



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

MicroRNAs y Dolor Crónico **MicroRNAs and Chronic Pain**

Autora: Dña. Elsa García Rumayor

Director/es: Dña. M^a del Amor Hurlé González

Dña. Mónica Tramullas Fernández

Santander, Junio 2016

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	
1. DOLOR	
1.1 Concepto y tipos de dolor	8
1.2 Dolor crónico	8
1.3 Dolor neuropático	9-10
1.3.1 Clasificación	9-10
1.3.2 Fisiopatología	10
1.4 Polineuropatía diabética	10-11
1.4.1 Etiopatogenia	11
1.5 Polineuropatía diabética dolorosa	11-12
1.6 Tratamiento	12-13
2. MICRO-RNAS	
2.1 Concepto y descubrimiento	14
2.2 Biogénesis y mecanismo de acción	14-16
2.2.1 Localización en el genoma	14
2.2.2 Biogénesis	14-15
2.2.3 Mecanismo de acción	15-16
2.3 Dolor neuropático y Micro-RNAs	16-17
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Animales de experimentación	19-22
1.1 Modelo animal de diabetes	19
1.2 Determinación del peso corporal y de la glucemia	20
1.3 Valoración de la respuesta nocifensiva a estímulos mecánicos	20-21
1.3.1 Test de Von Frey	20-21
1.3.2 Test de Randall-Selitto o Paw Pressure	21

1.4 Extracción de muestras	22
1.4.1 Plasma	22
1.4.2 LCR	22
1.4.3 Médula y ganglios raquídeos dorsales	22
2. Pacientes	23-27
2.1 Criterios	23
2.1.1 Criterios de inclusión	23
2.1.2 Criterios de exclusión	23
2.2 Valoración clínica	23-26
2.2.1 Historia clínica.....	24
2.2.2 Cuestionarios de valoración del dolor: EVA y DN4	24-25
2.2.3 Exploración de la sensibilidad	25-26
2.2.4 Despistaje de enfermedad arterial periférica (EAP)	26
2.3 Extracción de muestras de plasma	27
3. Determinación de la expresión de miRNA mediante qPCR	27-29
3.1 Extracción de RNA de plasma y LCR	27
3.2 Extracción de RNA de médula y ganglios raquídeos dorsales	27-28
3.3 Determinación de la concentración y pureza del RNA	28
3.4 Transcripción reversa del RNA	28
3.5 PCR cuantitativa	28-29
RESULTADOS	
1. Animales de experimentación	31-34
1.1 Evolución del peso y la glucemia	31
1.2 Curso temporal del desarrollo de hiperalgesia y alodinia mecánica	31-33
1.3 Expresión de miR-30c	34

2. Pacientes	35-38
2.1 Valoración clínica	35-37
2.2 Expresión de miR-30c	38
CONCLUSIONES	40-42
BIBLIOGRAFÍA	44-48
AGRADECIMIENTOS	50

RESUMEN

RESUMEN

Antecedentes: El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico con alta prevalencia en nuestro medio, siendo la polineuropatía diabética dolorosa una de las causas más importantes del mismo. Recientemente se han implicado diversos microRNAs (miRNAs) en la fisiopatología del dolor crónico. Entre los miRNAs investigados, miR-30c aparece muy desregulado en el dolor neuropático de origen isquémico y traumático.

Métodos: pusimos a punto un modelo animal de diabetes con diez ratas (6 diabéticas y 4 controles) y analizamos la expresión diferencial de miR-30c en plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR), médula espinal y ganglio raquídeo dorsal. Paralelamente seleccionamos un grupo de veintidós pacientes (9 no diabéticos, 9 diabéticos sin neuropatía y 4 diabéticos con neuropatía) y analizamos la expresión en plasma.

Resultados: No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-30c en LCR, médula espinal y ganglio raquídeo dorsal, mientras que se objetivó una disminución estadísticamente significativa en sus niveles plasmáticos, tanto en animales de experimentación, como en pacientes con neuropatía/dolor neuropático.

Conclusiones: la expresión plasmática de miR-30c se encuentra significativamente disminuida en la neuropatía diabética. Existe una tendencia al incremento de miR-30c, tanto en LCR, como en las estructuras neurales estudiadas, que requiere ser confirmada.

Palabras clave: MicroRNA, miR-30c, Diabetes Mellitus, Polineuropatía diabética dolorosa.

ABSTRACT

Background: Neuropathic pain is a high prevalence type of chronic pain with in our environment. One of the most important causes of neuropathic pain is painful diabetic polyneuropathy. Recent researchs have implicated several microRNAs (miRNAs) in the pathophysiology of chronic pain. Among the investigated miRNAs, miR-30c appears to be very deregulated in neuropathic pain of ischemic and traumatic etiology.

Methods: We validate an animal model of diabetes in rats (6 diabetic and 4 controls) and then, we analyzed the differential expression of miR-30c in plasma, cerebrospinal fluid (CSF), spinal cord and dorsal spinal ganglion. At the same time we selected a group of twenty-two patients (9 nondiabetic 9 diabetics without neuropathy and 4 diabetic with neuropathy) and we analyzed the differential expression of miR-30c in plasma.

Results: There were no significant differences in the differential expression of miR-30c in CSF, dorsal horn of the spinal cord and dorsal spinal ganglion. Whereas a statistically significant decrease was observed in the plasma of diabetic rats and patients with neuropathy / neuropathic pain. The tendence to increase in LCR needs to be confirmed.

Conclusions: plasma expression of miR-30c is significantly decreased in diabetic neuropathy.

Keywords: MicroRNA, miR-30c, Diabetes Mellitus, Painful diabetic polyneuropathy.

INTRODUCCIÓN

1. DOLOR

1.1 Concepto y tipos de dolor

La International Association for the Study of Pain (IASP) define el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con el daño tisular actual o potencial, o que se describe en términos de dicho daño”.

En condiciones fisiológicas, el dolor nos alerta ante la presencia de daño tisular o enfermedad, siendo la sensación dolorosa proporcional a la intensidad del estímulo que la origina (lesión, inflamación, etc...) y desencadenando respuestas dirigidas a la protección del propio organismo. El dolor fisiológico, o nociceptivo, desaparece tras la curación de la lesión y, generalmente, este periodo no suele ser superior a tres meses. Sin embargo, en determinadas situaciones el dolor puede persistir por más tiempo, pasando a clasificarse como dolor crónico cuando su duración es superior a seis meses.

1.2 Dolor crónico

El dolor crónico, se define, por consenso, como aquel cuya duración es mayor de seis meses y constituye en sí mismo un proceso patológico (Cerveró, 2009) que tiene un efecto devastador en muchos aspectos de la vida diaria: no sólo disminuye la calidad de vida al repercutir negativamente en la salud física y emocional, sino que también dificulta participar plenamente de la vida social y familiar, y disminuye la capacidad para trabajar de manera productiva. Dada su alta prevalencia (se estima que uno de cada seis españoles sufre dolor crónico), constituye, además, un problema de salud pública (Torralba et al., 2014).

El dolor crónico, según el Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI), se puede clasificar en cuatro categorías que no son excluyentes:

- Dolor neuropático.
- Dolor musculoesquelético.
- Dolor inflamatorio.
- Dolor mecánico/compresivo.

De todos ellos, aunque no es la causa más prevalente de dolor crónico, nos centraremos en el dolor neuropático, ya que persisten muchas sombras acerca de su etiopatogenia y es altamente refractario a las terapias convencionales.

1.3 Dolor neuropático

En algunas 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, dando lugar a lo que conocemos como dolor neuropático (Woolf et al., 2007).

La prevalencia exacta del dolor neuropático está mal establecida. Se estima que en Europa el 20% de la población sufre de dolor crónico (Breivik et al., 2006) y de ellos, aproximadamente el 7-8% sufre de dolor predominantemente neuropático (Torrance et al., 2006; Bouhassira et al., 2008).

El dolor neuropático se caracteriza por la existencia de dolor espontáneo (sin una estimulación detectable), continuo, o paroxístico con episodios intermitentes. Cursa con respuestas exageradas a estímulos nociceptivos (hiperalgesia) y con dolor evocado por estímulos normalmente inocuos (alodinia). Todo ello pone de manifiesto una alteración neurológica subyacente (Wall, 1991. Bennett, 1994). Así, los síntomas característicos que experimentan los pacientes con dolor neuropático incluyen: parestesias, disestesias, dolor espontáneo, calambres, quemazón y sensación de descarga eléctrica, además de hipersensibilidad al tacto y al calor/frío (figura 1). (Baron et al., 2010).

Dolor neuropático, taxonomía-términos
<ul style="list-style-type: none">• Alodinia: dolor por estímulo no doloroso normalmente.• Hiperalgnesia: respuesta dolorosa aumentada.• Hiperestesia: sensibilidad aumentada.• Hipoalgnesia: sensibilidad disminuida a estímulo normalmente doloroso.• Hipoestesia: sensibilidad disminuida.• Disestesia: sensación desagradable, espontánea o evocada.• Parestesia: sensación anormal espontánea o evocada, no desagradable.• Anestesia dolorosa: dolor en zona anestesiada.• Neuralgia: dolor en área inervada por uno o más nervios.

Figura 1: Conceptos relacionados con el dolor neuropático. Modificado de González et. al. Fundación Grünenthal, 2002).

1.3.1 Clasificación

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, metabopatías, exposiciones prolongadas a un frío extremo, presión directa en algún nervio, etc.

- Dolor neuropático central: está causado por lesiones o enfermedades que afectan al sistema somatosensorial central. Las causas más comunes son las lesiones medulares, los infartos cerebrales, la esclerosis múltiple, etc.

1.3.2 Fisiopatología

En el desarrollo de dolor neuropático intervienen múltiples mecanismos (sensibilización central y periférica, desinhibición, excitabilidad ectópica...) que involucran, además de las vías neuronales, la microglía y las células de Schwann, componentes del sistema inmunitario, liberando sustancia P, bradisinina, óxido nítrico, citoquinas, etc... Estas sustancias producen una reacción inflamatoria que va a condicionar un aumento de la sensibilidad dolorosa, favoreciendo así la aparición de hiperalgesia y alodinia (Baron et al., 2010; Taves y et al., 2013). La modulación de la intercomunicación neurona-astrocito-microglía después de la lesión del SNC se basa en el intercambio de moléculas como las citoquinas y, entre ellas, el TGF- β parece ser un elemento protector clave frente al desarrollo y control de la transmisión de la señal nociceptiva en el dolor neuropático (Tramullas et al., 2010, Lantero et al., 2012, Lantero et al, 2014). Estudios recientes han demostrado la existencia de interacciones cruzadas entre la señalización TGF- β y diversos microRNAs (miRNAs) de forma bidireccional: un subgrupo de miRNAs regula la vía de señalización TGF- β y, a su vez, el TGF- β incrementa la biogénesis de otros miRNAs (Butz et al., 2012).

Dentro de las causas de dolor neuropático, las más frecuentes son las polineuropatías dolorosas y, dentro de ellas, la polineuropatía diabética dolorosa es el ejemplo más clásico (Cabezas-Cerrato et al., 1998).

1.4 Polineuropatía diabética

La diabetes puede afectar de diversas maneras al sistema nervioso. La polineuropatía sensitivo-motora distal y simétrica es la forma más frecuente de afectación y se caracteriza por la pérdida progresiva de la sensibilidad distal que se correlaciona con el daño de los axones sensitivos, seguido en casos más severos de debilidad motora (Álvarez-Guisasola F. et al., 2011).

En España, la prevalencia de polineuropatía diabética es, según la Encuesta Nacional de Salud, del 22%, incrementándose con la edad. Según el tiempo de evolución de la enfermedad, la polineuropatía diabética se presenta en el 14,2% de los diabéticos con menos de 5 años de evolución, aumentando a más de un 40% cuando su evolución es superior a 10 años. De este total de pacientes con polineuropatía diabética, alrededor del 11% desarrollará una polineuropatía diabética dolorosa. Teniendo en cuenta que la prevalencia de la diabetes está aumentando en el mundo occidental, debemos caer en la cuenta de la importancia clínica de esta entidad.

1.4.1 Etiopatogenia

Los estudios epidemiológicos han identificado que la duración y severidad de la hiperglucemia es el factor de riesgo fundamental en el desarrollo de neuropatía diabética, tanto en pacientes con diabetes mellitus (DM) tipo 1 como tipo 2 (Edwards et al., 2008). Otros factores de riesgo que también influyen en el desarrollo de neuropatía en la diabetes son algunas comorbilidades frecuentemente asociadas, como la dislipemia, la hipertensión arterial y el tabaquismo. Además, la presencia de enfermedad cardiovascular multiplica el riesgo por dos.

Entre los factores metabólicos que se han involucrado en el desarrollo de neuropatía diabética se encuentran los siguientes (Álvarez-Guisasola F., 2011):

- Acumulación de productos finales de la glicosilación avanzada. Estas sustancias son proinflamatorias y el incremento de sus niveles afecta al colágeno tisular, favoreciendo la lesión microvascular.
- Acumulación de sorbitol, que interfiere con el metabolismo celular y predispone al estrés oxidativo.
- Alteración de la vía de la hexosamina: sus productos de degradación alteran factores de transcripción esenciales para el normal funcionamiento celular. En consecuencia, se produce daño celular e incremento del estrés oxidativo.
- Alteración de la vía de la proteína kinasa C.
- Activación en respuesta a la hiperglucemia de la vía poli (ADP-ribosa) polimerasa. Su exceso de activación induce la producción de radicales libres y la formación de productos finales de glicosilación avanzada.

Por tanto, la hiperglucemia activa diferentes vías metabólicas de las que su resultante final es el incremento del estrés oxidativo (Feldman, 2014). Así pues, el estrés oxidativo proporciona un mecanismo unificador para explicar el daño neural que provoca la diabetes (Pop-Busui et al., 2006).

La isquemia nerviosa también ha sido involucrada en la patogenia de la polineuropatía diabética debido a la presencia de engrosamiento de la pared de los vasos endoneurales y las oclusiones vasculares encontradas en autopsias (Feldman, 2014).

1.5 Polineuropatía diabética dolorosa

La neuropatía diabética puede ser subclínica, detectable solo mediante pruebas, o presentar manifestaciones clínicas, cuyo síntoma principal es la presencia de dolor neuropático (Íñiguez, 2000). Este último caso es lo que conocemos como polineuropatía diabética dolorosa. Por tanto, se denomina neuropatía diabética

dolorosa a la presencia de dolor como consecuencia de un daño neurológico producido por la diabetes (Sánchez, 2011). Como ya hemos mencionado anteriormente, alrededor del 11% de los pacientes diabéticos con polineuropatía diabética desarrollará una polineuropatía diabética dolorosa.

En general, los pacientes refieren entumecimiento, parestesias, disestesias, sensación de dolor quemante en las plantas de los pies (en calcetín) y en las manos (en guante); además, pueden presentar paroxismos punzantes o eléctricos en estas regiones y alodinia. El dolor suele empeorar por la noche y mejora al caminar (al contrario que el dolor típico de la enfermedad arterial periférica).

En la exploración física encontraremos pérdida de sensibilidad en zonas acras, ya que los axones más largos son los primeros en afectarse; y alteración de la sensibilidad profunda con pérdida de la propiocepción. La afectación motora con amiotrofia es menos frecuente (Sánchez, 2011).

1.6 Tratamiento

En lo que al tratamiento de la dolorosa se refiere, es especialmente importante el control estricto de los niveles de glucemia y el cuidado de los pies, además del tratamiento del dolor. El control de la glucemia previene el desarrollo de neuropatía y frena su progresión, razón por la que debe ser el primer objetivo del tratamiento de los pacientes con polineuropatía diabética sintomática (Boulton et al., 2005; Feldman, 2014). El cuidado de los pies, con la inspección diaria en busca de callosidades, fisuras o pequeñas heridas es muy importante en pacientes diabéticos, ya que pueden ser signos precoces de neuropatía y, como tal, ayudan a diagnosticar la neuropatía en etapas precoces.

Con respecto al tratamiento del dolor en la polineuropatía diabética dolorosa, en 2005, la American Diabetes Association (ADA) publicó en Diabetes Care la utilidad de las terapias tópicos o físicas no farmacológicas, como la pomada de capsaicina o la acupuntura, en cualquier estadio en asociación o no con las terapias farmacológicas disponibles (Feldman, 2014).

En relación con las opciones farmacológicas, las guías clínicas recomiendan usar como fármaco de primera línea un antidepresivo tricíclico, como la amitriptilina, o un anticomicial, como la gabapentina o la pregabalina (grado de evidencia A). Como alternativa, podrían utilizarse antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (inhibidores duales), como la Duloxetina que, pese a tener una eficacia menor, tienen un perfil más seguro, sobre todo en ancianos o pacientes con riesgo cardiovascular (grado de evidencia A). La Venlafaxina no tiene indicación actualmente como tratamiento de primera línea (Cochrane Database Syst Rev., 2015). En el tratamiento de segunda o tercera línea tendríamos a los opioides y otros antiepilépticos con menor evidencia en lo referente a mejoría de la calidad de vida, del sueño, la ansiedad o la depresión (Blanco, 2011; Feldman, 2014). Además, en algunas circunstancias, puede ser útil la asociación de dos o más fármacos (antidepresivo + anticonvulsivante), o la utilización de antagonista NMDA (Neira et

al., 2004). Por último, como tratamientos de cuarta línea, encontraríamos la inyección de toxina botulínica o la administración de ziconotide intratecal en aquellos casos de dolor crónico severo refractario al tratamiento con los fármacos anteriores (figura 2).

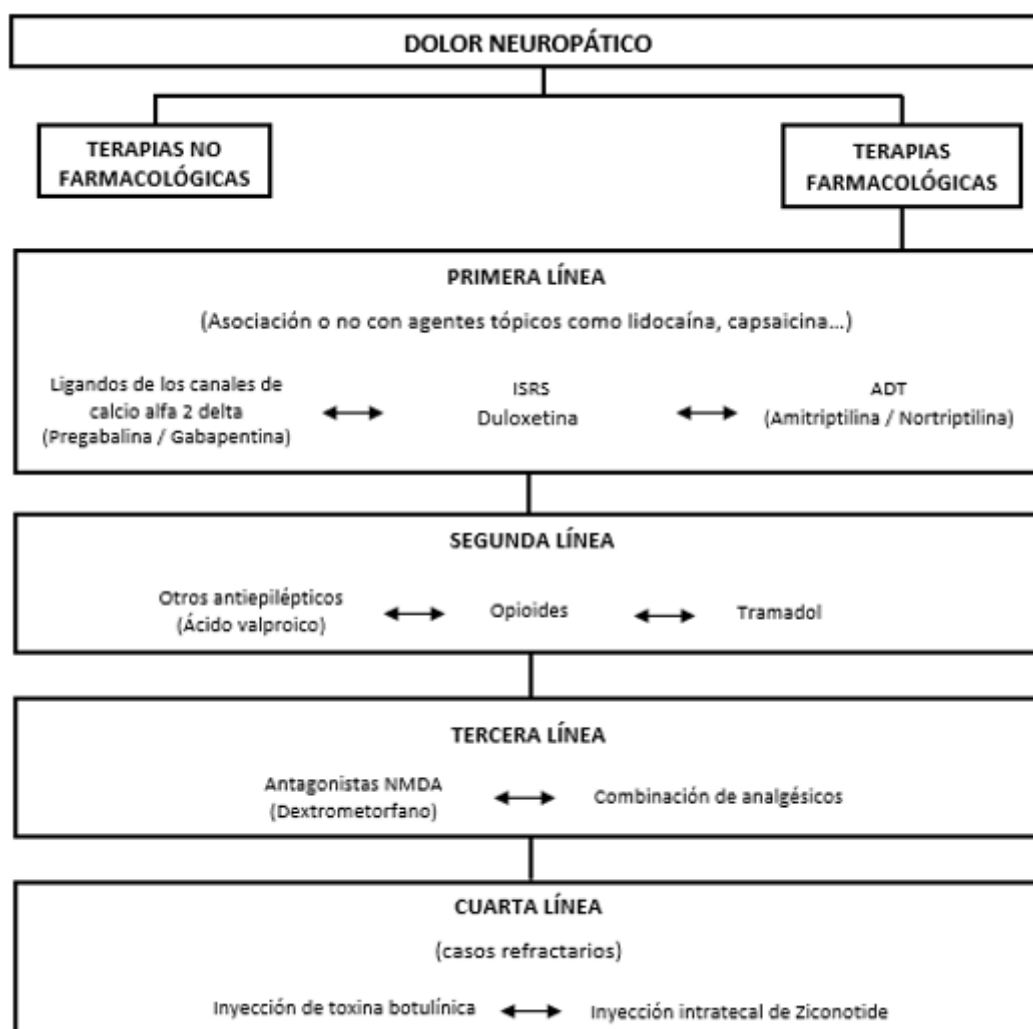


Figura 2. Algoritmo terapéutico para el dolor neuropático. Modificado de Rosenquist, 2016.

Sin embargo, pese al extenso arsenal terapéutico del que disponemos, la eficacia es limitada y ningún fármaco es capaz de modificar el curso evolutivo del dolor neuropático que, además, supone un elevado coste económico y social (Bouhassira et al., 2008;). Por ello, numerosas líneas de investigación se han abierto en los últimos años y, tras el descubrimiento de los micro-RNAs y su implicación en la fisiopatología del dolor, estos también han entrado a formar parte de las líneas de investigación relacionadas con la etiopatogenia y el tratamiento del dolor neuropático (Velategui, 2015).

2. MICRO-RNAS

2.1 Concepto y descubrimiento

Los miRNAs son moléculas de RNA monocatenario, no codificante, de aproximadamente 22 nucleótidos, cuya función principal es la regulación postranscripcional de la expresión génica. Están implicados en la regulación de una amplia variedad de procesos biológicos (se estima que el 60% de los genes están regulados por miRNAs) y su desregulación se ha asociado con la patogénesis de muchas enfermedades (McDonald et al., 2015).

El descubrimiento de los 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 encontraron dos pequeños RNAs reguladores, denominados *lin-4* y *let-7*, no codificantes, pero con un papel clave en el desarrollo (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000).

Posteriormente se encontraron regiones homólogas en otros animales (otros gusanos, moscas y también mamíferos), dando en llamarlas miRNAs y, desde entonces, se han ido identificando numerosos miRNAs en distintas especies. Se sabe que múltiples organismos multicelulares expresan cientos de miRNAs con un patrón diferente en función del tipo de celular y del tejido (Lagos-Quintana et al., 2002). En humanos, miRBase v21 tiene registrados 1.881 miRNAs, de los cuales sólo 500 están sólidamente soportados como productos codificados por genes específicos (Fromm et al., 2015).

2.2 Biogénesis y mecanismo de acción

2.2.1 Localización en el genoma

La mayoría de los miRNAs que se han identificado en humanos son intragénicos intrónicos (44%, se localizan dentro de sus genes huésped que codifican para proteínas), por lo que su regulación dependería de la del gen huésped, explicando así la especificidad de tejido de algunos miRNAs. Otro 42% son intergénicos (se localizan entre los genes codificantes de proteínas) y, en este caso, su expresión estaría regulada de forma independiente a la de los genes adyacentes (McDonald et al., 2015).

2.2.2 Biogénesis

Los miRNAs maduros derivan de un procesamiento que empieza en el núcleo celular y termina en el citoplasma, donde los miRNAs realizan su función (figura 3). En el núcleo, son transcritos por la RNA polimerasa II, que produce una molécula de RNA, conocida con el nombre de miRNA primario (*pri-miRNAs*). El *pri-miRNA* forma una estructura en *hairpin stem-loop*, que es cortada en el núcleo por la RNA polimerasa III conocida con el nombre de Drosha. Esta escinde de forma

asimétrica los pri-miRNAs dando lugar a una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada miRNA precursor (*pre-miRNAs*), que es transportada activamente al citoplasma. Una vez allí, 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, por un mecanismo aún desconocido, se separan las dos cadenas y una de ellas (la codificada por la hebra guía) da lugar al miRNA maduro de unos 20-25 nucleótidos, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. El miRNA maduro se incorpora al complejo ribonucleoprotéico miRISC (miRNA-induced silencing complex), que es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción. Los componentes conocidos de este complejo son Dicer, las proteínas Argonauta (AGO), TRBP (HIV-1 transactivation responsive element TAR RNA-binding protein) y PACT (proteína de unión a ARN de doble cadena) (McDonald et al., 2015).

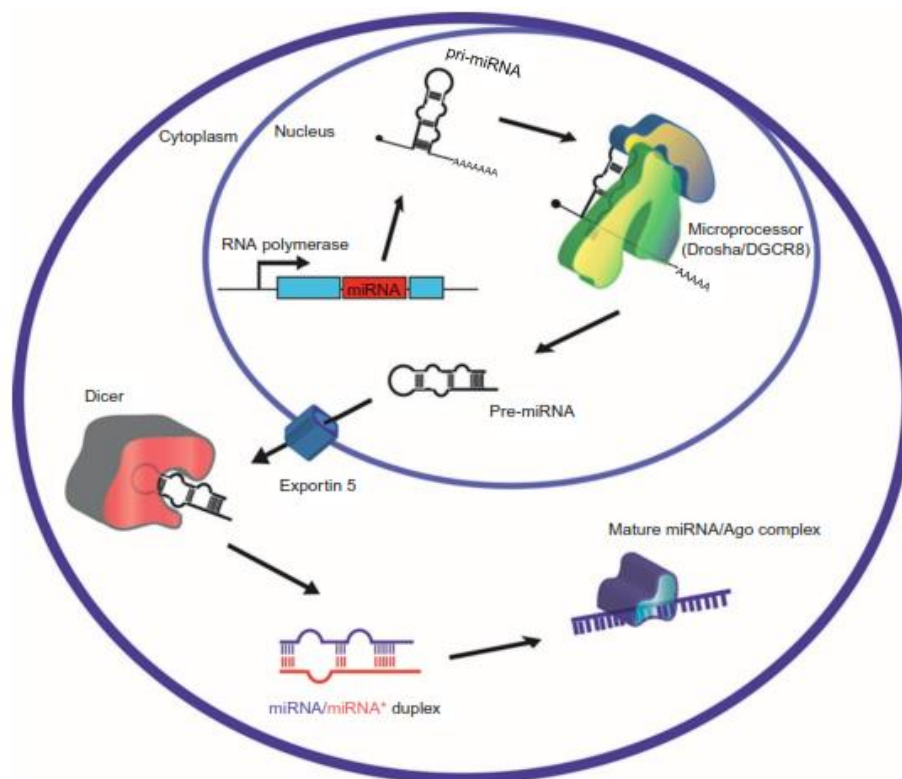


Figura 3. Biogénesis de los miRNAs. En el núcleo, Drosha/DGCR8 escinde las horquillas del pri-miRNA de forma asimétrica dando lugar a una molécula de miRNA precursor o pre-miRNA. Esta molécula sale al citoplasma a través de la exportina 5 y allí es reconocida por Dicer que, al procesarla, produce un miRNA dúplex, cuyas cadenas se separan, pasando la codificada por la hebra guía a formar parte del complejo miRISC. (Tomado de McDonald et al., 2015).

2.2.3 Mecanismo de acción

Los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA diana o mediante la represión traduccional. La utilización de un mecanismo u otro dependerá de la

complementariedad del miRNA con el 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 (Bartel, 2009). De ello deducimos que un mismo miRNA puede actuar sobre muchas zonas 3' UTR (complementarias a la seed sequence o región semilla del miRNA) de un gran número de genes y así lo han demostrado diferentes estudios de microarrays. Además, tras la degradación del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede reconocer y destruir otros mRNAs (Lewis et al., 2005).

Se sabe también que, además de los dos mecanismos principales de los que hemos hablado, los miRNAs dirigen la deadenilación rápida de los mRNA diana, conduciendo a un deterioro rápido del mRNA y a la reducción de sus niveles (Wu et al., 2006).

A nivel extracelular, los miRNAs viajan unidos a proteínas Ago2, lipoproteínas de alta densidad (HDL) o englobados en microvesículas (vesículas lipídicas liberadas durante la apoptosis y exosomas, principalmente), pero sus acciones fuera de la célula aún no son bien conocidas (Vickers KC et al., 2011). Pueden detectarse con gran sensibilidad y especificidad en suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina, leche materna y lágrimas. La alteración en los niveles extracelulares de diferentes miRNAs se asocia con distintas patologías, por lo que se ha propuesto su utilización como biomarcadores de enfermedad (McDonald et al., 2015).

2.3 Dolor neuropático y miRNAs

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 (Sayed et al., 2011). 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 et al., 2012).

Prueba de la asociación entre miRNAs y dolor es que la deficiencia condicionada en DICER de los nociceptores previene el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa en un modelo murino de dolor inflamatorio (Zhao et al., 2010). Estudios posteriores muestran la existencia de alteraciones en la expresión de varios miRNAs (miR-1, miR-7a, miR-16, miR-21, miR-96, miR-124, miR-155, miR181a, miR-200b, miR206, miR-223, miR-249 o miR-103) en el sistema nervioso de animales sometidos a modelos de dolor crónico (Kusuda et al., 2011, Chattopadhyay et al. 2012, Bali et al., 2014; Kynast et al., 2013). 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 et al., 2011). Algunos miRNAs (miR-let-7, miR-23b, miR-133b, miR-134, miR-190 o miR-339) regulan la expresión de los receptores opioides con consecuencias funcionales en la respuesta analgésica a los opiáceos (Wu et al., 2008; He et al., 2010; Zheng et

al., 2010; Rodríguez, 2012; Ni et al., 2013; Wu et al., 2013). Existen algunos estudios en humanos que ponen de manifiesto un papel para diversos miRNAs en las alteraciones de expresión génica asociadas a patologías inflamatorias. Además, en pacientes con síndrome de dolor regional complejo (dolor crónico neuropático) la correlación entre perfiles de miRNAs y marcadores de inflamación ha supuesto una herramienta útil para establecer criterios de estratificación de los pacientes (Alevizos et al., 2010; Orlova et al., 2011).

Este Trabajo Fin de Grado se engloba dentro de un proyecto de investigación más amplio, llevado a cabo en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Cantabria bajo la dirección de las Dras. M^a Amor Hurlé y Mónica Tramullas. Estudios previos de secuenciación masiva realizados en este laboratorio muestran que un grupo discreto de miRNAs se encuentran intensamente desregulados en el asta dorsal de la médula espinal en modelos murinos de dolor neuropático que presentan un fenotipo hiperalgésico y un fenotipo antialodínico. Entre los miRNAs más desregulados, miR-30c aparece intensamente sobre-expresado en condiciones de dolor neuropático respecto a los ratones con nocicepción reducida. En ratas expuestas a neuropatía traumática, los niveles de expresión de miR-30c están incrementados en regiones relevantes para la nocicepción (asta dorsal de la médula espinal y ganglio dorsal) así como en LCR y plasma (Velategui, 2015). Además, los niveles de miR-30c en LCR y plasma también son directamente proporcionales al grado de alodinia desarrollada por las ratas. La relevancia de estos hallazgos pudo ser trasladada a la clínica en un grupo de pacientes con isquemia de las extremidades inferiores. En estos pacientes, los niveles circulantes de miR-30c en LCR o en plasma, junto con parámetros clínicos, permiten discriminar a aquellos individuos que padecen dolor neuropático de los que están libres de dolor.

Teniendo en cuenta que la diabetes es una patología frecuentemente asociada a neuropatía sensitiva en la clínica, en este Trabajo Fin de Grado nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Validar y poner a punto un modelo de neuropatía diabética en rata.
- 2) Establecer el curso temporal del desarrollo de alodinia e hiperalgnesia mecánica.
- 3) Determinar los niveles de expresión del miR-30c en médula espinal, ganglio dorsal, LCR y plasma.
- 4) Trasladar a la clínica los resultados obtenidos, analizando los cambios de miR-30c en el plasma de pacientes diabéticos con dolor neuropático o neuropatía sensitiva en comparación con los pacientes diabéticos sin dolor.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El estudio se llevó a cabo en ratas macho Sprague Dawley, de 4 meses de edad y pesos comprendidos entre 300 y 400 gramos ($n=10$). Los animales fueron criados en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria y, hasta su utilización en el proceso experimental, los animales fueron estabulados 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*. Durante el estudio, los animales asignados al grupo de casos, por razones de confort, fueron estabulados en parejas, mientras que los asignados al grupo control siguieron estabulados en grupos de tres.

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.

La figura 3 recoge la cronología de las intervenciones realizadas en los animales de experimentación, tanto en lo referente a recogida de muestras, como a pruebas conductuales.

1.1 Modelo animal de diabetes

Para la inducción de diabetes utilizamos un modelo basado en la administración de una única dosis de 40mg/Kg de Estreptozotocina (STZ) subcutánea. La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado del *Streptomyces achromogenes*; es un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucoquinasa, e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA. Su molécula consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea; por esta razón, es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa y, dado que las células β pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa, también resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ (Arias-Díaz et al., 2007). Sin embargo, la STZ también puede tener efectos sobre otros órganos, como el hígado, los riñones, el intestino, el cerebro, los testículos o los pulmones (King, 2012).

Una única dosis de STZ puede inducir diabetes en roedores, probablemente debido a efecto tóxico directo, mientras que dosis pequeñas repetidas tendrían un efecto proinflamatorio induciendo una insulinitis que, finalmente, también produciría intolerancia a la glucosa y diabetes (Arias-Díaz et al., 2007; King, 2012).

1.2 Determinación del peso corporal y de la glucemia

EL peso se determinó utilizando una balanza electrónica (sensibilidad 0,1g) en condiciones basales y semanalmente tras la administración subcutánea de STZ. En el grupo control se determinó en las mismas condiciones experimentales (basal y semanalmente) después de la administración de la administración subcutánea de suero salino.

La glucemia se midió basalmente y los días 7 y 28 en ambos grupos. Se colocó a los animales en cepos para manipularlos cómodamente y se extrajo una gota de sangre venosa mediante punción en la cola. Los animales no permanecieron más de dos minutos en el interior del cepo. Se utilizó un glucómetro Freestyle Optium Xceed, cuyo rango de medición es 20-500mg/dl y las tiras reactivas compatibles (Tiras Reactivas Glucemia Freestyle Optium Plus).

1.3 Valoración de la respuesta nocifensiva a estímulos mecánicos

Las pruebas se realizaron antes de la intervención, y semanalmente hasta el día del sacrificio (4 semanas tras la administración de STZ).

1.3.1 Test de von Frey

Para valorar la aparición de alodinia mecánica se utilizó el test de Von Frey. Los animales se introdujeron de forma individualizada en un habitáculo con suelo de rejilla, donde su movilidad quedaba reducida. Tras un periodo de adaptación de aproximadamente 10 minutos, 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 ejercen (figura 1).

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. El umbral nociceptivo se expresó como los gramos que evocaron el 50% de las respuestas de retirada de la pata trasera.



Figura 1. Batería de monofilamentos de Von Frey y modo de aplicación.

1.3.2 Test de Randall-Selitto (Paw pressure)

La hiperalgesia mecánica se cuantificó mediante la prueba de Randall-Selitto o test de Paw Pressure, que consiste en la aplicación de una presión puntual en la pata del animal con una punta roma y produciendo una fuerza lineal mecánica creciente en gramos (figura 2).

Antes de comenzar la prueba, el animal fue acostumbrado al manejo en la mano del investigador durante unos minutos. El estímulo fue aplicado en la superficie plantar de ambas patas traseras, aumentando la presión hasta que la rata retirara la extremidad. La fuerza aplicada en el momento de la retirada fue considerada el umbral, determinándose como la media obtenida entre ambas patas. Se determinó una presión máxima de 320 g para evitar daño tisular.



Figura 2. Modo de realización del test de Randall-Selitto.

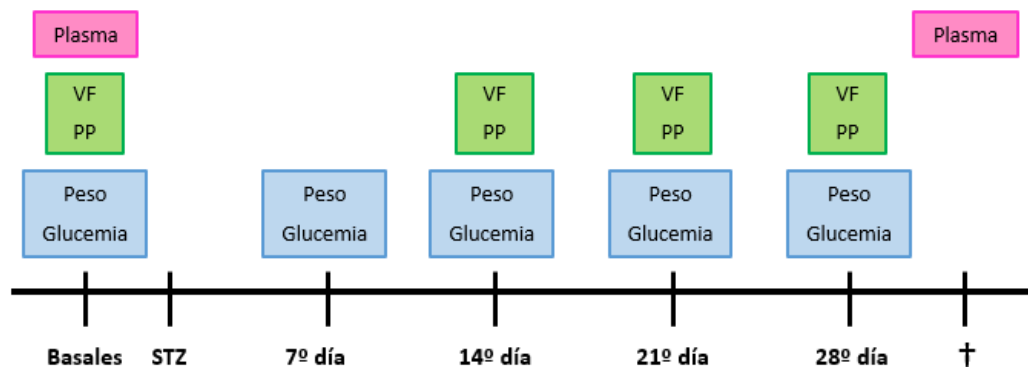


Figura 3. Esquema de los procedimientos realizados en el estudio de animales de experimentación. VF: Test de Von Frey; PP: Test de Paw Pressure.

1.4 Extracción de muestras

1.4.1 Plasma:

Bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (Forane®, 11/min al 2,53%) se extrajo sangre a través del seno retroorbital Por capilaridad, se recogió la sangre (12-14 gotas) en un tubo estéril que contenía una solución de 50mg/ml de EDTA (40 µl). A continuación, las muestras se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 10 min y posteriormente el plasma se almacenó a -80º C hasta su posterior uso. Se extrajo plasma basal y el día del sacrificio.

1.4.2 LCR

Bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (Forane®, 11/min al 2,53%) e inmovilización en cuadro de estereotaxia, con el cuerpo en posición horizontal y la cabeza inclinada 45º con respecto al cuerpo, se introdujo en la cisterna magna una aguja tipo mariposa (25 g) unida a un catéter fino de plástico conectado a una jeringuilla de 1ml para aspirar y recoger el LCR. El LCR extraído se almacenó a -80º C hasta su posterior utilización. Se recogieron muestras de LCR en condiciones basales y el día del sacrificio de los animales. Las muestras contaminadas con restos hemáticos fueron descartadas.

1.4.3 Médula y ganglios raquídeos dorsales

Los animales se decapitaron bajo anestesia inhalatoria con isoflurano al 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.

Se extrajeron todos los ganglios raquídeos posibles de cada lado, que bien habían quedado en los agujeros foraminales al ejercer presión sobre el canal medular, o habían sido arrastrados junto a la médula en el proceso.

Las muestras se almacenaron a -80º C hasta ser procesadas para la obtención de miRNAs y mRNAs.

2. PACIENTES

2.1 Criterios

2.1.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes de ambos sexos, con/sin Diabetes Mellitus, con edades comprendidas entre los 18 y los 90 años, que acudieron a las consultas externas de Endocrinología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla durante los meses de octubre y noviembre de 2015. Entre los pacientes diabéticos, independientemente del tipo (tipo 1 ó 2), se incluyeron aquellos con una evolución de la enfermedad superior a cinco años.

2.1.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron aquellos pacientes con dolor, neuropático o no, secundario a otras patologías médicas conocidas (dolor neuropático isquémico puro, artrosis severa, hernia discal compresiva, enfermedades reumáticas...), así como aquellos que padeciesen un proceso agudo de cualquier etiología.

2.2 Valoración clínica

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados acerca de los objetivos y de los procedimientos de forma oral y mediante consentimiento informado escrito.

Se seleccionó un total de veintidós pacientes, que fueron clasificados en tres grupos atendiendo a la presencia o no de diabetes y alteraciones sensitivas/dolor:

- Controles: pacientes no diabéticos, sin alteraciones sensitivas, ni dolor.
- Diabéticos no sensitivos: pacientes diabéticos sin alteraciones en la sensibilidad, ni dolor neuropático.
- Diabéticos sensitivos/neuropáticos: pacientes diabéticos con dolor neuropático o alteraciones en la sensibilidad.

La presencia de dolor y alteraciones sensitivas fue valorada mediante la historia clínica, el cuestionario Dolour Neuropathique 4 (DN4), la Escala Visual Analógica (EVA) y la exploración física, realizadas en la consulta de Endocrinología y en la Unidad de Pie Diabético del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla durante las prácticas de la asignatura de Clínica Médica.

2.2.1 Historia clínica

Para cada paciente se recogieron los siguientes datos: edad, sexo; presencia o no de diabetes, tipo y tiempo de evolución; última cifra de hemoglobina glicosilada (HbA1c), peso, talla, tensión arterial, otras enfermedades y medicación habitual. Los datos globales se recogen en la figura 4.

Además, en aquellos pacientes con dolor, se les preguntó acerca de agravantes y factores que aliviaran el mismo, la cualidad e irradiación, la severidad y las variaciones con el tiempo (*Método PQRST*).

VARIABLE	n = 21
Edad (M±DS)	62,86 ± 12,38
Sexo, n (%)	
Mujeres	7 (33)
Varones	14 (67)
Diabetes Mellitus, n (%)	13 (62)
Tipo 1	3 (23)
Tipo 2	9 (77)
Años de evolución DM (M±DS)	15,31 ± 8,92
HbA1c (M±DS)	8,19 ± 2,08
Otros factores de riesgo cardiovascular	
HTA, n (%)	12 (57)
Obesidad, n (%)	6 (29)
Dislipemia, n (%)	7 (33)
Fármacos analgésicos	
AINEs, n (%)	3 (14)
Opioides, n (%)	0 (0)

Figura 4. Características clínicas de los pacientes. DM: Diabetes Mellitus.

2.2.2 Cuestionarios de valoración del dolor: EVA y DN4

Para la valoración del dolor se utilizaron la Escala Visual Analógica (EVA) y el cuestionario de valoración de dolor neuropático DN4.

La EVA (figura 5) permite medir la intensidad del dolor que describe el paciente con la máxima reproducibilidad entre los observadores. Se pide al paciente que marque sobre la línea de 10 centímetros el punto que indique la

intensidad, siendo 0 la ausencia de dolor y 10 el dolor extremo. Después se mide con una regla y se expresa la intensidad en centímetros o milímetros.

Sin dolor _____ Máximo dolor

Figura 5. Escala visual analógica.

El DN4 consiste en diez preguntas agrupadas en dos secciones: las siete primeras hacen referencia a la calidad del dolor y otros síntomas relacionados, mientras que las tres últimas se centran en la exploración neurológica (figura 6). Cada ítem se puntúa con un punto cuando la respuesta es afirmativa y cero cuando es negativa. El punto de corte para el diagnóstico de dolor neuropático se establece en cuatro o más puntos.

ENTREVISTA CON EL PACIENTE		
PREGUNTA 1: ¿tiene el dolor una o más de las siguientes características?		
	Sí	No
1. Quemazón		
2. Sensación de frío-doloroso		
3. Descargas eléctricas		
PREGUNTA 2: ¿se asocia el dolor con uno o más de las siguientes síntomas en la misma zona?		
	Sí	No
4. Hormigueo		
5. Sensación de alfileres y agujas		
6. Entumecimiento		
7. Picazón		
EXAMEN DEL PACIENTE		
PREGUNTA 3: ¿está el dolor localizado en una zona donde el examen físico puede mostrar una o más de las siguientes características?		
	Sí	No
8. Hipoeslesia al tacto		
9. Hipoeslesia a los pinchazos		
PREGUNTA 4: en la zona dolorosa, el dolor puede ser causado o incrementado por:		
	Sí	No
10. Roce		
Suma de todos los puntos positivos. Puntuación del paciente: <input type="text"/> /10		

Figura 6. Cuestionario DN4 validado al castellano. Tomado de Pérez et al. 2007.

Para la valoración de la alodinia y la hiperalgesia (preguntas 8-10) se utilizaron una torunda de algodón y una aguja, respectivamente.

2.2.3 Exploración de la sensibilidad

En primer lugar, se observó la piel de ambas extremidades para descartar la presencia de cambios tróficos (alteraciones ungueales, grietas...) y cambios en las zonas de apoyo (callosidades).

Para valorar la sensibilidad mecánica, se utilizó un monofilamento de Von Frey que, al aplicarse sin que se doble, ejerce una presión constante de 10 g, con independencia de la fuerza con la que lo aplique el explorador. Se mostró al paciente la dinámica del test aplicando el monofilamento sobre una región sana (parte proximal de las extremidades superiores, cara...) y se le instruyó para que respondiese con términos simples sobre la percepción del estímulo (sí/no/no estoy seguro). A continuación, se le indicó que cerrase los ojos y se presionó en cuatro puntos plantares de cada pie: en falange distal y base del primer dedo, tercer y quinto metatarsiano. El test se consideró positivo cuando al menos se identificó un punto insensible.

Para valorar la sensibilidad vibratoria se utilizó un diapasón de 128 Hz. Tras producir la vibración y mostrar la experiencia sobre una región sana, se colocó el diapasón sobre la cabeza del primer metatarsiano y los maléolos interno y externo de cada pie, considerándose patológica la disminución de la sensibilidad en cualquiera de las protuberancias óseas.

Para valorar la sensibilidad térmica se utilizó un cubo de metal que se aplicó sobre el dorso del pie. Cualquier alteración de la sensibilidad térmica fue considerada patológica.

2.2.4 Despistaje de enfermedad arterial periférica (EAP)

A fin de detectar EAP, se preguntó a los pacientes acerca de síntomas clásicos, como la frialdad distal o la claudicación intermitente y se examinó la piel de las extremidades en busca de cambios tróficos (piel fina y brillante, ausencia de vello...). Además, se realizó una cuidadosa exploración de los pulsos arteriales periféricos (pedios y tibiales posteriores), mediante palpación y doppler. La exploración se hizo de distal a proximal, en función de la presencia/ausencia de los mismos. Así mismo, se determinó el índice tobillo-brazo (ITB) mediante esfigmomanómetro. El ITB se calcula dividiendo la presión arterial sistólica (PAS) en el tobillo, entre la PAS del brazo y los valores se interpretan según lo recogido en la tabla de la figura 7.

ITB	Interpretación
> 1,3	Sospecha de calcificación arterial.
0,91-1,3	Normal.
0,9-0,71	Obstrucción leve.
0,7-0,41	Obstrucción moderada.
< 0,40	Obstrucción grave.

Figura 7. Interpretación de los valores del ITB.

2.3 Extracción de muestras de plasma

Se extrajo una muestra de sangre en la Unidad de Pruebas Funcionales de Endocrinología. Se hicieron una serie de modificaciones a la técnica habitual de extracción para conseguir unas condiciones de mínima presión y evitar así la ruptura de plaquetas y la consiguiente contaminación del plasma con el contenido intracelular de las mismas. Las modificaciones realizadas fueron las siguientes:

- Se rompió el vacío de un tubo convencional de Hematología (que contiene una solución de EDTA).
- Se extrajo la sangre utilizando una jeringuilla para ejercer la mínima presión posible.
- Se vertió la sangre lentamente en el interior del tubo.
- Se selló el tubo de nuevo.

3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNA MEDIANTE qPCR

3.1 Extracción de RNA de plasma y LCR

Se extrajo el RNA total de las muestras de plasma mediante Trizol (TRI Reagent T9429; SIGMA Life Science). Para ello se añadieron 800 μ l de Trizol a 100 μ l de plasma/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 (5 fmol/ μ l) como control interno. Seguidamente, se añadieron 160 μ l de cloroformo, 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 400 μ l de isopropanol, 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 DPC 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 μ l de H₂O DPC. Finalmente, las muestras se incubaron a 50° C durante 5 min y se almacenaron a -80° C hasta su uso.

3.2 Extracción de RNA de médula y ganglios raquídeos dorsales

Se utilizó el kit (Nucleo Spin miRNA; Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante un procedimiento similar al empleado en la extracción de

RNA de fluidos, se obtuvo un eluido con RNA. Las muestras se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

3.3 Determinación de la concentración y pureza del RNA

Para determinar la concentración y pureza del RNA, se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific Inc) que permite trabajar con $2\ \mu\text{l}$ de muestra. Para determinar la pureza se valoró la relación obtenida entre las absorbancias medidas a $260\ \text{nm}$ (absorción por ácidos nucleicos) y a $280\ \text{nm}$ (absorción por proteínas). El índice $260/280$ ha de encontrarse en un rango comprendido entre 1,7 y 2,0 para garantizar la pureza, sin embargo, en fluidos, dada la mayor dificultad técnica, se admiten valores menores.

3.4 Transcripción reversa de RNA

La reacción de la transcripción inversa del RNA (microRT-PCR) es el método por el cual se obtienen las cadenas de DNA complementario (cDNA) a partir del RNA extraído. Para la transcripción inversa del RNA se utilizó un kit comercial de RT-PCR (TaqMan[®] Applied Biosystems). Para la reacción se usaron $100\ \text{ng}$ de RNA las muestras. Se añadieron la cantidad de H_2O DPC necesaria para alcanzar un volumen final de $9,16\ \mu\text{l}$ y $2,84\ \mu\text{l}$ de una mezcla que contenía $0,15\ \mu\text{l}$ de dNTPs, $1\ \mu\text{l}$ de la enzima transcriptasa inversa (multiscribe RT enzima), $1,5\ \mu\text{l}$ de tampón de reacción (10X) y $0,19\ \mu\text{l}$ de enzima inhibidora de RNAasas (Ribolock Ribonuclease Inhibitor). Finalmente, se añadieron a la mezcla $3\ \mu\text{l}$ del cebador específico correspondiente al miRNA objeto de estudio. El miRNA utilizado como control interno fue cell-miR-39 para fluidos (plasma y LCR) y RNU6B tejidos (médula y ganglios), que se añadieron a las muestras durante el proceso de extracción. La muestra total ($15\ \mu\text{l}$) 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 cDNA se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.5 PCR cuantitativa

Los niveles de expresión de miRNAs se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: polimerase chain reaction) de tipo cuantitativo, que constituye uno de los métodos más sensibles para la cuantificación de la expresión de genes a partir de cDNA. La expresión de miR-30c se normalizó a cell-miR-39. Se utilizaron sondas comerciales TaqMan[®] (Applied Biosystems, Life Technologies) y el reactivo que contiene Mg y nucleótidos (Premix Ex Taq (2X) qPCR, Takara Bio Inc). Las amplificaciones se hicieron en un termociclador para PCR cuantitativa a tiempo real (Stratagene Mx3005P; Agilent technologies). Para cuantificar la expresión de miRNAs, la reacción se llevó a cabo por duplicado, en un volumen de $10\ \mu\text{l}$ que contenían $0,5\ \mu\text{l}$ del producto de la $\mu\text{RT-PCR}$, $5\ \mu\text{l}$ de Mastermix, $0,25\ \mu\text{l}$ de sonda TaqMan[®] y $4,25$

µl de H₂O DPC. El número de copias de los miRNAs problema y de referencia se cuantificaron en paralelo en diferentes muestras, utilizando marcadores fluorescentes con longitudes de onda FAM.

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

a) Un primer segmento compuesto de un ciclo:

I. 2 min a 50° C.

II. 10 min a 95° C.

b) Un segundo segmento, compuesto de 40 ciclos:

I. 15 s a 95° C para la desnaturalización del DNA complementario.

II. 1 min a 60° C para la unión de los cebadores a la cadena de DNA complementario.

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

RESULTADOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1 Evolución del peso y la glucemia

Los animales tratados con STZ fueron perdiendo peso de manera progresiva a lo largo de todo el estudio, mientras que los animales del grupo control fueron ganando peso de forma progresiva, tal y como se representa en la figura 1A. Se observaron diferencias significativas en los pesos al comparar el grupo tratado con STZ y el grupo control durante todo el periodo que duró el estudio (Tratamiento: $F(1,8) = 10,9$, $p < 0,001$; Tiempo*Tratamiento: $F(4,32) = 28,0$, $p < 0,001$).

Los niveles de glucemia por encima de lo habitual detectados ya en el séptimo día tras la inyección, junto con síntomas propios de la hiperglucemia (fundamentalmente poliuria y polidipsia) validan el modelo de diabetes en nuestro estudio. Los niveles de glucemia se mantuvieron elevados a partir del segundo día tras la administración de STZ y se mantuvieron constantes a lo largo de todo el estudio (400-500 mg/dl), mientras que los niveles de glucemia de los animales control permanecieron constantes dentro del rango de normalidad (80-120mg/dl) (figura 1B). Los niveles de glucemia fueron significativamente superiores en el grupo tratado con STZ comparado con el grupo control durante todo el tiempo que duró el estudio [Tiempo X Tratamiento: $F(1,8) = 51,5$, $p < 0,001$; Tratamiento: $F(1,8) = 35,9$, $p < 0,001$].

1.2. Curso temporal del desarrollo de hiperalgesia y alodinia mecánica

Se evaluó el desarrollo de hiperalgesia mecánica y alodinia con los test de Randall-Selitto y Von Frey, respectivamente.

En el test de Randal-Selitto, los animales tratados con STZ mostraron un decremento significativo en el umbral de retirada de las patas traseras, alcanzando una respuesta hiperalgésica que fue máxima el día 14 y que se mantuvo hasta el día 28 [Tiempo*Tratamiento: $F(2,16) = 15,1$, $p < 0,001$; Tratamiento: $F(1,8) = 17,9$; $p < 0,01$, figura 2A].

Así mismo, se valoró la respuesta nocifensiva de las patas traseras frente a estímulos mecánicos de fuerza creciente mediante monofilamentos de Von Frey, en condiciones basales y semanalmente durante un periodo de 28 días tras la administración de STZ.

Los animales a los que se administró la STZ mostraron un decremento progresivo y significativo del umbral de retirada de las patas traseras, alcanzando una respuesta alodínica máxima a los 28 días de la inyección de STZ. Por el contrario, los animales control no modificaron su umbral de retirada de las patas traseras [Tratamiento: $F(1,6) = 17,9$ $p < 0,01$, Figura 2B].

En la figura 2C se muestran los resultados obtenidos el día 28 tras la administración de STZ, momento en el que la respuesta alodínica que mostraron las ratas fue máxima [Tratamiento: $F(1,8) = 20,6$, $p < 0,01$]. Esto se reflejó con un incremento significativo del porcentaje de respuestas positivas al aplicar monofilamentos de fuerza creciente [Fuerza*Tratamiento: $F(6,48) = 2,74$, $p < 0,05$, Figura 2C].

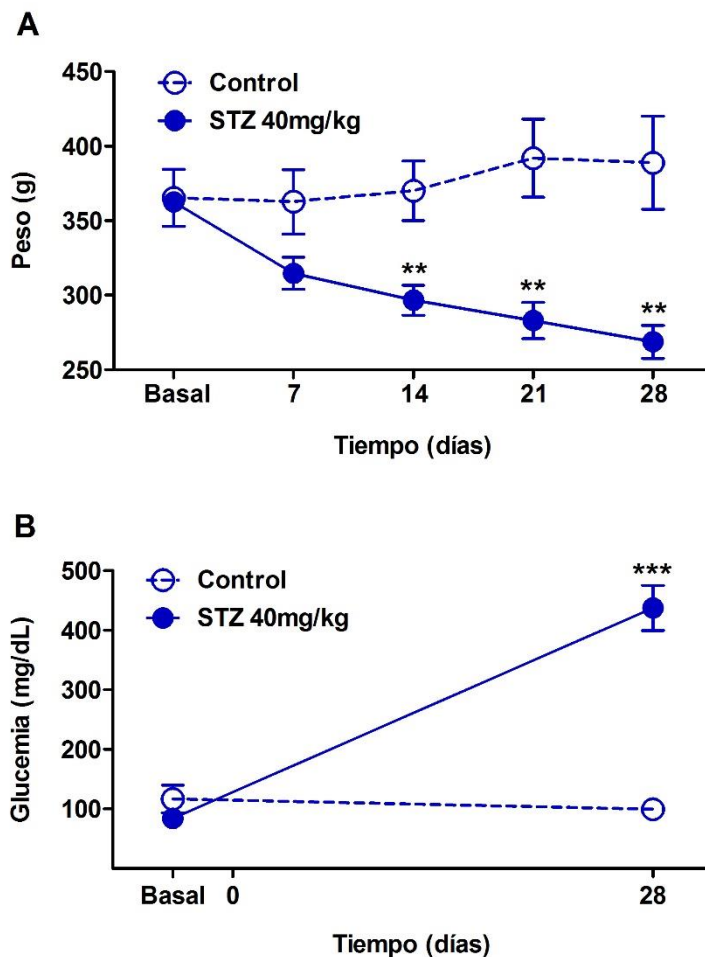


Figura 1. Evaluación del peso y glucemia. A) Variación del peso en el grupo de animales diabéticos (STZ 40mg/kg) y en el grupo control. **B)** Variación de la glucemia en ambos grupos (el día 0 se administró la STZ). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control; Prueba de Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas. Tratamiento con STZ: $n=6$; control: $n=4$.

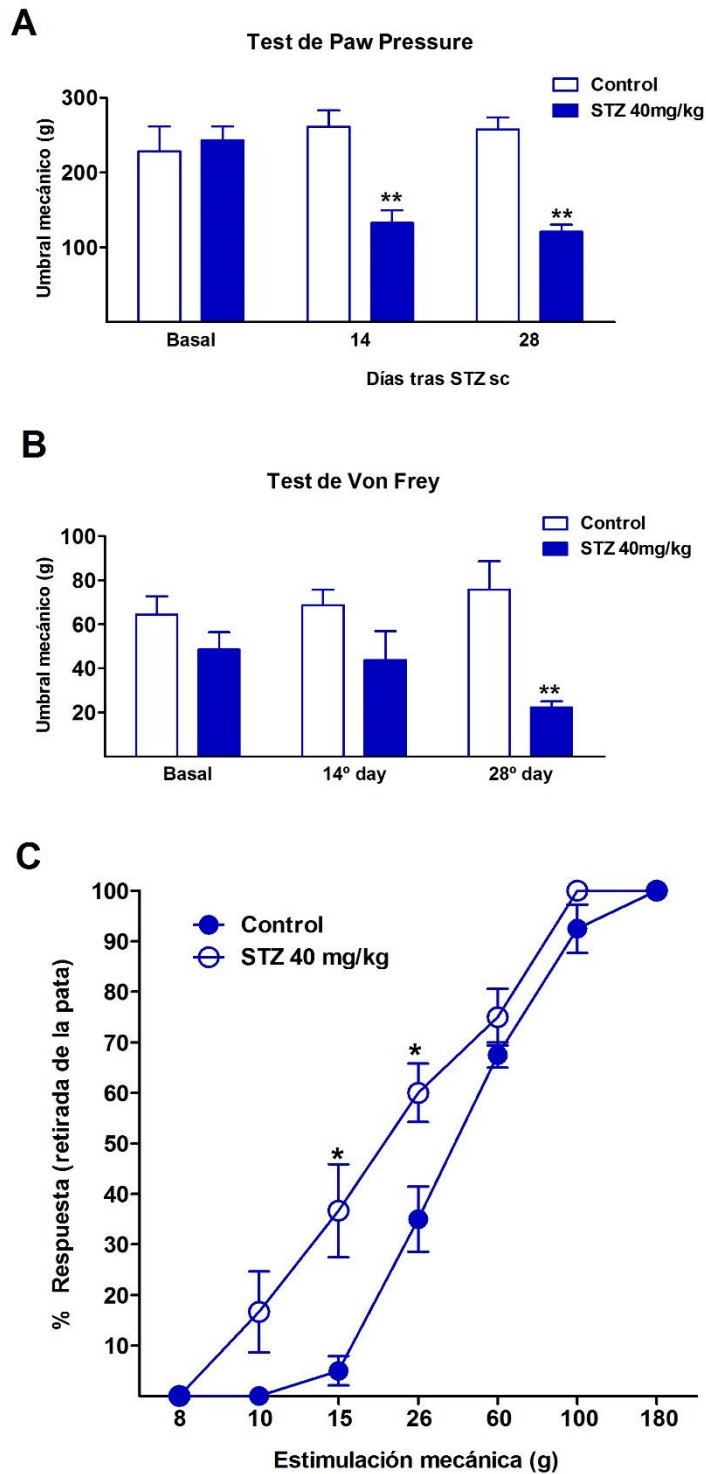


Figura 2. Valoración del desarrollo de hiperalgesia y alodinia tras la administración de STZ y en el grupo control. A) Desarrollo de hiperalgesia mecánica valorado con Test de Paw Pressure. **B)** Desarrollo de alodinia valorado con Test de Von Frey. **C)** Curva fuerza-respuesta a los 28 días tras la administración de STZ y en el control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. control; Prueba de Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas. Tratamiento con STZ: $n=6$; control: $n=4$.

1.3 Expresión de miR-30c

Se analizó la expresión de miR-30c en las muestras de médula espinal, ganglio raquídeo dorsal, LCR y plasma obtenidas el día del sacrificio. Se compararon los resultados obtenidos en el grupo de intervención (STZ) con los del grupo control.

Existe una tendencia a la sobreexpresión de miR-30c en médula, ganglio raquídeo y líquido cefalorraquídeo, aunque la diferencia entre grupos no alcanzó la significación estadística. En plasma se observó una expresión disminuida, estadísticamente significativa al comparar los datos de ambos grupos ($p=0,03$ STZ vs. control).

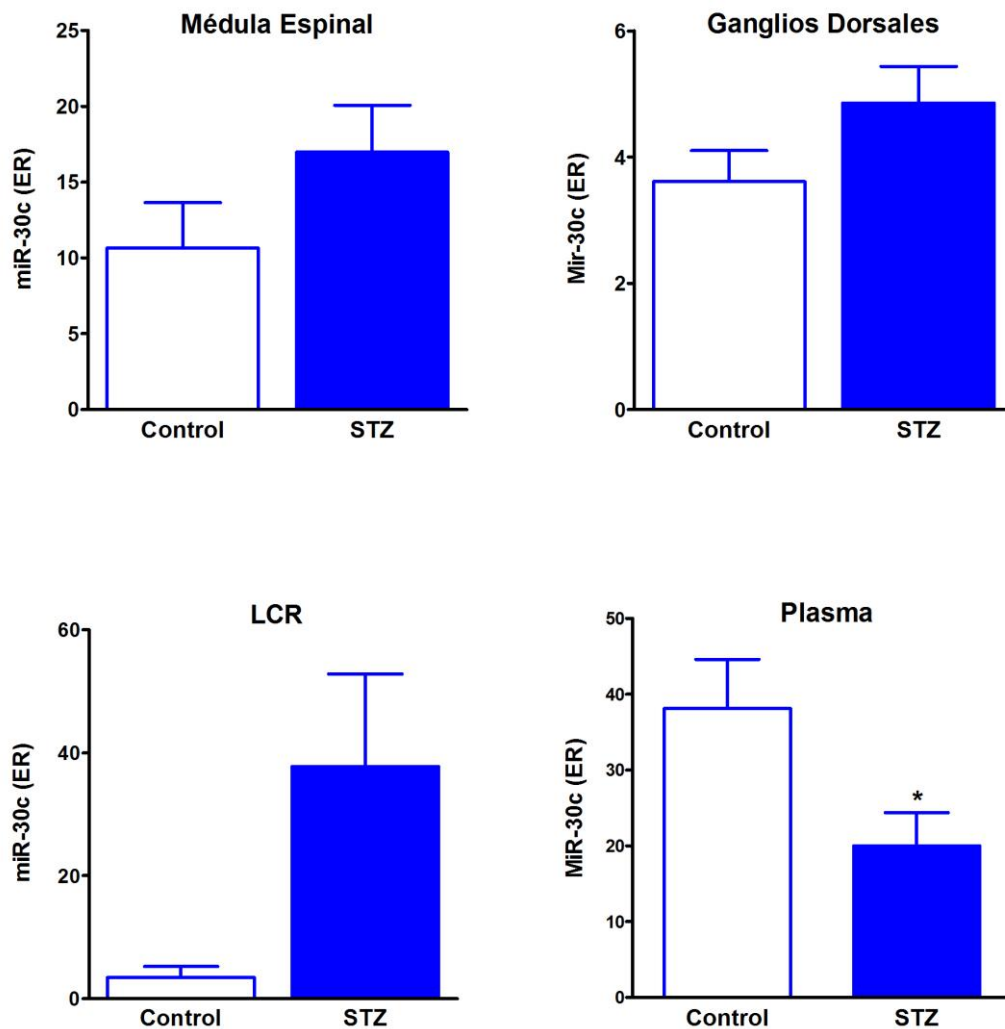


Figura 3. Expresión relativa de miR-30c en médula, ganglio raquídeo dorsal, líquido cefalorraquídeo y plasma. Los grupos de estudio están compuestos por: ratas diabéticas tratadas con STZ (n=6) y ratas control, tratadas con suero salino (n=4). * $p<0,05$ STZ vs. control, t de Student.

2. PACIENTES

2.1 Valoración clínica

A fin de clasificar los pacientes dentro de los grupos de estudio definidos en el apartado de Material y Métodos, se realizó una valoración clínica mediante anamnesis (historia clínica y test específicos para dolor neuropático) y exploración física (valoración de la sensibilidad e ITB). En las figuras 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos, así como las características clínicas de cada paciente y el grupo asignado en función de los resultados de la exploración física.

Los pacientes se dividieron en los siguientes grupos de estudio:

- Grupo 1: pacientes NO diabéticos, SIN neuropatía sensitiva, SIN isquemia y SIN dolor neuropático.

Se incluyeron en este grupo todos los pacientes que no refirieron dolor en la historia clínica y cuya exploración física fue estrictamente normal.

- Grupo 2: pacientes CON diabetes, SIN isquemia, SIN neuropatía sensitiva y SIN dolor neuropático.

Se incluyeron en este grupo todos los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 ó 2, que no refirieron dolor en la historia clínica y cuya exploración física fue estrictamente normal, sin observarse ninguna alteración sensitiva. Se excluyeron aquellos pacientes con un ITB alterado.

- Grupo 3: pacientes CON diabetes mellitus, CON neuropatía sensitiva y/o CON dolor neuropático.

Se incluyeron en este grupo todos los pacientes diabéticos que refirieron dolor en la historia clínica y obtuvieron una puntuación igual o superior a cuatro puntos en el cuestionario DN4, así como aquellos con una exploración física patológica, encontrándose al menos alteración en una de las modalidades sensitivas (táctil, térmica o vibratoria). Se incluyeron todos los pacientes con las características mencionadas, independientemente de la existencia o no de componente isquémico asociado (ITB alterado).

Paciente	Sexo	Edad	Tipo de DM	Años de evolución	HbA1c	HTA	DL	Obesidad	Otros diagnósticos	AINES	EVA	DN4	ITB	Sensibilidad	Grupo
1	F	57	2	10	6,6	NO	NO	NO	Trasplante hepático, RVS VHC, fibrosis hepática F2	NO	0	0	N	N	2
2	F	52	2	9	11,7	NO	NO	NO	Hipotiroidismo	NO	0	0	N	N	2
3	F	49	2	7	9,2	NO	NO	SI	Anemia ferropénica, hiperuricemia	SI	7	6	P	P	3
4	M	28	2	6	8,5	NO	NO	SI	Asma	NO	0	0	N	N	2
5	F	58	2	20	6,9	SI	NO	NO	Hipotiroidismo	NO	0	0	N	N	2
6	M	71	2	12	6,2	SI	SI	NO	No	NO	0	0	N	P	3
7	M	67	2	15	7,1	SI	NO	SI	Litiasis renal	NO	0	0	N	N	2
8	M	61	2	10	6,6	SI	SI	NO	EAP, hepatitis, SCACEST	NO	6	2	N	N	2
9	F	62	2	20	7,6	SI	SI	NO	RPDM, Dupuytren, ACVA, EAP	NO	7	4	P	P	3
10	F	67	2	17	8,2	SI	SI	SI	No	SI	6	2	N	N	2
11	M	47	1	8	8	SI	NO	SI	Hipofosfatemia crónica	NO	0	0	N	N	2
12	M	57	1	32	6,8	SI	SI	NO	RPDM	NO	0	0	N	N	2
13	F	59	1	33	13,1	NO	SI	NO	RPDM, SCACEST	SI	8	5	N	P	3

Figura 4. Asignación de grupo en función de la valoración clínica. Pacientes diabéticos. DM: Diabetes Mellitus; HbA1c: Hemoglobina glicosilada; HTA: Hipertensión arterial; DL: Dislipemia; AINES: Antiinflamatorios no esteroideos; EVA: Escala visual analógica; DN4: Dolour Neuropathique 4; ITB: índice tobillo-brazo. RVS VHC: Respuesta viral sostenida de Virus de la hepatitis C; EAP: Enfermedad arterial periférica; SCACEST: Síndrome coronario agudo con elevación del ST; RPDM: Retinopatía diabética; ACVA: Accidente cerebrovascular agudo.

Paciente	Sexo	Edad	HTA	DL	Obesidad	Otros diagnósticos	AINES	EVA	DN4	ITB	Sensibilidad	Grupo
1	M	60	NO	NO	NO	HBP	NO	0	0	N	N	1
2	M	74	SI	NO	NO	HBP	NO	0	0	N	N	1
3	M	66	NO	NO	NO	HBP	NO	0	0	N	N	1
4	M	73	SI	NO	NO	Neoplasia vesical	NO	0	0	N	N	1
5	F	69	NO	NO	SI	Neoplasia vesical	NO	0	0	N	N	1
6	M	86	SI	NO	NO	Litiasis vesical	NO	0	0	N	N	1
7	M	73	NO	SI	NO	Artrosis, neoplasia vesical	NO	0	0	N	N	1
8	M	67	NO	NO	NO	EPOC, neoplasia vesical	NO	0	0	N	N	1
9	M	80	SI	NO	NO	Neoplasia vesical	NO	0	0	N	N	1

Figura 5. Asignación de grupo en función de la valoración clínica. Pacientes no diabéticos. HTA: Hipertensión arterial; DL: Dislipemia; AINES: Antiinflamatorios no esteroideos; EVA: Escala visual analógica; DN4: Dolour Neuropathique 4; ITB: índice tobillo-brazo. HBP: Hiperplasia benigna de próstata.

2.2 Expresión de miR-30c

Se analizó la expresión relativa de miR-30c en las muestras de plasma y se compararon los resultados obtenidos en los diferentes grupos: controles no diabéticos (Grupo 1 o Control), diabéticos sin neuropatía/dolor (Grupo 2 o DM) y diabéticos con dolor neuropático/neuropatía sensitiva (Grupo 3 o DM + Neuropatía).

Se encontró una reducción estadísticamente significativa de la expresión de miR-30c en el grupo de pacientes con dolor neuropático/neuropatía sensitiva en comparación con los pacientes diabéticos sin neuropatía (Neuropatía: $p=0,02$; t de Student; figura 6). La diferencia no fue estadísticamente significativa al comparar la expresión en el grupo DM con la del grupo control (Diabetes: $p=0,47$; t de Student; figura 6).

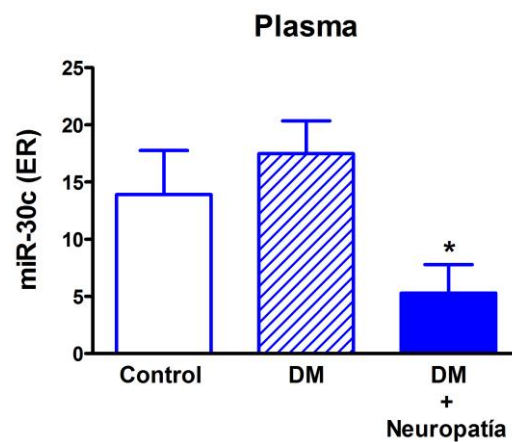


Figura 6. Expresión relativa de miR-30c en plasma de pacientes. Los grupos de estudio fueron pacientes control (n=9): pacientes no diabéticos, sin isquemia, sin neuropatía, sin dolor; DM (n=9): pacientes diabéticos, sin isquemia, sin neuropatía, sin dolor; y DM + Neuropatía: pacientes diabéticos, con neuropatía y/o dolor neuropático. * $p<0,05$. DM + Neuropatía vs. control; t de Student.

CONCLUSIONES

El dolor agudo, o nociceptivo, es fisiológico, nos alerta ante la presencia de daño tisular o enfermedad. Desaparece tras la curación de la lesión y, generalmente, tiene una duración no superior a tres meses. Se denomina dolor crónico a aquel dolor que, con una duración superior a seis meses, se mantiene cuando la causa que lo produjo ha desaparecido, a pesar de carecer de función biológico-defensiva, considerándose por esta razón como una patología en sí mismo (Cerveró, 2009). El dolor crónico tiene una elevada prevalencia en nuestro medio, generando un gran impacto en términos humanos y socio-económicos y constituyendo, por tanto, un problema socio-sanitario de primer orden (Torralba et al., 2014).

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico causado por la lesión del sistema nervioso somatosensorial (Woolf et al., 2007). Entre las causas de dolor neuropático, las más frecuentes son las polineuropatías dolorosas, dentro de las cuales destaca la polineuropatía diabética (Cabezas-Cerrato et al., 1998).

Existen multitud de sombras en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al dolor neuropático. El descubrimiento de los miRNAs y su implicación en la etiopatogenia de múltiples enfermedades (Sayed et al., 2011), ha promovido una gran actividad investigadora dirigida a desvelar el papel de miRNAs específicos en la fisiopatología del dolor (Kusuda et al., 2011, Chattopadhyay et al. 2012, Bali et al., 2014; Kynast et al., 2013). Por esta razón, y dada la creciente prevalencia de diabetes mellitus en la población general, nos planteamos investigar la contribución a la neuropatía diabética de un miRNA altamente desregulado en modelos experimentales de dolor neuropático de otras etiologías, como son el traumático o el isquémico (Velategui, 2015). Para ello diseñamos un estudio con una doble vertiente, experimental y traslacional. Incluimos como sujetos de estudio tanto animales de experimentación (ratas Sprague Dawley), como pacientes.

Utilizamos un modelo animal de diabetes basado en la administración subcutánea de STZ para, posteriormente, valorar el desarrollo de dolor neuropático. Analizamos las diferencias en la expresión de miR-30c en diferentes estructuras neurales de la vía nociceptiva (asta dorsal de la médula espinal y ganglios raquídeos dorsales) y en fluidos corporales (LCR y plasma).

La presencia de dolor neuropático y neuropatía sensitiva en los pacientes fue evaluada mediante la historia clínica dirigida, cuestionarios específicos de dolor neuropático (DN4) y la exploración física. La expresión de miR-30c se midió en muestras plasmáticas, comparando los resultados de pacientes con neuropatía y/o dolor neuropático con los de pacientes diabéticos sin neuropatía y pacientes no diabéticos.

Con respecto a los resultados obtenidos en el modelo animal, se observó que el tratamiento con STZ modificó significativamente los niveles de glucemia y el peso de los animales, de forma que disminuyeron su peso a medida que se incrementaban los niveles de glucemia. Estos datos validan el modelo diabético del estudio (Arias-Díaz et al., 2007; King, 2012). Además, aunque no fueron cuantificados, se observaron síntomas derivados de la hiperglucemia, como son la polidipsia y la poliuria.

Para valorar el desarrollo de dolor neuropático se midió la respuesta nocifensiva de las patas traseras a estímulos mecánicos, mediante los test de Paw Pressure y Von Frey, que detectan hiperalgesia y alodinia mecánica, respectivamente. En ambos test se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las respuestas entre los grupos de estudio, resultando una disminución del umbral nociceptivo en el grupo tratado con STZ.

Estudios previos de secuenciación masiva realizados en este laboratorio muestran que un grupo discreto de miRNAs se encuentra intensamente desregulado en el asta dorsal de la médula espinal en modelos murinos de dolor neuropático que presentan un fenotipo hiperalgésico y un fenotipo antialodínico. Entre los miRNAs más desregulados, miR-30c aparece intensamente sobre-expresado en condiciones de dolor neuropático respecto a los ratones con nocicepción reducida. En ratas expuestas a neuropatía traumática, los niveles de expresión de miR-30c están incrementados en regiones relevantes para la nocicepción (asta dorsal de la médula espinal y ganglio dorsal) así como en LCR y plasma (Velategui, 2015). En nuestro estudio, la expresión de miR-30c en LCR, el asta dorsal de la médula espinal y el ganglio raquídeo dorsal no se encuentra significativamente aumentada. En plasma, al contrario de lo que cabría esperar, la expresión de miR-30c se encuentra disminuida de manera estadísticamente significativa, tanto en animales de experimentación, como en pacientes con neuropatía/dolor neuropático. Sin embargo, la diabetes en sí misma no modificó la expresión de miR-30c en plasma, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre pacientes diabéticos sin neuropatía y no diabéticos. Basándonos en la bibliografía existente, planteamos una serie de explicaciones posibles para los resultados obtenidos en nuestro estudio, señalando los aspectos más relevantes.

En primer lugar, el hecho de que la expresión de miR-30c no se incremente de manera significativa en LCR, asta dorsal de la médula espinal y ganglio raquídeo dorsal en nuestro estudio podría indicar que la desregulación de dicho miRNA no está implicada en la fisiopatología del dolor neuropático diabético. Dado que miR-30c se sobre-expresa en dolor neuropático traumático, nuestros resultados podrían indicar que miR-30c no es un biomarcador inespecífico de cualquier tipo de dolor neuropático, si no que podría permitirnos diferenciar dolores neuropáticos de distinta etiología.

No obstante, dado que el número de animales incluidos en este estudio es relativamente pequeño (STZ n=6), para descartar una desregulación de miR-30c en LCR, médula y ganglio raquídeo asociada al dolor neuropático diabético, deberíamos incrementar el tamaño muestral. Si en los experimentos que próximamente vamos a llevar a cabo se confirmara la sobre-expresión de miR-30c en la neuropatía diabética, cabría sugerir que dicho miRNA está implicado en un mecanismo fisiopatológico común subyacente a los distintos tipos de dolor neuropático (tanto traumático, como diabético). Una prueba definitiva para demostrar el papel etiopatogénico de miR-30c en la neuropatía diabética sería el alivio del dolor tras la administración de un inhibidor de miR-30c, tal y como ya se observó en este laboratorio en un modelo de lesión del nervio ciático en roedores (Velategui, 2015).

Con relación a los niveles circulantes de miR-30c en plasma, nuestros resultados ponen de manifiesto una disminución significativa de su expresión, tanto en animales de experimentación, como en pacientes. Estos resultados podrían indicar que la participación de miR-30c en la neuropatía diabética se produce a nivel periférico, pero no en el sistema nervioso central.

Antes de buscar posibles explicaciones para la reducción de la expresión de miR-30c en plasma, debemos recordar que las fuentes plasmáticas de miRNAs son, fundamentalmente, las plaquetas, los leucocitos y las células endoteliales. En nuestro estudio, la extracción sanguínea se realizó en condiciones de mínimo traumatismo, evitando así la lisis de estas células, la activación plaquetaria y la consecuente contaminación del plasma con miRNAs intracelulares. De esta manera, podemos afirmar que las diferencias encontradas en la expresión plasmática de miR-30c, tanto en ratas, como en pacientes, se deben a cambios asociados a la neuropatía diabética.

Los miRNAs plasmáticos circulan incluidos en vesículas (exosomas, micropartículas y cuerpos apoptóticos), o unidos a proteínas (HDL, Ago-2), lo que evita su degradación por RNAsas circulantes (Vickers KC et al., 2011). Algunos autores han postulado que la hiperglucemia altera la incorporación de miRNAs a estas partículas (Jansen F et al., 2016), disminuyendo así sus niveles circulantes. Por otro lado, en la diabetes mellitus existe un desbalance del metabolismo lipoproteico (dislipidemia diabética) que condiciona una disminución de los niveles de HDL (Carmena R, 2008), lo que también podría contribuir a la reducción de la expresión plasmática detectada de miR-30c. Por tanto, es posible que, pese a existir una expresión modificada de miR-30c en la neuropatía diabética, esta no pueda ser objetivada en el laboratorio debido a una alteración en la incorporación a las micropartículas de transporte y/o unión a proteínas transportadoras, como el HDL.

Puesto que el daño neural en la diabetes mellitus es eminentemente periférico (Álvarez-Guisasola F. et al., 2011), si hubiera una producción alterada de miRNA por el nociceptor, es poco probable que estos cambios pudieran ser detectados en el sistema nervioso central, dado que los miRNAs son transportados en partículas o unidos a complejos proteicos (McDonald et al., 2015), cuya capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica no ha sido demostrada.

Finalmente, podemos concluir que este trabajo abre las puertas a futuros estudios para profundizar en el papel de miR-30c en la neuropatía diabética, bien como elemento diferenciador frente a otras neuropatías, o como mecanismo etiopatogénico común al dolor neuropático de cualquier etiología. Además, será imprescindible profundizar en las alteraciones existentes en los mecanismos de transporte plasmático de miRNAs en micropartículas y HDL asociados a la diabetes.

BIBLIOGRAFÍA

Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Jul;6(7):391-8. doi: 10.1038/nrrheum.2010.81.

Álvarez-Guisasola F. Epidemiología y prevalencia de la neuropatía diabética. En: Rodríguez Vicente JM, coordinador. *Guía de buena práctica clínica en dolor neuropático en el paciente diabético*. IMC: Madrid. 2011. p 23-26.

Arias-Díaz J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr Hosp*. 2007; 22(2): 160-68.

Bali KK, Hackenberg M, Lubin A, Kuner R, Devor M. Sources of individual variability: miRNAs that predispose to neuropathic pain identified using genome-wide sequencing. *Mol Pain*. 2014; 10: 22.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-233.

Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology* 2010; 9(8):807-819.

Bennett G. Chronic pain due to peripheral nerve damage: an overview. In: Fields H, Liebeskind J ed. *Textbook of pain*, 3rd.ed Edinburgh, UK: Churchill Livingstone 1994: 201-23.

Blanco E. Tratamiento de la neuropatía diabética. En: Rodríguez Vicente JM, coordinador. *Guía de buena práctica clínica en dolor neuropático en el paciente diabético*. IMC: Madrid. 2011. p 63-90.

Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008; 136: 380-7.

Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R et al. Diabetic Neuropathies. A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005; 28(4):956-62.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain* 2006. 10(4):287-333.

Butz H, Rácz K, Hunyady L, Patócs A. Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery. *Trends in Pharmacological Sciences* 2012; 33(7):382-393.

Cabezas-Cerrato J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS)*. *Diabetología* 1998; 41(11):1263-9.

Carmena R. Riesgo elevado de disfunción lipoproteica en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2008;8(C):19-26 - Vol. 8 Núm.Supl.C

Cervero F. Pain: friend or foe? A Neurobiologic: the 2008 Bonica Award Lecture. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 2009; 34(6):569-574.

Chattopadhyay M, Zhou Z, Hao S, Mata M, Fink DJ. Reduction of voltage gated sodium channel protein in DRG by vector mediated miRNA reduces pain in rats with painful diabetic neuropathy. *Mol Pain*. 2012; 8:17.

Cochrane Database Syst Rev. [base de datos en Internet]. Oxford: Update Software Ltd; 2015- [fecha de consulta 19 de mayo de 2016]. Gallagher HC1, Gallagher RM, Butler M, Buggy DJ, Henman MC. Venlafaxine for neuropathic pain in adults (Cochrane Review). Doi: 10.1002/14651858.CD011091.pub2.

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience* 2009; 32:1-32.

Edwards JL, Vincent A, Cheng T, Feldman EL. Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther*. 2008; 120(1): 1–34.

Feldman EL, McCulloch DK. UptoDate [Base de datos en internet]. Shefner JM, Nathan DM; 10 de diciembre 2015 [enero 2016-febrero 2016]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-diabetic-neuropathy?source=machineLearning&search=neuropathic+pain&selectedTitle=2~150§ionRank=1&anchor=H8#H8>.

Fromm B, Billipp T, Peck LE, Johansen M, Tarver JE, King BL, et al. A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome. *Annu Rev Genet*. 2015; 49: 213-42.

Gallego JA, Gordon ML, Claycomb K, Bhatt M, Lencz T, Malhotra AK. In Vivo MicroRNA Detection and Quantitation in Cerebrospinal Fluid. *Journal of Molecular Neuroscience* 2012; 47(2): 243-248.

He Y, Wang ZJ. Let-7 microRNAs and Opioid Tolerance. *Front Genet*. 2012; 3:110 substituye a He et al., 2010.

Jansen F, Wang H, Przybilla D, Franklin BS, Dolf A, Schmitz T, Flender A et al. Vascular endotelial microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; 15:49 Doi: 10.1186/s12933-016-0367-8.

Íñiguez C. Neuropatías sensitivas dolorosas *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2000; 7: Supl. II, 49-59.

King AJF. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology* 2012; 166: 877–894.

Kusuda R et al (2011) Differential expression of microRNAs in mouse pain models. *Mol Pain* 7 (17):1-8.

Kynast, K.L., Russe, O.Q., Geisslinger, G., Niederberger, E. Novel findings in pain processing pathways: implications for miRNAs as future therapeutic targets. *Expert review of neurotherapeutics* 13, 515-525 (2013).

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue specific microRNAs from mouse. *Current Biology* 2002; 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.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5):843-854.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1): 15-20.

McDonald MK, Ajit SK. MicroRNA biology and pain. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2015; 131: 215-249.

Neira F, Ortega JL. NMDA glutamatergic receptor antagonists for the management of chronic pain. *Rev Soc Esp Dolor* 2004; 11: 210-222.

Ni J, Gao Y, Gong S, Guo S, Hisamitsu T, Jiang X. (2013) Regulation of μ -opioid type 1 receptors by microRNA134 in dorsal root ganglion neurons following peripheral inflammation. *Eur J Pain*. 17:313-23.

Orlova IA, Alexander GM, Qureshi RA, Sacan A, Graziano A, Barrett JE et al. MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome. *J Transl Med*. 2011 Nov 10;9:195. doi: 10.1186/1479-5876-9-195.

Pérez C, Galvez R, Huelbes S, Insausti J, Bouhassira D, Díaz S et. al. Validity and reliability of the Spanish version of the DN4 (*Douleur Neuropathique 4 questions*) questionnaire for differential diagnosis of pain syndromes associated to a neuropathic or somatic component. *Health Qual Life Outcomes* 2007; 5: 66.

Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22:257.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901-906.

Rodríguez RE (2012) Morphine and microRNA Activity: Is There a Relation with Addiction? *Front Genet* 3:223.

Sánchez J. Diagnóstico de la neuropatía diabética. En: Rodríguez Vicente JM, coordinador. Guía de buena práctica clínica en dolor neuropático en el paciente diabético. IMC: Madrid. 2011. p 31-62.

Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiological Reviews* 2011; 91(3): 827-887.

Taves S, Berta T, Chen G, Ji RR. Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. *Hindawi Neural Plasticity* 2013: id 753656.

Torralba A, Miquel A, Darba J. Situación actual del dolor crónico en España: iniciativa "Pain Proposal". *Rev Soc Esp Dolor* 2014; 21(1): 16-22.

Torrance N, Smith BH, Bennett MI et al. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 2006; 7: 281-289.

Tramullas M, Lantero A, Díaz A, Morchón N, Merino D, Villar A, Buscher D, Merino R, Hurlé JM, Izpisua-Belmonte JC, Hurlé MA. 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* 2010; 30(4):1502-1511.

van Rooij, E., Purcell, A.L. Levin, A.A. Developing microRNA therapeutics. *Circulation research* 110, 496-507 (2012).

Velategui Camus S. Papel del microRNA-30c en la percepción dolorosa [Tesis doctoral]. Santander; 2015.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13:423-33.

Wall P, Neurophatic pain and injured nerve: central mechanisms. *Br Med Bull* 1991; 47: 631-43.

Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007. 55(3):353-364.

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2006; 103(11): 4034-4039.

Wu Q, Hwang CK, Zheng H, Wagley Y, Lin HY, Kim DK, Law PY, Loh HH, Wei LN. (2013) MicroRNA 339 down-regulates μ -opioid receptor at the post-transcriptional level in response to opioid treatment. *FASEB J.* 27:522-535.

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. *FASEB J* 22(12):4085-4095.

Zheng H, Zeng Y, Chu J, Kam AY, Loh HH, Law PY. (2010) Yin Yang 1 phosphorylation contributes to the differential effects of mu-opioid receptor agonists on microRNA-190 expression. *J Biol Chem* 285:21994-2002.

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, Merkenschlager M, Wood JN. (2010) Small RNAs control sodium channel expression, nociceptor excitability, and pain thresholds. *J Neurosci* 30(32):10860–10871.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, las Dras Maruja Hurlé y Mónica Tramullas, por sumergirme en el mundo de la investigación, por su paciencia y su entera disponibilidad para enseñarme todo lo que sé sobre microRNAs y por guiarme en la realización de este documento, animándome en todo momento y haciendo de este trabajo algo más que una asignatura.

A Roberto de la Fuente, por su ayuda con el enfoque clínico y la extracción de muestras; y a las técnicas del laboratorio de Farmacología (Nieves García, Ana Cayón y María Navarro) por ayudarme en tantas ocasiones con las dudas de media tarde, con las extracciones y con tantas y tantas PCRs.

Al Dr. José Antonio Amado, por permitirme compatibilizar las prácticas en el servicio con la realización de este trabajo. Al personal de enfermería de las unidades de pruebas funcionales, por todas las extracciones de sangre y tanta paciencia; y del pie diabético, por enseñarme la dinámica de la exploración y permitirme hacer uso de sus herramientas y su espacio en el hospital.

A Patricia, a Dani y a mis amigos, que se han preocupado por el proyecto y me han animado durante estos meses. Y a mis padres, que me han preguntado cada día, me han escuchado y siempre han estado ahí para apoyarme.

