



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Marcas epigenéticas en el dolor neuropático.

Epigenetic marks in neuropathic pain.

Autor: D.^a Isabel Álvarez Pérez

Director/es: Dra. María Amor Hurlé y Dra. Mónica
Tramullas

Santander, Junio 2017

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
EPIGENÉTICA	
Conceptos iniciales	3
Control por metilación del ADN	5
Metiltransferasas	7
Metilación de mantenimiento	7
Metilación de novo	8
Desmetilación	8
Mecanismo por el cual se reprime la expresión	10
Importancia de la metilación	10
Control por marcaje de histonas	10
Acetilación	12
Metilación	14
Control por microARN	15
Ejemplos de regulación epigenética	18
Inactivación del cromosoma X	18
Impronta	18
Evolución	19
DOLOR	
Definición	20
Epidemiología	20
Clasificación	21

Receptores sensoriales	22
Transmisión nerviosa	22
Procesamiento nociceptivo en el asta dorsal	23
Vías de la nocicepción	25
Modulación del dolor	27
Teoría de la compuerta	27
Sistema inhibitorio descendente	27
Dolor neuropático	28
Concepto	28
Modelos de estudio del dolor neuropático	30
Mecanismos del dolor neuropático	32
Mecanismos periféricos	32
Canales iónicos y mediadores	32
Cambios en el fenotipo	34
Denervación sensorial	34
Sistema nervioso simpático	34
Mecanismos centrales	34
Canales iónicos y mediadores	35
Sistema inmunitario y mediadores	36
Reorganización central de las vías aferentes	36
Pérdida de inhibición	37
Resumen de los síntomas y su origen	37
EPIGENÉTICA Y DOLOR NEUROPÁTICO	
Metilación del ADN	38
Modificaciones en las histonas	39
Metilación de histonas	39

Metiltransferasa G9a	39
Metilación del promotor de MCP3	40
EZH2	41
Acetilación de histonas	42
Desacetilación de histonas como promotora del dolor	42
Quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK 1)	43
Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF- α)	43
Receptores y transportadores de glutamato (mGlu2)	43
Factor silenciador neuronal restrictivo (NRSF)	44
Descarboxilasa de Ácido Glutámico 65 (GAD 65)	44
Acetilación de histonas como promotora del dolor	44
Aplicación al tratamiento	45
El ejercicio físico y el dolor neuropático	45
Resveratrol	46
Inhibidores de la HDAC	46
RNA no codificante	47
NRSF	48
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
AGRADECIMIENTOS	57

RESUMEN

La epigenética consiste en la regulación de la expresión genética que no involucra cambios en la secuencia del ADN. En este proceso de regulación intervienen diversos mecanismos, como son la metilación del ADN, el marcaje de Histonas, con grupos metilo o acetilo entre otros, y los microARN. El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable que se asocia a daño tisular. Su procesamiento involucra gran cantidad de mediadores. En el caso del dolor neuropático, en el cual se centra el trabajo, el daño se ha producido en el sistema nervioso. Este dolor es aún más complejo y aún se están investigando nuevas formas de tratarlo de manera efectiva. La epigenética cumple un papel importante en esta clase de dolor modificando los factores que lo constituyen, por medio de diferentes enzimas, receptores y microARNs. En muchas ocasiones unos mecanismos se solapan con otros, o una misma molécula está implicada en varios de ellos, como en el caso del Factor silenciador neuronal restrictivo (NRSF). En esta revisión se resumen los descubrimientos más actuales respecto al tema.

Palabras clave: epigenética, neuropático, acetilación, metilación, microARN.

ABSTRACT

Epigenetics are responsible of the regulation in the genetic expression without changing the sequence of the DNA. Various mechanisms take part in this process, as DNA metilation, histone modification by addition of acetyl or methyl groups, or microRNAs. Pain is an unpleasant sensorial and emotional experience associated with tissue damage. This proccess involves a great quantity of substances. This work, particulartly, it's about neuropathic pain, in which the damage is located in the nervous system. This kind of pain is much more complex, and there's a lot of current investigations with the aim of finding more effective treatments. Epigenetics have an important function in neuropathic pain by the modification of factors which take part in this processes, by means of different enzymes, receptors and microRNAs. Frecuently, some mechanisms ovelap with others, or the same molecule participates in more than one of them, for example the Neuron Restrictive Silencer Factor (NRSF). This review summarizes the recent discoveries about this issue.

Key words: epigenetics, neuropathic, acetylation, methylation, microRNA.

INTRODUCCIÓN

El dolor neuropático es un problema que perjudica a un sector de la población importante y que afecta significativamente a su vida diaria y también a la sociedad y la economía. Sus mecanismos, así como su tratamiento, aún están en proceso de investigación para tratar de encontrar soluciones más eficientes. Una rama que se está ampliando respecto a este tema es el de la epigenética. A continuación, se explicarán la definición y los mecanismos tanto del dolor neuropático como de la epigenética, para en un capítulo final, integrar ambas partes y demostrar la influencia de este tipo de regulación sobre esta sensibilidad dolorosa y sus posibles aplicaciones.

1. EPIGENÉTICA

1.1. Conceptos iniciales

La epigenética se encarga de la regulación de la expresión de los genes sin modificar la secuencia del ADN. No solo controla cuales se expresan, sino también dónde, o en qué momento lo hacen, así como su intensidad. Los patrones epigenéticos se heredan de unas células a otras, aunque también pueden tener variaciones según el ambiente e el que se encuentre el organismo. A veces estos cambios llegan a las células germinales. Esto se denomina efecto epigenético transgeneracional. La epigenética nos desvela las razones, hasta hace tiempo desconocidas, de por qué dos individuos genéticamente idénticos se desarrollan de manera diferente, y cómo puede haber una expresión tan variada del mismo genoma. La epigenética se encarga de regular la actividad transcripcional basándose en el marcaje molecular del material genético (Tollefsbol, 2010).

El contenido genético de los seres vivos se encuentra en el ADN, cuya molécula contiene cuatro bases nitrogenadas: Adenina, Guanina, Timina y Citosina. El ADN puede expresar sus genes en forma de proteínas mediante la transcripción de una de las cadenas de ADN a una de ARN. Existen varios tipos de ARN. El ARN tiene algunas diferencias respecto al ADN, es monocatenario y en vez de Timina como base nitrogenada contiene Uracilo. El ARNm es el tipo de ARN que lleva la información del ADN a los ribosomas, el lugar de la síntesis de proteínas. La información del ARNm se

encuentra ordenada una secuencia de nucleótidos. Cada secuencia de tres nucleótidos continuos en el ARNm (tripleto o codón) codifica un aminoácido específico. Una gran parte de las secuencias de ARN no se traduce a proteínas (ARN no codificante), son reguladoras. Hay secuencias con funciones muy variadas dentro de la regulación, incluso hay porciones cuya función aún se está descubriendo.

La forma en la que se empaqueta el ADN también es importante en el control de la manifestación de éste. Tiene varios niveles de empaquetamiento, y para ello se ayuda de unas proteínas conocidas como histonas (H2A, H2B, H3, H4), asociándose en nucleosomas y creando un nivel estructural más compacto, la cromatina. En la figura 1 se muestra la organización en nucleosomas (Beck, 2010). Cuanto más compacta es la organización, más difícil se hace su expresión. Debido a ello, es un proceso dinámico en el que ciertas partes se compactan o se liberan para permitir que se pueda transcribir. Las zonas hipercompactas se conocen como heterocromatina y las más libres como eucromatina. Esta condensación se observa en la figura 2.

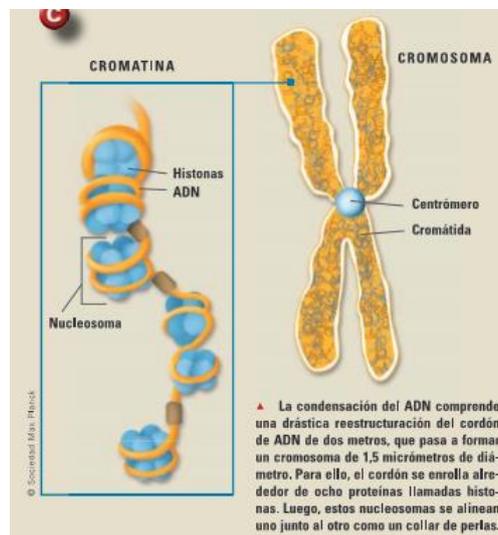


Figura 1. Condensación en forma de cromosoma. Cada 8 histonas con el ADN enrollado forman el nucleosoma (Beck, 2010).

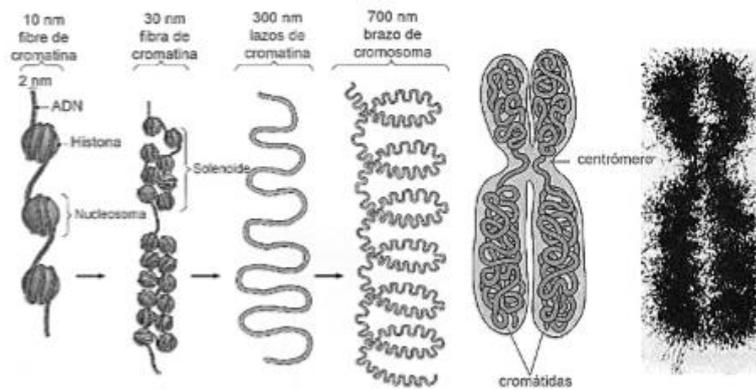


Figura 2. Niveles de condensación del material genético, su tamaño y denominación, hasta llegar al cromosoma (Camarena et al., 2016).

1.2. Control por metilación del ADN

La cromatina tiene ciertas zonas marcadas, que condicionan su significado funcional. Existen marcas de metilación, en las que a ciertas citosinas se les une un grupo metilo (-CH₃) o hidroximetilo (-OH-CH₃). Las ADN metiltransferasas son las enzimas encargadas de colocar los grupos metilo siguiendo un patrón, que se puede heredar de unas células a sus hijas. Este patrón se llama epigenoma. En este proceso intervienen diversos cofactores, como el de la figura 3, SAM, que es donante de grupos metilo.

La metilación en C5 de la base citosina es el único tipo de metilación en eucariotas. En otro tipo de organismos se pueden encontrar N6-metiladenina o N4-metilcitosina. Muchas veces ocurre en las citosinas que se encuentran próximas a una guanina, en los dinucleótidos CpG, en el que la p es el fosfato que une la Citosina y la Guanina. Cuando se acumulan en ciertas zonas muchos de ellos, se llama a esa formación islas CpG. Estas islas se solapan con promotores aproximadamente en la mitad de los genes y no se encuentran igualmente metiladas en todas las etapas de la vida, ni en todos los tejidos (Cheng et al. 2010). En los mamíferos, alrededor de un 4% de las citosinas se encuentran metiladas. Sin embargo, en las regiones CpG el porcentaje de citosinas metiladas puede alcanzar entre un 60 y un 90%. Esto significa que gran parte de las citosinas metiladas se concentran en estas regiones del ADN. La

presencia de la 5 metil-citosina produce un cambio conformacional en la molécula de ADN.

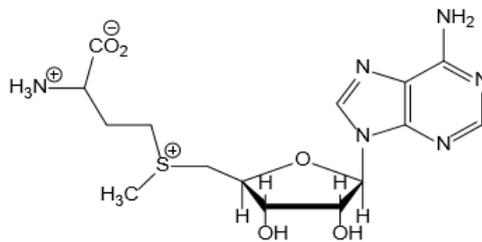


Figura3. Cofactor SAM (Aranda M J et al. 2015)

La presencia del grupo metilo unido a la base no altera el apareamiento entre las dos hebras de ADN, ya que se encuentra en la parte externa de la cadena y no en la interna donde se hacen los enlaces entre ambas hebras. En esta posición hacia afuera, las proteínas se acercan al ADN y pueden interactuar con ella (Ziller et al., 2013).

Los patrones de metilación generalmente se heredan y tienen cierta estabilidad. En la formación de gametos la metilación se elimina, dando lugar a una reprogramación tras la cual, en el embrión, ocurre la metilación de novo. En las mujeres los gametos se encuentran menos metilados que en los hombres. La desmetilación general ocurre alrededor de la fase de 8 células, tras la cual se establece el patrón somático. También hay metilación de novo en células somáticas, aunque es un proceso más lento, asociado al envejecimiento tisular y la carcinogénesis, donde por ejemplo, los genes supresores de tumores son inactivados.

Generalmente la función de la metilación es supresora, por ejemplo, al unirse a una región promotora. En los segmentos hipermetilados no se transcriben los genes, mientras que los hipometilados se asocian con la existencia de más mutaciones y por tanto inestabilidad. Esto puede explicar en parte la génesis del cáncer (Cheng et al. 2010). A veces también se metilan porciones no codificantes, en las que también cumple su función. Por ejemplo, en la heterocromatina centromérica, en donde se da estabilidad e integridad de la conformación cromosómica.

La metilación del ADN junto con las modificaciones en las histonas son los mecanismos principales de silenciamiento genético. Aunque la metilación se cree que no inicia el proceso y su función es más de mantenimiento.

1.2.1. Metiltransferasas

Según su afinidad a un sustrato u otro, las ADN metiltransferasas se identifican de diferente manera. La DNMT3A y DNMT3B son metiltransferasas de novo, esto ocurre en el momento en el que se va a crear un nuevo ser y se precede de una desmetilación del material genético para después reprogramarlo. Una vez que el patrón de metilación se ha establecido, se transfiere de unas células a otras con ayuda de la DNMT1. Este enzima a diferencia de los anteriores, tiene mayor afinidad por el ADN hemimetilado. Esto significa que copia el patrón de metilación de una hebra en la sintetizada a través de esta en el proceso de replicación.

En el proceso de la transferencia de metilos se produce una rotación de los enlaces de la base nitrogenada en la cadena de ADN, para exponer el nucleótido y así desaparecerse de su pareja de la otra hebra. En este punto ya puede usarse como sustrato del enzima. Este giro de las bases ocurre también en otros procesos como el de reparación. Es importante para para facilitar el contacto del enzima con la base a modificar (Jurkowska et al. 2011).

a) Metilación de mantenimiento

En este proceso actúa la DNMT1 (figura 4) en el inicio de la replicación, actuando en la nueva cadena de forma semiconservativa. La afinidad de este enzima por el ADN hemimetilado es mucho mayor que en una molécula en la que ambas estén metiladas. Este enzima se relaciona con la PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) que une la ADN polimerasa a la horquilla de replicación. En algunas ocasiones la DNMT1 puede participar en metilación de novo sobre todo con los dinucleótidos CpG. Además, también tiene alguna función con otras moléculas que regulan la transcripción, como las desacetilasas de histonas.

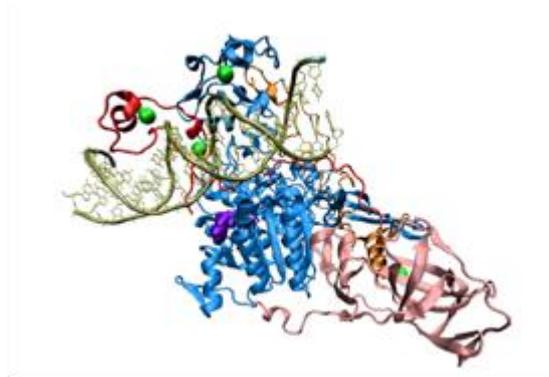


Figura 4. Representación de la estructura de DNMT1. En amarillo la doble hebra de ADN. En azul, el rosa y el naranja son subdominios del enzima. El rojo es el loop catalítico. En morado el cofactor S-Adenosil-L-Homocisteina (SAH). Iones Zn en verde. (Aranda et al. 2015)

b) Metilación de novo

Los enzimas implicados añaden el grupo metilo a un CpG no metilado, creando una hemimetilación del ADN. También influyen en la acción de deacetilasas de histonas. Cada una de las dos metilasas de novo actúa en diferentes zonas del ADN, no llegando a solaparse. Esto se puede apreciar en enfermedades como el síndrome ICF. Este síndrome, que se manifiesta con síntomas de anomalía facial, inmunodeficiencia e inestabilidad centromérica, se debe a una mutación de la DNMT3B, que actúa principalmente en los centrómeros, causando los síntomas mencionados y la inestabilidad, a diferencia de DNMT3A que actúa mayoritariamente en otras zonas y su afectación daría lugar a otra serie de síntomas (Cheng et al. 2010).

Las metiltransferasas interaccionan con lugares concretos de la secuencia por relacionarse con factores de transcripción, proteínas de unión a histonas metiladas o correpresores.

1.2.2. Desmetilación

Al igual que existe la metilación también hay un proceso de desmetilación. Se conocen dos mecanismos para este proceso. El mecanismo pasivo consiste en que no actúe la metiltransferasa de mantenimiento durante varios ciclos y de esa forma no se repongan los metilos (Doerfler et al. 2006). La alternativa activa (figura 5) tiene varias opciones que se basan en la actuación de un enzima con capacidad demetilasa. Una

opción es a través de una glicosidasa que corta la citosina metilada, y luego esto es arreglado por la maquinaria de reparación de la célula. La otra opción es un mecanismo oxidativo llevado a cabo por las metilcitosina dioxigenasas denominadas TETs (Ten Eleven Translocation). Transforman la C5 metilcitosina en C5 hidroximetilcitosina. Luego, la citosina normal, sin metilar, es repuesta. Otra opción es la oxidación de la citosina por las TETs y posteriormente esta citosina oxidada pasa a ser un uracilo oxidado por los AID (activación inducida citosina deaminasa) o los APOBEC (enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico). Por último, se transforma en citosina gracias a una serie compleja de enzimas (TDG, SMUG1 y BER).

Se habla de una proteína que se une al ADN metilado, la MBD 2b, que es desmetilasa. Aunque no hay mucha reproducibilidad con esta teoría. La alternativa es que se produzca durante la reparación del ADN por la 5 metilcitosina ADN glicosilasa.

Como dato interesante, el sistema activo se aprecia en la desmetilación del material paterno en el cigoto, y el sistema pasivo preferentemente en el genoma materno en estadios posteriores.

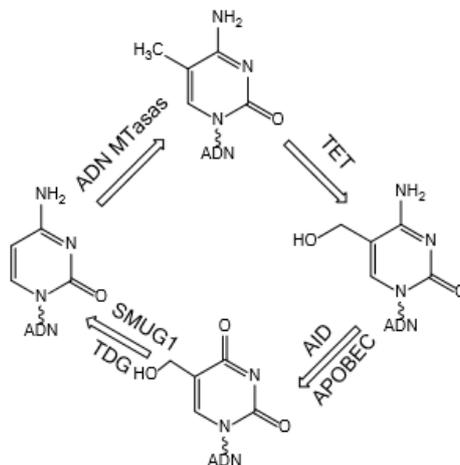


Figura 5. Desmetilación activa (Aranda M J et al. 2015).

1.2.3. Mecanismo por el cual se reprime la expresión

Como ya se mencionó anteriormente, este mecanismo da lugar a una supresión de la expresión, que puede darse a través de varios mecanismos. Uno es que dificulte la unión de los factores de transcripción que contengan CpG en su lugar de reconocimiento. Esto afecta a factores como E2F, CREB, AP2, cMyc/Myn y NFkB. Otro mecanismo consiste en proteínas o complejos que se unen a los CpG metilados e inhiben indirectamente la transcripción, al impedir la unión de los factores de transcripción. Esto se debe a que estos complejos tienen dominios de unión al ADN metilado, MBD (Methyl CpG Binding Domain). Ejemplo de esto es la MeCP2, la primera descubierta aunque se conocen otras más como la MBD1, MBD2 y MBD3. La MeCP2 contiene un dominio de represión transcripcional. La MBD2 proviene del complejo MeCP1, cuya afinidad por las secuencias metiladas es baja y por tanto su represión es temporal. El dominio MBD también interacciona con componentes de la cromatina, como las histonas y sus deacetilasas, potenciando así la inhibición de la expresión.

1.2.4 Importancia de la metilación

Estos mecanismos son fundamentales para el control de la expresión, la impronta genética y la inactivación del cromosoma X entre otros. También en el control de los transposones, unas secuencias que se copian y saltan de unos lugares a otros, y como consecuencia pueden facilitar las mutaciones, por eso muchos de ellos se encuentran inactivados.

1.3. Control por marcaje de histonas

No solo el ADN se marca, también las histonas pueden, y las consecuencias funcionales pueden ser un establecimiento global de la cromatina o una regulación de procesos como la transcripción. (Delgado, 2009). Como son proteínas, se marcan sus aminoácidos, aunque algunos son más susceptibles a ello que otros, entre ellos están la Arginina, Lisina, Serina y Treonina. En este caso se pueden unir grupos metilo, fosforilo, acetilo o incluso ubiquitinas. Dependiendo de la molécula que se agregue a la histona y el lugar, los resultados pueden ser diferentes. La acetilación es uno de los procesos más importantes y ocurre normalmente sobre Lisinas, mientras que la

metilación se da generalmente en Lisinas y Argininas. Solo se han identificado hasta ahora 14 sitios diana de Lisinas para acetilación de Histonas, y 8 para metilación de Lisinas. Las Lisinas se pueden metilar, dimetilar o trimetilar, con un significado funcional diferente. Las Argininas solo se pueden metilar o dimetilar (Herceg, 2010).

El código de Histonas se puede leer a través de proteínas con dominios concretos, según el proceso que se quiera leer. Para la metilación de Histonas, son proteínas con cromodominios, que interaccionan con residuos metilados, y en el caso de la acetilación, con bromodominios. Estas proteínas inician respuestas para iniciar la transcripción, represión genética, condensación, etc. (Delgado, 2009). Algunas de esas proteínas con cromodominios son ellas mismas HMT (Histona Metil Transferasa) y lo mismo con los bromodominios, coincide que son también HAT (Histona Acetil Transferasa). Un caso curioso es el de la proteína ESET, que tiene un cromodominio y un dominio de unión a ADN metilado, y además es HMT. Por lo que varios mecanismos epigenéticos están regulados por la misma y por tanto relacionados. En la figura 6 se ve la interacción entre metilación de ADN y acetilación de histonas.

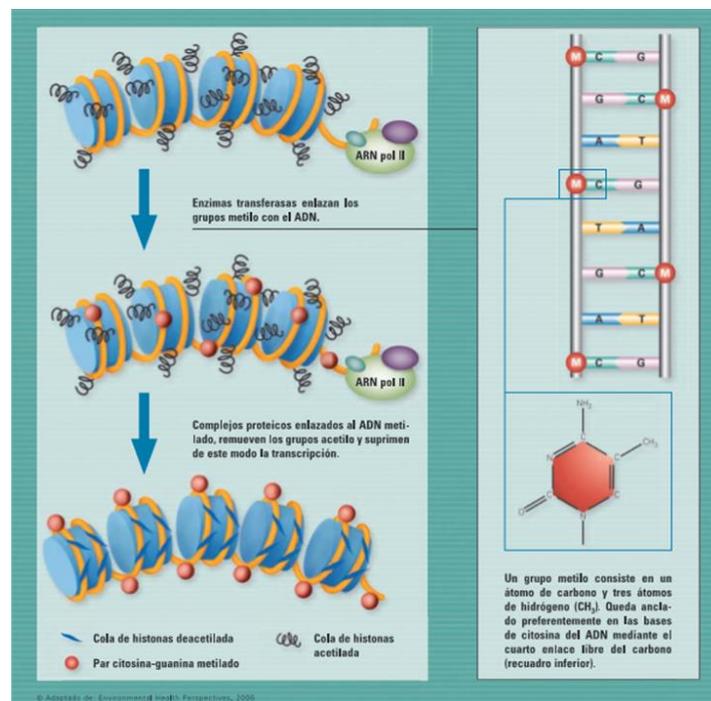


Figura 6. Relación entre la metilación del ADN y la acetilación de histonas para suprimir la expresión. (Beck, 2010)

Como se mencionó en la introducción, según la condensación y la actividad transcripcional el ADN se divide en hetero y eucromatina. La heterocromatina, más compacta y con mayor densidad de secuencias repetitivas y que no se expresan, se localiza principalmente en los telómeros y los centrómeros. En estos lugares se puede observar una mayor metilación de residuos en histonas como en H3K9 (Lisina 9 en histona H3), H3K27 y H4K20, además una menor acetilación. Concretando en la metilación de H3K9, que es una marca de silenciamiento de heterocromatina, provoca una atracción de elementos correpresores como HP1 o HDAC (Figura 7). La represión puede propagarse por la acción de las metiltransferasas de histonas, que metilan más H3K9 (Delgado MD, 2009).

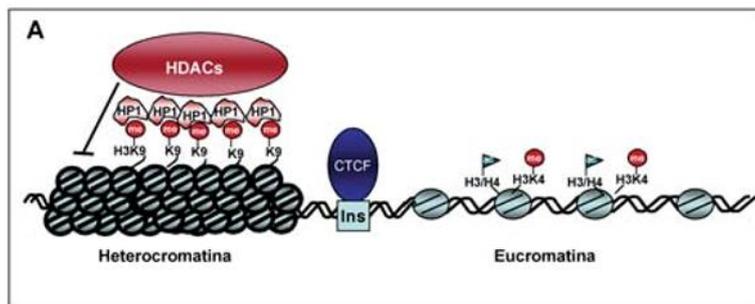


Figura 7. Represión por metilación de histonas. (Delgado, 2009)

La eucromatina a diferencia de lo anterior, puede variar su grado de compactación y su transcripción, según las necesidades de expresión o reparación genética. Marcas típicas de las histonas en la cromatina activa son la acetilación de H3 y H4 y la di o trimetilación de H3K4 (Imagen 7). Para dividir estas dos zonas y que no se silencie la eucromatina como la heterocromatina hay regiones aislantes llamadas insulators.

1.3.1 Acetilación

El grupo amino de la Lisina y la Arginina le confieren carga positiva, lo que hace que pueda interactuar fácilmente con las cargas negativas de los enlaces fosfodiéster del ADN. Si la lisina es acetilada, pasa de amina a amida y pierde su carga positiva lo que disminuye la atracción electrostática con el ADN. Gracias a esto, la cromatina está más libre y pueden acceder los factores que permiten su transcripción (Haberland et al

2009). Esto se observa en la figura 8. Por lo tanto, la acetilación o deacetilación tiene relación con la accesibilidad o no a la transcripción. Mientras que, en la metilación, el efecto depende del lugar y número de metilos.

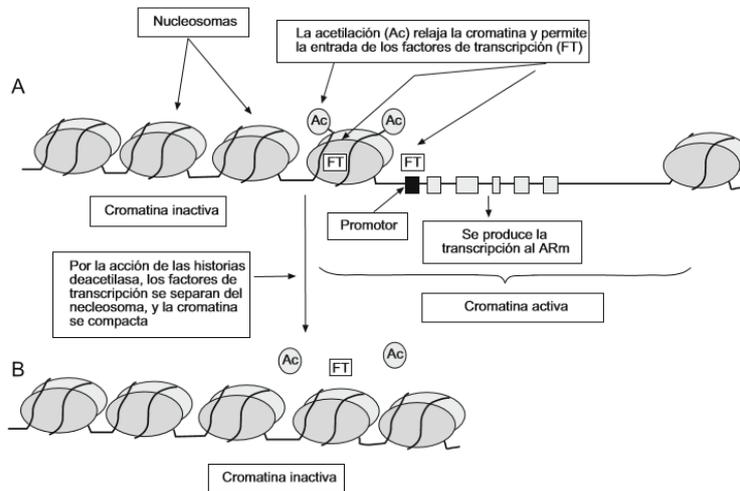


Figura 8. Proceso de acetilación de histonas. (Martínez-Frías ML et al., 2010)

La acetilación se lleva a cabo por el enzima Histona acetil transferasa (HAT), que utiliza el grupo acetilo del AcetilCoA. Las HAT se clasifican según donde se localizan en clase A o nucleares y clase B o citoplasmáticas. Algunos ejemplos de HAT son MYST, GNAT y SRC. El proceso contrario se lleva a cabo por el enzima Histona deacetilasa (HDAC). Según el cofactor que utilicen se clasifican en clásicas, que necesitan Zn, o Sirtuinas, que necesitan NAD⁺. Las clásicas se subdividen en clase I, II y IV. La III es de las Sirtuinas. En total en humanos hay 18 enzimas que se conozcan implicadas en esta función. Las clásicas van de la HDAC1 a la HDAC11. Las Sirtuinas van de la SIRT1 a la SIRT7. La mayoría de las clásicas, menos la HDAC6, se encuentran en el núcleo. Las sirtuinas están normalmente en el citoplasma y en mitocondrias. Esto muestra que además de esta función tienen otras más.

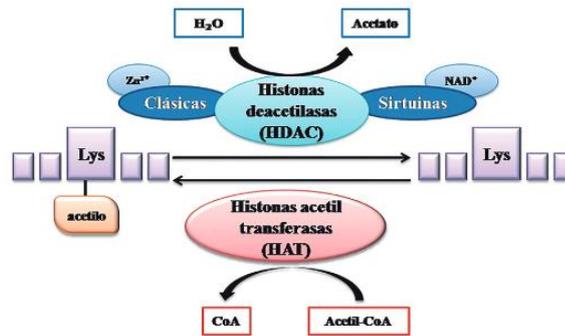


Figura 9. Actividad enzimática en la acetilación y desacetilación de histonas. (Latorre et al., 2014).

La HDAC también regula la transcripción por medio de la unión a factores de transcripción como STAT3, NFκB, p53 y E2f entre otros. Además, pueden unirse a receptores nucleares y formar complejos correpresores. Las HDAC cumplen con muchas funciones importantes. Las HDAC 1,2 y 3 participan en la regulación epigenética, aunque también en la proliferación de células madre embrionarias, regulación del ciclo celular, en ciertas rutas metabólicas o en el desarrollo de órganos como es el caso del hígado. Las de clase II son fosforiladas y después actúan en rutas de señalización, además controlan el tránsito de ciertas proteínas del citoplasma al núcleo, la adhesión, la movilidad celular y las chaperonas. Las de clase IV no se conocen tanto aún (Haberland et al 2009). Las sirtuinas son reguladoras de la transcripción y controlan el ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la proliferación. Al reparar las conexiones sinápticas, a mayores, se ha descubierto que tienen un papel en el aprendizaje y la memoria.

1.3.2 Metilación de histonas

La metilación en el Nitrogeno de Argininas y Lisinas es muy estable. Los enzimas actúan de manera específica según el residuo a metilar. Hay tres clases de enzimas implicadas. Las HMT específicas de Lisina conteniendo dominio SET que metilan las H3 en K4, K9, K27 y K36, y la H4K20. Otro grupo son las HMT específicas de Lisina sin dominio SET, que actúan en H3K79. Y por último las HMT específicas para Arginina, que metilan ciertas Argininas en H3 y H4.

La metilación, a diferencia de la acetilación, puede ser activadora en H3K4, H3K36 y H3K79. En H3K4 se atraen acetiltransferasas que activan factores de transcripción y descondensan la cromatina. También puede tener función silenciadora en H3K9, H3K27 y H4K20. En concreto la metilación de la lisina 27 en H3, se relaciona con la represión de los genes HOX, la inactivación del cromosoma X y la impronta.

1.4. Control por microARNs

Los microRNAs (miRs) son hebras cortas de ARN no codificante, que regulan la expresión y la estabilidad de los ARNm. Suelen tener de 21 a 25 nucleótidos. Se calcula que hasta un 30% de todos los genes humanos son regulados por miRs. El proceso es complejo, tal y como se puede ver en la figura 10. La ARN polimerasa II es la principal responsable de la transcripción de los genes codificantes de miRNAs. El transcrito primario (pri-miR) es largo (aproximadamente 100 nucleótidos) y de doble cadena, con extremos 3' y 5' de una única cadena. Tiene una estructura en horquilla. Un complejo proteico (DGCR8/Drosha) convierte el pri-miR en una hebra precursora de unos 70 nucleótidos que se denomina pre-miR. El DGCR8 es el que identifica el pri-miR para luego ser cortado por Drosha. Estos procesos ocurren en el núcleo. El pre-miR sale al citoplasma, asociándose con exportina y RanGTP, que le sirven de transportadores. Allí se eliminan las secuencias que forman la estructura de horquilla, quedando un fragmento de unos 21 nucleótidos y doble hebra. De esto último se encargan la ARN polimerasa III Dicer y la proteína TRBP (Transactivator RNA binding protein).

El miR maduro se une al complejo RISC (RNA induced silencing complex) formado por las proteínas Argonauta (AGO2) y GW182. La doble cadena de ARN se presenta a AGO2. El miR de doble hebra se separa, la cadena seleccionada por el componente AGO2 del RISC se llama "cadena guía" y la otra es la "cadena pasajera", que es liberada. La cadena guía reconoce a su ARNm diana por medio de la complementariedad de bases. La secuencia encargada del reconocimiento es la "secuencia semilla" o ERM (miR recognition element) constituida por los primeros 2-8 nucleótidos del extremo 5' del miR. El RISC lleva el miR al extremo 3' no traducible del ARNm que se necesita silenciar. Según la cantidad de complementariedad entre ambos elementos las consecuencias sobre el ARNm son diferentes: degradación del mismo,

inhibición de la elongación, terminación prematura de la traducción e inhibición de la traducción. Cuando la interacción no es total, se impide la traducción de ARNm pero no se destruye. En cambio, cuando hay una gran complementariedad o coincide totalmente, el ARNm es deadenilado por escisión endonucleolítica, que lo desestabiliza y es degradado. (Hobert, 2008). Sea cual sea el desenlace, los complejos ARNm-miARN son trasladados a unas estructuras del citoplasma conocidas como “cuerpos de procesamiento” o P-bodies, para que puedan ser degradados o almacenados. Este mecanismo de regulación es muy complejo. Se sabe que con solo un apareamiento de 6 nucleótidos puede dar lugar a las consecuencias citadas. Además, cada miR no solo puede ejercer su acción con un ARNm, sino con cientos de ellos, y cada ARNm puede ser regulado por muchos miRs diferentes.

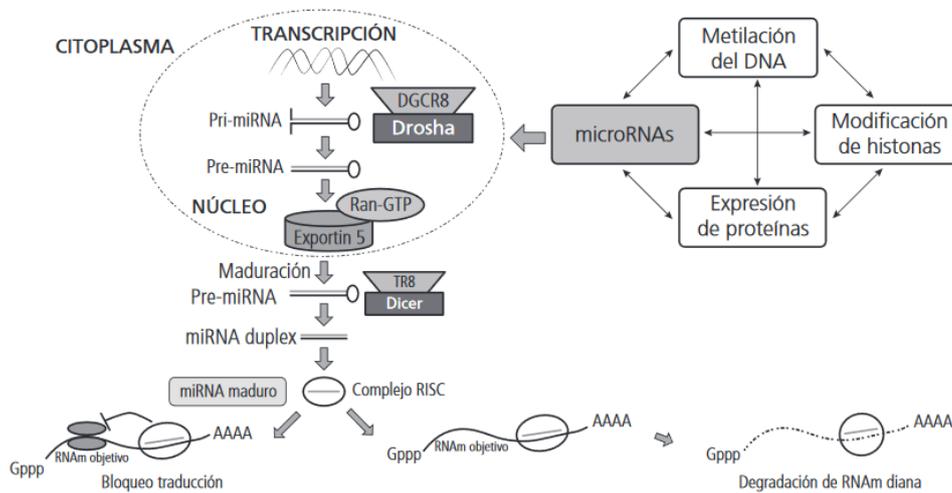


Figura 10. Resumen de la formación y actuación de los micro ARN (Araya et al., 2014).

Otros mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN o la acetilación de histonas, puede también regular a los miR. En particular, en el caso de miR-127 (figura 11), que se encontraba aumentado en líneas celulares con cáncer tras tratarlas con 5-Aza-CdR y PBA (4phenylbutyric acid). El primero es un inhibidor de la metilación de ADN, y el segundo un inhibidor de HDAC. Al disminuir la metilación y favorecer la liberación del ADN de las histonas, se facilita la transcripción de este miR. La diana de miR-127 es el protooncogen BCL6, relacionado con el cáncer de próstata y de vejiga (Chuang et al., 2007).

Muchos miRs se encuentran en intrones de genes que codifican proteínas y se cree que son regulados en conjunto con su gen huésped. Otros miRs tienen sus propios promotores. El descubrimiento de que islas CpG dentro de intrones pueden actuar como promotores sugiere que miRs intrónicos, con islas CpG más arriba en el mismo intrón, pueden ser transcritos a partir de sus propios promotores, que a su vez están regulados por metilación (Chuang et al., 2007).

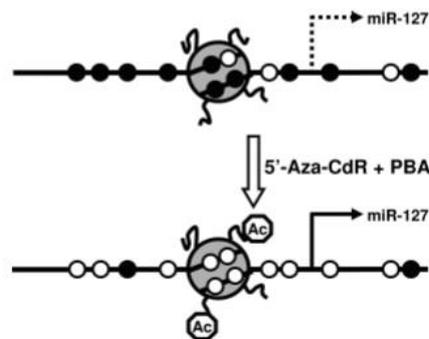


Figura 11. MiR 127 y consecuencia tras tratarse con 5' Aza-CdR y PBA. Los círculos negros representan ADN metilado, los blancos ADN sin metilar (Chuang et al., 2007).

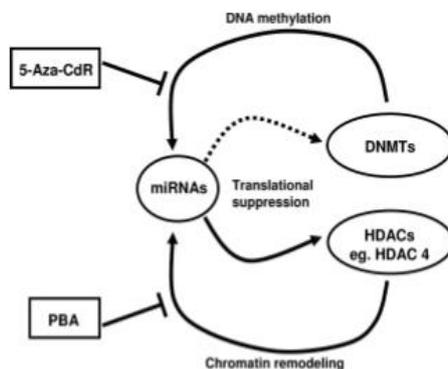


Figura 12. DNMT: metiltransferasas. Sobre el mismo ejemplo de la figura 11, mostrando que los miARN influyen en procesos epigenéticos y ellos en los miARN (Chuang et al., 2007)

Los miR no se encuentran en el interior de las células, también están presentes en todos los fluidos biológicos (plasma, saliva, orina, leche, etc). Su degradación es evitada al estar en el interior de pequeñas vesículas, empaquetados dentro de HDL o

unidos a proteínas, como AGO2. Las funciones extracelulares dependen de las células de las que proceden. Los niveles que se encuentran extracelularmente son muy estables y reproducibles, por lo que pueden ser útiles como biomarcadores de procesos y enfermedades.

1.5. Ejemplos de regulación epigenética

1.5.1. Inactivación del cromosoma X

Este proceso consiste en el silenciamiento de casi todo un cromosoma completo. La razón del silenciamiento es que, en la mujer, a diferencia del hombre, tiene el doble de dosis genética y para compensarlo necesita inactivar uno de sus dos cromosomas X. Se inactiva uno al azar, pero luego en las sucesivas divisiones de esa célula se mantiene el mismo inactivado, desde el estado de blastocisto. Se ha observado que hay gran cantidad de secuencias metiladas en el cromosoma inactivo, entre ellos casi todas las islas CpG y genes como el HPRT, G6PD y PGK1.

Se inicia al expresarse el gen Xist, localizado en Xq13. En el cromosoma inactivo está desmetilado. Del gen Xist se obtiene un ARN que cubre en posición cis al cromosoma e inicia una serie de modificaciones que tienen como fin el silenciamiento del cromosoma. Primero se metila K9H3, más tarde se aprecia globalmente una pobre acetilación de H4 y se incorpora la histona H2A al nucleosoma. La metilación de las islas CpG ocurre al final.

1.5.2. Impronta

Es el marcaje del genoma respecto a su origen parental. No todos los genes son improntados, pero cuando lo hacen significa que solo se expresa uno de sus alelos.

Muchos de los genes sujetos a impronta se encuentran agrupados y, de forma similar a la inactivación del cromosoma X, también hay un centro de impronta (IC) que controla el proceso. Estas regiones que se improntan contienen islas CpG y secuencias repetitivas. En concreto, la metilación de dinucleótidos CpG que define regiones con metilación diferencial (DMR) específicas para cada alelo parental, algunas veces se mantiene desde las células germinales y su desarrollo posterior, y otras ocasiones se reprograma en el desarrollo. Para esta regulación no se conocen bien los mecanismos

pero existe la teoría de que dependen de un patrón de histonas como la metilación de K4 o K9 en H3. Las secuencias DMR en ocasiones se encuentran metiladas en el alelo inactivo y en otras ocasiones en el activo.

1.6 Evolución

La epigenética tiene un papel muy importante en la explicación de la evolución. Según el Lamarckismo, los organismos nacen dotados de ciertas características, pero que en su adaptación al medio se pueden modificar para facilitar la supervivencia. Estas modificaciones durante la vida del organismo son heredadas por los descendientes. La teoría de la evolución, por el contrario, defiende que los organismos de una especie pueden tener ligeras diferencias desde el nacimiento y, que, por selección natural, sobreviven de los seres más preparados al ambiente y ellos son los que tienen descendencia, haciendo que se mantengan las características más favorables a la especie.

Aunque la teoría de Lamarck dejó de considerarse, al contrario de lo que se pensaba, puede no estar del todo errada, ya que el ambiente puede provocar modificaciones importantes en un individuo para adaptarse al medio y, además, como se explicó anteriormente, también se puede heredar de una generación a otra. Por lo cual la evolución se trata de un compendio de diferentes teorías que al ampliarse los conocimientos sobre la epigenética puede ir cambiando con el tiempo (Ayala et al., 2012). La epigenética es, por supuesto, un tema muy complejo, relevante y aún en investigación.

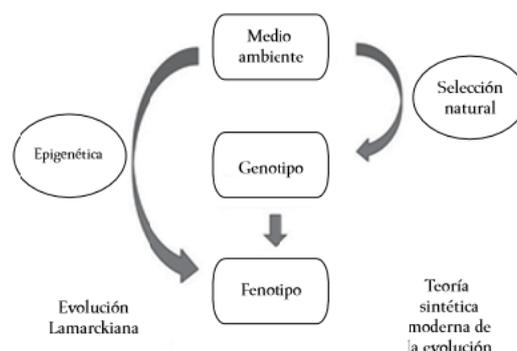


Figura 13. Teorías de la evolución integradas. (Ayala R PA et al., 2012)

2. EL DOLOR

2.1. Definición

A lo largo de la historia el fenómeno doloroso se ha definido de diversas formas, dada su complejidad. La más aceptada ahora es la de la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP): "el dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño".

El dolor se construye con varios componentes:

- Sensorial discriminativo: Se encarga de las características sensoriales del dolor, como la localización, intensidad, calidad y temporalidad.
- Cognitivo-evaluativo: Se trata de la interpretación del dolor.
- Afectivo-emocional: Síntomas añadidos como la ansiedad y la depresión forman parte de esta dimensión. Es variable en cada persona debido a las experiencias, la personalidad y la cultura de la que procede.

2.2. Epidemiología

Unos seis millones de adultos sufren dolor en España. El dolor es un mal muy prevalente en la sociedad, un 17,25% de los españoles sufren dolor, excluyendo el dolor menstrual, dental y las migrañas. Las mujeres tienden a sufrirlo en mayor medida que los hombres. Los dolores más comunes son en primer lugar el dolor de espalda (60,53%), en segundo lugar, el dolor articular (40,21%), en el tercer puesto está el dolor de cabeza (34,72%) y por último el dolor cervical (28,62%). Las consecuencias personales más importantes repercuten sobre el sueño (42,24%), los niveles de ansiedad (40,62%) y la depresión (24,43%). Esto en muchas ocasiones provoca una reducción o una limitación de las actividades sociales y laborales. El 39,39% de las personas que sufren de intenso dolor faltan al trabajo, en comparación con el 3% que corresponde con las personas que no sufren dolor (Breivik et al., 2006, Colloca et al., 2017).

2.3. Clasificación

El dolor se puede clasificar de diversas formas, según sus dimensiones. Dependiendo de la duración distinguimos dos tipos de dolor:

- **Agudo:** Generalmente dura menos de un mes, aunque puede durar hasta tres meses. La causa que lo provoca se reconoce bien, por eso para resolverse, basta con tratarla. Es “útil” porque nos sirve para reconocer la existencia de un proceso que puede atentar contra la integridad corporal.
- **Crónico:** De tres meses a 6 meses o incluso más. Su tratamiento es más complejo puesto que las dimensiones de este dolor no se limitan a una causa concreta, sino que perduran y por ello también cobran sentido los tratamientos de rehabilitación y psicológicos. La depresión, la ansiedad o el estrés están íntimamente relacionados con ello. Su cronificación baja el umbral del dolor y produce modificaciones centrales que constituyen la fijación del dolor.

Según las características fisiológicas pueden ser:

- **Nociceptivo:** Se da al estimularse los receptores del dolor. Puede ser somático, en cuyo caso se estimularían los receptores cutáneos, musculares y los del tejido conjuntivo. A menos profundidad serán más fáciles de localizar. El otro subtipo es el visceral, que se da al estimularse receptores en los órganos en procesos como la lesión, distensión, inflamación u obstrucción.
- **Neuropático:** Se produce al lesionarse el tejido nervioso periférico o central. Su control es mucho más complicado y tiende a la cronificación.
- **Mixto:** Con características de ambos tipos.

También se evalúa la intensidad. Es un parámetro subjetivo, pero útil para valorar el proceso y el desarrollo del dolor, saber si tras el tratamiento se obtiene un resultado, etc. Las escalas son muy variadas; las hay numéricas, del 0 al 10, por colores, con expresiones faciales, para niños y personas con déficits cognoscitivos. La más utilizada es la escala EVA. Esta escala consiste en una línea de 10 centímetros sobre la cual el paciente coloca su nivel de dolor entre un mínimo, que es la ausencia, y un máximo, que es el máximo dolor que pueda sentir (Williamson et al., 2005).

2.4. Receptores sensoriales

Los receptores sensoriales son las terminaciones nerviosas de la neurona pseudounipolar, que posee el soma en el ganglio raquídeo, cuyo axón da dos ramas, a la periferia y al asta dorsal. Se distinguen tres tipos:

- Nociceptores: Se relacionan con fibras C. En las ocasiones en las que están profundas en el tejido solo transmiten dolor.
- Mecanorreceptores de umbral elevado: Actúan en casos de presión elevada sobre los tejidos que pueden dañarlos. Se continúan en fibras A δ . Se asocia al dolor agudo.
- Polimodales: No solo responden al dolor, sino también a la temperatura, tacto, químicos, etc. Se continúan normalmente con fibras C. En caso de estímulo leve se tiene sensación táctil o calor, pero si supera un umbral se siente dolor.

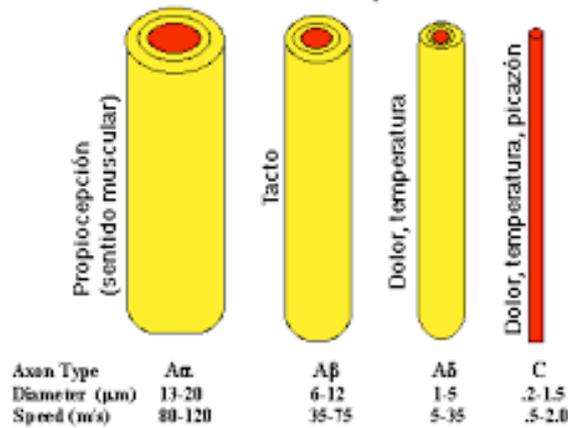
La activación de los receptores puede ser directa, aunque generalmente está mediada por sustancias químicas que se liberan en los tejidos lesionados, como son: K⁺, H⁺, Histamina, Serotonina, Prostaglandinas y Leucotrienos. Además, Bradicinina desde los vasos, y en las terminaciones nerviosas libres, sustancia P.

2.5. Transmisión nerviosa

La transmisión se produce en fibras diferentes, según las características de éstas y del estímulo (Figura 14 y Tabla 1):

- Fibras A: Pueden ser alfa, beta, gamma y delta, según la velocidad. Sus axones son gruesos y están mielinizados. Tienen alta velocidad de conducción.
- Fibras B
- Fibras C: son amielínicas, y por ello lentas. Dan dolor difuso.

Axones aferentes primarios



Grupo de fibras	Diámetro	Velocidad de conducción	Función
Fibras del tipo A: densamente mielínicas	1-20 μm	15 a 120 m/s	(Fibras de alta velocidad) Dolor agudo, temperatura, tacto, presión, propiocepción, fibras somáticas eferentes
Fibras del tipo B: menos densamente mielínicas	1-3 μm	3-15 m/s	(Fibras de velocidad moderada) Fibras viscerales aferentes, fibras preganglionares autónomas
Fibras del tipo C: amielínicas	0.5-1.5 μm	0.5-2 m/s	(Fibras de velocidad lenta) Fibras posganglionares autónomas, dolor crónico

Figura 14 y Tabla 1. Axones y sus funciones.

Las fibras encargadas de la transmisión del impulso nociceptivo son las fibras A δ y C. Las primeras se encargan de transmitir el dolor rápido y bien localizado mientras que las segundas están implicadas en la transmisión del dolor lento, sordo y de localización más difusa.

2.6. Procesamiento nociceptivo en el asta dorsal

La comunicación entre las aferencias de la neurona nociceptiva de primer orden y la segunda neurona de la vía nociceptiva, localizada en el asta dorsal de la médula espinal, se produce a través de sustancias como el glutamato, aspartato, péptidos y neuromoduladores. El glutamato, una de las sustancias más importantes en el proceso, actúa sobre receptores AMPA, NMDA, Kainato y receptores metabotrópicos. Al estimularse los receptores tipo AMPA, se abren canales de sodio que dan lugar al potencial excitatorio postsináptico. Al activarse el receptor NMDA se

movilizan iones calcio y causa una despolarización de larga duración. Esto participa en los cambios a largo plazo en el dolor crónico, como la sensibilización central o la inducción de genes. Los receptores metabotrópicos, a través de proteínas G y receptores de cinasas, activan una cascada de segundos mensajeros, incluido el AMPc, y se abren finalmente canales iónicos. También tienen que ver con la sensibilización central.

También se liberan neuropéptidos. Los más importantes son la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la Calcitonina (CGRP). En el asta dorsal estas sustancias provocan potenciales postsinápticos lentos.

Hay varias diferencias en cuanto a los efectos de los neuropéptidos y el glutamato. Por una parte, el glutamato tiene un territorio de actuación más pequeño debido a que es recaptado rápidamente; en cambio, eso no es así en los neuropéptidos, por lo que actúan a más distancia. Los neuropéptidos potencian el efecto glutamatérgico. Al liberarse más neuropéptidos, aumenta la excitabilidad y da lugar en ocasiones a una localización del dolor más difusa. Además de su acción en el asta dorsal de la médula, la primera neurona se encarga también de la inflamación neurogénica, liberando sustancias como la sustancia P y el CGRP. Las consecuencias de ello son vasodilatación, inflamación y extravasación de proteínas. Además, activan también los nociceptores (Basbaum et al., 2009).

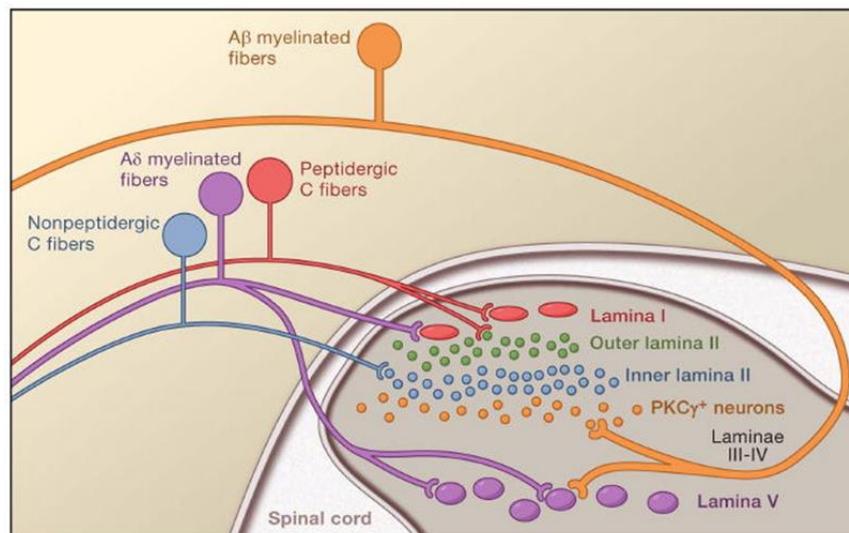


Figura 15. Distribución de las láminas del asta dorsal (Basbaum et al. 2009).

En el asta dorsal las sinapsis se hacen de manera distinta según la información y el tipo de neurona que llega (figura 15). Las láminas I,II y V son las principales en esta vía. Las fibras A δ de la piel acaban en la I y la V mientras que las C en la II y la V. Igualmente, las fibras con información musculoesquelética llegan a la I y V y las del dolor visceral en la I, V y X. La lámina V recibe información tanto dolorosa como no dolorosa. Se llaman neuronas de amplio rango dinámico, y al recibir esta información tan variada, se puede explicar así el dolor referido.

En la segunda lámina las neuronas inhibitorias contactan con neuronas primarias que transmiten dolor y también no nociceptivas, además de con segundas neuronas en la lámina I. El tacto estimula esta vía, aunque no es así cuando los estímulos son muy intensos. En esta lámina, por la zona ventral hay neuronas excitatorias que reciben información no dolorosa. Se sabe que estas neuronas tienen un papel en el proceso de alodinia y el de cronificación del dolor (Neumann et al, 2008).

2.7. Vías de la nocicepción

Las fibras aferentes pueden hacer sinapsis con neuronas que envían sus proyecciones a los centros superiores, con interneuronas dentro de la médula que pueden modular la transmisión y con neuronas propioespinales. El tracto espinotalámico es la vía termoalgésica principal (Waxman, 2011), (figura 16).

La primera neurona de esta vía se asienta en el ganglio raquídeo y, como se mencionó previamente, tiene una terminación periférica con el receptor y una terminación central que conecta con la neurona de segundo orden en la médula (García-Porrero JA y Hurlé JM, 2015). Tras atravesar el vértice del asta posterior, hacen sinapsis con la segunda neurona en el núcleo gelatinoso de Rolando y en núcleos del asta posterior. Esta segunda neurona se decusa y asciende contralateralmente. El cruzamiento es difuso a lo largo de la médula (García-Porrero y Hurlé, 2015). La vía espinotalámica lateral pasa a encontrarse en la sustancia blanca anterolateral. En el bulbo se unen a las fibras del haz anterior y el tracto espinotectal (proceden de articulaciones y tendones), formando el lemnisco, y muchas fibras del tracto lateral acaban en el tálamo, generalmente en el núcleo ventral postero lateral. Se cree que

aquí inician las sensaciones de dolor y la dimensión emocional. Ahí se transmite la señal a la tercera neurona, y se dan múltiples radiaciones. Muy importante es la información que llega a la corteza somatoestésica. También se emiten radiaciones a núcleos de asociación y corteza motora. Muchas fibras del dolor lento contactan con la formación reticular.

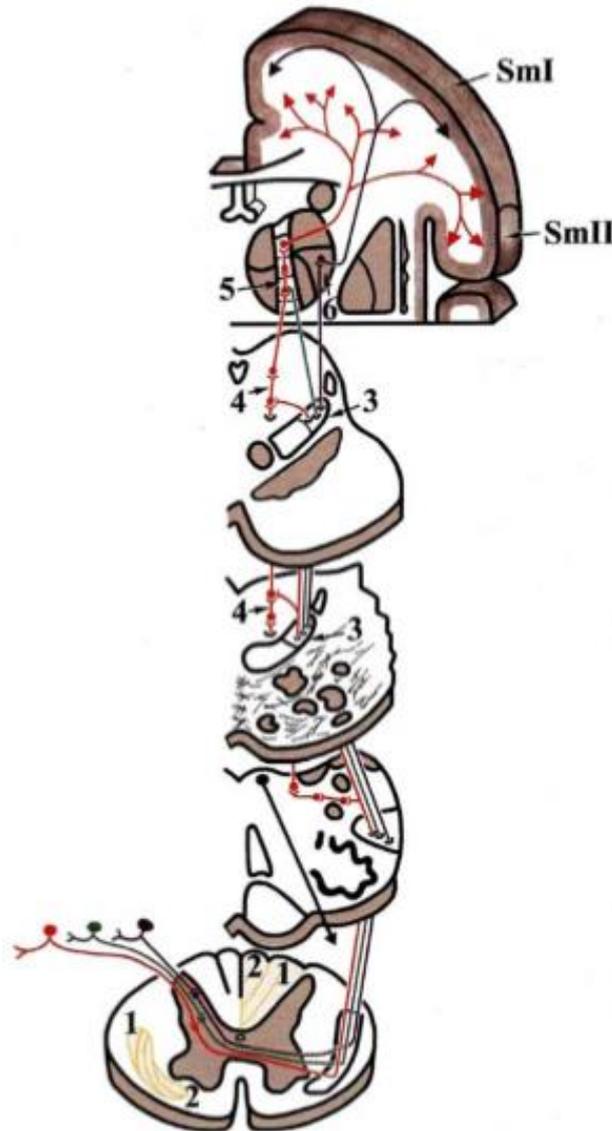


Figura 16. **Tracto espinotalámico.** Se pueden observar cortes de la médula, el bulbo, el puente, el mesencéfalo y el hemisferio cerebral izquierdo. Se muestran los subsistemas de la vía: en rojo el tracto espinoreticular, en azul el neoespinotalámico y en verde el paleoespinotalámico. El número 1 son los mielómeros sacrocóccigeos, el 2 los mielómeros cervicales, el 3 es el lemnisco espinal, el 4 es la formación reticular, el 5 los núcleos intralaminares y el 6 el núcleo ventral posterolateral (Icardo, et al., 2004).

Como estructuras superiores algunas importantes son el giro postcentral, que interpreta el dolor en función de experiencias pasadas, la circunvolución del cíngulo del sistema límbico, que tiene que ver con las emociones asociadas al dolor y la circunvolución insular, que se relaciona con estímulos dolorosos viscerales y con la respuesta autónoma.

Al mismo tiempo que se produce la sensación dolorosa se pueden producir reacciones simpáticas y motoras. Esto se debe a una comunicación directa o indirecta entre las neuronas aferentes con las neuronas motoras del asta anterior, para la respuesta motora de contracción refleja al dolor. En el caso del reflejo simpático se debe a la comunicación de estas neuronas aferentes y las de la vía simpática intermedio-lateral de la médula.

2.8. Modulación del dolor

2.8.1. Teoría de la compuerta

El mecanismo de “control gate”, de Melzack y Wall (1965) explica cómo puede reducirse el dolor al intervenir fibras mielínicas que no forman parte de la vía del dolor. Consiste en una regulación presináptica entre la primera y segunda neurona, por medio de una interneurona, que normalmente está inhibida. Las neuronas de las láminas I y V, pueden inhibirse por estas interneuronas inhibitorias y ambas reciben también fibras aferentes tipo C, que excitan a las neuronas de la proyección y a su vez inhiben a las interneuronas. Las fibras mielínicas A que llevan información propioceptiva y táctil, excitan a su proyección pero también a la interneurona inhibitoria, lo que hace que se eleve el umbral del dolor.

2.8.2. Sistema inhibitorio descendente

De estructuras como la sustancia gris periacueductal, la formación reticular y núcleos del rafe se originan las rutas de modulación descendentes. Ejercen su acción presinápticamente en las neuronas primarias aferentes, y postsinápticamente en las segundas o en las interneuronas. Dichas rutas son mediadas por receptores opioides (μ , δ y κ), α_2 adrenérgicos y serotoninérgicos. Cada uno de los mediadores tiene su papel en vías diferentes:

- Noradrenalina: actúa en la vía de la sustancia gris al núcleo del rafe y la formación reticular.
- Serotonina: En el cordón dorsolateral, inhibe las neuronas del asta dorsal.
- Opioides endógenos: De forma presináptica provoca hiperpolarización de la neurona aferente y por tanto no se libera sustancia P. De forma postsináptica, intervienen en las segundas neuronas o las interneuronas en el asta dorsal de la médula.

2.9. Dolor neuropático

2.9.1. Conceptos generales

La descripción que recoge la IASP (International Association for the Study of Pain) respecto a este fenómeno es el de un dolor causado por una lesión primaria o una enfermedad en el sistema nervioso periférico o central.

Aproximadamente, entre un 7 y un 10% de la población mundial sufren de esta clase de dolor (Calloca et al., 2017). En Europa, una cuarta parte de las consultas médicas tienen como causa el dolor (Breivik et al., 2006). En España, informes de Atención Primaria indican un 30,7% de prevalencia del dolor neuropático, de los cuales un 13,4% es de tipo mixto. Un 60% de los afectados son mujeres, y la media se encuentra en los 59 años. Las causas más típicas son la neuralgia del trigémino y neuropatías como la diabética. Estos datos nos indican que realmente es un problema importante y prevalente, con gran impacto social, laboral y económico.

Las sensaciones que se tienen en el dolor neuropático son diferentes a las del nociceptivo. Los pacientes pueden describirlo como sensación de quemazón, presión intensa en el interior, calambres, dolor punzante, pulsátil, etc. Hay sensaciones que pueden aparecer espontáneamente como la sensación de quemazón, dolor lacinante o muy intenso, y dolor profundo. Pero hay otras sensaciones que son provocadas por estímulos, lo que significa que puede ser alodinia o hiperalgesia. La alodinia es el dolor ante estímulos normalmente inocuos y la hiperalgesia es una exageración de la sensación de dolor en un caso en el que suele haber dolor pero en menor grado (Gilron et al., 2015).

Además de estos síntomas muchas veces se asocian otros más, como vegetativos, motores o sensitivos. Si lo que los provoca es una interrupción de la conducción del nervio, los síntomas serán negativos y comprenden según la fibra afectada paresia, parálisis, espasticidad, hipoestesia, sordera, amaurosis, analgesia, vasodilatación, hipohidrosis, etc. Los síntomas positivos se deben a descargas ectópicas en los nervios lesionados y provocan e muchos casos percepciones nuevas y al mismo tiempo desagradables para el paciente. Algunos ejemplos son fasciculaciones, distonías, parestesia, tinnitus, vasoconstricción, hiperhidrosis y piloerección (Baron et al., 2000, Finnerup et al., 2016). Los síntomas autonómicos se dan en un 33-50 % de pacientes que sufren este cuadro y es una característica muy importante de la distrofia simpático-refleja. El diagnóstico tiene por base fundamental la sintomatología y la exploración (Gilron et al., 2015).

Por todas estas sensaciones y la temporalidad, este tipo de dolor es muy complejo y muy difícil de tratar y sobrellevar por el paciente. Adquiere consecuencias psicológicas, en el sueño, en el ánimo y repercute en la vida laboral, social y personal del paciente. Por ello el abordaje debe ser completo (Bouhassira, 2015).

Las causas de dolor neuropático pueden ser muy variadas: enfermedades degenerativas (esclerosis múltiple, ELA), sustancias tóxicas (antineoplásicos, plomo), enfermedades infecciosas (herpes zóster, VIH), enfermedades metabólicas (diabetes mellitus), traumatismos neurales (dolor post quirúrgico, miembro fantasma, síndrome del dolor regional complejo), enfermedades genéticamente determinadas (enfermedad de Fabry, neuralgia del trigémino) tumores, isquemia, etc.

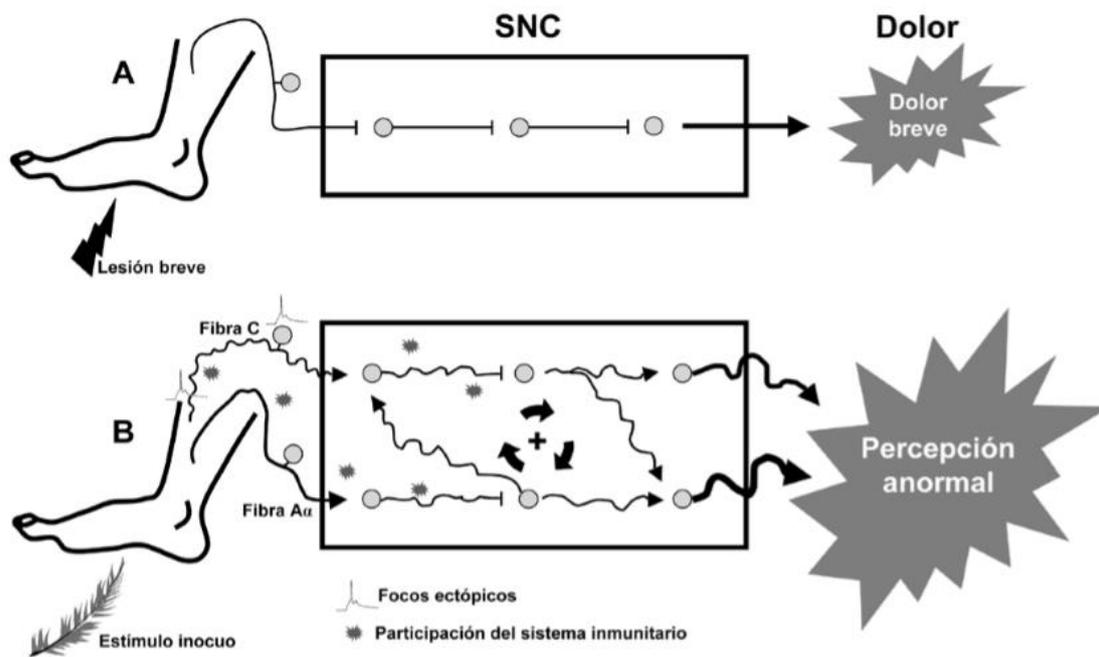


Figura 17. Representación sencilla de la fisiopatología del dolor neuropático (Gómez-Barrios et al., 2009).

2.9.2 Modelos de estudio del dolor neuropático

Para poder comprender los mecanismos que ocasionan dolor neuropático y así poder elaborar tratamientos más efectivos, se utilizan modelos que representan diversas situaciones. En la mayoría se realizan las lesiones en uno de los miembros posteriores, dañando parcialmente nervios periféricos o espinales. Los estímulos utilizados son generalmente térmicos o mecánicos.

Algunos modelos más utilizados son (figura 18):

- Constricción crónica del nervio (CCN) (Bennett et al., 1988). Consiste en la disposición de cuatro ligaduras laxas en el nervio ciático, que bloquean parcialmente la circulación. Se produce una reacción inflamatoria que provoca una pérdida de fibras A y más levemente de fibras C. El dolor aparece a los 4 días y persiste por 2 o 3 semanas (Bridges et al., 2001).
- Modelo de la ligadura parcial del nervio ciático (LPN) (Seltzer et al., 1990). En este modelo se coloca una ligadura más fuerte en el nervio ciático. Da menor inflamación que el anterior, y se pierden 2/3 partes de las fibras (Bennett,

2001). Provoca un dolor de rápida aparición, aunque de semanas o pocos meses de duración.

- Modelo de ligadura parcial del nervio espinal (LNS) (Kim et al., 1992). En este caso se ligan fuertemente L5 y L6, haciendo una sección transversal. La nocicepción es más prolongada y se pierde el 50% de la inervación.
- Modelo de ligadura neural por omisión (LNO) o denervación parcial del nervio ciático (Decosterd et al., 2000). Consiste en la sección transversal del nervio peroneal y el tibial. No se corta el sural. Así se pueden comparar las zonas de piel correspondientes a la denervación y las zonas intactas. Este modelo causa un dolor rápido y mantenido durante más de 6 meses.

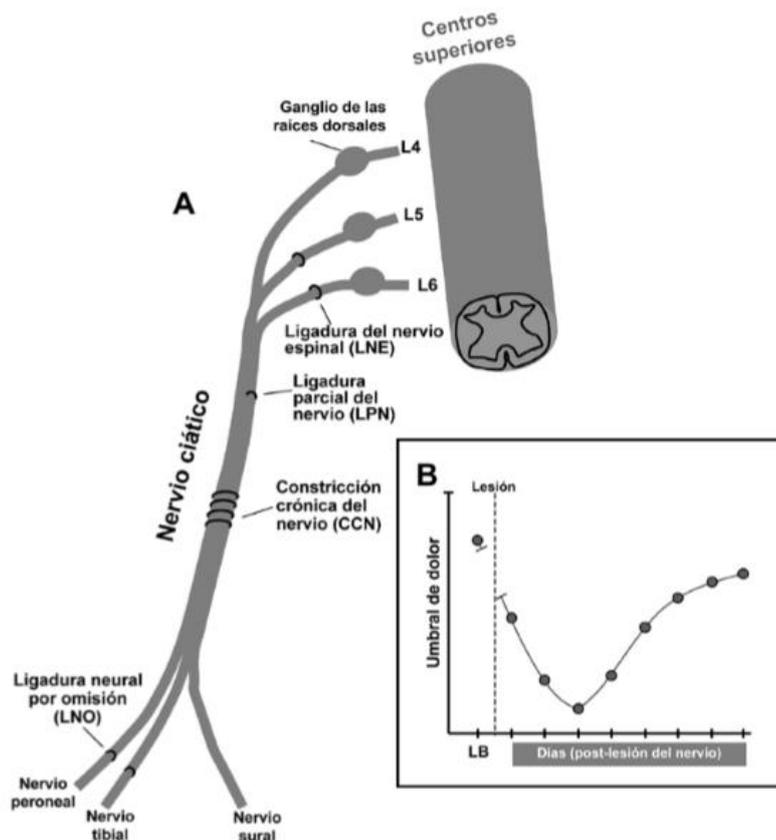


Figura 18. Modelos de estudio del dolor neuropático (A) y progreso del umbral del dolor, desde un gran descenso tras la lesión hasta la recuperación, que es variable según el tipo de daño (Gómez-Barrios et al., 2009).

2.9.3 Mecanismos del dolor neuropático

Los mecanismos no son totalmente conocidos, aunque sí hay ciertas estructuras y procesos que se sabe que están implicados en esta clase de dolor (Colloca et al., 2017)

a) Mecanismos periféricos

Los mecanismos periféricos principales son la sensibilización, cambios en los canales iónicos, cambio fenotípico, denervación sensorial y la influencia del sistema nervioso simpático. En los siguientes párrafos se irán describiendo brevemente.

I. Canales iónicos y mediadores

La sensibilización periférica se adquiere al repetirse el estímulo sobre los receptores nociceptivos. Esto provoca cambios mantenidos en el tiempo en las neuronas aferentes. Al producirse la lesión se liberan en los terminales bradicinina, histamina y serotonina. Estas sustancias aumentan la permeabilidad vascular y dan lugar a la liberación de otros mediadores como las prostaglandinas, citocinas, bradicinina y factores de crecimiento, además provocan, a modo de círculo vicioso, la selección y activación de canales de sodio hiperexcitables.

Por las lesiones en los axones aumenta la expresión de canales de sodio en el soma y las dendritas de neuronas sensitivas y motoras (Hargus NJ. et al, 2007). También estos cambios axonales alteran los factores de crecimiento. Las consecuencias son una disminución del umbral del dolor y/o descargas ectópicas sin una causa concreta. Cada conexión entre una neurona y otra puede consistir en una ampliación de la señal, distorsionando así la sensación nociceptiva (figura 19).

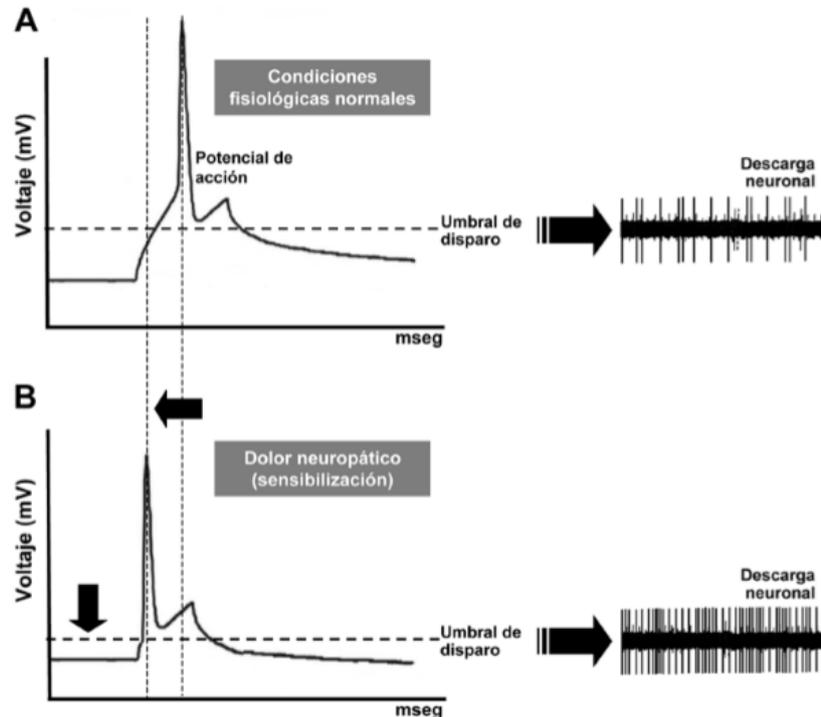


Figura 19. Se aprecia el umbral más bajo en la sensibilización neuropática y con ello, un aumento de los potenciales (Gómez-Barrios et al., 2009).

Los daños ocurridos en las neuronas sensitivas pueden modificar la excitabilidad en fibras vecinas. En relación con la información anterior, los AINES pueden aliviar en ocasiones el dolor neuropático, debido a que, interviniendo en las vías de las prostaglandinas, evitan la formación de mediadores que cambian los nociceptores. Pero al no ser solo a consecuencia de la liberación de las prostaglandinas, sino por toda una serie de diferentes sustancias actuando, el efecto sobre la reducción del dolor no es total, o puede no ocurrir (Cohen et al., 2014).

En este dolor también se observa un aumento de canales iónicos en los terminales dañados y en los ganglios de la raíz dorsal, que disminuyen el umbral y pueden facilitar la sensibilización central (Cohen et al., 2014). Es el caso de algunos canales de sodio. Para ello se utiliza carbamazepina, que bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje, aunque no con gran resultado, puesto que hay algunos subtipos de canales de sodio sobre los que no actúa. En el caso de bloquear en los ganglios de la raíz dorsal los canales de calcio dependientes de voltaje, los fármacos

son más efectivos. Se utilizan los gabapentinoides (Florez, 2007). Además de los cambios en los canales de sodio y calcio también facilita el dolor la disminución de los canales de potasio y la reducción del umbral de los canales receptores transitorios de potencial (Trp).

II. Cambios en el fenotipo

Las fibras C liberan neuromoduladores. Al dañarse las fibras, se puede cambiar la regulación génica que da lugar a que estas sustancias se produzcan en otros tipos de fibras (Cohen et al., 2014).

III. Denervación sensorial

Al dañarse el nervio se produce una atrofia que puede ser responsable tanto de una pérdida de sensibilidad como de un aumento del dolor. En ocasiones el daño da lugar a una discontinuidad entre el axón y el cuerpo celular. La consecuencia es que degeneran ambas partes y se liberan sustancias como factores de crecimiento que pueden crear colaterales de comunicación (Cohen et al., 2014).

IV. El sistema nervioso simpático

El sistema nervioso simpático interactúa con las vías somatosensoriales. En ocasiones pueden encontrarse receptores alfa adrenérgicos en neuronas sensitivas y en el ganglio dorsal. También se produce una afectación del nervio cuando por efecto del sistema simpático se produce vasoconstricción, que hace que le llegue menos oxígeno y se ralentice su metabolismo. En algunas patologías como el síndrome regional complejo, el simpático tiene un poder muy grande. Esto se comprueba al observarse una disminución del dolor con fármacos como la fentolamina, clonidina y otros bloqueantes adrenérgicos (Cohen et al., 2014).

b) Mecanismos centrales

Además de lo explicado anteriormente también existen mecanismos centrales: los espinales y los supraespinales.

I. Canales iónicos y mediadores

Respecto a los mecanismos espinales, la sumación temporal y espacial es fundamental. Se trata de la unificación de los potenciales postsinápticos que la segunda neurona recibe de la primera. También se modifican las vías que comunican la sensibilidad periférica a la central. En todos estos procesos intervienen canales de sodio, potasio, calcio, glutamatérgicos, gabaérgicos, serotoninérgicos y adrenérgicos. Además de receptores de cannabinoides, citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y otros mediadores como la proteína quinasa C (intracelular) (Cohen et al., 2014).

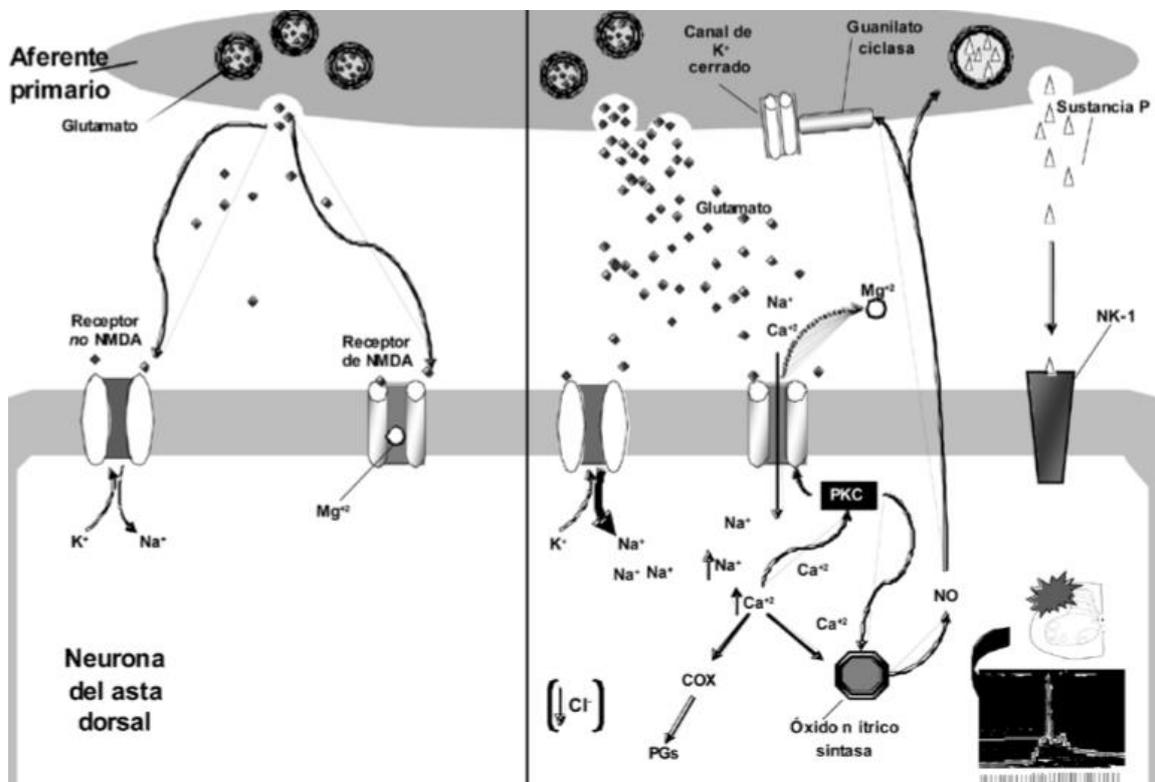


Figura 20. En la primera imagen se muestra la situación normal. El canal de NMDA está bloqueado por el Mg^{2+} . En la segunda imagen se muestra el proceso que ocurre en el dolor neuropático, descrito en el texto (Gómez-Barrios et al., 2009)

Por la emisión de potenciales ectópicos, frecuentes e intensos, se produce una liberación de glutamato y sustancia P en el asta dorsal de la médula. La sustancia P activa receptores NK1 y NK2, relacionados con la hipersensibilidad al dolor (Sandkühler et al., 2007). El glutamato liberado en estos casos activa a receptores AMPA y Kainato, de una forma masiva, causando una despolarización tal que la gran entrada de Na^+ ,

evita el bloqueo del canal NMDA por parte del Mg^{+2} . Por lo tanto, el calcio entra incesantemente, produciéndose una despolarización aún mayor y más duradera. El calcio también activa proteincinasas, que pueden fosforilar diferentes sustratos, que ayudan a mantener este estado de despolarización. Estos mecanismos fomentan la cronicidad del dolor (Sandkühler et al., 2007)(figura 20).

El aumento que se observa de los receptores de NMDA, se puede prevenir con la administración de su antagonista, la memantina. En modelos con diabetes se observó un aumento masivo de estos receptores, por lo que puede ser una razón para la aparición de este fenómeno en pacientes diabéticos. Una respuesta semejante se observó en animales con polineuropatía alcohólica. Además, al dañarse la médula espinal, en ocasiones, se producen fallos en los transportadores de glutamato, que aumentan la concentración de glutamato en ese territorio, de forma que la activación de los receptores se perpetúa.

II. Sistema inmunitario y mediadores

Las interleucinas 6 y 1β y el $TNF-\alpha$, que se liberan en el daño neuronal, a nivel central o periférico, actuando con mediadores como la PKC (proteína quinasa C) y la $3',5'$ -cAMP (adenosín monofosfato $3'5'$ cíclico), promueven el dolor. Al ser producidas por microglía y astrocitos, elevan los niveles de glucocorticoides y activan los receptores de glutamato. El resultado es un aumento de la excitación espinal. La IL 1β tiene un papel en el miedo condicionado, por lo que se piensa que participa también en la dimensión emocional del dolor (Cohen et al., 2014).

Cuando se produce una lesión neuronal, en las primeras 24 horas y hasta semanas después se activan las células de la microglía y luego los astrocitos. Los astrocitos producen prostaglandinas, citocinas y neurotransmisores excitadores, y la microglía estimula las vías del complemento y libera citocinas, quimiocinas y sustancias tóxicas para las células como los radicales libres (Cohen et al., 2014). En el daño neuronal aumenta la población de microglía en los ganglios dorsales y cordones posteriores. Normalmente solo son un 20% de todas las células de la glía (Cohen et al., 2014).

III. Reorganización central de las vías aferentes

Los potenciales de acción de alta frecuencia e intensidad, al llegar a la médula, en el asta posterior, dan lugar a una reorganización de las sinapsis dendríticas y apoptosis neuronal específica (Sandkühler et al., 2007). Esto significa que la distribución de las aferencias en el asta posterior, que es diferente según los estímulos que transmitan, puede verse modificada en estas situaciones (Polgar et al., 2004). A lo largo de toda la vía nociceptiva se producen cambios. En el tálamo también se produce esta modificación de las conexiones, así como en la corteza, donde se expande la región activada por el dolor.

IV. Pérdida de la inhibición

Añadido a todos los procesos anteriores que aumentan la excitabilidad de la vía nociceptiva también ocurre una pérdida de mecanismos inhibitorios. Cuando se producen lesiones de las fibras C, los niveles de GABA de las interneuronas inhibitorias de la médula se ven reducidos. También descienden los niveles de Serotonina y NA en las vías moduladoras descendentes. Por esto los receptores AMPA y Kainato están muy activos y se potencia la excitación (Li et al., 1998). Además se ha observado un descenso de receptores opioides tipo mu en el ganglio dorsal, lo que explica también la reducida eficacia de los opioides en estos pacientes.

2.9.4 Resumen de los síntomas y su origen

Según los síntomas se puede resumir a de forma sencilla el mecanismo principal que lo causa. La parestesia y la disestesia son causados por potenciales ectópicos en las fibras A beta mielinizadas. El dolor ardiente continuo se debe a la sensibilización periférica, descargas ectópicas en las fibras C, y pérdida de la inhibición. El dolor paroxístico o lacinante es debido a la estimulación ectópica por activación de canales de Sodio voltaje dependientes en las fibras C. Otros síntomas consisten en alteraciones del sueño. En estos pacientes la calidad del sueño se ve reducida. Esto se relaciona con una intensidad mayor del dolor. En concreto, en la fibromialgia la fase I es más larga, mientras que el resto se ven acortadas. Los trastornos psicológicos y de anticipación se producen al asociarse el dolor con estímulos inocuos. Esto puede dar lugar a una reorganización cortical, que cause sensación de dolor ante estímulos, en principio, no dolorosos.

3. EPIGENÉTICA Y DOLOR NEUROPÁTICO

Tras comprender los mecanismos del dolor y de la epigenética, en este apartado se explicarán los mecanismos

3.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es específica para cada tejido y forma regiones DMR (Differentially methylated regions). Se han descrito regiones DMR que según si son metiladas se asocian a una diferente sensibilidad al dolor.

A continuación, se explicarán casos y regiones en las que, por medio de la metilación, participan en el dolor neuropático.

Existen complejos de unión a ADN dependiente de la metilación, como la proteína 2 de unión a metil CpG (MeCP2). Esta molécula es un represor transcripcional, que se une a genes específicos, en sitios metil CpG en el ADN. Al fosforilarse, no se puede unir a esas regiones promotoras y por tanto se mantiene la expresión génica (Chang et al, 2003). También se ha descrito la promoción de la expresión genética por medio de la unión a 5 Hidroximetilcitosina. Utilizando como modelo ratas a las que se les inyectó CFA, una sustancia que promueve la activación del sistema inmune y el dolor, se observó un aumento de la fosforilación de MeCP2 en las láminas I y II del asta dorsal. Esto hizo que genes normalmente suprimidos se expresasen, y se pudiese asociar el umbral del dolor con los niveles de MeCP2 (Fratto et al., 2008).

En cuanto al cáncer, también la metilación del ADN tiene su papel. El cáncer es una causa importante de dolor crónico. En él se observa una hipermetilación de las islas CpG, y se ha relacionado con el dolor crónico. La potenciación en la secreción de endotelina 1 se ha asociado en neoplasias malignas con el dolor inducido por el cáncer. La acción nociceptiva de esta sustancia se debe a su unión con receptores de endotelina 1A, mientras que los receptores 1B son antinociceptivos. Esto se observó en un estudio con pacientes fallecidos por carcinoma, que mostraron una metilación aumentada en las regiones promotoras del gen de la endotelina 1B (antinociceptiva) en las lesiones dolorosas del carcinoma escamocelular oral, en cambio en lesiones de displasia no dolorosas no fue así (Dang et al., 2011). Además, en un modelo con

ratones, al restaurarse el receptor de la endotelina 1B al nivel basal, el comportamiento doloroso cesó, por lo que puede ser un nuevo enfoque para el tratamiento del dolor asociado al cáncer.

Otro estudio mostró, en modelos de dolor neuropático inducido por lesión del nervio ciático, que muchas de las regiones DMR (72%) en linfocitos T sanguíneos y la corteza prefrontal se podían superponer. Esto nos muestra que podría ser viable la medición de los niveles de metilación de los linfocitos T como biomarcador en el dolor neuropático. Sin embargo, solo un 43% de los promotores se alteran en la misma dirección en ambos tejidos y, por ello, se necesita un análisis cuidadoso de los patrones de metilación específicos para el tejido a comparar y así poder correlacionarlo adecuadamente con la intensidad del dolor (Dymov et al. 2016).

Con los recientes avances en la materia ahora podemos contar con una extensa y precisa biblioteca de análisis epigenético, que nos permite conocer un poco mejor las regiones y los mecanismos epigenéticos que influyen en la hipersensibilidad neuropática.

3.2 Modificaciones en las histonas

3.2.1 Metilación de histonas

En los estudios en los que se inducía dolor por la ligadura parcial del nervio ciático, más que observarse cambios en la metilación del ADN, se observaron diferencias relevantes en la metilación de histonas.

a) Metiltransferasa G9a

La metilación de histonas en genes que codifican canales dependientes de voltaje (Kv1.4, Kv4.2 y Kv7.2) y canales de K^+ activados por Ca^{+2} influye en el dolor. Así, tras provocar daño en un nervio en ratas, mientras que la metilación de ADN permanecía intacta, aumentaba la metilación de histonas H3 (H3K9me2) del promotor de los genes que codifican canales de K^+ en el ganglio de la raíz dorsal, resultando en un descenso de los canales, y relacionándose con hipersensibilidad. Este proceso está mediado por la dimetiltransferasa G9a. A consecuencia, la inhibición de G9a

normalizaba la expresión de los canales de K⁺ y atenuaba así la hipersensibilidad (Chen et al.,2015).

Se ha descrito que la metiltransferasa G9a metila también al promotor del gen del receptor opioide μ (MOR), que se activa con opioides como la morfina. El descenso de los MOR inducido por dolor está asociado con niveles elevados de metilación de las histonas en su promotor. Al utilizar bloqueantes de G9a se restauran los niveles de MOR y potencian la analgesia inducida por los opioides. Por estas dos acciones en las que participa G9a, los bloqueantes son una forma de prevenir la cronificación del dolor neuropático y mejorar la eficacia del tratamiento con opioides (Zhang et al., 2016).

b) Metilación del promotor de MCP3

Asimismo, las modificaciones en las histonas pueden influir en las interacciones astrocito-microglía. Se pudo describir un aumento de la expresión de la proteína quimiotáctica monocítica 3 (MCP3), que es una citocina proinflamatoria, en la médula espinal y sólo en los astrocitos. Al mismo tiempo, se describió una reducción de metilación en H3 (H3K27me3) en el promotor del MCP3. Esta teoría se comprobó administrando anticuerpos antiMCP3, resultando ello en una disminución de la hipersensibilidad inducida por neuropatía. A consecuencia, se podría considerar como nuevo objetivo terapéutico la activación de microglía mediada por hipometilación de histonas del promotor de MCP3. En la figura 21 se puede ver más claramente cómo la expresión de quimiocinas está modificada epigenéticamente y los cambios que pueden provocar en estructuras del sistema nervioso.

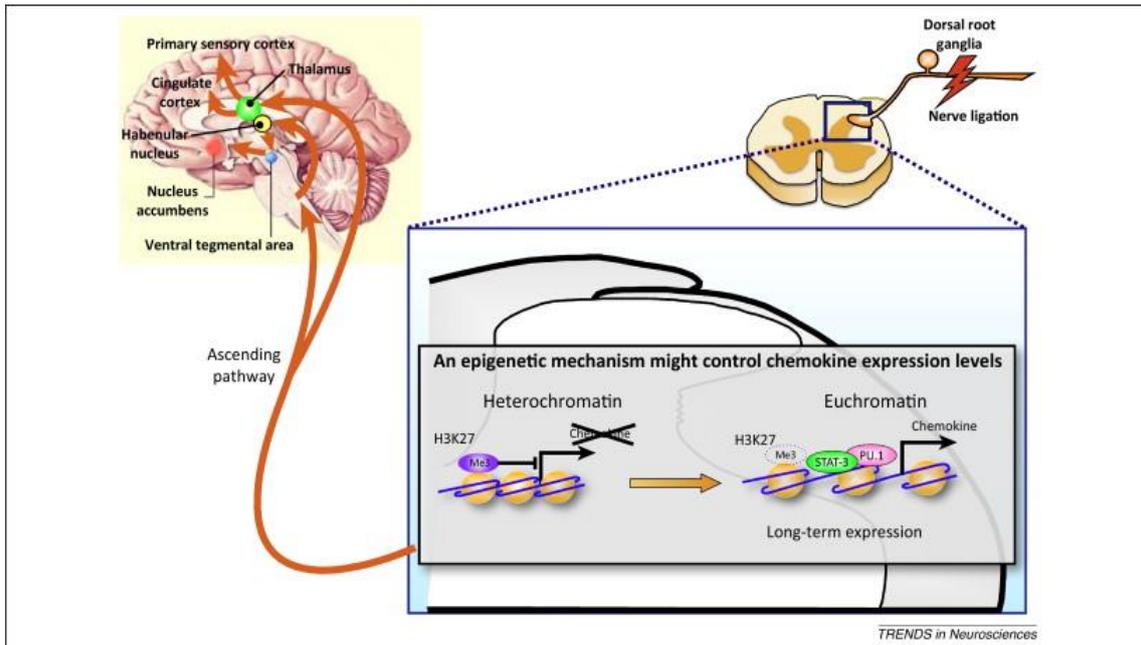


Figura 21. El aumento de la expresión a largo plazo de las quimiocinas puede producir modificaciones en la médula espinal y por tanto un papel crucial en los mecanismos del dolor crónico. La lesión nerviosa activa los nociceptores aferentes primarios, que transmite la información al asta dorsal de la médula. La activación de neuronas secundarias en las vías espinales por esta acción mantenida de las quimiocinas puede inducir modificaciones epigenéticas que producen sensibilización central (Descalzi et al., 2015).

c) EZH2

Otra de las moléculas cuyo papel en el dolor se ha descrito ya, es la histona metiltransferasa EZH2 (Potenciador de Zeste homólogo), que es una subunidad del complejo represivo 2 Polcomb. Cataliza la metilación de la lisina 27 en H3. Los niveles de EZH2 y la histona trimetilada H3K27 en el asta dorsal de la médula se vieron incrementados en ratas a las que se les provocó dolor neuropático. Se expresa también en neuronas del asta dorsal en condiciones normales, pero en cantidades mucho más pequeñas.

Estudios previos han mostrado que EZH2 juega un papel importante en el control de la diferenciación y proliferación de neuronas, astrocitos y oligodendocitos y previene el fin prematuro de la neurogénesis en el cerebro en desarrollo. Está implicado en la producción de citocinas y células de proliferación en enfermedades como artritis reumatoide o cáncer de mama. El aumento drástico de la población de

microglía y su activación, a la par que la elevación de los niveles de EZH2, nos hace pensar en una relación entre ellos. Además, también se observó un aumento en TNF- α , IL-1 β y MCP-1.

El aumento global de H3K27me3 y EZH2 en el ganglio dorsal de las ratas se asoció a la supresión de canales de potasio en las neuronas sensitivas. En el estudio no solo se vio que con los inhibidores de EZH2 se prevenía el desarrollo de dolor neuropático, sino que se atenuaba el dolor neuropático preexistente, los niveles de EZH2 y H3K27me3 volvieron a la normalidad, y se suprimió la neuroinflamación. A pesar de todo, los mecanismos por los que regula la neuroinflamación aún no están del todo claros, sin embargo, un gen que se sabe que es reprimido por EZH2 es p16, una proteína reguladora del ciclo celular. Por tanto, regula negativamente la inflamación y la proliferación celular.

3.2.2 Acetilación de histonas

a) Desacetilación de histonas como promotora del dolor

S. No.	Target	Effect	HDAC inhibitor/ HAT inhibitor	References
1.	Serum glucocorticoid-inducible kinase-1 (SGK)	Cytoplasmic retention of 14-3-3 β - histone deacetylase 4 complex	GSK-650395 (SGK inhibitor), LMK-235 (HDAC-4 inhibitor)	Lin et al., 2015
2.	Tumor necrosis factor- α	\uparrow TNF- α and other inflammatory mediators	Sodium butyrate (non selective HDAC inhibitors)	Kukkar et al., 2014; Lin et al., 2006
3.	Metabotropic Glutamate receptors-2 and glutamate transporters	Increase in the expression of mGlu ₂ receptors; glutamate-aspartate transporter (GLAST) and glutamate transporter-1 (GLT-1)	mGlu _{2/3} receptor antagonist (LY341495; sodium valproate)	Chiechio et al., 2009; Hobo et al., 2011
4.	Neuron restrictive silencer factor	\downarrow Transcription of Na _v 1.8 genes on C-fibers; reduction in mu-opioid receptor expression	Non selective HDAC inhibitors	Matsushita et al., 2013; Uchida et al., 2010
5.	Glutamic acid decarboxylase 65	\downarrow GABAergic transmission	Non selective HDAC inhibitors	Zhang et al., 2011; Knabl, 2008

Tabla 2. Mecanismos involucrados en la desacetilación de histonas que causan dolor (Khangura et al., 2017).

I. Quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK 1)

SGK1 es una molécula con un importante rol en la respuesta al estrés. Ante el dolor se activa la SGK1, y a consecuencia se produce la fosforilación de la HDAC 4, lo que provoca que quede retenida (la HDAC 4) en el citoplasma y no pase al núcleo de las neuronas del asta dorsal. En el mismo estudio se aplicaron inhibidores de SGK1 y de la HDAC 4, lo que indicó que ambas modificaban la sensibilidad al dolor pero que la HDAC4 estaba aguas abajo en el proceso, ya que su inhibidor no modificaba los otros componentes de la ruta, pero sí aliviaba el dolor.

II. Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Es una molécula liberada principalmente por macrófagos y otras células del sistema inmune, que media la inflamación. Varios estudios demuestran el papel que ejerce el TNF- α en la sensibilización central y el dolor neuropático. Al administrarse inhibidores de la histona desacetilasa se observó una disminución de TNF- α y otros mediadores inflamatorios, lo que atenuó el dolor.

III. Receptores metabotrópicos de glutamato 2 y transportadores de glutamato (mGlu2)

Los receptores mGlu2 se encuentran en células gliales y neuronas del sistema nervioso central. El estudio de Chiechio S et al 2009. demostró que el tratamiento con inhibidores de la histona deacetilasa (aumentan la acetilación), induce la sobreexpresión de mGlu2, en los ganglios de la raíz dorsal y la médula, disminuyendo el dolor inflamatorio. Al utilizar una antagonista de mGlu2 aumentó la sensibilidad al dolor, mostrando que mGlu2 está involucrado.

También en relación con el Glutamato se han hecho estudios sobre la expresión del transportador de glutamato-aspartato (GLAST) y de Glutamato 1 (GLT1). Ambos están en los astrocitos, aunque GLT1 juega un papel más importante en la regulación del glutamato extracelular en la médula y el cerebro. La regulación negativa de ambos transportadores en el asta posterior de la médula dan lugar a dolor (Sung et al., 2003). Se demostró que al tratar con valproato se recuperaron los niveles normales de los transportadores y el dolor se fue reduciendo. El riluzol y el valproato se pueden usar

sinérgicamente, pues el valproato restaura la expresión de los transportadores de glutamato y el riluzol los activa y aumenta la captación de glutamato (Frizzo et al., 2004).

Como conclusión importante al apartado, la acetilación de histonas regula positivamente los receptores mGlu2 y los transportadores para atenuar el dolor, mientras que al inhibir la acetilación se causa mayor sensibilidad al dolor.

IV. Factor silenciador neuronal restrictivo (NRSF)

Esta molécula tiene una función represora que por diversos mecanismos puede participar en el dolor neuropático. Los mecanismos son variados, por lo que más adelante en este trabajo se describirá con mayor detalle su papel en el dolor neuropático.

V. Descarboxilasa de Ácido Glutámico 65 (GAD 65)

Su función principal es la participación en la síntesis de GABA. En cuanto al dolor, en la lesión del nervio periférico se induce el dolor al perder su actividad la GAD65, lo que produce una restricción de la inhibición GABAérgica. Eso se asoció con una hipoacetilación de H3 y H4 en el núcleo del rafe, que causa una persistencia de la sensibilización en ratas (Zhang et al., 2011).

b) Acetilación de histonas como promotora del dolor

Sobre este proceso no se dispone de tanta información. Pero se han descrito una serie de mecanismo que se explican a continuación.

La acetilación de histonas aumenta la producción de citoquinas y quimiocinas, muy importantes en la génesis del dolor. Se mostró que la expresión del ligando de quimiocinas CXC tipo 2 y el receptor de quimiocinas CXC tipo 2 estaba aumentado en neutrófilos y macrófagos de los nervios dañados. Esto pudo revertir con la inyección perineural del anticuerpo antiMIP2. El aumento del eje MIP2/CXCR2, que se ha visto que puede deberse a la hiperacetilación de H3 en el promotor de MIP2 y CXCR2, puede inducir neuroinflamación crónica que da como resultado dolor neuropático. Otro mecanismo se relaciona con la sobreexpresión de COX2 en el nervio lesionado. Se demostró en relación con el aumento de COX2 un aumento de p300, que es una HAT,

en la médula espinal. Al inhibir la p300 se redujeron la expresión tanto de la p300 como de COX2.

3.2.3 Aplicación al tratamiento

a) El ejercicio físico y el dolor neuropático

Según Kami et al, 2017, el ejercicio ayuda a aliviar el dolor neuropático. El ejercicio físico previene la disminución de la síntesis de GABA en el núcleo ventromedial y el asta dorsal de la médula. También disminuye la actividad de la HDAC1 en la microglía activada del asta dorsal, y el incremento de la acetilación de H3K9, que puede aumentar la transcripción de citocinas antiinflamatorias como IL10 (Figura 22).

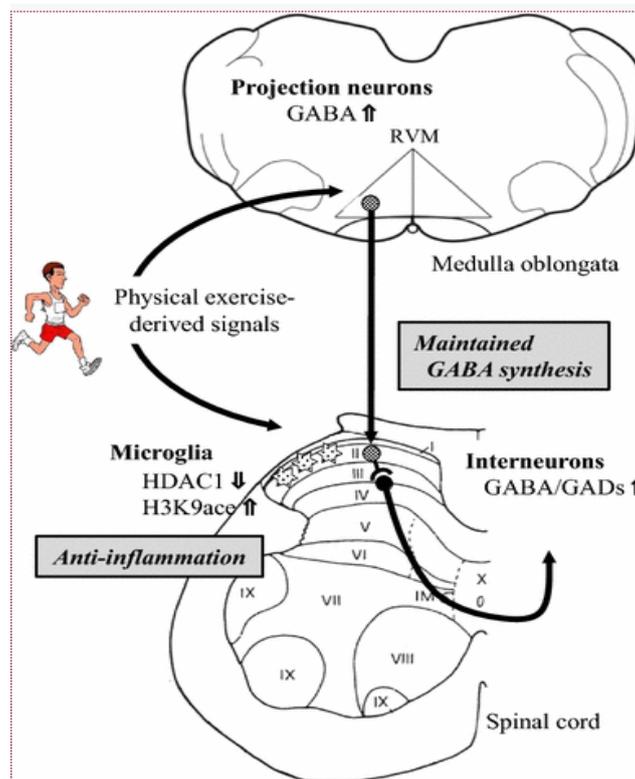


Figura 22. Mecanismos de la hipodalgia inducida por el ejercicio físico (Kami et al., 2017).

b) Resveratrol

El uso de morfina a largo plazo lleva a la activación de los receptores de CGRP (Péptido relacionado con el gen de calcitonina), que controlan la síntesis y liberación de TNF- α por los astrocitos y microglía. El bloqueo de CGRP previno la liberación de TNF- α y así la tolerancia. Asimismo, la morfina administrada crónicamente induce la activación glial y la expresión de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y IL-6 en la médula espinal. La inyección intratecal del resveratrol restaura el efecto analgésico de la morfina en ratas tolerantes a morfina, revirtiendo el aumento de HDAC1 observado en la médula de estas ratas, y lo mismo con el aumento de la citocina proinflamatoria TNF- α en el asta dorsal de la médula. Se observó además un descenso de la activación astrocitaria y de microglía. La terapia con resveratrol puede, por tanto, ser efectiva de forma adyuvante en pacientes con dolor neuropático, o que necesiten morfina a largo plazo.

c) Inhibidores de la HDAC

Después de la ligadura del nervio espinal se producen algunos cambios en el asta dorsal, como el aumento de la HDAC1 y la reducción de la acetilación en H3. Tras la administración intratecal de Baicalin, un inhibidor no específico de HDAC, se aliviaron la hiperalgesia y la alodinia mecánica. Igualmente, se revirtieron las adaptaciones relacionadas, como la reducción de la acetilación de la histona H3 y el aumento de la expresión de HDAC1 (Cherng et al., 2014).

Aunque los inhibidores de la HDAC que se utilizan son inespecíficos, se está tratando de buscar tratamientos más específicos de determinados enzimas y así evitar tanto como sea posible los efectos indeseables asociados. Además de las histonas, muchas proteínas y factores de transcripción pueden ser regulados por la acetilación y servir como dianas de HDAC, dando vías alternativas por las que los inhibidores de HDAC modulan la nocicepción.

Por lo tanto, los inhibidores de HDAC I pueden ser herramientas útiles para tratar ciertos dolores inflamatorios, dirigiéndose a las Histonas, o acetilando otras estructuras a nivel espinal. Otro punto positivo es que, según los estudios, estos fármacos producen menos tolerancia analgésica a comparación de los actuales

tratamientos. Hay casos como en los fármacos que se basan en la activación de mGlu2m, que pese a que son efectivos, muestran una rápida tolerancia (Cherng et al., 2014).

La acetilación de histonas también tiene un papel en otras redes endógenas del control del dolor. Los receptores mu opioides (MOR) y los canales Nav1.8 se reducen en el dolor neuropático y están relacionados con cambios de las histonas, como la acetilación de H4 en la región promotora II de NRSF.

3.3 RNA no codificante

Algunos miARNs participan en la analgesia, y están reducidos en el dolor neuropático. Un ejemplo es el miR-7a, que suprime la excitabilidad neuronal del ganglio dorsal actuando contra la subunidad $\beta 2$ de los canales de Na^+ voltaje dependientes. MiR-183 ejerce analgesia actuando en los canales Nav1.3 y BDNF en el ganglio dorsal (Lin et al, 2014). Igualmente, miR-146a5p, administrado por vía espinal, reduce también la sensibilidad al dolor, suprimiendo el factor 6 asociado al receptor de TNF, que media la señalización de $\text{TNF-}\alpha$.

En la médula espinal, los cambios a largo plazo asociados a la sensibilización al dolor suelen ser inducidos por cambios en la transmisión sináptica y requieren la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs). Se ha investigado por este lado, dado que en determinadas condiciones la prevención de la activación de VGCC mejora el dolor crónico. Se han relacionado con algunos miARNs, por ejemplo, se ha observado en el asta dorsal de ratas con ligadura del nervio espinal, una regulación positiva de las subunidades Cav1.2 de tipo L (VGCCs) en relación con una disminución en miR-103. Tras la inyección de CFA (coadyuvante de Freud), un inductor inflamatorio y del dolor, en el músculo masetero de unas ratas, se observaron disminuciones significativas de varios miARNs, como miR-134. Esta disminución se correspondió con un aumento de MOR, implicado en las vías analgésicas endógenas. Todos estos estudios indican que, utilizando los miARN mencionados, se puede tratar el dolor neuropático.

Por otra parte, existen también miARNs que inducen al dolor, y cuya inhibición nos puede servir para mejorar los síntomas. Un ejemplo de ello se describió tras la administración intratecal de IL-1B en ratas que les provocó alodinia. Ello se acompañó de aumentos de miR-21 en el ganglio dorsal de la médula. IL-1B, también regula HAT y HDAC en algunos tejidos (Ito et al.,2000).

Los modelos de dolor neuropático también nos han revelado cambios selectivos en el tiempo y el tejido en cuanto a la expresión de miARNs. Un ejemplo de esto representa el resultado de la ligadura del nervio espinal L5, que causó un aumento de miR-21, de forma tardía, entre los 7 y los 14 días tras la lesión. A diferencia de miR-195 que aumenta en el ganglio dorsal y en el asta posterior, desde el segundo día tras la ligadura, y persiste por al menos 14 días más. MiR-195 aumenta en la microglía espinal, lo que se asociaba con una disminución de la autofagia microglial y una mayor sensibilidad dolorosa. Su acción es resultado de actuar sobre el gen ATG14 que regula la autofagia de forma inversamente proporcional a los niveles de este miARN. También se ha observado que el miR-221 ejerce influencia al aumentar las citocinas proinflamatorias.

A la hora de modificar la acción de estos miARNs se trató de modificar la acción de Dicer, el enzima implicado en el procesamiento de miARN. La delección de Dicer resultó en una gran reducción de las conductas de dolor inflamatorio en ratones, manteniendo a la vez la sensibilidad nociceptiva aguda (Bai et al., 2007).

3.4 NRSF

La molécula NRSF es muy interesante respecto a este tema, porque es un factor de transcripción que influye en el dolor neuropático de diversas maneras, utilizando los mecanismos epigenéticos anteriormente descritos. El NRSF es una proteína de unión al ADN que contiene Zinc, que media la represión transitoria y a largo plazo de la transcripción de genes neuronales. NRSF interacciona con los complejos correpresores SIN3A/B y CoREST, que modifican epigenéticamente las regiones diana a través de enzimas modificadoras de cromatina, como las HDAC1/2, LSD1 (histona demetilasa) y la metilasa de histonas G9a. NRSF es un regulador del destino de las neuronas, además tiene importantes funciones en algunas enfermedades neurales.

En el desarrollo, se expresa con altos niveles en tejido no nervioso y suprime la especificación hacia tejido nervioso mediante la represión de la transcripción genética. A diferencia del tejido no nervioso, los niveles de NRSF son mucho más bajos en células progenitoras embrionarias y adultas del tejido nervioso, y su expresión disminuye a medida que se va diferenciando. NRSF se expresa a niveles bajos en ciertas regiones cerebrales. Los niveles aumentan en ciertas patologías, como en el infarto isquémico, donde se reprimen genes importantes para la transmisión sináptica y fomenta la muerte neuronal. También aumenta en algunos cánceres como el glioblastoma.

El Remifentanilo, un opioide sintético de acción corta muy utilizado como anestésico, puede provocar hiperalgesia postoperatoria, y se ha observado que provoca el aumento de expresión de NRSF en la sustancia gris periacueductal. Lo que se asocia con un descenso del tiempo de latencia en respuesta a estimulación térmica y mecánica. Se observó que con el aumento de NRSF se reprimía la transcripción de Oprm1 (codifica el receptor opioide mu) (Kim et al., 2004).

El dolor se asocia también a un aumento de NRSF en el sistema nervioso periférico, y se puede mantener hasta semanas después del daño. Esos niveles aumentados reprimen a Oprm1, Kcnd3, Kcnq2 y Scn10a, que codifican respectivamente los canales Kv 4.3, Kv 7.2 y Nav 1.8. La represión de estos genes se asocia a una disfunción de las fibras C y la interrupción de corrientes de potasio de tipo M, que facilitan la excitabilidad neuropática de las fibras sensitivas periféricas (Uchida et al., 2010). Para los genes objetivo de NRSF como Kcnd3 y Scn10a, el dolor persistente está asociado a hipoacetilación de las regiones genómicas que rodean los sitios de unión de NRSF. Los inhibidores de HDAC aminoran el dolor neuropático, al menos en parte, impidiendo la remodelación de la cromatina y la represión de la transcripción por NRSF.

Se examinó si la expresión de la descarboxilasa de ácido Glutámico 2 (Gad2) en el rafe magnus se regula también por la NRSF. Las neuronas inhibitoras GABAérgicas del rafe magnus son importantes en la supresión de la facilitación descendente del dolor.

En estudios con ratones disminuían los niveles de acetilación de las histonas en el promotor de Gad2, y se reprimía su expresión (Zhang et al., 2011). Esta represión se asocia con el reclutamiento de HDAC 1-2 al promotor de Gad2. El promotor de Gad2 interacciona con NRSF y sus correpresores SIN3A y HDAC2. Esto nos muestra que al unirse NRSF a la secuencia promotora de Gad2 puede relacionarse con la represión de Gad2 presente en el dolor neuropático.

NRSF tiene efectos represivos en varios genes. Para modificar su expresión se une al inicio o dentro de intrones. NRSF va asociado a un complejo correpresor en el cual, entre otros, se incluyen, como ya se mencionó anteriormente, SIN3A, CoREST y HDAC1/2. La represión de los genes diana no solo se puede explicar por la acción represora de NRSF, muchos genes aumentados en el dolor neuropático muestran lugares de unión con este NRSF, por ejemplo, Gabra5 (subunidad $\alpha 5$ del receptor GABAA), Cacna2d1 (canal de calcio voltaje dependiente con voltaje tipo L) y Vip (péptido intestinal vasoactivo).

La represión en el caso del dolor neuropático es selectiva y depende también de otros factores. La fosforilación de MeCP2 inducida por el dolor representa uno de ellos (figura 23). MeCP2 es una proteína de unión a ADN metilado que recluta correpresores entre los que se incluyen HDACs, y también CoREST. Cuando MeCP2 se encuentra fosforilado, disminuye su afinidad por el ADN metilado.

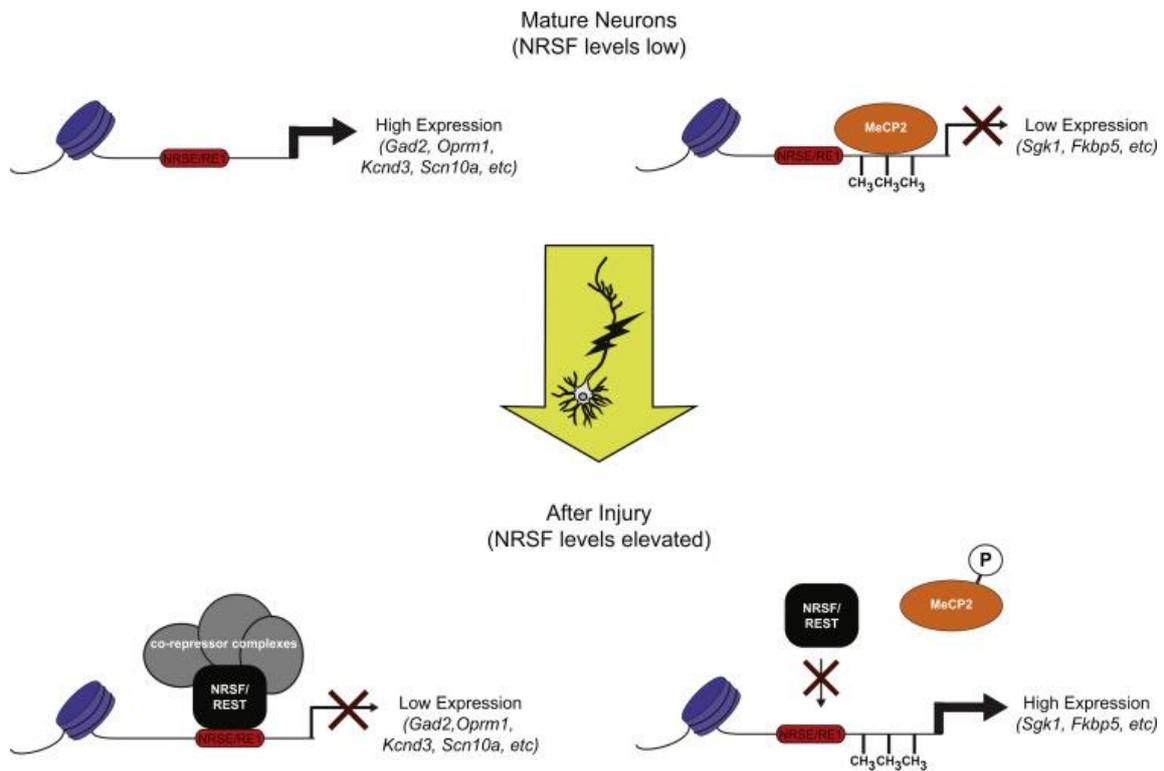


Figura 23. Diferentes respuestas a NRSF en genes diana (Willis DE. et al., 2016).

En las neuronas maduras no lesionadas el NRSF se encuentra en niveles bajos, por lo que hay una alta expresión de sus genes diana, como Gad2 y Oprm1. Aunque puede ocurrir en algunos otros genes diana de NRSF, que otros represores sí actúen en ellos, como es el caso de MeCP2, y entonces los niveles de éstos sean bajos. Es el caso de Sgk1 y Fkbp5 entre otros.

Cuando ocurre un daño al nervio, los niveles de NRSF se elevan y por tanto al unirse a sus dianas, éstas reprimen su transcripción. En la lesión del nervio también actúa como regulador el MeCP2 que en este caso es fosforilado y por tanto su afinidad por el ADN metilado disminuye, entonces no reprime los genes que reprimía cuando no había lesión. Hay excepciones, pero aún no se conoce por qué en algunos genes la regulación de NRSF es insuficiente para reprimirlos, si MeCP2 está fosforilado y no puede hacerlo, y en cambio en otros genes sí puede reprimir en estas condiciones.

CONCLUSIONES

La evidencia científica de las investigaciones mencionadas anteriormente nos muestra una relación entre varios mecanismos epigenéticos y el dolor neuropático. A pesar de todo, los descubrimientos son bastante dispersos y no todo lo que se ha observado en modelos puede aplicarse al ser humano y paliar los síntomas. Existen fármacos como los inhibidores de la HDAC que actúan en muchas dianas, por ello se producirían muchos efectos secundarios indeseables. Aún hay que avanzar en la investigación y encontrara sustancias que actúen en las dianas que nos interesan. La complejidad de estos procesos es muy grande ya que se solapan muchos mecanismos distintos que influyen unos sobre otros y además afectan a citocinas y poblaciones celulares, como los macrófagos. No siempre el dolor neuropático ocurre por las mismas causas en todos los pacientes o en algunos casos unos procesos son más importantes que otros y no siempre funciona igual. Debido a ello, el tratamiento debería ser específico para cada caso. Aún queda un largo camino que recorrer en este campo, pero los resultados demuestran un futuro prometedor de cara al desarrollo de fármacos más eficaces.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranda Moratalla J. Estudio computacional de ADN-Metiltransferasas. Análisis del mecanismo epigenético de metilación del ADN. [tesis doctoral en Internet]. Valencia: Universitat de València; 2015. 268p: 1-31.
- Araya Quezada, M; Bascuñán Gamboa, KA.; Pérez Bravo, F. MicroRNAs, mecanismo epigenético para estudiar la enfermedad celiaca. *Revista española de enfermedades digestivas* [revista en Internet]. 2014; 106 (5):325-333.)
- Ayala Ramírez PA, García Robles R, Perdomo Velásquez B. SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud*. 2012; 10 (1): 59-71.
- Bai G, Ambalavanar R, Wei D., et al. Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain. *Mol. Pain*. 2007; 3(1):15.
- Baron R, Maier C, Attal N, et al. Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. *Pain*. 2017; 158(2): 261–272.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009; 139(2):267-84.
- Beck C. Epigenética: La herencia es más que la suma de los genes. *Bio-max Sociedad Max Planck*. Munich. 2010; 23: 1-4.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988; 33: 87-107.
- Bennett GJ. *Animals Models of Pain. Methods in Pain Res* . CRC Press LLC. 2001; pp. 68-87.
- Bouhassira D. Pharmacotherapy of neuropathic pain: which drugs, which treatment algorithms?. *Pain*. 2015; 156: 104-14.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*. 2006; 10(4):287-333.
- Bridges D, Thompson S, Rice A. Mechanism of neuropathic pain. *Bri J Anaesth*. 2001; 87:12-26.
- Camarena Camacho MA, Cervantes Rodríguez S , Pinto Gutiérrez R, et al. ADN, una ventana para admirar el código de la vida. Instituto Cultural Copán. Naucalpan de Juárez, México (Trabajo teórico-experimental en línea). 2016 Feb. Pg 6.
- Chang Q, Chen WG, Greenberg Michael E. et al. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*. 2003 Oct ;302(5646):885–9.
- Chen SR, Garriga J, Laumet G et al. G9a is essential for epigenetic silencing of K+ channel genes in acute-to-chronic pain transition. *Nat Neurosci*. 2015 Dic;18(12):1746–55.

- Cheng, X., Hashimoto H, Horton JR, et al. Mechanisms of DNA methylation, methyl-CpG recognition, and demethylation in mammals, In Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics Oxford: Academic Press. 2010; pp 9-24
- Cherng C-H, Lee K-C, Chien C-C et al. Baicalin ameliorates neuropathic pain by suppressing HDAC1 expression in the spinal cord of spinal nerve ligation rats. J. Formos. Med. Assoc. 2014; 113: 513–520
- Chiechio S, Zammataro M, Morales M.E et al. Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain. Mol Pharmacol. 2009 May ;75(5):1014–20.
- Chuang, Jody C., Jones P A. Epigenetics and MicroRNAs. Rev pediatric research. 2007; 61 (5): 24-28.
- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. BMJ. 2014; 348.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, et al. Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers. 2017; 3:17002
- Dang D, Ye Y, Viet CT, et al. Re-expression of the methylated EDNRB gene in oral squamous cell carcinoma attenuates cancer-induced pain. Pain. 2011 Oct ;152(10):2323-2332.
- Decosterd I, Woolf C. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. Pain. 2000; 87: 149-158.
- Delgado Villar, MD. Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2009; 139-152.
- Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler E, Zachariou V, Narita M. Epigenetic Mechanisms of Chronic Pain. Trends in neurosciences. 2015 Mar ;38(4):237-246.
- Doerfler, W., and Böhm, P. DNA Methylation: Basic Mechanisms. Berlin Heidelberg: Springer, 2006; Vol 301.
- Dymov S, Massart R, Millecamps M, et al. Overlapping signatures of chronic pain in the DNA methylation landscape of prefrontal cortex and peripheral T cells. Sci Rep. 2016 Ene;6: 19615.
- Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, et al. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. Pain. 2016; 157(8): 1599–1606.
- Florez, J. El tratamiento farmacológico del dolor. 1ª ed. Madrid: Ars Medica, 2007.
- Fratto V, Géranton S M, Hunt S P et al. Descending serotonergic controls regulate inflammation-induced mechanical sensitivity and methyl-CpG-binding protein 2 phosphorylation in the rat superficial dorsal horn. Molecular Pain. 2008 Sep ;4(1):35.
- Frizzo M.E., Dall'Onder L.P., Dalcin K.B., et al Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures. Cell Mol. Neurobiol. 2004 ;24 (1): 123–128
- García-Porrero Pérez JA, Hurlé González JM. Neuroanatomía humana. 1ª ed. Editorial Medica Panamericana S.A; 2015.

- Gilron I, Baron R, Jensen T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2015; 90(4):532-45.
- Gómez -Barrios JV, Tortorici V. Mecanismos del dolor neuropático: del laboratorio a la clínica. *Archivos Venezolanos de farmacología y terapéutica.* 2009 Mar ; 28 (1): 1-7.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 2009; 10:32–42.
- Hargus NJ, Patel MK. Voltage-gated Na⁺ channels in neuropathic pain. *Expert Opin Investig Drugs.* 2007; 16(5):635-46
- Herceg Z., M. R. Mechanisms of Histone Modifications, In *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics.* Oxford: Academic Press. 2010; pp 25-45.
- Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science.* 2008; 319(5871): 1785-1786
- Icardo JL, Ojeda JM. *Neuroanatomía humana.* 1ª ed. Barcelona: Masson; 2004. P. 135-140.
- International Association for the study of Pain (IASP). Disponible en: <http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx>
- Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid Receptor Recruitment of Histone Deacetylase 2 Inhibits Interleukin-1 β -Induced Histone H4 Acetylation on Lysines 8 and 12. *Molecular and Cellular Biology.* 2000 Sep;20(18):6891–6903.
- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., Jeltsch, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBioChem.* 2011; 12, 206-222.
- Kami K., Tajima F., Senba E. Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain. *Anat Sci Int.* 2017 Ene ;92: 79-90.
- Khangura RK, Bali A, Jaggi AS; et al. Histone acetylation and histone deacetylation in neuropathic pain: An unresolved puzzle?. *European Journal of Pharmacology.* 2017 Jan; 795: 36-42.
- Kim C.S., Hwang C.K., Choi H.S., et al. Neuron-restrictive silencer factor (NRSF) functions as a repressor in neuronal cells to regulate the mu opioid receptor gene. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 46464–46473
- Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 1992; 50: 355-63
- Latorre A, Moscardó A, Santos MT, et al. Acetilación de proteínas en las plaquetas: un nuevo mecanismo de señalización con implicaciones terapéuticas. *Sociedad Española de Trombosis y hemostasia (Archivo de congreso y ponencias).* Valencia. 2014; 83-84.
- Li P, Zhuo M. Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. *Nature.* 1998; 393: 695-8.

- Lin CR, Chen KH, Yang CH, et al. : Intrathecal miR-183 delivery suppresses mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *Eur J Neurosci*. 2014 Mar;39(10):1682–9.
- Martínez-Frías, ML. Estructura y función del ADN y de los genes II. Tipos de alteraciones de la función del gen por procesos epigenéticos. *Rev Semergen*. 2010 ; 36 (6):332-335.)
- Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: A new theory. *Science, New series*. 1965; 150 (3699): 971-979.
- Neumann S, Braz JM, Skinner K, et al. Innocuous, not noxious, input activates PKC γ interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. *J. Neurosci*. 2008; 28:7936–44.
- Polgar E, Gray S, Riddell JS, et al. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain*. 2004; 111(1-2): 144-50.
- Sandkühler, J. Understanding LTP in pain pathways. *Molecular Pain*. 2007; 3(9)
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990; 43: 205-211
- Sung B., Lim G., Mao J.. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *Neuroscience*. 2003 ;23 (7): 2899–2910
- Tollefsbol, T. Epigenetics: The New Science of Genetics, In *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics* Oxford: Academic Press. 2010; pp 18.
- Uchida H., Ma L., Ueda H. Epigenetic gene silencing underlies C-fiber dysfunctions in neuropathic pain. *J. Neurosci*. 2010; 30: 4806–4814
- Waxman, SG. *Neuroanatomía clínica*. 26ª Ed. México: McGraw-Hill/Interamericana. 2011.
- Weng H.R, Chen J.H, Cata J.P. Inhibition of glutamate uptake in the spinal cord induces hyperalgesia and increased responses of spinal dorsal horn neurons to peripheral afferent stimulation. *Neuroscience*. 2006 Ene; 138 (4):1351–1360.
- Williamson A, Hoggart B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs*. 2005; 14(7):798-804.
- Willis DE; Wang M, Brown E, et al. Selective repression of gene expression in neuropathic pain by the neuron-restrictive silencing factor/repressor element-1 silencing transcription (NRSF/REST). *Neuroscience Letters*. 2016 Jun; 625:20-25.
- Zhang Y, Chen SR, Laumet G, et al. : Nerve Injury Diminishes Opioid Analgesia through Lysine Methyltransferase-mediated Transcriptional Repression of μ -Opioid Receptors in Primary Sensory Neurons. *J Biol Chem*. 2016 Feb;291(16):8475–85.
- Zhang Z., Cai Y., Zou F., et al. Epigenetic suppression of GAD65 expression mediates persistent pain. *Nat. Med*. 2011 ;17:1448–1455
- Ziller M J, Gu H, Müller F, et al . Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*. 2013; 500: 477.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, María Amor Hurlé González, por su inestimable ayuda y por orientarme, proporcionándome las herramientas necesarias para que este trabajo fuera posible. También quiero agradecer a la Doctora Tramullas, por hacer que el proyecto estuviera más completo.

A mi familia, por sus consejos, su apoyo incondicional y su infinita paciencia.

A mis amigos, por escucharme y animarme a seguir.

¡Muchas gracias a todos!