K, Liu N, Wang Y, Fu Z, Ding J, Jia L, Yuan W. (2013) "Increased miR-195 aggravates neuropathic pain by inhibiting autophagy following peripheral nerve injury". *Glia* 61(4):504-512.
- Shir Y, Seltzer Z. (1991) "Effects of sympathectomy in a model of causalgiform pain produced by partial sciatic nerve injury in rats". *Pain* 45(3):309-320.
- Smalheiser NR, Torvik VI. (2005) "Mammalian microRNAs derived from genomic repeats". *Trends in Genetics* 21(6):322-326.
- Smith B, Treadwell J, Zhang D, Ly D, McKinnell I, Walker P R, Sikorska M. (2010) "Large-scale expression analysis reveals distinct microRNA profiles at different stages of human neurodevelopment". *PLOS ONE* 5 (6):e11109.
- 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.
- Spataro LE, Sloane EM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Schoeniger D, Jekich BM, Barrientos RM, Maier SF, Watkins LR. (2004) "Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation". *Journal of Pain* 5(7):392-405.
- Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, Detmar M, Gay S, Kyburz D. (2008) "Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis". *Arthritis and Rheumatims* 58(4):1001-1009.
- Stefani G, Slack FJ. (2008) "Small non-coding RNAs in animal development". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(3):219–230.
- Strickland EE, Woller SA, Garraway SM, Hook MA, Grau JW, Miranda RC. (2014) "Regulatory effects of intermitent noxious stimulation on spinal cord injury-sensitive microRNAs and their presumptive

- targets following spinal cord contusion”. *Front Neural Circuits* 8:117.
- 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.
- Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH. (2004) “Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing”. *Trends in Pharmacological Sciences* 25(12):613-617.
- Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. (2015) “Circulating serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer”. *Journal Urology* 193(1):331-337.
- Takasugi Y, Shirai T, Futagawa K, Koga Y, Egawa K, Watanabe S, Umeda T. (2005) “Transcutaneous cisternal puncture for sampling of cerebrospinal fluid in awake rat”. *Experimental Animals* 54(2):193-196.
- Tan PH, Pao YY, Cheng JK, Hung KC, Liu CC. (2013) “MicroRNA-based therapy in pain medicine: Current progress and future prospects”. *Acta Anaesthesiology Taiwan* 51(4):171-176.
- Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. (2009) “Identification of glucoseregulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription”. *Rna* 15(2):287-293.
- Taves S, Berta T, Chen G, Ji RR. (2013) “Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain”. *Hindawi Neural Plasticity* 2013:id753656.
- Tan Y, Yang J, Xiang K, Tan Q, Guo Q. (2015) “Suppression of microRNA-155 attenuates neuropathic pain by regulating SOCS1 signalling pathway”. *Neurochemical Research* 40(3):550-560.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. (1992) “The formalin test: an evaluation of the method”. *Pain* 51(1):5-17.
- Todd AJ, Koerber R. (2006) “Neuroanatomical substrates of spinal nociception”. *Wall and Melzack’s textbook of pain*. London: Elsevier, 2006. 73-90.
- Thorns C, Schurmann C, Gebauer N, Wallaschofski H, Kümpers C, Bernard V, Feller AC, Keck T, Habermann JK, Begum N, Lehnert H, Brabant G. (2014) “Global microRNA profiling of pancreatic neuroendocrine neoplasias. *Anticancer Research* 34(5):2249-2254.
- Tramullas M, Lantero A, Díaz A, Morchón N, Merino D, Villar A, Buscher D, Merino R, Hurlé JM, Izpisúa-Belmonte JC, Hurlé MA.

- (2010) “BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation”. *Journal of Neuroscience* 30(4):1502-1511.
- Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, Strack I, Roggendorf M, Viazov S, Wedemeyer I, Drebber U, Rockstroh J, Sauerbruch T, Dienes HP, Odenthal M. (2013) “Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis”. *Journal of Hepatology* 58(2):234-239.
- 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”. *Molecular Pain* 7:30.
- Twining CM, Sloane EM, Milligan ED, Chacur M, Martin D, Poole S, Marsh H, Maier SF, Watkins LR. (2004) “Peri-sciatic proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, and complement induce mirror-image neuropathic pain in rats”. *Pain* 110(1-2):299-309.
- 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.
- Van Remoortere MP, Meert TF, Vissers KC, Coppenolle H, Adriaensen H. (2007) “Refinement of Symptoms of Neuropathic Pain Measurements After Various Transections of the Nerve Endings of the Sciatic and Femoral Nerve in Rats: An Exploratory Behavioral Analysis”. *Anesthesia y Analgesia* 104:1236 –1245.
- Van Remoortere MP, Meert TF, Vissers KC, Coppenolle H, Adriaensen H. (2007) “Refinement of symptoms of neuropathic pain measurements after various transections of the nerve endings of the sciatic and femoral nerve in rats: an exploratory behavioral analysis”. *Anesthesiology Analges* 104(5):1236-1245.
- Van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. (2012) “Developing microRNA therapeutics”. *Circulation Research* 110(3):496-507.
- Van Rooij E, Kauppinen S. (2014) “Development of microRNA therapeutics is coming of age”. *EMBO Molecular Medicine* 6(7):851-864.

- 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.
- Villar AV, Merino D, Wenner M, Llano M, Cobo M, Montalvo C, García R, Martín-Durán R, Hurlé JM, Hurlé MA, Nistal JF.(2011) "Myocardial gene expression of microRNA-133a and myosin heavy and light chains, in conjunction with clinical parameters, predict regression of left ventricular hypertrophy after valve replacement in patients with aortic stenosis". *Heart* 97(14):1132-1137.
- Villar AV, García R, Merino D, Llano M, Cobo M, Montalvo C, Martín-Durán R, Hurlé MA, Nistal JF. (2013) "Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients". *International Journal of Cardiology* 167(6):2875-2881.
- Villar AV, García R, Llano M, Cobo M, Merino D, Lantero A, Tramullas M, Hurlé JM, Hurlé MA, Nistal JF. (2013) "BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF- β signaling". *Biochimica et Biophysica Acta* 1832(2):323-335.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. (2006) "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103(7):2257-2261.
- Von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. (2006) "Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms". *Neuron* 73(4):638-652.
- Von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. (2012) "Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms". *Neuron* 73(4):638-52.
- Von Shack D, Agostino MJ, Murray BS, Yizheng L, Reddy PS, Jin C, Choe SE, Strassle BW, Li C, Bates B, Lynn Z, Huijuan H, Kotnis S, Bingham B, Wei L, Whiteside GT, Samad TA, Kennedy JD, Ajit SK. (2011) "Dynamich changes in the microRNA expression profile reveal multiple regulatory mechanism in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain". *Plos One* 6(3):1.
- Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R . (2006) "A genetic

- screen implicates miRNA 372 and miRNA 373 as oncogenes in testicular germ cell tumor". *Cell Press* 124(6):1169-1181.
- Wang JY, Zhao M, Huang FS, Tang JS, Yuan YK. (2008) "Mu-opioid receptor in the nucleus submedius: involvement in opioid-induced inhibition of mirror-image allodynia in a rat model of neuropathic pain". *Neurochemical Research* 33(10):2134-2141.
- Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. (2006) "Characterization of Chronic Constriction of the Saphenous Nerve, a Model of Neuropathic Pain in Mice Showing Rapid Molecular and Electrophysiological Changes". *Journal of Neuroscience Research* 83(7):1310-1322.
- Wang Z. (2010) "MicroRNA: A matter of life or death". *World Journal of Biological Chemistry* 1(4):41-54
- Watkins LR, Maier SF. (2002) "Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states". *Physiology Review* 82(4):981-1011
- 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.
- Wienholds E, Koudijs MG, Van Eeden FJM, Cuppen E, Plasterk RHA. (2003) "The microRNA-producing enzyme Dicer 1 is essential for zebrafish development". *Nature Genetics* 35(3):217-218.
- Willemsen HJLM, Huo XJ, Hao-Ying QL, Zijlstra J, Heijnen CJ and Kavelaars A. (2012) "MicroRNA-124 as a novel treatment for persistent hyperalgesic". *Journal of Neuroinflammation* 9:143.
- Woolf CJ, Ma Q. (2007) "Nociceptors--noxious stimulus detectors". *Neuron* 55(3):353-364.
- Woolf CJ y, Salter MW. (2006) "Plasticity and pain: role of the dorsal horn". En: McMahon SB, Koltzenburg M, editors. *Wall and Melzack's textbook of pain*. Philadelphia: Elsevier 91-105.
- 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.
- Wu Q, Hwang CK, Zheng H, Wagley Y, Lin HY, Kim do K, Law PY, Loh HH, Wei LN. (2013) "MicroRNA 339 down-regulates μ -opioid receptor at the post-transcriptional level in response to opioid treatment". *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 27(2):522-535.

- Wu Q, Law PY, Wei LN, Loh HH. (2008) "Post-transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor (MOR1) via its 3' untranslated region: a role for microRNA23b". *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 22(12):4085-4095.
- Wu T, Zhou H, Hong Y, Li J, Jiang X, Huang H. (2012) "miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation". *Journal of Biological Chemistry* 287(10):7503-7511.
- Xiao J, Liu D, Jiao W, Guo J, Wang X, Zhang X, Lu S, Zhao Z. (2015) "Effects of microRNA-346 on epithelial-mesenchymal transition in mouse podocytes". *Gene* 560(2):195-9
- Xu Y, Zhang X, Pu S, Wu J, Lv Y, Du D. (2014) "Circulating microRNA expression profile: a novel potential predictor for chronic nervous lesions". *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 46(11):942-949.
- 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.
- Yamasaki T, Yoshino H, Enokida H, Hidaka H, Chiyomaru T, Nohata N, Kinoshita T, Fuse M, Seki N, Nakagawa M. (2012) "Novel molecular targets regulated by tumor suppressors microRNA-1 and microRNA-133a in bladder cancer". *International Journal of Oncology* 40(6):1821-1830.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP. (2004) "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA". *Science* 304(5670):594-596.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. (2003) "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNA and short hairpin RNAs". *Genes y Development* 17(24):3011-3016.
- Yoon YW, Na HS, Chung JM. (1996) "Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model". *Pain* 64(1):27-36.
- Yu C, Chen WP, Wang XH. (2011) "MicroRNA in osteoarthritis". *Journal of International Medical Research* 39(1):1-9.
- Yu YM, Gibbs KM, Dávila J, Campbell N, Sung S, Todorova TI, Otsuka S, Sabaawy HE, Hart RP, Schachner M. (2011) "MicroRNA miR-133b is essential for functional recovery after spinal cord injury in adult zebrafish". *European Journal of Neuroscience* 33(9):1587-1597.
- Yunta M, Nieto-Díaz M, Esteban FJ, Caballero-López M, Navarro-Ruiz R, Reigada D, Pita-Thomas DW, del Águila A, Muñoz-Galdeano T,

- Maza RM. (2012) "MicroRNA dysregulation in the spinal cord following traumatic injury". *PLOS ONE* 7 (4):e34534
- Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. (2010) "Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes". *Circulation Research* 107(6):810-817.
- Zeng Y. (2006) "Principles of micro-RNA production and maturation". *Oncogene* 25:6156–6162.
- Zhang J, Banerjee B. (2015) "Role of MicroRNA in visceral pain" *Journal Neurogastroenterology Motil* 21(2):159-171.
- Zhang Y, Yang Q, Wang S. (2014) "MicroRNAs: a new key in lung cancer". *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 74(6):1105-1111.
- Zhao J, Lee MC, Momin A, Cendan CM, Shepherd ST, Baker MD, Asante C, Bee L, Bethry A, Perkins JR, Nassar MA, Abrahamsen B, Dickenson A, Cobb BS, Merckenschlager M, Wood JN. (2010) "Small RNAs control sodium channel expression, nociceptor excitability, and pain thresholds". *Journal of Neuroscience* 30(32):10860-10871.
- Zheng H, Chu J, Zeng Y, Loh HH, Law PY. (2010) "Yin Yang 1 phosphorylation contributes to the differential effects of mu-opioid receptor agonists on microRNA-190 expression". *Journal of Biological Chemistry* 285(29):21994-22002
- Zhu H y, Guo-Chang F. (2011) "Extracellular/circulating microRNAs and their potencial role in cardiovascular disease". *American Journal of Cardiovascular Disease* 1(2):138-141.
- Zi Z, Chapnick DA, Liu X. (2012) "Dynamics of TGF- β /Smad signaling". *FEBS Letters* 586(14):1921-1928.
- Zimmermann M. (2001) "Pathobiology of neuropathic pain". *European Journal of Pharmacology* 429(1-3):23-37.

