

TESE DE DOUTORAMENTO

DESARROLLO DE MODELOS IN VITRO
DE DOLOR Y SU APLICACIÓN AL
CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

Antón Leandro Martínez Rodríguez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN E
DESENVOLVEMENTO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Desarrollo de modelos in vitro de dolor y su aplicación al cribado de alto rendimiento

D. Antón Leandro Martínez Rodríguez

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 6 de setembro de 2018

Asdo.
Antón L. Martínez Rodríguez



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Desarrollo de modelos in vitro de dolor y su
aplicación al cribado de alto rendimiento

Dna. María Isabel Loza García
D. Javier Burgueño Hurtado

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. Antón L. Martínez Rodríguez, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 6 de setembro de 2018

Asdo.
María Isabel Loza García

Asdo.
Javier Burgueño Hurtado



Agradecimientos

Para la elaboración de esta tesis doctoral ha sido necesaria la colaboración de muchas personas, a las cuales deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

A mis directores: la profesora María Isabel Loza y el doctor Javier Burgueño de Esteve Pharmaceuticals, así como al profesor José Manuel Brea y a la profesora María Isabel Cadavid. Por su apoyo constante, su orientación, sus consejos, su ejemplo y sus ánimos, ellos son los cuatro pilares sobre los que se asienta esta tesis doctoral

Al doctor Manuel Merlos, a Xavier Monroy y al doctor José Miguel Vela de Esteve Pharmaceuticals por su colaboración. Al doctor Eduardo Domínguez por su orientación para la realización de los experimentos de transcriptómica. A los doctores Catarina Allegue, Raquel Cruz y Javier Amigo por el inestimable apoyo prestado para la interpretación estadística de los datos generados en los experimentos de transcriptómica. A los miembros de la Unidad Mixta de I+D USC-Esteve y a la doctora Amparo Pérez por su ayuda con el cultivo de la línea celular F11 y con la puesta a punto de los ensayos. A las doctoras Olalla Maroñas, María Santamaría y Cristina Castro por sus sugerencias durante la elaboración de esta memoria.

Finalmente, quiero dar las gracias especialmente, uno por uno, a todos mis compañeros y buenos amigos del grupo BioFarma de la Universidad de Santiago de Compostela por su constante apoyo y colaboración en el día a día para la elaboración de esta tesis doctoral.

Para la realización de la presente memoria se ha contado con la financiación otorgada por la Xunta de Galicia (GRC2014/011), por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-57138-C2-2-R y RTC-2015-4207-1), por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y gracias al proyecto Innopharma (PI12/00742) financiado por el Fondo Tecnológico de la Unión Europea a través del Ministerio de Economía y Competitividad con el apoyo de la Xunta de Galicia. El autor ha sido beneficiario de dos ayudas para la formación predoctoral: la ayuda del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU 2013) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, y la ayuda de apoyo a la etapa predoctoral del Plan Gallego de Investigación, Innovación y Crecimiento 2011-2015 del año 2013 concedida por la Consellería de Cultura, Educación y Ordenación

Índice

1. Resúmenes de la tesis doctoral	39
1.1 Resumen en Castellano	39
1.2 Abstract in English	41
2. Justificación, hipótesis y objetivos	47
3. Introducción.....	55
3.1 El dolor	55
3.1.1 Clasificación del dolor	56
3.2 Fisiología del sistema nociceptivo.....	58
3.2.1 La neurona sensorial de primer orden.....	60
3.2.1.1 Fibras nerviosas.....	61
3.2.1.2 Nociceptores	63
3.2.1.3 Transmisión del impulso nervioso a lo largo de las neuronas nociceptivas	75
3.2.1.3.1 Canales de calcio	75
3.2.1.3.2 Canales de sodio.....	78
3.2.1.3.3 Canales de potasio	82
3.2.1.3.4 Canales activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN)	85
3.2.2 La sinapsis entre la neurona de DRG y la neurona sensorial de segundo orden en el asta dorsal	86
3.3 El dolor neuropático	90
3.3.1 Patologías que cursan con dolor neuropático	91
3.3.2 Modificaciones fisiológicas y anatómicas producidas por el dolor neuropático periférico.....	95
3.3.2.1 En el sistema nervioso periférico	96

3.3.2.2	En el sistema nervioso central	99
3.3.2.2.1	En la médula espinal	99
3.3.2.2.2	En el cerebro	101
3.3.3	Diagnóstico del dolor neuropático	101
3.3.4	Epidemiología del dolor neuropático	103
3.3.5	Tratamiento del dolor neuropático	103
3.3.5.1	Fármacos empleados en clínica	104
3.3.5.1.1	Fármacos en primera línea de tratamiento	105
3.3.5.1.2	Fármacos en segunda línea de tratamiento	107
3.3.5.1.3	Fármacos en tercera línea de tratamiento.....	109
3.3.5.1.4	Fármacos empleados en dolor neuropático sin justificación	110
3.3.5.2	Técnicas intervencionistas para el tratamiento del dolor neuropático.....	111
3.3.5.3	Fármacos en investigación para el tratamiento del dolor neuropático.....	112
3.3.5.3.1	Moléculas que actúan en el sistema nervioso periférico.....	112
3.3.5.3.2	Moléculas que actúan en el sistema nervioso central	120
3.3.6	Modelos de dolor neuropático	125
3.3.6.1	Modelos animales	125
3.3.6.1.1	Modelos de neuropatía periférica.....	125
3.3.6.1.2	Modelos de neuropatía central	132
3.3.6.1.3	Modelos de neuropatía inducida por fármacos.....	133
3.3.6.1.4	Modelos de neuropatía inducida por enfermedades.....	134
3.3.6.1.5	Otros modelos de neuropatía	136
3.3.6.2	Modelos histológicos	137
3.3.6.3	Modelos celulares	138
4.	Material y métodos.....	143
4.1	Líneas celulares	143

4.1.1	Mantenimiento del cultivo celular	143
4.1.2	Descongelación de las células	144
4.1.3	Expansión de las células.....	144
4.1.4	Criogenización de las células	145
4.1.5	Siembra celular.....	146
4.2	Microscopía fluorescente de alto rendimiento	147
4.2.1	Valoración de la diferenciación celular.....	147
4.2.1.1	Cuantificación de la expresión del marcador neuronal	148
4.2.1.2	Cuantificación de la longitud de las neuritas.....	149
4.2.2	Valoración de la neurodegeneración.....	150
4.3	Cuantificación de la redistribución dinámica de masa.....	152
4.4	Medida de la concentración de calcio intracelular	155
4.4.1	Ensayos de estimulación de la movilización de calcio intracelular.....	155
4.4.2	Ensayos de inhibición de la movilización de calcio intracelular.....	156
4.4.2.1	Cribado de la quimioteca Prestwick®	157
4.5	Cuantificación del potencial de membrana	158
4.5.1	Cuantificación del potencial de membrana mediante FluoVolt®	160
4.5.2	Cuantificación del potencial de membrana mediante DiBAC ₄ (3).....	162
4.6	Análisis de expresión de TrpV1 por SDS-PAGE y Western blot.....	163
4.6.1	Preparación de la muestra	163
4.6.2	Preparación de los geles de electroforesis.....	164

4.6.3 Electroforesis (SDS-PAGE)	164
4.6.4 Electrotransferencia.....	165
4.6.5 Marcaje de la proteína con anticuerpos	166
4.6.6 Revelado.....	167
4.7 Ensayo de evaluación de la supervivencia celular	167
4.8 Estudio del transcriptoma.....	169
4.8.1 Obtención de la muestra	169
4.8.2 Análisis global del transcriptoma.....	171
4.8.2.1 Análisis de la calidad del ARNm.....	171
4.8.2.2 Secuenciación del transcriptoma.....	173
4.8.2.3 Análisis bioinformático e interpretación estadística	174
4.8.3 PCR inversa a tiempo real	177
4.9 Análisis estadístico.....	181
4.10 Reactivos utilizados	183
4.10.1 Reactivos empleados para la preparación de tampones.....	183
4.10.2 Reactivos farmacológicos.....	184
5. Resultados.....	187
5.1 La diferenciación de las líneas celulares F11 y ND7/23 las dotó de características de neuronas sensoriales.....	187
5.1.1 Análisis cualitativo de la adquisición de características fenotípicas de neuronas de DRG	187
5.1.2 Estudio de la expresión del receptor TrkA	191
5.1.3 Estudio del crecimiento de neuritas.....	192
5.2 El cloruro potásico, pero no el ATP ni la capsaicina, indujeron una respuesta dosis-dependiente en las células diferenciadas	194
5.2.1 Respuesta a ATP	194

5.2.1.1	Medida de DMR.....	194
5.2.1.2	Medida de la concentración de calcio intracelular.....	196
5.2.1.3	Medida del potencial de membrana.....	197
5.2.1.3.1	Empleo del kit FluoVolt®	197
5.2.1.3.2	Empleo de DiBAC ₄ (3).....	197
5.2.2	Respuesta a KCl.....	198
5.2.2.1	Medida de DMR.....	198
5.2.2.2	Medida de la concentración de calcio intracelular.....	199
5.2.2.3	Medida del potencial de membrana.....	200
5.2.2.3.1	Empleo del kit FluoVolt®	200
5.2.2.3.2	Empleo de DiBAC ₄ (3).....	202
5.2.3	Respuesta a capsaicina.....	203
5.2.3.1	Medida de DMR.....	203
5.2.3.2	Medida de la concentración de calcio intracelular.....	203
5.2.3.3	Medida del potencial de membrana.....	204
5.2.3.3.1	Empleo del kit FluoVolt®	204
5.2.3.3.2	Empleo de DiBAC ₄ (3).....	205
5.2.3.4	Comprobación de la expresión del receptor TrpV1 mediante Western blot.....	206
5.3	La diferenciación neuronal activa mecanismos de transcripción que regulan la excitabilidad neuronal.....	208
5.3.1	Comparativa de la expresión génica entre las células F11 sin diferenciar y las células F11 diferenciadas	208
5.3.1.1	Comparativa de los genes más inducidos y más reprimidos al diferenciar las células F11	208
5.3.1.2	Comparativa de la regulación de la señalización celular	211
5.3.1.3	Análisis discriminante de componentes principales	212
5.3.1.4	Confirmación de los datos obtenidos mediante RNA-Seq utilizando la técnica de RT-qPCR.....	213

5.3.2	Incremento de la expresión de canales de calcio dependientes de voltaje tras la diferenciación.....	215
5.4	Se desarrolló un ensayo de excitabilidad neuronal para el cribado de alto rendimiento de analgésicos en células F11 diferenciadas.....	217
5.4.1	Verificación del incremento de excitabilidad de la línea celular F11 tras la exposición a una combinación de mediadores inflamatorios.....	218
5.4.2	Comprobación de la ventana del ensayo	218
5.4.3	Prueba de concepto mediante una batería de analgésicos.....	219
5.4.4	Cribado de los compuestos de la quimioteca Prestwick®	220
5.4.4.1	Evaluación de la actividad de los 1120 compuestos de la quimioteca Prestwick®.....	220
5.4.4.2	Confirmación de la actividad analgésica de los <i>hits</i>	222
5.5	Se desarrolló un ensayo fenotípico de alto rendimiento para el cribado de analgésicos en células F11 diferenciadas	225
5.5.1	Estudio del efecto de vincristina, paclitaxel y rilpivirina sobre la longitud de las neuritas	225
5.5.2	Estudio del efecto de una batería de fármacos analgésicos sobre el acortamiento de las neuritas producido por rilpivirina, paclitaxel y vincristina.....	227
5.5.3	Estudio del efecto de los <i>hits</i> identificados de la quimioteca Prestwick® sobre el acortamiento de las neuritas producido por rilpivirina, paclitaxel y vincristina. ...	229
5.6	Los estímulos algogénicos indujeron cambios específicos en el transcriptoma de las células F11 diferenciadas	232

5.6.1	Caracterización del impacto en la viabilidad celular de los estímulos dolorosos	232
5.6.2	Secuenciación del transcriptoma de las células F11 mediante RNA-Seq	233
5.6.2.1	Análisis transcriptómico de las células F11 expuestas a <i>sopa inflamatoria</i>	234
5.6.2.1.1	Comparativa de los genes más inducidos y más reprimidos al exponer a la <i>sopa inflamatoria</i>	234
5.6.2.1.2	Comparativa de la regulación de las vías de señalización celular al exponer a la <i>sopa inflamatoria</i>	237
5.6.2.2	Análisis transcriptómico de las células F11 expuestas a zalcitabina.....	238
5.6.2.2.1	Comparativa de genes más inducidos y más reprimidos al exponer a zalcitabina	238
5.6.2.2.2	Comparativa de la regulación de las vías de señalización celular al exponer a zalcitabina.....	241
5.6.2.3	Análisis discriminante global de componentes principales.....	241
6.	Discusión	247
6.1	La diferenciación de las líneas celulares F11 y ND7/23 las dotó de características de neuronas sensoriales.....	250
6.2	El cloruro potásico, pero no el ATP ni la capsaicina, indujeron una respuesta dosis-dependiente en las células diferenciadas.....	253
6.3	La diferenciación neuronal activa mecanismos de transcripción que regulan la excitabilidad neuronal	258
6.4	Se desarrolló un ensayo de excitabilidad neuronal para el cribado de alto rendimiento de analgésicos en células F11 diferenciadas	261

6.5	Se desarrolló un ensayo fenotípico de alto rendimiento para el cribado de analgésicos en células F11 diferenciadas	272
6.6	Los estímulos algogénicos indujeron cambios específicos en el transcriptoma de las células F11 diferenciadas.....	276
7.	Conclusiones	283
8.	Bibliografía.....	293
A1.	Glosario de genes	327



Índice de figuras

Figura 1.	Vías de transmisión y modulación del dolor	60
Figura 2.	Fibras nerviosas sensoriales integradas en el nervio periférico	62
Figura 3.	Estructura de los canales de calcio activados por voltaje.....	76
Figura 4.	Estados funcionales del canal de sodio dependiente de voltaje.....	79
Figura 5.	Estructura de los canales de sodio activados por voltaje.....	80
Figura 6.	Aferencias sensoriales en el asta dorsal medular.....	88
Figura 7.	Diagrama de flujo para el diagnóstico del dolor neuropático.....	102
Figura 8.	Raíces nerviosas de las fibras que inervan la pata de un ratón o rata.....	126
Figura 9.	Fundamento de la medida de DMR.....	153
Figura 10.	Mecanismo de actuación de las dos sondas fluorescentes empleadas para medir el potencial de membrana	160
Figura 11.	Perfil electroforético y RIN de las muestras de ARN _m total aisladas a partir de las células F11.....	173
Figura 12.	Fundamento de la técnica de RT-qPCR para cuantificar el ARN _m presente en una muestra.....	178
Figura 13.	Morfología de las células F11 diferenciadas y no diferenciadas	189
Figura 14.	Morfología de las células ND7/23 diferenciadas y no diferenciadas	190
Figura 15.	Tinción del receptor TrkA con un anticuerpo marcado con CFL647®	191

Figura 16. Incremento de la intensidad de fluorescencia de CFL647 [®] (correspondiente a la expresión del receptor TrkA) empleando los tres protocolos de diferenciación en comparación con la intensidad de fluorescencia en células F11 no diferenciadas	192
Figura 17. Longitud media de las neuritas y porcentaje de células con neuritas de más de 30 μm sobre el total de células en la línea F11 sin diferenciar y diferenciada empleando los tres métodos de diferenciación	193
Figura 18. Registro de la DMR de las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutilil-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP	195
Figura 19. Registro de la concentración de calcio intracelular en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutilil-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP	196
Figura 20. Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutilil-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP	197
Figura 21. Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutilil-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP	198
Figura 22. Registro de la DMR de las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutilil-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl	199

Figura 23.	Registro de la concentración de calcio intracelular en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutiril-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl.....	200
Figura 24.	Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutiril-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl.....	201
Figura 25.	Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutiril-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl.....	202
Figura 26.	Registro de la DMR de las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutiril-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina	203
Figura 27.	Registro de la concentración de calcio intracelular en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutiril-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina	204
Figura 28.	Registro del potencial de membrana medido con el kit FluoVolt® en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutiril-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina	205
Figura 29.	Registro del potencial de membrana medido con DiBAC ₄ (3) en las células F11 antes y después de la diferenciación con dibutiril-AMP _c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina	206

Figura 30.	Análisis de la expresión del receptor TrpV1 mediante Western blot en las células F11 diferenciadas en ausencia y en presencia de NGF y de Il-6 e Il-6R.....	207
Figura 31.	Análisis discriminante de componentes principales comparando la línea celular F11 no diferenciada y la línea F11 diferenciada, tanto con los genes murinos como de rata.	212
Figura 32.	Comparativa de la expresión de cuatro genes en células F11 no diferenciadas y diferenciadas cuantificada mediante RT-qPCR.....	214
Figura 33.	Ejemplo del incremento de respuesta de las células F11 diferenciadas a KCl 32 mM tras 10 minutos de exposición a la <i>sopa inflamatoria</i> frente al valor de respuesta a KCl 32 mM sin exposición previa a la <i>sopa inflamatoria</i>	218
Figura 34.	Inhibición de la respuesta de las células F11 diferenciadas a KCl 32 mM tras diez minutos de exposición a la <i>sopa inflamatoria</i> producida por una batería de fármacos	220
Figura 35.	Inhibición de la respuesta de las células F11 a KCl 32 mM tras diez minutos expuestas a <i>sopa inflamatoria</i> en presencia de cada uno de los compuestos de la quimioteca Prestwick®.	221
Figura 36.	Inhibición de la respuesta de las células F11 diferenciadas a KCl 32 mM tras diez minutos expuestas a <i>sopa inflamatoria</i> por los <i>hits</i> seleccionados entre las moléculas de la quimioteca Prestwick®	224
Figura 37.	Acortamiento de las neuritas de las células F11 diferenciadas al exponerlas a vincristina 1 nM, paclitaxel 1 μM y rilpivirina 100 nM, en comparación con las células F11 sin exposición a agentes tóxicos, y reversión con el ácido α-lipoico	226

Figura 38.	Efecto de los antitumorales vincristina y paclitaxel, y del antirretroviral rilpivirina sobre la longitud máxima de las neuritas de las células F11 y reversión del acortamiento con ácido α -lipoico 10 μ M.....	227
Figura 39.	Efecto de una batería de analgésicos sobre la degeneración axonal producida por vincristina 1 nM.....	228
Figura 40.	Efecto de una batería de analgésicos sobre la degeneración axonal producida por el antitumoral paclitaxel 1 μ M	228
Figura 41.	Efecto de una batería de analgésicos sobre la degeneración axonal producida por el antirretroviral rilpivirina 100 nM a una concentración 100 nM.....	229
Figura 42.	Efecto de los <i>hits</i> seleccionados en el cribado de la quimioteca Prestwick [®] sobre la degeneración axonal producida por el antitumoral vincristina 1 nM	230
Figura 43.	Efecto de los <i>hits</i> seleccionados en el cribado de la quimioteca Prestwick [®] sobre la degeneración axonal producida por el antitumoral paclitaxel 1 μ M.....	231
Figura 44.	Efecto de los <i>hits</i> seleccionados en el cribado de la quimioteca Prestwick [®] sobre la degeneración axonal producida por el antirretroviral rilpivirina a una concentración 100 nM.....	231
Figura 45.	Viabilidad de las células F11 diferenciadas en presencia de <i>sopa inflamatoria</i> y de zalcitabina (ddC) como estímulos dolorosos comparado con el control (células F11 diferenciadas no expuestas a estímulos dolorosos).....	233

Figura 46. Análisis global discriminante de componentes principales comparando las cuatro muestras: línea celular F11 no diferenciada, línea F11 diferenciada, línea celular F11 diferenciada expuesta a *sopa inflamatoria* y línea celular F11 diferenciada expuesta a zalcitabina (ddC)..... 242

Figura 47. Mecanismo de acción de los mediadores empleados para inducir la diferenciación 252



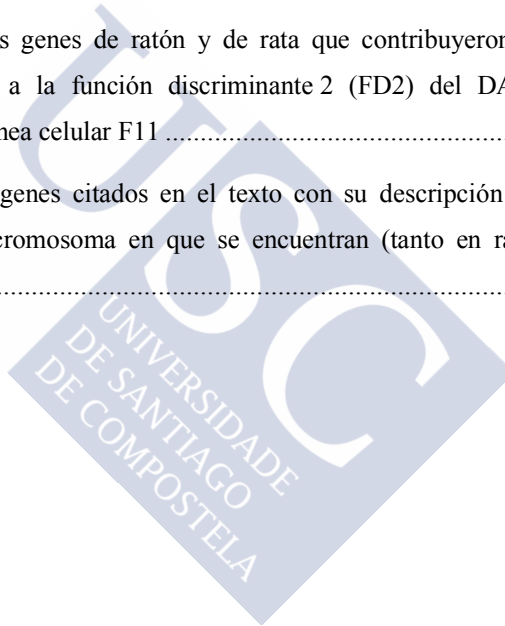
Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación de Erlanger-Gasser de las fibras nerviosas participantes en la transmisión de estímulos sensoriales.....	61
Tabla 2.	Clasificación de los nociceptores atendiendo a la fibra a la que pertenecen y al estímulo al que responden	66
Tabla 3.	Canales iónicos que participan en la nocicepción.....	67
Tabla 4.	Mediadores que modifican la sensibilidad de los nociceptores, tanto incrementando la sensibilidad dolorosa (proalgésicos) como reduciéndola (analgésicos).....	69
Tabla 5.	Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje.....	77
Tabla 6.	Clasificación de los canales de sodio dependientes de voltaje.....	81
Tabla 7.	Clasificación de las subunidades K_v de los canales de potasio dependientes de voltaje	83
Tabla 8.	Áreas corporales afectadas por el dolor en los diferentes cuadros que cursan con dolor neuropático	94
Tabla 9.	Fármacos indicados para el tratamiento del dolor neuropático.....	104
Tabla 10.	Comparativa entre los métodos de medida de potencial de membrana empleados.....	159
Tabla 11.	Potencia (pEC_{50}) y eficacia ($E_{m\acute{a}x}$) del ATP en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la DMR.....	195
Tabla 12.	Potencia (pEC_{50}) y eficacia ($E_{m\acute{a}x}$) del ATP en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la concentración de calcio intracelular	196

Tabla 13.	Potencia (pEC_{50}) y eficacia ($E_{m\acute{a}x}$) del KCl en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la concentración de calcio intracelular.....	200
Tabla 14.	Potencia (pEC_{50}) y eficacia ($E_{m\acute{a}x}$) del KCl en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la variación en el potencial de membrana mediante el kit FluoVolt®.....	201
Tabla 15.	Potencia (pEC_{50}) y eficacia ($E_{m\acute{a}x}$) del KCl en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo el potencial de membrana mediante DiBAC ₄ (3).....	202
Tabla 16.	Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se incrementa más al inducir la diferenciación de las células F11.....	209
Tabla 17.	Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se reprime más al inducir la diferenciación de las células F11.....	210
Tabla 18.	Listado de las tres vías de señalización murinas y de rata en que, mediante IPA®, se observó una mayor sobrerrepresentación de genes que codifican proteínas que participan en esas vías tras la diferenciación de la línea celular F11.....	211
Tabla 19.	Listado de los genes de ratón y de rata que contribuyeron en mayor grado a la función discriminante (FD) del DAPC en la línea celular F11.....	213
Tabla 20.	Cuantificación de la expresión de los genes confirmados mediante RT-qPCR en las células F11 antes y después de la diferenciación (ΔC_t) y comparación entre las células diferenciadas y sin diferenciar ($\Delta\Delta C_t$).....	215
Tabla 21.	Listado de los genes que codifican las subunidades de los canales de calcio dependientes de voltaje y variación en la expresión tras la diferenciación de las células F11.....	216

Tabla 22.	Parámetros estadísticos del cribado de los 1120 compuestos de la quimioteca Prestwick®	221
Tabla 23.	Actividad de los nueve compuestos capaces de producir una inhibición superior al punto de corte en el cribado de los 1120 compuestos de la quimioteca Prestwick®	222
Tabla 24.	Potencia (pIC ₅₀) de los seis compuestos de la quimioteca Prestwick® en que se observó correlación entre concentración y actividad.....	223
Tabla 25.	Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se incrementó más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a la <i>sopa inflamatoria</i>	235
Tabla 26.	Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se redujo más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a la <i>sopa inflamatoria</i>	236
Tabla 27.	Listado de las vías de señalización murinas y de rata en que, mediante IPA®, se observó una mayor sobrerepresentación de genes que codifican proteínas que participan en esas vías tras la exposición a <i>sopa inflamatoria</i> de la línea celular F11 diferenciada.....	237
Tabla 28.	Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se incrementó más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a zalcitabina 1 μM	239
Tabla 29.	Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se redujo más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a zalcitabina 1 μM	240

Tabla 30.	Listado de las vías de señalización murinas y de rata en que, mediante IPA [®] , se observó una mayor sobrerepresentación de genes que codifican proteínas que participan en esas vías tras la exposición a zalcitabina 1 μ M de la línea celular F11 diferenciada.....	241
Tabla 31.	Listado de los genes de ratón y de rata que contribuyeron en mayor grado a la función discriminante 1 (FD1) del DAPC global en la línea celular F11	243
Tabla 32.	Listado de los genes de ratón y de rata que contribuyeron en mayor grado a la función discriminante 2 (FD2) del DAPC global en la línea celular F11	244
Tabla A1.	Listado de los genes citados en el texto con su descripción (en inglés) y el cromosoma en que se encuentran (tanto en ratón como en rata).....	327



Glosario de símbolos y abreviaturas utilizados

5-HT_n	Receptor de serotonina n
A	Adenina
A/C-M	Nociceptores para estímulos mecánicos
A/C-MH	Nociceptores para estímulos térmicos y mecánicos
A₁, A_{2A}	Receptores de adenosina tipo 1 y 2A
Ác.	Ácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN_c	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADT	Antidepresivo tricíclico
AEDT	Ácido etilendiaminotetraacético
AGE	<i>Advanced glycation end product</i> (producto final de glicosilación avanzada)
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMP_c	Adenosina monofosfato cíclico
ANO1	(Canal) anoctamina 1
APS	<i>Ammonium persulfate</i> (persulfato de amonio)
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ASB	Albúmina sérica bovina
ASIC	<i>Acid sensing ion channel</i> (canal iónico sensible a ácido)
AT₂	Receptor de tipo 2 de angiotensina II

ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> (factor neurotrófico derivado del cerebro)
BK	Canales de potasio dependientes de voltaje activados por calcio
BK₁, BK₂	Receptor de bradicinina tipo 1 y 2
BTX-A	Toxina botulínica A
C	Citosina
C-H	Nociceptores para estímulos térmicos
C-M_iH_i	Nociceptores silentes
Ca²⁺	Catión calcio
CaCl₂	Cloruro de calcio
Ca_v	Canal de calcio dependiente de voltaje
CB₁	Receptor de cannabinoides tipo 1
CBP	<i>CREB binding protein</i> (proteína de unión a CREB)
CC	<i>Creative Commons</i> (Comunes Creativos)
CCL2:	Ligando de quimiocinas 2
CCR5:	C-C quimiocina receptora de tipo 5
CFL647[®]	Colorante CruzFluor [®] 647
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i> (péptido relacionado con el gen de la calcitonina)
ChemR23	Receptor de quemerina
Cl⁻	Anión cloruro
CO₂	Dióxido de carbono
cpm	Cuentas por millón
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> (elemento de respuesta a AMP _c)

CRPS	<i>Complex regional pain syndrome</i> (síndrome de dolor regional complejo)
CV	Coefficiente de variación
CXCR4	C-X-C quimiocina receptora de tipo 4
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]-Encefalina
DAPC	<i>Discriminant analysis of principal components</i> (análisis discriminante de componentes principales)
DAT	<i>Dopamine active transporter</i> (transportador activo de dopamina)
ddC	Zalcitabina
ΔCt	Cuantificación relativa de la expresión de un gen mediante RT-qPCR con respecto a un gen de referencia
ΔΔCt	Cuantificación relativa de la expresión de un gen en una célula o población de células mediante RT-qPCR con respecto a otra célula o población de células
DiBAC₄(3)	Ácido bis-(1,3- dibutilbarbitúrico)trimetinaoxonol
dibutilil-AMP_c	N ⁶ ,2'-O-dibutilil)-adenosina 3',5'-monofosfato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Medio de Eagle modificado de Dulbecco)
DMR	<i>Dynamic mass redistribution</i> (Redistribución dinámica de masa)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN4	(Test para) dolor neuropático 4
DRG	<i>Dorsal root ganglion</i> (ganglio de la raíz dorsal)
DS	Desviación estándar
EC₅₀	Concentración eficaz del 50 %
ECCAC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i> (Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados)
E_{máx}	Respuesta máxima
E_{mín}	Respuesta mínima

EP	Receptor de PGE ₂
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> (quinasas reguladas por señales extracelulares)
exp	Tasa de expresión
FAM	<i>Fluorescein amidite</i> (amidita de fluoresceína)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (suero fetal bovino)
FBS_d	FBS dializado
FD	Función discriminante
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Unidad relativa de medida de la aceleración igual a la aceleración de la Gravedad
G	Guanina
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> (ácido γ -aminobutírico)
GABA_B	Receptor de GABA tipo B
GC	Guanilato ciclasa
GDNF	<i>Glial cell derived neurotrophic factor</i> (factor neurotrófico derivado de célula glial)
GENYO	Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica
GLM	<i>Generalized linear model</i> (modelo lineal generalizado)
GMP_c	Guanosina monofosfato cíclico
GMX	<i>Grupo de Medicina Xenómica</i> (Grupo de Medicina Genómica)
gp120	Glucoproteína 120
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> (receptor acoplado a la proteína G)
h	Hora
H⁺	Protón

H₁, H₃, H₄	Receptor de histamina 1, 3, 4
H₂O	Agua
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> (solución salina tamponada de Hanks)
HCl	Ácido clorhídrico
HCN1, 2, 3, 4	<i>Hyperpolarization-activated channels 1, 2, 3, 4</i> (canales activados por la hiperpolarización 1, 2, 3, 4)
HDAC6	Histona deacetilasa 6
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HOMER	<i>Hypergeometric optimization of motif enrichment</i> (optimización hipergeométrica de enriquecimiento de motivos)
HTS	<i>High-throughput screening</i> (cribado de alto rendimiento)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano)
I₂	Receptor de imidazolina tipo 2
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i> (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor)
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50 %
IGEPAL[®] CA-630	Octilfenoxipoli(etileno)etanol ramificado
IGF-1, IGF-2	<i>Insulin-like growth factor-1, 2</i> (factor de crecimiento insulínico 1, 2)
I_h	<i>Hyperpolarization-activated current</i> (corriente activada por hiperpolarización)
IL-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de interleucina 6
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i> (cinasa ligada a integrinas)
IP	Receptor de PGI ₂

IP₃	Inositol trifosfato
IPA	Ingenuity Pathway Analysis [®]
IRNS	Inhibidor de la recaptación de noradrenalina y serotonina
K⁺	Catión potasio
K₂P	Canales de potasio con dos poros
KCl	Cloruro de potasio
kDa	KiloDalton
KH₂PO₄	Fosfato de sodio monobásico
K_v	Canal de potasio dependiente de voltaje
L1, L2, L3, L4, L5	Nervio lumbar espinal 1, 2, 3, 4, 5
M	Masa molar
m/v	Masa/volumen
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> (proteína cinasas activadas por mitógenos)
MDS	<i>Multidimensional scaling</i> (escalado multidimensional)
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ms	Milisegundo

mV	Milivoltio
Na⁺	Catión sodio
Na₂HPO₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
NADP(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
NaOH	Hidróxido de sodio
Nav	Canal de sodio dependiente de voltaje
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i> (Colección Nacional de Cultivos Tipo)
NET	<i>Norepinephrine transporter</i> (transportador de noradrenalina)
NGF	<i>Nerve growth factor</i> (factor de crecimiento nervioso)
NK₁	Receptor de neurocininas 1
nL	Nanolitro
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOP	<i>Nociceptin/orphanin FQ peptide</i> (péptido nociceptina/orfanina FQ)
°C	Grado Celsius
OX₂	Receptor de tipo 2 de orexinas
P1	Receptor de adenosina
P2X	Receptor purinérgico ionotrópico
P2Y	Receptor purinérgico metabotrópico
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i> (polipéptido activador de adenilato ciclasa de la pituitaria)

pág	Página
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampón fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGI₂	Prostaglandina I ₂
PIP₂	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKM	Proteína cinasa M
PKR	Receptor de procineticina
pm	Picómetro
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
QL	<i>Quasi-likelihood</i> (cuasi verosimilitud)
qPCR	PCR en tiempo real, PCR cuantitativa
RIN	<i>RNA integrity number</i> (número de integridad del ARN)
RIPA	Radioinmunoprecipitación
RNA-Seq	<i>RNA sequencing</i> (secuenciación del ARN)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (especies reactivas de oxígeno)
ROX	5-carboxi-X-rodamina
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR a tiempo real con transcriptasa inversa
S1	Nervio sacro espinal 1
SDS	<i>Sodium docecylsulfate</i> (laurilsulfato de sodio)

SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS)
SERT	<i>Serotonin transporter</i> (transportador de serotonina)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SST₂	Receptor de tipo 2 de somatostatina
STAR	<i>Spliced transcripts alignment to a reference</i> (alineamiento de tránsitos empalmados a una referencia)
SV40	Virus 40 vacuolado del simio
T	Timina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (factor de necrosis tumoral)
TNFR1, TNFR2	Receptor de TNF tipo 1 y 2
TRAAK	Canal de potasio, subfamilia K, tipo 4
TREK-1	Canal de potasio, subfamilia K, tipo 2
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TrkA	<i>Tropomyosin receptor kinase A</i> (receptor de tropomiosina cinasa A)
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i> (receptor de tropomiosina cinasa B)
Trp	Receptor potencial transitorio
TrpA1	Receptor potencial transitorio anquirina tipo 1
TrpM2, 8	Receptor potencial transitorio melastina tipo 2, 8
TrpV1, 2, 3, 4	Receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1, 2, 3, 4
TTBS	Tampón formado por Tris y Tween 20.
TTX	Tetrodotoxina
UDG	<i>Uracil-DNA glycosylase</i> (uracil ADN glicosilasa)

UI	Unidades internacionales (de cantidad de enzima)
USC	Universidad de Santiago de Compostela
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen
VGLUT	<i>Vesicular glutamate transporter</i> (transportador vesicular de glutamato)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
\bar{X}	Media aritmética



The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA'.

Resúmenes de la tesis doctoral



1. Resúmenes de la tesis doctoral

1.1. RESUMEN EN CASTELLANO

El dolor neuropático tiene una prevalencia cercana al 10 % entre la población general y resulta incapacitante para los pacientes al cursar con dolor espontáneo y alodinia, es decir, hipersensibilidad a estímulos no dolorosos. Este tipo de dolor constituye una necesidad terapéutica no resuelta debido a que los fármacos indicados para su tratamiento resultan ineficaces y presentan importantes efectos adversos que limitan su empleo. Tradicionalmente, el descubrimiento de nuevos fármacos para el dolor neuropático se ha basado en el empleo de modelos animales y de células de origen tumoral modificadas genéticamente para expresar dianas relacionadas con la patogenia de la enfermedad. Por lo tanto, es necesario desarrollar modelos traslacionales de cribado de nuevos analgésicos para el dolor neuropático que permitan detectar sinergias y mecanismos de acción desconocidos que, con los modelos tradicionales, no se pueden detectar. La utilización de líneas celulares inmortalizadas de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) podría permitir el desarrollo de nuevos modelos traslacionales para la búsqueda de analgésicos para el dolor neuropático.

En la presente tesis doctoral: i) se ha seleccionado una línea celular inmortalizada de DRG y un método de diferenciación adecuado para la expresión de un marcador neuronal ($p < 0,01$) y para la adquisición de características fenotípicas neuronales según la longitud de las neuritas ($p < 0,001$); ii) se ha verificado que la diferenciación induce la transcripción de genes que codifican canales iónicos dependientes de voltaje mientras que reprime la transcripción de genes que codifican proteínas relacionadas con la proliferación celular; iii) se ha caracterizado la respuesta de las células diferenciadas a varios estímulos algogénicos y se ha seleccionado la medida de la concentración intracelular de calcio para la cuantificación de la respuesta celular a estos estímulos; iv) se ha confirmado que el ensayo permite el cribado de alto rendimiento de fármacos que contrarrestan la hiperexcitabilidad neuronal observada en cuadros de dolor neuropático (factor $Z' > 0,5$) y se han encontrado cinco *hits* tras el cribado de la quimioteca Prestwick® capaces de inhibir la respuesta de las células a un agente despolarizante con unos IC_{50} entre 1 y 7 μM ; v) se ha verificado que la exposición a fármacos antitumorales y antirretrovirales reduce la longitud de las neuritas, y que este acortamiento puede ser revertido con ácido α -lipoico, con algunos fármacos indicados para el dolor neuropático y con los *hits* del cribado de la quimioteca Prestwick®, y vi) se ha comprobado que la exposición de la línea celular F11 diferenciada tanto a un antirretroviral como la exposición a una combinación de mediadores

inflamatorios produce cambios específicos en la transcriptómica que podrían permitir el descubrimiento de dianas farmacológicas para el desarrollo de nuevos tratamientos para el dolor neuropático.

Así pues, en la presente tesis doctoral se ha desarrollado un nuevo modelo de neurona sensorial primaria basado en la línea celular F11 diferenciada; este modelo se caracterizó con estudios bioquímicos, transcriptómicos y funcionales, y con él se pusieron a punto dos ensayos de cribado de alto rendimiento de fármacos analgésicos para dolor neuropático: un ensayo bioquímico basado en la hiperexcitabilidad de las neuronas tras la exposición a mediadores inflamatorios y otro ensayo basado en la imagen para evaluar la neurodegeneración iatrogénica (producida por fármacos antitumorales y antirretrovirales). Con estos ensayos se llevó a cabo la validación empleando la quimioteca Prestwick[®].

1.2. ABSTRACT IN ENGLISH

Neuropathic pain is a symptom suffered by approximately 10 % of the general population. It is incapacitating for patients because it consists of spontaneous pain and allodynia (hypersensitivity to non-painful stimuli). Neuropathic pain remains an unsolved therapeutic need, due to the lack of efficacy, and the high rate of adverse side effects, of the drugs employed in its treatment. Traditionally, the development and research of new drugs implied the use of animal

models and of tumour cells whose genome was modified to express neuropathic pain related targets. In consequence, there is a clinical need to develop translational models for screening novel drugs for neuropathic pain, for the detection of synergies and new mechanisms of action, which are currently impossible to detect using traditional models. The employment of immortalized dorsal root ganglia (DRG) neurons should allow the development of innovative models for the research of the new analgesics needed.

In this PhD thesis: i) an immortalized DRG neuron cell line was selected and differentiated to enhance the expression of neuronal markers ($p < 0,01$) and the acquisition of neuronal phenotypic characteristics, according to neurite length ($p < 0,001$); ii) it was verified that differentiation induces the expression of genes that codify voltage-gated ion channels and represses the transcription of genes related with cell proliferation; iii) the response of differentiated cells to several algogenic stimuli was characterized and the measurement of intracellular calcium concentration was selected as readout to assess the response of cells to those stimuli; iv) it was confirmed that the assay is suitable for high throughput screening (HTS) of novel drugs that counteract the neuronal hyperexcitability observed in patients with neuropathic pain (Z' value $> 0,5$) and five hits were found able to inhibit the response of cells to a depolarizing agent with IC_{50} values between 1 and 7 μM after an HTS trial carried

out with the Prestwick[®] chemical library; v) it was confirmed that exposure to antiviral and antitumour drugs induces neurite shortening and that there are some drugs (like α -lipoic acid, previously identified hits from Prestwick[®] chemical library and drugs employed for the treatment of neuropathic pain in humans) that protect neurons against neurite shortening, and vi) it was also verified that the exposure of differentiated F11 cells both to antivirals and to inflammatory mediators induces changes in genes transcription that allow the identification of targets for the development of new drugs for neuropathic pain.

Furthermore, a novel model of sensory neuron based on differentiated F11 cells has been developed in this work; this model was characterized with biochemical, transcriptomic and functional assays, and allowed the development of two screening assays for the research of analgesic drugs for neuropathic pain: a biochemical assay based on the hyperexcitability of neurons after exposure to inflammatory mediators and a functional assay for the evaluation of neurodegeneration caused by drugs. The model was validated by screening the Prestwick[®] chemical library.



The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'USC' and the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA'.

Justificación, hipótesis y objetivos



2. Justificación, hipótesis y objetivos

El dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial (Peirs y Seal, 2016). El impulso doloroso se transmite hacia el sistema nervioso central a través de las neuronas sensoriales primarias o neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) por acción de varios tipos de canales iónicos dependientes de voltaje (Fitzpatrick y Mooney, 2015a).

El dolor neuropático afecta aproximadamente al 10 % de la población mundial (Van Hecke y cols., 2014). Su sintomatología es incapacitante para los pacientes, puesto que cursa con dolor espontáneo e hipersensibilidad a estímulos no dolorosos que merman la calidad de vida (Zimmermann, 2001). El tratamiento del dolor neuropático continúa siendo hoy en día una necesidad terapéutica no resuelta porque los fármacos disponibles presentan una eficacia escasa, con gran variabilidad entre los pacientes, y una alta incidencia de efectos adversos (Kayano y cols., 2013).

La lesión en las vías nerviosas que participan en la percepción dolorosa puede generar un cuadro de dolor neuropático (Woolf y

Mannion, 1999). Su etiología puede ser múltiple, puesto que numerosas causas, como lesiones, enfermedades, medicamentos y sustancias tóxicas, pueden producir un daño inicial en la neurona sensorial primaria (Colloca y cols., 2017). Este daño conlleva una sensibilización de los nociceptores debido a la liberación de mediadores inflamatorios en las áreas circundantes al nervio (*lecho doloroso*), que induce un incremento en la excitabilidad de la célula y en la liberación de neurotransmisores en el asta dorsal, rebajándose por tanto el umbral de detección de la sensación dolorosa y apareciendo dolor espontáneo, alodinia (es decir, dolor producido por estímulos no dolorosos) e hipersensibilidad (Nickel y cols., 2012). Entre las lesiones mencionadas causantes de dolor neuropático está la degeneración axonal y el acortamiento iatrogénico de las neuritas, característico de algunos fármacos antirretrovirales y antitumorales que causan una neuropatía que afecta a los extremos de los miembros (manos y pies) y que, por ello, recibe el nombre de neuropatía *en guante y calcetín* (Han y Smith, 2013).

En la investigación farmacológica temprana del dolor neuropático se han empleado modelos celulares recombinantes (con frecuencia células tumorales) que permiten evaluar el efecto de nuevas moléculas sobre dianas relevantes relacionadas con el dolor neuropático (Taneja y cols., 2017). La expresión de las dianas *in vitro* se induce generalmente mediante técnicas de recombinación genética. Estos

modelos adolecen de la falta de traslacionalidad de un entorno *in vivo* tan complejo. Por otra parte, la predefinición de las dianas en los modelos citados hace que los programas de descubrimiento de fármacos se restrinjan a los mismos mecanismos de acción y finalmente, se desarrollen fármacos moduladores de dianas similares, pero no analgésicos innovadores.

En los últimos años se han desarrollado y caracterizado líneas celulares inmortalizadas de neuronas sensoriales primarias, que son capaces de proliferar hasta que se exponen a factores de diferenciación; estos factores motivan la detención de la proliferación celular y la adquisición de las características fenotípicas de neuronas, lo que aumenta la traslacionalidad de los modelos (Chen y cols., 2007).

Además, hay un gran interés en el empleo de técnicas de cribado fenotípico traslacionales para el descubrimiento de nuevos fármacos (Warchal y cols., 2016). Estas técnicas permiten la búsqueda de compuestos que producen cambios en el fenotipo fisiopatológico sin necesidad de conocer *a priori* la diana en la que actúan dichos compuestos (Lee y Berg, 2013).

El empleo de técnicas de cribado fenotípico utilizando líneas celulares inmortalizadas de neurona sensorial primaria puede permitir la identificación de nuevos mecanismos terapéuticos mediante

deconvolución. En relación con ello, las nuevas tecnologías de transcriptómica permiten conocer las variaciones en la expresión génica como consecuencia de la diferenciación neuronal y su respuesta a algógenos.

Habida cuenta de estos antecedentes, en la presente tesis doctoral se ha planteado el empleo de líneas de neurona sensorial primaria inmortalizadas para el desarrollo de un nuevo modelo traslacional *in vitro* que permita el cribado de analgésicos para el tratamiento del dolor neuropático. Este nuevo modelo se podría orientar tanto al cribado de fármacos que contrarresten la hiperexcitabilidad neuronal característica de los cuadros de dolor neuropático de origen inflamatorio, como a la búsqueda de fármacos que palién la degeneración axonal de origen iatrogénico. El empleo de técnicas transcriptómicas aplicadas a este nuevo modelo también podría ayudar a la identificación de las dianas y patrones celulares y moleculares relacionados con el daño y con la respuesta a los fármacos.

HIPÓTESIS

“La utilización de líneas celulares inmortalizadas de neuronas de ganglio de raíz dorsal permitiría el desarrollo de modelos traslacionales para la búsqueda de nuevos analgésicos en el tratamiento del dolor neuropático”.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un nuevo modelo de neuronas sensoriales inmortalizadas y poner a punto en él ensayos de cribado de alto rendimiento en farmacología analgésica para dolor neuropático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y caracterizar un modelo de neurona sensorial.
2. Poner a punto un ensayo primario bioquímico de cribado de alto rendimiento en el modelo anterior para estudiar la hiperexcitabilidad en relación con el *lecho doloroso* inflamatorio.
3. Estudiar la respuesta en este modelo a algógenos y a fármacos, y su transcriptómica.
4. Desarrollar un ensayo secundario basado en la imagen para el cribado de alto rendimiento en el modelo anterior en relación con el acortamiento iatrogénico de neuritas.
5. Estudiar en cada caso la transcriptómica en los ensayos desarrollados en relación con la farmacología analgésica.
6. Validar dichos modelos mediante el estudio de la farmacología analgésica en la quimioteca Prestwick® de fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA).





Introducción



3. Introducción

3.1 EL DOLOR

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), el dolor se define como *una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial* (Peirs y Seal, 2016). Esta definición ilustra la naturaleza dual del dolor que, además de ser una experiencia nociceptiva, implica también componentes emocionales y subjetivos. En el año 2018, Cohen y colaboradores actualizaron esta definición enunciando que el dolor es *una experiencia somática mutuamente reconocible que refleja la aprehensión de un individuo ante una amenaza contra su cuerpo o su integridad existencial* (Cohen y cols., 2018).

La finalidad del dolor es servir de alerta ante una agresión externa o un daño interno; sin embargo, en ocasiones el dolor puede dejar de ser un síntoma para llegar a convertirse en una patología *per se*, deviniendo en una dolencia crónica incapacitante para el paciente.

3.1.1 Clasificación del dolor

El dolor se puede clasificar atendiendo a diferentes criterios. Según su intensidad, se han desarrollado varias escalas, tanto visuales como verbales que sirven para que el paciente exprese su nivel de dolor con un valor del 1 al 10, siendo el 0 la ausencia de dolor y 10 el peor dolor imaginable (Chapman y cols., 1985; Von Korff y cols., 1992). Un valor entre 1 y 4 implica que el dolor es leve a moderado; un valor entre 4 y 6 indica que el dolor es moderado a grave y si el valor supera 6, el dolor es intenso (Collins y cols., 1997).

Según la duración del dolor en el tiempo se distinguen dos categorías:

- **Dolor agudo**, que inicialmente se describió como aquel de menos de tres meses de duración, hoy en día se define como aquel que obedece a una lesión desencadenante y cuya evolución natural es una disminución progresiva hasta su desaparición desde el momento en que se cura la lesión subyacente (Mesas-Idáñez, 2012).
- **Dolor crónico**, que es el que se prolonga en el tiempo durante más de seis meses, sea por estar asociado a una patología crónica, sea por extenderse más allá del período de curación de la lesión tisular. El dolor crónico induce cambios fenotípicos en las neuronas que participan en la

transmisión de la señal dolorosa hasta el cerebro (Peirs y cols., 2015).

Según la etiología del dolor, se distinguen tres categorías:

- **Dolor psicógeno**, que consiste en una sensación dolorosa que no responde a ninguna estimulación nociceptiva ni a ninguna alteración neuronal, sino que se debe a una causa psíquica (depresión, hipocondría...), o bien resulta de la intensificación psicógena de un dolor nociceptivo o neuropático que confiere una intensidad desproporcionada a la sensación dolorosa (Pérez Trullén y cols., 2008).
- **Dolor nociceptivo**, que hace referencia a aquellos dolores que se producen como consecuencia de un estímulo lesivo (o potencialmente lesivo) que es detectado por los nociceptores (Bausbaum y Jessell, 2001). Se distinguen dos tipos de dolor nociceptivo según su origen:
 - **Dolor somático**, es decir, dolor producido por la estimulación de los receptores de la piel, los músculos, los huesos y las cápsulas articulares. Este dolor se caracteriza porque su localización es muy precisa (Mesas-Idáñez, 2012).
 - **Dolor visceral**, que se produce por un daño en un órgano interno. Este dolor de localización difusa, que se puede confundir con un dolor somático en

una zona distinta a la de origen del dolor real, se denomina dolor referido (Fitzpatrick y Mooney, 2015a). Además, el dolor visceral puede venir acompañado de reacciones vegetativas (náuseas, vómitos, sudoración...).

- **Dolor neuropático**, que se produce como consecuencia de un daño en el sistema nervioso, que puede ser tanto en el sistema nervioso periférico como en el sistema nervioso central. En ocasiones, se emplea incorrectamente el término dolor crónico como sinónimo de dolor neuropático; sin embargo, no todo dolor crónico es neuropático (el dolor de la artrosis es nociceptivo pero se prolonga en el tiempo). Tampoco todo dolor neuropático es necesariamente crónico (la punzada de dolor que se percibe al golpear la cara externa del codo [*hueso de la risa*], se debe a la compresión momentánea del nervio cubital).

3.2 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NOCICEPTIVO

En la transmisión de la señal dolorosa participan vías nerviosas tanto del sistema nervioso periférico como del sistema nervioso central. Así, el estímulo doloroso se genera cuando se estimulan los nociceptores de las neuronas de primer orden que inervan la piel, los diferentes componentes del sistema locomotor y los órganos internos (Y. Zhang y cols., 2015). Estas neuronas conducen el estímulo

doloroso a las astas dorsales de la médula espinal, donde se produce la sinapsis con las neuronas de segundo orden que transmiten el estímulo hasta los centros supramedulares (principalmente hasta el tálamo, aunque también hasta el bulbo raquídeo, el mesencéfalo, etc.) (Almeida y cols., 2004). La neurona de segundo orden sufre una decusación en el interior de la médula espinal, por lo que una lesión en un lado de la médula espinal produce una pérdida de la sensibilidad dolorosa en el lado opuesto a la lesión medular (Fitzpatrick y Mooney, 2015a). Desde los centros supramedulares se transmite el estímulo nociceptivo a través de las neuronas de tercer orden hasta las áreas de la corteza encargadas de la integrar la experiencia dolorosa, tanto en su vertiente sensorial (corteza somatosensorial), como en su vertiente emocional (circunvolución del cíngulo) (Rathmell y Fields, 2016).

Además de esta vía ascendente, se han descrito una serie de vías descendentes que se encargan de la modulación del estímulo doloroso. Las vías descendentes parten de distintas áreas del encéfalo (como el hipotálamo y el tronco encefálico, entre otras) e interaccionan con las fibras aferentes en las astas dorsales de la médula modulando la señal nociceptiva (**figura 1**) (Dinakar y Stillman, 2016).

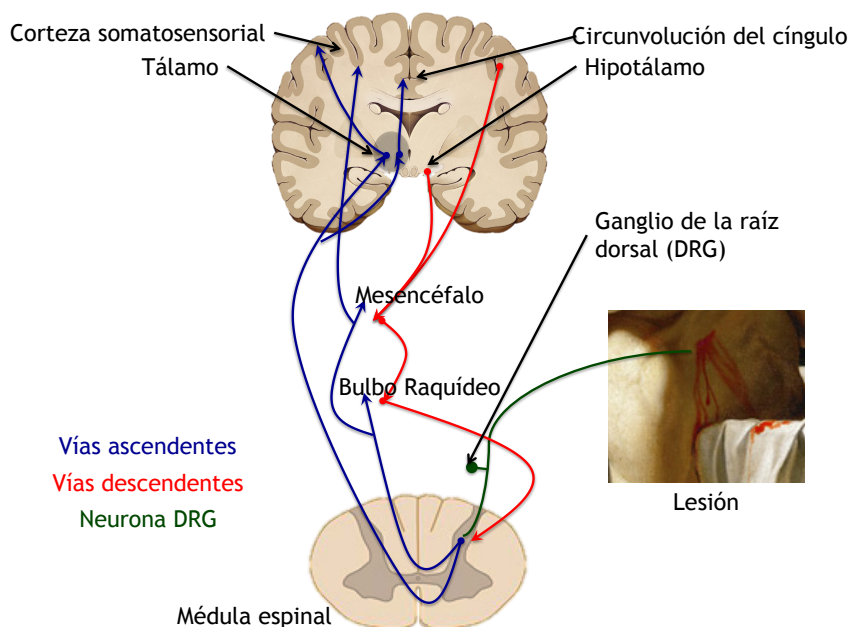


Figura 1. Vías ascendentes y descendentes de transmisión y modulación del dolor. Realizado a partir de Rathmell y Fields, 2016 con imágenes con licencia CC.

3.2.1 La neurona sensorial de primer orden

Las neuronas sensoriales de primer orden son neuronas pseudounipolares cuyos somas o cuerpos celulares se localizan en los ganglios periféricos: en los ganglios trigeminales aquellas que forman parte del nervio trigémino (V par craneal), innervando la cara y transmitiendo los estímulos dolorosos directamente al cerebro, o en los ganglios de la raíz dorsal, las neuronas que transmiten el estímulo nociceptivo a la médula espinal desde el resto del organismo. Por este motivo, a estas últimas neuronas algunos autores las denominan neuronas de ganglio de raíz dorsal. Estas células nerviosas presentan

dos prolongaciones axónicas: una de ellas forma parte del nervio periférico que inerva los miembros, la otra transmite la señal a la segunda neurona de la vía de dolor, estableciéndose la conexión sináptica en el asta dorsal medular (Melli y Höke, 2010).

3.2.1.1 Fibras nerviosas

Las neuronas sensitivas se agrupan formando fibras. Se distinguen varios tipos de fibras nerviosas atendiendo a su diámetro y a la presencia o no de vainas de mielina en torno a ellas (**tabla 1**) (**figura 2**). Cuanto más gruesas sean y más mielinizadas estén las fibras, mayor será la velocidad de conducción del estímulo (Rathmell y Fields, 2016).

Tabla 1. Clasificación de Erlanger-Gasser de las fibras nerviosas participantes en la transmisión de estímulos sensoriales. Adaptado a partir de Gardner y cols., 2001; Fitzpatrick y Mooney, 2015b; Rathmell y Fields, 2016.

Fibra	Grosor (μM)	Mielinizada	Velocidad de conducción (m/s)	Estímulos que transmiten
A α	15	Sí	100	Información sensorial procedente de los músculos
AB	8	Sí	50	Tacto / presión
A γ	6	Sí	20	Información sensorial procedente de los músculos
A δ	<3	Sí, capa fina de mielina	15	Dolor, estímulos térmicos y estímulos mecánicos
B	3	Sí, capa fina de mielina	7	Relacionada con transmisión del sistema nervioso simpático
C	1	No	1	Dolor

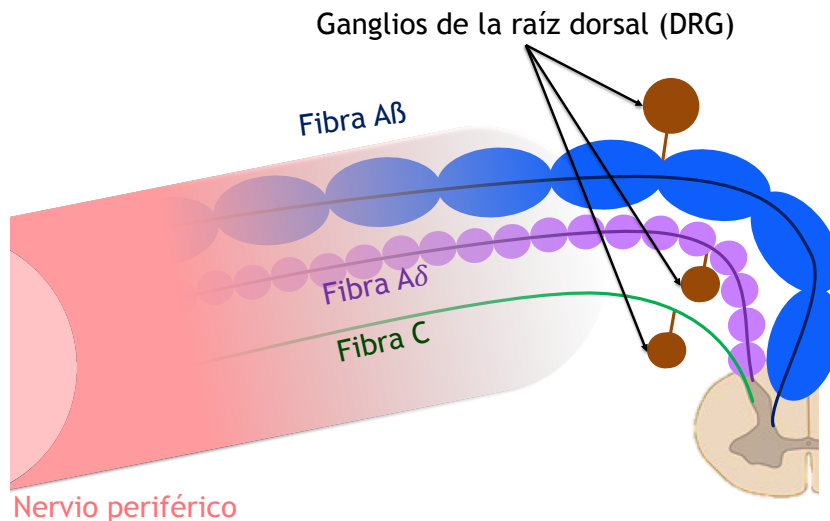


Figura 2. Fibras nerviosas sensoriales A β , A δ y C integradas en el nervio periférico. Realizado a partir de Rathmell y Fields, 2016 con imágenes con licencia CC.

Así pues, las fibras responsables de la transmisión del dolor tanto mecánico como térmico son, única y exclusivamente, las de tipo A δ y las de tipo C. Al aplicar un estímulo doloroso se activan, en primer lugar, las fibras A δ , responsables del denominado *primer dolor*, es decir, el dolor agudo. En caso de que el estímulo sea lo suficientemente intenso, se activarán las fibras C, responsables del *segundo dolor*, es decir, de la sensación de dolor sordo y persistente (Fitzpatrick y Mooney, 2015a).

Tradicionalmente, las neuronas que forman parte de las fibras C se clasifican según la expresión de determinados marcadores (Miller y cols., 2016):

- **Peptidérgicas:** que liberan sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), y expresan el receptor de tropomiosina cinasa A (TrkA), receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF).
- **No peptidérgicas:** que expresan el receptor c-Ret del factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) y que responden a ATP.

Hoy en día, a pesar de que se han descrito neuronas que expresan marcadores de neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas al mismo tiempo, la clasificación tradicional continúa siendo ampliamente utilizada (Usoskin y cols., 2014).

3.2.1.2 Nociceptores

Se denominan nociceptores a las terminaciones especializadas de las neuronas sensoriales de las fibras A δ y C que, en condiciones normales, responden a estímulos térmicos, químicos y mecánicos que pueden resultar lesivos para el organismo (Fitzpatrick y Mooney, 2015a). No obstante, algunos autores utilizan esta denominación para referirse a la totalidad de la neurona de DRG (Dubin y Patapoutian, 2010).

Los nociceptores se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios. Según su localización, se distinguen tres tipos (Raja y cols., 1988):

- **Cutáneos:** los nociceptores de las neuronas integradas en las fibras nociceptivas que inervan la piel de tipo A δ responden a estímulos mecánicos, transmitiendo sensaciones punzantes. Los de las que se integran en las fibras de tipo C responden a estímulos mecánicos, químicos y térmicos.
- **Musculoesqueléticos:** se sitúan en fibras musculares, en las paredes de los vasos y en los tendones. Responden a estímulos de tracción, presión, estímulos térmicos y químicos. Los nociceptores musculares de las neuronas que integran las fibras A δ son mecanorreceptores de alto umbral y polimodales. Los de las fibras de tipo C actúan como receptores polimodales. Asimismo, en las articulaciones se observan también nociceptores, aunque no en el cartílago.
- **Viscerales:** responden a distintos estímulos: mecánicos (tracción o distensión) y químicos (inflamación).

Según el estímulo al que responden los nociceptores, se distinguen tres tipos (Gardner y cols., 2001; Dubin y Patapoutian, 2010):

- **Mecánicos:** responsables de la sensación dolorosa producida por un pinchazo o un pellizco. Se estimulan al producirse un daño celular y liberarse componentes que, en condiciones normales, se encontrarían en el interior de la célula, como protones, ATP o, simplemente, un medio hiperosmótico.
- **Térmicos:** responden a temperaturas extremas (calor o frío). Se han descrito algunas sustancias químicas exógenas que son capaces de estimularlos.
- **Polimodales:** responden a distintos estímulos (térmicos, químicos y mecánicos).

Además, algunos autores distinguen un cuarto tipo de nociceptores atendiendo al estímulo al que responden: los nociceptores silentes. Estos no presentan actividad en condiciones normales; sin embargo, en cuadros de inflamación, son capaces de responder a estímulos mecánicos y térmicos (Schmidt y cols., 1995).

Algunos autores combinan la clasificación de los nociceptores con la de las fibras en que se integran y, de este modo, se distinguen siete grupos de nociceptores principales (**tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación de los nociceptores atendiendo a la fibra a la que pertenecen y al estímulo al que responden. Elaborado a partir de Raja *y cols.*, 1988; Dubin y Patapoutian, 2010).

Fibra	Nociceptor	Estímulos a los que responden
A δ	A-MH II	Térmicos y mecánicos
	A-MH I ¹	Térmicos y mecánicos
	A-M	Mecánicos
C	C-MH	Térmicos y mecánicos
	C-M	Mecánicos
	C-H	Térmicos
	C-MH _i	Receptores silentes

Los nociceptores presentan receptores asociados a canales iónicos que se activan por acción de los estímulos térmicos y mecánicos (**tabla 3**) (Dubin y Patapoutian, 2010). La activación de estos canales genera una despolarización de la membrana plasmática al entrar Na⁺ y Ca²⁺ a favor de gradiente, o bien por la salida a favor de gradiente de Cl⁻. Además, también se observan canales de K⁺ en los nociceptores que, al cerrarse, impiden la salida del ion a favor de gradiente, favoreciendo la hiperpolarización de la membrana (Gold y Gebhart, 2010).

¹ La diferencia entre los nociceptores A-MH II y A-MH I estriba en que los primeros son más sensibles a estímulos mecánicos y menos sensibles a estímulos térmicos que los segundos.

Tabla 3. Canales iónicos que participan en la nocicepción. Elaborado a partir de Dubin y Patapoutian, 2010; Gold y Gebhart, 2010; Cho y cols., 2012, y Nilius y Flockerzi, 2014.

Estímulo	Canal	Ion	Papel en dolor
Calor	TrpV1	Cationes (más afinidad por cationes divalentes)	Se activa a partir de 42 °C. También se activa por capsaicina, mediadores lipídicos, sustancias ácidas y vainilloides. Principal responsable de la percepción del dolor térmico.
	TrpV2	Calcio (Ca ²⁺)	Se activa a partir de 52 °C, aunque el silenciamiento del gen en ratones no parece repercutir en la percepción del dolor térmico.
	TrpV3	Calcio (Ca ²⁺)	Se activa a partir de 33 °C. Irrelevancia en la percepción del dolor térmico.
	TrpV4	Calcio (Ca ²⁺)	Se activa a partir de 27 °C. Irrelevancia en la percepción del dolor térmico.
	ANO1	Cloruro (Cl ⁻)	Se activa a partir de 44 °C, produciendo la salida del ion de la célula e induciendo la despolarización (las neuronas de DRG presentan altas concentraciones intracelulares de Cl ⁻).
	TREK-1 TRAAK	Potasio (K ⁺)	Se activan a partir de 30 °C. Incrementan la tolerancia al calor moderado.
Frío	TrpM8	Cationes (más afinidad por cationes divalentes)	Se activa por debajo de 20 °C. También es activado en presencia de mentol.
	TrpA1	Cationes	Se activa por debajo de 15 °C, aunque su efecto es controvertido (Huang y cols., 2011). También se activa por acroleína, aceite de mostaza o formalina.

Estímulo	Canal	Ion	Papel en dolor
Frio	TREK-1	Potasio (K ⁺)	Permanecen cerrados a baja temperatura, por lo que favorecen la sensibilidad al frío.
	TRAAK		
Estímulos mecánicos	TrpV1	Cationes (más afinidad por cationes divalentes)	Causante de la hipersensibilidad al dolor en las zonas quemadas. También en dolor por hiperosmoticidad.
	TrpV4	Calcio (Ca ²⁺)	Participa en dolor por hiperosmoticidad y en modelos <i>in vivo</i> de dolor.
	TrpA1	Cationes	Participa en dolor por presión y en modelos <i>in vivo</i> en que se emplean filamentos de von Frey.
	ASIC	Protones (H ⁺)	Efectos contradictorios en sensibilidad a dolor por traumatismo.
	Kv3.4	Potasio (K ⁺)	Reduce la excitabilidad de los nociceptores ante estímulos mecánicos.
	Kv4.3		
	TREK-1	Potasio (K ⁺)	Se activan en los modelos de dolor <i>in vivo</i> en que se emplean filamentos de von Frey. También participan en el dolor osmótico.
	TRAAK		

Además, en los nociceptores se han descrito receptores para mediadores secretados por células adyacentes a las neuronas sensoriales (como los queratinocitos de la piel, células del sistema inmunológico, células tumorales u otras neuronas), o incluso por bacterias (**tabla 4**) (Moalem y Tracey, 2006). Estos mediadores reducen, en muchos casos, el umbral de excitación de los canales iónicos, incrementando la respuesta a los estímulos nociceptivos; a consecuencia de ello, estímulos que en condiciones normales no

serían dolorosos, inducirían esa sensación. Este proceso patológico recibe el nombre de sensibilización (Gold y Gebhart, 2010). Además, la liberación de estos mediadores por las células adyacentes a las neuronas puede, en algunos casos, estimular la liberación de mediadores inflamatorios como CGRP o sustancia P por las propias neuronas de DRG (Julius y Basbaum, 2001; de Oliveira y cols., 2011). También se ha descrito la liberación de mediadores que pueden reducir la sensibilidad de los nociceptores (Du y cols., 2017).

Tabla 4. Mediadores que modifican la sensibilidad de los nociceptores, tanto incrementando la sensibilidad dolorosa (proalgésicos) como reduciéndola (analgésicos).

	Mediadores	Receptores	Efectos en la neurona
Proalgésicos	Acetilcolina	Receptores muscarínicos y nicotínicos	Incrementa sensibilidad del canal TrpA1, reduce la hiperpolarización causada por la activación de canales de potasio e induce la despolarización de la membrana (Zhang y cols., 2015; Busserolles y cols., 2016)
	Angiotensina II	Receptores AT ₂	Incrementa la sensibilidad del canal TrpV1 a través de la vía de las MAPK (Rice y Smith, 2015).
	ATP	Receptores P2X	Canales para cationes. Especialmente P2X ₁₋₃ y P2X ₅ incrementan la sensibilidad al dolor (Chen y cols., 2016).
		Receptores P2Y	El ATP actúa en neuronas DRG a través de P2Y ₁ y P2Y ₂ , sensibilizando al canal TrpV1 (Fischer y cols., 2010).

Mediadores		Receptores	Efectos en la neurona	
Proalérgicos	Bradicinina	BK ₁ (inducido)	Activa receptores acoplados a proteínas G _q y G _i . Sensibiliza canales como TrpV1 y, además, induce la liberación de mediadores inflamatorios por las neuronas (como NGF, TNF o interleucinas) (Fischer y cols., 2010).	
		BK ₂		
	CGRP	Receptor de CGRP	Participa en el mantenimiento de la sensibilización neuronal en las neuronas de DRG. Es secretado por las propias neuronas de DRG (Bullock y cols., 2014).	
	Citocinas	TNF α	TNFR1 y TNFR2	Inducen la liberación de otras citocinas y presentan efectos sensibilizantes <i>per se</i> (Fischer y cols., 2010).
		Il-1 β	Receptor de interleucina 1 β	
		Il-6	Receptor de interleucina 6 + Receptor soluble	
	Glutamato	Receptor N-metil-D-aspartato (NMDA)	Sensibilización de las neuronas de DRG. Es secretado por las propias neuronas de DRG (Huettner y cols., 2002).	
Histamina	H ₁	Asociado a proteínas G _{q/11} . Induce nocicepción, aunque es más importante su papel en la generación de picor (Fischer y cols., 2010).		

Mediadores		Receptores	Efectos en la neurona
Neurotrofinas	NGF	TrkA	Sensibilización de la neurona por activación de tirosina cinasas SRC y MAP cinasas que potencian la activación del canal TrpV1. Además, en exposiciones largas incrementa los niveles de sustancia P y CGRP (Fischer y cols., 2010).
	BDNF	TrkB	Participa en la sensibilización en cuadros de dolor visceral (Xia y cols., 2016).
Óxido nítrico (NO)		Estimula al enzima GC (guanilato ciclasa)	Induce un incremento de GMP _c en la célula, que provoca una sensibilización (Borsani y cols., 2013). Además, induce un incremento en la producción de prostaglandinas.
Procineticina 1 y procineticina 2		Receptores PKR	Sensibilización del canal TrpV1 (Fischer y cols., 2010).
Prostaglandinas	PGE ₂	Receptores EP	Activación de receptores acoplados a la proteína G _s , incrementándose los niveles de AMP _c intracelular y estimulando PKA. Sensibiliza canales de sodio y potasio; induce el cierre de canales de potasio (Fischer y cols., 2010).
	PGI ₂	Receptores IP	
Proteasas		Receptores activados por proteasas	Sensibilización del canal TrpV1 (Fischer y cols., 2010).

Proalgénicos

	Mediadores	Receptores	Efectos en la neurona
Proalgésicos	Protones (pH < 5)	ASIC	No está clara su participación en la sensibilización de los nociceptores puesto que a pH < 5 se bloquea la conducción nerviosa. Probablemente contribuya a la sensibilización inflamatoria provocada por otros mediadores (Fischer y cols., 2010).
	Serotonina	5-HT ₃	Canal permeable a cationes cuya activación induce la despolarización de la membrana plasmática (Fischer y cols., 2010).
		5-HT _{2A}	Asociado a proteínas G _{q/11} . Incrementa la sensibilidad al dolor (Fischer y cols., 2010).
		5-HT ₁	Participa en la sensibilización de las neuronas del nervio trigémino (Fischer y cols., 2010).
	Sustancia P	Receptor NK ₁	Sensibilización de las neuronas de DRG. Secretado por las propias neuronas de DRG (Moraes y cols., 2014).
Analgésicos	Adenosina	Receptores P1	Se postula que la adenosina podría ejercer un efecto analgésico en la periferia (Katz y cols., 2015).
	Cannabinoides endógenos	CB ₁	Reduce la transmisión de la señal dolorosa a lo largo de la neurona de DRG (Veress y cols., 2013).
	GABA	GABA _B	Reduce la excitabilidad de las neuronas de DRG mediada por el canal TrpV1 (Hanack y cols., 2015).

	Mediadores	Receptores	Efectos en la neurona
Analgésicos	Opioides endógenos	Receptores opioides (μ , κ y δ)	Inhibición de canales TrpV1 y de la conducción del estímulo nervioso (Stein, 2016).
	Resolvinas	Receptores para resolvinas (ChemR23)	Inhibición del canal TRPV1 (Ji y cols., 2016)

La exposición de las neuronas de DRG a los mediadores sensibilizantes induce la fosforilación de los canales iónicos responsables de la percepción de los estímulos nociceptivos y de la transmisión de la señal dolorosa a través de la neurona de DRG. Además, la exposición prolongada a estos agentes sensibilizantes también genera modificaciones en la expresión de los canales y de los receptores, que incrementan la sensación dolorosa. Estas modificaciones se pueden deber a la activación de varias vías de señalización celular (Fischer y cols., 2010):

- **Proteína cinasa A (PKA):** se activa como consecuencia del incremento de la concentración intracelular de AMP_c, incrementando la sensibilidad de los canales Trp y la conducción de la señal dolorosa a lo largo de la neurona de DRG (Zhu y cols., 2014).
- **Proteína cinasa C (PKC):** existen varias isoformas del enzima, algunas de las cuales se activan a causa de un incremento en la concentración de calcio intracelular.

Entre estas se encuentra la PKC ϵ , responsable del cebado de los nociceptores (Bogen y cols., 2012) (véase pág. 75).

- **Cinasa Src:** esta tirosina cinasa es responsable de la sensibilización celular a través del canal TrpV1 como consecuencia de la exposición de la neurona a NGF. Asimismo, se ha descrito que esta cinasa es la responsable del incremento en la secreción de sustancia P como consecuencia de la exposición de las neuronas de DRG a mediadores inflamatorios como la interleucina 1 β (Zhu y cols., 2014).
- **Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK):** a pesar de que se conoce mejor el papel de estas enzimas en la sensibilización al dolor en el sistema nervioso central (SNC), se ha descrito cómo algunos de ellos (ERK, p38, c-Jun) contribuyen a la sensibilización de las neuronas de DRG.
- **Fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂):** el incremento de este mediador intracelular se relaciona con una sensibilización de la neurona de DRG a causa del incremento en la actividad de los canales Trp.

La exposición continuada de la neurona de DRG a mediadores sensibilizantes causa una reducción en el umbral de activación de los receptores presentes en los nociceptores y un incremento en la

actividad de los canales responsables de la transmisión de la señal dolorosa, que incluso puede afectar a áreas contiguas a la de la lesión. La sensibilización se puede prolongar en el tiempo incluso después de que haya cesado la liberación de los mediadores; esto se denomina cebado de los nociceptores (*nociceptor priming*) (Kandasamy y Price, 2015).

3.2.1.3 Transmisión del impulso nervioso a lo largo de las neuronas nociceptivas

La transmisión del impulso nervioso a lo largo de la neurona de DRG se realiza gracias a la acción de canales de sodio, potasio y calcio sensibles a voltaje (Fitzpatrick y Mooney, 2015a). En primer lugar, se produce una despolarización mediada por los canales de sodio dependientes de voltaje (que introducen el catión en la célula a favor de gradiente). Posteriormente, se abren los canales de calcio dependientes de voltaje, introduciendo calcio en la célula e induciendo la liberación de mediadores; por último, se abren los canales de potasio para dejar salir el ion, restableciéndose el potencial de la membrana en reposo (Lee y cols., 2005).

3.2.1.3.1 Canales de calcio

Los canales de calcio dependientes de voltaje se componen de cuatro subunidades α_1 , que conforman el poro, y una serie de subunidades auxiliares: β , $\alpha_2\delta$ (constituida por dos proteínas: α_2 ,

extracelular, y δ , anclada a la membrana) y γ (**figura 3**) (Dolphin, 2016).

De esta manera, se distinguen cinco familias de canales de calcio dependientes de voltaje según la subunidad α_1 que poseen: canales de calcio de tipo L, de tipo P/Q, de tipo N, de tipo R y de tipo T. Las cuatro primeras familias se activan por alto voltaje y los canales de tipo T, se activan por bajo voltaje (**tabla 5**) (Marais y cols., 2001). Todos ellos presentan subunidades auxiliares que modulan su activación salvo el canal de calcio de tipo T (Pérez-Reyes, 2003).

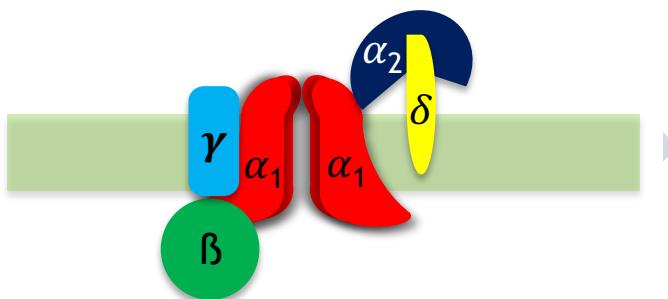


Figura 3. Estructura de los canales de calcio activados por voltaje. Elaborado a partir de Catterall, 2011.

Tabla 5. Clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje. Elaborado a partir de Khakh y cols., 2001; Bourinet y cols., 2014.

Activación por voltaje	Tipo	Canal	Subunidad α_1
Alto	L	Cav1.1	α_{1S}
		Cav1.2	α_{1C}
		Cav1.3	α_{1D}
		Cav1.4	α_{1F}
	P/Q	Cav2.1	α_{1A}
	N	Cav2.2	α_{1B}
Bajo	T	Cav3.1	α_{1G}
		Cav3.2	α_{1H}
		Cav3.3	α_{1I}
	R	Cav2.3	α_{1E}

De todos ellos, los canales de calcio de tipo N han sido los más estudiados en cuanto a su contribución a la transmisión dolorosa a través de las neuronas de DRG; así pues, se ha descrito que la ω -conotoxina, fármaco inhibidor selectivo de canales de calcio de tipo N, es capaz de bloquear la transmisión del impulso doloroso (Murakami y cols., 2001). También se ha caracterizado la importancia de los canales de calcio tipo T en la transmisión de la señal dolorosa (Coste y cols., 2007). Recientemente, se ha descrito el papel de los canales de calcio de tipo R y L en la transmisión del impulso doloroso a lo largo de la neurona de DRG (Fang y cols., 2010; Fossat y cols., 2010). En cuanto a los canales de calcio de tipo P/Q, parecen ejercer

un efecto inhibitorio sobre la transmisión de la señal dolorosa (Araque y cols., 1994; Fukumoto y cols., 2009).

Las subunidades $\alpha_2\delta$ modulan la activación de los canales de calcio dependientes de alto voltaje (tipo N, P/Q, R y L) (Catterall, 2011). La expresión de la subunidad $\alpha_2\delta_1$ se incrementa cuando se produce un daño en la neurona de DRG, constituyendo un marcador de dolor neuropático y la diana de los gabapentinoides, fármacos empleados para el tratamiento de este tipo de dolor (Nieto-Rostro y cols., 2014).

3.2.1.3.2 *Canales de sodio*

Los canales de sodio dependientes de voltaje permiten la entrada de sodio al interior de la célula a favor de gradiente de concentración. Su activación y apertura se produce cuando el potencial transmembrana alcanza un valor umbral, momento en que se abren dejando pasar al ion, con lo que se produce la despolarización de la membrana plasmática. Sin embargo, si la despolarización es prolongada, estos canales se inactivan, impidiendo el paso de los iones a pesar de que el potencial de membrana sea superior al valor umbral. Una vez que la célula se ha repolarizado, los canales de sodio permanecen cerrados, pero son susceptibles de abrirse en caso de que el potencial de membrana vuelva a superar el valor umbral (Catterall, 2014; Augustine, 2015) (**figura 4**).

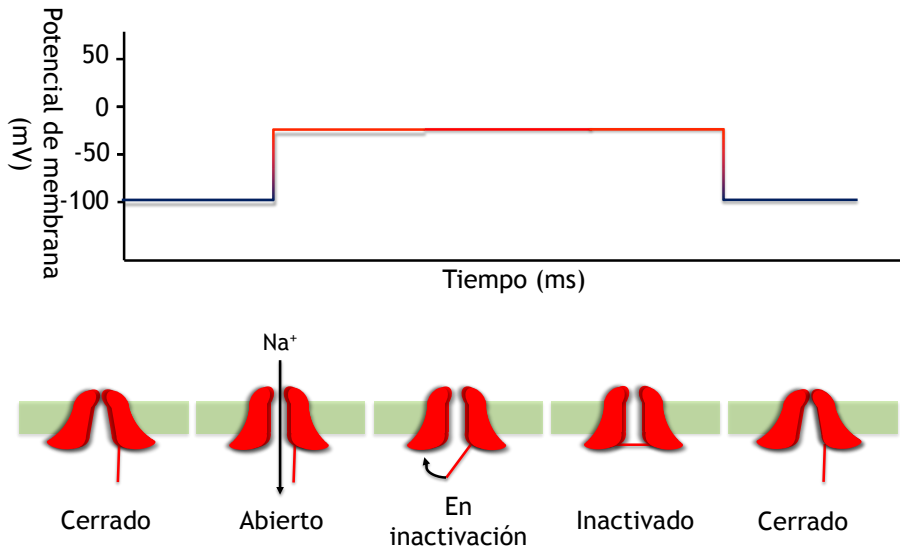


Figura 4. Estados funcionales del canal de sodio dependiente de voltaje. Elaborado a partir de Augustine, 2015.

Los canales de sodio dependientes de voltaje se componen de una subunidad α que posee cuatro dominios homólogos formando el poro a través del cual penetra el ion al interior de la célula. A esta subunidad α se asocian las subunidades β , que modulan el tránsito de iones a través del canal y contribuyen a estabilizar la proteína en el seno de la membrana plasmática (Namarudai y cols., 2014; Foadi, 2018) (**figura 5**).

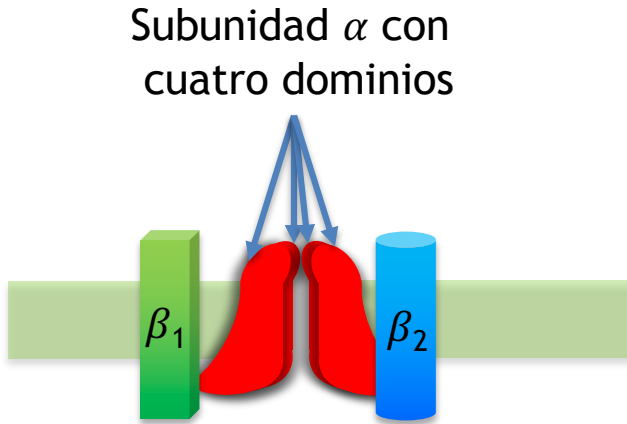


Figura 5. Estructura de los canales de sodio activados por voltaje. Elaborado a partir de Catterall, 2014.

Existen nueve isoformas de la subunidad α que permiten distinguir nueve tipos de canales de sodio dependientes de voltaje. Estos nueve tipos se clasifican en dos grandes grupos: canales de sodio sensibles a TTX (tetrodotoxina) y canales de sodio resistentes a TTX (**tabla 6**). La TTX es una neurotoxina de origen natural que se une a la subunidad α , impidiendo la entrada de sodio en la célula (Nieto y cols., 2008).

Tabla 6. Clasificación de los canales de sodio dependientes de voltaje. Elaborado a partir de Nieto y cols., 2012.

Sensibilidad a TTX	Canales de sodio
Sensibles a TTX	Nav1.1
	Nav1.2
	Nav1.3
	Nav1.4
	Nav1.6
	Nav1.7
Resistentes a TTX	Nav1.5
	Nav1.8
	Nav1.9

En las neuronas de DRG se expresan de manera significativa los canales Nav1.1, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 (Deuis y cols., 2017). Además, se ha demostrado que la expresión de los canales Nav1.3 y Nav1.5 se incrementa en modelos de dolor neuropático; los niveles de estas proteínas son prácticamente indetectables en condiciones normales en neuronas sensoriales a pesar de que ambos se expresan en neuronas de DRG embrionarias (Dib-Hajj y cols., 2010; Yin y cols., 2015).

Se ha descrito la importancia del canal Nav1.1 para la conducción del estímulo doloroso a través de las neuronas de DRG que forman parte de las fibras nerviosas de tipo A δ (Osteen y cols., 2016). El canal de sodio Nav1.6 se expresa en las zonas de la neurona de DRG

más cercanas al nociceptor y su acción se relaciona con el dolor neuropático inducido por el antitumoral oxaliplatino (Qin y cols., 2017). Sin embargo, los tres canales de sodio cuya importancia en la transmisión del dolor ha sido más extensamente estudiada son $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ y $\text{Na}_v1.9$ (Foadi, 2018):

- El canal **$\text{Na}_v1.7$** induce la generación de potenciales de acción en neuronas de DRG y las mutaciones que inducen la pérdida de función del canal se relacionan con síndromes familiares de insensibilidad a dolor (Cummings y cols., 2007; Waxman, 2007).
- El canal **$\text{Na}_v1.8$** es el principal responsable de la despolarización de la membrana de las neuronas de DRG al transmitirse el estímulo doloroso (Jarvis y cols., 2007).
- El canal **$\text{Na}_v1.9$** mantiene el potencial de membrana de reposo al mantenerse abierto aún cuando la membrana plasmática está hiperpolarizada. Al impedir la hiperpolarización excesiva de la membrana, permite que la célula experimente despolarizaciones repetidas para transmitir la señal nerviosa (Coste y cols., 2004, 2007).

3.2.1.3.3 *Canales de potasio*

Los canales de potasio activados por voltaje se encargan de expulsar este ion desde el interior de la célula, permitiendo la repolarización de esta tras el potencial de acción y determinando la

frecuencia con que se lleva a cabo la transmisión de la señal dolorosa a lo largo de la neurona de DRG.

Entre los canales de potasio activados por voltaje se observa una gran variabilidad. Esto se debe a que el canal está formado por cuatro subunidades de diez familias (K_v1 a K_v10) (**tabla 7**) que pueden ser iguales o diferentes (aunque siempre se asocian con subunidades de la misma familia, salvo las subunidades de las familias K_v5 , K_v6 , K_v8 y K_v9 que se asocian con las de la familia K_v2); además, a los canales se pueden asociar subunidades modificadoras β que también modifican las propiedades del canal (Gutman y cols., 2005).

Tabla 7. Clasificación de las subunidades K_v de los canales de potasio dependientes de voltaje. Elaborado a partir de Gutman y cols., 2005.

Familia	Subunidades
K_v1	$K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v1.5$, $K_v1.6$, $K_v1.7$, $K_v1.8$
K_v2	$K_v2.1$, $K_v2.2$
K_v3	$K_v3.1$, $K_v3.2$, $K_v3.3$, $K_v3.4$
K_v4	$K_v4.1$, $K_v4.2$, $K_v4.3$
K_v5	$K_v5.1$
K_v6	$K_v6.1$, $K_v6.2$, $K_v6.3$, $K_v6.4$
K_v7	$K_v7.1$, $K_v7.2$, $K_v7.3$, $K_v7.4$, $K_v7.5$
K_v8	$K_v8.1$, $K_v8.2$
K_v9	$K_v9.1$, $K_v9.2$, $K_v9.3$
K_v10	$K_v10.1$, $K_v10.2$
K_v11 y K_v12	$K_v11.1$, $K_v11.2$, $K_v11.3$, $K_v12.1$, $K_v12.2$, $K_v12.3$

De entre todos los canales de potasio dependientes de voltaje, en la transmisión de la señal dolorosa a lo largo de las neuronas de DRG se ha verificado la participación de las subunidades $K_v1.1$ y $K_v1.2$, $K_v2.1$ y $K_v2.2$, $K_v4.3$, $K_v7.2$ y $K_v7.3$, y $K_v9.1$, además de la familia K_v3 (Busserolles y cols., 2016). $K_v1.1$ y $K_v2.2$ determinan el umbral de excitabilidad de las neuronas de DRG y, por tanto, condicionan la frecuencia con que se genera el potencial de acción en las células a la hora de transmitir la señal dolorosa (Zhao y cols., 2013; Busserolles y cols., 2016). Los canales de la familia K_v2 se abren tras despolarizaciones prolongadas induciendo la repolarización de la membrana de las neuronas y condicionando la duración del periodo refractario durante el que no se generan potenciales de acción (Tsantoulas y cols., 2014). Además, en neuronas de las fibras $A\delta$ a las subunidades K_v2 se les asocian subunidades $K_v9.1$, incrementando la salida de potasio a través de los canales y reduciendo la excitabilidad neuronal (Tsantoulas y cols., 2012). También los canales de la familia K_v3 limitan la duración de los potenciales de acción y, por lo tanto, la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas (Rudy y McBain, 2001). Las subunidades $K_v7.2$ y $K_v7.3$ forman los canales de tipo M, canales de potasio que sufren regulación negativa por la acción de mediadores que se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) asociados a la proteína $G_{q/11}$, como angiotensina, acetilcolina, bradicinina o proteasas, y que participan en la

hiperpolarización de la membrana celular y en el mantenimiento del potencial de reposo (Du y cols., 2014; Busserolles y cols., 2016).

Además de los canales de potasio dependientes de voltaje, se ha verificado la participación de otros canales de potasio en la transmisión del impulso doloroso desde los nociceptores de las neuronas de DRG hasta las astas dorsales medulares. Anteriormente, se expuso el papel de TRAAK y TREK, canales de potasio de dos poros (K2P), en la percepción del estímulo nociceptivo (véase pág. 67). También se ha estudiado la participación de los canales de potasio activados por calcio BK_i en la hiperpolarización de la membrana de las neuronas de DRG (Li y cols., 2007).

3.2.1.3.4 Canales activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN)

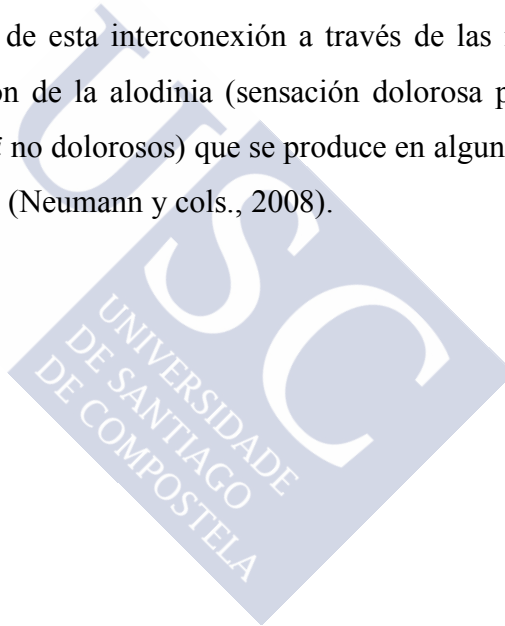
Los canales HCN se activan cuando se produce la hiperpolarización de la membrana plasmática, manteniendo el potencial de reposo al ser permeables a los iones sodio y potasio (esta corriente de iones activada por la hiperpolarización se simboliza como I_h). Además, los canales HCN presentan dominios de unión a nucleótidos cíclicos como el AMP_c , que incrementan el paso de iones a través del canal (Benarroch, 2013). Se han descrito cuatro clases de canales HCN: HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4; en las neuronas de

DRG que transmiten el estímulo doloroso predominan los de tipo HCN2 (Fischer y cols., 2010). Esta familia de canales muestra una gran dependencia de AMP_c, de manera que, si por efecto de los mediadores inflamatorios se incrementan los niveles de AMP_c, se incrementa también el potencial de membrana y se generan con más facilidad los potenciales de acción, favoreciéndose la transmisión de la señal dolorosa desde la periferia hacia el sistema nervioso central (Emery y cols., 2011). El canal HCN2 también es susceptible de sufrir activación en caso de que el pH descienda, lo que ocurre cuando se produce un cuadro inflamatorio (Zong y cols., 2001).

3.2.2 La sinapsis entre la neurona de DRG y la neurona sensorial de segundo orden en el asta dorsal

La neurita de la neurona de DRG penetra en la médula espinal por la raíz dorsal a través del surco dorsolateral. Una vez que los axones alcanzan el asta dorsal de la médula, se ramifican formando el tracto dorsolateral de Lissauer, dirigiéndose hacia arriba o hacia abajo antes de penetrar en la sustancia gris del asta dorsal. En el asta dorsal se distinguen las denominadas láminas de Rexed, donde las neuronas de DRG establecen conexiones sinápticas con las neuronas de segundo orden (Fitzpatrick y Mooney, 2015a). Las aferencias nociceptivas establecen sinapsis con neuronas secundarias en las láminas más superficiales, mientras que las aferencias no nociceptivas llegan a las más profundas (**figura 6**).

En las láminas del asta dorsal se ha descrito la presencia de interneuronas, que regulan positiva o negativamente la transmisión de la señal dolorosa conectando diferentes láminas del asta dorsal (Peirs y Seal, 2016). Las interneuronas expresan la proteína cinasa $C\gamma$ (PKC γ) y reciben señales procedentes de las neuronas no nociceptivas de las áreas más profundas del asta dorsal, modulando la sinapsis de las neuronas nociceptivas de las láminas superficiales. Se ha postulado que la existencia de esta interconexión a través de las interneuronas puede ser la razón de la alodinia (sensación dolorosa producida por estímulos *a priori* no dolorosos) que se produce en algunos cuadros de dolor neuropático (Neumann y cols., 2008).



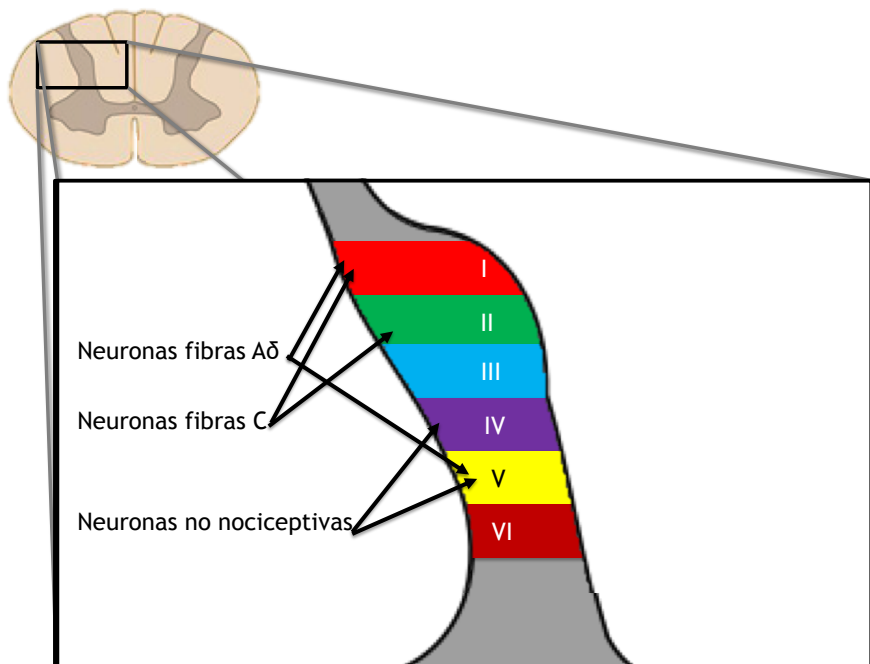


Figura 6. Aferencias sensoriales en el asta dorsal medular. Elaborado a partir de Basbaum y cols., 2009; Peirs y Seal, 2016 con imágenes de dominio público.

En la sinapsis entre la neurona de DRG y la neurona de segundo orden en el asta dorsal participan tres tipos de neurotransmisores: aminoácidos, neuropéptidos y ATP. Entre los aminoácidos excitadores destaca el glutamato, que en caso de dolor agudo es liberado por la neurona presináptica y ejerce su acción en receptores ionotrópicos glutamatérgicos del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y de kainato en la terminación postsináptica (Basbaum y cols., 2009). En cuadros de dolor crónico, cuando se produce una liberación repetida y abundante de glutamato por las neuronas de DRG, se activan en la neurona de segundo orden

los receptores del N-metilaspártato (NMDA) y metabotrópicos de glutamato (Dickenson, 1995). El glutamato ejerce su acción de manera local puesto que, tras su liberación, es recaptado por acción de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) presentes en la neurona de DRG (Wang y cols., 2016).

De entre los neurotransmisores neuropeptídicos que participan en la sinapsis entre la neurona de DRG y la neurona de segundo orden destacan la sustancia P y el CGRP. Ambos péptidos ejercen una función sensibilizante sobre la neurona de segundo orden, incrementando la respuesta del glutamato al sensibilizar los receptores NMDA postsinápticos (Basbaum y cols., 2009). Otro neuropéptido que participa en esta sinapsis es la somatostatina, cuyo receptor (SST_{2A}) en el asta dorsal ha emergido como posible nueva diana para el desarrollo de analgésicos (Shi y cols., 2014). Los neuropéptidos no son recaptados inmediatamente, tal y como sucede con el glutamato, sino que pueden difundir e interactuar con los receptores presentes en otras neuronas de segundo orden; se cree que este es el motivo de que se presente, en ocasiones, un dolor con localización difusa (Basbaum y cols., 2009).

Asimismo, en el asta dorsal tanto la neurona de DRG como la neurona de segundo orden se ven sometidas a señales excitadoras e inhibitoras por parte de las interneuronas, que modulan la señal

nociceptiva (Yasaka y cols., 2010). En este proceso participan diversos neurotransmisores como los opioides endógenos, el neuropéptido Y o la galanina (Yasaka y cols., 2010; Lemons y Wiley, 2011; Peirs y cols., 2015).

3.3 EL DOLOR NEUROPÁTICO

Los cuadros de dolor neuropático se caracterizan por una serie de sensaciones dolorosas distintas de las que se producen en un cuadro de dolor nociceptivo (Woolf y Mannion, 1999); en algunos casos pueden aparecer ambas al mismo tiempo, o bien solamente una de ellas:

- **Dolor paroxístico:** se trata de un dolor persistente cuyo origen no obedece a ningún estímulo. Los pacientes describen este dolor como punzante, urente, lancinante o quemante.
- **Hiperalgnesia y alodinia:** se trata de dos percepciones dolorosas exageradas en respuesta a un estímulo. La hiperalgnesia se define como un dolor originado por un estímulo que, en condiciones normales, suscitaría un dolor no tan intenso como el experimentado por el paciente; la alodinia es la sensación dolorosa suscitada por un estímulo *a priori* no doloroso. En la práctica clínica es complicado distinguir ambos síntomas, por lo que se engloban bajo el calificativo de hiperalgnesias. Las

hiperalgesias se pueden clasificar según la naturaleza del estímulo que origine el dolor; así, se habla de hiperalgesias químicas, térmicas o mecánicas. Las hiperalgesias mecánicas se pueden clasificar, a su vez, en hiperalgesias mecánicas dinámicas, si son suscitadas por el roce, o hiperalgesias mecánicas estáticas, si es una presión la que las desencadena (Koltzenburg y cols., 1992).

En ocasiones, el dolor neuropático se asocia con la pérdida de la sensibilidad en las zonas afectadas, sea total (anestesia) o parcial (hipoestesia), o incluso con sensaciones anormales (parestesias) (Black y cols., 1999). Asimismo, también se han descrito trastornos motores asociados a cuadros de dolor neuropático (Costigan y cols., 2009).

3.3.1 Patologías que cursan con dolor neuropático

El dolor neuropático es un síntoma cuyas causas pueden ser extremadamente variadas. De esta manera, los cuadros de dolor neuropático se pueden clasificar según su etiología y la zona a la que afectan (**tabla 8**) (Colloca y cols., 2017):

- **De origen central:** se debe a una lesión o enfermedad que afecta al cerebro o a la médula espinal. Entre las patologías que afectan al cerebro y que producen dolor


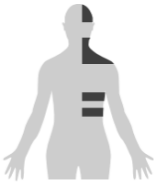




neuropático se encuentran algunos accidentes cerebrovasculares (especialmente aquellos que afectan al lóbulo parietal o al tálamo) y enfermedades neurodegenerativas como el párkinson (Harrison y Field, 2015). Entre las enfermedades que producen dolor neuropático por afectación de la médula espinal destacan las lesiones traumáticas medulares, la formación de quistes o tumores medulares y algunas patologías desmielinizantes como la esclerosis múltiple o la mielitis transversa.

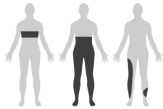


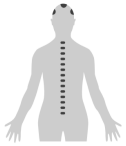
- **De origen periférico:** se distinguen dos tipos de cuadros de dolor neuropático causado por un daño en el sistema nervioso periférico según la localización del dolor:
 - **Dolor generalizado** (normalmente en áreas simétricas del organismo): este cuadro es característico de las neuropatías periféricas causadas por enfermedades como la diabetes mellitus, por infecciones (sean víricas como la del VIH o bacterianas como la causada por el *Mycobacterium leprae*), por enfermedades autoinmunes (como el síndrome de Guillain-Barré) o inflamatorias, o por enfermedades genéticas que cursan con neuropatías. También hay algunos fármacos entre cuyos efectos adversos se

encuentra el dolor neuropático como algunos antitumorales (por ejemplo, los complejos de platino, los alcaloides de la vinca o los taxanos) o los antirretrovirales. Estos cuadros de dolor neuropático generalizado suelen afectar a las zonas distantes de las extremidades (pies, manos, pantorrillas y antebrazos), y es por ello por lo que, en ocasiones, reciben el nombre de neuropatías en *guante y calcetín*.

- **Dolor focal:** el dolor en el área de inervación de un único nervio es característico de la neuralgia post-herpética, radiculopatías lumbares o cervicales, dolor por compresión de un nervio (como el que se produce en algunas metástasis, en el neuroma de Morton o síndrome del túnel carpiano), en neuropatías postraumáticas o postquirúrgicas o en la neuralgia del trigémino. También en algunos cuadros infecciosos o en pacientes diabéticos se puede manifestar un dolor neuropático focal. Asimismo, el dolor focal es característico del síndrome doloroso regional complejo (CRPS) de tipo 2, una patología que cursa con dolor espontáneo y evidencias de daño en el nervio periférico de causa desconocida (Bruehl, 2015).

Tabla 8. Áreas corporales afectadas por el dolor en los diferentes cuadros que cursan con dolor neuropático. Adaptado a partir de Colloca y cols. 2017 con permiso de Springer-Nature.

Origen	Cuadro	Área afectada	
Periférico	Neuralgia del trigémino	Cara o cavidad bucal (zona inervada por el nervio trigémino, V par craneal).	
	Neuralgia postherpética	Distribución unilateral en áreas inervadas por un único nervio espinal o por el nervio trigémino.	
	Dolor por lesión en nervio periférico	Área inervada por el nervio dañado (distal al lugar donde tuvo lugar la cirugía, trauma o compresión).	
	Dolor del miembro fantasma	En una extremidad amputada o en el muñón.	
	Polineuropatía	En los pies, manos, pantorrillas y antebrazos.	
	Radiculopatía	En el área inervada por el nervio cuya raíz ha sido comprimida	

Origen	Cuadro	Área afectada	
Central	Dolor neuropático asociado con una lesión medular	Zonas situadas por debajo de la lesión medular, o en la zona de la lesión.	
	Dolor neuropático producido por un accidente cerebrovascular	Áreas contralaterales al hemisferio cerebral en que se produjo el infarto.	
	Dolor neuropático producido por un infarto medular	Áreas contralaterales del tronco y de las extremidades con respecto al lado de la médula en que se produjo el infarto e ipsilateral de la cara.	
	Dolor asociado a esclerosis múltiple	Distribución variable del dolor.	

3.3.2 Modificaciones fisiológicas y anatómicas producidas por el dolor neuropático periférico

El daño a un nervio periférico conlleva una serie de cambios en la fisiología e, incluso, en la anatomía de todos los componentes que intervienen en las rutas que participan en la transmisión de la señal dolorosa desde la periferia hasta el sistema nervioso central y en la percepción (tanto sensorial como emocional) del dolor (Cohen y Mao,

2014). Estos procesos conllevan el desarrollo de un estado de hiperexcitabilidad que se conoce como sensibilización periférica.

3.3.2.1 En el sistema nervioso periférico

El daño en el nervio periférico conlleva una estimulación repetida del sistema nociceptivo que da lugar a modificaciones en la neurona de DRG. Además, la secreción por parte de la neurona de DRG de sustancia P y CGRP incrementa la permeabilidad vascular, produciéndose la extravasación de células del sistema inmunológico, que producen mediadores inflamatorios como bradicinina, prostaglandinas, histamina o serotonina, induciendo una sensibilización de la neurona de DRG (Julius y Basbaum, 2001). Además de la sensibilización de los receptores (véase pág. 69), el efecto de la estimulación repetida y de los mediadores inflamatorios produce cambios en la expresión de canales iónicos, cambios fenotípicos y la pérdida de fibras nerviosas (Cohen y Mao, 2014):

- **Cambios en la expresión de los canales iónicos:** una lesión en una fibra nerviosa induce un incremento en la expresión de los canales de sodio $Na_v1.3$, $Na_v1.7$ y $Na_v1.8$. Como consecuencia de esto, se reduce el umbral de estimulación de la neurona y se incrementa la generación de potenciales de acción ectópicos, produciéndose un dolor espontáneo (Baron y cols., 2017). También se ha descrito una sobreexpresión de la subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de

calcio como consecuencia del daño en el nervio periférico que incrementa la excitabilidad de las neuronas al reducirse la frecuencia de apertura del canal (Luo y cols., 2001). Asimismo, el daño en el nervio periférico induce una reducción en la expresión de los canales de potasio mediada por la acción de la proteína cinasa de tipo M ζ (PKM ζ), incrementándose la frecuencia de generación de potenciales de acción (Chien y cols., 2007; Zhang y cols., 2012).

- **Variaciones en la expresión génica:** Como consecuencia del daño en el nervio periférico, se producen variaciones en la expresión génica en las neuronas que integran la fibra nerviosa; por ejemplo, se ha descrito que neuronas no nociceptivas (como las de las fibras A β) expresan mediadores propios de neuronas nociceptivas (como sustancia P o CGRP) (Cohen y Mao, 2014). Asimismo, se detecta un descenso en la expresión de los receptores opioides, motivo por el que la morfina es poco eficaz en el tratamiento del dolor neuropático (Ueda, 2006).
- **Denervación sensorial y emisión de nuevas proyecciones nerviosas:** tras la lesión en el nervio periférico, se produce una atrofia en el extremo distal del axón (degeneración *walleriana*), que induce una reducción en el tamaño del cuerpo celular y en el diámetro del axón. Como

consecuencia de este proceso, se observa una denervación en el miembro distal a la lesión que cursa con hipoestesia o, paradójicamente, con hiperalgesia (Cohen y Mao, 2014). En cuadros de dolor neuropático inducidos por el tratamiento con antirretrovirales o antitumorales se produce un acortamiento en las terminaciones axónicas que también pueden producir la denervación de los miembros (Gornstein y Schwarz, 2014; Sanna y cols., 2014; L.-H. Chen y cols., 2015). Al mismo tiempo, la liberación de NGF de manera local puede estimular la proyección de nuevas fibras nerviosas que alcanzan zonas con innervación intacta, incrementando la señal nociceptiva y la sensibilidad al dolor (Cohen y Mao, 2014).

En algunas patologías que cursan con dolor neuropático, como el CRPS, el dolor del miembro fantasma o la neuralgia postherpética, el tono del sistema nervioso simpático influye en la percepción dolorosa (Nickel y cols., 2012). En estos casos, se ha descrito la formación de ovillos de fibras simpáticas en torno a los ganglios de la raíz dorsal, así como la expresión de receptores adrenérgicos en las neuronas sensoriales (Shinder y cols., 1999). Además, la estimulación del sistema nervioso simpático produce una vasoconstricción que incrementa la sensación dolorosa al reducir la irrigación en el nervio dañado (Cohen y Mao, 2014).

3.3.2.2 En el sistema nervioso central

3.3.2.2.1 *En la médula espinal*

En las astas dorsales de la médula espinal, donde se establece la sinapsis entre la neurona de DRG y la neurona de segundo orden se produce un desequilibrio en la señalización neuronal. De esta manera, al incrementarse la frecuencia y la magnitud de los potenciales de acción en las neuronas integradas en las fibras sensoriales de tipo C, se induce una liberación de glutamato mayor de la habitual. Como consecuencia del daño en el nervio, se reduce la recaptación de glutamato por los transportadores de la neurona de DRG (Cohen y Mao, 2014). El glutamato activa receptores ionotrópicos y metabotrópicos en la neurona de segundo orden, estimulándose la PKC. Además, el glutamato es un neurotransmisor excitotóxico e induce un incremento de la concentración de radicales libres (Schwartz y cols., 2008). Tanto la activación de la PKC como la generación de radicales libres dentro de la célula contribuyen a la sensibilización de la neurona de segundo orden (Cohen y Mao, 2014). Asimismo, el incremento de glutamato en las sinapsis implica que las neuronas no nociceptivas de las fibras A β y las neuronas de las fibras A δ estimulen a las neuronas nociceptivas de segundo orden, dando lugar a la alodinia (Colloca y cols., 2017). En las neuronas nociceptivas de segundo orden se produce un incremento en las espinas dendríticas, es decir, en las protrusiones de los axones en que

se establece la sinapsis; este incremento en las espinas dendríticas está mediado por la cinasa Rac1 (Tan y Waxman, 2015).

El incremento en la transmisión de impulsos dolorosos induce un incremento en la liberación de otros neurotransmisores excitadores en las sinapsis del asta dorsal, tales como la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o el CGRP, que contribuyen al desarrollo de la hiperalgesia (Shehab y Atkinson, 1986; K. Chen y cols., 2015).

Al mismo tiempo, la neurona de DRG dañada induce una liberación de mediadores inflamatorios (como CCL2 y fractalquina), que atraen al asta dorsal a linfocitos T y a células microgliales. Estas células producen mediadores inflamatorios como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), que contrarrestan el efecto inhibitorio del GABA secretado por las interneuronas inhibitorias de la neurona de DRG (Scholz y Woolf, 2007). Esto también contribuye al incremento de la transmisión sináptica desde las fibras nociceptivas hacia las láminas más superficiales de la médula (donde se produce la sinapsis entre las neuronas de las fibras no nociceptivas con las neuronas de segundo orden), induciéndose la alodinia (Alles y Smith, 2018). Asimismo, los mediadores inflamatorios también ejercen un efecto sensibilizante *per se* sobre la neurona de segundo orden (Scholz y Woolf, 2007).

3.3.2.2.2 *En el cerebro*

En pacientes con dolor neuropático se observa que se producen reorganizaciones anatómicas en la corteza cerebral y en el sistema límbico que reducen la actividad en las vías inhibitorias del dolor y que modifican las áreas encargadas de la percepción sensorial de la parte del cuerpo en que se manifiesta el dolor (Gustin y cols., 2012).

3.3.3 Diagnóstico del dolor neuropático

El dolor, como síntoma subjetivo, es muy difícil de valorar y de objetivar. En el dolor neuropático la dificultad se incrementa en comparación con el dolor nociceptivo puesto que, en muchas ocasiones, el daño neurológico causante del dolor no resulta evidente.

Como se ha indicado anteriormente, el dolor neuropático agrupa múltiples sensaciones dolorosas: dolores espontáneos, alodinia, hiperalgesia... Se han descrito varios cuestionarios para sistematizar la detección de estos síntomas; el más extendido es el DN4, que recoge diez síntomas característicos y los puntúa de 1 a 10 (Mathieson y cols., 2015).

Además, el diagnóstico del dolor neuropático requiere de la exploración física del paciente y de la revisión de la historia clínica para la detección de un daño neurológico. Según las evidencias a favor de la relación entre el dolor y el daño neurológico, se han establecido tres grados en el diagnóstico de dolor neuropático: dolor neuropático posible, dolor neuropático probable y dolor neuropático seguro (**figura 7**) (Finnerup y cols., 2016).

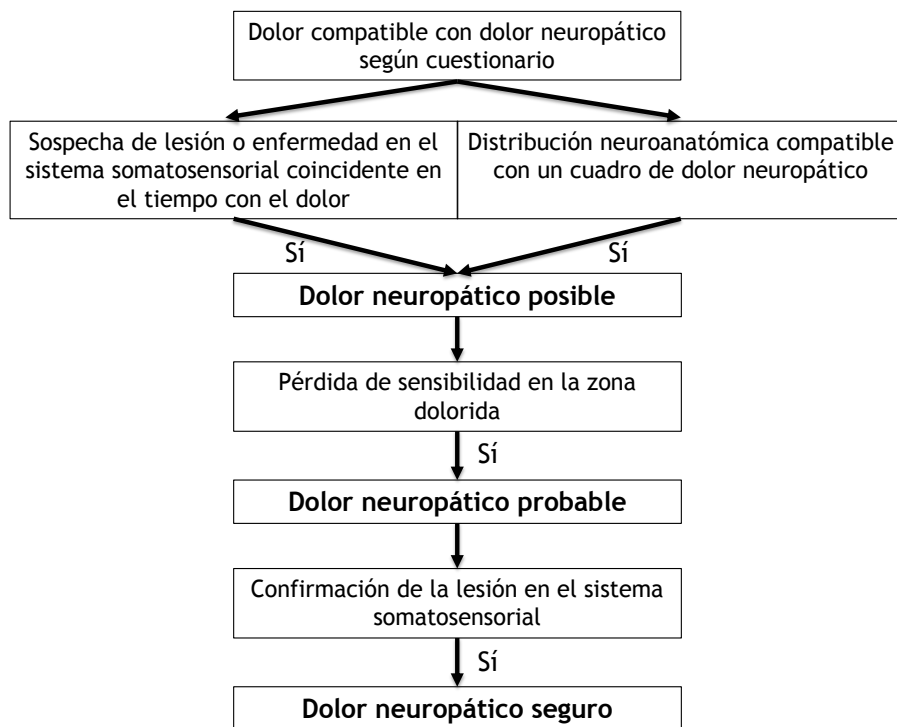


Figura 7. Diagrama de flujo para el diagnóstico del dolor neuropático. Realizado a partir de Finnerup y cols., 2016.

3.3.4 Epidemiología del dolor neuropático

El dolor neuropático es un síntoma difícil de diagnosticar; además, en muchos casos acompaña a otra enfermedad y, en ocasiones, los estudios se refieren a dolores crónicos con componentes neuropáticos y nociceptivos (como el dolor en pacientes oncológicos). Por ello, según la bibliografía, la prevalencia del dolor neuropático oscila entre el 1% y el 17,9%, aunque si no se consideran aquellos estudios en que se incluyen pacientes con dolor mixto (pacientes con dolor neuropático y oncológico), la prevalencia se sitúa entre un 7 y un 10% (Van Hecke y cols., 2014). Su prevalencia es mayor en mujeres que en hombres y se incrementa después de la quinta década de la vida (Colloca y cols., 2017).

3.3.5 Tratamiento del dolor neuropático

En contraposición al dolor nociceptivo, el dolor neuropático no remite con analgésicos como los AINE (antiinflamatorios no esteroideos) ni con paracetamol; asimismo, tampoco los analgésicos opioides presentan una eficacia elevada en el tratamiento del dolor neuropático. Entre los fármacos que se emplean en clínica se observa una escasa eficacia y una alta tasa de fracaso, por ello el dolor neuropático es una necesidad terapéutica no cubierta (Attal y Bouhassira, 2015).

3.3.5.1 Fármacos empleados en clínica

Según las recomendaciones de la IASP, actualizadas en un metaanálisis de 2015, los fármacos para el tratamiento del dolor neuropático se clasifican en fármacos de primera línea, de segunda línea y de tercera línea (Finnerup y cols., 2015) (**tabla 9**). Asimismo, según este mismo estudio, algunos de los fármacos que se están utilizando en terapéutica para el dolor neuropático presentan evidencias en contra de su uso atendiendo a su eficacia.

Tabla 9. Fármacos indicados para el tratamiento del dolor neuropático. Elaborado a partir de Finnerup y cols., 2015.

	Fármacos	Eficacia	Tolerabilidad	Coste tratamiento	Neuropatía indicada
1º línea	Gabapentinoides	Media	Moderada-alta	Medio	Central y periférica
	IRNS	Media	Moderada	Medio	Central y periférica
	Antidepresivos tricíclicos	Media	Moderada-baja	Bajo	Central y periférica
2º línea	Capsaicina 8% (parches)	Baja	Moderada-alta	Alto	Periférica
	Lidocaína (parches)	Baja	Alta	Alto	Periférica
	Tramadol	Media	Moderada-baja	Bajo	Central y periférica
3º línea	Toxina botulínica A	Media	Alta	Alto	Periférica
	Opioides clásicos	Media	Moderada-baja	Medio	Central y periférica

3.3.5.1.1 Fármacos en primera línea de tratamiento

Los fármacos en primera línea de tratamiento del dolor neuropático son los anticonvulsivantes pregabalina y gabapentina; los inhibidores de la recaptación de noradrenalina y serotonina (IRNS) duloxetine y venlafaxina, y los antidepresivos tricíclicos.

La gabapentina y la pregabalina son gabapentinoides, análogos estructurales de GABA que se unen a la subunidad $\alpha_2\delta$ de los canales de calcio, que se sobreexpresa tanto en las neuronas de DRG como en las neuronas de segundo orden nociceptivo del asta dorsal. La unión de los gabapentinoides a estas proteínas reduce el flujo de entrada de calcio a la neurona, disminuyendo la excitabilidad de las células y la liberación de neurotransmisores (Calandre y cols., 2016; Patel y Dickenson, 2016). Se han encontrado evidencias de una eficacia modesta de la gabapentina en el tratamiento de la neuropatía diabética (mitiga el dolor solamente en un 38% de los pacientes) y de la neuralgia postherpética (mitiga el dolor tan solo en un 33% de los pacientes) (Wiffen y cols., 2017). En cuanto a la pregabalina, mitiga el dolor en el 50% de los pacientes con neuropatía diabética (S. S. Zhang y cols., 2015). En ambos casos se describió una elevada tasa de efectos adversos entre los que se cuentan mareos, edemas periféricos, ganancia de peso y trastornos del estado anímico (tanto astenia como euforia).

Los IRNS son un grupo de fármacos cuya indicación inicial fue el tratamiento de la depresión debido a su efecto sobre las vías monoaminérgicas del SNC, incrementando las concentraciones de serotonina y noradrenalina y mejorando el estado anímico (Xu y cols., 2017). Posteriormente, se describió que los fármacos de este grupo mitigaban ligeramente el dolor neuropático en cuadros de esclerosis múltiple, daño medular, neuropatía por antineoplásicos y neuropatía diabética (Vranken y cols., 2011; Smith y cols., 2013; Vollmer y cols., 2014; Attal y Bouhassira, 2015). Su efecto beneficioso en el tratamiento del dolor neuropático se logra de dos maneras: por una parte, incrementan la actividad de las vías descendentes inhibitorias (Bannister y cols., 2015); además, en las neuronas de DRG reducen la entrada de calcio, ejerciendo un efecto neuroprotector, a causa de la modulación de los canales TrpM2 y TrpM8 (Bannister y cols., 2015). Los efectos adversos más frecuentes en los pacientes tratados con IRNS son somnolencia, estreñimiento, náuseas y vómitos (Attal y Bouhassira, 2015).

De entre los antidepresivos tricíclicos (ADT) el más empleado en dolor neuropático es la amitriptilina (Attal y Bouhassira, 2015). De entre todos los estudios clínicos publicados hasta 2015, solamente en estudios con unos pocos pacientes se observó la superioridad de la amitriptilina comparada con el placebo en el tratamiento del dolor neuropático por neuropatía diabética y en neuralgia postherpética

(Moore y cols., 2015). Otros ADT como la clomipramina, la nortriptilina y la desipramina han sido utilizados para el tratamiento del dolor neuropático, aunque también con escasa eficacia (Khoromi y cols., 2007). Su efecto analgésico en cuadros de dolor neuropático se debe a su acción estimulante sobre las vías descendentes inhibitorias en el SNC y a su efecto bloqueante sobre los canales de sodio y calcio en las neuronas de DRG, reduciendo la transmisión de la señal dolorosa (Song y cols., 2000; Wu y cols., 2012; Muthuraman y cols., 2014). Los principales efectos adversos de los ADTs son los efectos anticolinérgicos (boca seca, estreñimiento, retención urinaria...) producidos por el bloqueo de los receptores muscarínicos, hipotensión ortostática por la inhibición de receptores α_1 adrenérgicos, somnolencia y sedación por su efecto antagonista en receptores serotoninérgicos, y cardiotoxicidad por el bloqueo de canales cardíacos (Dharmshaktu y cols., 2012).

3.3.5.1.2 Fármacos en segunda línea de tratamiento

En segunda línea de tratamiento del dolor neuropático se encuentran los parches de capsaicina al 8%, la lidocaína tópica y el tramadol.

La capsaicina es un agonista del receptor TrpV1 cuya aplicación repetida a alta dosis produce una degeneración de la fibra nerviosa que conduce a la insensibilización del área de aplicación del parche y

al alivio de la sensación dolorosa (Sharma y cols., 2013). Esto se debe a tras mecanismos de acción distintos: inactivación de la calcineurina, activación de fosfolipasa C y activación de proteína cinasa C; como consecuencia, se induce la desfosforilación del canal TrpV1 y la insensibilización de la neurona (Safat y cols., 2014). Se ha descrito que la capsaicina es eficaz a una concentración del 8% en cuadros de neuralgia post-herpética, neuralgia posquirúrgica, neuropatía postraumática, polineuropatía y neuropatía por VIH (Brown y cols., 2013; Simpson y cols., 2014). La capsaicina tópica es, en general, un fármaco muy bien tolerado, puesto que sus efectos adversos más frecuentes se observan solamente al inicio del tratamiento y son eritema y dolor (Maihofner y Heskamp, 2013).

La lidocaína es un anestésico local cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje, impidiendo la transmisión del impulso a lo largo de la neurona de DRG. Se ha descrito una eficacia muy modesta de los parches de lidocaína en el tratamiento de la neuralgia post-herpética, neuralgia posquirúrgica, neuropatía diabética y neuralgia del trigémino (Derry y cols., 2016). Sin embargo, su excelente perfil de seguridad (en contraposición al resto de las alternativas terapéuticas), motiva que los parches de lidocaína sigan siendo prescritos con mucha frecuencia para el tratamiento del dolor neuropático, sobre todo en ancianos (Attal y Bouhassira, 2015).

El tramadol es un opioide sintético que, al igual que su metabolito (+)-O-desmetiltramadol, ejerce un efecto analgésico dual para el tratamiento del dolor neuropático: es un agonista débil de receptores opioides periféricos y centrales, y además inhibe la recaptación de la noradrenalina y de la serotonina, potenciando la actividad de las vías inhibitorias descendentes en el SNC (Hama y Sagen, 2007; Kaneko y cols., 2014; Sakakiyama y cols., 2014). Se ha descrito un ligero efecto analgésico del tramadol en la neuralgia post-herpética, neuropatía diabética, polineuropatías y dolor neuropático post-amputación (Muthuraman y cols., 2014). A pesar de que el riesgo de desarrollo de dependencia es menor con el tramadol que con otros opioides, los efectos adversos neurológicos condicionan su utilización, especialmente en individuos de edad avanzada (Attal y Bouhassira, 2015).

3.3.5.1.3 *Fármacos en tercera línea de tratamiento*

En tercera línea de tratamiento del dolor neuropático se encuentran las inyecciones de toxina botulínica tipo A y los opioides clásicos.

La toxina botulínica de tipo A (BTX-A) es uno de los serotipos de esta neurotoxina producida por bacterias del género *Clostridium spp.*, cuya toxicidad se debe a que bloquea la exocitosis de neurotransmisores desde la célula presináptica (Matak y Lacković, 2014). Se ha descrito la eficacia de la toxina para mitigar el dolor

neuropático en cuadros de neuralgia post-herpética, neuralgia del trigémino y neuropatía diabética. La principal limitación del tratamiento es que la toxina debe ser administrada por vía subcutánea o intradérmica en el área afectada por el dolor (Fabregat y cols., 2013).

Los opioides, que muestran gran eficacia para el tratamiento de dolores intensos de origen nociceptivo, se reservan a la tercera línea de tratamiento del dolor neuropático. Esto se debe a que estos fármacos presentan una eficacia moderada como analgésicos en pacientes con neuropatías (especialmente a corto plazo, no a largo plazo) pero sus efectos adversos, como el riesgo de dependencia o la depresión respiratoria, son muy graves y limitan en buena medida su utilización continuada (Muthuraman y cols., 2014; Ed y cols., 2015).

3.3.5.1.4 Fármacos empleados en dolor neuropático sin justificación

El metaanálisis de Finnerup y cols. recoge también una relación de fármacos que se han usado y se siguen usando como tratamiento en cuadros dolor neuropático pero que, atendiendo a los estudios clínicos publicados, no existen evidencias a favor de su eficacia. Entre ellos se cuentan las cremas de capsaicina a baja dosis, algunos antiepilépticos (lamotrigina, topiramato, zonisamida, carbamazepina, oxcarbamazepina o lacosamida), la clonidina, los antidepresivos

inhibidores de recaptación de serotonina o el tapentadol. Incluso algunos de ellos pueden ser contraproducentes como el ácido valproico, el levetiracetam, la mexiletina o los cannabinoides. Estos últimos fármacos han demostrado su eficacia para el tratamiento de la esclerosis múltiple (que cursa con dolor neuropático) pero pueden agravar el dolor neuropático no relacionado con esta patología desmielinizante.

3.3.5.2 Técnicas intervencionistas para el tratamiento del dolor neuropático

Además de los fármacos expuestos anteriormente, se ha descrito el empleo de algunas técnicas intervencionistas para el tratamiento de cuadros de dolor neuropático, a pesar de que ninguna de ellas ha demostrado una alta eficacia y que, en casi todos los casos, el riesgo de efectos adversos es elevado (Dworkin y cols., 2013). Entre ellas destacan las infiltraciones con corticosteroides en cuadros de dolor neuropático por compresión de la raíz nerviosa, que alivian el dolor de manera transitoria, o las infiltraciones con bloqueantes del sistema nervioso simpático para el tratamiento del CRPS. Además, también se ha utilizado la estimulación mediante electrodos en el sistema nervioso central y periférico para tratar cuadros de dolor neuropático refractario. En los últimos años la FDA ha aprobado el empleo de infiltraciones de morfina y ziconotida, bloqueante de canales de calcio de tipo N, por vía intratecal (Colloca y cols., 2017).

3.3.5.3 Fármacos en investigación para el tratamiento del dolor neuropático

Debido a que el dolor neuropático continúa siendo una necesidad terapéutica no cubierta, en los últimos años se han destinado grandes esfuerzos al desarrollo de nuevos analgésicos para paliarlo. De entre los fármacos que se están investigando, algunos de ellos actúan en dianas del sistema nervioso central mientras que la diana de otros se encuentra en la periferia.

3.3.5.3.1 *Moléculas que actúan en el sistema nervioso periférico*

- **Fármacos que actúan en el receptor TrpV1:** actualmente se están investigando nuevas moléculas que, al igual que la capsaicina, potencian la activación del canal TrpV1 cuando se administran por vía tópica. La civamida o zucapsaicina es un isómero cis de la capsaicina que, además de su efecto sobre TrpV1, también inhibe canales de calcio dependientes de voltaje (Sałat y cols., 2014). Paradójicamente, también se ha investigado el empleo de antagonistas de TrpV1 para aliviar el dolor; sin embargo, el bloqueo del receptor induce un incremento de la temperatura corporal que limita la utilización de estos fármacos (Ursu y cols., 2010; Uchytlova y cols., 2014).

- **Antagonistas del receptor TrpV3:** el empleo de antagonistas de este canal iónico permeable a Ca^{2+} que se activa a temperaturas superiores a 33 °C (véase pág. 67), ha demostrado su eficacia para contrarrestar las evidencias de dolor neuropático en modelos animales (Gomtsyan y cols., 2016). También se han llevado a cabo estudios de eficacia (fase II) de un antagonista del canal TrpV3 en pacientes con dolor neuropático.
- **Antagonistas del receptor de productos finales de glicación avanzada (AGEs):** los AGEs son derivados de aductos de proteínas y ácidos nucleicos con glucosa que se forman durante las hiperglucemias en pacientes diabéticos. Los AGEs se unen a inmunoglobulinas (las denominadas receptores de AGEs) produciendo la activación de varias cinasas (entre ellas MAPK y ERK), que desencadenan una respuesta inflamatoria que puede agravar la neuropatía diabética (Gkogkolou y Bohm, 2012). Sin embargo, el empleo de fármacos que contrarrestasen esta inflamación producida por AGEs podría interferir en la cicatrización tisular y producir problemas vasculares que limitarían mucho el empleo de los antagonistas del receptor de AGEs (Hardaway y Podgoroski, 2013; Gilron y Dickenson, 2014).

- **Fármacos anti-NGF:** se está investigando el empleo de anticuerpos monoclonales anti-NGF como fasinumab, fulranumab o tanezumab para paliar el dolor en cuadros de dolor neuropático puesto que en algunos pacientes se observa un incremento de este péptido. Sin embargo, a la vista de los resultados, a pesar de que parecen mejorar algunos indicadores (intensidad de dolor máxima), pueden empeorar otros (dolor evocado) (Wallace y cols., 2007; Wang y cols., 2014). También se está investigando el efecto del bloqueo de la syntaxina 8, proteína que permite el transporte del receptor TrkA a la membrana plasmática, así como fármacos antagonistas de este receptor (Chang y cols., 2016).
- **Fármacos anti-TNF:** se ha ensayado el efecto de anticuerpos monoclonales anti-TNF como placulumab, adalimumab e infliximab, que se están usando con éxito en patologías reumáticas, para el tratamiento de dolor neuropático. En algunos ensayos clínicos con un número bajo de pacientes se ha observado que pueden aliviar ligeramente el dolor en cuadros de dolor del nervio ciático (Korhonen y cols., 2006; Genevay y cols., 2010).
- **Fármacos que incrementen los niveles intracelulares de GMP_c:** se ha postulado que un incremento en la concentración de GMP_c intracelular reduce el dolor en

modelos animales de dolor neuropático (Otari y Upasani, 2015). De esta manera, se han llevado a cabo ensayos clínicos para estudiar el efecto de inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (enzima que degrada el GMP_c) en pacientes con neuropatía diabética. También se ha evaluado la eficacia de ataciguat (activador de guanilato ciclasa) para tratar el dolor neuropático (Zhou y cols., 2008).

- **Antagonistas del receptor de angiotensina II tipo 2 (AT₂):** la activación de este receptor produce, en las neuronas de DRG, una estimulación de las MAPK de manera directa y por la potenciación del efecto del NGF a través del receptor TrkA. Todo ello incrementa la sensibilidad del nociceptor a los estímulos. El empleo de antagonistas del receptor AT₂ previene esta sensibilización, habiendo demostrado su eficacia en pacientes con neuralgia postherpética (Rice y Smith, 2015). Se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase III con fármacos que actúan en esta diana (Bouhassira y Attal, 2018).
- **Inhibidores de metaloproteasas:** las metaloproteasas son enzimas cuya expresión se incrementa cuando se produce una lesión en el nervio, favoreciendo la atracción de células del sistema inmunológico y la liberación de mediadores inflamatorios. Se han llevado a cabo ensayos clínicos para evaluar el efecto de los inhibidores de

metaloproteasas en pacientes con neuropatía post-herpética y neuropatía diabética (Dev y cols., 2010).

- **Inhibidores de histona deacetilasa 6 (HDAC6):** el tratamiento con el antitumoral cisplatino induce un daño en la neurona de DRG que cursa con una escasez de mitocondrias en el extremo distal de la célula. El empleo del inhibidor de HDAC6 ricolinostat se va a ensayar en clínica (fase II) para proteger a las neuronas de la degeneración causada por el antitumoral debido a que el ricolinostat favorece la acetilación de la α -tubulina e incrementa la concentración de mitocondrias en el extremo distal de la neurona de DRG, reduciendo los signos de dolor neuropático en modelos animales (Krukowski y cols., 2017).
- **Fármacos que actúan en canales de sodio:** los ensayos para desarrollar bloqueantes de canales de sodio para el tratamiento del dolor neuropático se dirigen a la búsqueda de inhibidores selectivos de los canales $Na_v1.3$, $Na_v1.7$ y $Na_v1.8$, puesto que $Na_v1.7$ y $Na_v1.8$ participan en la transmisión de la señal dolorosa y $Na_v1.3$ se sobreexpresa en cuadros de neuropatía (véase pág. 82) (Gilron y Dickenson, 2014; Waxman y cols., 2014). También se ha estudiado el efecto del antiarrítmico flecainida en pacientes con dolor neuropático oncológico y se ha

descrito una reducción en la percepción dolorosa; sin embargo, el reducido número de pacientes y la complejidad del dolor oncológico (que presenta componentes neuropáticos y no neuropáticos), limitan los resultados del estudio (Von Gunten y cols., 2007). Asimismo, se ha estudiado la eficacia de la tetrodotoxina (TTX) para el tratamiento del dolor neuropático. Los ensayos clínicos realizados muestran que la molécula alivia moderadamente el dolor; sin embargo, el bajo número de pacientes y los criterios de inclusión (que implican el reclutamiento de pacientes oncológicos con dolor somático y neuropático), impiden extraer conclusiones definitivas. Además, la TTX produce trastornos neurológicos que condicionan su empleo en la clínica (Hagen y cols., 2006; Nieto y cols., 2012).

- **Fármacos que actúan en canales de calcio:** el empleo de bloqueantes de canales de calcio para el tratamiento del dolor neuropático presenta el inconveniente de la ubicuidad de estos canales; de esta manera, a pesar de su gran eficacia, los bloqueantes de canales de calcio producen efectos adversos que pueden motivar la suspensión del tratamiento por problemas neurológicos o cardiovasculares. En los últimos años, se ha estudiado la eficacia y la seguridad de la etosuximida en pacientes con

dolor neuropático. Este fármaco es un inhibidor de canales de calcio de tipo T, responsables de la despolarización repetida de la membrana de las neuronas de DRG en pacientes con dolor neuropático (Yaksh, 2006; Gilron y Dickenson, 2014). Los primeros resultados en humanos parecen indicar que este fármaco no es eficaz para el tratamiento de la neuropatía diabética (Kerckhove y cols., 2018). También se está investigando el empleo de fármacos bloqueantes de canales de calcio de tipo N y L, puesto que los resultados obtenidos en modelos animales indican que el bloqueo de estos canales puede ser eficaz para tratar el dolor neuropático (Yamamoto y cols., 2016).

- **Fármacos que actúan en canales de potasio:** se ha descrito que algunos miembros de las familias de canales de potasio K_v7 y K_v2 (véase pág. 83) pueden constituir dianas de interés para el tratamiento del dolor neuropático, puesto que en algunos cuadros (dolor postoperatorio, neuropatía diabética...) se produce un descenso en la expresión de estos canales, que induce un incremento en la excitabilidad neuronal (Gilron y Dickenson, 2014; Waxman y Zamponi, 2014; Tsantoulas, 2015).
- **Bloqueantes de receptores nicotínicos:** el empleo de antagonistas del receptor nicotínico $\alpha_4\beta_2$ produce un efecto antihiperalgésico y antialodínico en modelos

animales de dolor neuropático. Este efecto se debe a la modulación del sistema inmunológico en los macrófagos que rodean al nervio dañado (Saika y cols., 2015).

- **Factores neurotróficos:** el empleo de factores neurotróficos como la neublastina (derivado de células gliales), ha resultado eficaz para contrarrestar las evidencias de dolor en modelos animales de dolor neuropático. Los primeros ensayos clínicos (fase II), parecen ratificar esta eficacia, aunque no se observa correlación entre dosis y respuesta y son las dosis más bajas las que parecen ser más efectivas (Backonja y cols., 2017).
- **Ácido α -lipoico:** el ácido α -lipoico es un ácido carboxílico que contiene dos grupos sulfhidrilo que protegen frente a especies reactivas de oxígeno (ROS). Se han realizado estudios para valorar la eficacia y la seguridad de este fármaco en cuadros de neuropatía diabética y de neuropatía por antitumorales, observándose que el ácido α -lipoico es un fármaco eficaz y seguro; sin embargo, el bajo número de pacientes incluidos y el alto porcentaje de individuos que abandonan los estudios antes de finalizar determinan que exista controversia a la hora de indicar el fármaco para la prevención del dolor neuropático (Guo y cols., 2014; Papanas y Ziegler, 2014; Desideri y cols., 2017).

3.3.5.3.2 *Moléculas que actúan en el sistema nervioso central*

- **Antagonistas de receptores de glutamato:** la inhibición de los receptores de glutamato NMDA y AMPA parece resultar de interés para el tratamiento del dolor neuropático al contrarrestar el efecto del exceso del neurotransmisor en el asta dorsal (Collins y cols., 2010; T. Y. Liu y cols., 2015). Se ha estudiado el efecto de diversos fármacos que actúan en estos receptores para tratar el dolor neuropático: algunos de ellos han sido comercializados con otras indicaciones, como el antitusivo dextrometorfano, o el nootrópico memantina (Pickering y cols., 2014; King y cols., 2016); otros son nuevas moléculas con un perfil farmacocinético apropiado para su empleo en cuadros de dolor neuropático (Wallace y cols., 2017). Dentro de los antagonistas de receptores de glutamato que se están investigando destaca la ketamina, antagonista selectivo de receptores NMDA que también ejerce un efecto analgésico al modular las conexiones relacionadas con la percepción dolorosa en el cerebro (Niesters y cols., 2014; Aiyer y cols., 2018).
- **Agonistas de receptores de adenosina:** la activación de los receptores de adenosina en el sistema nervioso periférico induce un efecto proalgésico (véase pág. 69).

Sin embargo, en el sistema nervioso central la activación de receptores A_1 y A_{2A} reduce la excitabilidad de las neuronas encargadas de la transmisión de la señal hacia el cerebro; además, la activación de receptores de adenosina en células de la microglía ejerce un efecto inhibitorio (Sawynok, 2016). En modelos animales, algunas moléculas agonistas de los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina han demostrado su efectividad para tratar cuadros de dolor neuropático (Katz y cols., 2015; Kwilasz y cols., 2018).

- **Agonistas de 5-HT_{1A}:** los receptores del tipo 5-HT₁ ejercen un efecto inhibitorio de la señalización mediada por la serotonina en el SNC. En clínica se están empleando los agonistas de 5-HT_{1B/1D} para el tratamiento de un dolor no neuropático, la migraña. El empleo de agonistas del receptor 5-HT_{1A} en modelos animales ejerce un efecto analgésico en otros cuadros de dolor (Bannister y cols., 2009; Newman-Tancredi y cols., 2018).
- **Antagonistas de receptores H₃ y H₄:** en modelos animales, el empleo de antagonistas de ambos receptores de histamina demostró eficacia para el tratamiento del dolor neuropático, tanto en combinación con morfina como en monoterapia (Newman-Tancredi y cols., 2018).

- **Potenciadores de la acción de catecolaminas:** el empleo de agonistas de los receptores de adrenalina α_2 potencia la acción de las vías descendentes noradrenérgicas de modulación de la señal dolorosa (Bannister y cols., 2009). Asimismo, también se ha ensayado el efecto del antiparkinsoniano levodopa como analgésico (Park y cols., 2013).
- **Agonistas del receptor de nociceptina/orfanina FQ (NOP):** el receptor NOP, que en un principio se pensó que pertenecía a la familia de los receptores opioides, ejerce un papel complejo en la percepción dolorosa: en cuadros de dolor nociceptivo, la estimulación de los receptores NOP supraespinales tiene una acción proalgésica; por el contrario, en cuadros de dolor neuropático, el empleo de agonistas de los receptores NOP supraespinales media efectos antialodínicos y antihiperalgésicos (Mika y cols., 2011; Tzschentke y cols., 2017). Se ha identificado una molécula, el cebranopadol, que es agonista de receptores NOP y μ opioides y ejerce un efecto antihiperalgésico y antialodínico en modelos animales de dolor neuropático (Tzschentke y cols., 2017).
- **Agonistas del receptor de imidazolina I₂:** en modelos animales de dolor neuropático el empleo de agonistas de

este receptor potencia el efecto analgésico de los opioides (Bhalla y cols., 2013; Thorn y cols., 2015).

- **Antagonistas del receptor σ_1 :** el receptor σ_1 es una chaperona cuya activación media numerosos efectos proalgésicos centrales y periféricos en cuadros de dolor neuropático. En condiciones fisiológicas, el receptor σ_1 se encuentra unido a otras proteínas en la membrana del retículo endoplasmático asociada a mitocondria; sin embargo, cuando se produce una situación de estrés celular (con un incremento de la concentración de calcio intracelular), el σ_1 se libera y se asocia a receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), incrementando la entrada de calcio en la mitocondria (Ortega-Roldán y cols., 2013; Davis, 2015). La acción de σ_1 implica cambios en canales iónicos modulados por voltaje, cinasas y receptores acoplados a proteínas G, dando lugar a un incremento en la sensibilidad de las neuronas. Resulta especialmente destacable el efecto sensibilizante ejercido sobre el receptor NMDA de glutamato (Zamanillo y cols., 2013). Se ha desarrollado un antagonista del receptor σ_1 que ha demostrado su eficacia para contrarrestar las evidencias de dolor en distintos modelos animales de dolor neuropático, mientras que en condiciones fisiológicas su administración no modifica la percepción del dolor (Vidal-Torres y cols.,

2012, 2014; Gris y cols., 2016). Se ha postulado la existencia de una sinergia entre el empleo de antagonistas del σ_1 y fármacos opioides para el tratamiento del dolor neuropático pudiéndose reducir la dosis de opioides (con la consiguiente reducción de los efectos adversos asociados a estos analgésicos) (Vidal-Torres y cols., 2013).

- **Antagonistas del receptor de orexinas:** se ha demostrado que el bloqueo del receptor OX_2 de orexinas reduce los signos de dolor en modelos animales de dolor neuropático (McDonald y cols., 2016).
- **Inhibidores de cinasas:** debido a que tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico la sensibilización de las neuronas se encuentra mediada por cinasas, se está investigando el empleo de fármacos que inhiban estas enzimas para el tratamiento del dolor neuropático. A pesar de que los ensayos en modelos animales arrojaron datos prometedores, los primeros resultados en seres humanos parecen refutar la eficacia observada en estudios con animales (Cousins y cols., 2013; Ostenfeld y cols., 2015).

3.3.6 Modelos de dolor neuropático

3.3.6.1 Modelos animales

Antes de los últimos años de la década de 1970, los modelos animales existentes solamente eran capaces de valorar los cambios en el comportamiento y en la electrofisiología inducidos por estímulos nociceptivos (mecánicos y térmicos), eludiendo que, en cuadros de dolor neuropático, el dolor espontáneo y la hipersensibilidad son los principales síntomas que reducen la calidad de vida de los pacientes. De esta manera, a partir de finales de la década de 1970 se desarrollaron una serie de modelos animales que pretendían reproducir lo que sucede en el organismo durante un cuadro de dolor neuropático (Jaggi y cols., 2011).

3.3.6.1.1 Modelos de neuropatía periférica

- **Axotomía:** este modelo implica la sección del nervio ciático en la mitad del muslo, un poco más arriba de la bifurcación del nervio en la rama tibial y la peroneal (**figura 8**) en una rata anestesiada. Además, también se lesiona el nervio safeno para inducir la denervación en el extremo distal de la pata. Tras la lesión de los nervios, se desarrolla un neuroma consistente en ramas nerviosas que crecen en todas las direcciones. En el modelo se observa anestesia, dolor espontáneo y autotomía (el animal ataca y mutila el miembro denervado); esta autotomía se considera el marcador de dolor neuropático en el modelo (Wall y cols., 1979). La

mayor limitación del modelo es que en los seres humanos raramente se produce el corte total de un nervio (solamente se produce cuando hay una amputación y se desarrolla un cuadro de dolor del miembro fantasma) (Katz y cols., 1991).

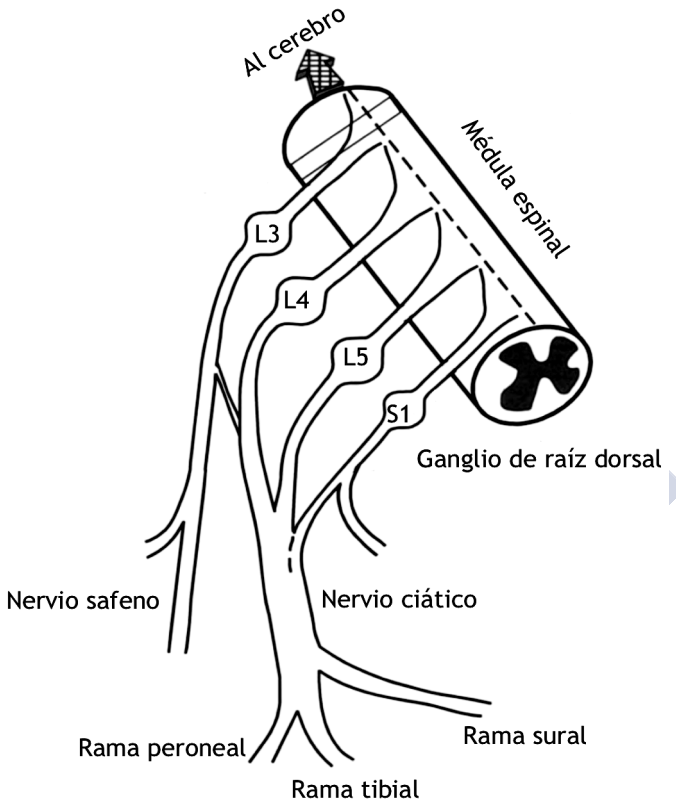


Figura 8. Raíces nerviosas de las fibras que inervan la pata de un ratón o una rata. Adaptado de Decosterd y Woolf., 2000 con permiso de Wolters Kluwer Health, Inc.

- **Lesión por constricción crónica:** en el ratón o la rata anestesiados, se rodea el nervio ciático con tres o cuatro ligaduras sin apretar, desencadenándose un edema intraneural, isquemia focal y degeneración *walleriana*. Se produce un dolor espontáneo en la rata que se manifiesta en autotomía moderada con reducción de la ingesta, posición de alerta y cojera; además, el animal evita cargar la pata dañada y se la lame continuamente. Al cabo de una semana, aparecen también signos de alodinia térmica y mecánica, y, tras dos semanas, asimetría postural. Los signos de dolor observados en este modelo se corresponden con lo que se produce en cuadros de CRPS en seres humanos, aunque también se emplea para analizar los síntomas sensoriales observados en caso de neuropatía por atrapamiento de un nervio (Bennett y Xie, 1988; Nakamura y Atsuta, 2006).
- **Ligadura parcial del nervio ciático:** el modelo implica la ligadura de un tercio o la mitad del grosor del nervio ciático en la rata o ratón anestesiados. Como consecuencia, se observan evidencias de dolor espontáneo: posición de alerta y lamido de la pata. Al cabo de una semana, se desarrolla un cuadro de hiperalgesia y alodinia que persiste hasta seis semanas (Seltzer y cols., 1990). Este modelo es interesante para el

estudio del dolor neuropático en seres humanos, puesto que el daño circunscrito a un sector del nervio es la causa principal de este cuadro (Seltzer, 1995).

- **Ligadura de nervio dorsal:** este modelo implica la colocación de una ligadura en los nervios L5 y S1 de la rata anestesiada, dando lugar a alteraciones en la sensibilidad como alodinia mecánica, hiperalgesia térmica y dolor espontáneo (síntomas que se observan en el CRPS) (Kim y Chung, 1992). En este modelo, los signos de dolor neuropático están mediados por el sistema nervioso simpático, de manera que la inhibición de este alivia los comportamientos del animal asociados a dolor neuropático (Kinnman y Levine, 1995). Asimismo, también se ha descrito un modelo consistente en la ligadura del nervio S1 en monos (Carlton y cols., 1994).
- **Lesión parcial en el nervio ciático:** en este modelo se seccionan dos de las ramas del nervio ciático, la peroneal y la tibial en la rata o ratón anestesiados, dejando intacta la rama sural (**figura 8**). De esta manera se observa dolor espontáneo, hiperalgesia y alodinia en las zonas laterales de la pata del animal, pudiendo comparar las respuestas al estimular esta área con respecto a las respuestas al estimular la zona inervada por la rama sural del nervio ciático, que queda intacta (Decosterd y Woolf, 2000).

Asimismo, este modelo permite estudiar la influencia de los nervios no dañados en el dolor neuropático producido por el daño en un nervio (Shields y cols., 2003).

- **Corte transversal de las ramas tibial y sural:** en este modelo se eliminan 2 mm de la rama sural y la tibial, dejando intacta la rama peroneal (Lee y cols., 2000) (**figura 8**). En el animal se observa dolor espontáneo e hiperalgesia, aunque no alodinia térmica (Dowdall y cols., 2005). Este modelo resulta especialmente interesante para la búsqueda de fármacos para el tratamiento del dolor neuropático que no depende de la acción del sistema nervioso simpático.
- **Ligadura del nervio peroneal común:** este modelo implica la afectación de las fibras sensitivas y motoras del nervio peroneal. En el animal se observa hiperalgesia por calor y alodinia (Vadakkan y cols., 2005).
- **Crioneurolysis ciática:** en este modelo el daño se produce al congelar el nervio ciático, observándose en el animal comportamientos relacionados con alodinia mecánica y autotomía (DeLeo y cols., 1994). En este modelo, el daño en el nervio es temporal y se recupera en un lapso de dos o tres semanas, pudiéndose estudiar el efecto de la cicatrización de la fibra nerviosa sobre los síntomas de dolor neuropático (Jaggi y cols., 2011).

- **Resección del tronco caudal:** en este modelo se reseca el tronco caudal de la rata de manera unilateral, dejando sin inervación áreas concretas de la cola del animal, permitiendo verificar el efecto de los estímulos mecánicos y térmicos en la cola en vez de la pata de la rata. El animal desarrolla alodinia e hiperalgesia mecánica y térmica (Nay y cols., 1994).
- **Neuritis ciática inflamatoria:** este modelo intenta reproducir lo que sucede en el organismo cuando una inflamación o infección afecta a un nervio produciendo una neuropatía (Franssen, 2015). Para ello se implanta un catéter en torno al nervio ciático que libera, de manera local, un componente inflamatorio como el zimosano (polisacárido obtenido a partir de la pared celular de algunas levaduras), mediadores inmunológicos como el TNF, restos de bacterias o carragenanos (Eliav y cols., 1999; Wang y cols., 1999; Jaggi y cols., 2011). En este modelo se observa alodinia, tanto ipsilateral como contralateral (denominada alodinia en espejo), producida por la activación intensa del sistema inmunológico (Chacur y cols., 2001).
- **Inducción de dolor por inserción de manguitos en el nervio ciático:** este modelo consiste en la inserción de un manguito de polietileno en torno al nervio ciático. De esta

manera, en el animal se observan evidencias de hiperalgesia por calor y alodinia mecánica. Los manguitos en torno al nervio ciático producen una respuesta nociceptiva en el animal con alteraciones en la composición de los nervios periféricos atendiendo al grosor de las fibras (se observa una reducción en el número de fibras C y A δ), degeneración *walleriana* y una reacción inflamatoria (Mosconi y Kruger, 1996).

- **Daño en el nervio ciático inducido fotoquímicamente:** en este modelo se perfunde en el animal un agente fotosensibilizante como la eritrosina B y, a continuación, con un láser de argón se induce una trombosis en los capilares que irrigan al nervio ciático (Kupers y cols., 1998). Asimismo, en la bibliografía se ha descrito una metodología para inducir la degeneración *walleriana* mediante un haz de láser de CO₂. En ambos casos, se ha observado en el animal dolor espontáneo, hiperalgesia térmica y alodinia mecánica (Chiang y cols., 2005).
- **Dolor inducido por formalina:** en este modelo se inyecta por vía subcutánea en la pata del animal formalina al 1 %. Se observa que, en un primer momento, la formalina produce un dolor que se debe a la estimulación directa de los nociceptores; mientras que, en una segunda fase, el dolor se debe a la liberación de mediadores inflamatorios

en el entorno de la fibra nerviosa (Hunskaar y Hole, 1987).

3.3.6.1.2 Modelos de neuropatía central

- **Daño contusivo en la médula espinal:** el modelo consiste en dejar caer un peso sobre la médula espinal del animal para producir un daño caracterizado por una paraplejia severa y necrosis, observándose signos de hipersensibilidad mecánica (Allen, 1911).
- **Daño excitotóxico en la médula espinal:** el modelo consiste en la inyección intraespinal de ácido quisquálico, agonista del receptor AMPA de glutamato. Esto induce cambios fisiopatológicos similares a los que se observan tras un daño en la médula espinal isquémico o traumático que se traducen en alodinia y dolor espontáneo (Chiang y cols., 2005).
- **Daño en la médula espinal inducido fotoquímicamente:** este modelo es semejante al daño en el nervio ciático inducido fotoquímicamente con la única diferencia que, en este caso, el daño se produce en la médula espinal en vez de en un nervio periférico. En el animal se observa alodinia mecánica y térmica y autotomía (Hao y cols., 1991).

- **Hemisección espinal:** el modelo consiste en la realización de una hemisección de la médula espinal desde la base del cráneo hasta la inserción del nervio L1 en la médula espinal, observándose alodinia en los miembros inferiores y en la cola del animal (Kim y cols., 2003).

3.3.6.1.3 Modelos de neuropatía inducida por fármacos

- **Neuropatía inducida por fármacos antitumorales:** se han empleado diversas especies de animales para investigar el efecto de los antitumorales sobre el sistema nociceptivo: ratas, ratones, conejos y cobayos. De entre los antitumorales que se han utilizado en estos modelos destacan la vincristina, los complejos de inclusión con platino o los taxanos. En los modelos animales todos ellos se perfunden empleando pautas similares a las utilizadas en terapéutica (Jaggi y cols., 2011).
- **Neuropatía inducida por antirretrovirales:** los antirretrovirales se emplean para el tratamiento del SIDA. Sin embargo, algunos de ellos, especialmente la zalcitabina, presentan como efecto adverso el dolor neuropático. El efecto de estos fármacos ha sido ensayado en especies como ratas o conejos (Jaggi y cols., 2011).

3.3.6.1.4 *Modelos de neuropatía inducida por enfermedades*

- **Neuropatía diabética:** se han empleado diversas especies de animales como modelos de neuropatía diabética, entre ellas las ratas y los ratones. Se han descrito dos modelos distintos para estudiar *in vivo* la neuropatía diabética: el empleo de estreptozocina o aloxano, toxinas que destruyen las células β pancreáticas responsables de la producción de insulina, o el empleo de animales modificados genéticamente que, o bien no produzcan insulina (como en pacientes con diabetes tipo 1) o bien sean resistentes a la hormona (como sucede en pacientes diabéticos tipo 2) (Jaggi y cols., 2011). De este modo se induce una hiperglucemia en los animales que, entre otros efectos, produce una neuropatía periférica.
- **Dolor tumoral:** se han descrito varios modelos para reproducir en animales lo que sucede en los pacientes que sufren de dolor neuropático a consecuencia de un cáncer. Los modelos de cáncer óseo consisten en la inoculación de células de fibrosarcoma osteolítico NCTC 2472 en el húmero, tibia, fémur o calcáneo del animal, en que se observan evidencias de dolor espontáneo y evocado (Schwei y cols., 1999; Wacnik y cols., 2001; Menéndez y cols., 2003; Wacnik y cols., 2003).

- **Neuropatía postherpética:** estos modelos tratan de reproducir en animales la neuropatía que se produce en seres humanos tras la reactivación del virus varicela-zoster, que se encuentra acantonado en los ganglios de raíz dorsal. Para ello, se inoculan células infectadas con el virus varicela-zoster en la pata del animal (Fleetwood-Walker y cols., 1999).
- **Neuropatía inducida por VIH:** además de la neuropatía producida por los fármacos empleados para tratar el virus del SIDA, el propio virus puede dañar las neuronas sensoriales debido a la interacción de la glucoproteína gp120, presente en la envoltura del virus, con los receptores de quimiocinas CXCR4/CCR5, expresados en neuronas y células gliales (Moss y cols., 2014). Se han desarrollado modelos animales de dolor neuropático inducido por VIH consistentes en la inyección de la glucoproteína gp120 inmersa en una matriz de celulosa oxidada en el nervio ciático (Herzberg y Sagen, 2001).
- **Modelos de neuralgia de trigémino:** los modelos animales de neuralgia de trigémino se basan en la compresión del nervio trigémino, sea mediante la inyección de una solución de agar al 4 % en áreas contiguas al nervio trigémino o mediante la colocación de

ligaduras en torno al nervio (Imamura y cols., 1997; Yang y cols., 2009).

3.3.6.1.5 *Otros modelos de neuropatía*

- **Neuropatía por consumo crónico de alcohol:** el consumo de alcohol induce, al principio, una ligera analgesia; sin embargo, al cabo de un tiempo se produce la degeneración de las terminaciones sensoriales, que cursa con dolor neuropático (Chopra y Tiwari, 2012). Para estudiar en animales esta neurodegeneración, se suplementa el alimento o el agua de bebida de los animales con etanol durante doce semanas, incrementándose paulatinamente la concentración de etanol durante los primeros días y reduciéndola de manera gradual durante los últimos días para estudiar el efecto de la retirada del alcohol sobre la sensibilidad al dolor (Narita y cols., 2007).
- **Neuropatía producida por piridoxina:** la vitamina B6 es una vitamina hidrosoluble que actúa como cofactor en numerosas reacciones biológicas. En caso de ingestas de la vitamina prolongadas en el tiempo superiores a lo recomendado en pacientes con la función renal comprometida, se produce una intoxicación que cursa con neuropatía, que puede llegar a ser irreversible en caso de

altas ingestas de la vitamina (Kulkantrakorn, 2014). La neuropatía resultante de la intoxicación con piridoxina se ha reproducido en numerosas especies de animales, entre ellas los perros y las ratas, empleando distintas dosis de la molécula (Jaggi y cols., 2011).

- **Modelo de dolor inducido por acrilamida:** la acrilamida es un monómero de vinilo cuya incorporación a la dieta se produce a partir de la reacción entre la asparagina y los azúcares al freír los alimentos. Entre otros efectos nocivos, la acrilamida produce, si se ingieren altas cantidades, una neuropatía (Erkekoglu y Baydar, 2014). En modelos animales, se han reproducido los efectos de la exposición prolongada a acrilamida administrando la sustancia en tres dosis semanales durante cinco semanas (Prasad y Muralidhara, 2013).

3.3.6.2 Modelos histológicos

- **Cortes histológicos de médula espinal:** el estudio electrofisiológico de cortes de la médula espinal permite el estudio de la conductividad iónica utilizando la técnica de fijación de membranas, que permite registrar el flujo de iones a través de canales (Nashmi y cols., 2002).

3.3.6.3 Modelos celulares

- **Neuronas sensoriales primarias:** la obtención de neuronas sensoriales se puede llevar a cabo a partir de animales adultos o fetos (Ayar y cols., 2015; Gong y cols., 2016).
- **Neuronas sensoriales inmortalizadas:** se han descrito varias líneas celulares inmortalizadas de neurona de DRG. La obtención de estas neuronas se puede llevar a cabo a partir de la inserción de los genes que codifican al antígeno T del virus SV40 y a la telomerasa transcriptasa inversa en neuronas de DRG, como en la línea celular 50B11, o bien mediante la hibridación de células de neuroblastoma y neuronas de DRG, como en las líneas celulares F11 y ND7/23 (Chen y cols., 2007; Vetter y Lewis, 2010). Asimismo, se ha descrito una línea celular de neurona de DRG obtenida a partir de cepas de ratones modificados genéticamente para expresar oncogenes (Immortomouse®). Las neuronas de DRG de estos animales, una vez aisladas, se pueden inmortalizar constituyendo la línea celular MED17.11 (Doran y cols., 2015). Recientemente, se ha descrito la generación de neuronas que expresan marcadores de neurona de DRG a partir de células humanas pluripotentes. Se ha puesto a punto de un método fenotípico para la búsqueda de

nuevos analgésicos empleando estas células (Stacey y cols., 2018).

- **Cocultivos:** el empleo de cocultivos permite estudiar la interacción de las neuronas de DRG con otros tipos celulares, especialmente células del sistema inmunitario, para investigar la fisiopatología del dolor neuropático (Kwon y cols., 2015).







Material y métodos



4. Material y métodos

4.1 LÍNEAS CELULARES

En el presente trabajo se emplearon dos líneas celulares comerciales híbridas de neuronas de ganglio de raíz dorsal (DRG) de embrión de rata (*Rattus norvegicus*) y células de neuroblastoma N18TG2 de ratón (*Mus musculus*), originadas mediante fusión por exposición a polietilenglicol: las líneas F11 y ND7/23 (Platika y cols., 1985; Wood y cols., 1990).

4.1.1 Mantenimiento del cultivo celular

Para el cultivo de ambas líneas celulares se siguieron las recomendaciones del proveedor, manteniendo las células a una temperatura de 37 °C en una atmósfera controlada con un 5 % de CO₂ y a saturación de humedad. La línea celular F11 (*ECCAC*) se sembró en placas de cultivo estériles de 100 mm de diámetro (*Corning*) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) sin piruvato sódico (*Sigma-Aldrich*). El medio se suplementó con suero fetal bovino (FBS) no dializado (*Sigma-Aldrich*) al 10 % (v/v) para aportar nutrientes y factores de crecimiento necesarios para la proliferación celular; glutamina (*Sigma-Aldrich*) 2 mM como aminoácido esencial

inestable en disolución, y una combinación de antibióticos consistente en estreptomicina 100 µg/mL con penicilina 100 UI/mL (*Sigma-Aldrich*) para evitar posibles contaminaciones microbiológicas.

En cuanto a las células ND7/23 (*ECCAC*), estas se cultivaron en las mismas placas en medio DMEM (*Sigma-Aldrich*) suplementado con FBS no dializado al 10 % (v/v), glutamina 2 mM, y estreptomicina 100 µg/mL y penicilina 100 UI/mL.

4.1.2 Descongelación de las células

La descongelación de las células se llevó a cabo a partir de viales criogénicos (*Thermo-Fisher*) conservados en ultracongeladores a -80 °C. Estos viales se descongelaron en un baño termostatzado a 37 °C y, a continuación, se suspendieron las células en 10 mL de medio de cultivo en un tubo de centrifuga de 15 mL (*Corning*). Posteriormente se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos, seguida de la aspiración del sobrenadante. El sedimento celular se suspendió en 10 mL de medio de cultivo y se sembró en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro.

4.1.3 Expansión de las células

Al alcanzar una confluencia celular del 80 % en la placa de cultivo se llevó a cabo una expansión celular, transfiriéndose un 10 % de las células a una nueva placa. De este modo, se evitó el crecimiento

de las células en capas superpuestas, que podría llegar a comprometer la supervivencia de aquellas que quedan confinadas en los estratos inferiores, así como afectar al fenotipo celular.

Para la expansión celular de ambas líneas se realizó en primer lugar un aspirado del medio de la placa madre, seguido de un lavado con 10 mL de tampón fosfato salino (PBS) (NaCl 140 mM; KH_2PO_4 2 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KCl 2,7 mM) y, una vez retirado este tampón, se añadió 1 mL de tripsina (*Sigma-Aldrich*). Este enzima proteolítico lisa las uniones entre células, así como las adherencias entre las células y la base de la placa. Tras una incubación de 5 minutos, se lavó la placa con 8 mL de medio de cultivo para diluir la tripsina y recoger la suspensión celular, transfiriendo un 10 % de esta a una nueva placa a la que previamente se habían añadido 8 mL de medio fresco.

4.1.4 Criogenización de las células

Para criogenizar las células se partió de placas de cultivo a un 80 % de confluencia. Tras una aspiración del medio, se llevó a cabo un lavado con 10 mL de PBS y la adición de 1 mL de tripsina para despegar las células, estas se recogieron en un tubo de centrifuga de 15 mL empleando medio de cultivo. El tubo se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y, tras aspirar el sobrenadante, se suspendió el sedimento de células en un medio de congelación consistente en una

mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*) al 8 % (v/v) en FBS no dializado. El DMSO actúa como crioprotector, impidiendo la formación de cristales de hielo que pudieran dañar a las células y ayudando a igualar las presiones osmóticas a ambos lados de las membranas (Ma y cols., 2010). La suspensión se transfirió a un vial de criogenización que se introdujo en un contenedor Mr. Frosty® (*Nalgene*). El recipiente se mantuvo durante 12 horas en un ultracongelador tras las cuales se extrajo el vial de criogenización para su almacenamiento a -80 °C.

4.1.5 Siembra celular

Para llevar a cabo los experimentos, las células se sembraron en placas de 96 o 384 pocillos recubiertos previamente durante 60 minutos con poli-D-lisina o una combinación de poli-D-lisina y laminina. Para su almacenamiento a -20 °C, la poli-D-lisina (*Sigma-Aldrich*) se reconstituyó empleando como solvente agua esterilizada por filtración para lograr una concentración de 100 µg/mL. El contenido del vial de laminina (*Sigma-Aldrich*) se diluyó en agua esterilizada por filtración para obtener una solución de laminina 10 µg/mL y se alicuotó para su almacenamiento a -20 °C. Ambas soluciones se diluyeron en PBS estéril hasta una concentración de 30 µg/mL y 2 µg/mL, respectivamente, para tratar las placas. Tras retirar el recubrimiento, los pocillos se enjuagaron con PBS estéril y se dejaron secar al aire durante 60 minutos.

Las células se lavaron con PBS estéril y se despegaron exponiéndolas a tripsina durante 5 minutos. Se recogieron en un tubo de centrifuga de 15 mL empleando 10 mL de medio de cultivo. Tras 10 minutos de centrifugación a una velocidad de 1000 rpm, se resuspendió el sedimento de células en 5 mL de medio de cultivo. Para el recuento celular se preparó una mezcla de tres partes de medio de cultivo, una parte de células en suspensión y una parte de azul de tripano al 0,4 % (v/v) (*Sigma-Aldrich*). Este colorante de exclusión tiñe las células que están muertas mientras que, por el contrario, la membrana plasmática de las células vivas es impermeable a la tinción (Strober, 2015). El conteo se llevó a cabo mediante una cámara de Neubauer empleando un objetivo de 20 aumentos en un microscopio de contraste de fases. Se calculó la media del número de células en cada uno de los cinco campos

Una vez determinada la concentración de células, se llevó a cabo la dilución necesaria para sembrarlas a la densidad requerida según el experimento.

4.2 MICROSCOPIA FLUORESCENTE DE ALTO RENDIMIENTO

4.2.1 Valoración de la diferenciación celular

La diferenciación celular para adquirir características propias de neuronas de DRG se valoró de dos formas distintas: midiendo la expresión del receptor TrkA, proteína característica de este tipo de

células y cuantificando la longitud de las neuritas de las células diferenciadas. Ambas medidas precisaron el empleo de sistemas de microscopía de fluorescencia.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos estériles con fondo transparente (*Perkin-Elmer*) previamente tratadas con laminina y poli-D-lisina. Se sembraron 5000 células por pocillo suspendidas en 100 μ L de medio de cultivo. 24 horas después, el medio de cultivo se reemplazó por medio de diferenciación. Las células permanecieron diferenciando durante 72 horas en los incubadores a una temperatura de 37 °C en atmósfera saturada de humedad y con un 5 % de CO₂.

4.2.1.1 Cuantificación de la expresión del marcador neuronal

Previamente a la tinción, las células se fijaron empleando una solución de paraformaldehído (*Sigma-Aldrich*) al 4 % (m/v) en PBS y, posteriormente, se lavaron dos veces con este tampón. El paraformaldehído mata las células conservando la arquitectura de las estructuras celulares (Leyton Puig y cols., 2016). A continuación, las células se trataron durante una hora con una solución de bloqueo consistente en albúmina sérica bovina (ASB) (*Sigma-Aldrich*) al 5 % (m/v) y Triton[®] X-100 (*Sigma-Aldrich*) al 0,1 % (v/v) en PBS. La ASB es una proteína que se adsorbe en áreas de las células cargadas eléctricamente previniendo uniones inespecíficas con los anticuerpos (Phan y cols., 2015). El Triton[®] X-100 es un detergente no iónico que

permeabiliza las membranas celulares permitiendo la tinción (Zang y cols., 2013). Las células fijadas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en presencia de un anticuerpo de conejo anti-TrkA (*Santa Cruz Biotechnologies*) diluido en solución de bloqueo en proporción 1:500. A continuación, las células se lavaron dos veces con dicha solución y se tiñeron durante una hora mediante un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con CFL647[®] (*Santa Cruz Biotechnologies*) en proporción 1:250 y colorante nuclear Hoechst 33342 (*Thermo-Fisher*) en proporción 1:1500, ambos diluidos en solución de bloqueo. Tras realizar dos lavados con la solución se tomaron las imágenes de las células mediante un microscopio de alto contenido Operetta[®] (*Perkin-Elmer*) con un objetivo de 20 aumentos y realizando 12 microfotografías por cada pocillo. Para identificar la longitud de onda de excitación y emisión de los marcadores fluorescentes se empleó la aplicación SpectraViewer[®] (*Thermo-Fisher*), concluyendo que la máxima excitación del fluoróforo CFL647[®] se produce con luz de una longitud de onda de 649 nm, emitiendo luz de una longitud de onda de 664 nm. En cuanto al Hoechst 33342, la máxima excitación se produce al incidir la luz con una longitud de onda de 350 nm, emitiendo luz con una longitud de onda de 460 nm.

4.2.1.2 Cuantificación de la longitud de las neuritas

Para cuantificar la longitud de las neuritas, las preparaciones de células bloqueadas y permeabilizadas se tiñeron con una dilución

1:500 de un anticuerpo anti- β -tubulina conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 (*Becton & Dickinson Biosciences*) y el colorante nuclear DRAQ5[®] (*Abcam*) a una concentración 2,5 μ M en solución de bloqueo. Previamente a la toma de imágenes mediante el sistema de microscopía de alto contenido Operetta[®], las células se lavaron dos veces con la solución de bloqueo. Para la realización de las microfotografías se utilizó un objetivo de 20 aumentos y se capturaron 12 imágenes en cada pocillo. Mediante el programa SpectraViewer[®] (*Thermo-Fisher*) se identificó que la máxima excitación del fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 se produce con luz de longitud de onda de 490 nm, emitiendo luz de longitud de onda 525 nm. DRAQ5[®] presenta una excitación máxima a 647 nm y emite luz con una longitud de onda 681 nm.

En ambos casos las imágenes se procesaron utilizando el programa informático de visión y análisis de imagen Columbus[®] (*Perkin-Elmer*), obteniéndose los valores medios en las 12 microfotografías capturadas en cada pocillo.

4.2.2 Valoración de la neurodegeneración

Para valorar la neurodegeneración se cuantificó el efecto de diferentes fármacos sobre el acortamiento de la longitud de las neuritas, y la capacidad de algunas moléculas para revertir este acortamiento. Para ello, se sembraron 5000 células por pocillo en

placas de 96 pocillos estériles con fondo transparente previamente tratadas con poli-D-lisina. Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó por 100 μL de medio de diferenciación. Las células permanecieron diferenciando durante 72 horas en los incubadores a una temperatura de 37 °C en atmósfera saturada de humedad y con un 5 % de CO_2 . Sobre los 100 μL de medio de diferenciación se añadieron 50 μL de los fármacos a estudiar disueltos en el medio de diferenciación. Tras 24 horas a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y con un 5 % de CO_2 se sustituyó el medio presente en el pocillo por 100 μL de medio fresco y se dejó incubar durante 72 horas la placa a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y con un 5 % de CO_2 .

Para identificar las neuritas, las preparaciones de células fijadas, bloqueadas y permeabilizadas con un tampón de bloqueo, con ASB al 2 % (m/v) y Triton[®] X-100 al 0,1 % (v/v) en HBSS, se tiñeron con una dilución 1:500 de un anticuerpo anti- β -tubulina conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 (*Becton & Dickinson Biosciences*) y el colorante nuclear DRAQ5[®] (*Abcam*) a una concentración 2,5 μM en medio DMEM sin aditivos. Previamente a la toma de imágenes mediante el sistema de microscopía de alto contenido Operetta[®], los pocillos se rellenaron con 100 μL de tampón de bloqueo. Para la realización de las microfotografías se utilizó un objetivo de 20 aumentos y se capturaron 12 imágenes en cada pocillo empleando

los mismos filtros de excitación y emisión que en el caso anterior. Mediante el programa informático Harmony® (*Perkin-Elmer*), se procesaron las imágenes aplicando un filtro de corrección basado en una distorsión gaussiana y seleccionando las crestas de señal de la imagen para delimitar correctamente el perfil de los cuerpos celulares. Se puso a punto un protocolo de detección de neuritas y se seleccionó como resultado la longitud máxima de neuritas.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE LA REDISTRIBUCIÓN DINÁMICA DE MASA

La medida de la redistribución dinámica de masa (DMR) es un ensayo fenotípico capaz de valorar la acción global de diferentes estímulos sobre procesos celulares que afectan a la forma de las células, a la adhesión celular y a la reorganización de los componentes del citoesqueleto (Scott y Peters, 2010). Se basa en la utilización de biosensores que reaccionan a los cambios de forma de las células modificando el índice de refracción de un haz de luz que incide en el fondo del pocillo (**figura 9**) (Fang, 2010).

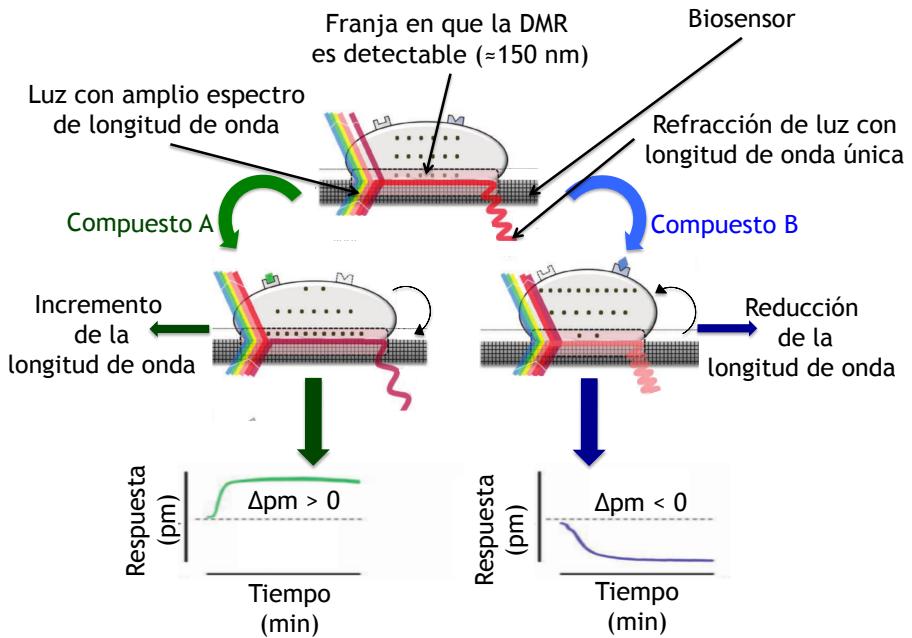


Figura 9. Fundamento de la medida de DMR. Adaptado y traducido con el permiso de Springer Nature (Schröder y cols., 2011).

Para la realización del ensayo, las células se sembraron en placas EnSpire-LFC[®] de 384 pocillos (*Perkin Elmer*) previamente tratadas con laminina y poli-D-lisina. Se sembraron 10000 células por pocillo suspendidas en 50 μL de medio de cultivo y se mantuvieron a 37° C en una atmósfera con un 5 % de CO_2 y a saturación de humedad. Tras 24 horas en esas condiciones, las células se lavaron tres veces con un tampón de ensayo consistente en una solución de ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 20 mM en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (CaCl_2 1,3 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,49 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,41 mM; KCl 5,3 mM; KH_2PO_4 0,44 mM;

NaCl 140 mM; Na₂HPO₄·7H₂O 0,34 mM; glucosa 5,6 mM) ajustada a pH 7,4 utilizando una estación de trabajo automatizada Janus® (*Perkin-Elmer*). A continuación, las células se incubaron a 37 °C en 40 µL de tampón de ensayo por pocillo durante 90 minutos antes de realizar la medida de DMR.

Para la realización de los ensayos en las células diferenciadas se reemplazó el medio de cultivo por medio de diferenciación 72 horas antes de realizar el experimento. Las células se lavaron con el tampón de ensayo y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C en 40 µL de tampón de ensayo antes de llevar a cabo la medida de la DMR.

La medida de DMR se realizó a una temperatura constante de 37 °C. En primer lugar, se registró la línea base durante 20 minutos y, a continuación, se añadieron 10 µL de una disolución de los compuestos correspondientes en el tampón de ensayo mediante el robot Janus® y se monitorizó la respuesta de las células durante 60 minutos. Mediante el programa informático Enspire Manager® (*Perkin-Elmer*) se obtuvo un registro del valor de DMR con una frecuencia de una lectura por minuto en cada pocillo restando el valor medio de la respuesta basal.

4.4 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

La medida de la concentración de calcio intracelular se basa en la utilización de quelantes de iones calcio (Ca^{2+}) acoplados a sondas fluorescentes que, al formar un complejo de inclusión con el catión, emiten una señal fluorescente tras ser excitados con un haz de luz de una determinada longitud de onda (Hansen y Bräuner-Osborne, 2009). En el presente trabajo se empleó, como sonda sensible a la concentración de calcio intracelular, Calcium - 6[®] (*Molecular Devices*).

4.4.1 Ensayos de estimulación de la movilización de calcio intracelular

Para medir la concentración intracelular de calcio se sembraron 5000 células por pocillo en placas de 384 pocillos de color negro con fondo plano transparente (*Greiner Bio-One*). El método de cultivo y diferenciación que se empleó fue idéntico al utilizado en los ensayos de DMR. Antes de la lectura se aspiró el medio, se realizaron tres lavados con tampón de ensayo mediante el sistema automatizado Janus[®], y se añadieron 25 μL de medio sin aditivos y 25 μL del colorante Calcium - 6[®] reconstituido en el mismo tampón de ensayo que se empleó en los experimentos de DMR. Tras dos horas de incubación en oscuridad a 37 °C se midieron los cambios en la concentración de calcio intracelular al añadir los compuestos correspondientes disueltos en el tampón de ensayo. Para llevar a cabo

la medida se utilizó un sistema funcional de cribado de fármacos FDSS7000EX[®] (*Hamamatsu Photonics*) con un filtro de excitación de 470 - 495 nm y un filtro de emisión de 515 - 575 nm a una temperatura de 37 °C y con una frecuencia de registro de imágenes de un disparo cada 500 ms. Las puntas FDSS[®] (*Hamamatsu Photonics*) se trataron previamente con una solución de ASB al 0,1 % (m/v) en tampón de ensayo para evitar la adsorción de los compuestos.

Mediante el programa informático FDSS7000EX/ μ cell[®] (*Hamamatsu Photonics*) se obtuvo la diferencia entre la señal máxima en el pico de respuesta inducido por el compuesto y la señal basal registrada inmediatamente antes de la adición de la molécula.

4.4.2 Ensayos de inhibición de la movilización de calcio intracelular

Las células se sembraron a una densidad de 5000 células por pocillo en placas de 384 pocillos de color negro con fondo plano transparente. El método de cultivo y diferenciación que se empleó fue idéntico al utilizado en los ensayos previos. Antes de la lectura se aspiró el medio, se realizaron tres lavados con tampón de ensayo mediante el sistema automatizado Janus[®] y se añadieron 25 μ L del colorante Calcium - 6[®], reconstituido en el mismo tampón de ensayo que se empleó en los experimentos de DMR. La placa se mantuvo durante una hora a 37 °C y en oscuridad antes de añadir 25 μ L de una

solución de los fármacos antagonistas en cada pocillo. A continuación, se incubó durante una hora la placa a 37 °C y en oscuridad antes de introducirla en el lector FDSS7000EX[®] con un filtro de excitación de 470 - 495 nm y un filtro de emisión de 515 - 575 nm a una temperatura de 37 °C y con una frecuencia de registro de imagen de un disparo cada 500 ms. El lector se programó para añadir 12 µL de una solución de mediadores inflamatorios o *sopa inflamatoria* (histamina 10 µM, serotonina 10 µM, prostaglandina E₂ 10 µM y bradicinina 1 µM) en tampón de ensayo 30 segundos después del inicio de la lectura y 12 µL de KCl 186 mM (para una concentración final de la sal igual de 32 mM), 10 minutos después de la adición de la *sopa inflamatoria*. Las puntas FDSS[®] se trataron previamente con una solución de ASB al 0,1 % (m/v) en tampón de ensayo para evitar la adsorción de los compuestos.

Mediante el programa informático FDSS7000EX/µcell[®] se obtuvo la diferencia entre la señal máxima en el pico de respuesta inducido por el compuesto y la señal basal registrada inmediatamente antes de la adición de la molécula.

4.4.2.1 Cribado de la quimioteca Prestwick[®]

Para la identificación de posibles analgésicos de entre las moléculas de la quimioteca Prestwick[®], se partió de cuatro placas de 384 pocillos de polipropileno (*Labcyte*) conteniendo los

1120 compuestos que conforman la quimioteca disueltos en DMSO a una concentración de 10 mM. Utilizando un dispensador Echo[®] 555 (*Labcyte*), se transfirieron 100 nL de cada uno de los compuestos a otra placa intermedia de polipropileno. En cada pocillo se añadieron 50 μ L de medio DMEM sin aditivos para obtener una concentración de compuestos intermedia de 20 μ M. Mediante un dispensador automatizado Janus[®] se transfirieron 25 μ L de cada pocillo de la placa de células a la que, una hora antes, se le habían añadido 25 μ L de colorante Calcium 6[®] por pocillo de manera que la concentración final de las moléculas de la quimioteca Prestwick[®] fuese 10 μ M.

4.5 CUANTIFICACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA

Existen varias técnicas para cuantificar la medida del potencial de membrana basadas en sondas capaces de responder a cambios en el voltaje con variaciones en la fluorescencia emitida. En el presente trabajo se han utilizado dos metodologías diferentes: el kit FluoVolt[®] (*Thermo-Fisher*), que es de respuesta rápida y mide cambios de potencial de modo instantáneo; por el contrario, el ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico)trimetinaoxonol (DiBAC₄(3)) es un colorante sensible a cambios de voltaje de respuesta lenta, midiendo las variaciones que se producen a largo plazo (**tabla 10**) (**figura 10**).

Tabla 10. Comparativa entre los métodos de medida de potencial de membrana empleados (Epps y cols., 1994; Baxter y cols., 2002; Miller y cols., 2011; Pakhomov y cols., 2017).

	Fluovolt®	DiBAC₄(3)
Respuesta	Rápida	Lenta
Relación entre señal y potencial de membrana	Incremento de señal indica despolarización de la membrana	Incremento de señal indica despolarización de la membrana
Mecanismo	El colorante tiene tres partes: un donante de electrones en el interior celular, un fluoróforo en el exterior y una cadena molecular que une ambos. Al despolarizarse la membrana, hay una transferencia de electrones hacia el fluoróforo que emite una señal.	El colorante tiene carga negativa y penetra en la célula al despolarizarse la membrana, uniéndose a proteínas intracelulares y emitiendo una señal fluorescente.
Sensibilidad	25 % por 100 mV	1 % por 1 mV
Velocidad de respuesta	< 1 ms	≈ 20 ms
λ de excitación	522 nm	490 nm
λ de emisión	535 nm	516 nm

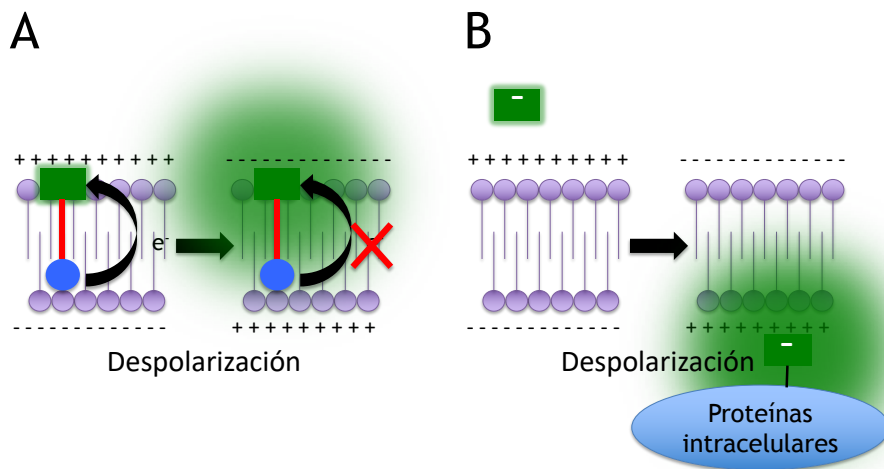


Figura 10. Mecanismo de actuación de las dos sondas fluorescentes empleadas para medir el potencial de membrana: (A) FluoVolt® y (B) DiBAC₄(3).

4.5.1 Cuantificación del potencial de membrana mediante FluoVolt®

Las células F11 se sembraron en placas de 384 pocillos de color negro con fondo plano transparente previamente tratados con poli-D-lisina y laminina a una densidad de 5000 células por pocillo. El método de cultivo y diferenciación celular que se empleó fue idéntico al utilizado en los ensayos precedentes de medida de la DMR y de la concentración intracelular de calcio. La preparación de los componentes del kit se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante: se preparó una solución con un 1 % (v/v) del componente A (FluoVolt®) y un 10 % (v/v) del componente B (PowerLoad®) en el tampón de ensayo. El componente A del kit es la sonda fluorescente y

el componente B es un surfactante no iónico que favorece la dispersión de la sonda y permite que esta se intercale en el seno de la membrana plasmática (Bedut y cols., 2016). Tras tres lavados con tampón de ensayo mediante el sistema automatizado Janus[®], se añadieron 25 μL de esta solución a cada pocillo de la placa y se realizó una incubación a temperatura ambiente agitando a una velocidad de 200 rpm durante 30 minutos. A continuación, se aspiró la solución de cada uno de los pocillos y se añadieron 25 μL del componente C del kit (Neuro[®] Background Suppressor) diluido en tampón de ensayo en una proporción del 5 % (v/v). Este componente actúa suprimiendo la fluorescencia de fondo y, por lo tanto, mejorando la ventana del ensayo (Bedut y cols., 2016). Los cambios en el potencial de membrana producidos al añadir los compuestos correspondientes disueltos en el tampón de ensayo se midieron mediante el lector de fluorescencia FDSS7000EX[®] con un filtro de excitación de 470 - 495 nm y un filtro de emisión de 515 - 575 nm a una temperatura de 37 °C y con una frecuencia de registro de imagen de un disparo cada 500 ms. Las puntas FDSS[®] se trataron previamente con una solución de ASB al 0,1 % (m/v) en tampón de ensayo para evitar la adsorción de los compuestos.

Mediante el programa informático FDSS7000EX/ μcell [®] se obtuvo la diferencia entre la señal máxima en el pico de respuesta

inducido por el compuesto y la señal basal registrada inmediatamente antes de la adición de la molécula.

4.5.2 Cuantificación del potencial de membrana mediante DiBAC₄(3)

Las células F11 se sembraron en placas de 384 pocillos de color negro con fondo plano transparente previamente tratados con poli-D-lisina y laminina a una densidad de 5000 células por pocillo. El método de cultivo y diferenciación celular que se utilizó fue idéntico al empleado en los ensayos precedentes. Las células se lavaron tres veces con el tampón de ensayo utilizando el sistema automatizado Janus[®]. A continuación, se añadieron 50 μ L de una solución de DiBAC₄(3) (*Sigma-Aldrich*) 2 μ M en tampón de ensayo a cada pocillo, y se dejaron incubar las células durante 60 minutos a 37 °C en atmósfera con un 5 % de CO₂ y a saturación de humedad. Los cambios en el potencial de membrana producidos al añadir los compuestos correspondientes disueltos en el tampón de ensayo se cuantificaron mediante el lector de fluorescencia FDSS7000EX[®] con un filtro de excitación de 470 - 495 nm y un filtro de emisión de 515 - 575 nm a una temperatura de 37 °C y con una frecuencia de registro de imagen de un disparo cada 500 ms. Las puntas FDSS[®] se trataron previamente con una solución de ASB al 0,1 % (m/v) en tampón de ensayo para evitar la adsorción de los compuestos.

Mediante el programa informático FDSS7000EX/ μ cell[®] se obtuvo la diferencia entre la señal máxima de la respuesta inducida por el compuesto y la señal basal registrada inmediatamente antes de la adición de la molécula.

4.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE TRPV1 POR SDS-PAGE Y WESTERN

BLOT

4.6.1 Preparación de la muestra

Las proteínas para la realización del Western *blot* se aislaron a partir de células F11 sembradas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro a un 80 % de confluencia. Las células se despegaron de la placa utilizando PBS a 4 °C para transferirlas a un tubo de centrifuga. Tras una centrifugación a 3000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se añadió al sedimento celular 1 mL del tampón de lisado para radioinmunoprecipitación (RIPA) (NaCl 150 mM; IGEPAL[®] CA-630 1%; deoxicolato sódico 0,5%; laurilsulfato de sodio (SDS) 0,1%; Tris 50 mM; pH 8) (*Santa Cruz Biotechnologies*), suplementado con ortovanadato de sodio al 1 % (v/v), una solución de inhibidores de proteasas al 1 % (v/v) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) al 1 % (v/v).

Tras la homogeneización por rotación durante 60 minutos a 4 °C, se centrifugaron los viales a 14000 x g durante 30 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Se prepararon alícuotas de 20 μ g de

proteína midiendo la concentración proteica con el kit Bio-Rad DC Protein Assay® (*Bio-Rad*), basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

4.6.2 Preparación de los geles de electroforesis

Se utilizó un gel de poliacrilamida con dos fases: una fase con una concentración de poliacrilamida del 3 % (m/v) (gel concentrador), y otra fase, con una concentración de poliacrilamida del 15 % (m/v) (gel separador). Para la elaboración del gel se partió de una solución comercial de acrilamida/bisacrilamida en proporción 29:1 (m/m) (*Bio-Rad*), suplementada con SDS (*Sigma-Aldrich*) al 0,1 % (m/v); persulfato de amonio (APS) (*Sigma-Aldrich*) al 0,01 % (m/v), y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (*Sigma-Aldrich*) a una concentración del 0,125 % (m/v) en el gel concentrador y del 0,4 % (m/v) en el gel separador. Tras la elaboración de cada una de las fases, se dejó fraguar el gel durante 45 minutos. Antes de realizar la electroforesis, el gel se mantuvo durante 18 horas a 4 °C.

4.6.3 Electroforesis (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó de acuerdo con el procedimiento de Laemmli (Laemmli, 1970), a partir de alícuotas de 100 µg de proteína procedentes del lisado de las células. Estas alícuotas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y, a continuación, se diluyeron en un tampón de carga de Laemmli (SDS 1,7 % [m/v]; glicerol [*Sigma-Aldrich*] 5 %

[v/v]; azul de bromofenol [*PanReac Química*] 30 µg/mL). El gel cargado se introdujo en un soporte ubicado en el interior de una cubeta con un tampón de electroforesis (SDS 0,1 % [m/v], TRIS 25 mM; glicina [*Sigma-Aldrich*] 190 mM). La electroforesis se llevó a cabo durante 70 minutos aplicando una diferencia de potencial de 200 V y se utilizó Precision Plus Protein[®] Dual Color Standard (*Bio-Rad*) como marcador del peso molecular.

4.6.4 Electrotransferencia

En la presente tesis doctoral se empleó una electrotransferencia semiseca, en la que el gel y la membrana se rodearon de papeles humedecidos con un tampón conductor dentro de una cámara con dos electrodos (Kyhse-Andersen, 1984).

Para llevar a cabo la transferencia, las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (*Bio-Rad*) se activaron sumergiéndolas en metanol (*VWR*) durante un minuto en agitación. A continuación, se lavaron las membranas con agua ultrapurificada. Para la transferencia de las proteínas se empleó un tampón de Towbin modificado (metanol 20 % [v/v], Tris 20 mM; glicina 150 mM), aplicando una diferencia de potencial de 15 V entre ambos electrodos de la cámara de transferencia durante 90 minutos (Towbin y cols., 1979).

4.6.5 Marcaje de la proteína con anticuerpos

Previamente al marcaje, la membrana se cortó, reservándose dos fragmentos: uno correspondiente a la banda de las proteínas de masa molecular 50 - 55 kDa (franja donde se encuentra la β -tubulina, que fue la proteína empleada como control) y otro correspondiente a proteínas de masa molecular 90 - 95 kDa (franja donde se incluye al TrpV1). Ambos fragmentos se sumergieron en un tampón de bloqueo (ASB 5 % [m/v], polisorbato 20 [*Sigma-Aldrich*] 0,1 % [v/v] en TTBS) durante dos horas en agitación. A continuación, se les añadió una dilución 1:250 de anticuerpo anti-TrpV1 (*Abcam*) en tampón de bloqueo y se incubó durante 18 horas a 4 °C en agitación. Tras dos lavados con TTBS en agitación, se añadió una solución del anticuerpo secundario anti-conejo (*Cell Signalling Technology*) y de un anticuerpo anti- β -tubulina (*Cell Signalling Technology*) marcados con peroxidasa de rábano (HRP) en TTBS diluidos 5000 y 25000 veces, respectivamente. Los anticuerpos se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación. Tras cinco lavados con el tampón TTBS en agitación, se sumergieron ambos fragmentos de la membrana durante 5 minutos en una mezcla a partes iguales de cada uno de los componentes del kit de detección Novex[®] ECL Chemoluminiscent Substrate Reagent Kit (*Thermo-Fisher*), protegiendo de la luz y en agitación.

4.6.6 Revelado

Para llevar a cabo el revelado se utilizó el kit Carestream® Kodak® Autoradiography GBX Developer/Replenisher (*Sigma-Aldrich*), que consta de dos soluciones fotográficas: un revelador y un fijador. Como soporte para el revelado se empleó la película fotográfica X50 Hyperfilm® ECL (*Invitrogen*). Se ensayaron tiempos de exposición de la película a los fragmentos de la membrana comprendidos entre 20 segundos y un minuto (definiéndose un tiempo óptimo de 20 segundos); a continuación, la película se sumergió en el líquido revelador durante 15 segundos y, seguidamente, se introdujo en una cubeta con fijador durante un minuto.

4.7 ENSAYO DE EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

La supervivencia celular se evaluó cuantificando la cantidad de ATP en el interior de las células. Para ello se empleó un kit basado en el empleo de ATP como cofactor del enzima luciferasa, responsable de la oxidación de la luciferina en una reacción en la que se desprende energía en forma de luz. Esta reacción es la causa de la bioluminiscencia de los insectos de la familia *Lampyridae* (luciérnagas) (Li y cols., 2013).

Para llevar a cabo el ensayo se sembraron las células F11 en placas de 384 pocillos blancas y de fondo opaco (*Greiner Bio-One*) a una densidad de 4000 células por pocillo. Tras 24 horas a 37 °C en

atmósfera saturada de humedad y con un 5 % de CO₂, el medio de crecimiento se reemplazó por medio de diferenciación y se introdujo en un incubador en las mismas condiciones. Al cabo de tres días, se sustituyó el medio de diferenciación por 50 µL de *sopa inflamatoria* o el antirretroviral zalcitabina diluidos en medio de diferenciación. La placa se mantuvo a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y con un 5 % de CO₂. Para cuantificar la cantidad de ATP presente en los pocillos, se utilizó el kit CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (*Promega*), que consta de dos viales: uno con un disolvente y otro con un sólido pulverulento liofilizado que hubo de ser reconstituido con el disolvente y alicuotado para ser conservado a -20 °C. Tras atemperar la alícuota del kit y la placa, se añadieron 50 µL de la alícuota a cada pocillo y se dejó incubar durante 2 minutos en oscuridad y agitando a 100 rpm a fin de garantizar el lisado de las células; posteriormente, se dejó reposar la placa en oscuridad a 37 °C. La luminiscencia generada se cuantificó durante un segundo mediante un lector ULTRA Evolution[®] (*Tecan*).

Para la obtención de los resultados, se restó a la señal obtenida en cada pocillo con células la señal generada en un pocillo con las mismas cantidades de medio sin células.

4.8 ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA

El estudio del transcriptoma celular permite conocer cuáles son los genes que se transcriben a ARN_m. Se trata de un estudio comparado, que permite contrastar los niveles de expresión de los genes bajo dos circunstancias diferentes. En el presente trabajo hemos utilizado dos métodos distintos de estudio del transcriptoma: una secuenciación global de todo el transcriptoma utilizando la técnica NextSeq500 (*Illumina*), y un ensayo de reacción en cadena de polimerasa inversa a tiempo real (RT-qPCR), que hemos empleado para confirmar los resultados de la secuenciación global del transcriptoma.

4.8.1 Obtención de la muestra

Para la obtención de ARN_m se partió de lotes de cuatro placas de 150 mm de diámetro en que se sembraron las células F11 a una densidad de 20 millones de células por placa. Tras 24 horas a 37 °C y en atmósfera saturada de humedad con un 5 % de CO₂, el medio de cultivo se sustituyó por medio de diferenciación. Las células se dejaron diferenciar en las mismas condiciones de temperatura, concentración de CO₂ y humedad. Al cabo de tres días, se sustituyó el medio de diferenciación por un medio de diferenciación fresco conteniendo *sopa inflamatoria* en tres de los lotes, el antirretroviral zalcitabina (ddC) (*Haoyuan Chemexpress*) a una concentración de 1 µM en otros tres lotes, y, en los tres lotes restantes, se añadió medio

de diferenciación fresco. Las células se incubaron en las mismas condiciones de temperatura, concentración de CO₂ y humedad antes de llevar a cabo el aislamiento del ARN_m.

El aislamiento del ARN_m se llevó a cabo mediante el kit RNeasy[®] mini kit (*Qiagen*), basado en el empleo de pequeñas columnas cromatográficas de afinidad con un recubrimiento de gel de sílice capaces de adsorber las moléculas de ARN. Todas las superficies de trabajo, pipetas y equipos se trataron con RNase Zap[®] (*Thermo-Fisher*), una solución detergente básica capaz de desactivar las ribonucleasas que pudieran degradar el ARN_m de la muestra.

Se aspiró el medio de las placas y la superficie de estas se lavó dos veces con PBS. A continuación, se añadió a las placas 1 mL del tampón RLT[®] del kit con mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) al 1 % (v/v). Este componente del kit es una solución hiperosmótica de lisis que contiene agentes caotrópicos capaces de desnaturalizar los ácidos nucleicos; además, la adición de mercaptoetanol tiene como finalidad impedir la acción de las ribonucleasas.

El lisado se recogió y se transfirió a las columnas cromatográficas incluidas en el kit que se introdujeron en tubos de microcentrífuga. El sistema se centrifugó a una velocidad de 8000 x g y se descartó la fase móvil, puesto que el gel de sílice de la columna adsorbe los ácidos

nucleicos. A continuación, se eluyeron a través de la columna 700 μL del componente RW1[®] centrifugando el sistema a una velocidad de 8000 x g, seguido de dos eluciones con 500 μL del componente RPE[®] diluido cuatro veces en etanol con idéntica velocidad de centrifugación. La finalidad del empleo de estas soluciones fue la eliminación del ADN y otras impurezas para aislar el ARN. Por último, el ARN se eluyó con 50 μL de agua libre de ribonucleasas centrifugando a una velocidad de 800 x g. La concentración de ARN se estimó utilizando un lector NanoDrop[®] 2000C (*Thermo-Fisher*). Este instrumento es un espectrofotómetro que basa su funcionamiento en que los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción con luz ultravioleta de longitud de onda 260 nm (Heptinstall y Rapley, 2000).

4.8.2 Análisis global del transcriptoma

4.8.2.1 Análisis de la calidad del ARN_m

Previamente a la secuenciación se llevó a cabo un control de calidad del ARN_m con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer System[®] (*Agilent*). Este sistema permite determinar la cantidad, tamaño, pureza e integridad del ARN_m. Para ello se realizó una electroforesis capilar en chip para separar las muestras y, a continuación, mediante un haz de luz láser y un detector de fluorescencia, se obtuvo un electroferograma del ARN de la muestra. Utilizando el programa informático 2100 Expert[®] (*Agilent*), se obtuvo el número de integridad del ARN_m (RIN), valor comprendido entre 0 y 10 que es

indicativo de la calidad del ARN_m aislado. Para el cálculo de este parámetro se emplea un algoritmo que compara el ARN_m de bajo peso molecular y el ARN_m de alto peso molecular en la muestra (Mueller y cols., 2016). El predominio del ARN_m de bajo peso molecular indica que gran parte del ARN_m de la muestra se ha degradado (por lo que el valor de RIN tenderá a 0). Por el contrario, un predominio de ARN_m de alto peso molecular es indicativo de la alta integridad del ARN_m de la muestra (con lo que el valor de RIN tenderá a 10). Valores de RIN inferiores a 8 son indicativos de una pobre calidad de la muestra y, por lo tanto, indican que el material aislado no es válido para secuenciar.

Las muestras de ARN_m aisladas a partir de las células F11 mostraron una integridad cercana a los valores máximos (RIN = 8,2 – 9,6) y se consideraron adecuadas para los estudios de secuenciación de nueva generación (**figura 11**).

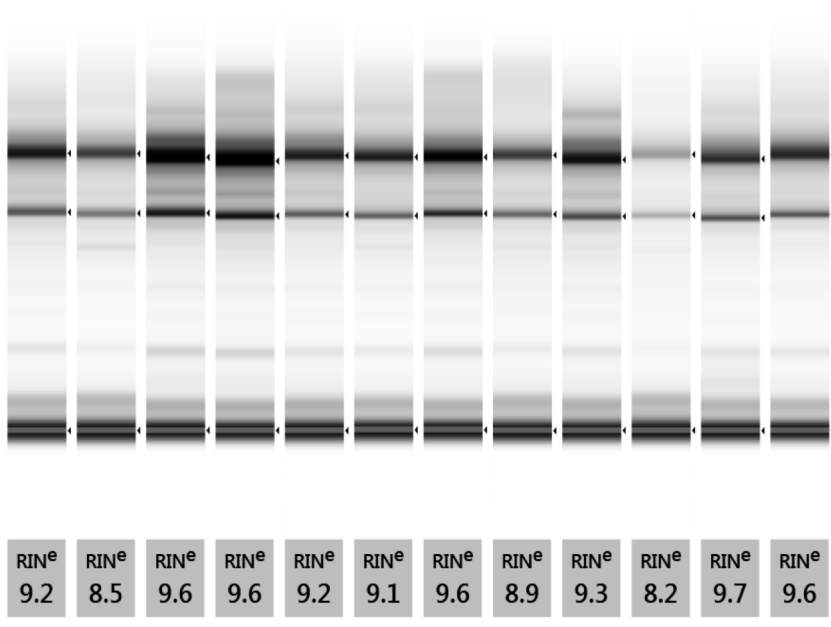


Figura 11. Perfil electroforético y RIN de las muestras de ARN_m total aisladas a partir de las células F11.

4.8.2.2 Secuenciación del transcriptoma

La secuenciación se realizó en el Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) (Granada, Andalucía) mediante la plataforma NextSeq 500[®] (Illumina). Este sistema consta de los siguientes pasos: en primer lugar, el ARN fue cortado en pequeños fragmentos por la acción enzimática de la ribonucleasa específica de poli(a). A continuación, se procedió a la transformación del ARN_m mediante transcriptasa inversa, siendo copiado a ácido desoxirribonucleico complementario (ADN_c). Este ADN_c se enriqueció por PCR en

soporte sólido (célula de flujo), para lo que se unió inicialmente a oligonucleótidos complementarios adaptadores, y por acción de ligasas y polimerasas se generaron secuencias complementarias a los fragmentos de ADN en dirección 5' - 3' que se amplificaron repitiendo varias veces ciclos de desnaturalización y extensión. Este proceso se denomina amplificación en grupo. Finalmente, todas las secuencias de ADN 3' - 5' se lavaron y se llevó a cabo una secuenciación por síntesis. Es decir, se emplearon nucleótidos marcados con una sonda fluorescente de manera que a cada una de las bases (A, T, C, G), le correspondió una determinada longitud de onda. Así, según la secuencia de colores en cada cadena, el sistema registró la secuencia nucleotídica.

4.8.2.3 Análisis bioinformático e interpretación estadística de los datos

Los doctores Raquel Cruz, Jorge Amigo y Catarina Allegue del Grupo de Medicina Xenómica (GMX) de la Universidade de Santiago de Compostela (USC) llevaron a cabo el análisis de los datos crudos en formato fastq y su interpretación estadística. Estos análisis consistieron fundamentalmente en una serie de transformaciones de formato para poder integrarlo en los programas de análisis y en el alineamiento de secuencias frente a genomas de referencia. En el caso de las células F11, al tratarse de una línea celular clonal derivada de la fusión de neuronas de ganglio dorsal de rata con células de

neuroblastoma de ratón (Platika y cols., 1985), se decidió realizar estos análisis de alineamiento de forma independiente frente a los genomas de referencia más recientes para cada una de estas especies, en este caso rn6 (rata) y mm10 (ratón). En primer lugar, se testó la calidad de los datos generados mediante dos programas informáticos: FastQC y Prinseq (*Babraham Bioinformatics*). Posteriormente, se relacionaron los datos generados con el gen correspondiente. Para ello, se detectaron duplicados con la herramienta Picard (*Picard tools*) y se alinearon las secuencias con el gen respectivo mediante el algoritmo STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*, Alineamiento de Tránsitos Empalmados a una Referencia). Se realizó un control de calidad de estos alineamientos empleando el programa RNA-SeQC. La cuantificación de la expresión de cada gen se llevó a cabo utilizando el programa informático HOMER (*Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment*, Optimización Hipergeométrica de Enriquecimiento de Motivos), permitiendo realizar el análisis de expresión diferencial mediante herramientas R. Se realizó un escalado multidimensional con R y se compararon las secuencias presentes en las muestras con la herramienta edgeR. Finalizado este análisis se obtuvo el archivo de expresión diferencial con el que se llevó a cabo la interpretación biológica de los resultados de expresión diferencial entre categorías utilizando el programa informático IPA[®] (Ingenuity Pathway Analysis[®]) (*Quiagen*).

El análisis de expresión diferencial se realizó empleando el software libre R (R versión 3.2.3) con la librería edgeR (Robinson y cols., 2009; McCarthy y cols., 2012).

La metodología empleada ajustó modelos generalizados lineales (GLM) basados en una distribución binomial negativa con *quasi-likelihood* (QL) tests. Este método controla la tasa de error de forma más estricta que otros tests usados de forma tradicional en la misma librería (por ejemplo, el test exacto) y resulta especialmente apropiado en experimentos con múltiples tratamientos y pocas réplicas biológicas (Chen y cols., 2017).

Previamente se realizó un filtrado para eliminar posibles artefactos, seleccionando genes presentes en al menos tres muestras con un valor mayor igual a una cpm (lo que equivale a 23 cuentas en rata y 35 en ratón). Se ha confirmado por MDS (*multidimensional scaling*) que al aplicar este filtro se mejora la separación de las muestras sometidas a diferente tratamiento, aunque la discriminación entre las células no diferenciadas fue siempre más acentuada que la diferenciación entre otros grupos.

Para analizar la diferenciación de los perfiles de expresión entre las muestras (células no diferenciadas frente a células diferenciadas, células diferenciadas *versus* células diferenciadas expuestas al

antirretroviral zalcitabina, y células diferenciadas frente a células diferenciadas expuestas a *sopa inflamatoria*), se realizó un análisis discriminante de componentes principales usando el paquete adgenet de R (Jombart y cols., 2010). Los recuentos de genes en cada grupo se normalizaron previamente y se transformaron logarítmicamente empleando el comando rlog de la librería DESeq2 (Love y cols., 2014). El análisis se realizó sobre el total de genes previamente filtrados y, posteriormente, se identificó el grupo de genes con mayor contribución a las funciones discriminantes.

4.8.3 PCR inversa a tiempo real

Para la realización de la RT-qPCR empleamos la tecnología TaqMan[®]. El fundamento de esta técnica se basa en la transcripción inversa de una secuencia de ARN_m de la muestra a ADN_c; a continuación, el ADN_c generado se replica por medio de una ADN polimerasa; el empleo de una sonda específica para esa secuencia de ADN acoplada a un fluoróforo y a un desactivador fluorescente o *quencher* permite conocer cuántas copias de la secuencia de ARN_m hay en la muestra: a medida que el ADN se replica, la ADN polimerasa libera el fluoróforo acoplado a la sonda y se emite una señal fluorescente al cesar la acción inhibitoria del *quencher* sobre la molécula (**figura 12**) (Nolan y cols., 2006). El tiempo transcurrido hasta que esta señal fluorescente supera un valor umbral es

inversamente proporcional a la cantidad de copias del ARN_m a estudiar.

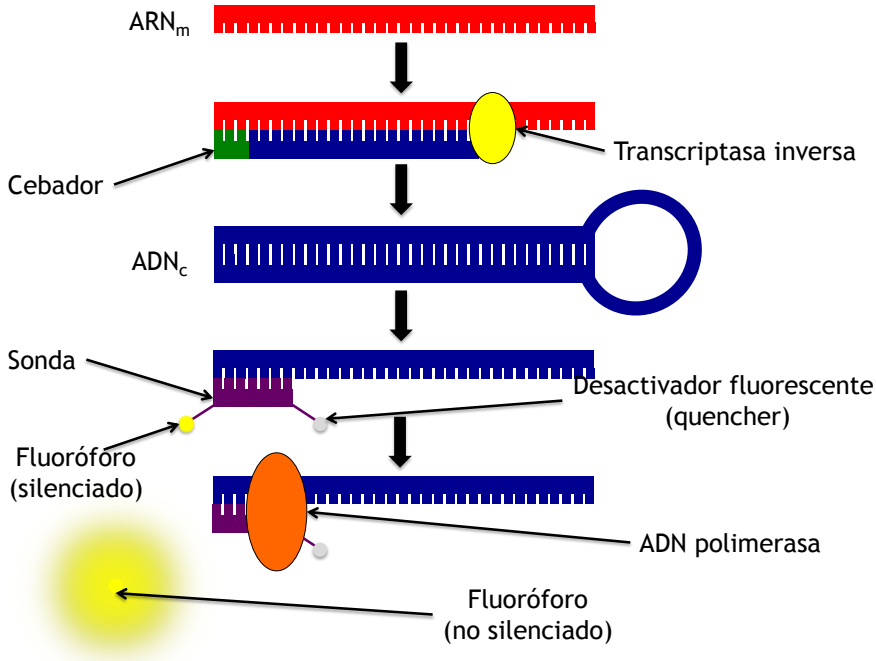


Figura 12. Fundamento de la técnica de RT-qPCR para cuantificar el ARN_m presente en una muestra.

La RT-qPCR proporciona un valor relativo, puesto que únicamente permitió conocer si hay más o menos copias del gen a estudio que de un gen de referencia cuya expresión permanece invariable independientemente de las circunstancias. En el presente trabajo, el control empleado fue el gen que codifica la proteína RPLP10 o 36B4, constitutiva del ribosoma (Zhang y cols., 2014). Los reactivos empleados permitieron la realización del ensayo en un solo

paso (teniendo lugar la transcripción inversa del ARN_m y la amplificación del ADN en el mismo pocillo), y que la reacción tuviese lugar de modo rápido, durando la lectura alrededor de 50 minutos.

Para la realización del ensayo se empleó el kit EXPRESS One-Step Superscript[®] qRT-PCR (*Invitrogen*), constituido por tres viales. El primero de ellos, EXPRESS SuperScript[®] Mix para qPCR en un paso, contiene una solución de ADN polimerasa para la amplificación del ADN, MgCl₂ como cofactor del enzima, desoxinucleótidos (con desoxiuridil trifosfato en vez de deoxitimidina trifosfato), uracil ADN glicosilasa (UDG) y agentes estabilizantes. El empleo de UDG se justifica en que este enzima degrada posibles cadenas de ADN con uracilo en vez de timina que pudieran aparecer en el pocillo como remanente de PCR llevadas a cabo anteriormente (Pang y cols., 1992). El segundo vial, EXPRESS qPCR SuperMix[®] Universal, consiste en una solución con una transcriptasa inversa e inhibidores de ribonucleasas. Además, el kit contiene un tercer vial con rodamina X (ROX), colorante empleado para normalizar la señal fluorescente.

Por otra parte, para realizar la RT-qPCR también se emplearon dos cebadores para el gen murino que codifica a la proteína 36B4 como control (*Integrated DNA Technologies*); así como una sonda para ese gen marcada con VIC[®] (*Life Technologies*). Los cebadores se reconstituyeron utilizando una solución comercial tamponada de Tris-

AEDT libre de ribonucleasas (*Macherey-Nagel*) para lograr una concentración 10 μM ; la sonda se diluyó en agua ultrapurificada esterilizada hasta una concentración 100 μM . Asimismo, se utilizaron sondas específicas de los genes murinos a determinar marcadas con amidita de fluoresceína (FAM) (*Thermo-Fisher*). El ARN de las células F11 se diluyó hasta lograr una concentración 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua ultrapurificada esterilizada.

El ensayo se llevó a cabo en placas Fast Thermal Cycling[®] (*Perkin-Elmer*), añadiendo en cada pocillo los siguientes volúmenes de cada componente, logrando un volumen final de 10 μL :

- 0,2 μL de cada cebador de 36B4
- 0,02 μL de la sonda específica para 36B4
- 5 μL de EXPRESS SuperScript[®] Mix
- 1 μL de EXPRESS qPCR SuperMix Universal
- 0,04 μL del colorante ROX
- 0,5 μL de la sonda para el gen a estudio
- 1 μL de la solución de ARN 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 2,04 μL de agua ultrapurificada esterilizada

La RT-qPCR se llevó a cabo en un lector QuantStudio[®] 12K Flex (*Perkin-Elmer*). El sistema se programó para que calentase la placa a 50 °C durante 15 minutos, tiempo durante el que se produjo la transcripción inversa del ARN. A continuación, la temperatura se

elevó hasta los 95 °C, permaneciendo a esa temperatura durante 20 segundos para inducir la desnaturalización del ADN_c. Seguidamente, se realizaron cuarenta ciclos de amplificación del ADN: cada uno de estos ciclos constó de una primera fase de 3 segundos a 95 °C para inducir la desnaturalización del ADN y una segunda fase de 30 segundos a 60 °C a fin de llevar a cabo la replicación del ADN. El sistema se programó para que los cambios de temperatura de la placa tuviesen lugar de manera paulatina, no superando la variación los 2,63 °C por segundo.

Mediante el programa informático QuantStudio[®] 12K Flex Real-Time PCR (*Perkin-Elmer*) se calculó el parámetro ΔC_t , es decir, la diferencia en número de ciclos entre que la señal fluorescente de FAM (que marcaba la sonda para el gen a estudio) se detectó por el aparato y el momento de la detección de la señal fluorescente de VIC (que marcaba la sonda correspondiente al gen control). Utilizando el programa informático Microsoft Excel[®] para Mac (*Microsoft Corporation*), se calculó la diferencia entre los ΔC_t de dos condiciones para calcular el parámetro $\Delta\Delta C_t$.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm desviación estándar. Para la realización del análisis estadístico se utilizó el

programa informático GraphPad Prism® versión 6.00 para Mac® (*GraphPad software*).

Para los análisis comparativos de datos expresados como media \pm desviación estándar se empleó la prueba t de Student fijando la significación estadística en $\alpha > 0,05$. Los resultados de viabilidad celular (véase Resultados, pág. 232) se compararon mediante la prueba ANOVA de un factor para analizar las diferencias entre los tratamientos y el control; el nivel de significación también se fijó en $\alpha > 0,05$.

Para el ajuste de los datos a curvas de correlación entre dosis y respuesta se utilizó una aproximación de regresión no lineal a una curva sigmoidea usando un ajuste de mínimos cuadrados empleando la siguiente ecuación:

$$Y = E_{\min} + \frac{E_{\max} - E_{\min}}{1 + 10^{x - \log IC_{50}}}$$

Donde E_{\min} es la respuesta mínima; E_{\max} , la respuesta máxima, e IC_{50} es la concentración de fármaco necesaria para reducir la respuesta al 50 % de la respuesta máxima. En curvas de agonismo se consideró la EC_{50} , que se define como la concentración de sustancia requerida para que la respuesta sea el 50 % de la respuesta máxima. La comparación estadística entre dos curvas se realizó mediante la prueba

F de suma extra de cuadrados, fijando el nivel de significación estadística en $\alpha > 0,05$.

Para calcular la idoneidad de la ventana del ensayo de medida de la excitabilidad a través de la concentración intracelular de calcio se empleó el factor Z' . El cálculo de este factor se realizó mediante la siguiente ecuación (Iversen y cols., 2004):

$$Z' = \frac{(\bar{x}_{control} - 3 \cdot DS_{control}) - (\bar{x}_{blanco} + 3 \cdot DS_{blanco})}{\bar{x}_{control} - \bar{x}_{blanco}}$$

4.10 REACTIVOS UTILIZADOS

Además de los reactivos citados anteriormente, a continuación se detallan las casas comerciales que suministraron los reactivos empleados para la preparación de los distintos tampones de ensayo, así como los reactivos farmacológicos utilizados a lo largo del presente trabajo.

4.10.1 Reactivos empleados para la preparación de tampones

Para la preparación de los tampones se utilizaron las sales CaCl_2 , MgSO_4 , KH_2PO_4 y KCl ; además de ácido acético, NaOH , HCl y glucosa, todos ellos adquiridos a *Panreac*. Las sales MgCl_2 , NaCl , y NaH_2PO_4 fueron suministradas por *Sigma-Aldrich*, al igual que la ASB, el DMSO y el FBS dializado. Asimismo, el metanol y el etanol se obtuvieron a través de *VWR*.

4.10.2 Reactivos farmacológicos

Los reactivos farmacológicos ATP, serotonina, histamina, ácido α -lipoico, 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX), capsaicina, amitriptilina, dexametasona, clomipramina y [D-Ala², D-Leu⁵]-encefalina (DADLE) se adquirieron a través de *Sigma-Aldrich*. La pregabalina, la tetrodotoxina (TTX), la vincristina y la morfina fueron suministradas por *Tocris*. Los compuestos rilpivirina, zalcitabina, bradicinina, duloxetina, fluoxetina y paclitaxel se obtuvieron a través de *Chemexpress*. *Santa Cruz Biotechnologies* suministró la difenhidramina, el N⁶,2'-O-dibutiril 3',5'- monofosfato de adenosina cíclico (dibutiril-AMP_c) y la forskolina. El factor de crecimiento nervioso (NGF) se adquirió a través de *Millipore*.

Todos los reactivos se alicuotaron en HBSS suplementado con HEPES 20 mM para su conservación a -20 °C; excepto ATP, serotonina, histamina, IBMX y dibutiril-AMP_c, que se pesaron inmediatamente antes de su empleo. Asimismo, la morfina, rilpivirina, zalcitabina, duloxetina, dexametasona, vincristina y paclitaxel se alicuotaron en DMSO para su conservación a -20 °C; el ácido α -lipoico se disolvió en etanol y se conservó a -20 °C; la bradicinina se conservó a -20 °C en ácido acético al 5 % en agua ultrapurificada, y el NGF se disolvió en una solución de ASB 500 μ M en PBS para su conservación a -80 °C.



Resultados



5. Resultados

5.1 LA DIFERENCIACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES F11 Y ND7/23

LAS DOTÓ DE CARACTERÍSTICAS DE NEURONAS SENSORIALES

Se desarrollaron tres métodos de diferenciación en las líneas celulares F11 y ND7/23 a fin de verificar la adquisición de caracteres fenotípicos de neuronas de DRG.

5.1.1 Análisis cualitativo de la adquisición de características fenotípicas de neuronas de DRG

Se comparó mediante microscopía la adquisición de características fenotípicas de neurona de DRG en las células F11 y ND7/23 empleando tres métodos de diferenciación para cada línea celular.

Para la línea celular F11 se evaluaron tres procedimientos para obtener células diferenciadas usando como base un medio DMEM sin piruvato con estreptomomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y penicilina 100 UI/mL, y glutamina 2 mM: i) medio base suplementado con forskolina 30 μM , dibutiril-AMP_c 1 mM y FBS dializado (FBS_d) en proporción 0,5 % (v/v); ii) medio base suplementado con dibutiril-AMP_c 0,5 mM, NGF

a una concentración de 2 ng/mL y FBS_d en proporción 0,5 % (v/v), y iii) medio base suplementado con ácido retinoico a una concentración de 10 μ M y FBS_d 2 % (v/v) (**figura 13**). En los tres casos se verificó la adquisición de características neuronales en comparación con las células F11 no diferenciadas (**figura 13D**). El empleo de un medio de diferenciación con forskolina y dibutilil-AMP_c dio lugar a una mayor proporción de células con neuritas largas (**figura 13A**). Por otra parte, el empleo de dibutilil-AMP_c sin forskolina como factor de diferenciación generó un menor número de células con neuritas (**figura 13B**). La utilización de ácido retinoico como factor de diferenciación indujo la proyección de neuritas en algunas células sin ser capaz de detener la proliferación celular (**figura 13C**).



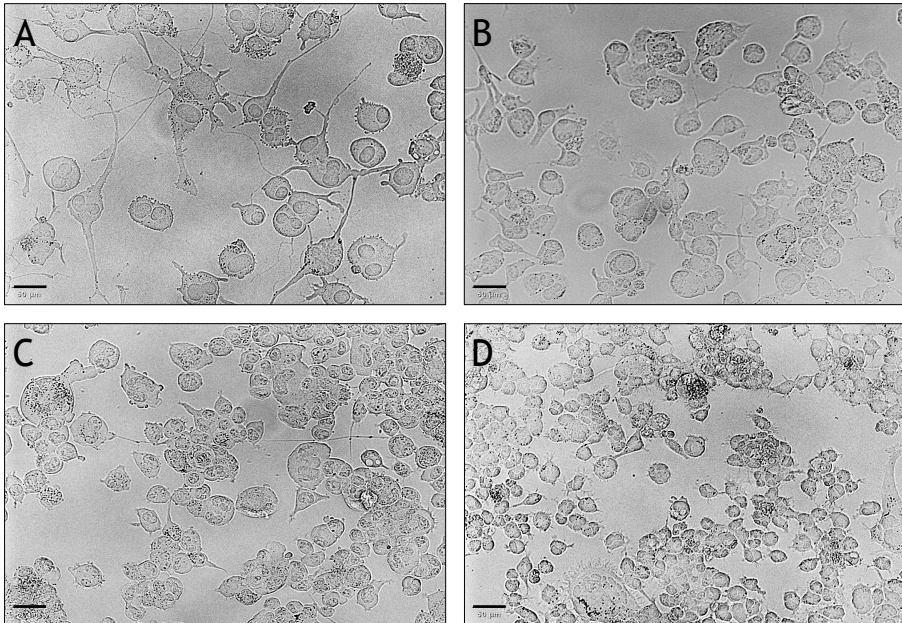


Figura 13. Morfología de las células F11 diferenciadas empleando, como factores de diferenciación: (A) forskolina 30 μM , dibutiril-AMP_c 1 mM y FBS_d 0,5 % (v/v); (B) dibutiril-AMP_c 0,5 mM, NGF 2 ng/mL y FBS_d 0,5 % (v/v); (C) ácido retinoico 10 μM y FBS_d 2 % (v/v), y (D) células F11 sin diferenciar. Fotografías representativas de tres ensayos con 24 replicados (barra de escala 50 μm).

Asimismo, para la línea celular ND7/23 se evaluaron tres procedimientos de diferenciación a partir de un medio base consistente en DMEM con estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ y penicilina 100 UI/mL, y glutamina 2 mM: i) medio base suplementado con forskolina 60 μM , dibutiril-AMP_c 1 mM, NGF 1,3 ng/mL y FBS_d 0,5 % (v/v); ii) medio base suplementado con dibutiril-AMP_c 1 mM, NGF 2 ng/mL y FBS_d 0,5 % (v/v), y iii) medio base suplementado con ácido retinoico 20 μM , IBMX 100 μM , NGF 2 ng/mL y FBS_d 2 %

(v/v). Se verificó que la adquisición de las características neuronales dependió del tratamiento empleado (**figura 14**). No obstante, la elevada variabilidad observada entre las células de la línea ND7/23 motivó el descarte de esta línea celular.

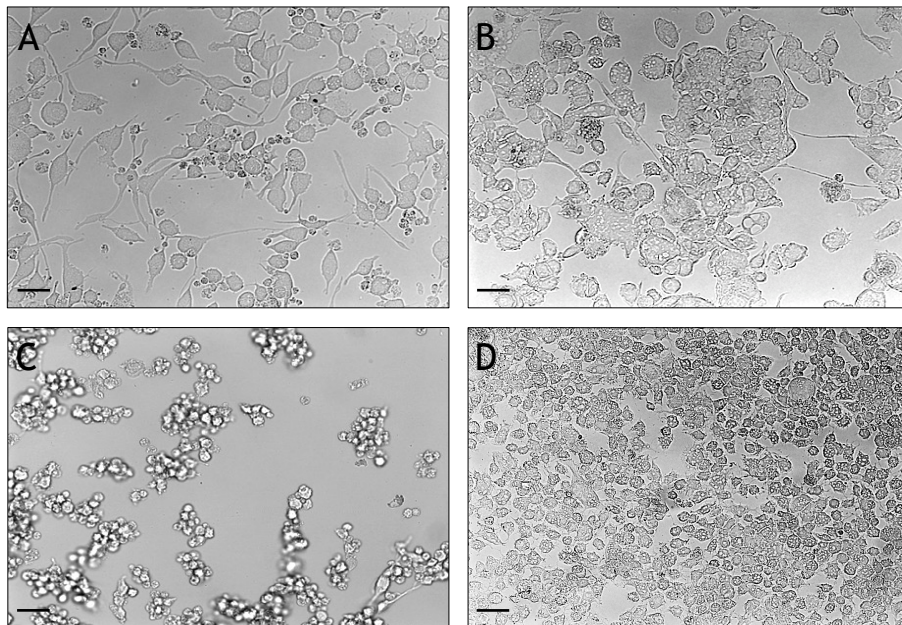


Figura 14. Morfología de las células ND7/23 diferenciadas empleando, como factores de diferenciación: (A) forskolina 60 μ M, dibutiril-AMP_c 1 mM, NGF 1,3 ng/mL y FBS_d 0,5 % (v/v); (B) dibutiril-AMP_c 1 mM, NGF 2 ng/mL y FBS_d 0,5 % (v/v); (C) ácido retinoico 20 μ M, IBMX 100 μ M, NGF 2 ng/mL y FBS_d 2 % (v/v), y (D) células ND7/23 sin diferenciar. Fotografías representativas de tres ensayos con 24 replicados (barra de escala 50 μ m).

5.1.2 Estudio de la expresión del receptor TrkA

Para confirmar la adquisición de características fenotípicas neuronales se estudió la expresión del receptor TrkA en las células F11 diferenciadas empleando los tres métodos (**figura 15**). El receptor TrkA es un marcador de neuronas de DRG y receptor de NGF, la interacción de este péptido con el receptor incrementa la transmisión de la señal dolorosa en la neurona sensorial (Lei y cols., 2005; Boisvert y cols., 2015; Norman y McDermott, 2016).

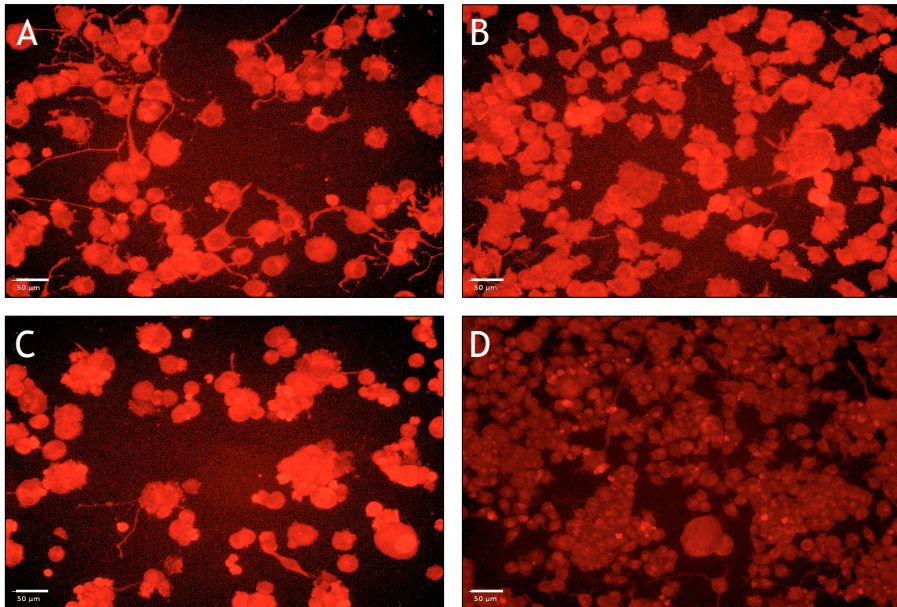


Figura 15. Tinción del receptor TrkA con un anticuerpo marcado con CFL647[®] en (A) las células F11 diferenciadas empleando forskolina 30 µM con dibutilil-AMP_c 1 mM y FBS_d 0,5 %; (B) dibutilil-AMP_c 0,5 mM, NGF 2 ng/mL y FBS_d 0,5 %; (C) ácido retinoico 10 µM con FBS_d 2 %, y (D) en las células F11 no diferenciadas. Fotografías representativas de tres ensayos con 12 replicados (barra de escala 50 µm).

Se verificó que la expresión de la proteína fue superior en las células F11 empleando cualquiera de los tres métodos de diferenciación en comparación con las células no diferenciadas ($p < 0,01$) (**figura 16**).

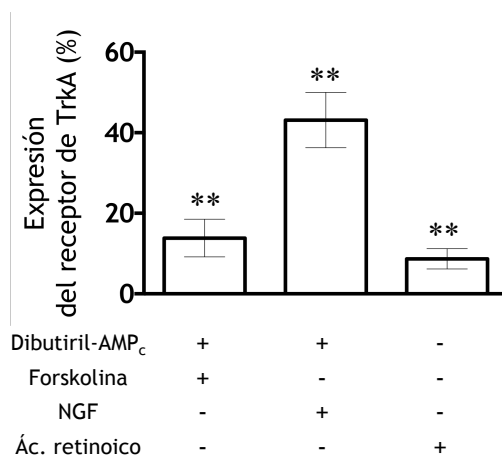


Figura 16. Incremento de la intensidad de fluorescencia de CFL647[®] (correspondiente a la expresión del receptor TrkA) empleando los tres protocolos de diferenciación en comparación con la intensidad de fluorescencia en las células F11 no diferenciadas. En el gráfico se muestra la media \pm desviación estándar de un experimento representativo de un total de dos ($n = 2$) experimentos independientes realizados con veinticuatro replicados por punto. ****** $p < 0,01$ (test t de Student).

5.1.3 Estudio del crecimiento de neuritas

A fin de validar la adquisición de un fenotipo neuronal, se evaluó el crecimiento de las neuritas en las células diferenciadas. Se comprobó que el empleo de forskolina y dibutiril-AMP_c como factores de diferenciación dio lugar a células con mayor longitud media de neuritas y un mayor porcentaje de células con neuritas de más de 30 μm entre el total de células del pocillo ($p < 0,001$)

(figura 17). Por ello, se seleccionó este método como el método de diferenciación más adecuado para obtener células con fenotipo neuronal.

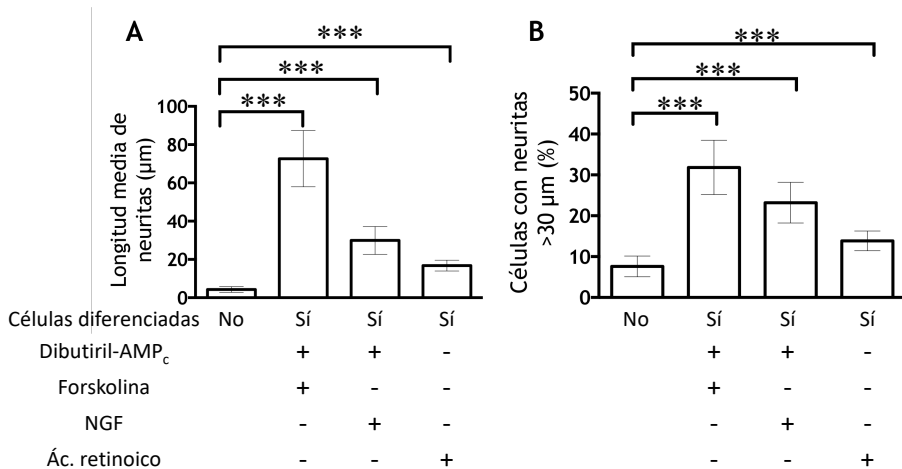


Figura 17. (A) Longitud media de las neuritas y (B) porcentaje de células con neuritas de más de 30 μm sobre el total de células en la línea F11 sin diferenciar y diferenciada empleando los tres métodos de diferenciación. En el gráfico se muestra la media \pm desviación estándar de un experimento representativo de un total de dos ($n = 2$) experimentos independientes realizados con veinticuatro replicados por punto. *** $p < 0,001$ (test t de Student).

A la vista de los resultados obtenidos en este apartado, se seleccionó el método de diferenciación empleando forskolina 30 μM , dibutiril-AMP_c 1 mM y FBS_d 0,5 % como el más adecuado para la obtención de células F11 diferenciadas con un fenotipo neuronal.

5.2 EL CLORURO POTÁSICO, PERO NO EL ATP NI LA CAPSAICINA, INDUJERON UNA RESPUESTA DOSIS-DEPENDIENTE EN LAS CÉLULAS DIFERENCIADAS

Mediante la exposición de las células F11 diferenciadas a KCl, ATP y capsaicina se evaluó: i) la excitabilidad de las líneas celulares generadas en el apartado anterior a estímulos algogénicos utilizando diferentes técnicas de medida; ii) el establecimiento de cuál de estas técnicas sería la más adecuada para llevar a cabo un ensayo de cribado de alto rendimiento. Para ello, se expusieron las células a concentraciones seriadas de ATP, KCl y capsaicina.

5.2.1 Respuesta a ATP

5.2.1.1 Medida de DMR

Se comprobó que el ATP indujo cambios en la DMR de las células F11, tanto antes como después de la diferenciación; sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre ambas respuestas (**figura 18**) (**tabla 11**).

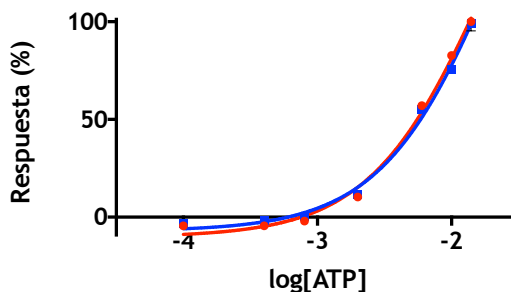


Figura 18. Registro de la DMR de las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP. Se representa la media \pm desviación estándar de dos ($n=2$) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas cuantificando la DMR.

Tabla 11. Potencia (pEC_{50}) y eficacia ($E_{m\acute{a}x}$) del ATP en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la DMR.

	pEC_{50} (media \pm DS)	$E_{m\acute{a}x}$ (media \pm DS) (%)
Células F11 no diferenciadas	$\approx 1,7 \pm 0,17$	$\approx 247 \pm 59$
Células F11 diferenciadas	$\approx 1,6 \pm 0,17$	$\approx 270 \pm 70$

5.2.1.2 Medida de la concentración de calcio intracelular

Se verificó que la entrada de calcio en las células inducida por concentraciones seriadas de ATP fue muy similar en las células F11 antes y después de la diferenciación, ajustándose en ambos casos a un modelo sigmoideo de correlación entre concentración y respuesta (figura 19) (tabla 12).

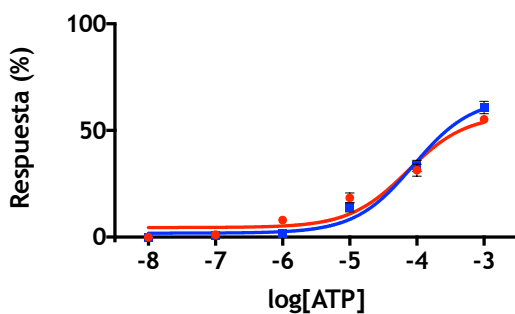


Figura 19. Registro de la concentración de calcio intracelular en las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutiril-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP. Se representa la media ± desviación estándar de cuatro (n = 4) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas empleando el kit Calcium 6[®] para medir la concentración de calcio intracelular.

Tabla 12. Potencia (pEC₅₀) y eficacia (E_{máx}) del ATP en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la concentración de calcio intracelular.

	pEC ₅₀ (media ± DS)	E _{máx} (media ± DS) (%)
Células F11 no diferenciadas	4,1 ± 0,28	57 ± 7,9
Células F11 diferenciadas	4,1 ± 0,14	65 ± 5,1

5.2.1.3 Medida del potencial de membrana

5.2.1.3.1 Empleo del kit FluoVolt®

Al utilizar el kit FluoVolt®, se observó que las respuestas obtenidas no se pudieron ajustar a una curva sigmoidea de correlación entre la concentración de ATP y la respuesta ni antes ni después de la diferenciación (**figura 20**).

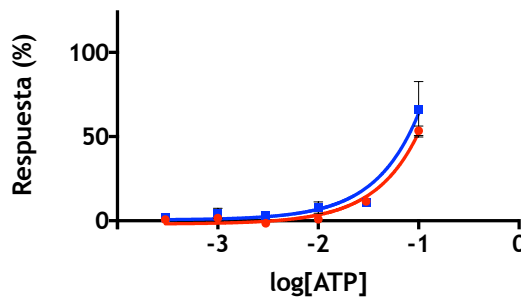


Figura 20. Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 medido con FluoVolt® antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutiril-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP. Se representa la media \pm desviación estándar de un experimento representativo de tres ($n = 3$) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas obtenida empleando el kit FluoVolt® para medir el potencial de membrana.

5.2.1.3.2 Empleo de DiBAC₄(3)

Se observó que, al igual que al emplear el kit FluoVolt®, las variaciones en el potencial de membrana medidas mediante DiBAC₄(3) inducidas por concentraciones seriadas de ATP no se pudieron ajustar a un modelo sigmoideo de correlación entre

concentración y respuesta ni antes ni después de la diferenciación (figura 21).

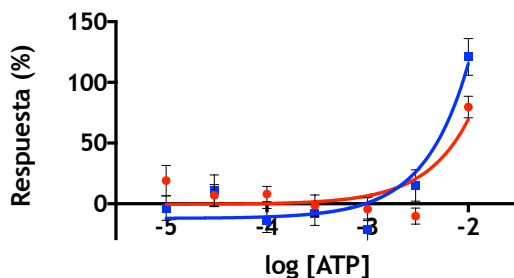


Figura 21. Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 medida con DiBAC₄(3) antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de ATP. Se representa la media ± desviación estándar de cinco (n = 5) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas empleando DiBAC₄(3) para cuantificar el potencial de membrana.

5.2.2 Respuesta a KCl

5.2.2.1 Medida de DMR

Se verificó que las concentraciones seriadas de KCl en células F11, antes y después de la diferenciación, indujeron variaciones en la DMR que no se pudieron ajustar a una curva sigmoidea, puesto que solamente a altas concentraciones de la sal se observa una respuesta (figura 22).

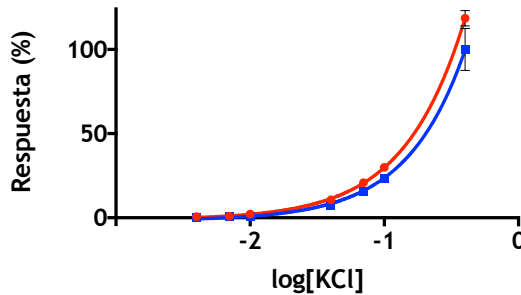


Figura 22. Registro de la DMR de las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl. Se representa la media \pm desviación estándar de dos ($n=2$) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas.

5.2.2.2 Medida de la concentración de calcio intracelular

Se observó que la exposición de las células F11 a KCl indujo una respuesta que se ajustó a una curva sigmoidea al confrontar concentración y respuesta cuando se midió la concentración intracelular de calcio tanto antes como después de diferenciar las células; sin embargo, entre ambas respuestas se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), siendo la respuesta antes de la diferenciación inferior en magnitud (**figura 23**) (**tabla 13**).

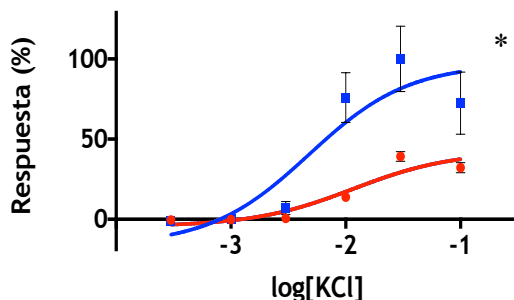


Figura 23. Registro de la concentración de calcio intracelular en las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl. Se representa la media ± desviación estándar de cuatro (n = 4) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. *p < 0,05 (prueba F de suma extra de cuadrados). La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas.

Tabla 13. Potencia (pEC₅₀) y eficacia (E_{máx}) del KCl en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la concentración de calcio intracelular.

	pEC ₅₀ (media ± DS)	E _{máx} (media ± DS) (%)
Células F11 no diferenciadas	1,9 ± 0,40	44 ± 11
Células F11 diferenciadas	2,3 ± 0,47	100 ± 23

5.2.2.3 Medida del potencial de membrana

5.2.2.3.1 Empleo del kit FluoVolt®

Al igual que al medir la concentración de calcio intracelular, atendiendo a la variación en el potencial de membrana se observaron diferencias significativas al comparar la respuesta antes y después de la diferenciación (p < 0,01), aunque en ambos casos la correlación

entre concentración y respuesta se pudo ajustar a una curva sigmoidea (**figura 24**) (**tabla 14**).

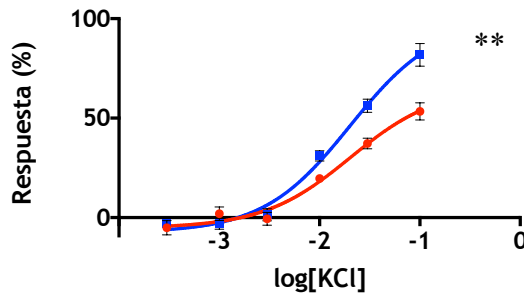


Figura 24. Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 medida con FluoVolt® antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl. Se representa la media \pm desviación estándar de un experimento representativo de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. $**p < 0,01$ (prueba F de suma extra de cuadrados). La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas.

Tabla 14. Potencia (pEC_{50}) y eficacia ($E_{m\acute{a}x}$) del KCl en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo la variación en el potencial de membrana mediante el kit FluoVolt®.

	pEC_{50} (media \pm DS)	$E_{m\acute{a}x}$ (media \pm DS) (%)
Células F11 no diferenciadas	$1,7 \pm 0,14$	$66 \pm 6,9$
Células F11 diferenciadas	$1,7 \pm 0,099$	$100 \pm 7,3$

5.2.2.3.2 Empleo de DiBAC₄(3)

En las células F11 no diferenciadas no se observó respuesta a concentraciones seriadas de KCl empleando DiBAC₄(3) para cuantificar el potencial de membrana. Por el contrario, una vez diferenciadas las células sí respondieron a concentraciones seriadas de KCl y esta respuesta se ajustó a una curva sigmoidea (**figura 25**) (**tabla 15**).

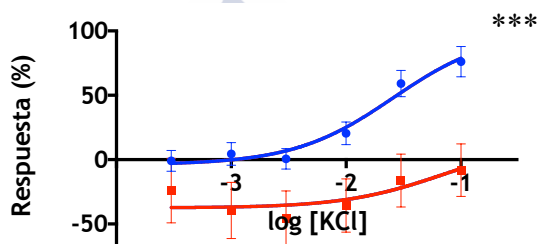


Figura 25. Registro de la variación en el potencial de membrana en las células F11 medida con DiBAC₄(3) antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutiril-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de KCl. Se representa la media ± desviación estándar de cinco (n = 5) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. ***p < 0,001 (prueba F de suma extra de cuadrados). La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas.

Tabla 15. Potencia (pEC₅₀) y eficacia (E_{máx}) del KCl en las células F11 antes y después de diferenciar midiendo el potencial de membrana mediante DiBAC₄(3).

	pEC ₅₀ (media ± DS)	E _{máx} (media ± DS) (%)
Células F11 no diferenciadas	-	-
Células F11 diferenciadas	1,6 ± 0,20	100 ± 16

5.2.3 Respuesta a capsaicina

5.2.3.1 Medida de DMR

Se observó que la capsaicina no produjo cambios en la DMR de las células F11 ni antes ni después de la diferenciación (**figura 26**).

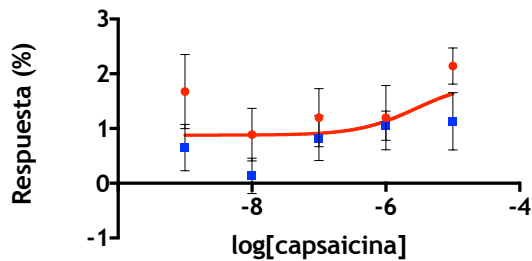


Figura 26. Registro de la DMR de las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina. Se representa la media \pm desviación estándar de un experimento con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas cuantificando la DMR.

5.2.3.2 Medida de la concentración de calcio intracelular

Se comprobó que la capsaicina no indujo la entrada de calcio en las células F11 ni antes ni después de la diferenciación (**figura 27**).

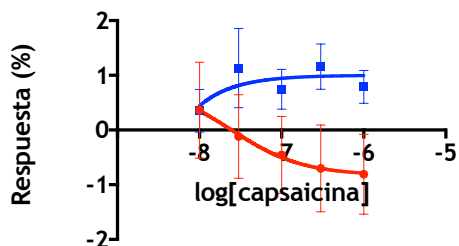


Figura 27. Registro de la concentración de calcio intracelular en las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina. Se representa la media \pm desviación estándar de dos ($n = 2$) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas empleando el kit Calcium 6[®] para medir la concentración de calcio intracelular.

5.2.3.3 Medida del potencial de membrana

5.2.3.3.1 Empleo del kit FluoVolt[®]

Se verificó que la capsaicina no produjo en las células F11 ni antes ni después de la diferenciación modificaciones en el potencial de membrana que pudiesen ser medidas utilizando el kit FluoVolt[®] (**figura 28**).

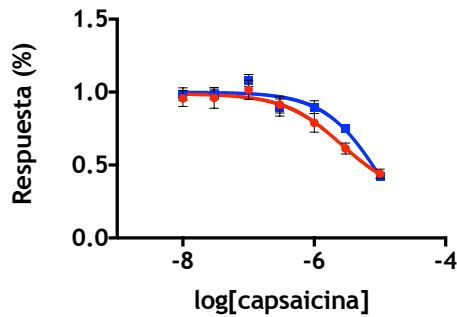


Figura 28. Registro del potencial de membrana medido con el kit FluoVolt® en las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina. Se representa la media \pm desviación estándar de un experimento representativo de cuatro ($n=4$) experimentos independientes realizados con puntos por cuadruplicado. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas obtenida empleando el kit FluoVolt® para medir el potencial de membrana.

5.2.3.3.2 Empleo de DiBAC₄(3)

Se constató que la medida del potencial de membrana mediante DiBAC₄(3) tampoco permitió apreciar respuestas a concentraciones seriadas de capsaicina ni antes ni después de la diferenciación de las células F11 (**figura 29**).

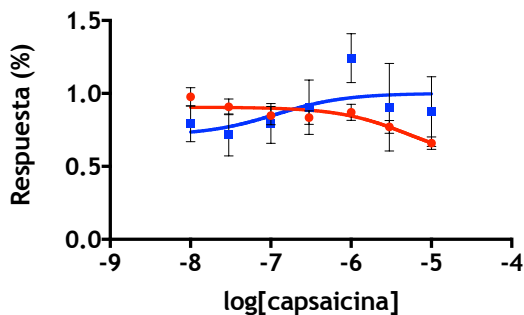


Figura 29. Registro del potencial de membrana medido con DiBAC₄(3) en las células F11 antes (●) y después (■) de la diferenciación con dibutilil-AMP_c y forskolina al ser expuestas a concentraciones seriadas de capsaicina. Se representa la media \pm desviación estándar de un experimento realizado con seis replicados por cada punto. La respuesta se estandarizó con respecto a la respuesta máxima a KCl de las células diferenciadas empleando DiBAC₄(3) para cuantificar el potencial de membrana.

5.2.3.4 Comprobación de la expresión del receptor TrpV1 mediante *Western blot*

Al observar que la capsaicina no indujo una respuesta en las células F11 con ninguno de los cuatro métodos ensayados, se llevaron a cabo ensayos para evaluar la expresión del receptor TrpV1, receptor sobre el que actúa este compuesto como agonista (Doran y cols., 2015; Frias y Merighi, 2015), sin que se verificase la expresión de este receptor mediante *Western blot*. Se constató que ni mediante la exposición a interleucina 6 (Il-6) y al receptor soluble de interleucina 6 (Il-6R), ambos a una concentración de 50 ng/mL, ni mediante la exposición a NGF 200 ng/mL durante la diferenciación, se indujo la

expresión del receptor (Amaya y cols., 2004; Fang y cols., 2015) (**figura 30**).

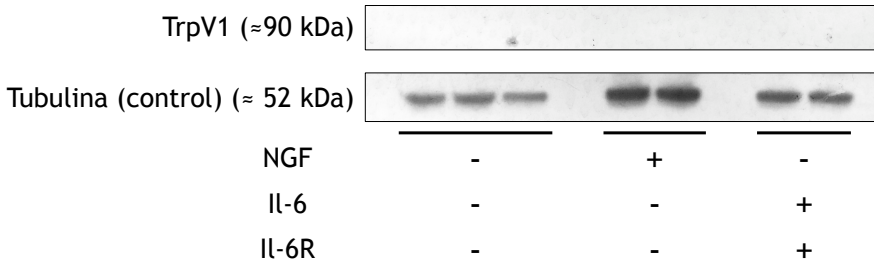


Figura 30. Análisis de la expresión del receptor TrpV1 mediante Western *blot* en las células F11 diferenciadas en ausencia y en presencia de NGF y de Il-6 e Il-6R. Resultados representativos de un experimento de una serie de tres (n=3) experimentos independientes.

A la vista de los resultados obtenidos en este apartado, se seleccionó la medida de la concentración de calcio intracelular como la mejor técnica a la hora de valorar la excitabilidad de las células F11 diferenciadas. Este método presenta varias ventajas, como una amplia ventana, una adecuada reproducibilidad, y que se puede emplear para el cribado de alto rendimiento (Yu y cols., 2016). Además, el catión calcio participa en la despolarización de la membrana plasmática de las neuronas y en la transmisión del estímulo doloroso a lo largo de la neurona de DRG hasta las astas dorsales (Ambrosino y cols., 2014). Asimismo, se verificó que el KCl a una concentración de alrededor de 30 mM indujo la máxima respuesta en las células F11 diferenciadas (**figura 23**).

5.3 LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL ACTIVA MECANISMOS DE TRANSCRIPCIÓN QUE REGULAN LA EXCITABILIDAD NEURONAL

Los propósitos de esta parte del trabajo fueron: i) la identificación de marcadores de diferenciación neuronal en la línea celular diferenciada, ii) la caracterización de posibles dianas en las células diferenciadas que pudiesen resultar de interés para desarrollar fármacos analgésicos.

5.3.1 Comparativa de la expresión génica entre las células F11 sin diferenciar y las células F11 diferenciadas

5.3.1.1 Comparativa de los genes más inducidos y más reprimidos al diferenciar las células F11

Se elaboró un listado de los genes cuya expresión se incrementó más (**tabla 16**) y los genes cuya expresión se redujo más (**tabla 17**) tras la diferenciación de la línea celular híbrida F11, tanto murinos como de rata.

Tabla 16. Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se incrementa más al inducir la diferenciación de las células F11 (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos).

Genes de ratón		Genes de rata	
Símbolo	log (tasa de expresión)	Símbolo	log (tasa de expresión)
<i>Adipoq</i>	8,2	<i>Adipoq</i>	9,0
<i>Sipi</i>	6,6	<i>Scn10a</i>	7,9
<i>Arid3c</i>	6,4	<i>Zmat4</i>	6,8
<i>Gm20594</i>	6,0	<i>Ackr3</i>	6,2
<i>Zmat4</i>	5,9	<i>Epha3</i>	5,5
<i>Ackr3</i>	5,7	<i>Igf2</i>	5,3
<i>Igf2</i>	5,5	<i>Scn5a</i>	5,3
<i>Scn5a</i>	5,2	<i>Nppc</i>	5,1
<i>Shc2</i>	5,2	<i>Otof</i>	5,1
<i>Neurog2</i>	5,1	<i>Shc2</i>	5,0
<i>Otof</i>	5,0	<i>Vip</i>	4,6
<i>Snora81</i>	4,9	<i>H19</i>	4,5
<i>Loxl1</i>	4,8	<i>Aass</i>	4,5
<i>Nppc</i>	4,8	<i>Mgst3</i>	4,5
<i>Snora23</i>	4,8	<i>Vdr</i>	4,5
<i>Scn10a</i>	4,7	<i>Fst</i>	4,4
<i>Tspoap1</i>	4,6	<i>Tmem184a</i>	4,3
<i>H19</i>	4,4	<i>Rspo1</i>	4,3
<i>Adgrg1</i>	4,4	<i>Padi3</i>	4,1
<i>Rspo1</i>	4,4	<i>Slc4a1</i>	4,1

Tabla 17. Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se reprime más al inducir la diferenciación de las células F11 (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos).

Genes de ratón		Genes de rata	
Símbolo	log (tasa de expresión)	Símbolo	log (tasa de expresión)
<i>Hist1h2ba</i>	-4,3	<i>Hsd11b2</i>	-4,1
<i>Hist1h2bb</i>	-4,2	<i>Hist1h2ba</i>	-4,0
<i>Taf7l</i>	-3,9	<i>Myl7</i>	-4,0
<i>Hist1h1b</i>	-3,9	<i>Hist1h2bk</i>	-3,7
<i>Rrm2</i>	-3,5	<i>Hist1h1b</i>	-3,4
<i>Hist1h2aj</i>	-3,5	<i>Rrm2</i>	-3,4
<i>Hist1h2ab</i>	-3,4	<i>Pimreg</i>	-3,4
<i>Mcm5</i>	-3,4	<i>Pclaf</i>	-3,3
<i>Pclaf</i>	-3,4	<i>Trip13</i>	-3,2
<i>Hist1h2al</i>	-3,4	<i>Hist1h2bo</i>	-3,2
<i>Pimreg</i>	-3,4	<i>Mcm5</i>	-3,1
<i>Myb</i>	-3,4	<i>Cdc20</i>	-3,1
<i>Hist1h2bn</i>	-3,3	<i>Hist1h2ak</i>	-3,1
<i>Hist1h2ah</i>	-3,2	<i>Angpt2</i>	-3,0
<i>Trip13</i>	-3,2	<i>Tk1</i>	-2,9
<i>Ndp</i>	-3,2	<i>Mybl2</i>	-2,9
<i>Hist1h3h</i>	-3,1	<i>Dsc1</i>	-2,9
<i>Hist1h2ac</i>	-3,1	<i>Mcm3</i>	-2,9
<i>Tk1</i>	-3,1	<i>Hist1h2bl</i>	-2,8
<i>Cdc20</i>	-3,0	<i>Hist1h2bn</i>	-2,8

5.3.1.2 Comparativa de la regulación de las vías de señalización celular

Mediante el programa informático IPA[®], se obtuvo información acerca de la repercusión de la diferenciación en la expresión de los genes que codifican las proteínas que participan en las diferentes vías de señalización celular en la línea F11 (**tabla 18**).

Tabla 18. Listado de las tres vías de señalización murinas y de rata en que, mediante IPA[®], se observó una mayor sobrerrepresentación de genes que codifican proteínas que participan en esas vías tras la diferenciación de la línea celular F11.

Vías de señalización de ratón			Vías de señalización de rata		
Vía	-log(p)	Genes que varían (sentido de la variación)	Vía	-log(p)	Genes que varían (sentido de la variación)
Control de la replicación del ADN cromosómico	22	75 % (↓)	Control de la replicación del ADN cromosómico	21	68 % (↓)
Entrada en la fase S mediada por estrógenos	8,5	58 % (↓)	Entrada en la fase S mediada por estrógenos	8,7	54 % (↓)
Reparación de errores durante la replicación	7,9	69 % (↓)	Reparación de errores durante la replicación	7,6	63 % (↓)

5.3.1.3 Análisis discriminante de componentes principales

Se llevó a cabo un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para comparar la línea celular no diferenciada con la línea celular diferenciada partiendo del número total de genes en rata y ratón (tras los filtros de calidad aplicados). Se observó una clara diferenciación entre ambos grupos (**figura 31**) (**tabla 19**).

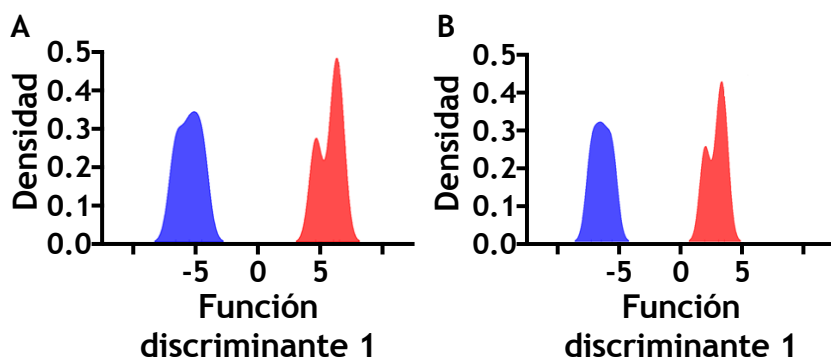


Figura 31. Análisis discriminante de componentes principales comparando la línea celular F11 no diferenciada (—) y la línea F11 diferenciada (—), tanto (A) con los genes murinos como (B) con los genes de rata.

Tabla 19. Listado de los genes que contribuyeron en mayor grado a la función discriminante (FD) del DAPC en la línea celular F11, tanto genes de ratón como de rata (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos). Se muestran además el logaritmo de la tasa de expresión y la probabilidad en el análisis de expresión diferencial.

Genes de ratón				Genes de rata			
Símbolo	Contribución a la FD1	log (exp)	-log P	Símbolo	Contribución a la FD1	log (exp)	-log P
<i>Igf2</i>	$5,0 \cdot 10^{-3}$	5,5	5,7	<i>Igf2</i>	$5,9 \cdot 10^{-3}$	5,3	5,1
<i>Snora23</i>	$4,1 \cdot 10^{-3}$	4,8	2,5	<i>Scn5a</i>	$4,4 \cdot 10^{-3}$	5,3	12
<i>Snora81</i>	$3,9 \cdot 10^{-3}$	4,9	2,9	<i>H19</i>	$4,1 \cdot 10^{-3}$	4,5	3,9
<i>Lars2</i>	$3,8 \cdot 10^{-3}$	2,2	0,62	<i>Hist1h2bk</i>	$3,4 \cdot 10^{-3}$	-3,7	9,6
<i>Hist1h2bb</i>	$3,6 \cdot 10^{-3}$	-4,2	9,6	<i>Hist1h1b</i>	$3,4 \cdot 10^{-3}$	-3,4	9,2
<i>Vaultrc5</i>	$3,3 \cdot 10^{-3}$	4,4	2,7	<i>Rrm2</i>	$3,1 \cdot 10^{-3}$	-3,4	9,3
<i>Hist1h1b</i>	$3,2 \cdot 10^{-3}$	-3,9	11	<i>Rn18s</i>	$3,1 \cdot 10^{-3}$	3,3	1,8
<i>Scn5a</i>	$3,2 \cdot 10^{-3}$	5,2	12	<i>Fst</i>	$3,1 \cdot 10^{-3}$	4,4	7,9
<i>H19</i>	$3,1 \cdot 10^{-3}$	4,4	4,5	<i>Hist1h2bo</i>	$3,0 \cdot 10^{-3}$	-3,2	11

5.3.1.4 Confirmación de los datos obtenidos mediante RNA-Seq utilizando la técnica de RT-qPCR

A fin de confirmar los datos obtenidos mediante la técnica de RNA-Seq en la comparativa entre células F11 diferenciadas y no diferenciadas, se realizó una PCR inversa a tiempo real. Esta técnica permitió cuantificar la expresión de cuatro genes en las células diferenciadas y no diferenciadas en comparación con un gen control. Se encontró que en los cuatro casos los datos coincidían con los obtenidos con anterioridad, puesto que tanto los marcadores neuronales murinos *Shc2* y *Otof* como el receptor de citocinas *Ackr3*

murino, o el canal de sodio *Scn5a* murino, incrementaron su expresión en las células F11 diferenciadas con respecto a las células F11 no diferenciadas (**figura 32**) (**tabla 20**).

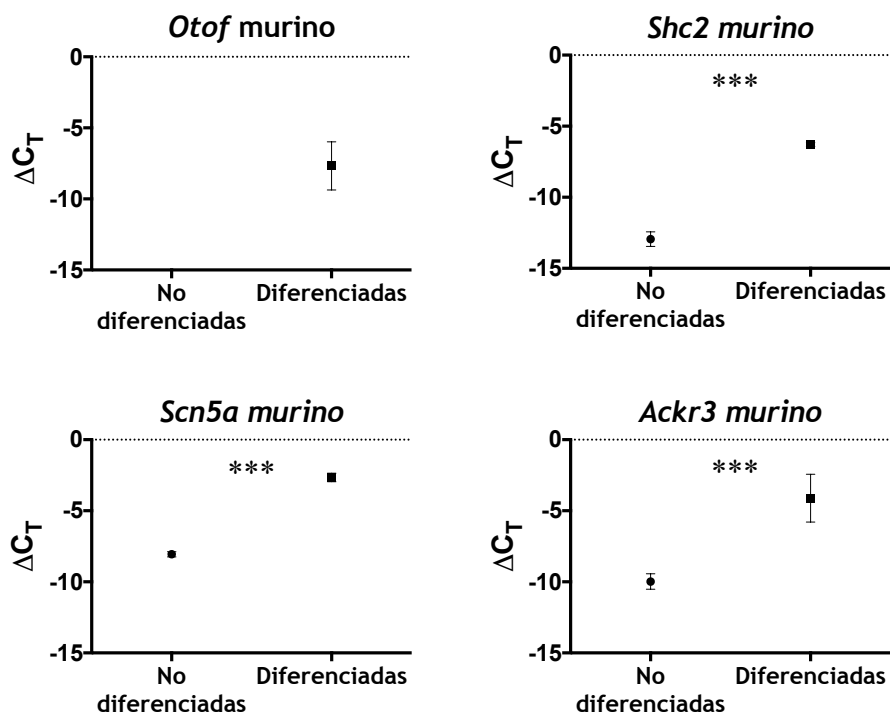


Figura 32. Comparativa de la expresión de cuatro genes en células F11 no diferenciadas y diferenciadas cuantificada mediante RT-qPCR (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos). Se representa la media \pm desviación estándar de un ensayo representativo de dos experimentos ($n = 2$) con tres replicados metodológicos por cada uno de los tres replicados biológicos. *** $p < 0,001$ (test t de Student).

Tabla 20. Cuantificación de la expresión de los genes confirmados mediante RT-qPCR en las células F11 antes y después de la diferenciación (ΔC_t) y comparación entre las células diferenciadas y sin diferenciar ($\Delta\Delta C_t$) (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos de los genes).

Gen	Células	ΔC_t (media \pm DS)	$\Delta\Delta C_t$ (media \pm DS)
<i>Otof</i>	F11 no diferenciadas	-	-
	F11 diferenciadas	-7,7 \pm 1,7	
<i>Ackr3</i>	F11 no diferenciadas	-10 \pm 0,55	5,9 \pm 1,6
	F11 diferenciadas	-4,1 \pm 1,7	
<i>Shc2</i>	F11 no diferenciadas	-13 \pm 0,51	6,7 \pm 0,50
	F11 diferenciadas	-6,3 \pm 0,12	
<i>Scn5</i>	F11 no diferenciadas	-8,1 \pm 0,18	5,4 \pm 0,24
	F11 diferenciadas	-2,7 \pm 0,30	

5.3.2 Incremento de la expresión de canales de calcio dependientes de voltaje tras la diferenciación

La comparativa entre el transcriptoma de las células diferenciadas frente al de las células no diferenciadas permitió constatar el incremento en la expresión de genes que codifican las proteínas integrantes de los canales de calcio dependientes de voltaje tras la diferenciación (**tabla 21**).

Tabla 21. Listado de los genes murinos y de rata que codifican las subunidades de los canales de calcio dependientes de voltaje y variación en la expresión tras la diferenciación de las células F11.

Genes de ratón			Genes de rata		
Símbolo	Subunidad	log (tasa de expresión)	Símbolo	Subunidad	log (tasa de expresión)
<i>Cacna1d</i>	Subunidad α_1D	1,5	<i>Cacna1g</i>	Subunidad α_1G	1,5
<i>Cacna1g</i>	Subunidad α_1G	1,4	<i>Cacna1d</i>	Subunidad α_1D	1,4
<i>Cacng5</i>	Subunidad auxiliar γ_5	1,2	<i>Cacng5</i>	Subunidad auxiliar γ_5	1,2
<i>Cacng3</i>	Subunidad auxiliar γ_3	1,0	<i>Cacng3</i>	Subunidad auxiliar γ_3	1,0
<i>Cacna1c</i>	Subunidad α_1C	0,92	<i>Cacna1c</i>	Subunidad α_1C	0,88
<i>Cacna2d3</i>	Subunidad auxiliar $\alpha_2\delta_3$	0,85	<i>Cacna2d3</i>	Subunidad auxiliar $\alpha_2\delta_3$	0,85
<i>Cacna2d2</i>	Subunidad auxiliar $\alpha_2\delta_2$	0,79	<i>Cacng4</i>	Subunidad auxiliar γ_4	0,82
<i>Cacng4</i>	Subunidad auxiliar γ_4	0,68	<i>Cacna2d2</i>	Subunidad auxiliar $\alpha_2\delta_2$	0,82
<i>Cacng2</i>	Subunidad auxiliar γ_2	0,50	<i>Cacnb1</i>	Subunidad auxiliar β_1	0,59
<i>Cacnb1</i>	Subunidad auxiliar β_1	0,49	<i>Cacng7</i>	Subunidad auxiliar γ_7	0,48
<i>Cacng7</i>	Subunidad auxiliar γ_7	0,47	<i>Cacng2</i>	Subunidad auxiliar γ_2	0,39
<i>Cacnb3</i>	Subunidad auxiliar β_3	0,33	<i>Cacnb3</i>	Subunidad auxiliar β_3	0,34
<i>Cacna1h</i>	Subunidad α_1H	0,21	<i>Cacna1a</i>	Subunidad α_1A	0,28
<i>Cacnb4</i>	Subunidad auxiliar β_4	0,18	<i>Cacna1b</i>	Subunidad α_1B	0,19
<i>Cacna1a</i>	Subunidad α_1A	0,14	<i>Cacna1e</i>	Subunidad α_1E	0,17

Genes de ratón			Genes de rata		
Símbolo	Subunidad	log (tasa de expresión)	Símbolo	Subunidad	log (tasa de expresión)
<i>Cacna1b</i>	Subunidad $\alpha_1\beta$	0,14	<i>Cacna2d1</i>	Subunidad auxiliar $\alpha_2\delta_1$	0,058
<i>Cacna2d1</i>	Subunidad auxiliar $\alpha_2\delta_1$	0,072	<i>Cacnb4</i>	Subunidad auxiliar β_4	-0,050
<i>Cacnb2</i>	Subunidad auxiliar β_2	0,066	<i>Cacnb2</i>	Subunidad auxiliar β_2	-0,078
<i>Cacna1i</i>	Subunidad α_1	-0,27	<i>Cacna1i</i>	Subunidad α_1	-0,22
<i>Cacng8</i>	Subunidad auxiliar γ_8	-0,73	<i>Cacng8</i>	Subunidad auxiliar γ_8	-0,61

5.4 SE DESARROLLÓ UN ENSAYO DE EXCITABILIDAD NEURONAL PARA EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO DE ANALGÉSICOS EN CÉLULAS F11 DIFERENCIADAS

El propósito de esta parte del trabajo fue desarrollar un método de cribado de alto rendimiento para buscar nuevos analgésicos empleando la medida de la concentración intracelular de calcio en las células diferenciadas. En el apartado de introducción se expuso cómo, cuando se produce un daño en el nervio, la acción de los mediadores inflamatorios sobre la fibra nerviosa incrementa la excitabilidad de ese nervio (véase Introducción, pág. 96 y siguientes). Para trasladar la hiperexcitabilidad que se produce en el organismo en los cuadros de neuropatía periférica al modelo *in vitro*, se expusieron las células a la *sopa inflamatoria* diez minutos antes de inducir la despolarización mediante una solución de KCl 32 mM.

5.4.1 Verificación del incremento de excitabilidad de la línea celular F11 tras la exposición a una combinación de mediadores inflamatorios

Se comprobó que la exposición de la línea celular F11 diferenciada a la combinación de mediadores inflamatorios (*sopa inflamatoria*) durante diez minutos incrementó significativamente la respuesta de las células F11 a KCl 32 mM ($p < 0,05$) (**figura 33**).

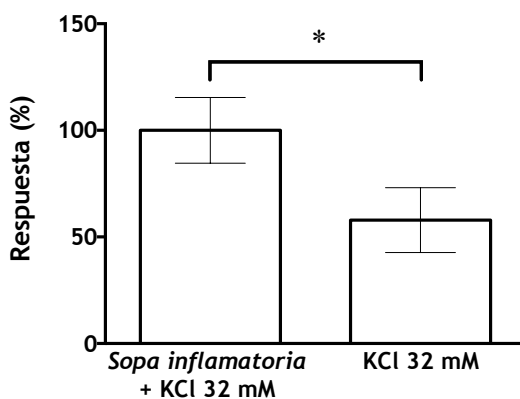


Figura 33. Ejemplo del incremento de respuesta de las células F11 diferenciadas a KCl 32 mM tras 10 minutos de exposición a la *sopa inflamatoria* frente al valor de respuesta a KCl 32 mM sin exposición previa a la *sopa inflamatoria*. Se representa la media \pm desviación estándar de valores por triplicado * $p < 0,05$ (test t de Student).

5.4.2 Comprobación de la ventana del ensayo (cálculo del factor Z')

A fin de verificar la ventana de la medida de la concentración de calcio intracelular y su adecuación a los ensayos de cribado de alto

rendimiento, se calculó el factor Z' . Se obtuvo un valor de Z' igual a 0,57 ($> 0,5$), lo que indica que la técnica se podría utilizar en ensayos de cribado de alto rendimiento para la búsqueda de nuevos fármacos.

5.4.3 Prueba de concepto mediante una batería de analgésicos

La utilidad del modelo para el cribado de analgésicos para el dolor neuropático se testó mediante una batería de fármacos utilizados para el tratamiento de cuadros de dolor neuropático de diferente etiología. Se comprobó que la difenhidramina a concentraciones 100 μM y 10 μM , la amitriptilina a 10 μM , la clomipramina a 10 μM , la duloxetina a 10 μM y 1 μM , y la fluoxetina a 10 μM fueron capaces de reducir la respuesta inducida por KCl 32 mM tras diez minutos de exposición a *sopa inflamatoria* (**figura 34**).

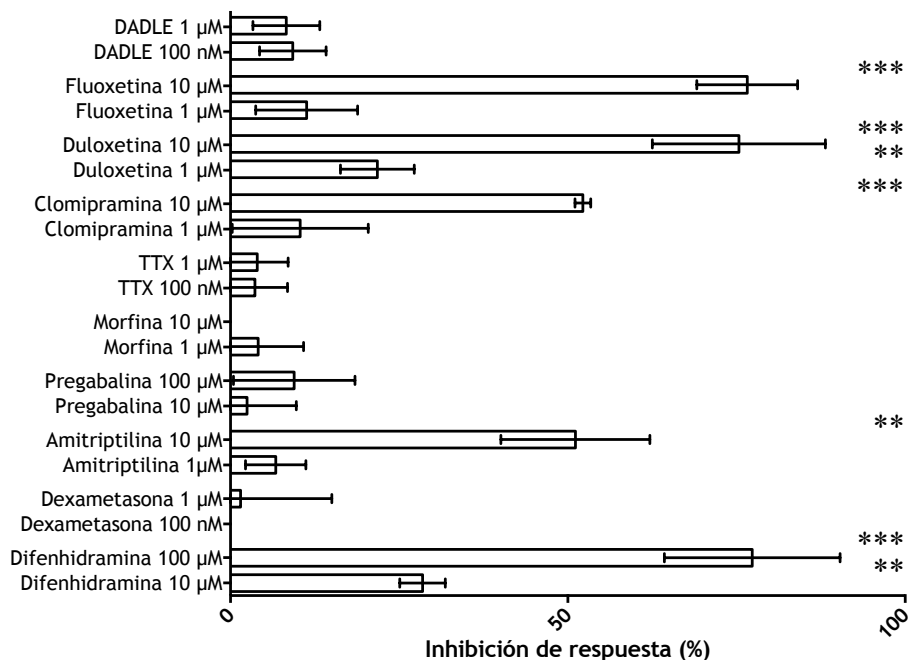


Figura 34. Inhibición de la respuesta de las células F11 diferenciadas a KCl 32 mM tras diez minutos de exposición a la *sopa inflamatoria* producida por una batería de fármacos. Se representa la media \pm desviación estándar de tres experimentos (n = 3) con quince replicados. ***p < 0,001 y **p < 0,01 (test t de Student).

5.4.4 Cribado de los compuestos de la quimioteca Prestwick®

5.4.4.1 Evaluación de la actividad de los 1120 compuestos de la quimioteca Prestwick®

Se evaluó la capacidad de los 1120 compuestos de la quimioteca Prestwick® a concentración 10 μ M para reducir la excitabilidad de las células F11 diferenciadas al ser expuestas a KCl 32 mM tras diez minutos de exposición a la *sopa inflamatoria* midiendo la concentración intracelular de calcio. Debido a la dispersión obtenida,

se seleccionó como punto de corte el valor de la inhibición media más dos veces la desviación estándar (**tabla 22**) (**figura 35**); se identificaron nueve compuestos capaces de producir una inhibición superior a ese valor (**tabla 23**).

Tabla 22. Parámetros estadísticos del cribado de los 1120 compuestos de la quimioteca Prestwick®.

CV medio de los controles	13 %
CV medio de los blancos	19 %
Factor Z' medio	$0,55 \pm 0,035$
Inhibición media	$5,7 \pm 29 \%$
Punto de corte (inhibición media + 2 x DS)	65 %

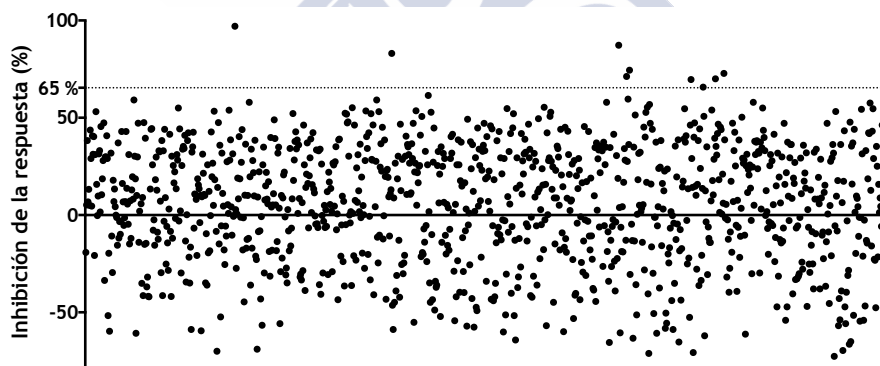


Figura 35. Inhibición de la respuesta de las células F11 a KCl 32 mM tras diez minutos expuestas a *sopa inflamatoria* en presencia de cada uno de los compuestos de la quimioteca Prestwick®. Se representa el valor obtenido de un replicado. En el eje de ordenadas se marca el punto de corte por encima del cual se consideran los compuestos como candidatos a *hits* (65 %).

Tabla 23. Actividad de los nueve compuestos capaces de producir una inhibición superior al punto de corte en el cribado de los 1120 compuestos de la quimioteca Prestwick®.

Compuesto	Inhibición de la respuesta (%)
N6-metiladenosina	96
Nicardipino	87
Felodipino	83
Nitrendipino	74
Protriptilina	74
Nimodipino	71
Prometacina	70
Piribedil	70
Prenilamina	66

5.4.4.2 Confirmación de la actividad analgésica de los *hits*

Para confirmar que los nueve *hits* capaces de inhibir la respuesta de las células por encima del punto de corte presentaban actividad analgésica, se planteó un ensayo de correlación entre concentración y respuesta. De esta manera, se ensayaron diluciones seriadas de cada uno de los *hits* con concentraciones entre 250 nM hasta 100 μ M. De entre los nueve *hits*, en cinco de ellos se verificó la existencia de una correlación entre la concentración de compuesto y la inhibición de la respuesta producida por KCl 32 mM tras diez minutos de exposición a la *sopa inflamatoria* (tabla 24) (figura 36).

Tabla 24. Potencia (pIC_{50}) de los seis compuestos de la quimioteca Prestwick[®] en que se observó una correlación entre concentración y actividad.

Compuesto	pIC_{50} (media \pm DS)
Felodipino	5,7 \pm 0,36
Nicardipino	5,9 \pm 0,16
Nimodipino	5,9 \pm 0,22
Nitrendipino	5,9 \pm 0,22
Propriltina	5,2 \pm 0,15



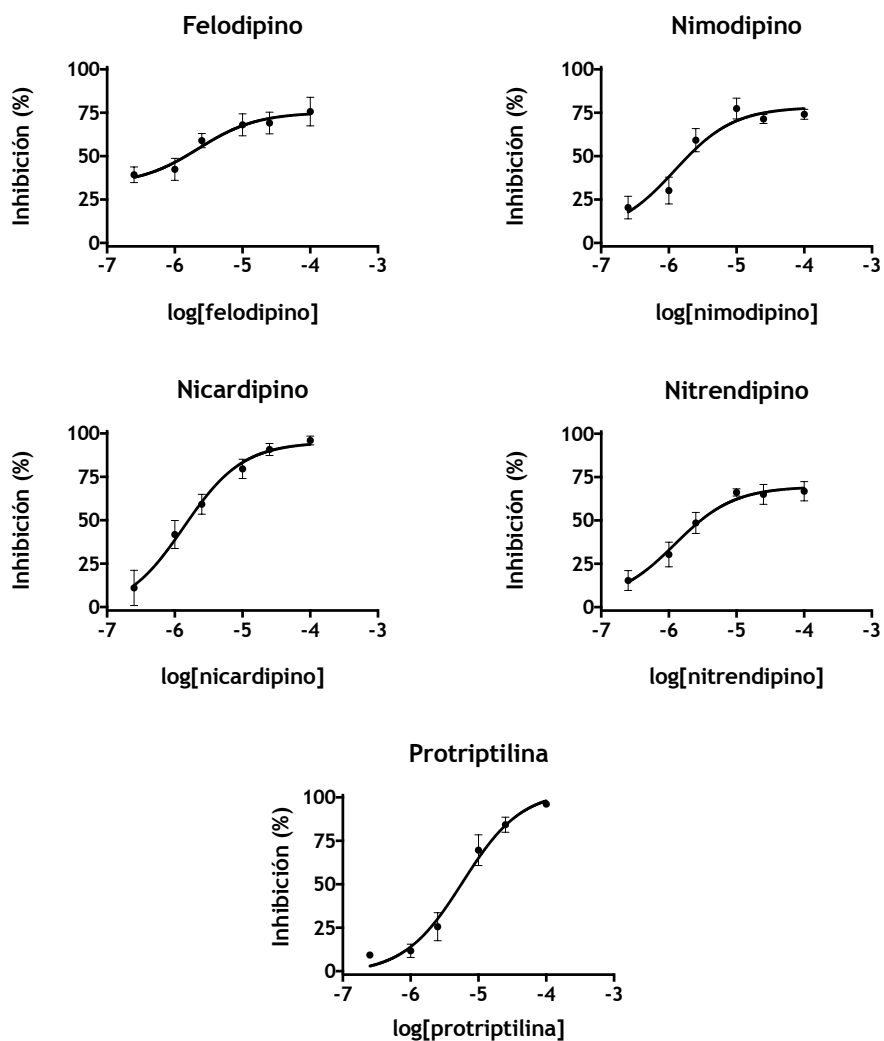


Figura 36. Inhibición de la respuesta de las células F11 diferenciadas a KCl 32 mM tras diez minutos expuestas a *sopa inflamatoria* por los *hits* seleccionados entre las moléculas de la quimioteca Prestwick®. Se representa la media \pm desviación estándar de dos ($n = 2$) experimentos independientes con puntos por triplicado.

5.5 SE DESARROLLÓ UN ENSAYO FENOTÍPICO DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL CRIBADO DE ANALGÉSICOS EN CÉLULAS F11 DIFERENCIADAS

La finalidad de esta parte del trabajo fue el diseño de un procedimiento para cuantificar la degeneración axonal distal que producen algunos fármacos causantes de neuropatía periférica y uno de cuyos síntomas es el dolor neuropático (Melli y Höke, 2010; Jaggi y Singh, 2012). Para ello, se empleó el modelo desarrollado en el presente trabajo, es decir, las células F11 diferenciadas con dibutiril-AMP_c y forskolina. Asimismo, se ensayó el efecto de una batería de analgésicos y de los *hits* identificados en el apartado anterior a la hora de contrarrestar la degeneración axonal inducida por dos antitumorales, la vincristina y el paclitaxel, y un antirretroviral, la rilpivirina.

5.5.1 Estudio del efecto de vincristina, paclitaxel y rilpivirina sobre la longitud de las neuritas

Se constató que los tres fármacos producen un acortamiento en la longitud máxima de las neuritas de las células F11. Además, se verificó que la exposición al antioxidante ácido α -lipoico a concentración 10 μ M ejerció un efecto neuroprotector, contrarrestando el acortamiento de las neuritas inducido tanto por vincristina ($p < 0,001$), como por paclitaxel ($p < 0,01$) y por rilpivirina ($p < 0,001$) (**figura 37**) (**figura 38**).

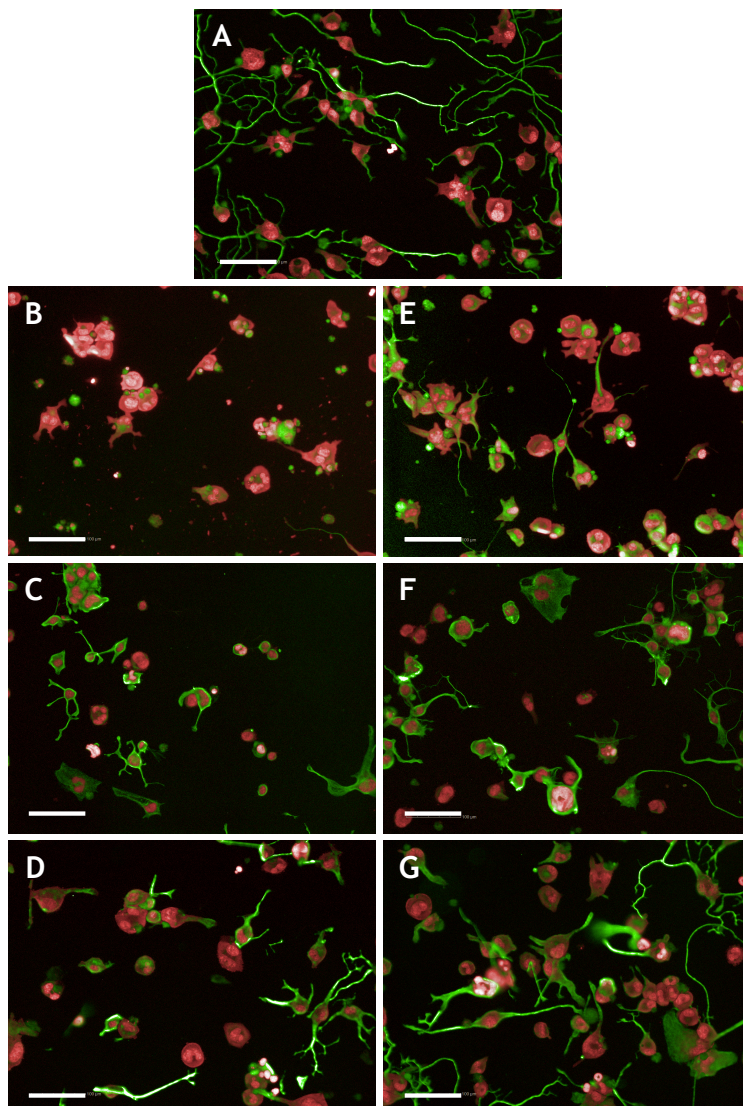


Figura 37. Acortamiento de las neuritas de las células F11 diferenciadas al exponerlas a (B) vincristina 1 nM, (C) paclitaxel 1 μM y (D) rilpivirina 100 nM, en comparación con (A) células F11 sin exposición a agentes tóxicos. La adición de ácido α -lipoico 10 μM revirtió el acortamiento producido (E) por vincristina, (F) por paclitaxel y (G) por rilpivirina. Se muestra una imagen representativa de cuatro ($n = 4$) experimentos independientes con puntos por triplicado (barra de escala 100 μm).

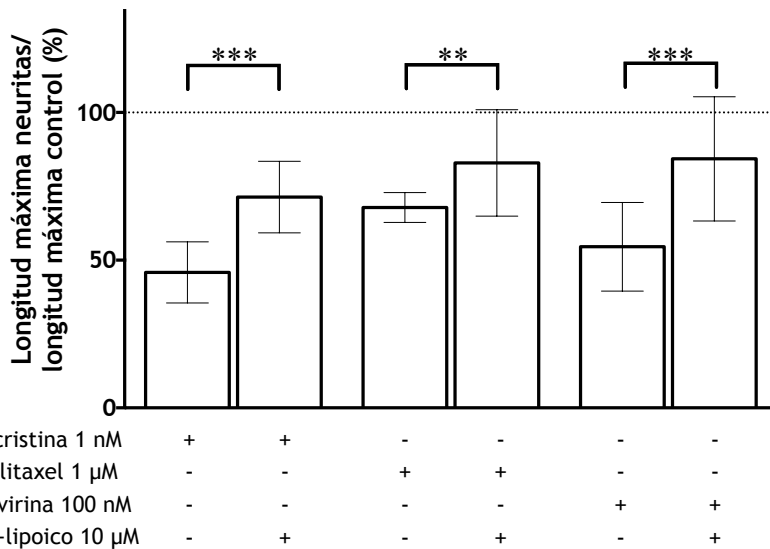


Figura 38. Efecto de los fármacos antitumorales vincristina y paclitaxel, y del antirretroviral rilpivirina sobre la longitud máxima de las neuritas de las células F11 y reversión del acortamiento con ácido α -lipoico 10 μ M. Se representa la media \pm desviación estándar de cuatro experimentos ($n=4$) con puntos por triplicado. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ (test t de Student).

5.5.2 Estudio del efecto de una batería de fármacos analgésicos sobre el acortamiento de las neuritas producido por rilpivirina, paclitaxel y vincristina.

Se constató que la pregabalina 100 μ M indujo un efecto protector significativo sobre el acortamiento de las neuritas en células F11 diferenciadas expuestas a vincristina 1 nM ($p < 0,01$) (**figura 39**) y a rilpivirina 100 nM ($p < 0,01$) (**figura 41**); ningún fármaco produjo efectos protectores significativos sobre el acortamiento de neuritas producido por el paclitaxel a una concentración 1 μ M (**figura 40**).

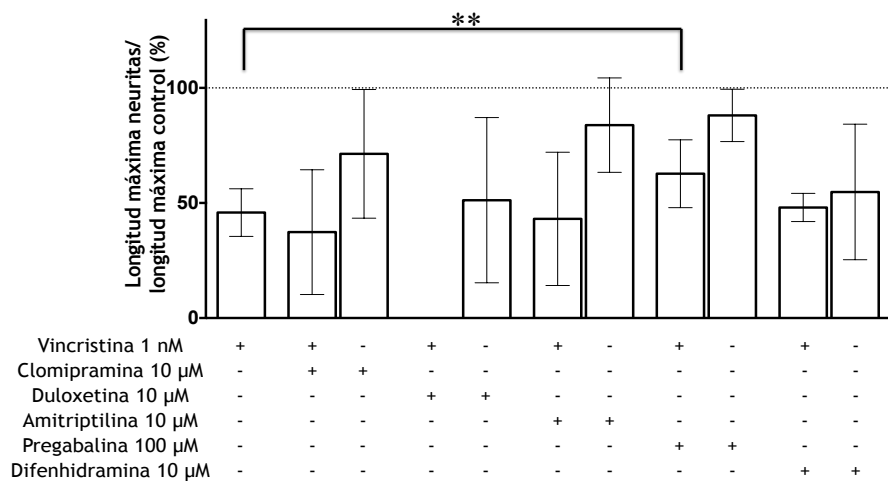


Figura 39. Efecto de una batería de analgésicos sobre la degeneración axonal producida por vincristina 1 nM. Se representa la media \pm desviación estándar de cuatro ($n = 4$) experimentos independientes con puntos por triplicado. $**p < 0,01$ (test t de Student).

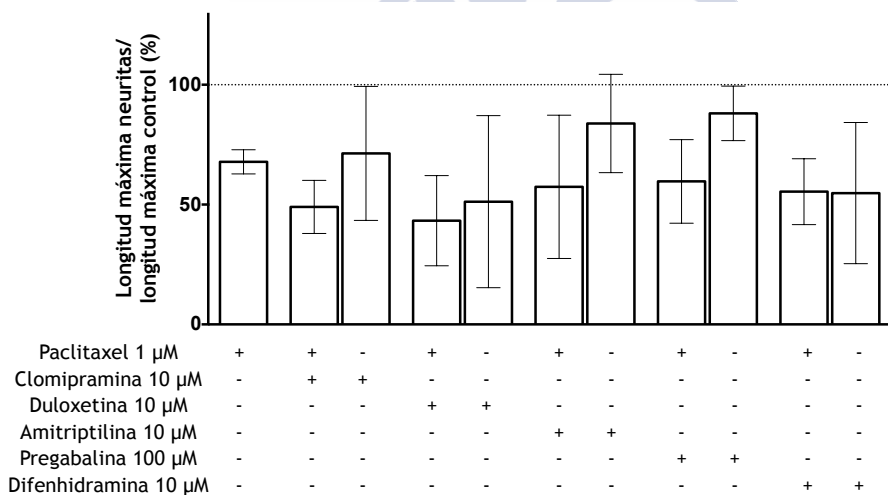


Figura 40. Efecto de una batería de analgésicos sobre la degeneración axonal producida por el antitumoral paclitaxel 1 µM. Se representa la media \pm desviación estándar de cuatro ($n = 4$) experimentos independientes con puntos por triplicado.

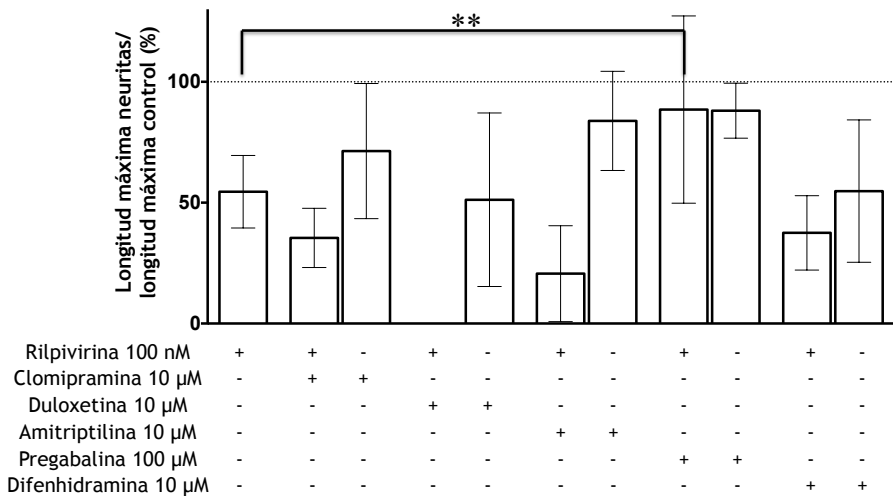


Figura 41. Efecto de una batería de analgésicos sobre la degeneración axonal producida por el antirretroviral rilpivirina 100 nM. ** $p < 0,01$ (test t de Student). Se representa la media \pm desviación estándar de cuatro ($n = 4$) experimentos independientes con puntos por triplicado

5.5.3 Estudio del efecto de los *hits* identificados de la quimioteca Prestwick[®] sobre el acortamiento de las neuritas producido por rilpivirina, paclitaxel y vincristina.

Se constató que, de entre los *hits* identificados en el cribado de la quimioteca Prestwick[®], tanto el felodipino ($p < 0,01$) como el nitrendipino a concentraciones 10 μ M ($p < 0,001$) fueron capaces de contrarrestar de modo significativo el acortamiento de las neuritas en las células F11 diferenciadas expuestas a vincristina 1 nM (**figura 42**); sin embargo solamente el felodipino 10 μ M protegió a las células F11 del efecto del paclitaxel 1 μ M sobre el acortamiento de las neuritas de

modo significativo ($p < 0,01$) (**figura 43**), y solamente con el nitrendipino 10 μM se observó una mitigación significativa de la degeneración axonal producida por rilpivirina 100 nM ($p < 0,01$) (**figura 44**).

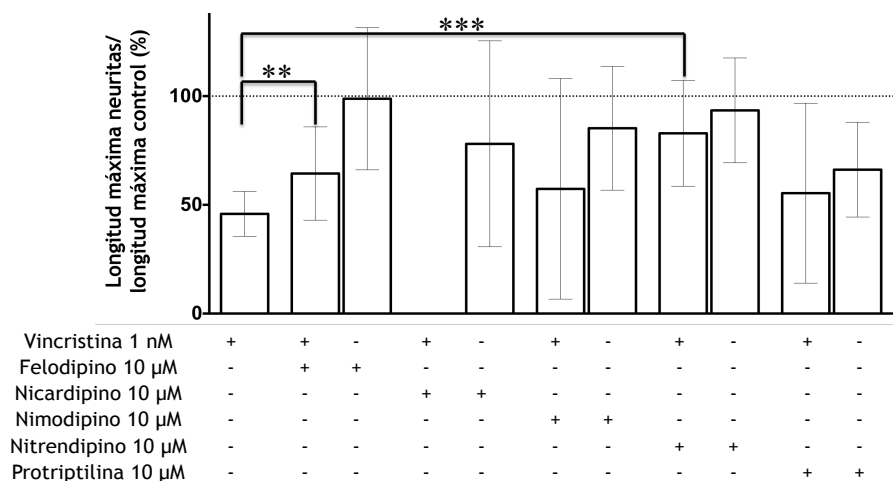


Figura 42. Efecto de los *hits* seleccionados en el cribado de la quimioteca Prestwick® sobre la degeneración axonal producida por el antitumoral vincristina 1 nM. Se representa la media \pm desviación estándar de cuatro ($n = 4$) experimentos independientes con puntos por triplicado. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ (test t de Student).

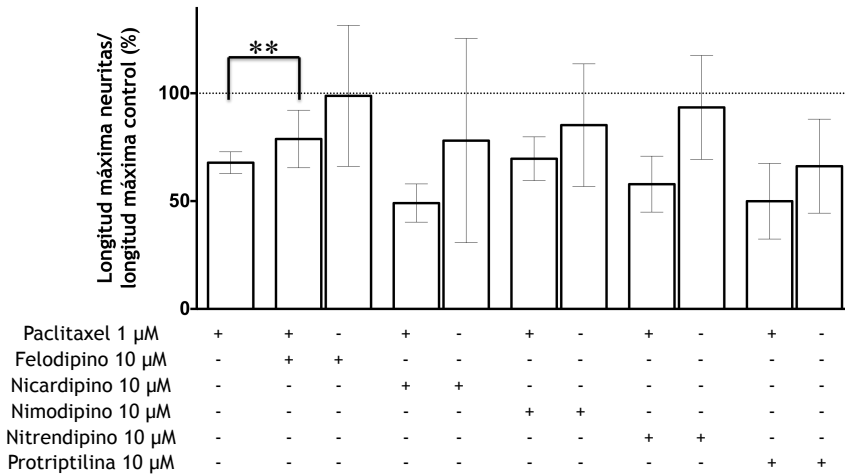


Figura 43. Efecto de los *hits* seleccionados en el cribado de la quimioteca Prestwick® sobre la degeneración axonal producida por el antitumoral paclitaxel 1 μM . Se representa la media \pm desviación estándar de cuatro ($n = 4$) experimentos independientes con puntos por triplicado. ****** $p < 0,01$ (test t de Student).

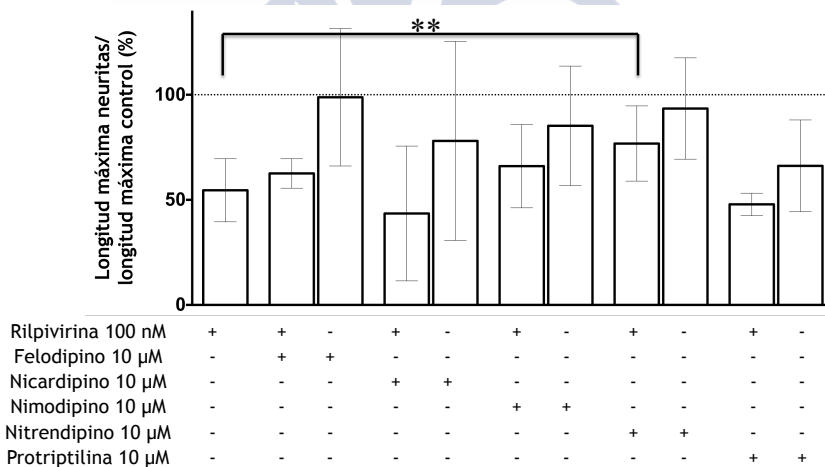


Figura 44. Efecto de los *hits* seleccionados en el cribado de la quimioteca Prestwick® sobre la degeneración axonal producida por el antirretroviral rilpivirina a una concentración 100 nM. Se representa la media \pm desviación estándar de cuatro ($n = 4$) experimentos independientes con puntos por triplicado. ****** $p < 0,01$ (test t de Student).

5.6 LOS ESTÍMULOS ALGOGÉNICOS INDUJERON CAMBIOS ESPECÍFICOS EN EL TRANSCRIPTOMA DE LAS CÉLULAS F11 DIFERENCIADAS

El propósito de este apartado fue estudiar las variaciones en la expresión génica que inducidas al exponer a las células a dos estímulos: *sopa inflamatoria*, es decir, una combinación de mediadores inflamatorios, y un antirretroviral (zalcitabina).

5.6.1 Caracterización del impacto en la viabilidad celular de los estímulos dolorosos

A fin de estudiar la supervivencia de las células F11 en presencia de la *sopa inflamatoria* y del antirretroviral, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular. Se constató que la supervivencia celular no era inferior en presencia ni de *sopa inflamatoria* ni de zalcitabina 1 μM en comparación con el control al cabo de 72 horas (**figura 45**).

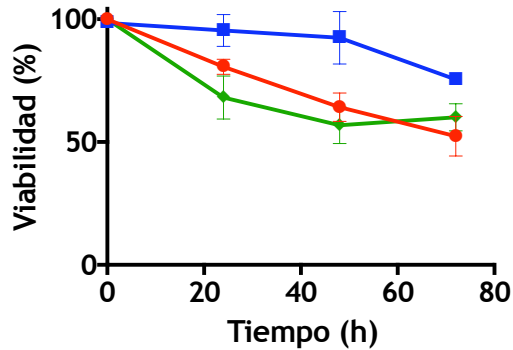


Figura 45. Viabilidad de las células F11 diferenciadas en presencia de *sopa inflamatoria* (■) y de zalcitabina 1 μM (◆) como estímulos dolorosos comparado con el control (●) (células F11 diferenciadas no expuestas a estímulos dolorosos). Se representa la media \pm desviación estándar de dos ($n=2$) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

A la vista de los resultados, se fijaron las 72 horas como el tiempo de exposición a los estímulos dolorosos previo al estudio del transcriptoma de las células F11.

5.6.2 Secuenciación del transcriptoma de las células F11 mediante RNA-Seq

A fin de estudiar las variaciones en la expresión génica de las células F11 al exponer a las células diferenciadas a *sopa inflamatoria* y a zalcitabina 1 μM , se llevó a cabo un estudio del transcriptoma. Para ello, se secuenció el ARN mensajero de las células F11 diferenciadas y de las células F11 diferenciadas expuestas a *sopa inflamatoria* y a zalcitabina. Debido a que las células F11 son células híbridas de neuroblastoma murino y neurona de DRG de embrión de rata, se encontraron transcritos de ambas especies.

5.6.2.1 Análisis transcriptómico de las células F11 expuestas a *sopa inflamatoria*

Mediante RNA-Seq se estudió la repercusión de la exposición durante 72 horas a una solución de mediadores inflamatorios sobre la expresión génica en las células F11 de cara a identificar posibles mecanismos de acción de fármacos que pudieran ser efectivos para el tratamiento de cuadros de dolor neuropático producidos por el efecto de mediadores inflamatorios sobre las fibras nerviosas.

5.6.2.1.1 Comparativa de los genes más inducidos y más reprimidos al exponer a la *sopa inflamatoria*

En primer lugar, se elaboró un listado de los genes, tanto murinos como de rata, cuya expresión se incrementó más (**tabla 25**) y se redujo más (**tabla 26**), al exponer la línea celular F11 a la *sopa inflamatoria*.

Tabla 25. Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se incrementó más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a la *sopa inflamatoria* (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos).

Genes de ratón		Genes de rata	
Símbolo	log (tasa de expresión)	Símbolo	log (tasa de expresión)
<i>Zrsr1</i>	2,5	<i>Snhg11</i>	2,5
<i>Snord49a</i>	2,0	<i>Miip</i>	1,9
<i>Scarna17</i>	1,9	<i>Tagln</i>	1,9
<i>Mir-351</i>	1,9	<i>Ppp1r27</i>	1,8
<i>Scarna2</i>	1,8	<i>Catsperg</i>	1,8
<i>1700096J18Rik</i>	1,8	<i>Sytl1</i>	1,8
<i>Snord55</i>	1,8	<i>Cd244</i>	1,7
<i>Snord49b</i>	1,7	<i>Gtpbp6</i>	1,7
<i>Snord16a</i>	1,6	<i>Galnt5</i>	1,6
<i>Snord47</i>	1,6	<i>Dnd1</i>	1,6
<i>Dnase1l2</i>	1,6	<i>Mutyh</i>	1,6
<i>Malat1</i>	1,6	<i>Tbx6</i>	1,5
<i>Snord2</i>	1,6	<i>Col7a1</i>	1,5
<i>Mir124a-1hg</i>	1,6	<i>Spaca6</i>	1,5
<i>Nrl</i>	1,5	<i>Tigd3</i>	1,5
<i>Ccdc154</i>	1,5	<i>Arse</i>	1,5
<i>Snora68</i>	1,5	<i>LOC100364673</i>	1,5
<i>Col7a1</i>	1,5	<i>Hpx</i>	1,5
<i>Slfn12l</i>	1,5	<i>Apobec2</i>	1,4
<i>Cdk3-ps</i>	1,5	<i>Syt12</i>	1,4

Tabla 26. Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se redujo más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a la *sopa inflamatoria* (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos).

Genes de ratón		Genes de rata	
Símbolo	log (tasa de expresión)	Símbolo	log (tasa de expresión)
<i>Lars2</i>	-6,5	<i>Myl7</i>	-5,3
<i>Mir6236</i>	-4,6	<i>Rn18s</i>	-4,5
<i>Snora23</i>	-4,4	<i>LOC257642</i>	-3,9
<i>Vaultrc5</i>	-4,1	<i>Igf2</i>	-3,6
<i>Igf2</i>	-3,7	<i>Igf1</i>	-3,6
<i>Snora81</i>	-3,5	<i>H19</i>	-3,4
<i>Myl7</i>	-3,5	<i>Tshr</i>	-2,7
<i>Htr1d</i>	-3,4	<i>Cd69</i>	-2,6
<i>H19</i>	-3,3	<i>Rn45s</i>	-2,4
<i>Igf1</i>	-3,2	<i>Mlph</i>	-2,4
<i>Col6a3</i>	-3,0	<i>LOC310926</i>	-2,3
<i>Tshr</i>	-2,7	<i>Hmgcs2</i>	-2,3
<i>Shisa2</i>	-2,6	<i>Rmrp</i>	-2,2
<i>Hmgcs2</i>	-2,4	<i>Rn28s</i>	-2,2
<i>Ackr3</i>	-2,4	<i>Tcea3</i>	-2,1
<i>Rpph1</i>	-2,2	<i>Aqp8</i>	-1,9
<i>Snora3</i>	-2,0	<i>Alpl</i>	-1,9
<i>Tnfrsf9</i>	-2,0	<i>Ackr3</i>	-1,8
<i>Cav1</i>	-1,9	<i>Rgs5</i>	-1,8
<i>Nova2</i>	-1,9	<i>Bc1-Ps1</i>	-1,8

5.6.2.1.2 Comparativa de la regulación de las vías de señalización celular al exponer a la *sopa inflamatoria*

Mediante el programa informático IPA[®], se obtuvo información acerca de la repercusión de la exposición a la *sopa inflamatoria* en la expresión de los genes que codifican las proteínas que participan en las diferentes vías de señalización celular en la línea F11 diferenciada (tabla 27).

Tabla 27. Listado de las vías de señalización murinas y de rata en que, mediante IPA[®], se observó una mayor sobrerrepresentación de genes que codifican proteínas que participan en esas vías tras la exposición a *sopa inflamatoria* de la línea celular F11 diferenciada.

Vías de señalización de ratón			Vías de señalización de rata		
Vía	-log(p)	Genes que varían (sentido de la variación)	Vía	-log(p)	Genes que varían (sentido de la variación)
Fibrosis hepática	8,0	17 % (↓)	Fibrosis hepática	6,7	15 % (↓)
Señalización para el guiado axonal	7,6	12 % (↓)	Señalización para el guiado axonal	6,2	11 % (↓)
Señalización relacionada con el citoesqueleto	4,1	12 % (↓)	Señalización mediada por ILK	4,2	12 % (↓)

5.6.2.2 Análisis transcriptómico de las células F11 expuestas a zalcitabina

Mediante RNA-Seq se estudió la repercusión de la exposición durante 72 horas al antirretroviral zalcitabina 1 μ M sobre la expresión génica en las células F11 de cara a identificar posibles mecanismos de acción de fármacos que pudieran ser efectivos para el tratamiento de cuadros de dolor neuropático producidos por los antirretrovirales.

5.6.2.2.1 Comparativa de genes más inducidos y más reprimidos al exponer a zalcitabina

Se elaboró un listado de los genes, tanto murinos como de rata, cuya expresión se incrementó más (**tabla 28**) y los genes cuya expresión se redujo más (**tabla 29**), tras exponer a las células F11 a zalcitabina.

Tabla 28. Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se incrementó más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a zalcitabina 1 μ M (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos).

Genes de ratón		Genes de rata	
Símbolo	log (tasa de expresión)	Símbolo	log (tasa de expresión)
<i>Taf7l</i>	2,1	<i>Sytl1</i>	2,1
<i>Nqo1</i>	1,8	<i>Kcnj3</i>	2,0
<i>Sytl1</i>	1,8	<i>Zbtb32</i>	1,9
<i>Ppef1</i>	1,6	<i>Galnt5</i>	1,9
<i>Ca6</i>	1,5	<i>Gsta1</i>	1,8
<i>Atp2a3</i>	1,5	<i>Wisp2</i>	1,8
<i>Gsdmd</i>	1,5	<i>Ppef1</i>	1,7
<i>Kcne5</i>	1,5	<i>Pimreg</i>	1,7
<i>Akr1b7</i>	1,5	<i>Pax4</i>	1,5
<i>4930481A15Rik</i>	1,4	<i>Apobec2</i>	1,5
<i>Pax4</i>	1,4	<i>Akr1b10</i>	1,5
<i>Trim63</i>	1,4	<i>Mir671</i>	1,5
<i>Spon2</i>	1,4	<i>Nqo1</i>	1,4
<i>Mir671</i>	1,4	<i>Slc30a3</i>	1,4
<i>Clcf1</i>	1,4	<i>Spon2</i>	1,4
<i>Col13a1</i>	1,3	<i>Slc22a4</i>	1,4
<i>Chtf18</i>	1,3	<i>Atp2a3</i>	1,4
<i>Cpxm1</i>	1,3	<i>Trim63</i>	1,3
<i>Mt2</i>	1,3	<i>Apobr</i>	1,3
<i>Nppb</i>	1,3	<i>Ncf2</i>	1,3

Tabla 29. Listado de los veinte genes murinos y de rata cuya expresión se redujo más al exponer durante 72 horas las células F11 diferenciadas a zalcitabina 1 μ M (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos).

Genes de ratón		Genes de rata	
Símbolo	log (tasa de expresión)	Símbolo	log (tasa de expresión)
<i>Lars2</i>	-5,6	<i>Rn18s</i>	-5,4
<i>Snora81</i>	-4,7	<i>Loc257642</i>	-4,3
<i>Vaultrc5</i>	-4,4	<i>Igf2</i>	-3,8
<i>Igf2</i>	-4,1	<i>Angptl4</i>	-3,7
<i>Mir6236</i>	-3,9	<i>Loc310926</i>	-3,6
<i>Snora23</i>	-3,9	<i>Agtr2</i>	-3,1
<i>Gm20594</i>	-3,4	<i>Sox10</i>	-3,0
<i>Smok4a</i>	-3,2	<i>H19</i>	-2,8
<i>Agtr2</i>	-3,2	<i>Epha3</i>	-2,7
<i>Egr1</i>	-3,0	<i>Tril</i>	-2,7
<i>Rn45s</i>	-2,9	<i>Rn45s</i>	-2,6
<i>Svep1</i>	-2,9	<i>Neurod6</i>	-2,6
<i>H19</i>	-2,8	<i>Egr1</i>	-2,5
<i>Neurog2</i>	-2,6	<i>Txnip</i>	-2,5
<i>Rnu12</i>	-2,6	<i>Rn28s</i>	-2,3
<i>Gm15441</i>	-2,4	<i>Tmem65</i>	-2,3
<i>Txnip</i>	-2,4	<i>Kcnj13</i>	-2,2
<i>Slc36a1os</i>	-2,4	<i>Hivep3</i>	-2,2
<i>Hivep3</i>	-2,2	<i>Apon</i>	-2,1
<i>Egr2</i>	-2,2	<i>Kdm6b</i>	-2,1

5.6.2.2 Comparativa de la regulación de las vías de señalización celular al exponer a zalcitabina

Mediante el programa informático IPA[®], se obtuvo información acerca de la repercusión de la exposición a zalcitabina en la expresión de los genes que codifican las proteínas que participan en las diferentes vías de señalización celular en la línea F11 diferenciada (tabla 30).

Tabla 30. Listado de las vías de señalización murinas y de rata en que, mediante IPA[®], se observó una mayor sobrerrepresentación de genes que codifican proteínas que participan en esas vías tras la exposición a zalcitabina 1 μ M de la línea celular F11 diferenciada.

Vías de señalización de ratón			Vías de señalización de rata		
Vía	$-\log(p)$	Genes que varían (sentido de la variación)	Vía	$-\log(p)$	Genes que varían (sentido de la variación)
Señalización mediada por Eif2	16	26 % (↓)	Señalización mediada por Eif2	18	25 % (↓)
Señalización mediada por mTOR	8,0	20 % (↓)	Señalización mediada por mTOR	10	20 % (↓)
Fosforilación oxidativa	6,7	24 % (↓)	Fosforilación oxidativa	9,0	25 % (↓)

5.6.2.3 Análisis discriminante global de componentes principales

El análisis DAPC se realizó también considerando los cuatro grupos de muestras (no diferenciadas, diferenciadas, diferenciadas expuestas a *sopa inflamatoria* y diferenciadas expuestas a zalcitabina), tanto para los genes de rata como para los genes de ratón

(**figura 46**). Se seleccionaron dos funciones discriminantes con dos selecciones de genes: tanto entre los genes murinos como de rata la función discriminante 1 (**tabla 31**) diferencia las muestras de células no diferenciadas del resto de clases; asimismo, entre los genes de las dos especies la función discriminante 2 (**tabla 32**) diferenció las muestras de ARN de la línea celular F11 diferenciada expuesta a zalcitabina del resto de muestras de ARN de células diferenciadas.

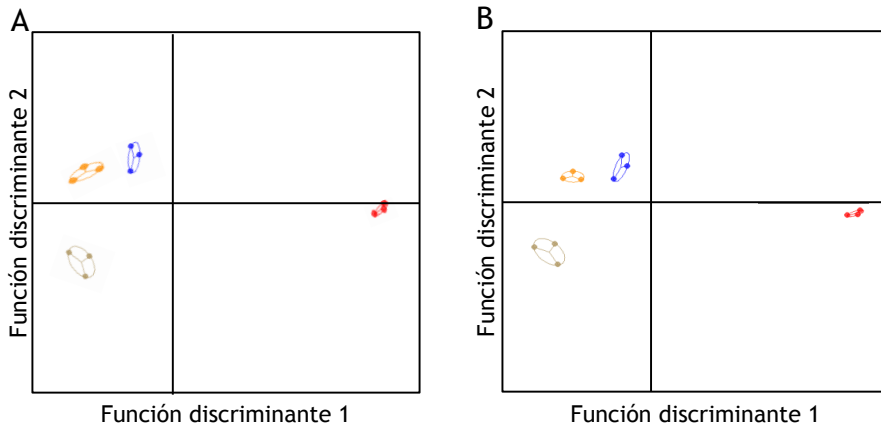


Figura 46. Análisis global discriminante de componentes principales comparando las cuatro muestras: línea celular F11 no diferenciada (●), línea F11 diferenciada (●), línea celular F11 diferenciada expuesta a *sopa inflamatoria* (●) y línea celular F11 diferenciada expuesta a zalcitabina (ddC) (●); el análisis se ha realizado tanto (A) con los genes murinos como (B) con los de rata.

Tabla 31. Listado de los genes que contribuyeron en mayor grado a la función discriminante 1 (FD1) del DAPC global en la línea celular F11, tanto genes de ratón como de rata (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos). Se muestran, además, el logaritmo de la tasa de expresión y la probabilidad en el análisis de expresión diferencial.

Genes de ratón				Genes de rata			
Símbolo	Contribución a la FD1	log (exp)	-log P	Símbolo	Contribución a la FD1	log (exp)	-log P
<i>Lars2</i>	$6,0 \cdot 10^{-3}$	2,2	0,62	<i>Loc257642</i>	$4,1 \cdot 10^{-3}$	2,1	1,7
<i>Mir6236</i>	$4,3 \cdot 10^{-3}$	1,8	1,4	<i>Hist1h2bk</i>	$3,9 \cdot 10^{-3}$	-3,7	9,6
<i>Col6a3</i>	$3,4 \cdot 10^{-3}$	-2,2	3,1	<i>Scn5a</i>	$3,5 \cdot 10^{-3}$	5,3	12
<i>Hist1h2bb</i>	$2,7 \cdot 10^{-3}$	-4,2	9,6	<i>Rn18s</i>	$3,4 \cdot 10^{-3}$	3,3	1,8
<i>Txnip</i>	$2,3 \cdot 10^{-3}$	-0,2	0,26	<i>Hist1h1b</i>	$3,2 \cdot 10^{-3}$	-3,4	9,2
<i>Hist1h2bm</i>	$2,3 \cdot 10^{-3}$	-3,3	7,9	<i>Hist1h1a</i>	$2,9 \cdot 10^{-3}$	-2,8	6,2
<i>Hist1h1b</i>	$2,2 \cdot 10^{-3}$	-3,9	11	<i>Pnoc</i>	$2,8 \cdot 10^{-3}$	3,1	9,2
<i>Gm15441</i>	$2,2 \cdot 10^{-3}$	-0,2	0,23	<i>Otof</i>	$2,7 \cdot 10^{-3}$	5,1	4,1
<i>Scn5a</i>	$2,0 \cdot 10^{-3}$	5,2	12	<i>Nptx1</i>	$2,5 \cdot 10^{-3}$	3,8	11
<i>Hist1h1a</i>	$2,0 \cdot 10^{-3}$	-2,8	6,7	<i>Hist1h2bo</i>	$2,5 \cdot 10^{-3}$	-3,2	11
<i>Hist1h3b</i>	$2,0 \cdot 10^{-3}$	-3,1	9,5	<i>Scara5</i>	$2,5 \cdot 10^{-3}$	3,9	11
				<i>Pde3a</i>	$2,3 \cdot 10^{-3}$	4,1	8,7
				<i>Vip</i>	$2,3 \cdot 10^{-3}$	4,6	8,3
				<i>Mki67</i>	$2,3 \cdot 10^{-3}$	-2,0	4,0
				<i>Angpt2</i>	$2,3 \cdot 10^{-3}$	-3,0	5,6
				<i>Sik1</i>	$2,2 \cdot 10^{-3}$	2,4	9,1
				<i>Txnip</i>	$2,2 \cdot 10^{-3}$	0,090	0,10
				<i>Mcm3</i>	$2,1 \cdot 10^{-3}$	-2,9	9,1
				<i>Rrm2</i>	$2,1 \cdot 10^{-3}$	-3,4	9,3
				<i>Mcm5</i>	$2,1 \cdot 10^{-3}$	-3,1	10
				<i>Hist1h2bd</i>	$2,0 \cdot 10^{-3}$	-2,8	5,5

Tabla 32. Listado de los genes que contribuyeron en mayor grado a la función discriminante 2 (FD2) del DAPC global en la línea celular F11, tanto genes de ratón como de rata (véase el Anexo, pág. 327 y siguientes, para el significado de los símbolos). Se muestran, además, el logaritmo de la tasa de expresión y la probabilidad en el análisis de expresión diferencial.

Genes de ratón				Genes de rata			
Símbolo	Contribución a la FD2	log (exp)	-log P	Símbolo	Contribución a la FD2	log (exp)	-log P
<i>Lars2</i>	$1,4 \cdot 10^{-2}$	2,2	0,62	<i>Rn18s</i>	$1,4 \cdot 10^{-2}$	3,3	1,8
<i>Gm25094</i>	$7,8 \cdot 10^{-3}$	6,0	2,6	<i>Loc257642</i>	$1,3 \cdot 10^{-2}$	2,1	1,7
<i>Snora81</i>	$7,0 \cdot 10^{-3}$	4,9	2,9	<i>Loc310926</i>	$9,2 \cdot 10^{-3}$	2,1	2,9
<i>Mir6236</i>	$6,6 \cdot 10^{-3}$	1,8	1,4	<i>Egr1</i>	$6,6 \cdot 10^{-3}$	2,0	2,0
<i>Vaultrc5</i>	$6,0 \cdot 10^{-3}$	4,4	2,7	<i>Igf2</i>	$4,7 \cdot 10^{-3}$	5,3	5,1
<i>Rn45s</i>	$5,4 \cdot 10^{-3}$	1,7	2,3	<i>Txnip</i>	$4,4 \cdot 10^{-3}$	0,090	0,10
<i>Snora23</i>	$4,9 \cdot 10^{-3}$	4,8	2,5	<i>Rn45s</i>	$4,1 \cdot 10^{-3}$	1,6	2,5
<i>Egr1</i>	$4,9 \cdot 10^{-3}$	1,7	1,2	<i>LOC100911</i>	$3,3 \cdot 10^{-3}$	0,5	0,26
<i>Igf2</i>	$4,5 \cdot 10^{-3}$	5,5	5,7	498			
<i>Rnu12</i>	$4,0 \cdot 10^{-3}$	3,1	2,7	<i>Rn28s</i>	$3,0 \cdot 10^{-3}$	1,4	1,9
<i>Txnip</i>	$3,1 \cdot 10^{-3}$	-0,18	0,26	<i>Akr1b8</i>	$2,4 \cdot 10^{-3}$	-0,45	1,1
<i>Gm15441</i>	$2,9 \cdot 10^{-3}$	-0,17	0,23				
<i>Snora78</i>	$2,7 \cdot 10^{-3}$	1,0	0,60				
<i>Kcnq1ot1</i>	$2,6 \cdot 10^{-3}$	0,65	0,59				
<i>Snora68</i>	$2,4 \cdot 10^{-3}$	1,9	0,96				
<i>Xist</i>	$2,3 \cdot 10^{-3}$	0,84	0,57				
<i>Rnu11</i>	$2,2 \cdot 10^{-3}$	2,9	2,8				
<i>Snord89</i>	$2,1 \cdot 10^{-3}$	1,7	0,82				



Discusión



6. Discusión

El principal hito de la presente tesis doctoral es el desarrollo de un modelo *in vitro* para la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del dolor neuropático basado en el empleo de neuronas sensoriales inmortalizadas. Este modelo permite la identificación de moléculas capaces de estabilizar la hiperexcitabilidad que acompaña a la inflamación en la neurona periférica y de contrarrestar el acortamiento de las neuritas que se produce como efecto adverso de algunos tratamientos antitumorales y antirretrovirales. Tanto la hiperexcitabilidad como el acortamiento de las neuritas se manifiestan clínicamente como cuadros de dolor neuropático.

El dolor neuropático continúa siendo una necesidad terapéutica no cubierta, a pesar de que su prevalencia es cercana al 10 % en la población mundial (Van Hecke y cols., 2014). Esto se debe a que los fármacos indicados en la clínica para su tratamiento presentan una eficacia muy limitada y una alta incidencia de efectos adversos (Finnerup y cols., 2015; St. John Smith, 2018).

Los modelos empleados para el cribado de nuevos fármacos para tratar el dolor neuropático se han basado en la utilización de células procedentes de tejidos periféricos (en muchas ocasiones de origen tumoral) a las que, mediante manipulación genética, se les induce la expresión de dianas implicadas en la patogenia del dolor neuropático (Enna, 2014). Después de identificar los fármacos activos sobre las dianas, se valora el efecto de las moléculas en modelos animales observando si son capaces de aplacar comportamientos motivados por lesiones que inducen en el animal cuadros similares al dolor neuropático en humanos (Jaggi y cols., 2011) (véase Introducción, pág. 125 y siguientes). Esta aproximación implica una predefinición de las dianas *a priori*, por lo que no permite el descubrimiento de fármacos innovadores. Además, el dolor neuropático es una patología compleja en la que intervienen múltiples mecanismos que inducen un aumento en la sensibilidad de los nociceptores, modificaciones en la conducción del impulso doloroso y cambios en la transmisión de los estímulos algogénicos en el SNC (Zimmermann, 2001). Estas observaciones son difícilmente reproducibles por los modelos clásicos *in vitro*, basados en sistemas recombinantes tal y como se ha comentado anteriormente.

Por lo tanto, un modelo *in vitro* para el cribado de alto rendimiento (HTS) de analgésicos que reprodujese las variaciones en la conducción del impulso doloroso a través de las neuronas sensoriales de DRG, podría aportar mayor traslacionalidad y permitir la identificación de

nuevos fármacos con mecanismos de acción desconocidos *a priori*, o bien acciones sinérgicas entre moléculas que sean capaces de aliviar el dolor originado por un daño en los nervios periféricos (Warchal y cols., 2016).

El objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo y la caracterización de un modelo para la búsqueda de nuevos analgésicos para el tratamiento del dolor neuropático, que signifique una mayor traslacionalidad y la identificación de *hits* con nuevos mecanismos analgésicos.

El modelo planteado en la presente tesis doctoral intenta aportar esta orientación para mejorar los métodos de búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del dolor neuropático, abordando la limitación de los cultivos neuronales primarios por la escasa disponibilidad de neuronas primarias, que los hace inadecuados para el cribado de alto rendimiento debido a la necesidad de sacrificar un gran número de animales para su obtención (Vincent y Feldman, 2008; Melli y Höke, 2010). Nuestro modelo se basa en la utilización de neuronas sensoriales inmortalizadas, permitiendo el crecimiento y la replicación de las células, lo que establece su adecuación para ser empleadas en ensayos de cribado de alto rendimiento.

6.1 LA DIFERENCIACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES F11 Y ND7/23 LAS DOTÓ DE CARACTERÍSTICAS DE NEURONAS SENSORIALES

El objetivo de este primer apartado de la presente tesis doctoral fue la selección de una línea celular inmortalizada de neurona sensorial y de un método de diferenciación para la obtención de células con fenotipo de neurona de DRG, a fin de desarrollar un modelo de cribado de fármacos para el tratamiento del dolor neuropático.

Para desarrollar el nuevo modelo, en primer lugar nos planteamos la comparación entre tres métodos que inducen la diferenciación a neuronas de dos líneas híbridas de neurona de DRG de rata y célula de neuroblastoma de ratón.

En la bibliografía se han descrito varias sustancias capaces de conferir características fenotípicas neuronales a este tipo de células a través del incremento del AMP_c intracelular: el dibutiril-AMP_c, la forskolina y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP). El dibutiril-AMP_c es un derivado de AMP_c capaz de atravesar la membrana plasmática (Dunn y cols., 1991; Puttfarcken y cols., 1997; Ghil y cols., 2000; Cho y cols., 2001; Martin y cols., 2002; Hwang y cols., 2008; Jung y cols., 2008; Inoue y cols., 2012; Sen y cols., 2013; Mitani y cols., 2016; Pota y cols., 2016). La forskolina induce la formación de AMP_c a través de la estimulación de la adenilato ciclasa (Ghil y cols., 2000; Milton, 2012; Wieringa y cols., 2012;

Mitani y cols., 2016). El PACAP también induce la formación de AMP_c a través de la adenilato ciclasa (McIlvain y cols., 2006; Inoue y cols., 2012). Este incremento del AMP_c intracelular favorece la activación de CREB y de otros factores de transcripción (Ghil y cols., 2000; Cho y cols., 2001), produciendo un incremento en la longitud de las neuritas y la inducción de cambios morfológicos en las células, lo que les confiere un fenotipo neuronal. También el ácido retinoico, que actúa a través de su receptor nuclear β , provoca la diferenciación celular a través de la expresión de factores de transcripción (Bain y cols., 1996; Fioravanti y cols., 2008; Ambrosino y cols., 2013). En la presente tesis doctoral se comparó la eficacia de dibutilil-AMP_c, forskolina y ácido retinoico para dar lugar a células con un fenotipo neuronal (**figura 47**). En las células ND7/23, el ácido retinoico se suplementó con IBMX puesto que esta molécula inhibe las fosfodiesterasas, enzimas responsables de la degradación del AMP_c (Mitani y cols., 2016). Por otra parte, algunos medios de diferenciación se enriquecieron con NGF debido a que este péptido también induce la diferenciación neuronal a través de la vía de las MAP cinasas (McIlvain y cols., 2006).

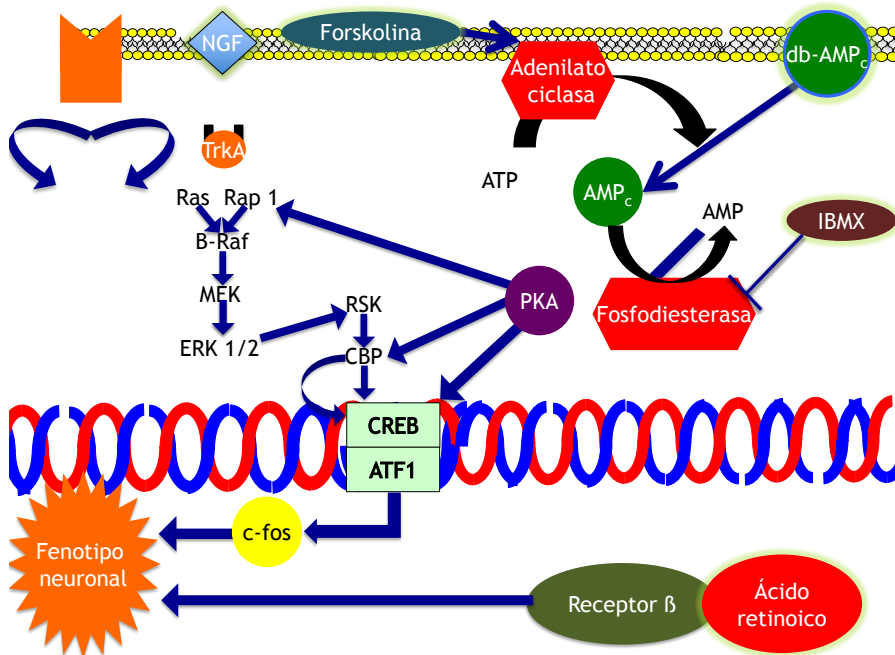


Figura 47. Mecanismo de acción de los mediadores empleados para inducir la diferenciación: ácido retinoico, dibutilil-AMP_c, forskolina, IBMX y NGF. Realizado a partir de McIlvain y cols., 2016 y de Bain y cols., 1996.

Atendiendo a la expresión de un marcador neuronal, el receptor TrkA, y a la adquisición de características fenotípicas neuronales (longitud de las neuritas), se utilizó la combinación de forskolina y dibutilil-AMP_c como método de diferenciación para obtener células con fenotipo de neurona de DRG a partir de la línea celular F11.

Se observó una gran variabilidad entre las células ND7/23 diferenciadas, por lo que el empleo de esta línea celular fue descartado.

Por todo ello, se seleccionó la línea celular F11 diferenciada con forskolina y dibutilil-AMP_c como nuevo modelo para el desarrollo de sistemas de cribado de fármacos para el tratamiento del dolor neuropático.

6.2 EL CLORURO POTÁSICO, PERO NO EL ATP NI LA CAPSAICINA, INDUJERON UNA RESPUESTA DOSIS-DEPENDIENTE EN LAS CÉLULAS DIFERENCIADAS

El siguiente objetivo que se planteó fue la caracterización de la respuesta de las células F11 diferenciadas a estímulos de tipo alrogénico. Se evaluó la señal inducida por tres estímulos relacionados con la generación de señales dolorosas: ATP, KCl y capsaicina, y se emplearon tres técnicas para cuantificar la respuesta: la medida de la redistribución dinámica de masa (DMR), del potencial de membrana y de la concentración intracelular de calcio.

La medida de la DMR es una técnica que permite la cuantificación de pequeños cambios en la distribución de la masa celular tras la exposición a un estímulo (Fang y cols., 2007; Schröder y cols., 2010; Pai y cols., 2012; Fang, 2014).

La cuantificación del potencial de membrana permite detectar la despolarización de la membrana plasmática como consecuencia de la exposición a estímulos (Wolff y cols., 2003). En la presente tesis

doctoral se emplearon dos técnicas diferentes para medir el potencial de membrana: el kit Fluovolt[®], que es una técnica que mide cambios instantáneos, y el DiBAC₄(3) (ácido bis-[1,3- dibutilbarbitúrico] trimetinaoxonol), sonda que cuantifica variaciones a más largo plazo.

La medida de la concentración de calcio intracelular resulta relevante a la hora de valorar la respuesta de células con fenotipo neuronal debido a que el calcio es un segundo mensajero que juega un papel destacado en la transmisión del dolor (Brini y cols., 2014; Jarvis y cols., 2014; S. Liu y cols., 2015).

En cuanto a los mediadores algogénicos empleados, Vetter y Lewis habían descrito en 2010 la capacidad de las células F11 no diferenciadas de responder a concentraciones seriadas de ATP de manera concentración-dependiente. El ATP es una molécula que ejerce su efecto actuando sobre dos tipos de receptores: los receptores P2X, acoplados a canales iónicos selectivos para cationes, y los receptores P2Y, acoplados a proteínas G (Ciruela y cols., 2015; Habermacher y cols., 2015). La presencia de ambos tipos de receptores ha sido descrita en neuronas sensoriales, participando en la transmisión de la señal dolorosa (Bradbury y cols., 1998; Ruan y Burnstock, 2003; Kobayashi y cols., 2005; Heinrich y cols., 2008; Chen y cols., 2016). En el presente trabajo se comprobó la ausencia de diferencias significativas entre la respuesta de las células F11 a ATP antes y después de la

diferenciación. Esta ausencia de diferencias se podría justificar porque el ATP es un mediador ubicuo que ejerce multitud de funciones en muchos tipos de células, no solamente como mediador alrogénico (Burnstock, 2013); de esta manera, en la literatura se han encontrado numerosas evidencias a favor de la presencia de receptores para ATP en células de neuroblastoma (Raffaghello y cols., 2006; Gutiérrez-Martín y cols., 2011; Pai y cols., 2012). La ausencia de diferencias significativas entre la respuesta a ATP de las células F11 antes y después de la diferenciación motivó el descarte de este estímulo alrogénico en el modelo para el cribado de fármacos para tratar el dolor neuropático desarrollado en la presente tesis doctoral.

La capsaicina es un principio activo de origen natural que actúa como agonista del receptor TrpV1, marcador de las células nociceptivas (Sharma y cols., 2013; Doran y cols., 2015). Este receptor se encuentra asociado a un canal permeable para cationes cuya activación es inducida por el ligando endógeno anandamida, por sustancias ácidas y por efecto de temperaturas superiores a 42 °C, participando en la transmisión del dolor (Caterina y cols., 1997; Savidge y cols., 2001; Fattori y cols., 2016). En el presente trabajo se ha observado que la capsaicina no induce respuesta en ninguno de los tres métodos en la línea celular F11 diferenciada. Se ha confirmado mediante la secuenciación del transcriptoma y mediante Western *blot* que el receptor TrpV1 no se expresa en las células F11.

Las evidencias presentes en estudios previos de la expresión del receptor TrpV1 en las células F11 son contradictorias: algunos autores refieren su presencia en la línea celular F11 (Kusano y Gainer, 1993; Fioravanti y cols., 2008; Le Gall-Ianotto y cols., 2012; Ambrosino y cols., 2013, 2014); por el contrario, otros muestran que el receptor está ausente y que estas células no responden a capsaicina (Vetter y Lewis, 2010; Yin y cols., 2016). En el año 2010, Vetter y Lewis han postulado en su estudio que estas diferencias se podrían atribuir a la gran variabilidad entre distintos lotes de células F11. Asimismo, Hwang y colaboradores en el año 2005 describieron que no todas las neuronas sensoriales primarias expresan el receptor TrpV1.

En trabajos previos, se constató que algunos mediadores como el NGF (Wang y cols., 2015) o la interleucina 6 (Fang y cols., 2015) inducían la expresión del receptor TrpV1 en neuronas primarias de DRG. En la presente tesis doctoral se ha comprobado que ninguna de las dos sustancias es capaz de inducir la expresión del receptor ni, por lo tanto, de provocar la respuesta a la capsaicina en las células F11 diferenciadas. Esta ausencia del receptor de TrpV1 en la línea celular F11 diferenciada es una limitación del modelo desarrollado en esta tesis doctoral, por lo que es necesario complementar el modelo con otros que expresen este receptor para el cribado de fármacos.

El KCl es un estímulo algogénico que ejerce su acción induciendo una despolarización de la membrana plasmática de las células sensoriales al aumentar la carga salina del medio extracelular (Ai y cols., 1998; Bi y cols., 2006; Pai y cols., 2012). La despolarización induce la activación de canales dependientes de voltaje y la transmisión de las señales dolorosas a lo largo de la neurona sensorial (Park y Luo, 2010). En el año 2013, Ambrosino y colaboradores describieron cómo la diferenciación les confiere a las células F11 la capacidad de responder a KCl 20 mM, aunque estos autores emplearon el ácido retinoico como factor de diferenciación en lugar de la forskolina y del dibutiril-AMP_c. En la presente tesis doctoral hemos confirmado que también el empleo de estos factores de diferenciación confiere a las células F11 la capacidad de responder a elevaciones en la carga salina del medio extracelular incrementando la concentración de calcio intracelular e induciendo la despolarización de la membrana plasmática. Este hallazgo concuerda con el estudio de 1987 de Francel y colaboradores en el que se describió que tras la diferenciación se incrementaba la expresión de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Por tanto, se demostró que las células F11 responden a ATP, tanto antes como después de la diferenciación, y que la diferenciación les confiere excitabilidad a las células F11 frente a variaciones en la carga salina del medio extracelular; además, se verificó que estas células no

son sensibles a la capsaicina. Asimismo, se identificó que la medición de la concentración de calcio intracelular es susceptible de ser empleada como ensayo primario de cribado de alto rendimiento en el descubrimiento temprano de fármacos para el tratamiento del dolor neuropático.

6.3 LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL ACTIVA MECANISMOS DE TRANSCRIPCIÓN QUE REGULAN LA EXCITABILIDAD NEURONAL

Nos planteamos el objetivo de valorar las repercusiones de la diferenciación sobre la expresión de los genes en la línea celular F11. Las células F11, al ser híbridas de neuronas de DRG de embrión de rata y de células de neuroblastoma murino (Fan y cols., 1992), presentan ARN_m de ambas especies; por lo tanto, la secuenciación del transcriptoma de estas células constituyó un reto para alinear las secuencias de ARN_m frente a los dos genomas de referencia.

Se comprobó que la diferenciación produce una reducción en la expresión de genes que codifican proteínas de las vías relacionadas con la replicación del ADN y la proliferación celular, como, por ejemplo, los genes que codifican histonas. Según el estudio publicado en 2017 por Mei y colaboradores, la reducción en la expresión de estas proteínas se correlaciona con una menor tasa de replicación de las células.

La diferenciación de la línea celular F11 incrementa, de acuerdo con los datos obtenidos en el análisis discriminante de componentes principales (DAPC), la expresión del gen *Scn5a* que codifica el canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.5, tanto murino como de rata. Este canal se expresa en neuronas de DRG embrionarias (Renganathan y cols., 2002), y más recientemente se han encontrado transcritos de ARN_m que codifican la proteína en neuronas de DRG de individuos adultos (Kerr y cols., 2007). Asimismo, también se ha verificado un incremento en la expresión del gen *Scn10a* (tanto de rata como de ratón) al diferenciar la línea celular F11; este gen codifica el canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.8, principal responsable de la despolarización de la membrana de las neuronas sensoriales durante la transmisión del estímulo doloroso (Akopian y cols., 1996; Blair y Bean, 2002; Renganathan y cols., 2002; Ho y O’Leary, 2011). Este canal se considera un marcador de neurona de DRG y su expresión en el modelo descrito en la presente tesis doctoral supone una ventaja de la línea celular F11 diferenciada frente a otras líneas inmortalizadas de neurona de DRG caracterizadas previamente en la bibliografía que carecen del canal (Doran y cols., 2015). La inducción de la expresión de estos canales de sodio dependientes de voltaje después de la diferenciación de la línea celular F11 explica la adquisición de la capacidad de responder a cambios en la carga salina del medio extracelular observada tras la diferenciación. A la vez, este hallazgo sugiere que el empleo de fármacos inhibidores de estos canales de sodio dependientes

de voltaje, en las neuronas de DRG, podría resultar de interés para el tratamiento del dolor neuropático.

Por otra parte, se ha verificado que la diferenciación incrementa la expresión de genes relacionados con la adquisición de características fenotípicas de neurona: *Epha3* de rata, que codifica un receptor acoplado a tirosina cinasas que participa en la formación de los axones (Liu y cols., 2012), o *Neurog2* murino, gen que codifica un factor de transcripción que participa en la neurogénesis (Dai y cols., 2015). Asimismo, también se ha comprobado que la diferenciación celular incrementa la expresión de genes que codifican proteínas expresadas en el sistema nervioso como *Shc2* o *Ackr3* de rata y de ratón (Sasaki y cols., 2011; Williams y cols., 2014).

Por todo ello, se puede concluir que la diferenciación neuronal induce la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la excitabilidad neuronal y con la adquisición de características fenotípicas neuronales. Por el contrario, la diferenciación reduce la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la proliferación celular y en la replicación del material genético.

6.4 SE DESARROLLÓ UN ENSAYO DE EXCITABILIDAD NEURONAL PARA EL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO DE ANALGÉSICOS EN CÉLULAS F11 DIFERENCIADAS

El objetivo planteado fue el desarrollo de un ensayo bioquímico de hipersensibilidad neuronal a partir de las células F11 diferenciadas y su validación inicial con una batería de fármacos analgésicos con distintos mecanismos de acción y posteriormente mediante el cribado de la quimioteca Prestwick[®], que consta de 1120 fármacos aprobados por las agencias de evaluación de medicamentos. Se expusieron las células a una solución de cuatro mediadores inflamatorios (*sopa inflamatoria*) (bradicinina 1 μM , prostaglandina E₂ 10 μM , histamina 10 μM y serotonina 10 μM), diez minutos antes de la despolarización de la membrana plasmática con KCl 32 mM, intentando reproducir *in vitro* la exposición de la neurona sensorial a los mediadores inflamatorios que se liberan tras el daño en la fibra nerviosa (Coutaux y cols., 2005; Ma y cols., 2006). La acción de estos mediadores sobre las neuronas sensoriales incrementa la sensibilidad de los nociceptores en cuadros de dolor neuropático (véase Introducción, págs. 63 y siguientes). Para evaluar la respuesta de las células se midió la concentración de calcio intracelular debido a que se observó que el factor Z', valor indicativo de la ventana de esta técnica, era adecuado para su aplicación en el cribado de fármacos (factor Z' = 0,566) (Iversen y cols., 2012). La medida de la concentración de calcio intracelular es automatizable y miniaturizable

pudiendo utilizarse para ensayos de cribado de alto rendimiento (Hansen y Bräuner-Osborne, 2009).

Cinco fármacos de la batería de analgésicos indujeron una reducción en la señal producida por el KCl: la difenhidramina, la amitriptilina, la duloxetina, la clomipramina y la fluoxetina. La difenhidramina es un fármaco empleado en la clínica como antihistamínico pero con acción sobre receptores colinérgicos y con acción inhibitoria sobre canales de sodio dependientes de voltaje con un IC_{50} de en torno a $50 \mu\text{M}$ (Kim y cols., 2000; Yu y cols., 2013); de forma similar, en la presente tesis doctoral una concentración de difenhidramina de $100 \mu\text{M}$ produjo una inhibición en la respuesta a KCl 32 mM cercana al 70 %, mientras que el empleo de difenhidramina a $10 \mu\text{M}$ redujo la respuesta aproximadamente en un 10 %. Los resultados en nuestro modelo neuronal sensorial *in vitro* se corresponden con lo descrito en tres casos clínicos referidos por Pollack y Swindle en 1989, que refieren el empleo en la clínica de este fármaco como anestésico local en pacientes alérgicos a los bloqueantes de canales de sodio.

Con respecto a la amitriptilina, este fármaco se indica en la clínica como antidepresivo y para el tratamiento del dolor neuropático y de algunos cuadros de dolor nociceptivo (cefaleas tensionales y migrañas). Al igual que el resto de los antidepresivos tricíclicos, es un fármaco con

un mecanismo de acción multidiana, actuando como antagonista en receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, purinérgicos, glutamatérgicos y gabaérgicos, además de bloquear, al menos, canales de sodio y calcio dependientes de voltaje (Sawynok y cols., 1999; Rico-Villademoros y cols., 2015). Se ha descrito en la literatura que el efecto antinociceptivo de la amitriptilina se debe a su acción inhibitoria sobre canales de sodio y calcio dependientes de voltaje a la concentración de 10 μM , pero no a 1 μM (Song y cols., 2000; Wu y cols., 2012). Esto se corresponde con lo observado en el modelo experimental desarrollado en la presente tesis doctoral, donde en el modelo descrito la amitriptilina a una concentración de 10 μM produjo una inhibición del 50 % en la respuesta a KCl 32 mM mientras que a una concentración de 1 μM no mostró una inhibición significativa.

La clomipramina es también un antidepresivo tricíclico que se une a múltiples dianas: transportadores de monoaminas (como SERT, NET y DAT), receptores de serotonina, de adrenalina, de dopamina, etc. (Millan y cols., 2001). Se ha descrito su eficacia en el tratamiento del dolor neuropático atribuida a un efecto inhibitorio sobre la recaptación de monoaminas, especialmente serotonina y noradrenalina, en el sistema nervioso central (Ardid y cols., 1991; Pelissier y cols., 2001). En el modelo desarrollado en la presente tesis doctoral se observó que la clomipramina a 10 μM presenta actividad inhibitoria sobre la respuesta a KCl 32 mM, tras la exposición a la *sopa inflamatoria*, lo

cual se correspondería con el efecto antagonista de la clomipramina sobre los receptores de serotonina, mediador presente en la *sopa inflamatoria*.

La duloxetina es un fármaco inhibidor de la recaptación de noradrenalina y de serotonina (y con menor potencia de la recaptación de dopamina) aprobado para el tratamiento del dolor neuropático asociado a neuropatía diabética (Murai y cols., 2014; Kiso y cols., 2018) que también bloquea la entrada de calcio en las neuronas de DRG a través del receptor TrpM2 a una concentración de 10 μM (Demirdaş y cols., 2017). Nuestros resultados experimentales coinciden con lo descrito por Demirdaş y colaboradores en 2017, puesto que en la presente tesis doctoral la duloxetina a 10 μM bloqueó en más de un 60 % la entrada de calcio en las células F11 diferenciadas inducida por KCl 32 mM tras la exposición durante diez minutos a la *sopa inflamatoria*.

En la presente tesis doctoral se ha verificado que la fluoxetina a 10 μM reduce la respuesta de las células F11 al KCl. La fluoxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (Dharmshaktu y cols., 2012), su efecto antinociceptivo en cuadros de dolor neuropático se atribuye a su acción central; sin embargo, se ha observado que induce un efecto analgésico periférico en modelos *in vivo* de dolor inducido por formalina y por la ligadura del nervio espinal (véase

Introducción, págs. 125 y siguientes) (Sawynok, Esser y Reid, 1999; Cervantes-Durán y cols., 2013). En 2013, Cervantes-Durán y colaboradores han señalado que la fluoxetina produce un efecto analgésico en las neuronas de DRG debido a la activación de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{5A} por la serotonina; sin embargo, a dosis altas de fluoxetina *in vivo* este efecto analgésico se enmascara, puesto que la fluoxetina impide la recaptación de la serotonina procedente de la desgranulación de los mastocitos que activa los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ de serotonina (Cervantes-Durán y cols., 2013). Como continuación del estudio realizado en la presente tesis doctoral se podrían realizar cocultivos de células F11 diferenciadas y mastocitos a fin de incrementar la traslacionalidad del modelo desarrollado.

En cuanto a los fármacos que no redujeron la respuesta al KCl 32 mM, resulta destacable que la pregabalina no produjese una inhibición significativa de la señal puesto que este fármaco es uno de los tratamientos de elección para el dolor neuropático (Moore y cols., 2014; Finnerup y cols., 2015; Calandre y cols., 2016). El mecanismo de acción descrito para la pregabalina es el bloqueo de la entrada de cationes calcio al interior celular a través de canales dependientes de voltaje al unirse a la subunidad auxiliar $\alpha_2\delta$ -1 de los canales (Patel y Dickenson, 2016), cuya expresión se incrementa en cuadros de dolor neuropático (Chang y cols., 2015). La ausencia de inhibición de la

respuesta a KCl 32 mM por la pregabalina a concentraciones de 100 μ M y 10 μ M en el modelo desarrollado en la presente tesis doctoral podría deberse a que la diferenciación de la línea celular F11 no produce un incremento significativo en la transcripción de los genes que codifican la subunidad auxiliar $\alpha_2\delta$ -1 de los canales de calcio dependientes de voltaje (véase Resultados, **tabla 21**), y por tanto no existen dianas con este mecanismo en el modelo descrito, lo cual, como en el caso del receptor de capsaicina, hace necesario complementar este modelo con otros que expresen la subunidad $\alpha_2\delta$ -1 de los canales de calcio dependientes de voltaje.

La neurotoxina TTX no redujo la excitabilidad de la célula F11 diferenciada producida por KCl 32 mM tras una exposición de diez minutos a la *sopa inflamatoria*, ni a 100 nM, ni a 1 μ M. Al secuenciar el transcriptoma de las células F11 se observó que la expresión de los genes que codifican los canales de sodio dependientes de voltaje Nav1.5 y Nav1.8 se incrementa significativamente tras la diferenciación (véase Resultados, **tabla 16**). Ambos canales son resistentes a TTX, por lo que son necesarias altas concentraciones de la neurotoxina (superiores a 1 μ M) para bloquear su activación (Renganathan y cols., 2002; Weiser, 2006). Sin embargo, en las células F11 diferenciadas no se verificó un incremento en la expresión del canal de sodio sensible a TTX Nav1.7, responsable de la generación de los potenciales de acción para la transmisión de la señal nociceptiva en las neuronas sensoriales

primarias (Tamura y cols., 2014; Foadi, 2018) (véase Introducción, pág. 82).

La morfina no redujo la respuesta de las células F11 a KCl 32 mM tras una exposición de diez minutos a la *sopa inflamatoria* ni a concentración 10 μ M ni a 1 μ M. Estos resultados concuerdan con los de estudios previos en que se ha verificado la gran variabilidad en el efecto de la morfina según el tipo de neurona y la necesidad de concentraciones muy elevadas del fármaco (> 1 mM) para bloquear la transmisión de la señal dolorosa a lo largo de la neurona periférica (Mizuta y cols., 2012). La ausencia de reversión de la despolarización también se observó con el DADLE, agonista de receptores δ opioides con efecto sobre receptores μ , a concentraciones 1 μ M y 100 nM (Toll y cols., 1998). Pettinger y colaboradores en 2013 han descrito que, a pesar de que la exposición a la bradicinina (mediador presente en nuestra sopa inflamatoria) incrementa la expresión del receptor δ opioide en las neuronas de DRG, existe una gran variabilidad en cuanto al efecto del DADLE sobre la despolarización inducida por el KCl.

La dexametasona a concentraciones 1 μ M y 100 nM tampoco redujo la respuesta de la línea celular F11 diferenciada al KCl. La dexametasona es un glucocorticoide que bloquea la transmisión nerviosa cuando se administra de forma local en la fibra sensorial (Zorrilla-Vaca y Li, 2018). Como el resto de los corticosteroides, la

dexametasona ejerce su efecto a través de receptores intranucleares que producen cambios en la regulación de la expresión génica de varios genes que codifican proteínas con acción antiinflamatoria (Rupprecht y cols., 1993; Vandevyver y cols., 2013). De esta manera, el efecto de la dexametasona sobre las neuronas de DRG se manifiesta tras exposiciones al fármaco superiores a 24 horas (Johansson y cols., 1990; Ramesh y cols., 2015). Recientemente, Shaqura y colaboradores (2016) han postulado que los glucocorticoides podrían ejercer una acción inmediata a través de mecanismos que no implican la regulación de la expresión génica; sin embargo, en el estudio de Shaqura y colaboradores la dexametasona se administra por la vía intratecal en un modelo comportamental de dolor neuropático producido por una inyección de formalina, por lo que no se puede valorar hasta qué punto este efecto analgésico rápido de la dexametasona se podría deber a la acción del fármaco sobre las neuronas o sobre células del sistema inmunológico. Para comprobar si la dexametasona sería capaz de reducir la hiperexcitabilidad de las células F11 diferenciadas en el modelo desarrollado en la presente tesis doctoral, se podrían exponer durante más tiempo (por encima de 24 horas) las células al glucocorticoide, o bien desarrollar un cocultivo de las células F11 diferenciadas con células del sistema inmunológico.

Por lo tanto, la prueba de concepto llevada a cabo con esta batería de analgésicos permitió identificar cinco fármacos que reducen la

excitabilidad de la línea celular F11 al exponerla a KCl 32 mM. El mecanismo de acción de estos cinco fármacos se basa en el antagonismo del efecto de los mediadores de la *sopa inflamatoria*, si bien la duloxetina y la amitriptilina también bloquean canales de calcio dependientes de voltaje. Por el contrario, dos de los fármacos utilizados para el tratamiento del dolor neuropático (la pregabalina es el fármaco de primera elección en la clínica y la TTX se encuentra en ensayos clínicos), que se esperaba que fuesen activos, no inhibieron la respuesta de la línea celular F11 a KCl 32 mM debido a las características transcriptómicas particulares de las células F11 diferenciadas con respecto a las neuronas de DRG primarias. Otros tres fármacos (morfina, DADLE y dexametasona), tampoco fueron capaces de inhibir la respuesta de las células F11 diferenciadas al KCl, de acuerdo con los datos disponibles en la literatura acerca del uso en clínica humana de estas moléculas y con los estudios llevados a cabo en modelos animales de dolor neuropático.

Además de emplear una colección de fármacos con posible actividad analgésica, se llevó a cabo una validación del modelo mediante el cribado de la quimioteca Prestwick[®], que consiste en una librería de 1120 fármacos aprobados por la FDA y de los que se conoce su actividad terapéutica. Este cribado se planteó como una prueba de concepto para comprobar la idoneidad del modelo a la hora de detectar analgésicos activos en dolor neuropático causado por un daño en el

sistema nervioso periférico. Al realizar el cribado de la quimioteca, se obtuvieron cinco fármacos capaces de reducir significativamente la señal producida por el KCl tras diez minutos de exposición a la *sopa inflamatoria*.

Cuatro de los fármacos identificados como *hits* (nicardipino, nimodipino, nitrendipino y felodipino) son bloqueantes de canales de calcio pertenecientes a la familia de las dihidropiridinas e indicados en la clínica para el tratamiento de la hipertensión arterial (Coca y cols., 2013). Son bloqueantes de canales de calcio de tipo L, cuya expresión se incrementa al diferenciar la línea celular F11 (véase Resultados, **tabla 21**) (Xu y Lipscombe, 2001). En la presente tesis doctoral estos fármacos redujeron la respuesta a KCl 32 mM con un IC₅₀ de en torno a 2 μM. Estudios previos han descrito su eficacia para reducir la excitabilidad de las neuronas de DRG y para atenuar los comportamientos indicativos de dolor neuropático en modelos animales en un rango de concentraciones de entre 1 y 10 μM (Kusano y Gainer, 1993; Cárdenas y cols., 1997; Michaluk y cols., 1998; Ray y cols., 2008; Fossat y cols., 2010; Ambrosino y cols., 2013; Pan y cols., 2014). También se describió el efecto analgésico de las dihidropiridinas en tres modelos animales de dolor neuropático (constricción crónica del nervio periférico, ligadura del nervio dorsal y un modelo animal modificado genéticamente para sobreexpresar la subunidad $\alpha_2\delta$ -1 de los canales de calcio dependientes de voltaje). Dicho efecto se atribuye a que sus

dianas, los canales de calcio de tipo L, se sobreexpresan en cuadros de dolor neuropático y participan en la liberación de neurotransmisores en las terminaciones presinápticas de las neuronas de DRG en la médula espinal, que estimulan a las neuronas sensoriales de segundo orden (Chang y cols., 2015; Alles y cols., 2018).

El antidepresivo tricíclico protriptilina también redujo la excitabilidad de las células F11 diferenciadas en nuestros ensayos con un IC_{50} de $6,3 \mu M$. En estudios previos se ha descrito que la protriptilina es capaz de bloquear parcialmente la conducción en el nervio ciático con una eficacia inferior a la de otros antidepresivos tricíclicos (Sudoh y cols., 2003). Sin embargo, en este mismo estudio los autores apuntan que esta menor eficacia se puede deber más a aspectos farmacocinéticos que a las características farmacodinámicas de la protriptilina, puesto que la molécula penetra con dificultad a través de las membranas que envuelven el nervio (Sudoh y cols., 2003; Amir y cols., 2006).

En resumen, en este apartado se comprobó que el modelo automatizado desarrollado en la presente tesis doctoral permite identificar nuevos fármacos analgésicos en el tratamiento del dolor neuropático para la hiperexcitabilidad que acompaña a la inflamación de la neurona periférica. Por lo tanto, resulta adecuado para la

realización de ensayos de cribado de nuevos analgésicos en dolor neuropático.

6.5 SE DESARROLLÓ UN ENSAYO FENOTÍPICO DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL CRIBADO DE ANALGÉSICOS EN CÉLULAS F11 DIFERENCIADAS

El siguiente objetivo planteado fue el desarrollo de un ensayo basado en la imagen para evaluar el acortamiento de las neuritas producido por el daño neuronal de origen iatrogénico y para llevar a cabo ensayos de cribado de moléculas que protejan a las neuronas de la neurodegeneración inducida por fármacos.

Existen fármacos que, como reacción adversa, producen un daño neuronal que puede requerir una reducción de la dosis del fármaco, o incluso la suspensión del tratamiento (Han y Smith, 2013). Entre ellos, se cuentan algunos antitumorales y antirretrovirales que producen un daño neuronal que puede llegar a ser irreversible. El mecanismo por el que se produce este daño poco conocido; aunque se ha descrito que tanto los antitumorales como los antirretrovirales inducen la liberación de calcio desde el interior de la mitocondria y desde el retículo endoplasmático, y un incremento de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS). La elevación de los niveles de calcio intracelular induce la activación de la calpaína, que degrada proteínas estructurales (Vittecoq y cols., 2002; Flatters y Bennett, 2004; Joseph y

cols., 2004; Opii y cols., 2007; Robinson y cols., 2007; Jaggi y Singh, 2011; Han y Smith, 2013; Gornstein y Schwarz, 2014; Boateng y cols., 2015; Chen y cols., 2015; Fukuda y cols., 2017). Además, los antitumorales ejercen su acción en los microtúbulos, paralizando el transporte vesicular a lo largo de los axones de las neuronas (Theiss y Meller, 2000; Kidd y cols., 2002; Gornstein y Schwarz, 2014). Como consecuencia, estos tratamientos reducen la longitud de las neuritas, produciendo distintos grados de denervación en las manos y en los pies que cursan con dolor neuropático (neuropatía en *guante y calcetín*) (Han y Smith, 2013; Colloca y cols., 2017). En nuestro modelo se reprodujo este acortamiento en la longitud de las neuritas de las células F11 empleando dos antitumorales, el paclitaxel y la vincristina, y un antirretroviral, la rilpivirina. Asimismo, se confirmó que el ácido α -lipoico a una concentración de 10 μ M contrarresta el daño neuronal producido por los tres fármacos. El ácido α -lipoico es un compuesto con dos grupos sulfhidrilo que presenta actividad protectora *in vivo* frente a radicales libres y que actúa como cofactor en varias reacciones del metabolismo energético mitocondrial (Park y cols., 2014). En 2015, García-Alcalá y colaboradores han descrito su eficacia en cuadros de neuropatía diabética, y también se ha demostrado que el ácido α -lipoico puede resultar eficaz para el tratamiento de las neuropatías producidas por los taxanos (Gedlicka y cols., 2003). Actualmente se están realizando ensayos clínicos para valorar la eficacia y la seguridad del ácido α -lipoico en cuadros de neuropatía por antitumorales, si bien el

escaso número de pacientes incluidos y el alto número de sujetos que abandonan los ensayos clínicos antes de su conclusión impiden la inferencia de conclusiones robustas de estos estudios (Guo y cols., 2014; Desideri y cols., 2017).

Se comprobó que la pregabalina revierte de forma significativa el acortamiento de las neuritas producido tanto por la vincristina como por la rilpivirina. La pregabalina bloquea la entrada de calcio en la célula al unirse a la subunidad $\alpha_2\delta-1$ del canal (Patel y Dickenson, 2016). Previamente, en la presente tesis doctoral se había verificado que la pregabalina no inhibía la entrada de calcio en la célula producida por KCl 32 mM tras una exposición de diez minutos a la *sopa inflamatoria*. Este efecto era debido a que la diferenciación no inducía un incremento significativo en la transcripción del gen que codifica a la subunidad auxiliar $\alpha_2\delta-1$ del canal de calcio dependiente de voltaje. Sin embargo, el incremento en la concentración de calcio intracelular inducido por los antitumorales y los antirretrovirales se produce por la liberación del ion desde la mitocondria, esto sugiere que el efecto protector de la pregabalina frente al acortamiento de las neuritas podría deberse a la acción del fármaco en las dianas mitocondriales. Esto concordaría con lo observado a propósito de los *hits* obtenidos tras el cribado de la quimioteca Prestwick[®], puesto que los bloqueantes de canales de calcio felodipino y nitrendipino, que son los de menor masa molar ($M_{\text{felodipino}} = 384$ g/mol; $M_{\text{nitrendipino}} = 360$ g/mol; $M_{\text{nimodipino}} = 418$ g/mol; $M_{\text{nicardipino}} =$

479 g/mol), fueron las únicas dihidropiridinas capaces de revertir de modo significativo el acortamiento de las neuritas: el felodipino revirtió significativamente el acortamiento de las neuritas inducido por el paclitaxel y la vincristina, mientras que el nitrendipino revirtió de manera significativa el acortamiento inducido por la vincristina y la rilpivirina. Como continuación de este estudio, para caracterizar nuestro modelo experimental resultaría de interés un ensayo en que se cuantificase la concentración de calcio en el interior de la mitocondria empleando sondas fluorescentes en presencia de antitumorales, antirretrovirales y de pregabalina (Davidson y Duchon, 2009)

En resumen, en el presente apartado se desarrolló un modelo fenotípico para la búsqueda de fármacos que reviertan el daño neuronal iatrogénico producido por tratamientos antitumorales y antirretrovirales. Se podría plantear como un ensayo de cribado secundario que complementase el cribado de alto rendimiento de moléculas que contrarrestan la hiperexcitabilidad de las neuronas de DRG para buscar nuevos fármacos para el tratamiento del dolor neuropático, pero también como alternativa al ensayo primario en librerías químicas más pequeñas.

6.6 LOS ESTÍMULOS ALGOGÉNICOS INDUJERON CAMBIOS ESPECÍFICOS EN EL TRANSCRIPTOMA DE LAS CÉLULAS F11 DIFERENCIADAS

Un objetivo importante del presente trabajo fue el estudio de las variaciones en el transcriptoma de las células F11 al exponerlas durante tres días a una combinación de mediadores inflamatorios y al antirretroviral zalcitabina. Esto nos permitió conocer las proteínas y vías celulares funcionales en el modelo desarrollado con células con fenotipo de neurona sensorial primaria.

La exposición de las células F11 diferenciadas a la *sopa inflamatoria* motivó la transcripción de genes implicados en la reparación o en la degradación del ADN dañado. Se comprobó que la exposición a la *sopa inflamatoria* producía un incremento en la transcripción del gen murino *Dnase1l2*, que codifica a una desoxirribonucleasa cuya expresión se induce por mediadores inflamatorios (Shiokawa y cols., 2004), así como del gen *Mutyh* de rata, que codifica a una glicosilasa responsable de la degradación de 7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanosina, producto de la oxidación del ADN por especies reactivas de oxígeno (David y cols., 2007). Por el contrario, se observó que la exposición a la *sopa inflamatoria* reduce la transcripción de los genes que codifican a los factores de crecimiento insulínico tipo 1 y tipo 2 (IGF-1 e IGF-2) (genes *Igf1* e *Igf2*, respectivamente), tanto de rata como de ratón.

En la bibliografía se ha descrito que los dos factores de crecimiento mencionados anteriormente protegen a las neuronas de la muerte celular inducida por citocinas (Suh y cols., 2013). En cuanto a la repercusión de la exposición a la *sopa inflamatoria* en las vías de señalización celular, se detectó un descenso en la expresión de genes que codifican proteínas que participan en vías de señalización mediadas por los factores de crecimiento insulínico, como la inducción de fibrosis hepática.

También se verificó un descenso en la expresión de genes que codifican proteínas que participan en vías de señalización mediadas por el citoesqueleto, como la vía de señalización mediada por la cinasa ligada a las integrinas (ILK) o las vías que guían la formación de axones. De esta manera, la exposición durante 72 horas a mediadores inflamatorios parece inducir un daño en el ADN celular que puede comprometer la supervivencia de las células F11 diferenciadas. Estos resultados se corresponden con lo observado en los experimentos de puesta a punto para medir la viabilidad celular, donde se observó que la exposición a la *sopa inflamatoria* durante más de 72 horas compromete seriamente la viabilidad celular. Los datos transcriptómicos demuestran que el daño génico se anticipa y es la causa de la muerte celular.

La exposición al antirretroviral zalcitabina 1 μ M indujo un incremento en la transcripción de genes que participan en la defensa

celular frente a agresiones externas como *Nqo1* (murino y de rata), que codifica al enzima NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1, implicado en la desintoxicación celular por su capacidad antioxidante (Ross y cols., 2000), así como el gen que codifica a la glutatión-S-transferasa 1 (*Gsta1*) de rata, y genes que codifican aldocetorreductasas (*Akr1b7* de ratón y *Akr1b10* de rata). Todos estos enzimas están implicados en la inactivación de sustancias tóxicas de origen exógeno (Penning, 2015; Singhal y cols., 2015). Además, se incrementó la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras encargadas de retirar cationes calcio del citoplasma celular como *Atp2a3*. Maratou y colaboradores (2009) han comprobado que la exposición de neuronas de DRG primarias de rata a zalcitabina y a la proteína del virus del SIDA gp120 incrementa la expresión de estos transportadores a corto plazo. La relación entre el dolor neuropático, el incremento de la concentración de calcio intracelular y el estrés oxidativo ha sido descrito en diferentes modelos animales de dolor neuropático (Kasznicki y cols., 2012; Amin y cols., 2014; Pathak y cols., 2014). Por el contrario, la exposición a zalcitabina induce una represión en la expresión del gen *Igf2* (murino y de rata), que codifica el factor de crecimiento IGF-2 y de genes que codifican neurogeninas (*Neurog2* de ratón y *Neurod6* de rata), proteínas implicadas en la diferenciación neuronal (Dai y cols., 2015). Esta represión de genes implicados en la diferenciación neuronal se corresponde con las observaciones del anterior apartado de la presente tesis doctoral, donde se comprobó que la exposición a un antirretroviral

reduce la longitud de las neuritas en la línea celular F11 diferenciada, lo cual se relaciona con una pérdida del fenotipo neuronal. También se observó un descenso en la expresión del gen que codifica a la proteína represora de tiorredoxina (*Txnip*), tanto murino como de rata. La tiorredoxina participa en la defensa de la célula frente a estrés oxidativo y, en condiciones normales, se encuentra unida a la proteína represora (que pertenece a la familia de las α -arrestinas); cuando la tiorredoxina se libera de la proteína represora, ejerce una función antioxidante porque presenta en su estructura grupos sulfhidrilo (Mahmood y cols., 2013).

Estas observaciones se correspondieron con las variaciones en la expresión génica sobre las vías de señalización, donde se observó una represión en los genes que codifican proteínas participantes en las vías en que se emplean agentes reductores para obtener energía, puesto que en las células F11 diferenciadas expuestas a zalcitabina estos cofactores intervendrían en la desintoxicación celular y la defensa frente al estrés oxidativo. Del mismo modo, en el análisis de componentes principales se observó que la expresión de genes que codifican a la aldocetorreductasa B8 de la familia 1 de rata (*Akr1b8*) y la proteína represora de tiorredoxina (*Txnip*) (tanto murina como de rata) permiten discriminar entre la línea celular F11 diferenciada y la línea celular F11 diferenciada expuesta a zalcitabina.

Por lo tanto, en el presente apartado se demostró que la exposición de la línea celular F11 diferenciada a la *sopa inflamatoria* y a la zalcitabina induce cambios en el transcriptoma de las células F11 diferenciadas. En el primer caso, estos cambios se relacionan con un daño en el material genético de la célula y en el citoesqueleto. Tras la exposición a zalcitabina, los cambios se corresponden con un incremento del estrés oxidativo y de la regulación de la concentración de calcio intracelular. Ambas observaciones se corresponden con nuestros resultados y son coherentes con la bibliografía referida a los cuadros clínicos y a los modelos animales de dolor neuropático de origen inflamatorio e iatrogénico.

En conclusión, en la presente tesis doctoral se desarrolló un nuevo modelo experimental y dos ensayos miniaturizados y automatizables para la búsqueda de nuevos fármacos en el tratamiento del dolor neuropático. El modelo se basa en el empleo de neuronas inmortalizadas de ganglio de raíz dorsal diferenciadas y los dos ensayos automatizados para el cribado de alto rendimiento fueron validados en dicho modelo neuronal y permiten la medida de la hiperexcitabilidad y del daño neuronal iatrogénico, en relación con el dolor neuropático.



Conclusiones



7. Conclusiones

1. Se desarrolló un modelo de neuronas sensoriales de ganglio de la raíz dorsal (DRG) a partir de la línea celular F11 inmortalizada diferenciada con dibutiril-AMP_c y forskolina, atendiendo a la expresión de un marcador neuronal (el receptor TrkA) y a la longitud global de las neuritas.
2. La medida de la concentración intracelular de calcio permitió la obtención de una amplia ventana de respuesta a los estímulos algogénicos, que permite su aplicación al cribado de alto rendimiento.
3. La diferenciación con forskolina y dibutiril-AMP_c confirió a las células F11 excitabilidad frente a la despolarización de la membrana plasmática inducida por el cloruro potásico, aunque la diferenciación no influye en la respuesta de las células al ATP. Se confirmó que la adquisición de la excitabilidad viene determinada por la transcripción de genes que codifican canales de sodio y calcio dependientes de voltaje.

4. La diferenciación celular incrementó la transcripción de genes que codifican proteínas neuronales (como *Epha3* o *Shc2*) y, por el contrario, se observó una disminución en la expresión de genes que codifican histonas, proteínas relacionadas con la replicación del material genético y la proliferación celular.
5. Se puso a punto un ensayo primario bioquímico de cribado de alto rendimiento en placa de 384 pocillos en el modelo desarrollado, en relación con la hiperexcitabilidad en el *lecho doloroso* inflamatorio.
6. La exposición aguda a una solución alrogénica de mediadores inflamatorios (*sopa inflamatoria*) potenció la respuesta de las células al agente despolarizante cloruro potásico. La exposición crónica a la *sopa inflamatoria* durante 72 horas incrementó la expresión de genes que codifican proteínas reguladoras relacionadas con la reparación y degradación del ADN dañado (como *Dnase1l2*); asimismo, la exposición a la *sopa inflamatoria* durante 72 horas redujo la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la señalización mediada por el citoesqueleto como las de la vía de inducción de fibrosis hepática.

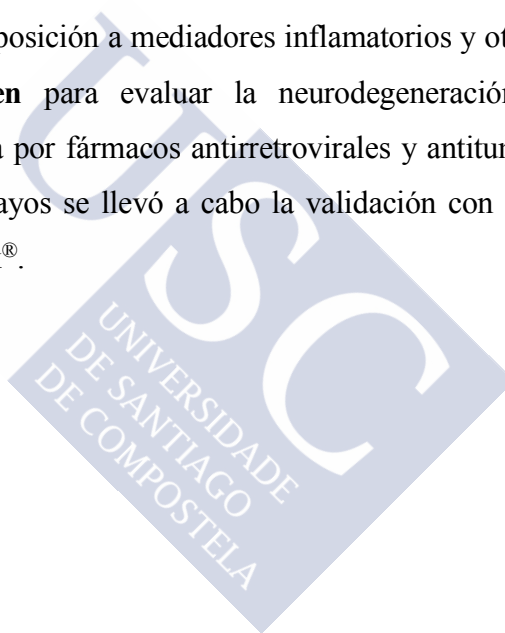
7. Cuatro fármacos analgésicos empleados en el tratamiento del dolor neuropático: difenhidramina, duloxetina, amitriptilina y clomipramina, redujeron de manera significativa la hiperexcitabilidad en las células F11 diferenciadas usando como estímulo algogénico el cloruro potásico previa exposición a la *sopa inflamatoria*. La difenhidramina redujo significativamente la excitabilidad de las células F11 a las concentraciones de 100 μM ($p < 0,001$) y 10 μM ($p < 0,01$); la duloxetina la redujo a las concentraciones 10 μM ($p < 0,001$) y 1 μM ($p < 0,01$); la amitriptilina, a la concentración 10 μM ($p < 0,01$), y la clomipramina, a 10 μM ($p < 0,001$). Esto apoya la validación del ensayo para el cribado de fármacos analgésicos para el dolor neuropático.
8. Se observó también un efecto inhibitorio con la fluoxetina 10 μM ($p < 0,001$), aunque el fármaco no está indicado para el tratamiento del dolor neuropático, porque, aunque el efecto analgésico está descrito *in vitro*, queda enmascarado *in vivo* en su administración sistémica al favorecer la acción proalgésica de la serotonina procedente de la desgranulación de las células del sistema inmunológico.

9. El estudio de la regulación génica en respuesta a la diferenciación, a la exposición a los alógenos y a la acción de los fármacos ha permitido validar y explicar los resultados de los ensayos realizados: a) la pregabalina, fármaco indicado para el tratamiento del dolor neuropático, no ejerció un efecto inhibitorio sobre la respuesta de las células F11 al cloruro potásico debido a la escasa expresión del gen que codifica la subunidad $\alpha_2\delta$ -1 del canal de calcio dependiente de voltaje en las células F11 diferenciadas; b) la TTX no indujo un efecto inhibitorio sobre la respuesta de las células F11 al cloruro potásico debido a que los canales de sodio dependientes de voltaje codificados por los genes que se expresan tras la diferenciación neuronal son resistentes a TTX, y c) las células F11 no responden a capsaicina debido a que no expresan el receptor TrpV1, diana sobre la que actúa este compuesto de origen natural, lo cual se ha confirmado mediante Western *blot*.
10. La morfina, el DADLE y la dexametasona no afectaron al efecto despolarizante del cloruro potásico sobre la membrana plasmática de células F11 diferenciadas, de acuerdo con las evidencias bibliográficas para estos fármacos en modelos animales de dolor neuropático y para la clínica humana.

11. La campaña de cribado de la quimioteca Prestwick® para la validación del ensayo de hiperexcitabilidad permitió identificar cinco *hits*, bloqueantes de canales de calcio, que redujeron la respuesta de las células F11 diferenciadas al cloruro potásico previa exposición a la *sopa inflamatoria*, con unos IC₅₀ entre 1 μM y 7 μM. Para estos cinco fármacos existen evidencias bibliográficas que indican su posible utilidad terapéutica en cuadros de dolor neuropático.
12. Se puso a punto un ensayo secundario de cribado de alto rendimiento en placas de 96 pocillos basado en la imagen, en relación con el acortamiento iatrogénico de neuritas en nuestro el modelo celular diferenciado.
13. El paclitaxel 1 μM, la vincristina 1 nM (fármacos antitumorales) y la rilpivirina 100 nM (fármaco antirretroviral) redujeron la longitud de las neuritas de las células F11 diferenciadas. En los tres casos, el ácido α-lipoico 10 μM revirtió significativamente el acortamiento neuronal producido por los tres fármacos ($p < 0,01$ para paclitaxel 1 μM y $p < 0,001$ para vincristina 1 nM y rilpivirina 100 nM).

14. La pregabalina 100 μM evidenció un efecto neuroprotector sobre la degeneración neuronal producida por vincristina 1 nM y rilpivirina 100 nM ($p < 0,01$), en contraste con el ensayo bioquímico de hiperexcitabilidad, lo que requiere un estudio posterior para verificar la existencia de dianas mitocondriales para la pregabalina. Además, el felodipino 10 μM contrarrestó el acortamiento de las neuritas inducido por vincristina 1 nM y paclitaxel 1 μM ($p < 0,01$), y el nicardipino 10 μM protegió a las células F11 diferenciadas frente al acortamiento de las neuritas producido por vincristina 1 nM ($p < 0,001$) y rilpivirina 100 nM ($p < 0,01$).
15. La exposición crónica (72 horas) al antirretroviral zalcitabina (ddC) 1 μM indujo un estrés oxidativo evidenciado en un incremento de la expresión de genes relacionados con la defensa celular frente a especies activas de oxígeno (como *Nqo1*) y frente al incremento en la concentración de calcio en el citoplasma celular, y un descenso en la expresión de genes relacionados con las rutas metabólicas que emplean agentes reductores para obtener energía.

16. En resumen, en la presente tesis doctoral se desarrolló **un nuevo modelo de neurona sensorial primaria** basado en la línea celular F11 diferenciada; este modelo se caracterizó con estudios bioquímicos, transcriptómicos y funcionales, y con él se pusieron a punto dos ensayos de cribado de alto rendimiento de fármacos analgésicos para dolor neuropático: un **ensayo bioquímico basado en la hiperexcitabilidad** de las neuronas tras la exposición a mediadores inflamatorios y otro **basado en la imagen** para evaluar la neurodegeneración iatrogénica producida por fármacos antirretrovirales y antitumorales). Con estos ensayos se llevó a cabo la validación con la quimioteca Prestwick®.







Bibliografía



8. Bibliografía

- Ai, X., MacPhedran, S. E. & Hall, A. K. (1998) *Depolarization stimulates initial calcitonin gene-related peptide expression by embryonic sensory neurons in vitro*, *The Journal of Neuroscience*, 18(22), pp. 9294–9302.
- Aiyer, R. *et al.* (2018) *A systematic review of NMDA receptor antagonists for treatment of neuropathic pain in clinical practice*, *The Clinical Journal of Pain*, 34(5), pp. 450–67.
- Akopian, A. N., Sivilotti, L. & Wood, J. N. (1996) *A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons*, *Nature*, 379, pp. 257–62.
- Allen, A. R. (1911) *Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation. A preliminary report*, *JAMA*, 57, pp. 878–80.
- Alles, S. R. A. & Smith, P. A. (2018) *Etiology and pharmacology of neuropathic pain*, *Pharmacological Reviews*, 70(2), pp. 315–347.
- Alles, S. R. *et al.* (2018) *Peripheral nerve injury increases contribution of L-type calcium channels to synaptic transmission in spinal lamina II: Role of $\alpha\delta$ -1 subunits*, *Molecular Pain*, 14, 174480691876580.
- Almeida, T. F., Roizenblatt, S. & Tufik, S. (2004) *Afferent pain pathways: A neuroanatomical review*, *Brain Research*, 1000(1–2), pp. 40–56.
- Amaya, F. *et al.* (2004) *NGF and GDNF differentially regulate TrpV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia*, *The European Journal of Neuroscience*, 20(9), pp. 2303–10.
- Ambrosino, P. *et al.* (2013) *Activation and desensitization of TrpV1 channels in sensory neurons by the PPAR α agonist palmitoylethanolamide*, *British Journal of Pharmacology*, 168(6), pp. 1430–44.
- Ambrosino, P. *et al.* (2014) *Functional and biochemical interaction between PPAR α receptors and TrpV1 channels: Potential role in PPAR α agonists-mediated analgesia*, *Pharmacological Research*, 87, pp. 113–22.
- Amin, B. *et al.* (2014) *Ceftriaxone, a β -lactam antibiotic, modulates apoptosis pathways and oxidative stress in a rat model of neuropathic pain*, *BioMed Research International*, 2014, 937568.

- Amir, R. *et al.* (2006) *The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain*, *The Journal of Pain*, 7(5 Suppl 3), pp. S1–29.
- Araque, A., Clarac, F. & Buno, W. (1994) *P-type Ca²⁺ channels mediate excitatory and inhibitory synaptic transmitter release in crayfish muscle*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp. 4224–28.
- Ardid, D., Eschalier, A. & Lavarenne, J. (1991) *Evidence for a central but not a peripheral analgesic effect of clomipramine in rats*, *Pain*, 45, pp. 95–100.
- Attal, N. & Bouhassira, D. (2015) *Pharmacotherapy of neuropathic pain: Which drugs, which treatment algorithms?*, *Pain*, 156(4), pp. S104–14.
- Augustine, G. J. (2015) *Canales iónicos y transportadores*. 5^o edition. D. Purves *et al* (ed). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Ayar, A. *et al.* (2015) *Spinorphin inhibits membrane depolarization- and capsaicin-induced intracellular calcium signals in rat primary nociceptive dorsal root ganglion neurons in culture*, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), pp. 550–58.
- Backonja, M. *et al.* (2017) *Safety and efficacy of neublazin in painful lumbosacral radiculopathy: A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 2 trial using Bayesian adaptive design (the SPRINT trial)*, *Pain*, 158(9), pp. 1802–12.
- Bain, G. *et al.* (1996) *Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223(3), pp. 691–94.
- Bannister, K. *et al.* (2015) *Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury: Restoring an imbalance between descending monoamine inhibitions and facilitations*, *Pain*, 156(9), pp. 1803–11.
- Bannister, K., Bee, L. A. & Dickenson, A. H. (2009) *Preclinical and early clinical investigations related to monoaminergic pain modulation*, *Neurotherapeutics*, 6(4), pp. 703–12.
- Baron, R. *et al.* (2017) *Peripheral neuropathic pain: A mechanism-related organizing principle based on sensory profiles*, *Pain*, 158(2), pp. 261–72.
- Basbaum, A. I. *et al.* (2009) *Cellular and molecular mechanisms of pain*, *Cell*, 139(2), pp. 267–84.
- Bausbaum, A. I. & Jessell, T. M. (2001) *La percepción del dolor*, in Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (eds) *Principios de Neurociencia*. 4^o edición. Madrid: McGraw-Hill Iberoamericana, pp. 472–91.

- Baxter, D. F. *et al.* (2002) *A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels*, *Journal of Biomolecular Screening*, 7(1), pp. 79–85.
- Bedut, S. *et al.* (2016) *High-throughput drug profiling with voltage and calcium-sensitive fluorescent probes in human iPSC-derived cardiomyocytes*, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 311(1), pp. H44–53.
- Benarroch, E. E. (2013) *HCN channels: Function and clinical implications*, *Neurology*, 80(3), pp. 304–10.
- Bennett, G. J. & Xie, Y. K. (1988) *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man*, *Pain*, 33(1), pp. 87–107.
- Bhalla, S. *et al.* (2013) *Potentiation of oxycodone antinociception in mice by agmatine and BMS182874 via an imidazoline I2 receptor-mediated mechanism*, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), pp. 550–60.
- Bi, J. *et al.* (2006) *Axonal mRNA transport and localized translational regulation of kappa-opioid receptor in primary neurons of dorsal root ganglia*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), pp. 19919–24.
- Black, J. A. *et al.* (1999) *Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons*, *Journal of Neurophysiology*, 82(5), pp. 2776–85.
- Blair, N. T. & Bean, B. P. (2002) *Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons*, *The Journal of Neuroscience*, 22(23), pp. 10277–90.
- Boateng, E. K. *et al.* (2015) *Heterogeneous responses of dorsal root ganglion neurons in neuropathies induced by peripheral nerve trauma and the antiretroviral drug stavudine*, *European Journal of Pain*, 19(2), pp. 236–45.
- Bogen, O. *et al.* (2012) *Generation of a pain memory in the primary afferent nociceptor triggered by PKC ϵ activation of CPEB*, *The Journal of Neuroscience*, 32(6), pp. 2018–26.
- Boisvert, E. M. *et al.* (2015) *The Specification and Maturation of Nociceptive Neurons from Human Embryonic Stem Cells*, *Scientific Reports*, 5, 16821.
- Borsani, E. *et al.* (2013) *Endothelial nitric oxide synthase in dorsal root ganglia during chronic inflammatory nociception*, *Cells Tissues Organs*, 197(2), pp. 159–68.
- Bouhassira, Di. & Attal, N. (2018) *Emerging therapies for neuropathic pain: new molecules or new indications for old treatments?*, *Pain*, 159(3), pp. 576–82.
- Bourinet, E. *et al.* (2014) *Calcium-permeable ion channels in pain signaling*, *Physiological Reviews*, 94(1), pp. 81–140.

- Bradbury, E. J., Burnstock, G. & McMahon, S. B. (1998) *The expression of P2X₃ purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor*, *Molecular and Cellular Neurosciences*, 12(4–5), pp. 256–68.
- Brini, M. *et al.* (2014) *Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), pp. 2787–2814.
- Brown, S. *et al.* (2013) *NGX-4010, a capsaicin 8% patch, for the treatment of painful HIV-associated distal sensory polyneuropathy: Integrated analysis of two phase III, randomized, controlled trials*, *AIDS Research and Therapy*, 10, 5.
- Bruehl, S. (2015) *Complex regional pain syndrome*, *British Medical Journal*, 351, h2730.
- Bullock, C. M. *et al.* (2014) *Peripheral calcitonin gene-related peptide receptor activation and mechanical sensitization of the joint in rat models of osteoarthritis pain*, *Arthritis and Rheumatology*, 66(8), pp. 2188–2200.
- Burnstock, G. (2013) *Purinergic signalling: Pathophysiology and therapeutic potential*, *Keio Journal of Medicine*, 62(3), pp. 63–73.
- Busserolles, J. *et al.* (2016) *Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas*, *Pain*, 157(2), pp. S7–14.
- Calandre, E. P., Rico-Villademoros, F. & Slim, M. (2016) *Alpha2delta ligands, gabapentin, pregabalin and mirogabalin: a review of their clinical pharmacology and therapeutic use*, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 16(11), pp. 1263–77.
- Cardenas, C. G., Del Mar, L. P. & Scroggs, R. S. (1997) *Two parallel signaling pathways couple 5HT_{1A} receptors to N- and L-type calcium channels in C-like rat dorsal root ganglion cells*, *Journal of Neurophysiology*, 77(6), pp. 3284–96.
- Carlton, S. M. *et al.* (1994) *Behavioral manifestations of an experimental model for peripheral neuropathy produced by spinal nerve ligation in the primate*, *Pain*, 56, pp. 155–66.
- Caterina, M. J. *et al.* (1997) *The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway*, *Nature*, 389, pp. 816–24.
- Catterall, W. A. (2011) *Voltage-gated calcium channels*, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947.
- Catterall, W. A. (2014) *Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution*, *Experimental Physiology*, 99(1), pp. 35–51.
- Cervantes-Durán, C., Rocha-González, H. I. & Granados-Soto, V. (2013) *Peripheral and spinal 5-HT receptors participate in the pronociceptive and antinociceptive effects of fluoxetine in rats*, *Neuroscience*, 252, pp. 396–409.

- Chacur, M. *et al.* (2001) *A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): Induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral perisciatic immune activation in rats*, *Pain*, 94(3), pp. 231–44.
- Chang, D. S. *et al.* (2016) *Anti-nerve growth factor in pain management: current evidence*, *Journal of Pain Research*, 9, pp. 373–83.
- Chang, E. *et al.* (2015) *Differential effects of voltage-gated calcium channel blockers on calcium channel alpha-2-delta-1 subunit protein mediated nociception*, *European Journal of Pain*, 19(5), pp. 639–48.
- Chapman, C. R. *et al.* (1985) *Pain measurement: An overview*, *Pain*, 22(1), pp. 1–31.
- Chen, K. *et al.* (2015) *Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TrpV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord*, *Journal of the Neurological Sciences*, 352(1–2), pp. 62–67.
- Chen, L. *et al.* (2016) *Differential expression of ATP-gated P2X receptors in DRG between chronic neuropathic pain and visceralgia rat models*, *Purinergic Signalling*, 12(1), pp. 79–87.
- Chen, L.-H. *et al.* (2015) *Integrating image-based high-content screening with mouse models identifies 5-hydroxydecanoate as a neuroprotective drug for paclitaxel-induced neuropathy*, *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(10), pp. 2206–14.
- Chen, W. *et al.* (2007) *Immortalization and characterization of a nociceptive dorsal root ganglion sensory neuronal line*, *Journal of the Peripheral Nervous System*, 12(2), pp. 121–30.
- Chen, Y., Lun, A. T. L. & Smyth, G. K. (2017) *From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline*, *F1000Research*, 5, 1438.
- Chiang, H. Y. *et al.* (2005) *Skin denervation, neuropathology, and neuropathic pain in a laser-induced focal neuropathy*, *Neurobiology of Disease*, 18(1), pp. 40–53.
- Chien, L.-Y. *et al.* (2007) *Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity*, *The Journal of Neuroscience*, 27(37), pp. 9855–65.
- Cho, H. *et al.* (2012) *The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons*, *Nature Neuroscience*, 15(7), pp. 1015–21.
- Cho, J. H. *et al.* (2001) *Overexpression of BETA2/NeuroD induces neurite outgrowth in F11 neuroblastoma cells*, *Journal of Neurochemistry*, 77(1), pp. 103–9.
- Chopra, K. & Tiwari, V. (2012) *Alcoholic neuropathy: Possible mechanisms and future treatment possibilities*, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 73(3), pp. 348–62.

- Ciruela, F., Fernández-Dueñas, V. & Jacobson, K. A. (2015) *Lighting up G protein-coupled purinergic receptors with engineered fluorescent ligands*, *Neuropharmacology*, 98, pp. 58–67.
- Coca, A. *et al.* (2013) *Role of dihydropyridinic calcium channel blockers in the management of hypertension*, *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 11(1), pp. 91–105.
- Cohen, S. P. & Mao, J. (2014) *Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications*, *British Medical Journal*, 348, f7656.
- Cohen, M.; Quintner, J. & van Rysewyk, S. (2018) *Reconsidering the international association for the study of pain definition of pain*. *PAIN Reports*, 3, e634.
- Collins, S. *et al.* (2010) *NMDA Receptor Antagonists for the Treatment of Neuropathic Pain*, *Pain Medicine*, 11, pp. 1726–42.
- Collins, S. L., Moore, R. A. & McQuay, H. J. (1997) *The visual analog pain intensity scale: What is moderate pain in millimeters?*, *Pain*, 72(1–2), pp. 95–97.
- Colloca, L. *et al.* (2017) *Neuropathic pain*, *Nature reviews. Disease Primers*, 3, 17002.
- Coste, B. *et al.* (2004) *Gating and modulation of presumptive Nav1.9 channels in enteric and spinal sensory neurons*, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), pp. 123–34.
- Coste, B., Crest, M. & Delmas, P. (2007) *Pharmacological dissection and distribution of Na_v1.9, T-type Ca²⁺ currents, and mechanically activated cation currents in different populations of DRG neurons*, *The Journal of General Physiology*, 129(1), pp. 57–77.
- Costigan, M., Scholz, J. & Woolf, C. J. (2009) *Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage*, *Annual Reviews in Neuroscience*, (32), pp. 1–32.
- Cousins, M. J. *et al.* (2013) *The safety and efficacy of KAI-1678- an inhibitor of epsilon protein kinase C (εPKC)-versus lidocaine and placebo for the treatment of postherpetic neuralgia: A crossover study design*, *Pain Medicine*, 14(4), pp. 533–40.
- Coutaux, A. *et al.* (2005) *Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms*, *Joint Bone Spine*, 72(5), pp. 359–71.
- Cummings, T. R., Sheets, P. L. & Waxman, S. G. (2007) *The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain*, *Pain*, 131(3), pp. 245–57.
- Dai, X. L. *et al.* (2015) *Neurogenin 2 enhances the neuronal differentiation of skin-derived precursors*, *International Journal of Neuroscience*, 125(5), pp. 367–74.

- David, S. S., Shea, V. L. O. & Kundu, S. (2007) *Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage*, *Nature*, 447(7147), pp. 941–50.
- Davidson, S. M. & Duchen, M. R. (2009) *imaging mitochondrial calcium signalling with fluorescent probes and single or two photon confocal microscopy*, in Palmeira, C. and Moreno, A. (eds) *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, pp. 219–34.
- Davis, M. P. (2015) *Sigma-1 receptors and animal studies centered on pain and analgesia*, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(8), pp. 885–900.
- Decosterd, I. & Woolf, C. J. (2000) *Spared nerve injury: An animal model of persistent peripheral neuropathic pain*, *Pain*, 87, pp. 149–58.
- DeLeo, J. A. et al. (1994) *Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat*, *Pain*, 56(1), pp. 9–16.
- Demirdaş, A., Nazıroğlu, M. & Övey, İ. S. (2017) *Duloxetine reduces oxidative stress, apoptosis, and Ca²⁺ entry through modulation of TrpM2 and Trpv1 channels in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats*, *Molecular Neurobiology*, 54(6), pp. 4683–95.
- Derry, S. et al. (2016) *Topical lidocaine for neuropathic pain in adults*, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7, CD010958.
- Desideri, I. et al. *Use of an alpha lipoic, methylsulfonylmethane and bromelain dietary supplement (Opera®) for chemotherapy-induced peripheral neuropathy management, a prospective study*. *Medical Oncology*, 34(3), 46.
- Deuis, J. R. et al. (2017) *The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators*, *Neuropharmacology*, 127, pp. 87–108.
- Dev, R. et al. (2010) *Therapeutic potential of matrix metalloprotease inhibitors in neuropathic pain*, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(4), pp. 455–68.
- Dharmshaktu, P., Tayal, V. & Kalra, B. S. (2012) *Efficacy of antidepressants as analgesics: A review*, *The Journal of Clinical Pharmacology*, 52(1), pp. 6–17.
- Dib-Hajj, S. D. et al. (2010) *Sodium channels in normal and pathological pain*, *Annual Review of Neuroscience*, 33(1), pp. 325–47.
- Dickenson, A. H. (1995) *Spinal cord pharmacology of pain*, *British Journal of Anaesthesia*, 75(2), pp. 193–200.
- Dinakar, P. & Stillman, A. M. (2016) *Pathogenesis of pain*, *Seminars in Pediatric Neurology*, 23(3), pp. 201–8.
- Dolphin, A. C. (2016) *Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology*, *Journal of Physiology*, 594(19), pp. 5369–90.

- Doran, C. *et al.* (2015) *Mouse DRG cell line with properties of nociceptors*, *Plos One*, 10(6), e0128670.
- Dowdall, T., Robinson, I. & Meert, T. F. (2005) *Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury*, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 80(1), pp. 93–108.
- Du, X. *et al.* (2014) *Control of somatic membrane potential in nociceptive neurons and its implications for peripheral nociceptive transmission*, *Pain*, 155(11), pp. 2306–22.
- Du, X. *et al.* (2017) *Local GABAergic signaling within sensory ganglia controls peripheral nociceptive transmission*, *Journal of Clinical Investigation*, 127(5), pp. 1741–56.
- Dubin, A. E. & Patapoutian, A. (2010) *Nociceptors: The sensors of the pain pathway*, *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), pp. 3760–72.
- Dunn, P. M. *et al.* (1991) *Bradykinin evoked depolarization of a novel neuroblastoma x DRG neurone hybrid cell line (ND7/23)*, *Brain Research*, 545(1–2), pp. 80–86.
- Dworkin, R. H. *et al.* (2013) *Interventional management of neuropathic pain: NeuPSIG Recommendations*, *Pain*, 154(11), pp. 2249–61.
- Ed, M., Midbari, A. & Eisenberg, E. (2015) *Opioids for neuropathic pain*, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8), CD006146.
- Eliav, E. *et al.* (1999) *Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve*, *Pain*, 83(2), pp. 169–82.
- Emery, E. C. *et al.* (2011) *HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain*, *Science*, 333(6048), p. 1462–66.
- Enna, S. J. (2014) *Phenotypic drug screening*, *Journal of Peripheral Nervous System*, 19, pp. S2–9.
- Epps, D. E., Wolfe, M. L. & Groppi, V. (1994) *Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1, 3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (Dibac₄(3)) in model systems and cells*, *Chemistry and Physics of Lipids*, 69(2), pp. 137–50.
- Erkekoglu, P. & Baydar, T. (2014) *Acrylamide neurotoxicity*, *Nutritional Neuroscience*, 17(2), pp. 49–57.
- Fabregat, G. *et al.* (2013) *Subcutaneous and perineural botulinum toxin type A for neuropathic pain*, *The Clinical Journal of Pain*, 29(11), pp. 1006–12.
- Fan, S. F. *et al.* (1992) *F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells express inhibitory μ - and δ -opioid receptors which increase voltage-dependent K^+ currents upon activation*, *Brain Research*, 590, pp. 329–33.

- Fang, D. *et al.* (2015) *Interleukin-6-mediated functional upregulation of TrpV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model*, *Pain*, 156(6), pp. 1124–44.
- Fang, Y. (2010) *Live cell optical sensing for high throughput applications*, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 118, pp. 153–63.
- Fang, Y. (2014) *Label-free drug discovery*, *Frontiers in Pharmacology*, 17(7), pp. 566–78.
- Fang, Y. *et al.* (2007) *Dynamic mass redistribution: a novel physiological signal of cells for cell systems biology and pharmacology*, *Journal of Pharmacologic and Toxicologic Methods*, 55(3), pp. 314–22.
- Fang, Z. *et al.* (2010) *R-type calcium channel isoform in rat dorsal root ganglion neurons*, *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 14(1), p. 45.
- Fattori, V. *et al.* (2016) *Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses*, *Molecules*, 21(7), p. 844.
- Finnerup, N. B. *et al.* (2016) *Neuropathic pain: Updated grading system for research and clinical practice*, *Pain*, 157(8), pp. 1599–1606.
- Finnerup, N. *et al.* (2015) *Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis*, *Lancet Neurology*, 14(2), pp. 162–73.
- Fioravanti, B. *et al.* (2008) *Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TrpV1: Antinociceptive actions of CB1 inverse agonists*, *The Journal of Neuroscience*, 28(45), pp. 11593–602.
- Fischer, M. J. M., Mak, S. W. Y. & Mcnaughton, P. A. (2010) *Sensitisation of nociceptors – What are ion channels doing?*, *The Open Pain Journal*, 3, pp. 82–96.
- Fitzpatrick, D. & Mooney, R. D. (2015a) *Dolor*, in Purves, D. *et al.* (eds) *Neurociencia*. 5°. Madrid: Editorial Médica Panamericana, pp. 209–28.
- Fitzpatrick, D. & Mooney, R. D. (2015b) *Sistema Somatosensitivo: Tacto y Propiocepción*, in Purves, D. *et al.* (eds) *Neurociencia*. 5°. Madrid: Editorial Médica Panamericana, pp. 189–208.
- Flatters, S. J. L. & Bennett, G. J. (2004) *Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy*, *Pain*, 109(1–2), pp. 150–61.
- Fleetwood-Walker, S. M. *et al.* (1999) *Behavioural changes in the rat following infection with varicella-zoster virus*, *Journal of General Virology*, 80, p. 2433–6.

- Foadi, N. (2018) *Modulation of sodium channels as pharmacological tool for pain therapy — highlights and gaps*, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391(5), pp. 481–88.
- Fossat, P. *et al.* (2010) *Knockdown of L-calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain*, *Journal of Neuroscience*, 30(3), pp. 1073–85.
- Francel, P. C. *et al.* (1987) *Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion x neuroblastoma hybrid cell line, F-11*, *Journal of Neurochemistry*, 48(5), pp. 1624–31.
- Franssen, H. (2015) *Relation between symptoms and pathophysiology in inflammatory neuropathies: Controversies and hypotheses*, *Neuroscience Letters*, 596, pp. 84–89.
- Frias, B. & Merighi, A. (2016) *Capsaicin, nociception and pain*, *Molecules*, 21(6), E797.
- Fukuda, Y., Li, Y. & Segal, R. A. (2017) *A mechanistic understanding of axon degeneration in chemotherapy-induced peripheral neuropathy*, *Frontiers in Neuroscience*, 11, 481.
- Fukumoto, N. *et al.* (2009) *Hypoalgesic behaviors of P/Q-type voltage-gated Ca²⁺ channel mutant mouse, rolling mouse Nagoya*, *Neuroscience*, 160(1), pp. 165–73.
- Garcia-Alcala, H. *et al.* (2015) *Treatment with α -lipoic acid over 16 weeks in type 2 diabetic patients with symptomatic polyneuropathy who responded to initial 4-week high-dose loading*, *Journal of Diabetes Research*, 189857.
- Gardner, E. P., Martin, J. H. & Jessell, T. M. (2001) *Los sentidos corporales*, in Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M. (eds) *Principios de Neurociencia*. 4^o. Madrid: McGraw-Hill Iberoamericana, pp. 430–50.
- Gedlicka, C. *et al.* (2003) *Amelioration of docetaxel/cisplatin induced polyneuropathy by α -lipoic acid*, *Annals of Oncology*, 14(2), pp. 339–40.
- Genevay, S. *et al.* (2010) *Adalimumab in severe and acute sciatica: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*, *Arthritis and Rheumatism*, 62(8), pp. 2339–46.
- Ghil, S. H. *et al.* (2000) *Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the α subunit of Go*, *Journal of Neurochemistry*, 74(1), pp. 151–58.
- Gilron, I & Dickenson, A. H. (2014) *Emerging drugs for neuropathic pain*, *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 19(3), pp. 329–41.
- Gkogkolou, P. & Bohm, M. (2012) *Advanced glycation end products: Key players in skin ageing?*, *Dermato-Endocrinology*, 4(3), pp. 259–70.
- Gold, M. S. & Gebhart, G. F. (2010) *Nociceptor sensitization in pain pathogenesis*, *Nature Medicine*, 16(11), pp. 1248–57.

- Gomtsyan, A. *et al.* (2016) *Synthesis and pharmacology of (pyridin-2-yl)methanol derivatives as novel and selective transient receptor potential vanilloid 3 antagonists*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(10), pp. 4926–47.
- Gong, K., Ohara, P. T. & Jasmin, L. (2016) *Patch clamp recordings on intact dorsal root ganglia from adult rats*, *Journal of Visualized Experiments*, 115, e54287.
- Gornstein, E. & Schwarz, T. L. (2014) *The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions*, *Neuropharmacology*, 76, pp. 175–83.
- Gris, G. *et al.* (2016) *The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats*, *Scientific Reports*, 6, 24591.
- Gunten, C. F. von *et al.* (2007) *Flecainide for the treatment of chronic neuropathic pain: A phase II trial*, *Paliative Medicine*, 21, pp. 667–72.
- Guo, Y. *et al.* (2014) *Oral alpha-lipoic acid to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Supportive Care in Cancer*, 22, pp. 1223–1231.
- Gustin, S. M. *et al.* (2012) *Pain and plasticity: Is chronic pain always associated with somatosensory cortex activity and reorganization?*, *The Journal of Neuroscience*, 32(43), pp. 14874–84.
- Gutiérrez-Martín, Y. *et al.* (2011) *P2X₇ receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells*, *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), pp. 11370–81.
- Gutman, G. A. *et al.* (2005) *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels*, *Pharmacological Reviews*, 57(4), pp. 473–508.
- Habermacher, C. *et al.* (2015) *Molecular structure and function of P2X receptors*, *Neuropharmacology*, 104, pp. 18–30.
- Hagen, N. A. *et al.* (2007) *an open-label, multi-dose efficacy and safety study of intramuscular tetrodotoxin in patients with severe cancer-related pain*, *Journal of Pain and Symptom Management*, 34(2), pp. 171–82.
- Hama, A. & Sagen, J. (2007) *Altered antinociceptive efficacy of tramadol over time in rats with painful peripheral neuropathy*, *European Journal of Pharmacology*, 559(1), pp. 32–37.
- Han, Y. & Smith, M. T. (2013) *Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN)*, *Frontiers in Pharmacology*, 4, 156.
- Hanack, C. *et al.* (2015) *GABA blocks pathological but not acute TrpV1 pain signals*, *Cell*, 160(4), pp. 759–70.

- Hansen, K. B. & Bräuner-Osborne, H. (2009) *FLIPR1 assays of intracellular calcium in gpcr drug discovery*, in Leifert, W. R. (ed.) *G Protein Coupled Receptors in Drug Discovery*. New York, NY: Humana Press, pp. 269–78.
- Hao, X. J. *et al.* (1991) *Allodynia-like effects in rat after ischaemic spinal cord injury photochemically induced by laser irradiation*, *Pain*, 45(2), pp. 175–85.
- Hardaway, A. L. & Podgoroski, I. (2013) *IL-1 β , RAGE and FABP4: Targeting the dynamic trio in metabolic inflammation and related pathologies*, *Future Medicinal Chemistry*, 5(10), pp. 1089–1108.
- Harrison, R. A. & Field, T. S. (2015) *Post stroke pain: Identification, assessment, and therapy*, *Cerebrovascular Diseases*, 39(4), pp. 190–201.
- Hecke, O. van *et al.* (2014) *Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies*, *Pain*, 155(4), pp. 654–62.
- Heinrich, A. *et al.* (2008) *Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord*, *Neuropharmacology*, 54(2), pp. 375–86.
- Heptinstall, J. & Rapley, R. (2000) *Spectrophotometric analysis of nucleic acids*, in Rapley, R. (ed.) *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 57–60.
- Herzberg, U. & Sagen, J. (2001) *Peripheral nerve exposure to HIV viral envelope protein gp120 induces neuropathic pain and spinal gliosis*, *Journal of Neuroimmunology*, 116(1), pp. 29–39.
- Ho, C. & O’Leary, M. E. (2011) *Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons*, *Molecular and Cellular Neurosciences*, 46(1), pp. 159–66.
- Huang, S. M. *et al.* (2011) *TrpV3 and TrpV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation*, *Molecular Pain*, 7(1), 37.
- Huettner, J. E., Kerchner, G. A. & Zhuo, M. (2002) *Glutamate and the presynaptic control of spinal sensory transmission*, *The Neuroscientist*, 8(2), pp. 89–92.
- Hunskar, S. & Hole, K. (1987) *The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain*, *Pain*, 30, pp. 103–14.
- Hwang, S. J.; Min Oh, J.; Valtschanoff, J. G. (2005) *Expression of the vanilloid receptor *trpv1* in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents*. *Brain Research*, 1047, pp. 261–266.
- Hwang, D. W. *et al.* (2008) *Noninvasive in vivo monitoring of neuronal differentiation using reporter driven by a neuronal promoter*, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 35(1), pp. 135–45.

- Imamura, Y., Kawamoto, H. & Nakanishi, O. (1997) *Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats*, *Experimental Brain Research*, 116(1), pp. 97–103.
- Inoue, A. *et al.* (2012) *Protein kinase A-dependent substance P expression by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rat sensory neuronal cell line ND7/23 cells*, *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(3), pp. 541–49.
- Iversen P. W., *et al.* (2012) *HTS assay validation*. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, *et al.*, editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- Jaggi, A. S. & Singh, N. (2011) *Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain*, *Brain Research*, 1381, pp. 187–201.
- Jaggi, A. S. & Singh, N. (2012) *Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy*, *Toxicology*, 291(1–3), pp. 1–9.
- Jaggi, A. S., Jain, V. & Singh, N. (2011) *Animal models of neuropathic pain*, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25(1), pp. 1–28.
- Jarvis, M. F. *et al.* (2007) *A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), pp. 8520–25.
- Jarvis, M. F. *et al.* (2014) *A peripherally acting, selective T-type calcium channel blocker, ABT-639, effectively reduces nociceptive and neuropathic pain in rats*, *Biochemical Pharmacology*, 89(4), pp. 536–44.
- Ji, R.-R., Chamesian, A. & Zhang, Y.-Q. (2016) *Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation*, *Science*, 354(6312), pp. 572–77.
- Jombart, T., Devillard, S. & Balloux, F. (2010) *Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations*, *BMC Genetics*, 11, 94.
- Johansson, A.; Hao, J.; Sjölund, B. (1990) *Local corticosteroid application blocks transmission in normal nociceptive C-fibres*, *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 34, pp. 335–38.
- Joseph, E. K. *et al.* (2004) *Novel mechanism of enhanced nociception in a model of AIDS therapy-induced painful peripheral neuropathy in the rat*, *Pain*, 107(1–2), pp. 147–58.
- Julius, D. & Basbaum, A. (2001) *Molecular mechanisms of nociception*, *Nature*, 413(September), pp. 203–10.
- Jung, H. *et al.* (2008) *Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons*, *Journal of Neurochemistry*, 104(1), pp. 254–63.

- Kandasamy, R. & Price, T. J. (2015) *The pharmacology of receptor priming*, in *Pain control, Handbook of Experimental Pharmacology*, Heidelberg: Springer. pp. 15–37.
- Kaneko, K. *et al.* (2014) *The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia*, *Neuroscience Letters*, 562, pp. 28–33.
- Kasznicki, J. *et al.* (2012) *Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy*, *Molecular Biology Reports*, 39(9), pp. 8669–78.
- Katz, J. *et al.* (1991) *Injury prior to neurectomy alters the pattern of autotomy in rats behavioral evidence of central neural plasticity*, *Anesthesiology*, 75(11), pp. 876–83.
- Katz, N. K., Ryals, J. M. & Wright, D. E. (2015) *Central or peripheral delivery of an adenosine A1 receptor agonist improves mechanical allodynia in a mouse model of painful diabetic neuropathy*, *Neuroscience*, 285, pp. 312–23.
- Kayano, T. *et al.* (2013) *Chronic NGF treatment induces somatic hyperexcitability in cultured dorsal root ganglion neurons of the rat*, *Biomedical Research*, 34(6), pp. 329–42.
- Kerckhove, N. *et al.* (2018) *Efficacy and safety of a T-type calcium channel blocker in patients with neuropathic pain: A proof-of-concept, randomized, double-blind and controlled trial*, *European Journal of Pain*, epub ahead of print.
- Kerr, N. C. H. *et al.* (2007) *The sodium channel Na_v1.5a is the predominant isoform expressed in adult mouse dorsal root ganglia and exhibits distinct inactivation properties from the full-length Na_v1.5 channel*, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 35(2), pp. 283–91.
- Khakh, B. S. *et al.* (2001) *International Union of Pharmacology. XXIV current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits*, *Pharmacological Reviews*, 53(1), pp. 107–18.
- Khoromi, S. *et al.* (2007) *Morphine, nortriptyline and their combination vs. placebo in patients with chronic lumbar root pain*, *Pain*, 130(1–2), pp. 66–75.
- Kidd, J. F. *et al.* (2002) *Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore*, *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8), pp. 6504–10.
- Kim, J. *et al.* (2003) *Cold and mechanical allodynia in both hindpaws and tail following thoracic spinal cord hemisection in rats: Time courses and their correlates*, *Neuroscience Letters*, 343(3), pp. 200–204.
- Kim, S. H. & Chung, J. M. (1992) *An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat*, *Pain*, 50(3), pp. 355–63.

- Kim, Y. S. *et al.* (2000) *Block of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by diphenhydramine*, *Brain Research*, 881(2), pp. 190–98.
- King, M. R. *et al.* (2016) *Perioperative dextromethorphan as an adjunct for postoperative pain: A meta-analysis of randomized controlled trials*, *Anesthesiology*, 124(3), pp. 696–705.
- Kinnman, E. & Levine, J. D. (1995) *Sensory and sympathetic contributions to nerve injury-induced sensory abnormalities in the rat*, *Neuroscience*, 64(3), pp. 751–67.
- Kiso, T. *et al.* (2018) *Effects of pregabalin and duloxetine on neurotransmitters in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of fibromyalgia*, *European Journal of Pharmacology*, 827, pp. 117–24.
- Kobayashi, K. *et al.* (2005) *Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat*, *Journal of Comparative Neurology*, 481(4), pp. 377–90.
- Koltzenburg, M., Lundberg, L. E. & Torebjork, H. E. (1992) *Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin [published erratum appears in Pain 1993 Jun;53(3):363]*, *Pain*, 51(2), pp. 207–19.
- Korff, M. von *et al.* (1992) *Grading the severity of chronic pain*, *Pain*, 50(1092), pp. 133–49.
- Korhonen, T. *et al.* (2006) *The treatment of disc herniation-induced sciatica with infliximab*, *Spine*, 30(24), pp. 2724–28.
- Krukowski, K. *et al.* (2017) *HDAC6 inhibition effectively reverses chemotherapy-induced peripheral neuropathy*, *Pain*, 158(6), pp. 1126–37.
- Kulkantrakorn, K. (2014) *Pyridoxine-induced sensory ataxic neuropathy and neuropathy: Revisited*, *Neurological Sciences*, 35(11), pp. 1827–30.
- Kupers, R. *et al.* (1998) *Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain*, *Pain*, 76(1–2), pp. 45–59.
- Kusano, K. & Gainer, H. (1993) *Modulation of voltage-activated Ca currents by pain-inducing agents in a dorsal root ganglion neuronal line, F-11*, *Journal of Neuroscience Research*, 34(2), pp. 158–69.
- Kwilasz, A. J. *et al.* (2018) *Sustained reversal of central neuropathic pain induced by a single intrathecal injection of adenosine A2A receptor agonists*, *Brain, Behavior and Immunity*, 69, pp. 470–79.
- Kwon, M. J. *et al.* (2015) *CCL2 Mediates Neuron-Macrophage Interactions to Drive Proregenerative Macrophage Activation Following Preconditioning Injury*, *Journal of Neuroscience*, 35(48), pp. 15934–47.

- Kyhse-Andersen, J. (1984) *Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10(3–4), pp. 203–9.
- Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227, 680–685.
- Le Gall-Ianotto, C. *et al.* (2012) *Characterization of the first coculture between human primary keratinocytes and the dorsal root ganglion-derived neuronal cell line F-11*, *Neuroscience*, 210, pp. 47–57.
- Lee, B. H. *et al.* (2000) *An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches*, *NeuroReport*, 11(4), pp. 657–61.
- Lee, J. A. & Berg, E. L. *Neoclassic drug discovery: The case for lead generation using phenotypic and functional approaches*. *Journal of Biomolecular Screening*, 18, pp. 1143–1155.
- Lee, Y., Lee, C.-H. & Oh, U. (2005) *Painful channels in sensory neurons*, *Molecules and Cells*, 20(3), pp. 315–24.
- Lei, L. *et al.* (2005) *The zinc finger transcription factor Klf7 is required for TrkA gene expression and development of nociceptive sensory neurons*, *Genes & Development*, 19, pp. 1354–64.
- Lemons, L. L. & Wiley, R. G. (2011) *Galanin receptor-expressing dorsal horn neurons: Role in nociception*, *Neuropeptides*, 45(6), pp. 377–83.
- Leyton Puig, D. *et al.* (2016) *Tips and tricks for artifact-free PFA-based fixation of the actin cytoskeleton and its regulatory proteins for single molecule localization super-resolution microscopy*, *Protocol Exchange*, pp. 1–19.
- Li, J. *et al.* (2013) *Cage the firefly luciferin! – a strategy for developing bioluminescent probes*, *Chemical Society Reviews*, 42(2), pp. 662–76.
- Li, W. *et al.* (2007) *Characterization of voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat dorsal root ganglion neurons*, *Cellular Physiology*, 212, pp. 348–57.
- Li, X.-Y. & Toyoda, H. (2015) *Role of leak potassium channels in pain signaling*, *Brain Research Bulletin*, 119, pp. 73–79.
- Liu, D. Z. *et al.* (2012) *Integrated analysis of mRNA and microRNA expression in mature neurons, neural progenitor cells and neuroblastoma cells*, *Gene*, 495(2), pp. 120–27.
- Liu, S. *et al.* (2015) *Wnt/Ryk signaling contributes to neuropathic pain by regulating sensory neuron excitability and spinal synaptic plasticity in rats*, *Pain*, 156(12), pp. 2572–84.
- Liu, T. Y. *et al.* (2015) *Pharmacologically inhibiting GluR2 internalization alleviates neuropathic pain*, *Neuroscience Bulletin*, 31(5), pp. 611–16.

- Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. (2014) *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*, *Genome Biology*, 15, 550.
- Lowry, O. H. *et al.* (1951) *Protein measurement with the folin phenol reagent*, *Journal of Biological Chemistry*, 193, pp. 265–75.
- Luo, Z. D. *et al.* (2001) *Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats*, *The Journal of Neuroscience*, 21(6), pp. 1868–75.
- Ma, C., Greenquist, K. W. & Lamotte, R. H. (2006) *Inflammatory Mediators Enhance the Excitability of Chronically Compressed Dorsal Root Ganglion Neurons*, *Journal of Neurophysiology*, 95(4), pp. 2098–2107.
- Ma, X. *et al.* (2010) *Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters*, *Cryobiology*, 60, 184–191.
- Mahmood, D. F. D. *et al.* (2013) *The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease*, *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(11), pp. 1266–1303.
- Maihofner, C. & Heskamp, M.-L. (2013) *Prospective, non-interventional study on the tolerability and analgesic effectiveness over 12 weeks after a single application of capsaicin 8% cutaneous patch in 1044 patients with peripheral neuropathic pain: first results of the QUEPP study*, *Current Medical Research and Opinion*, 29(6), pp. 673–83.
- Marais, E., Klugbauer, N. & Hofmann, F. (2001) *Calcium channel $\alpha\delta$ subunits-structure and gabapentin binding*, *Molecular Pharmacology*, 59(5), pp. 1243–48.
- Maratou, K. *et al.* (2009) *Comparison of dorsal root ganglion gene expression in rat models of traumatic and HIV-associated neuropathic pain*, *European Journal of Pain*, 13(4), pp. 387–98.
- Martin, D. J. *et al.* (2002) *Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca^{2+} channel currents in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and channel subunit expression*, *Neuropharmacology*, 42(3), pp. 353–66.
- Matak, I. & Lacković, Z. (2014) *Botulinum toxin A, brain and pain*, *Progress in Neurobiology*, 119–120, pp. 39–59.
- Mathieson, S. *et al.* (2015) *Neuropathic pain screening questionnaires have limited measurement properties. A systematic review*, *Journal of Clinical Epidemiology*, 68(8), pp. 957–66.
- McCarthy, D. J., Chen, Y. & Smyth, G. K. (2012) *Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation*, *Nucleic Acids Research*, 40(10), pp. 4288–97.

- McDonald, T. *et al.* (2016) *Pharmacological evaluation of orexin receptor antagonists in preclinical animal models of pain*, *Journal of Neurogenetics*, 30(1), pp. 32–41.
- McIlvain, H. B. *et al.* (2006) *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) induces differentiation in the neuronal F11 cell line through a PKA-dependent pathway*, *Brain research*, 1077(1), pp. 16–23.
- Mei, Q. *et al.* (2017) *Regulation of DNA replication-coupled histone gene expression*, *Oncotarget*, 8(55), pp. 95005–22.
- Melli, G. & Höke, A. (2010) *Sensory neuronal cultures: A tool for drug discovery for peripheral neuropathies*, *Expert Opinion in Drug Discovery*, 4(10), pp. 1035–45.
- Menéndez, L. *et al.* (2003) *Initial thermal heat hypoalgesia and delayed hyperalgesia in a murine model of bone cancer pain*, *Brain Research*, 969(1–2), pp. 102–9.
- Mesas-Idáñez, Á. (2012) *Dolor Agudo y Crónico. Clasificación del Dolor. Historia clínica en las Unidades de Dolor*. Documento de Consenso Hospital Universitario Vall d'Hebrón.
- Michaluk, J. *et al.* (1998) *Effects of various Ca²⁺ channel antagonists on morphine analgesia, tolerance and dependence, and on blood pressure in the rat*, *European Journal of Pharmacology*, 352(2–3), pp. 189–97.
- Mika, J., Obara, I. & Przewlocka, B. (2011) *The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: Implications of neuro-glial interaction*, *Neuropeptides*, 45(4), pp. 247–61.
- Millan, M. J. *et al.* (2001) *S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: II. Behavioral profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(2), pp. 581–91.
- Miller, E. W. *et al.* (2011) *Optically monitoring voltage in neurons by photo-induced electron transfer through molecular wires*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), pp. 2114–19.
- Miller, R. E. *et al.* (2016) *The role of peripheral nociceptive neurons in the pathophysiology of osteoarthritis Pain*, *Current Osteoporosis Report*, 13(5), pp. 318–26.
- Milton, N. G. N. (2012) *In vitro activities of kissorphan, a novel hexapeptide kiss-1 derivative, in neuronal cells*, *Journal of Amino Acids*, 2012, 691463.
- Mitani, K. *et al.* (2016) *The prostaglandin E₂/EP4 receptor/cyclic AMP/T-type Ca²⁺ channel pathway mediates neuritogenesis in sensory neuron-like ND7/23 cells*, *Journal of Pharmacological Science*, 130(3), pp. 177–80.

- Mizuta, K., Fujita, T. & Kumamoto, E. (2012) *Inhibition by morphine and its analogs of action potentials in adult rat dorsal root ganglion neurons*, *Journal of Neuroscience Research*, 90(9), pp. 1830–41.
- Moalem, G. & Tracey, D. J. (2006) *Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain*, *Brain Research Reviews*, 51(2), pp. 240–64.
- Moore, A., Wiffen, P. & Kalso, E. (2014) *Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia*, *JAMA*, 312(2), pp. 182–83.
- Moore, R. A. *et al.* (2015) *Amitriptyline for neuropathic pain in adults*, *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7, CD008242.
- Moraes, E. R., Kushmerick, C. & Naves, L. A. (2014) *Characteristics of dorsal root ganglia neurons sensitive to substance P*, *Molecular Pain*, 10, 73.
- Mosconi, T. & Kruger, L. (1996) *Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: Ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations*, *Pain*, 64(1), pp. 37–57.
- Moss, P. J. *et al.* (2014) *Macrophage-sensory neuronal interaction in HIV-1 gp120-induced neurotoxicity*, *British Journal of Anaesthesia*, 114(3), pp. 499–508.
- Mueller, O., Lightfoot, S. & Schroeder, A. (2016) *RNA integrity number (RIN)–standardization of RNA quality control application*, *Agilent Application Note*.
- Murai, N. *et al.* (2014) *AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, exerts analgesic effects in a rat model of neuropathic pain with unique characteristics in spinal monoamine turnover*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 348(3), pp. 372–82.
- Murakami, M. *et al.* (2001) *Distribution of various calcium channel α 1 subunits in murine DRG neurons and antinociceptive effect of ω -conotoxin SVIB in mice*, *Brain Research*, 903(1–2), pp. 231–36.
- Muthuraman, A. *et al.* (2014) *Drug therapy of neuropathic pain: current developments and future perspectives*, *Current Drug Targets*, 15(2), pp. 210–53.
- Na, H. S. *et al.* (1994) *A behavioral model for peripheral neuropathy produced in rat's tail by inferior caudal trunk injury*, *Neuroscience Letters*, 177, pp. 50–52.
- Nakamura, S. & Atsuta, Y. (2006) *The effects of experimental neurolysis on ectopic firing in a rat chronic constriction nerve injury model*, *Journal of Hand Surgery*, 31(1), pp. 35–39.
- Namarudai, S. *et al.* (2014) *Crystal structure and molecular imaging of the nav channel β 3 subunit indicates a trimeric assembly*, *The Journal of Biological Chemistry*, 289(15), pp. 10797–811.
- Narita, M. *et al.* (2007) *Involvement of microglia in the ethanol-induced neuropathic pain-like state in the rat*, *Neuroscience Letters*, 414(1), pp. 21–25.

- Nashmi, R. *et al.* (2002) *Patch-clamp recordings from white matter glia in thin longitudinal slices of adult rat spinal cord*, *The Journal of Neuroscience Methods*, 117(2), pp. 159–66.
- Neumann, S. *et al.* (2008) *Innocuous, not noxious, input activates PKC γ interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers*, *The Journal of Neuroscience*, 28(32), pp. 7936–44.
- Newman-Tancredi, A. *et al.* (2018) *NLX-112, a highly selective 5-HT_{1A} receptor agonist, mediates analgesia and antidepressant-like activity in rats via spinal cord and prefrontal cortex 5-HT_{1A} receptors, respectively*, *Brain Research*, 1688, pp. 1–7.
- Nickel, F. T. *et al.* (2012) *Mechanisms of neuropathic pain*, *European Neuropsychopharmacology*, 22(2), pp. 81–91.
- Niesters, M., Martini, C. & Dahan, A. (2014) *Ketamine for chronic pain: Risks and benefits*, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(2), pp. 357–67.
- Nieto-Rostro, M. *et al.* (2014) *Altered expression of the voltage-gated calcium channel subunit $\alpha 2\delta$ -1: A comparison between two experimental models of epilepsy and a sensory nerve ligation model of neuropathic pain*, *Neuroscience*, 283, pp. 124–37.
- Nieto, F. R. *et al.* (2008) *Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice*, *Pain*, 137(3), pp. 520–31.
- Nieto, F. R. *et al.* (2012) *Tetrodotoxin (TTX) as a therapeutic agent for pain*, *Marine Drugs*, 10(2), pp. 281–305.
- Nilius, B. & Flockerzi, V. (eds) (2014) *mammalian transient receptor potential (Trp) cation channels*. Heidelberg: Springer.
- Nolan, T.; Hands, R. E.; Bustin, S. A. (2006) *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*, *Nature Protocols*, 1(3), pp. 1559–1582.
- Norman, B. H. & McDermott, J. S. (2016) *Targeting the nerve growth factor (NGF) pathway in drug discovery. Potential applications to new therapies for chronic pain*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(1), pp. 66–88.
- Oliveira, C. M. B. de *et al.* (2011) *Cytokines and pain*, *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), pp. 255–65.
- Opii, W. O. *et al.* (2007) *Oxidative stress and toxicity induced by the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI)—2',3'-dideoxycytidine (ddC): Relevance to HIV-dementia*, *Experimental Neurology*, 204, pp. 29–38.
- Ortega-Roldan, J. L., Ossa, F. & Schnell, J. R. (2013) *Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BIP) interactions*, *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), pp. 21448–57.

- Osteen, J. D. *et al.* (2016) *Selective spider toxins reveal a role for Na_v1.1 channel in mechanical pain*, *Nature*, 534(7608), pp. 494–99.
- Ostenfeld, T. *et al.* (2015) *A randomized, placebo-controlled trial of the analgesic efficacy and safety of the p38 MAP kinase inhibitor, losmapimod, in patients with neuropathic pain from lumbosacral radiculopathy*, *The Clinical Journal of Pain*, 31(4), pp. 283–93.
- Otari, K. V. & Upasani, C. D. (2015) *Involvement of NO–cGMP pathway in anti-hyperalgesic effect of PDE5 inhibitor tadalafil in experimental hyperalgesia*, *Inflammopharmacology*, 23(4), pp. 187–94.
- Pai, S. *et al.* (2012) *Dynamic mass redistribution assay decodes differentiation of a neural progenitor stem cell*, *Journal of Biomolecular Screening*, 17(9), pp. 1180–91.
- Pakhomov, A. G. *et al.* (2017) *Neuronal excitation and permeabilization by 200-ns pulsed electric field: An optical membrane potential study with FluoVolt dye*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859, pp. 1273–81.
- Pan, B. *et al.* (2014) *Sigma-1 receptor antagonism restores injury-induced decrease of voltage-gated Ca²⁺ current in sensory neurons*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(2), pp. 290–300.
- Pang, J., Modlin, J. & Yolken, R. (1992) *Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA*, *Molecular and Cellular Probes*, 6(3), pp. 251–56.
- Papanas, N.; Ziegler, D. (2014) *Efficacy of alpha-lipoic acid in diabetic neuropathy*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15 (18), pp. 2721–2731.
- Park, H. J. *et al.* (2013) *Anti-allodynic effects of levodopa in neuropathic rats*, *Yonsei Medical Journal*, 54(2), pp. 330–35.
- Park, J. & Luo, Z. D. (2010) *Calcium channel functions in pain processing*, *Channels*, 4(6), pp. 510–17.
- Park, S. *et al.* (2014) *Physiological effect and therapeutic application of alpha lipoic acid*, *Current Medicinal Chemistry*, 21(32), pp. 3636–45.
- Patel, R. & Dickenson, A. H. (2016) *Mechanisms of the gabapentinoids and $\alpha\delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain*, *Pharmacology Research & Perspectives*, 4(2), e00205.
- Pathak, N. N. *et al.* (2014) *Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels*, *Neurochemistry International*, 68(1), pp. 1–9.
- Peirs, C. & Seal, R. P. (2016) *Neural circuits for pain: Recent advances and current views*, *Science*, 354(6312), pp. 578–84.

- Peirs, C. *et al.* (2015) *Dorsal horn circuits for persistent mechanical pain*, *Neuron*, 87(2), pp. 797–812.
- Pelissier, T. *et al.* (2001) *Antinociceptive effect of clomipramine in monoarthritic rats as revealed by the paw pressure test and the C-fiber-evoked reflex*, *European Journal of Pharmacology*, 416(1–2), pp. 51–57.
- Penning, T. M. (2015) *The aldo-keto reductases (AKRs): Overview*, *Chemico-Biological Interactions*, 234, pp. 236–46.
- Pérez Trullén, J. M., Arilla Aguilera, J. A. & Vázquez André, M. L. (2008) *Dolor psicógeno*, *Psiquiatría Biológica*, 15(3), pp. 90–96.
- Perez-Reyes, E. (2003) *molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels*, *Physiological Reviews*, 83, pp. 117–61.
- Pettinger, L. *et al.* (2013) *Bradykinin Controls Pool Size of Sensory Neurons Expressing Functional δ -Opioid Receptors*, *The Journal of Neuroscience*, 33, pp. 10762–71.
- Phan, H. T. M. *et al.* (2015) *Investigation of bovine serum albumin (BSA) attachment onto self-assembled monolayers (SAMs) using combinatorial quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and spectroscopic ellipsometry (SE)*, *PLoS ONE*, 10(10), e0141282.
- Pickering, G. *et al.* (2014) *Prevention of post-mastectomy neuropathic pain with memantine: study protocol for a randomized controlled trial*, *Trials*, 15, 331.
- Platika, D. *et al.* (1985) *Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), pp. 3499–3503.
- Pollack, C. V. & Swindle, G. M. (1989) *Use of diphenhydramine for local anesthesia in 'caine'-sensitive patients*, *Journal of Emergency Medicine*, 7(6), pp. 611–14.
- Pota, V. *et al.* (2016) *CGRP and Visceral Pain: The role of sex hormones in vitro experiment*, *Journal of Cellular Biochemistry*, 8(3), pp. 510–17.
- Prasad, S. N. & Muralidhara (2013) *Neuroprotective efficacy of eugenol and isoegenol in acrylamide-induced neuropathy in rats: Behavioral and biochemical evidence*, *Neurochemical Research*, 38(2), pp. 330–45.
- Puttfarcken, P. S. *et al.* (1997) *Evidence for nicotinic receptors potentially modulating nociceptive transmission at the level of the primary sensory neuron: studies with F11 cells*, *Journal of Neurochemistry*, 69(3), pp. 930–38.
- Qin, S. *et al.* (2017) *Local knockdown of Nav1.6 relieves pain behaviors induced by BmK I*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49(8), pp. 713–21.

- Raffaghello, L. *et al.* (2006) *The P2X₇ receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism*, *Cancer Research*, 66(2), pp. 907–14.
- Ramesh, G.; Meisner, O. C.; Philipp, M. T. (2015) *Anti-inflammatory effects of dexamethasone and meloxicam on Borrelia Burgdorferi-induced inflammation in neuronal cultures of dorsal root ganglia and myelinating cells of the peripheral nervous system*, *Journal of Neuroinflammation*, 12, 240.
- Raja, S. N., Meyer, R. A. & Campbell, J. N. (1988) *Peripheral mechanisms of somatic pain*, *Anesthesiology*, 68, pp. 571–90.
- Rathmell, J. P. & Fields, H. L. (2016) *Dolor: fisiopatología y tratamiento*, in Kasper, D. *et al.* (eds) *Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e*. New York, NY: McGraw-Hill Education. Available at: <http://harrisonmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1137915463>
- Ray, S. B. *et al.* (2008) *Nimodipine is more effective than nifedipine in attenuating morphine tolerance on chronic co-administration in the rat tail-flick test*, *Indian Journal of Experimental Biology*, 46(4), pp. 219–28.
- Renganathan, M., Dib-Hajj, S. & Waxman, S. G. (2002) *Na_v1.5 underlies the 'third TTX-R sodium current' in rat small DRG neurons*, *Molecular Brain Research*, 106(1–2), pp. 70–82.
- Rice, A. S. C. & Smith, M. T. (2015) *Angiotensin II type 2-receptor: New clinically validated target in the treatment of neuropathic pain*, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 97(2), pp. 128–30.
- Rico-Villademoros, F., Slim, M. & Calandre, E. P. (2015) *Amitriptyline for the treatment of fibromyalgia: A comprehensive review*, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(10), pp. 1123–50.
- Robinson, B., Li, Z. & Nath, A. (2007) *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors and human immunodeficiency virus proteins cause axonal injury in human dorsal root ganglia cultures*, *Journal of Neurovirology*, 13(2), pp. 160–67.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. (2009) *edgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*, *Bioinformatics*, 26(1), pp. 139–40.
- Ross, D. *et al.* (2000) *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): Chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms*, *Chemico-Biological Interactions*, 129(1–2), pp. 77–97.
- Ruan, H. Z. & Burnstock, G. (2003) *Localisation of P2Y₁ and P2Y₄ receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat*, *Histochemistry and Cell Biology*, 120(5), pp. 415–26.

- Rudy, B. & McBain, C. J. (2001) *Kv3 channels: Voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing*, *Trends in Neurosciences*, 24(9), pp. 517–26.
- Rupprecht, R. *et al.* (1993) *Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands*, *European Journal of Pharmacology*, 247, pp. 145–54.
- Saika, F. *et al.* (2015) *Peripheral alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor signalling attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia after nerve injury in mice*, *Acta Physiologica*, 213(2), pp. 462–71.
- Sakakiyama, M. *et al.* (2014) *preventive and alleviative effect of tramadol on neuropathic pain in rats: Roles of alpha2-adrenoceptors and spinal astrocytes*, *Journal of Pharmacological Sciences*, 124(2), pp. 244–57.
- Salat, K., Jakubowska, A. & Kulig, K. (2014) *Zucapsaicin for the treatment of neuropathic pain*, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 23(10), pp. 1433–40.
- Sanna, M. D. *et al.* (2014) *The RNA-binding protein HuD promotes spinal GAP43 overexpression in antiretroviral-induced neuropathy*, *Experimental Neurology*, 261, pp. 343–53.
- Sasaki, H. *et al.* (2011) *Copy number loss of (src homology 2 domain containing)-transforming protein 2 (SHC2) gene: Discordant loss in monozygotic twins and frequent loss in patients with multiple system atrophy*, *Molecular Brain*, 4(1), 24.
- Savidge, J. R., Ranasinghe, S. P. & Rang, H. P. (2001) *Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor, VR1*, *Neuroscience*, 102(1), pp. 177–84.
- Sawynok, J. (2016) *Adenosine receptor targets for pain*, *Neuroscience*, 338, pp. 1–18.
- Sawynok, J., Esser, M. J. & Reid, A. R. (1999) *Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat*, *Pain*, 82(2), pp. 149–58.
- Sawynok, J., Reid, A. R. & Esser, M. J. (1999) *Peripheral antinociceptive action of amitriptyline in the rat formalin test: Involvement of adenosine*, *Pain*, 80(1–2), pp. 45–55.
- Schmidt, R. *et al.* (1995) *Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin*, *The Journal of Neuroscience*, 15(1), pp. 333–41.
- Scholz, J. & Woolf, C. J. (2007) *The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia*, *Nature Neuroscience*, 10(11), pp. 1361–68.
- Schröder, R. *et al.* (2010) *Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements*, *Nature Biotechnology*, 28(9), pp. 943–49.

- Schröder, R. *et al.* (2011) *Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells*, *Nature Protocols*, 6(11), pp. 1748-60.
- Schwartz, E. S. *et al.* (2008) *Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice*, *Pain*, 138, pp. 514-24.
- Schwei, M. J. *et al.* (1999) *Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain*, *The Journal of Neuroscience*, 19(24), pp. 10886-97.
- Scott, C. W. & Peters, M. F. (2010) *Label-free whole-cell assays: expanding the scope of GPCR screening*, *Drug Discovery Today*, 15(17-18), pp. 704-16.
- Seltzer, Z. (1995) *The relevance of animal neuropathy models for chronic pain in humans*, *Seminars in the Neurosciences*, 7(4), pp. 211-19.
- Seltzer, Z., Dubner, R. & Shir, Y. (1990) *A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury*, *Pain*, 43(2), pp. 205-18.
- Sen, D., Huchital, M. & Chen, Y. L. (2013) *Crosstalk between delta opioid receptor and nerve growth factor signaling modulates neuroprotection and differentiation in rodent cell models*, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), pp. 21114-39.
- Sharma, S. K., Viji, A. S. & Sharma, M. (2013) *Mechanisms and clinical uses of capsaicin*, *European Journal of Pharmacology*, 720(1-3), pp. 55-62.
- Shehab, S. A. S. & Atkinson, M. E. (1986) *Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases in the spinal cord after peripheral axotomy of the sciatic nerve originate from primary afferent neurons*, *Brain Research*, 372(1), pp. 37-44.
- Shi, T. J. S. *et al.* (2014) *Somatostatin and its 2A receptor in dorsal root ganglia and dorsal horn of mouse and human: Expression, trafficking and possible role in pain*, *Molecular Pain*, 10(1), pp. 1-16.
- Shields, S. D., Eckert, W. A. & Basbaum, A. I. (2003) *Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: A behavioral and anatomic analysis*, *Journal of Pain*, 4(8), pp. 465-70.
- Shinder, V. *et al.* (1999) *Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury*, *Journal of Neurocytology*, 28(9), pp. 743-61.
- Shiokawa, D. *et al.* (2004) *Characterization of the human DNASIL2 gene and the molecular mechanism for its transcriptional activation induced by inflammatory cytokines*, *Genomics*, 84(1), pp. 95-105.

- Simpson, D. M. *et al.* (2014) *NGX-4010, a capsaicin 8% dermal patch, for the treatment of painful HIV-associated distal sensory polyneuropathy results*, *The Clinical Journal of Pain*, 30(2), pp. 134–42.
- Singhal, S. S. *et al.* (2015) *Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(3), pp. 361–70.
- Smith, E. M. L. *et al.* (2013) *Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy*, *JAMA Psychiatry*, 309(13), pp. 1359–67.
- Song, J. H. *et al.* (2000) *Amitriptyline modulation of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons*, *European Journal of Pharmacology*, 401(3), pp. 297–305.
- St. John Smith, E. (2018) *Advances in understanding nociception and neuropathic pain*, *Journal of Neurology*, 265, pp. 231–38.
- Stacey, P. *et al.* (2018) *Plate-based phenotypic screening for pain using human IPSC-derived sensory neurons*. *SLAS Discovery*. 23, pp. 585–596.
- Stein, C. (2016) *Opioid receptors*, *Annual Review of Medicine*, 67, pp. 5.1–5.19.
- Strober, W. (2015) *Trypan blue exclusion test of cell viability*, *Current Protocols in Immunology*, 111, A3.B.1–3.
- Sudoh, Y. *et al.* (2003) *Tricyclic antidepressants as long-acting local anesthetics*, *Pain*, 103(1-2), pp. 49–55.
- Suh, H.-S. *et al.* (2013) *Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators*, *Journal of Neuroinflammation*, 10, 37.
- Tamura, R. *et al.* (2014) *Up-regulation of nav1.7 sodium channels expression by tumor necrosis factor- α in cultured bovine adrenal chromaffin cells and rat dorsal root ganglion neurons*. *Anesthesia and Analgesia*, 118, pp. 318–324.
- Tan, A. M. & Waxman, S. G. (2015) *Dendritic spine dysgenesis in neuropathic pain*, *Neuroscience Letters*, 601, pp. 54–60.
- Taneja, A.; Della Pasqua, O.; Danhof, M. (2017) *Challenges in translational drug research in neuropathic and inflammatory pain: The prerequisites for a new paradigm*. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 73, pp. 1219–1236.
- Theiss, C. & Meller, K. (2000) *Taxol impairs anterograde axonal transport of microinjected horseradish peroxidase in dorsal root ganglia neurons in vitro*, *Cell and Tissue Research*, 299(2), pp. 213–24.
- Thorn, D. A. *et al.* (2015) *Anti-hyperalgesic effects of imidazoline I2 receptor ligands in a rat model of inflammatory pain: interactions with oxycodone*, *Psychopharmacology*, 232(18), pp. 3309–18.

- Toll, L. *et al.* (1998) *Standard Binding and Functional Assays Related to Medications Development Division Testing for Potential Cocaine and Opiate Narcotic Treatment Medications*. *NIDA Research Monographs*, 178, pp. 440–66
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, pp. 4350–4.
- Tsantoulas, C. (2015) *Emerging potassium channel targets for the treatment of pain*, *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 9(2), pp. 147–54.
- Tsantoulas, C. *et al.* (2012) *Sensory neuron downregulation of the K_v9.1 potassium channel subunit mediates neuropathic pain following nerve injury*, *The Journal of Neuroscience*, 32(48), pp. 17502–13.
- Tsantoulas, C. *et al.* (2014) *K_v2 dysfunction after peripheral axotomy enhances sensory neuron responsiveness to sustained input*, *Experimental Neurology*, 251, pp. 115–26.
- Tzschentke, T. M. *et al.* (2017) *Antihyperalgesic, antiallodynic, and antinociceptive effects of cebranopadol, a novel potent nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist, after peripheral and central administration in rodent models of neuropathic pain*, *Pain Practice*, 17(8), pp. 1032–41.
- Uchytílová, E., Spicarova, D. & Palecek, J. (2014) *TrpV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms*, *Molecular Pain*, 10, 67.
- Ueda, H. (2006) *Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms*, *Pharmacology and Therapeutics*, 109(1–2), pp. 57–77.
- Ursu, D. *et al.* (2010) *Pungency of TrpV1 agonists is directly correlated with kinetics of receptor activation and lipophilicity*, *European Journal of Pharmacology*, 641(2–3), pp. 114–22.
- Usoskin, D. *et al.* (2014) *Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing*, *Nature Neuroscience*, 18(1), pp. 145–53.
- Vadakkan, K. I., Jia, Y. H. & Zhuo, M. (2005) *A behavioral model of neuropathic pain induced by ligation of the common peroneal nerve in mice*, *Journal of Pain*, 6(11), pp. 747–56.
- Vandevyver, S. *et al.* (2013) *New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: An emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation*, *Endocrinology*, 154, pp. 993–1007.
- Veress, G. *et al.* (2013) *Characterisation of cannabinoid 1 receptor expression in the perikarya, and peripheral and spinal processes of primary sensory neurons*, *Brain Structure and Function*, 218(3), pp. 733–50.

- Vetter, I. & Lewis, R. J. (2010) *Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines*, *Biochemical Pharmacology*, 79, pp. 908–20.
- Vidal-Torres, A. *et al.* (2012) *Evaluation of formalin-induced pain behavior and glutamate release in the spinal dorsal horn using in vivo microdialysis in conscious rats*, *Journal of Pharmacological Sciences*, 120(2), pp. 129–32.
- Vidal-Torres, A. *et al.* (2013) *Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: Enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects*, *European Journal of Pharmacology*, 711(1–3), pp. 63–72.
- Vidal-Torres, A. *et al.* (2014) *Effects of the selective sigma-1 receptor antagonist SIRA on formalin-induced pain behavior and neurotransmitter release in the spinal cord in rats*, *Journal of Neurochemistry*, 129(3), pp. 484–94.
- Vincent, A. M. & Feldman, E. L. (2008) *Can drug screening lead to candidate therapies for testing in diabetic neuropathy?*, *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), pp. 387–93.
- Vittecoq, D. *et al.* (2002) *Mitochondrial damage associated with long-term antiretroviral treatment: Associated alteration or causal disorder?*, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, 31(3), pp. 299–308.
- Vollmer, T. *et al.* (2014) *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of duloxetine for the treatment of pain in patients with multiple sclerosis*, *Pain Practice*, 14(8), pp. 732–44.
- Vranken, J. H. *et al.* (2011) *Duloxetine in patients with central neuropathic pain caused by spinal cord injury or stroke: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*, *Pain*, 152(2), pp. 267–73.
- Wacnik, P. W. *et al.* (2001) *Functional interactions between tumor and peripheral nerve: Morphology, Algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain*, *The Journal of Neuroscience*, 21(23), 9355–9366.
- Wacnik, P. W. *et al.* (2003) *Tumor implantation in mouse humerus evokes movement-related hyperalgesia exceeding that evoked by intramuscular carrageenan*, *Pain*, 101(1–2), pp. 175–85.
- Wall, P. D. *et al.* (1979) *Autotomy following peripheral nerve lesions: Experimental anesthesia dolorosa*, *Pain*, 7, pp. 103–11.
- Wallace, M. *et al.* (2017) *Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study: Investigation of the safety, pharmacokinetics, and antihyperalgesic activity of l -4-chlorokymurenine in healthy volunteers*, *Scandinavian Journal of Pain*, 17, pp. 243–51.
- Wallace, V. C. J. *et al.* (2007) *Pharmacological, behavioural and mechanistic analysis of HIV-1 gp120 induced painful neuropathy*, *Pain*, 133(1), pp. 47–63.

- Wang, H. *et al.* (1999) *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*, *Science*, 285(5425), pp. 248–51.
- Wang, H. *et al.* (2014) *Fulranumab for treatment of diabetic peripheral neuropathic pain: A randomized controlled trial*, *Neurology*, 83(7), pp. 628–37.
- Wang, H. S. *et al.* (2016) *Changes in VGLUT1 and VGLUT2 expression in rat dorsal root ganglia and spinal cord following spared nerve injury*, *Neurochemistry International*, 99, pp. 9–15.
- Wang, Z. *et al.* (2015) *Activation of CB1 inhibits NGF-induced sensitization of TrpV1 in adult mouse afferent neurons*, *Neuroscience*, 277, pp. 679–89.
- Warchal, S. J., Unciti-Broceta, A. & Carragher, N. O. (2016) *Next-generation phenotypic screening*, *Future Medicinal Chemistry*, 8(11), pp. 1131–1347.
- Waxman, S. G. (2007) *Nav1.7, its mutations, and the syndromes that they cause*, *Neurology*, 69(6), pp. 505–7.
- Waxman, S. G. & Zamponi, G. W. (2014) *Regulating excitability of peripheral afferents: Emerging ion channel targets*, *Nature Neuroscience*, 17(2), pp. 153–63.
- Waxman, S. G. *et al.* (2014) *Sodium channel genes in pain-related disorders: Phenotype-genotype associations and recommendations for clinical use*, *Lancet Neurol*, 13, pp. 1152–60.
- Weiser, T. (2006) *Comparison of the effects of four Na⁺ channel analgesics on TTX-resistant Na⁺ currents in rat sensory neurons and recombinant Nav1.2 channels*, *Neuroscience Letters*, 395(3), pp. 179–84.
- Wieringa, P. *et al.* (2012) *Nanotopography induced contact guidance of the F11 cell line during neuronal differentiation: a neuronal model cell line for tissue scaffold development*, *Nanotechnology*, 23(27), 275102.
- Wiffen, P. *et al.* (2017) *Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults*, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6, CD007938.
- Williams, J. L. *et al.* (2014) *Targeting CXCR7/ACKR3 as a therapeutic strategy to promote remyelination in the adult central nervous system*, *The Journal of Experimental Medicine*, 211(5), pp. 791–99.
- Wolff, C., Fuks, B. & Chatelain, P. (2003) *Comparative study of membrane potential-sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays*, *Journal of Biomolecular Screening*, 8(5), pp. 533–43.
- Wood, J. N. J. *et al.* (1990) *Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons*, *Proceedings of the Royal Academy of Sciences*, 241(1302), pp. 187–94.
- Woolf, C. J. & Mannion, R. J. (1999) *Neuropathic pain: Aetiology, symptoms, mechanisms, and management*, *Lancet*, 353, pp. 1959–64.

- Wu, W. *et al.* (2012) *Amitriptyline modulates calcium currents and intracellular calcium concentration in mouse trigeminal ganglion neurons*, *Neuroscience Letters*, 506(2), pp. 307–11.
- Xia, C. *et al.* (2016) *Colitis-induced bladder afferent neuronal activation is regulated by BDNF through PLC γ pathway*, *Experimental Neurology*, 285(Pt B), pp. 126–35.
- Xu, W. & Lipscombe, D. (2001) *Neuronal Cav1.3 α_1 L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines*, *The Journal of Neuroscience*, 21(16), pp. 5944–51.
- Xu, Y. *et al.* (2017) *Study of sex differences in duloxetine efficacy for depression in transgenic mouse models*, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 344
- Yaksh, T. L. (2006) *Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain*, *Journal of Pain*, 7(1), S13–30.
- Yamamoto, S. *et al.* (2016) *N- and L-type calcium channels blocker cilnidipine ameliorates neuropathic pain*, *European Journal of Pharmacology*, 793, pp. 66–75.
- Yang, G. Y. *et al.* (2009) *Intracisternal administration of COX inhibitors attenuates mechanical allodynia following compression of the trigeminal ganglion in rats*, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4), pp. 589–95.
- Yasaka, T. *et al.* (2010) *Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach*, *Pain*, 151(2), pp. 475–88.
- Yin, K., Baillie, G. J. & Vetter, I. (2016) *Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison*, *Molecular pain*, 12, 1744806916646111.
- Yin, R. *et al.* (2015) *Voltage-gated sodium channel function and expression in injured and uninjured rat dorsal root ganglia neurons*, *The International Journal of Neuroscience*, 126(2), pp. 182–92.
- Yu, H. *et al.* (2016) *High throughput screening technologies for ion channels*, *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(1), pp. 34–43.
- Yu, J. *et al.* (2013) *Histamine modulation of acute nociception involves regulation of Nav1.8 in primary afferent neurons in mice*, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(9), pp. 649–58.
- Zamanillo, D. *et al.* (2013) *Sigma 1 receptor: A new therapeutic target for pain*, *European Journal of Pharmacology*, 716(1–3), pp. 78–93.

- Zhang, J. *et al.* (2014) *Identification of suitable reference genes for quantitative RT-PCR during 3T3-L1 adipocyte differentiation*, *International Journal of Molecular Medicine*, 33(5), pp. 1209–18.
- Zhang, S. S. *et al.* (2015) *Efficacy and safety of pregabalin for treating painful diabetic peripheral neuropathy: A meta-analysis*, *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 59(2), pp. 147–59.
- Zhang, X. L., Albers, K. M. & Gold, M. S. (2015) *Inflammation-induced increase in nicotinic acetylcholine receptor current in cutaneous nociceptive DRG neurons from the adult rat*, *Neuroscience*, 284, pp. 483–99.
- Zhang, Y. *et al.* (2015) *Identifying local and descending inputs for primary sensory neurons*, *Journal of Clinical Investigation*, 125(10), pp. 3782–94.
- Zhang, Y. H. *et al.* (2012) *Nerve growth factor enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the atypical protein kinase C isoform, PKM ζ* , *Journal of Neurophysiology*, 107(1), pp. 315–35.
- Zhao, X. *et al.* (2013) *A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing Kcna2 in primary afferent neurons*, *Nature Neuroscience*, 16(8), pp. 1024–31.
- Zhou, Z. *et al.* (2008) *Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress*, *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 295(4), pp. H1763-H71.
- Zhu, G.-Q. *et al.* (2014) *Activation of the cAMP-PKA signaling pathway in rat dorsal root ganglion and spinal cord contributes toward induction and maintenance of bone cancer pain*, *Behavioural Pharmacology*, 25(4), pp. 267–76.
- Zimmermann, M. (2001) *Pathobiology of neuropathic pain*, *European Journal of Pharmacology*, 429, pp. 23–37.
- Zong, X. *et al.* (2001) *A Single Histidine Residue Determines the pH Sensitivity of the Pacemaker Channel HCN2*, *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), pp. 6313–19.
- Zorrilla-Vaca, A. & Li, J. (2018) *dexamethasone injected perineurally is more effective than administered intravenously for peripheral nerve blocks: a meta-analysis of randomized controlled trials*, *Clinical Journal of Pain*, 34(3), pp. 276-84.





Anexos



A1. Glosario de genes

Tabla A1. Listado de los genes citados en el texto con su descripción (en inglés) y el cromosoma en que se encuentran (tanto en ratón como en rata). Elaborado a partir de Gene. (2006) *Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI). Biblioteca Nacional de Medicina.* [Base de datos en línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (Acceso: 28 de junio de 2018).

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>1700096J18Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 1700096J18 gene</i>	11	-
<i>36b4/Rplp10</i>	<i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>	5	12
<i>4930481A15Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930481A15 gene</i>	19	-
<i>Aass</i>	<i>Amino adipate-semialdehyde synthase</i>	6	4
<i>Ackr3</i>	<i>Atypical chemokine receptor 3</i>	1	9
<i>Adgrg1</i>	<i>Adhesion G protein-coupled receptor G1</i>	8	19
<i>Adipoq</i>	<i>Adiponectin</i>	16	11
<i>Agtr2</i>	<i>Angiotensin II receptor, type 2</i>	X	X
<i>Akr1b10</i>	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B10</i>	6	4
<i>Akr1b7</i>	<i>Aldo-keto reductase family 1, member B7</i>	6	4
<i>Alpl</i>	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	4	5
<i>Angpt2</i>	<i>Angiopoietin 2</i>	8	16
<i>Angptl4</i>	<i>Angiopoietin-like 4</i>	17	7
<i>Apobec2</i>	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 2</i>	17	9
<i>Apobr</i>	<i>Apolipoprotein B receptor</i>	7	1
<i>Apon</i>	<i>Apolipoprotein N</i>	10	7
<i>Aqp8</i>	<i>Aquaporin 8</i>	7	1
<i>Arid3c</i>	<i>AT-rich interaction domain 3C</i>	4	5
<i>Arse</i>	<i>Arylsulfatase E</i>	-	2

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>Atp2a3</i>	<i>ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 3</i>	11	10
<i>Bc1-Ps1</i>	<i>Brain cytoplasmic RNA 1, pseudogene 1</i>	7	-
<i>Ca6</i>	<i>Carbonic anhydrase 6</i>	4	5
<i>Cacna1a</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit</i>	8	19
<i>Cacna1b</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit</i>	2	3
<i>Cacna1c</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit</i>	6	4
<i>Cacna1d</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</i>	14	16
<i>Cacna1e</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit</i>	1	13
<i>Cacna1g</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit</i>	11	10
<i>Cacna1h</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit</i>	17	10
<i>Cacna1i</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, alpha 1I subunit</i>	15	7
<i>Cacna2d1</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1</i>	5	4
<i>Cacna2d2</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2</i>	9	8
<i>Cacna2d3</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3</i>	14	16
<i>Cacnb1</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit</i>	11	10
<i>Cacnb2</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit</i>	2	17
<i>Cacnb3</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit</i>	15	7
<i>Cacnb4</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit</i>	2	3
<i>Cacng2</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 2</i>	15	7

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>Cacng3</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 3</i>	7	1
<i>Cacng4</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4</i>	11	10
<i>Cacng5</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5</i>	11	10
<i>Cacng7</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7</i>	7	1
<i>Cacng8</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8</i>	7	1
<i>Catsperg</i>	<i>Cation channel sperm associated auxiliary subunit gamma</i>	-	1
<i>Cav1</i>	<i>Caveolin 1</i>	6	4
<i>Ccdc154</i>	<i>Coiled-coil domain containing 154</i>	17	10
<i>Cd244</i>	<i>CD244 molecule A</i>	1	13
<i>Cd69</i>	<i>CD69 antigen</i>	6	4
<i>Cdc20</i>	<i>Cell division cycle 20</i>	4	5
<i>Cdk3-ps</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 3, pseudogene</i>	11	-
<i>Chtf18</i>	<i>CTF18, chromosome transmission fidelity factor 18</i>	17	10
<i>Clcf1</i>	<i>Cardiotrophin-like cytokine factor 1</i>	19	1
<i>Col13a1</i>	<i>Collagen type XIII, alpha 1 chain</i>	10	20
<i>Col6a3</i>	<i>Collagen type VI, alpha 3 chain</i>	1	9
<i>Col7a1</i>	<i>Collagen, type VII, alpha 1 chain</i>	9	8
<i>Cpxm1</i>	<i>Carboxypeptidase X 1 (M14 family)</i>	2	3
<i>Dnase1l2</i>	<i>Deoxyribonuclease 1-like 2</i>	17	10
<i>Dnd1</i>	<i>DND microRNA-mediated repression inhibitor 1</i>	18	18
<i>Dscc1</i>	<i>DNA replication and sister chromatid cohesion 1</i>	15	7
<i>Egr1</i>	<i>Early growth response 1</i>	18	18
<i>Egr2</i>	<i>Early growth response 2</i>	10	20
<i>Epha3</i>	<i>Eph receptor A3</i>	16	11
<i>Fst</i>	<i>Follistatin</i>	13	2

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>Galnt5</i>	<i>Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5</i>	2	3
<i>Gm15441</i>	<i>15441 gene (predicted)</i>	3	-
<i>Gm20594</i>	<i>20594 gene (predicted)</i>	6	-
<i>Gsdmd</i>	<i>Gasdermin D</i>	15	7
<i>Gsta1</i>	<i>Glutathione S-transferase, alpha 1</i>	9	9
<i>Gtpbp6</i>	<i>GTP binding protein 6 (putative)</i>	5	12
<i>H19</i>	<i>H19, imprinted maternally expressed transcript</i>	7	1
<i>Hist1h1a</i>	<i>Histone cluster 1, H1a</i>	13	17
<i>Hist1h1b</i>	<i>Histone cluster 1, H1b</i>	13	17
<i>Hist1h2ab</i>	<i>Histone cluster 1, H2ab</i>	13	-
<i>Hist1h2ac</i>	<i>Histone cluster 1 H2ac</i>	13	17
<i>Hist1h2ah</i>	<i>Histone cluster 1 H2ah</i>	13	17
<i>Hist1h2aj</i>	<i>Histone cluster 1, H2aj</i>	13	-
<i>Hist1h2ak</i>	<i>Histone cluster 1, H2ak</i>	13	17
<i>Hist1h2al</i>	<i>Histone cluster 1, H2al</i>	13	-
<i>Hist1h2ba</i>	<i>Histone cluster 1, H2ba</i>	13	17
<i>Hist1h2bb</i>	<i>Histone cluster 1, H2bb</i>	13	-
<i>Hist1h2bd</i>	<i>Histone cluster 1, H2bd</i>	-	17
<i>Hist1h2bk</i>	<i>Histone cluster 1, H2bk</i>	13	17
<i>Hist1h2bl</i>	<i>Histone cluster 1, H2bl</i>	13	17
<i>Hist1h2bm</i>	<i>Histone cluster 1, H2bm</i>	13	-
<i>Hist1h2bn</i>	<i>Histone cluster 1, H2bn</i>	13	-
<i>Hist1h2bo</i>	<i>Histone cluster 1 H2bo</i>	-	17
<i>Hist1h3b</i>	<i>Histone cluster 1, H3b</i>	13	7
<i>Hist1h3h</i>	<i>Histone cluster 1, H3h</i>	13	-
<i>Hivep3</i>	<i>Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3</i>	4	5
<i>Hmgcs2</i>	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2</i>	3	2
<i>Hpx</i>	<i>Hemopexin</i>	7	1
<i>Hsd11b2</i>	<i>Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2</i>	8	19
<i>Htr1d</i>	<i>Serotonin receptor 1D</i>	4	5
<i>Igf1</i>	<i>Insulin like growth factor 1</i>	10	7

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>Igf2</i>	<i>Insulin like growth factor 2</i>	7	1
<i>Kcne5</i>	<i>Potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 5</i>	X	X
<i>Kcnj13</i>	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13</i>	1	9
<i>Kcnj3</i>	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3</i>	2	3
<i>Kcnq1ot1</i>	<i>KCNQ1 overlapping transcript 1</i>	7	-
<i>Lars2</i>	<i>Leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial</i>	9	8
<i>LOC100364673</i>	<i>Hypercoagulability-related protein-like</i>	-	4
<i>LOC100911498</i>	<i>Uncharacterized LOC100911498</i>	-	X
<i>LOC257642</i>	<i>rRNA promoter binding protein</i>	-	6
<i>LOC310926</i>	<i>hypothetical protein LOC310926</i>	-	1
<i>Loxl1</i>	<i>Lysyl oxidase-like 1</i>	9	8
<i>Malat1</i>	<i>Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)</i>	19	-
<i>Mcm3</i>	<i>Minichromosome maintenance complex component 3</i>	1	9
<i>Mcm5</i>	<i>Minichromosome maintenance complex component 5</i>	8	19
<i>Mgst3</i>	<i>Microsomal glutathione S-transferase 3</i>	1	13
<i>Miip</i>	<i>Migration and invasion inhibitory protein</i>	4	5
<i>Mir124a-1hg</i>	<i>Mir124-1 host gene (non-protein coding)</i>	14	-
<i>Mir351</i>	<i>MicroRNA 351</i>	X	X
<i>Mir6236</i>	<i>MicroRNA 6236</i>	9	-
<i>Mir671</i>	<i>MicroRNA 671</i>	5	4
<i>Mki67</i>	<i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki 67</i>	7	1
<i>Mlph</i>	<i>Melanophilin</i>	1	9
<i>Mt2</i>	<i>Metallothionein 2</i>	8	-
<i>Mutyh</i>	<i>mutY DNA glycosylase</i>	4	5
<i>Myb</i>	<i>Myeloblastosis oncogene</i>	10	-
<i>Mybl2</i>	<i>Myeloblastosis oncogene-like 2</i>	2	3
<i>Myl7</i>	<i>Myosin light chain 7</i>	11	14

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>Ncf2</i>	<i>Neutrophil cytosolic factor 2</i>	1	13
<i>Ndp</i>	<i>NDP, norrin cystine knot growth factor</i>	X	X
<i>Neurod6</i>	<i>Neurogenic differentiation 6</i>	6	4
<i>Neurog2</i>	<i>Neurogenin 2</i>	3	2
<i>Nova2</i>	<i>Neuro-oncological ventral antigen 2</i>	7	1
<i>Nppb</i>	<i>Natriuretic peptide B</i>	4	5
<i>Nppc</i>	<i>Natriuretic peptide type C</i>	1	9
<i>Nptx1</i>	<i>Neuronal pentraxin 1</i>	11	10
<i>Nqo1</i>	<i>NAD(P)H quinone dehydrogenase</i>	8	19
<i>Nrl</i>	<i>Neural retina leucine zipper gene</i>	14	15
<i>Otof</i>	<i>Otoferlin</i>	5	6
<i>Padi3</i>	<i>Peptidyl arginine deiminase, type III</i>	4	5
<i>Pax4</i>	<i>Paired box 4</i>	6	4
<i>Pclaf</i>	<i>PCNA clamp associated factor</i>	9	8
<i>Pde3a</i>	<i>Phosphodiesterase 3A</i>	6	4
<i>Pimreg</i>	<i>PICALM interacting mitotic regulator</i>	11	10
<i>Pnoc</i>	<i>Prepronociceptin</i>	14	15
<i>Ppef1</i>	<i>Protein phosphatase with EF hand calcium-binding domain 1</i>	X	X
<i>Ppp1r27</i>	<i>Protein phosphatase 1, regulatory subunit 27</i>	11	10
<i>Rgs5</i>	<i>Regulator of G-protein signaling 5</i>	1	13
<i>Rmrp</i>	<i>RNA component of mitochondrial RNAase P</i>	4	-
<i>Rn18s</i>	<i>18S ribosomal RNA</i>	6	14
<i>Rn28s</i>	<i>28S ribosomal RNA</i>	-	4
<i>Rn45s</i>	<i>45S pre-ribosomal RNA</i>	17	14
<i>Rnu11</i>	<i>U11 small nuclear RNA</i>	4	-
<i>Rnu12</i>	<i>RNA U12, small nuclear</i>	15	-
<i>Rpph1</i>	<i>Ribonuclease P RNA component H1</i>	14	15
<i>Rrm2</i>	<i>Ribonucleotide reductase M2</i>	12	6
<i>Rspo1</i>	<i>R-spondin 1</i>	4	5
<i>Scarna17</i>	<i>Small Cajal body-specific RNA 17</i>	18	-
<i>Scarna2</i>	<i>Small Cajal body-specific RNA 2</i>	3	-

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>Scn10a</i>	<i>Sodium voltage-gated channel α subunit 10</i>	9	8
<i>Scn5a</i>	<i>Sodium voltage-gated channel α subunit 5</i>	9	8
<i>Shc2</i>	<i>SHC adaptor protein</i>	10	7
<i>Shisa2</i>	<i>Shisa family member 2</i>	14	15
<i>Sik1</i>	<i>Salt inducible kinase 1</i>	17	20
<i>Slc22a4</i>	<i>Solute carrier family 22 member 4</i>	11	10
<i>Slc30a3</i>	<i>Solute carrier family 30 member 3</i>	5	6
<i>Slc36a1os</i>	<i>Solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1, opposite strand</i>	11	-
<i>Slc4a1</i>	<i>Solute carrier family 4 member 1</i>	11	10
<i>Slfn12l</i>	<i>Schlafen family member 12 like</i>	11	10
<i>Slpi</i>	<i>Secretory leukocyte peptidase inhibitor</i>	2	3
<i>Smok4a</i>	<i>Sperm motility kinase 4A</i>	17	-
<i>Snhg11</i>	<i>Small nucleolar RNA host gene 11</i>	2	3
<i>Snora23</i>	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 23</i>	7	-
<i>Snora3</i>	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 3</i>	7	-
<i>Snora68</i>	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 68</i>	8	-
<i>Snora78</i>	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 78</i>	17	-
<i>Snora81</i>	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 81</i>	16	-
<i>Snord16a</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 16A</i>	9	-
<i>Snord2</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 2</i>	16	-
<i>Snord47</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 47</i>	1	-
<i>Snord49a</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 49A</i>	11	-
<i>Snord49b</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 49B</i>	11	-
<i>Snord55</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 55</i>	4	-
<i>Snord89</i>	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 89</i>	1	-
<i>Sox10</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 10</i>	15	7
<i>Spaca6</i>	<i>Sperm acrosome associated 6</i>	17	1
<i>Spon2</i>	<i>Spondin 2, extracellular matrix protein</i>	5	14
<i>Svep1</i>	<i>Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1</i>	4	5
<i>Syt12</i>	<i>Synaptotagmin XII</i>	19	1

Símbolo	Descripción del gen (en inglés)	Cromosoma	
		Ratón	Rata
<i>Sytl1</i>	<i>Synaptotagmin-like 1</i>	4	5
<i>Taf7l</i>	<i>TATA-box binding protein associated factor 7 like</i>	X	X
<i>Tagln</i>	<i>Transgrelin</i>	9	8
<i>Tbx6</i>	<i>T-box 6</i>	7	1
<i>Tcea3</i>	<i>Transcription elongation factor A (SII), 3</i>	4	5
<i>Tigd3</i>	<i>Tigger transposable element derived 3</i>	19	1
<i>Tk1</i>	<i>Thymidine kinase 1</i>	11	10
<i>Tmem184a</i>	<i>Transmembrane protein 184a</i>	5	12
<i>Tmem65</i>	<i>Transmembrane protein 65</i>	15	7
<i>Tnfrsf9</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9</i>	4	5
<i>Tril</i>	<i>TLR4 interactor with leucine-rich repeats</i>	6	4
<i>Trim63</i>	<i>Tripartite motif-containing 63</i>	4	5
<i>Trip13</i>	<i>Thyroid hormone receptor interactor 13</i>	13	1
<i>Tshr</i>	<i>Thyroid stimulating hormone receptor</i>	12	6
<i>Tspoap1</i>	<i>TSPO associated protein 1</i>	11	10
<i>Txnip</i>	<i>Thioredoxin interacting protein</i>	3	2
<i>Vaultrc5</i>	<i>Vault RNA component 5</i>	18	-
<i>Vdr</i>	<i>Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor</i>	15	7
<i>Vip</i>	<i>Vasoactive intestinal polypeptide</i>	10	1
<i>Wisp2</i>	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 2</i>	2	3
<i>Xist</i>	<i>Inactive X specific transcripts</i>	X	-
<i>Zbtb32</i>	<i>Zinc finger and BTB domain containing 32</i>	7	1
<i>Zmat4</i>	<i>Zinc Finger Matrin-Type 4</i>	8	16
<i>Zrsr1</i>	<i>Zinc finger (CCCH type), RNA binding motif and serine/arginine rich 1</i>	11	14

De acuerdo con las directrices de la Escuela de Doctorado Internacional (EDI) en Ciencias de la Salud de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) (acuerdo de 3 de mayo de 2018), el doctorando Antón Leandro Martínez Rodríguez declara no tener ningún posible conflicto de intereses en relación con la presente tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, a 12 de septiembre de 2018

Firmado: Antón Leandro Martínez Rodríguez

