

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

EXPRESIÓN TEMPORAL DE ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS EN ANIMALES QUE DESARROLLAN DOLOR NEUROPÁTICO

Sánchez Granel, María Luz – LU 1021059

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Gonzalez, Susana Laura

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Co-Tutor Externo:

Coronel, María Florencia

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Co-Tutor Interno:

Prada, Federico

Universidad Argentina de la Empresa

Noviembre 1, 2014



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Dedicado a ustedes,

Mamá y Papá, que siempre están ahí incondicionalmente con sus corazones inmensos para acompañarme en cada decisión, cada paso, cada puerta nueva que abro.

Machi, por enseñarme a discutir, defender mis ideas y abrir mi cabeza a escuchar sin juzgar y percibir a cada persona como alguien único, increíble e irrepetible.

Somo, por hacerme reír, escucharme, tranquilizarme, darme paz, caminar conmigo cada paso, regalarme sonrisas todos los días e innumerables abrazos.

Miriam, por siempre estar en cada detalle, ayudarme todos los días a arrancar de buen humor y enseñarme infinidad de valores.

Normita, quien forma parte de mi vida, mi historia, mi crecimiento y fomentó mi creatividad, imaginación y alegría.

Juanita y Kenchu, por esperarme cada vez que me voy, darme alegría cada vez que vuelvo y acompañarme cuando me quedo.

Agradecimientos

Quiero expresar, mediante las siguientes líneas, mi más profundo y sincero agradecimiento a aquellas personas que me han acompañado y brindado su apoyo en la realización del proyecto final de la carrera.

A *Susana*, por haberme dejado formar parte de su equipo de trabajo, dándome una inmensidad de oportunidades, nuevos conocimientos y permitiéndome conocer el ambiente de la investigación. Gracias por hacerme sentir tan cómoda todos los días.

A *Flor*, por enseñarme todo con paciencia, dedicación y una increíble calidez, guiándome en todo momento, confiando en mí, compartiendo cada hora en el laboratorio y sus chocolatitos después de almorzar.

A *Celes*, por haber compartido esta lindísima experiencia conmigo, formando parte de cada día en el laboratorio, poniéndole una gran dosis de humor a cada hora.

A *Fede Prada*, por su buena predisposición.

A *Flor Labombarda*, por haber tenido el tiempo para colaborar con mi proyecto y ayudar al mejor entendimiento de lo estudiado.

Al *Dr. De Nicola* y todo el laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, *Claudia, Laura, Luciana, Ani, Pau, María, Gise, Ignacio, Elvi*, por haberme compartido su laboratorio y estado a plena disposición para contestar cada consulta.

A *Diego Gelman*, por su generosidad.

A *Luli, Euge, Pau, Soni, Laucha* y *Alexis*, por sumarle alegría al instituto.

A todos mis amigos biotecnólogos, *Belu, Cami, Luli, Chari, Lau, Fede, Joaco, Ale, Mau*, por compartir conmigo todo el camino en ésta lindísima carrera, compartiendo y alegrando mis días de cursada, y haciendo más leves mis días de estudio.

Resumen

El dolor neuropático se desencadena por lesiones o enfermedades del sistema nervioso, y se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo y dolor inducido por estímulos inocuos (alodinia) o nocivos (hiperalgesia). Se estima que entre 2 y 3% de la población mundial sufre de dolor neuropático. Entre una de las causas se encuentran las lesiones de médula espinal de origen traumático. Tanto el diagnóstico como el tratamiento del dolor posterior a la lesión siguen constituyendo un desafío clínico. No hay un tratamiento médico o quirúrgico que haya probado ser totalmente eficaz para la prevención o reducción del dolor.

Previamente, se ha demostrado que la progesterona (PG), un esteroide neuroactivo, podría representar una opción terapéutica para prevenir el desarrollo de dolor neuropático luego de una lesión espinal. Por otra parte, múltiples estudios han revelado la presencia y actividad biológica de importantes enzimas sintetizadoras de esteroides en el asta dorsal de la médula espinal. Esta información sugiere que los neuroesteroides generados en el asta dorsal, podrían controlar la integración de los mensajes somatosensoriales, incluyendo las señales nociceptivas. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: estudiar los cambios temporales en la expresión de las proteínas translocadoras y las enzimas esteroideogénicas, moléculas clave para la síntesis de esteroides y la regulación de los circuitos nociceptivos a nivel espinal, y analizar su posible modulación por PG en un modelo experimental de dolor crónico.

Ratas macho Sprague-Dawley controles (CTL) o con hemisección espinal (HX) fueron sacrificados a diferentes días post lesión (1 día, 14 días, 28 días). A su vez, un grupo de animales hemisectados fue inyectado diariamente con PG (16 mg/kg sc; HX+PG) y sacrificado a 28 días post lesión. La conducta neuropática (alodinia) se evaluó utilizando los tests de von Frey y Choi. Los niveles de ARNm de TSPO, StAR, 5 α -R I y II se determinaron por RT-PCR en tiempo real. En los animales HX se observó un aumento temprano en la expresión de TSPO ($p < 0.05$ vs CTL a 1d y 14d) y de 5 α -RII ($p < 0.05$ vs CTL a 1d; $p < 0.01$ vs CTL a 14d), mientras que en la fase crónica, y coincidiendo con la conducta alodínica (28d), se observó una disminución significativa en la expresión de 5 α -RI ($p < 0.01$ vs CTL) y 5 α RedII ($p < 0.05$ vs CTL). Por otra parte, a 28d, el grupo HX+PG mostró un marcado aumento en los niveles de ARNm de TSPO ($p < 0.001$ vs HX y CTL), StAR ($p < 0.05$ vs HX y CTL), 5 α -RI

($p < 0.01$ vs HX) y 5α -R_{II} ($p < 0.001$ vs HX y CTL). De acuerdo con datos previos, los animales lesionados tratados con PG no desarrollaron alodinia.

Nuestros resultados sugieren que en la etapa aguda post lesión, el incremento en la expresión de TSPO y 5α -R_{II} podría representar una respuesta protectora del tejido frente a la injuria, que no se mantiene en la fase alodínica. La PG favorecería la expresión de TSPO, StAR y la producción de metabolitos reducidos, posibles responsables de los efectos antialodínicos observados en animales con injuria tratados con PG.

Abstract

Neuropathic pain is triggered by lesions or diseases of the nervous system and is characterized by the presence of both spontaneous pain and pain induced by innocuous (allodynia) and noxious (hyperalgesia) stimuli. It has been estimated that between 2 and 3% of the world population suffers from neuropathic pain. One of the main causes is traumatic spinal cord injury. Both the diagnosis and the treatment of pain following injury remains a clinical challenge. No medical or surgical treatment has proven to be totally effective in preventing or reducing neuropathic pain.

Previous studies have shown that progesterone (PG), a neuroactive steroid, could be an interesting option for the treatment of neuropathic pain after spinal cord injury. On the other hand, multiple studies have revealed the presence and biological activity of important steroid synthesizing enzymes in the dorsal horn of the spinal cord. This information suggests that neurosteroids generated in the dorsal horn could control the integration of somatosensory messages including nociceptive signals. Therefore, the objectives of this work were to study the temporal changes in the expression of translocator proteins and steroidogenic enzymes, key molecules for steroid synthesis and regulation of nociceptive circuits in the spinal cord; and to analyze their possible modulation by PG in an experimental model of chronic pain.

Male Sprague-Dawley controls rats (CTL) or with spinal hemisection (HX), were sacrificed at different days after injury (1 day, 14 days, 28 days). Another group of animals was daily injected with PG (16 mg / kg sc; HX+PG) and sacrificed at 28 days after injury. Neuropathic behavior (allodynia) was evaluated using von Frey and Choi tests. The mRNA levels of TSPO, StAR, 5 α -RI and II were determined by real time RT-PCR. It was observed that HX animals showed an early increase in the expression of TSPO ($p < 0.05$ vs CTL at 1d, 14d) and 5 α -RII ($p < 0.05$ vs CTL at 1d, $p < 0.01$ vs CTL at 14d), whereas in the chronic phase, coinciding with the allodynic behavior (28d), a significant decrease in the expression of 5 α -RI ($p < 0.01$ vs CTL) and 5 α RedII ($p < 0.05$ vs CTL) was observed. In addition, at 28d, the HX+PG group showed a marked increase in the mRNA levels of TSPO ($p < 0.001$ vs HX and CTL), StAR ($p < 0.05$ vs HX y CTL), 5 α -RI ($p < 0.01$ vs HX) and 5 α -RII ($p < 0.001$ vs HX and CTL). Consistent with previous data, HX+PG animals did not develop allodynia.

Our results suggest that in the acute phase after injury, the increased expression of TSPO and 5 α -RII may represent a protective response against tissue injury, which is not maintained in the allodynic phase. PG may favor TSPO and StAR expression and the production of reduced metabolites, possibly responsible for the antiallodynic effects observed in hemisected animals treated with PG.

Tabla de Contenidos

Resumen	4
Abstract	6
Apéndice	10
1. Introducción	13
2. Antecedentes	15
2.1. Sistema nervioso y médula espinal	15
2.2. Dolor nociceptivo	17
2.2.1. Transducción	17
2.2.2. Transmisión	18
2.2.3. Modulación	20
2.2.4. Percepción	21
2.3. Dolor neuropático	21
2.4. Lesión de médula espinal y dolor neuropático	25
2.4.1. Modelos animales utilizados para el estudio del dolor neuropático causado por injurias de la médula espinal	27
2.5. Esteroides en el sistema nervioso	27
2.5.1. Neuroesteroidogénesis	28
2.5.2. Proteínas translocadoras y enzimas de la vía esteroideogénica	29
2.5.2.1. StAR y TSPO	29
2.5.2.2. P450 _{scc}	32
2.5.2.3. 3 β -HSD	33
2.5.2.4. 5 α -RI y 5 α -RII	32
2.5.2.5. 3 α -HSOR	34
2.5.3. Mecanismos de acción	35
2.5.4. Rol de la progesterona y sus metabolitos reducidos en injurias y enfermedades del sistema nervioso	37
2.5.5. Rol de la progesterona y sus metabolitos reducidos en modelos experimentales de dolor	38
3. Hipótesis	41
4. Materiales y Métodos	42
4.1. Animales de experimentación	42

4.1.1. Hemisección de la médula espinal y administración de progesterona	42
4.1.2. Pruebas funcionales para evaluar alodinia.....	43
4.1.2.1. Test de von Frey: Alodinia mecánica	43
4.1.2.2. Test de Choi: Alodinia térmica fría	46
4.2. Medición de expresión de proteínas translocadoras y enzimas de la vía esteroidogénica.....	46
4.2.1. Preparación de los tejidos	46
4.2.2. Extracción de ARN total.....	47
4.2.3. Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN	48
4.2.4. Retrotranscripción - Síntesis de ADNc	48
4.2.5. Diseño de oligonucleótidos para la RT-PCR en tiempo real.....	50
4.2.6. PCR en tiempo real.....	52
4.1.2.1. Determinación de los niveles de expresión relativos de las proteínas translocadoras y enzimas en estudio	59
5. Resultados	61
5.1. Curvas de rango dinámico de primers para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.....	61
5.2. Pruebas funcionales: Alodinia mecánica y térmica.....	63
5.3. Impacto de la lesión espinal sobre la expresión de proteínas translocadoras y enzimas esteroidogénicas	65
5.4. Efecto del tratamiento crónico con progesterona sobre los niveles de expresión de proteínas translocadoras y enzimas esteroideogénicas a 28 días	67
6. Discusión de los resultados	69
6.1. Perspectiva clínica del trabajo.....	75
7. Resumen de resultados y Conclusión.....	76
8. Bibliografía.....	77

Apéndice

3 α -HSOR: 3 α - hidroxisteroide oxido-reductasa

3 β -HSOR: 3 β - hidroxisteroide oxido-reductasa

3 α ,5 α -THP: 3 α ,5 α -tetrahidro-progesterona

3 β ,5 α -THP: 3 β ,5 α -tetrahidro-progesterona

3 β -HSD: 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa

5 α -DHP: 5 α -dihidro-progesterona

5 α -R: 5 α -reductasa

ASIC: canales iónicos sensibles a ácidos

AMP_C: adenosin monofosfato cíclico

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

Cyc B: ciclofilina B

COX-2: ciclooxigenasa-2

CRAC: consenso aminoacídico de reconocimiento de colesterol

Ct: Ciclo umbral

CTL: animales control, sin cirugía ni tratamiento

DEPC: dietil-pirocarbonato

DHDOC: dihidro-deoxicorticosterona

DHEA: dehidro-epiandrosterona

E: eficiencia

GABA: ácido gamma-aminobutírico

Glu: glutamato

Gly: glicina

HX: animales con hemisección espinal

HX+PG: animales con hemisección espinal tratados con progesterona

IL: interleuquina

iNOS: sintasa inducible del óxido nítrico

MAP-2: proteína 2 asociada a microtúbulos

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno

MME: membrana mitocondrial externa

MMI: membrana mitocondrial interna

mPR: receptor de membrana de progesterona

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

P450_{scc}: enzima de corte de la cadena lateral P450

PAP7: proteína 7 asociada a PKAR1 α

PG: progesterona

PGRMC1: componente 1 del receptor de membrana de progesterona

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PKA: proteína kinasa dependiente de adenosin monofosfato cíclico

PKAR1 α : subunidad R1 α de la PKA

PKC γ : proteína kinasa C gamma

PR: receptor intracelular de PG

PREG: pregnenolona

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

StAR: proteína reguladora esteroideogénica aguda

TNF α : factor de necrosis tumoral α

TRPs: receptores de potencial transitorio

TSPO: proteína translocadora de 18 kDa

VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje

“Imagínate un dolor enloquecedor cada vez que la ropa toca tu piel, una sensación de quemazón espontánea como agua hirviendo, una andanada de alfileres y agujas en tus pies al caminar, un dolor abrasador alrededor de todo tu cuerpo.”

(Costigan *et al.*, 2009)

Estos son solo algunos de los síntomas devastadores que experimentan los pacientes con dolor neuropático. Lamentablemente no existen terapias efectivas para el tratamiento de este dolor crónico por lo que resulta imperioso encarar estudios que permitan definir posibles blancos terapéuticos, así como evaluar abordajes novedosos.

1. Introducción

La nocicepción es el proceso neuronal mediante el cual se detectan y codifican los estímulos potencialmente dañinos para los tejidos. El dolor nociceptivo funciona como señal de alarma que advierte sobre la existencia de una injuria tisular real o potencial y activa respuestas destinadas a evitarla. Una vez resuelto el daño tisular el dolor se detiene (Basbaum *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2009).

Luego de una lesión o enfermedad del sistema nervioso, el sistema somatosensorial sufre cambios maladaptativos que conducen a un aumento de la excitabilidad de los circuitos nociceptivos y a una amplificación de la señal de dolor y como consecuencia las respuestas tanto a estímulos inocuos como nocivos son patológicamente amplificadas, generando dolor neuropático (Ducieux *et al.*, 2006; Dworkin *et al.*, 2003). De este modo, el dolor neuropático se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo (dolor en ausencia de estímulo), alodinia (dolor causado por estímulos inocuos) e hiperalgesia (dolor exacerbado causado por estímulos nocivos).

En el caso de la médula espinal, un traumatismo de columna puede causar compresión, contusión o bien generar fragmentos de huesos que lesionan e incluso pueden seccionar la médula. Se estima que cada año, entre 10.000 y 12.000 personas sufren injurias traumáticas de la médula espinal, tan sólo en Estados Unidos (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2008). Entre el 40 y el 60% de dichos pacientes, desarrolla dolor neuropático (Baasrup y Finnerup, 2008; Bajo *et al.*, 2006).

Desafortunadamente, la mayoría de las drogas disponibles hoy en día para el tratamiento del dolor neuropático son relativamente poco efectivas y acarrear numerosos efectos secundarios (O'Connor y Dworkin, 2009). Por lo tanto, el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas constituye un verdadero desafío para la investigación biomédica

Previamente, se ha demostrado que la progesterona (PG), un esteroide neuroactivo, podría representar una opción terapéutica para prevenir el desarrollo de dolor neuropático luego de una lesión espinal (Coronel *et al.*, 2011a; 2011b; 2014). Por otra parte, múltiples estudios han revelado la presencia y actividad biológica de importantes enzimas sintetizadoras de esteroides en el asta dorsal de la médula espinal (Julius y Basbaum, 2001; Millan, 2002; Willis *et al.*, 1995). Esta información sugiere que los neuroesteroides generados

en el asta dorsal, podrían controlar la integración de los mensajes somatosensoriales, incluyendo las señales nociceptivas.

Se propone en este trabajo el estudio de la maquinaria esteroideogénica en el SNC a fin de identificar nuevos blancos terapéuticos que permitan modular el dolor crónico de origen central. Nuestra hipótesis general es que proteínas translocadoras y enzimas involucradas en la biosíntesis de neuroesteroides podrían modificar sus niveles de expresión en la médula espinal dorsal luego de una lesión, y que dicha expresión se relacionaría con cambios en el umbral de dolor. A su vez, la administración de PG podría afectar la expresión de proteínas translocadores y enzimas esteroideogénicas necesarias para evitar la cronicidad del dolor generado a causa de una lesión.

Es nuestro objetivo primero evaluar la presencia de dolor neuropático en animales con lesión espinal mediante la utilización del Test de von Frey y el Test de Choi. En segundo lugar, determinar mediante RT-PCR¹ en tiempo real cambios temporales en la expresión de diversas proteínas translocadoras y enzimas involucradas en la vía de síntesis de esteroides en la médula espinal. Por último, evaluar el impacto de la administración de PG sobre la conducta nociceptiva de los animales lesionados y la expresión de las proteínas involucradas en la síntesis de esteroides en el tejido nervioso.

¹ RT-PCR: Retrotranscripción y posterior Reacción en Cadena de la Polimerasa

2. Antecedentes

A continuación se detallan los antecedentes que motivan este estudio acompañados de una breve descripción de los conceptos teóricos necesarios para la total comprensión de los mismos.

2.1. Sistema Nervioso y Médula Espinal

El sistema nervioso puede dividirse en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC incluye el encéfalo y la médula espinal. El SNP está constituido por todas las estructuras nerviosas externas al SNC, fundamentalmente los nervios que conectan el SNC con los diferentes órganos y sistemas (Drake *et al.*, 2010).

La médula espinal, tejido en el que hemos centrado nuestros estudios, ocupa los dos tercios superiores del conducto vertebral. Se extiende desde el agujero magno hasta aproximadamente el nivel del disco entre las vértebras L1 y L2 el hombre adulto y hasta la vértebra L3 en la rata (Hebel y Stromberg, 1986).

En un corte transversal de la médula espinal (Fig. 1) puede distinguirse claramente la sustancia gris, de localización central, y la sustancia blanca a su alrededor. La sustancia gris contiene cuerpos neuronales que forman columnas longitudinales a lo largo de la médula. En sección transversal, estas columnas tienen una apariencia característica en forma de H en la región central de la médula. La sustancia blanca rodea a la sustancia gris y es rica en procesos neuronales, los cuales forman grandes haces o tractos que ascienden y descienden hasta otros niveles medulares o transportan información desde o hacia el encéfalo. El canal central medular se extiende a lo largo de la médula espinal y está rodeado por sustancia gris.

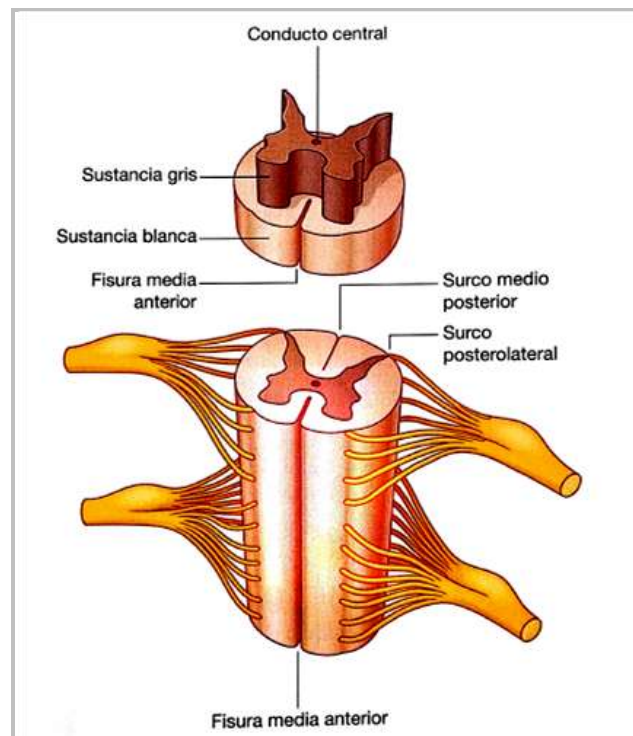


Figura 1: Anatomía de la médula espinal (Drake *et al.*, 2010).

La médula espinal se encarga de transmitir impulsos nerviosos entre el encéfalo y los nervios raquídeos (31 pares en humanos y 34 en ratas) (Hebel y Stromberg, 1986) que inervan los órganos y tejidos, mediante dos funciones básicas: la aferente, en la que son transmitidas las sensaciones del tronco, cuello y los cuatro miembros hacia el cerebro, y la eferente, en la que el cerebro ordena a los órganos efectores realizar determinada acción. Entre sus funciones también encontramos el control de movimientos inmediatos y vegetativos, como el acto reflejo, el sistema nervioso simpático y el parasimpático (Drake *et al.*, 2010).

Los nervios están constituidos por fibras sensitivas y fibras motoras. Las fibras sensitivas son las proyecciones periféricas de las neuronas aferentes primarias cuyos cuerpos se encuentran localizados en los ganglios raquídeos o ganglios anexos a la raíz dorsal (GARDs). Las neuronas aferentes primarias poseen una morfología única, llamada pseudounipolar, en la cual las terminales centrales y periféricas surgen de un mismo tallo axonal. La proyección periférica inerva piel, músculos, articulaciones, huesos y vísceras, y la proyección central termina en el asta dorsal de la médula (Basbaum y Jessell, 2000). De este modo, estas neuronas detectan y conducen información sobre estímulos inocuos y nocivos

(térmicos, mecánicos, químicos y propioceptivos²) desde los tejidos periféricos hacia el asta dorsal. Las fibras motoras constituyen los axones de las motoneuronas localizadas en el asta ventral de la médula y transportan información desde el SNC a los músculos esqueléticos, cardíacos y la musculatura lisa de las vísceras.

2.2. Dolor Nociceptivo

La nocicepción es el proceso neuronal mediante el cual se detectan y codifican los estímulos potencialmente dañinos para los tejidos. El dolor nociceptivo funciona como señal de alarma que advierte sobre la existencia de una injuria tisular real o potencial y activa respuestas destinadas a evitarla. Una vez resuelto el daño tisular el dolor se detiene (Basbaum *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2009).

La nocicepción comienza en los receptores periféricos, que son los encargados de detectar estímulos nocivos. La información sobre dichos estímulos es transmitida por las neuronas sensitivas, denominadas nociceptores, a la médula espinal y, de allí, hacia centros superiores como la corteza cerebral y el tálamo mediante las vías ascendentes. Por último, las diferentes áreas cerebrales procesan dicha información y modulan los circuitos nociceptivos espinales a través de vías descendentes (Pain Change, 2011). Por lo tanto, la médula espinal representa un sitio crucial para el procesamiento nociceptivo, donde se puede modular o incluso bloquear la transmisión de la información dolorosa.

Los 4 procesos (Zacharoff, 2007) que participan en la nocicepción son:

2.2.1. Transducción

Proceso por el cual las neuronas aferentes primarias reconocen los estímulos nocivos y transforman la información sobre los mismos en potenciales de acción. Los estímulos capaces de inducir una injuria tisular activan receptores específicos localizados en las terminaciones periféricas de las neuronas sensitivas. Estos receptores están presentes en grandes cantidades en la piel, pero también se encuentran en los músculos, el periostio, las cápsulas de los órganos internos y las paredes de los vasos y órganos huecos. En su mayoría, los nociceptores son polimodales, es decir, reaccionan frente a estímulos de diferentes modalidades: térmicos, mecánicos y químicos (Fig. 2). Para citar algunos ejemplos, los

² El término propiocepción hace referencia a la percepción de estímulos relacionados con la posición, postura, equilibrio o condiciones internas.

estímulos térmicos activan receptores de potencial transitorio (TRPs), los estímulos mecánicos actúan sobre receptores de la familia piezo y ciertas sustancias químicas activan canales iónicos sensibles a ácidos (ASICs).

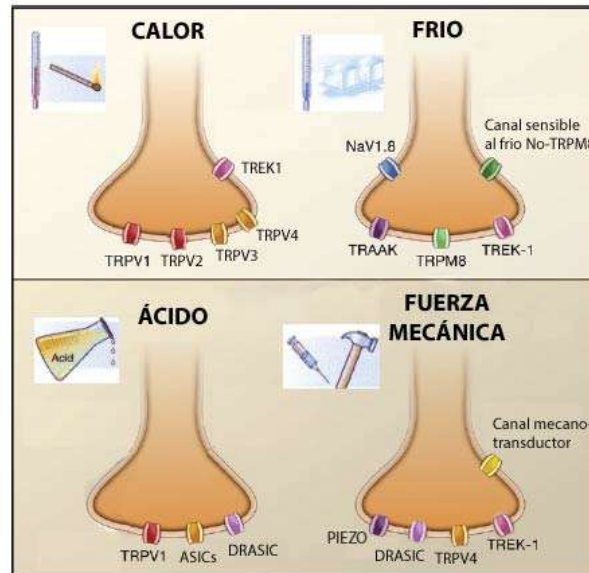


Figura 2: Diversidad de receptores y canales iónicos capaces de detectar estímulos potencialmente nocivos. Figura adaptada a partir de Basbaum *et al.* 2009.

2.2.2. Transmisión

Una vez detectados los estímulos potencialmente nocivos la información sobre los mismos es transmitida a través de las neuronas aferentes primarias hacia el asta dorsal de la médula espinal (Woolf y Ma, 2007), donde se lleva a cabo el primer procesamiento de la información nociceptiva (Fig. 3).

Las neuronas aferentes primarias dan origen a 3 tipos de fibras:

- Fibras C: fibras delgadas, amielínicas, de transmisión lenta. Son capaces de detectar estímulos nocivos de diferente índole (mecánicos, térmicos y químicos).
- Fibras Aδ: fibras de mediano calibre, con una fina vaina de mielina, de rápida transmisión. Transmiten información sobre estímulos térmicos inocuos y estímulos nocivos de las tres modalidades.

- Fibras A β : fibras de gran calibre, con una gruesa vaina de mielina, de alta velocidad de conducción. Transmiten información sobre estímulos mecánicos inocuos.

Las proyecciones centrales de las neuronas aferentes primarias penetran en el asta dorsal de la médula espinal y hacen sinapsis con neuronas de proyección, denominadas neuronas de segundo orden, e interneuronas locales. El asta dorsal está organizada en láminas anatómica y electrofisiológicamente distintas (Fig. 3) (Basbaum y Jessell, 2000). En las láminas I y II se encuentran las terminaciones de las fibras C, mientras que los nociceptores A δ se proyectan a las láminas I y V, y las fibras A β a las láminas III, IV y V.

Las neuronas de segundo orden son las encargadas de transmitir la información nociceptiva, principalmente a través del haz espinotalámico, hacia los centros supraespinales como la corteza somatosensorial primaria, el tálamo y los núcleos del sistema límbico (Basbaum *et al.*, 2009).

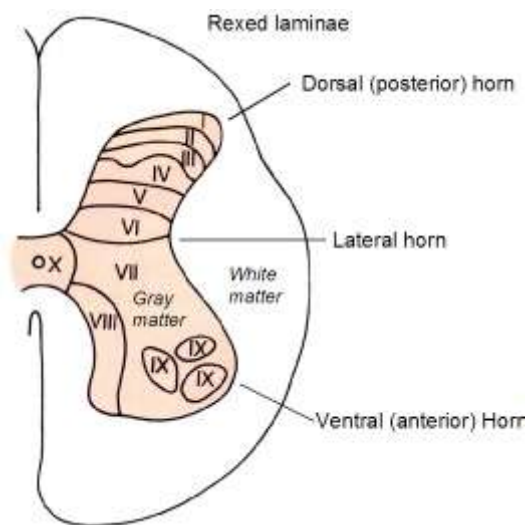


Figura 3: Esquema que representa las 10 láminas de Rexed en las que se divide la sustancia gris de la médula espinal. Las láminas I a VI corresponden al asta dorsal (área sensitiva). Las láminas VII a IX forman parte del asta ventral (área motora). La lámina X se encuentra rodeando el canal central.

La transmisión de información a lo largo de todo el circuito nociceptivo ocurre a través de la generación de potenciales de acción, con la activación de canales de sodio o potasio voltaje-dependientes (Basbaum *et al.*, 2009).

2.2.3. Modulación

Capacidad que tienen los sistemas pro- y anti-algésicos endógenos de modificar la transmisión de la señal de dolor. La modulación se lleva a cabo principalmente en el asta dorsal de la médula espinal, y es mediada por interneuronas locales de tipo excitatorio (liberan glutamato) o inhibitorio (liberan ácido gamma-aminobutírico, GABA). Los circuitos nociceptivos espinales también pueden ser modulados por vías descendentes facilitatorias e inhibitorias que transmiten las señales desde el cerebro (Fig. 4).

De este modo, el asta dorsal de la médula espinal constituye un sitio clave de modulación de la información nociceptiva, donde convergen terminales de neuronas aferentes primarias, neuronas de segundo orden, interneuronas locales, células gliales y fibras de control descendente.

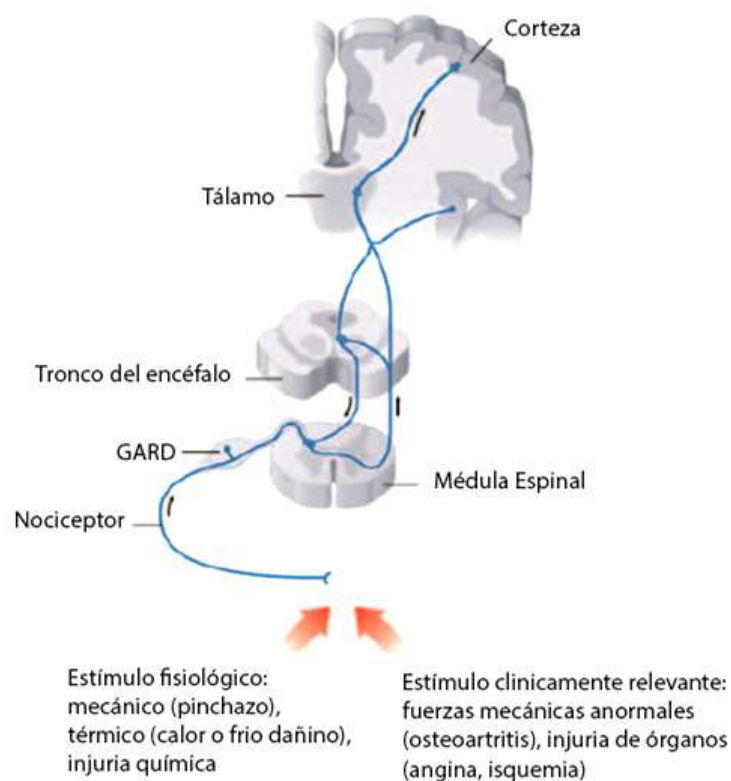


Figura 4: Vías de conducción de la información sobre estímulos nocivos. Imagen tomada de Costigan *et al.*, 2009.

2.2.4. Percepción

Proceso final en el cual se procesa la información sobre el estímulo nocivo en el cerebro y se genera la experiencia sensitiva y emocional que constituye el dolor.

Son varias las estructuras del cerebro involucradas en el procesamiento y la percepción del dolor (Fig. 5). Las más relevantes son:

- El tálamo, que actúa como estación de transmisión y envío de señales a distintas áreas del cerebro, incluida la corteza cerebral.
- La corteza cerebral, en donde se produce la percepción del estímulo nocivo, se genera y se hace consciente la sensación de dolor; procesa los aspectos sensitivos discriminativos relacionados al dolor.
- La sustancia gris periacueductal, la cual interviene en la modulación descendente de los circuitos espinales y en la conducta de defensa.
- El sistema límbico, que regula las emociones relacionadas al dolor (tristeza, enojo, etc.).

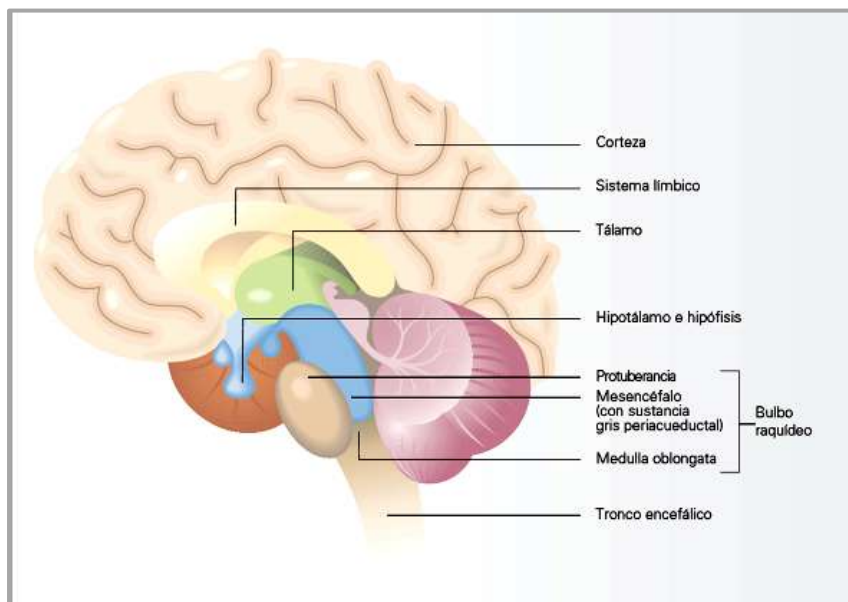
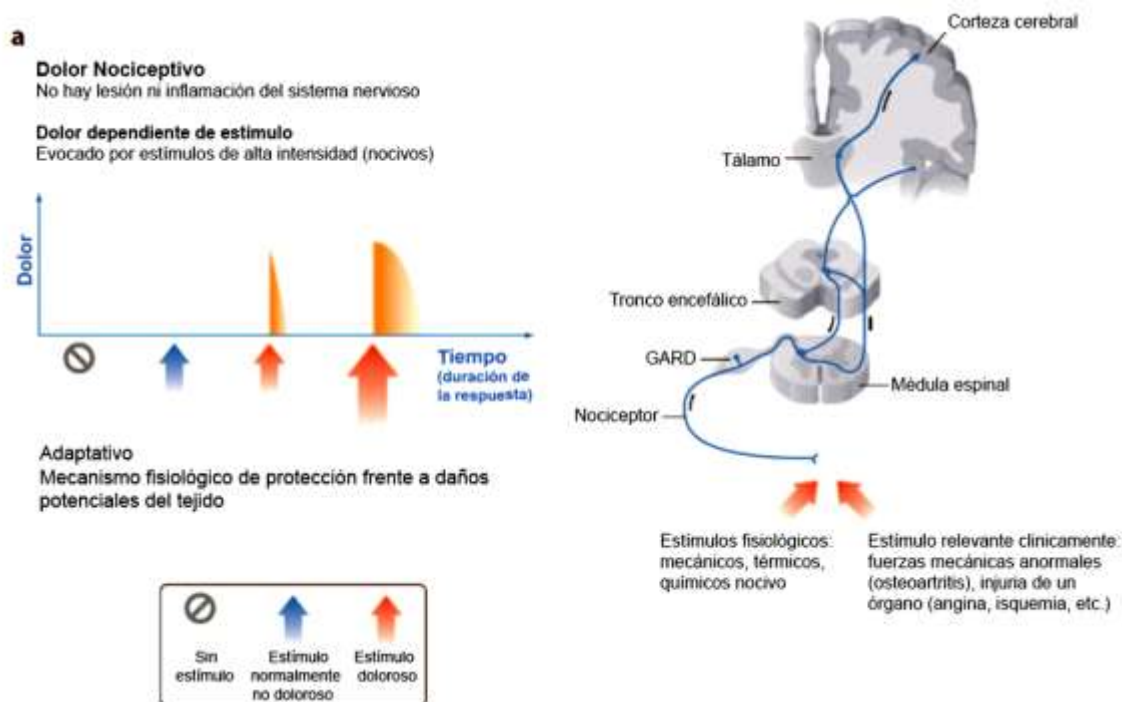


Figura 5: Estructuras cerebrales involucradas en el procesamiento del dolor. Imagen tomada de Pain Change, 2011.

2.3. Dolor Neuropático

Cuando el sistema somatosensorial sufre una lesión o enfermedad ocurren múltiples cambios que conducen a un aumento de la excitabilidad de los circuitos

nociceptivos y a la generación de dolor neuropático (Ducreux *et al.*, 2006; Dworkin *et al.*, 2003) (Fig. 6). Dichas lesiones pueden deberse a injurias traumáticas, enfermedades metabólicas (diabetes), químicos neurotóxicos (drogas antitumorales), infecciones (herpes zóster o HIV), enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple) o la presencia de tumores. En todos los casos, los cambios maladaptativos que ocurren en el sistema somatosensorial conducen a una amplificación de la señal de dolor y como consecuencia las respuestas tanto a estímulos inocuos como nocivos son patológicamente amplificadas, generando dolor crónico (Fig. 6). De este modo, el dolor neuropático se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo (dolor en ausencia de estímulo), alodinia (dolor causado por estímulos inocuos) e hiperalgesia (dolor exacerbado causado por estímulos nocivos).



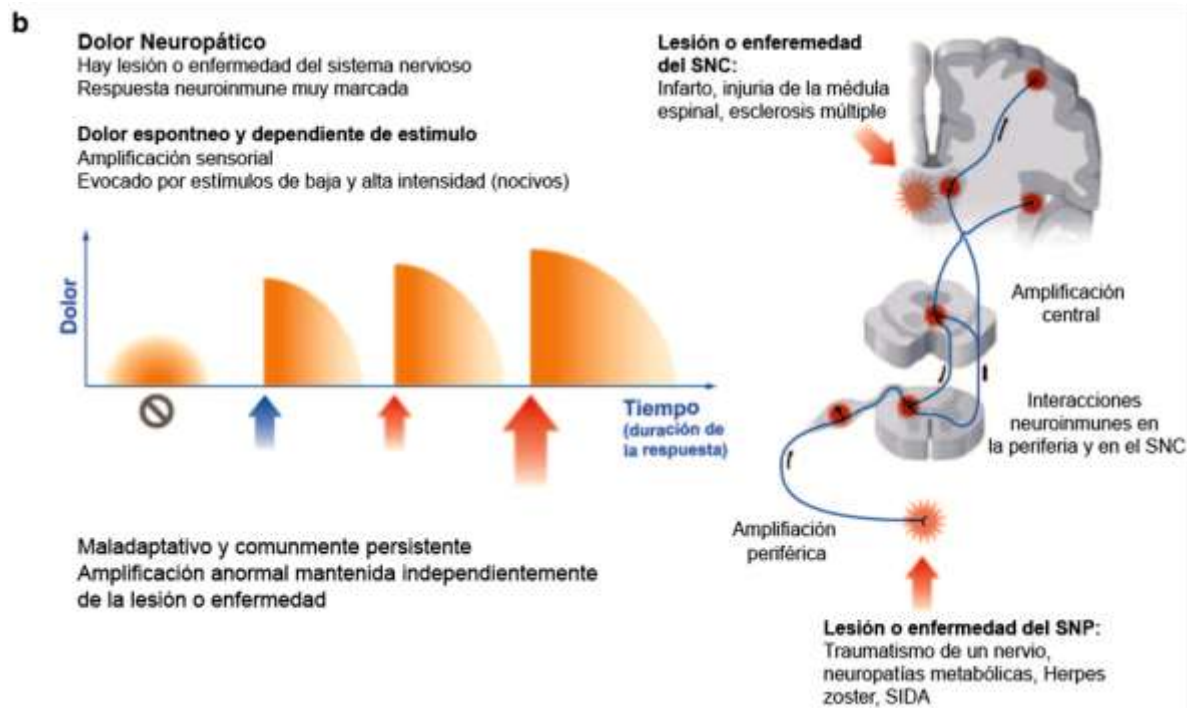


Figura 6: Características que diferencian al dolor nociceptivo del dolor neuropático. (a) El dolor nociceptivo es una respuesta fisiológica frente a estímulos nocivos y (b) el dolor neuropático es un dolor crónico que se desencadena luego de una injuria del sistema nervioso.

Imagen tomada de Costigan *et al.*, 2009.

Desafortunadamente, la mayoría de las drogas disponibles hoy en día para el tratamiento del dolor neuropático son poco efectivas y acarrear numerosos efectos secundarios. Se ha observado que en ensayos clínicos aleatorizados en los que se evaluó la efectividad de los tratamientos, menos del 50% de los pacientes con dolor neuropático experimentaron alivio de los síntomas (O'Connor y Dworkin, 2009). El descubrimiento de nuevas estrategias o de moléculas analgésicas capaces de tratar eficazmente los dolores resistentes constituye un verdadero desafío para la investigación biomédica. Es importante considerar que las enfermedades primarias y el daño neuronal causado por ellas son simples iniciadores de las cascadas de cambios que originan y mantienen el dolor neuropático. Aunque los tratamientos dirigidos a la enfermedad de base son esenciales, tratar los mecanismos responsables de la plasticidad maladaptativa de los circuitos nociceptivos ofrece oportunidades terapéuticas específicas para prevenir y revertir el dolor neuropático (Costigan *et al.*, 2009).

En el dolor neuropático, la amplificación de la señal de dolor puede ocurrir tanto a nivel periférico como central (Basbaum *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2009). Los principales mecanismos involucrados se mencionan a continuación:

- Activación de nociceptores silentes: estos receptores sólo se activan tras inflamación o lesión tisular, y una vez activados responden a una gran variedad de estímulos.
- Descargas espontáneas y repetitivas de los axones injuriados.
- Cambios en el fenotipo de las neuronas aferentes primarias.
- Aumento de la excitabilidad de las neuronas de proyección del asta dorsal, mediada por un aumento de la neurotransmisión glutamatérgica a través del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (Fig 7.1).
- Pérdida de la inhibición de los circuitos espinales mediada por interneuronas locales que liberan GABA y glicina (Gly), con la consiguiente amplificación de la respuesta frente a estímulos inocuos (alodinia) y nocivos (hiperalgesia) (Fig. 7.2).
- Activación de células gliales (astrocitos y microglia) que liberan factores proalgésicos (citoquinas como factor de necrosis tumoral (TNF α), interleuquinas 1 β y 6 (IL-1 β , IL-6), entre otros) que aumentan la excitabilidad neuronal (Fig. 7.3).

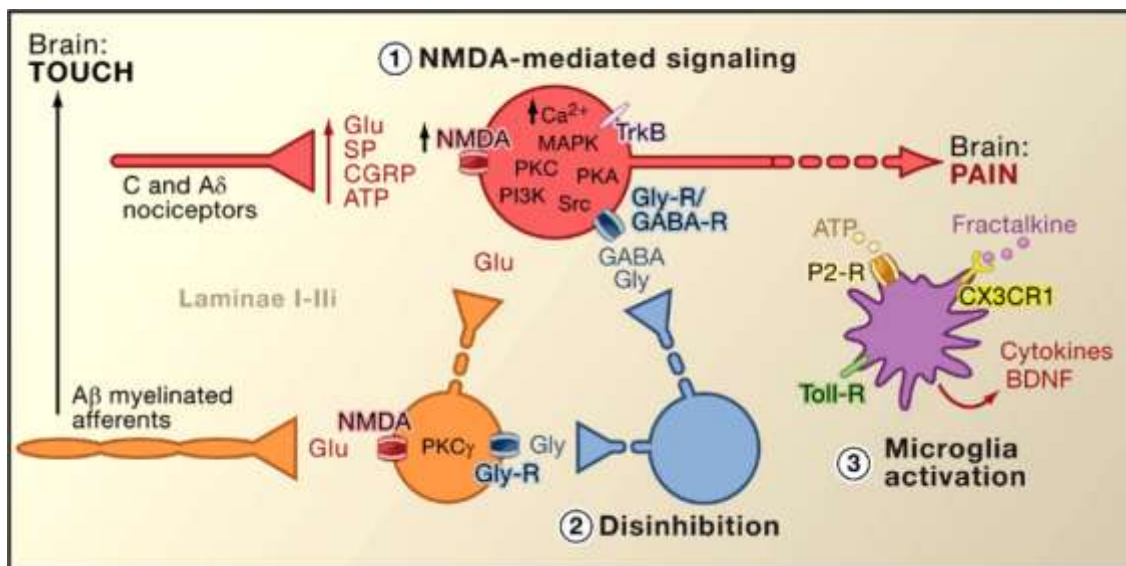


Figura 7: Sensibilización Central. (1) Aumento de la excitabilidad de las neuronas de proyección (rojo) mediado por el glutamato (Glu) y su receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA). (2) Pérdida de la inhibición mediada por las interneuronas inhibitorias (azul) que expresan ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glicina (Gly), aumentando la excitabilidad

de las neuronas de proyección (rojo) y las interneuronas excitatorias (naranja). (3) Activación de astrocitos y células de la microglia (púrpura) (Basbaum *et al.*, 2009).

2.4. Lesión de Médula Espinal y Dolor Neuropático

Como se mencionó anteriormente, el dolor neuropático se desencadena luego de una lesión o enfermedad del sistema nervioso. En el caso de la médula espinal, un traumatismo de columna puede causar compresión, contusión o bien generar fragmentos de huesos que lesionan e incluso pueden seccionar la médula, o bien ser seccionada directamente (por ejemplo, por arma de fuego o arma blanca en actos de violencia). Se estima que cada año, entre 10.000 y 12.000 pacientes sufren injurias traumáticas de la médula espinal, tan sólo en Estados Unidos (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2008). Entre el 40 y el 60% de dichos pacientes, desarrolla dolor neuropático que resulta resistente a la terapias disponibles (Baastrup y Finnerup, 2008; Bajo *et al.*, 2006).

La lesión de la médula espinal interrumpe completa o parcialmente la comunicación sensorial y motora dentro del SNC y entre el SNC y el SNP (Smeltzer, 2007). El nivel medular lesionado determinará las funciones sensitivas y motoras afectadas (Fig. 8). Mientras más alta sea la lesión a nivel de la médula espinal, mayor será la pérdida funcional del individuo (Shepherd Center & KPKinteractive, 2012). Lo más probable es que por debajo del nivel de la lesión se desarrollen alteraciones motoras como debilidad o parálisis. Estos pacientes también presentan alteraciones de la sensibilidad, tanto por debajo como por arriba del sitio de la lesión, que incluyen síntomas negativos, como pérdida de la sensibilidad, y síntomas positivos, como dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia (Akiskal *et al.*, 2013).



Figura 8: Se pueden observar las áreas corporales inervadas por los nervios correspondientes a cada sección de la médula. Según el nivel donde ocurra la lesión espinal, será la zona corporal afectada. En la parte inferior de la figura se muestran las regiones afectadas según la localización de la lesión (azul). Adaptado de Fundación Humanista de Ayuda a Discapacitados (FHADI), 2012.

Las personas que padecen este tipo de lesiones sufren de estados de depresión profundos a causa de la cronicidad de sus dolores. Se estima que en Estados Unidos se utilizan alrededor de \$4 mil millones cada año para el cuidado de los individuos afectados (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2008). Por lo tanto, este tipo de dolor

neuropático constituye un verdadero problema para la salud pública, ya que genera severos padecimientos en los individuos afectados y enormes consecuencias socio-económicas. Como ya se mencionó, lamentablemente, las terapias disponibles para el tratamiento del dolor neuropático son poco efectivas y tienen serios efectos adversos.

2.4.1. Modelos Animales utilizados para el estudio del Dolor Neuropático causado por Injuria de la Médula Espinal

El uso de modelos animales de experimentación es importante a la hora de desarrollar nuevas terapias dirigidas a reparar las lesiones de la médula espinal y mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados. Existen distintos modelos para el estudio del dolor neuropático en casos de injuria de la médula espinal (Mills *et al.*, 2001b). Los más utilizados son el modelo de contusión (Hulsebosch *et al.*, 2000) y el de hemisección espinal (Christensen *et al.*, 1996). En este trabajo se utilizó la técnica de hemisección espinal en T13 desarrollada por Claire E. Hulsebosch y colaboradores (cols.) en ratas Sprague-Dawley, modelo experimental que conduce a la generación de alodinia mecánica y térmica (Christensen *et al.*, 1996). Este modelo de dolor crónico no requiere de la utilización de artefactos complejos como una máquina de impacto o dispositivos laser para su realización, es reproducible y permite generar un grupo homogéneo para el estudio de los mecanismos involucrados en el dolor neuropático. A su vez, éste tipo de lesión permite que el animal recupere la movilidad de sus patas traseras de forma que se puedan realizar las pruebas funcionales para estudiar la presencia de alodinia (Christensen *et al.*, 1996; Junseun *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2001b). Los procedimientos para la generación de éste tipo de lesión se encuentran detallados en la sección de “Materiales y Métodos”.

2.5. Esteroides en el Sistema Nervioso

El término neuroesteroide designa a los esteroides sintetizados en el sistema nervioso y que persisten aún después de la ablación de las glándulas esteroideogénicas como las suprarrenales, los ovarios y los testículos (Baulieu *et al.*, 1999; Mensah-Nyagan *et al.*, 1999). Por otro lado se denominan esteroides neuroactivos a todos aquellos que ejercen un efecto sobre las células nerviosas, tanto aquellos producidos por el sistema nervioso o por las glándulas periféricas, como así también aquellos esteroides sintéticos que son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica luego de su administración (Melcangi *et al.*, 2008; Paul

et al., 1992). En el sistema nervioso, los esteroides neuroactivos actúan como reguladores fisiológicos de la función nerviosa, del desarrollo y de la plasticidad neuronal y glial (Melcangi *et al.*, 2014; Schumacher *et al.*, 2004). En relación al dolor se ha demostrado que tanto esteroides endógenos como administrados exógenamente participan en los mecanismos de nocicepción y dolor crónico en animales de experimentación (Coronel *et al.*, 2011b; Leonelli *et al.*, 2007; Mensah-Nyagan *et al.*, 2009).

2.5.1. Neuroesteroidogénesis

Uno de los principales hechos que permiten demostrar la biosíntesis de neuroesteroides es la presencia y actividad biológica de enzimas claves para la esteroidogénesis en las células del sistema nervioso (Baulieu *et al.*, 1999). En ese sentido, se ha identificado la presencia de diferentes enzimas que participan en la síntesis de esteroides como la enzima de corte de la cadena lateral P450 (P450_{scc}, también conocida como CYP11A1), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 5α-reductasa (5α-R) y 3α-hidroxiesteroide oxido-reductasa (3α-HSOR) (Baulieu *et al.*, 1999; Mensah-Nyagan *et al.*, 1999) (Fig. 9).

La neuroesteroidogénesis es llevada a cabo en neuronas y células de la glia del SNC (astrocitos, oligodendrocitos y microglia) y del SNP (células de Schwann) (Melcangi *et al.*, 2008; Panzica y Melcangi, 2008; Pelletier, 2010; Wei *et al.*, 2013). Es un proceso que se encuentra altamente compartimentalizado, en una secuencia de reacciones cuyo primer paso es la translocación del colesterol desde el citoplasma a la matriz mitocondrial (Fig. 9). Este es el paso limitante, controlado y mediado por la proteína reguladora esteroidogénica aguda (StAR) (Lavaque *et al.*, 2006) y la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO) (Papadopoulos *et al.*, 2006a). Una vez en la mitocondria, el colesterol es convertido en pregnenolona (PREG) por medio de la acción de la P450_{scc}. La PREG mediante vías metabólicas alternativas puede dar origen a andrógenos, estradiol o PG. En este punto, y teniendo en cuenta los resultados previos del laboratorio, haremos especial foco en las vías de síntesis y de reducción de la PG. La PG es sintetizada a partir de PREG gracias a la acción de la enzima 3β-HSD (Melcangi *et al.*, 2008). A continuación, la PG es reducida a 5α-dihidroprogesterona (5α-DHP) por la acción de la enzima 5α-R (existen dos isoformas: 5α-RI en la sustancia blanca y 5α-RII en la sustancia gris y blanca). Luego, la 5α-DHP es reducida a 3α,5α-tetrahydro-progesterona (3α,5α-THP o alopregnenolona) o a 3β,5α-tetrahydro-progesterona (3β,5α-THP o

isopregnenolona) por medio de la 3α -HSOR o la 3β -HSOR respectivamente (Melcangi *et al.*, 2008).

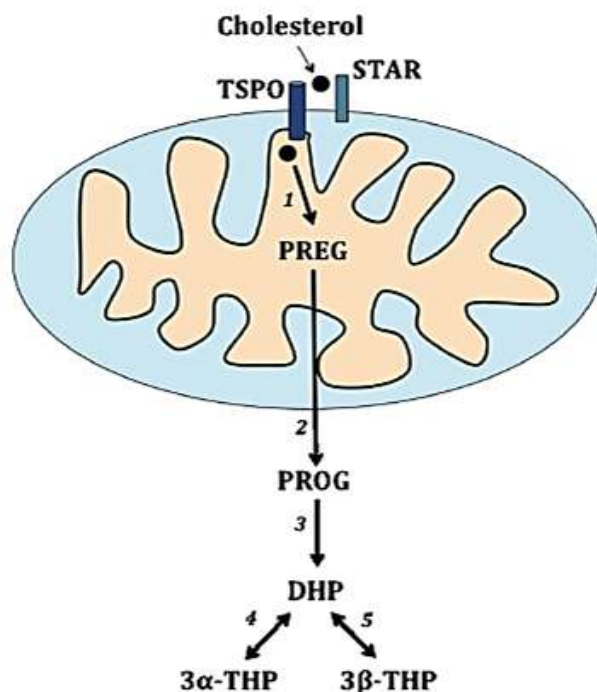


Figura 9: Biosíntesis de esteroides en el sistema nervioso. El colesterol ingresa a la mitocondria por acción de las proteínas StAR y TSPO, y por acción de la enzima de cadena lateral P450 (1) se sintetiza pregnonolona (PREG). La PREG se transloca al citoplasma y la enzima 3β -HSD (2) media su conversión a progesterona (PROG). Luego, PG pasa a 5α -DHP (DHP) por medio de la acción de la enzima 5α -R (3). Finalmente, las enzimas 3α -HSOR (4) y 3β -HSOR (5) sintetizan 3α - 5α -THP (3α -THP) y 3β - 5α -THP (3β -THP) respectivamente.

Figura adaptada a partir de Melcangi *et al.*, 2008.

2.5.2. Proteínas translocadoras y enzimas de la vía esteroidogénica

2.5.2.1. StAR y TSPO

Se ha demostrado que la translocación de colesterol desde la membrana mitocondrial externa (MME) a la membrana mitocondrial interna (MMI) es el paso limitante de la esteroidogénesis (Simpson y Waterman, 1983; Jefcoate *et al.*, 2002). Por lo tanto, la capacidad del colesterol para ingresar a la mitocondria y así estar disponible para la enzima P450_{sc}, determina la eficiencia de la producción de esteroides. En este mecanismo, dos

proteínas localizadas en la membrana mitocondrial, StAR (Lavaque *et al.*, 2006) y TSPO (Papadopoulos *et al.*, 2006a), tienen un rol activo.

StAR se sintetiza como una proteína de 37-kDa, que es rápidamente transportada a la mitocondria en donde se cliva generando una forma madura intramitocondrial de 30-kDa la cual se encuentra inactiva y es posteriormente activada por fosforilación dependiente de PKA³ (Arakane *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2014). La expresión de StAR parece estar restringida a poblaciones neuronales y astrogiales muy específicas del SNC (Sierra, 2003). En el SNP, StAR se expresa en células de Schwann (Benmessahel *et al.*, 2004). El dominio de unión a esteroides de StAR juega un papel importante en la unión a colesterol y a lípidos (Alpy y Tomasetto, 2005). Esta secuencia de 210 aminoácidos forma un canal hidrofóbico que posee una alfa hélice en su C-terminal la cual puede contener un esteroide (Fig. 10A) (Strauss *et al.*, 2003). StAR es capaz de unir moléculas de colesterol en una relación de 1:1 para facilitar su traspaso al interior de la membrana mitocondrial (Tsujiyama y Hurley, 2000).

TSPO es una proteína de la MME, localizada en los sitios de contacto entre la MME y la MMI. Se expresa en el SNC y el SNP, tanto en las células gliales como neuronas (Veiga *et al.*, 2005). Atraviesa la MME con sus 5 alfa hélices que conforman un canal (Fig. 10B) con superficie interna hidrofílica pero sin carga (Lacapere *et al.*, 2001). La TSPO promueve la neurosteroidogénesis permitiendo la translocación de moléculas de colesterol a través de la MMI (Rupprecht *et al.*, 2010). Puede unirse a moléculas de colesterol gracias a que la proteína posee un consenso aminoacídico de reconocimiento de colesterol (CRAC) (conformado por residuos de Leucina / Tirosina / Arginina) en la región C-terminal (Fig. 10 C y D) (Li *et al.*, 2001). Se ha reportado que la activación de TSPO resulta beneficiosa en enfermedades neurológicas como, esclerosis múltiple (Papadopoulos *et al.*, 2006b; Vowinckel *et al.*, 1997) y en la enfermedad de Alzheimer (Yasuno *et al.*, 2008) y en injurias de nervios periféricos (Wei *et al.*, 2013) mediante la inducción de la síntesis de neuroesteroides (Rupprecht *et al.*, 2010). El aumento en la expresión de TSPO luego de una injuria del SNC se encuentra principalmente limitada a la microglía y astrocitos (Kassiotou *et al.*, 2005). Estudios en células productoras de esteroides y en mitocondrias aisladas demostraron que la

³ PKA: proteína quinasa dependiente de adenosin monofosfato cíclico (AMP_c)

producción de PREG aumenta en presencia de agonistas de TSPO (Mukhin *et al.*, 1989; Papadopoulos *et al.*, 1990).

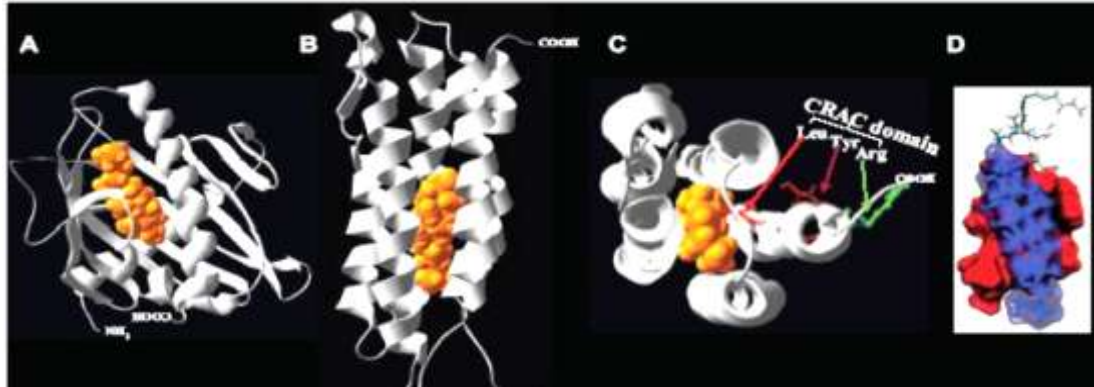


Figura 10: Dominios de unión a colesterol de StAR y TSPO. A) La proteína StAR humana (blanca) unida a colesterol (amarillo) por medio de su dominio de unión a esteroides. B) Modelo molecular de cinco hélices alfa de TSPO en presencia de colesterol, mostrando como su poro aloja una molécula de colesterol. C) Diagrama de cinta del dominio de TSPO de unión a colesterol, mostrando las cinco hélices, así como el dominio del consenso aminoacídico de reconocimiento de colesterol CRAC y el colesterol (vista superior). D) Modelo de acoplamiento de colesterol para el dominio TSPO-CRAC. La superficie accesible de las moléculas de péptidos y el colesterol se representan en rojo y azul, respectivamente (Jamin *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que la función principal de StAR es el transporte de colesterol inducido por hormona a la MME, mientras que la TSPO regula la translocación del colesterol a la MMI (Bose *et al.*, 2002; Garnier *et al.*, 1994; Rone *et al.*, 2009). Hoy en día se conoce como transduceosoma a un complejo multiprotéico que controla la tasa de entrada de colesterol en la MME (Fan y Papadopoulos, 2013; Issop *et al.*, 2013; Rone *et al.*, 2009). Este complejo mitocondrial de 240-kDa está formado por TSPO, subunidad RI α de la PKA (PKARI α), proteína 7 asociada a PKARI α (PAP7) (Liu *et al.*, 2003), StAR y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC⁴) (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006). La formación del transduceosoma se inicia por la estimulación hormonal y la subsecuente señalización de la cascada de AMP_C. En una forma dependiente de AMP_C, PAP7 es

⁴ VDAC: proteína multifuncional reguladora de la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas a través de la MME, la cual determina el potencial de membrana asistiendo en la regulación de la apoptosis y el metabolismo celular (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2008)

transportada desde el aparato de Golgi a la mitocondria, donde TSPO redistribuye su conformación de manera que PAP7 y PKAR1 α pueden interactuar con ella. Mediante esta unión, PAP7 puede transducir la elevada concentración de señales de AMP_C al resto del transduceosoma. Finalmente, StAR es activada por fosforilación gracias a PKA y permite la formación completa del transduceosoma STAR-PKAR1 α -PAP7-TSPO. De esta forma, el colesterol es transportado y anclado en la MME mediante StAR y la asociación de TSPO con los sitios de contacto entre la MME y la MMI, derivan en el transporte de colesterol al interior de la mitocondria y la subsecuente formación de esteroides (Fan y Papadopoulos, 2013; Issop *et al.*, 2013; Rone *et al.*, 2009).

2.5.2.2. P450scc

Cuando el colesterol llega a la matriz mitocondrial, es sustrato de la enzima P450scc que lo convierte en PREG. Por medio de técnicas de clonado molecular, se reveló la existencia de un solo gen que codifica P450scc en el genoma humano y en el de rata (Chung *et al.*, 1986; Oonk *et al.*, 1990). Mediante inmunohistoquímica se detectó la presencia de P450scc en la sustancia blanca del cerebro de la rata. A su vez, experimentos bioquímicos por cultivo primario de células gliales cerebrales demostraron la conversión de colesterol a PREG en las mismas (Jung-Testas *et al.*, 1989; Le Goascogne *et al.*, 1987). Los primeros trabajos que mostraron la expresión de P450scc en la médula espinal fueron los de Mellon y cols. realizados en embriones de roedores (Compagnone *et al.*, 1995). Estos autores informaron la expresión de P450scc en las estructuras sensoriales del SNC, incluyendo el ganglio de la raíz dorsal, el trigémino y preganglio facio-acústico, y mencionaron la existencia de P450scc en el asta ventral de la médula espinal de embriones de roedores. La expresión de esta enzima también se ha localizado en las células de Schwann de los nervios periféricos (Schumacher *et al.*, 2004).

Patte-Mensah y cols. describieron la distribución anatómica y celular de P450scc en la médula espinal de ratas adultas (Patte-Mensah *et al.*, 2003). La mayor densidad de inmunomarcación de P450scc se localiza en las láminas superficiales I y II del asta dorsal de la médula espinal, donde se encuentran las neuronas sensoriales (Patte-Mensah *et al.*, 2003). Experimentos de doble marcaje revelaron que la mayoría de las fibras P450scc-positivas en el asta dorsal también son inmunorreactivas para la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2), un marcador específico para las fibras neuronales. Las motoneuronas

del asta ventral también expresan inmunoreactividad para P450_{scc}, lo que sugiere un posible papel de la enzima o sus productos esteroideos en el control de la actividad motora (Patte-Mensah *et al.*, 2003). Por otra parte, se detectó inmunotinción de P450_{scc} en las células gliales ependimales que rodean el canal central en la médula espinal, una observación que sugiere una posible producción y liberación de neuroesteroideos en el líquido cefalorraquídeo y su participación en mecanismos de modulación del dolor y neuroprotección en el SNC (Patte-Mensah *et al.*, 2003). Además se identificaron cuerpos celulares P450_{scc}-inmunorreactivos en varios núcleos nociceptivos del tronco cerebral de la rata adulta. A través de experimentos bioquímicos que muestran que los homogenatos de médula espinal y tallo cerebral de la rata son capaces de convertir colesterol en PREG, se ha demostrado que la enzima P450_{scc} detectada en cerebro y médula corresponde a una forma activa (Patte-Mensah *et al.*, 2003).

2.5.2.3. 3 β -HSD

Una vez sintetizada, la PREG sale de la mitocondria y es sustrato de la enzima 3 β -HSD que reside en el retículo endoplasmático y sintetiza PG. Esta enzima también cataliza la conversión de 17OH-pregnenolona en 17OH-progesterona y de dehidroepiandrosterona (DHEA) en androstenediona.

La primera demostración de la presencia de ARNm de 3 β -HSD en la médula espinal de ratas fue realizada utilizando RT-PCR (Sanne y Kruger, 1995). Un estudio posterior realizado por Coirini y cols. utilizando hibridación in-situ, proporcionó la distribución anatómica y celular del ARNm de 3 β -HSD en la médula espinal (Coirini *et al.*, 2002). Este estudio reveló que las láminas I, II y III del asta dorsal exhibían las mayores densidades de ARNm de esta enzima. A nivel celular, el ARNm de la 3 β -HSD fue encontrado principalmente en neuronas sensoriales del asta dorsal y en motoneuronas de asta ventral en todos los segmentos de la médula espinal. A su vez, la existencia y actividad de esta enzima fue evidenciada mediante ensayos de Western-blot y cromatografía de gases ligada a espectrometría de masas, que revelaron que la concentración de PREG y PG eran mayores en la médula espinal que en el plasma (Coirini *et al.*, 2002), sugiriendo la producción local de PG.

2.5.2.4. 5 α -RI y 5 α -RII

La enzima 5 α -R es responsable de la reducción de PG en 5 α -DHP, metabolito con múltiples actividades neuroprotectoras. De una manera similar, 5 α -R reduce testosterona en 5 α -DHT y 11-deoxicorticosterona en dihidro-deoxicorticosterona (DHDOC) (Andersson y Russell, 1990).

En muestras humanas y de rata se han aislado dos isoformas de 5 α -R, designadas tipo 1 (5 α -RI) y tipo 2 (5 α -RII) (Andersson y Russell, 1990; Berman y Russell, 1993). Los genes que codifican las 5 α -RI y 5 α -RII se encuentran en el cromosoma 5 y 2 respectivamente; las dos isoenzimas tienen diferentes pH óptimos y distinta afinidad por sustratos (Normington y Russell, 1992).

La expresión de 5 α -R en el sistema nervioso ha sido ampliamente estudiada (Melcangi *et al.*, 1993; Pelletier *et al.*, 1994; Saitoh *et al.*, 1982; Stoffel-Wagner, 2003). Se ha sugerido que 5 α -RI juega un papel catabólico y neuroprotector, mientras que 5 α -RII participa en la diferenciación sexual del SNC (Torres y Ortega, 2003). En la médula espinal de rata predomina la isoforma 5 α -RII (Pozzi *et al.*, 2003). La inmunorreactividad para ambas isoenzimas se ha detectado en la sustancia blanca de la médula espinal, desde la región cervical a la sacra. Sin embargo, la inmunotinción para 5 α -RI es menor y los cuerpos celulares y las fibras que contienen esta isoenzima se observan principalmente en la sustancia blanca de los segmentos cervicales y torácicos (Melcangi *et al.*, 2008). La inmunomarcación de 5 α -RII, moderada en la sustancia blanca, es intensa en la sustancia gris del asta dorsal y ventral (Patte-Mensah *et al.*, 2004). En un estudio de colocalización con marcadores específicos de células nerviosas se reveló que la inmunotinción de 5 α -RI se localiza principalmente en los oligodendrocitos y astrocitos de la sustancia blanca, mientras que la inmunotinción de 5 α -RII se localiza tanto en neuronas como en células gliales de la sustancia gris y blanca (Patte-Mensah *et al.*, 2004). La observación de una restringida localización de 5 α -RI en la sustancia blanca de la médula espinal concuerda con su localización en estructuras mielinizadas del cerebro de ratas hembra y macho (Poletti *et al.*, 1997; Melcangi *et al.*, 1988).

2.5.2.5. 3 α -HSOR

La enzima 3 α -HSOR convierte, de manera reversible 5 α -DHP en 3 α ,5 α -THP. Del mismo modo, 3 α -HSOR cataliza la conversión reversible de 5 α -DHT en 3 α -androstenediol y de DHDOC en tetrahydro-deoxicorticosterona (THDOC). La enzima 3 α -

HSOR es un miembro de la superfamilia de aldo-ceto-reductasas que incluye aldehído-reductasas, aldo-reductasas y dihidrodiol-deshidrogenasas (Jez *et al.*, 1997; Jez y Penning, 2001). Hay cuatro isoenzimas 3α -HSOR en humanos.

La actividad enzimática de 3α -HSOR y su ARNm codificante, han sido detectados en el cerebro (Stoffel-Wagner, 2003) y en médula espinal (Patte-Mensah *et al.*, 2004). En todos los niveles espinales se ha detectado una intensa inmunoreactividad para 3α -HSOR en la sustancia gris y blanca. Sin embargo, la mayor densidad de inmunotinción de 3α -HSOR se encuentra en áreas sensoriales del asta dorsal. Este estudio también reveló que el 45% de la inmunofluorescencia de 3α -HSOR se localiza en los oligodendrocitos, 35% en las neuronas y 20% en los astrocitos (Patte-Mensah *et al.*, 2004).

Un análisis comparativo de la expresión de 5α -RI, RII y los elementos 3α -HSOR-positivos en la médula espinal, revela tres situaciones diferentes: (i) cuerpos neuronales y fibras que expresan tanto 3α -HSOR como 5α -R; (ii) cuerpos neuronales que expresan ya sea 5α -RI o RII y (iii) cuerpos celulares que solamente expresan 3α -HSOR (Patte-Mensah *et al.*, 2004). En consecuencia, parecería que algunas células gliales y neuronas de la médula espinal contienen ambos tipos de enzimas, 3α -HSOR y 5α -R, pudiendo catalizar la reducción requerida para la biosíntesis de esteroides 5α -reducidos. Los esteroides 5α -reducidos, mediante la modulación alostérica de los receptores GABA_A, controlan mecanismos neurobiológicos incluyendo nocicepción, dolor y locomoción (Majewska, 1992; Patte-Mensah *et al.*, 2004; 2005). La producción de estos esteroides puede implicar la cooperación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, que contengan una sola de las enzimas mencionadas: 3α -HSOR o 5α -R. Esta cooperación puede ocurrir durante condiciones fisiológicas y patológicas (Melcangi *et al.*, 1998; Melcangi *et al.*, 2008).

2.5.3. Mecanismos de acción

Además de ejercer las acciones genómicas clásicas de los esteroides sobre el control de la transcripción de diversos genes, los neuroesteroides también modulan la actividad neuronal vía receptores de membrana acoplados a proteína G o a través de receptores para neurotransmisores como los receptores GABA_A, NMDA, P2X y los canales de calcio tipo T (Basbaum *et al.*, 2009; Belelli y Lambert, 2005; Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2009; Mellon *et al.*, 2002; Pathirathna *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2003).

En particular, tanto PG como 5α -DHP regulan la transcripción de genes por medio de la unión al receptor intracelular de PG (PR), el cual se expresa ampliamente en el sistema nervioso (Guerra-Araiza *et al.*, 2003; Melcangi *et al.*, 2008). El PR, también llamado receptor clásico de PG, actúa como factor de transcripción de aquellos genes que tienen en su promotor sitio de reconocimiento para PR (Fig.11). A su vez, el PR puede interactuar con proteínas de señalización citoplasmáticas de la vía de Src/Ras/Erk (Schumacher *et al.*, 2008).

La PG también se une al receptor de membrana de PG (mPR, con sus tres isoformas α , β y γ) y al componente 1 del receptor de membrana de PG (PGRMC1, la proteína 25DX), presentes en el cerebro y en la médula espinal (Fig. 11) (Brinton *et al.*, 2008; Labombarda *et al.*, 2010; Meffre *et al.*, 2013; Thomas y Pang, 2012). El mPR activa las vías de transducción de Erk y p38, inhibe la adenilato ciclasa (AC) y la vía de la PKA y estimula la liberación de calcio de los reservorios internos. La vía de señalización del PGRMC1 aún se encuentra en estudio. La PG también actúa como antagonista del receptor sigma 1, molécula adaptadora que regula la salida de calcio del retículo endoplasmático.

La $3\alpha,5\alpha$ -THP es un regulador alostérico positivo del receptor $GABA_A$, favoreciendo el ingreso de Cl^- a la célula (Fig. 11) y la hiperpolarización neuronal (disminuyendo el potencial) (Ardehshiri *et al.*, 2006; Follesa *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2003; Wang, 2011). A su vez, la $3\alpha,5\alpha$ -THP regula la liberación de GABA y de glutamato (Giuliani *et al.*, 2013), contribuyendo al control de cambios anímicos y emocionales (Biggio *et al.*, 2009; Eser *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2011). Por último, $3\alpha,5\alpha$ -THP también modula la función neuronal mediante la unión a los receptores mPR (Pang *et al.*, 2013).

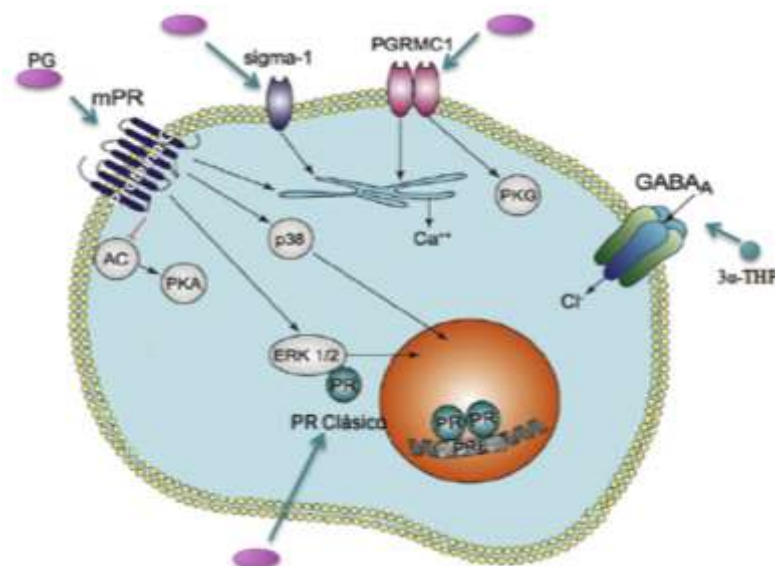


Figura 11: Receptores y mecanismos de acción de la PG y sus metabolitos. Imagen modificada a partir de Schumacher *et al.*, 2008

2.5.4. Rol de la progesterona y sus metabolitos reducidos en injurias y enfermedades del sistema nervioso

Además de su rol fisiológico, la PG y sus metabolitos reducidos juegan un papel importante en diferentes patologías del sistema nervioso. Se ha demostrado que la PG posee efectos neuroprotectores en diferentes modelos animales de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas (Melcangi *et al.*, 2014), incluyendo modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer (Wang *et al.*, 2008), Parkinson (Bourque *et al.*, 2009; Callier *et al.*, 2001), epilepsia (Rhodes y Frye, 2004), infarto (Chen *et al.*, 1999; Sayeed *et al.*, 2007), degeneración de motoneuronas (Gonzalez-Deniselle *et al.*, 2002), esclerosis múltiple y demielinización (Garay *et al.*, 2007; Giatti *et al.*, 2012b), e injuria traumática cerebral (Culter *et al.*, 2007; Djebaili *et al.*, 2005) y espinal (Coronel *et al.*, 2011b; 2014; Labombarda *et al.*, 2006).

Los numerosos efectos neuroprotectores que ejercen la PG y sus metabolitos han sido atribuidos a su papel como reguladores de los mecanismos que se mencionan a continuación:

- Regulación del crecimiento de las proyecciones neuronales y de la plasticidad sináptica, y promoción de la neurogénesis bajo condiciones de neurodegeneración (Melcangi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2008).

- Regulación de la síntesis de factores neurotróficos, tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Gonzalez-Deniselle *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2005).
- Reducción del estrés oxidativo (Ozacmak y Sayan, 2009) y la peroxidación de lípidos (Roof y Hall, 2000).
- Activación de cascadas de transducción de señales asociadas a la supervivencia celular (ej. cascada de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)) (Kaur *et al.*, 2007; Nilsen y Brinton, 2002; Singh, 2005).
- Regulación de la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas (Djebaili *et al.*, 2005; Nilsen y Brinton, 2002; Yao, 2005).
- Reducción de la activación de células involucradas en la neuroinflamación (astrocitos y microglia en el SNC; macrófagos y linfocitos en el SNP), con la consiguiente disminución en los niveles de mediadores inflamatorios (Arevalo *et al.*, 2012; Coronel *et al.*, 2014; Giatti *et al.*, 2012a; Labombarda *et al.*, 2011; VanLandingham *et al.*, 2007)
- Regulación de la mielinización del SNP (Melcangi *et al.*, 2005).
- Reducción del edema y la disfunción mitocondrial en modelos de injuria traumática cerebral (Robertson *et al.*, 2006; Roof *et al.*, 1996; Stein, 2011).

2.5.5. Rol de la progesterona y sus metabolitos reducidos en modelos experimentales de dolor

Estudios recientes han demostrado que los niveles de PG y sus metabolitos reducidos pueden modificarse por injurias o patologías del sistema nervioso tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, neuropatías periféricas, encefalopatía diabética o lesiones de la médula espinal (Melcangi *et al.*, 2014). Múltiples estudios revelan la presencia y actividad biológica de enzimas sintetizadoras de esteroides (P450_{scc}, 3 β -HSD, 5 α -R y 3 α -HSOR) en el asta dorsal de la médula espinal, en las láminas donde proyectan las neuronas aferentes primarias (Julius y Basbaum, 2001; Millan, 2002; Willis *et al.*, 1995). Esta información sugiere que neuroesteroides tales como PREG, PG, 3 α -DHP y 3 α ,5 α -THP, generados en el asta dorsal pueden controlar la integración de los mensajes somatosensoriales, incluyendo señales nociceptivas, y modular la transmisión hacia el cerebro.

Por otra parte, PG y sus metabolitos participan en la atenuación del dolor neuropático al ser administrados a animales que poseen una lesión de nervios periféricos (Coronel *et al.*, 2011a; Leonelli *et al.*, 2007; Roglio *et al.*, 2008) o de la médula espinal (Coronel *et al.*, 2011b). Se ha demostrado también que la PG logra prevenir el dolor neuropático atenuando el incremento en la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de las subunidades del receptor NMDA y de la proteína kinasa C gamma (PKC γ) inducidos por la injuria (Coronel *et al.*, 2011b). A su vez, otros estudios demostraron que la administración de PG previene el incremento en la expresión y actividad de las enzimas proinflamatorias ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), factores clave en los mecanismos de dolor crónico, en el asta dorsal de animales con injuria espinal, probablemente mediante una disminución de la actividad del NF κ B (Coronel *et al.*, 2014).

A su vez, como ya se mencionó en la sección anterior, los esteroides neuroactivos $3\alpha,5\alpha$ reducidos (tales como $3\alpha,5\alpha$ -THP) son potentes moduladores alostéricos de los receptores GABA_A, cuya actividad es crucial en la regulación de la nocicepción (Belelli y Lambert, 2005; Gambhiret *et al.*, 2002; Goodchild *et al.*, 2000). Por lo tanto, la $3\alpha,5\alpha$ -THP sintetizada en el asta dorsal podría modular la transmisión de mensajes de dolor actuando por medio de receptores GABA_A de amplia distribución en el SNC (Frye *et al.*, 2001; Gutierrez *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2008a; Willis *et al.*, 1995). A su vez, como soporte a este hipótesis, se ha demostrado que el incremento de los niveles locales de $3\alpha,5\alpha$ -THP en la médula espinal inducen analgesia en ratas con neuropatías, mientras que su inhibición exacerba su estado patológico (Meyer *et al.*, 2008a) y que inyecciones intraperitoneales de análogos sintéticos de $3\alpha,5\alpha$ -THP producen antinocicepción en ratas (Goodchild *et al.*, 2000; Nadeson y Goodchild, 2000). También, existen evidencias recientes que indican que tanto los canales GABA_A como los de calcio tipo-T son responsables de los potentes efectos analgésicos de esteroides neuroactivos 5α , sugiriendo que los neuroesteroides endógenos de la médula espinal podrían también regular mecanismos nociceptivos mediante la modulación de canales de calcio (Pathirathna *et al.*, 2005).

Investigaciones que utilizaron modelos de dolor neuropático generados por ligadura del nervio ciático (Lambert *et al.*, 2003) revelaron un aumento de la expresión de P450_{scc}, una redistribución celular de la misma en el asta dorsal y modificaciones de su actividad en la médula espinal durante el estado de dolor (Meyer *et al.*, 2008a). Estos resultados sugieren fuertemente que la biosíntesis de neuroesteroides podría ser un

mecanismo endógeno gatillado por la injuria para facilitar la adaptación a estados de dolor crónico. En concordancia con esta hipótesis, estudios llevados a cabo en animales que desarrollan diabetes revelaron la existencia de un mecanismo regulatorio en la médula espinal que deriva simultáneamente en la activación de la biosíntesis de la PG e inhibición de su catabolismo (Saredi *et al.*, 2005). Esta observación sugiere que en la médula espinal en modelos experimentales de diabetes las vías de biosíntesis de los neuroesteroides son selectivamente reguladas para optimizar la formación de PG (Saredi *et al.*, 2005). A su vez, ha sido demostrado que la PREG, cuya producción se ve aumentada bajo estados de dolor, promueve el desarrollo del citoesqueleto mediante la estimulación de la polimerización de tubulina y la formación de microtubulina (Murakami *et al.*, 2000; Plassart-Schiess y Baulieu, 2001). Como la regulación de la plasticidad neuronal ligada a la patogénesis del dolor crónico es de suma importancia para una terapia eficiente, la hiper-secreción de PREG en redes de neuronas sensoriales constituye un resultado prometedor que podría ser explotado en el desarrollo de estrategias novedosas contra el dolor. En efecto, una de las acciones principales de la PREG ha sido evidenciada en una terapia combinada la cual promueve la recuperación luego de una injuria de la médula espinal (Guth *et al.*, 1994), sugiriendo que la PREG puede tener un rol importante en la modulación de la regeneración de las funciones de la médula.

Como la neurodegeneración ha sido evidenciada en la médula espinal bajo dolor neuropático y diabetes crónica (Chen y Pan, 2002; Joseph y Levine, 2004; Varsik *et al.*, 2001; Whiteside y Munglani, 2001), la regulación del proceso de neuroesteroidogénesis en el tejido medular puede ser un mecanismo adaptativo para lidiar con estados de dolor crónico y/o neurodegenerativos. Por lo tanto, hacer foco en los componentes celulares y moleculares de la biosíntesis de los neuroesteroides en la médula espinal o en mecanismos de sensibilización neuronal en general, puede representar una interesante perspectiva para el desarrollo de drogas neuroprotectoras y nuevos agentes analgésicos contra el dolor neuropático.

3. Hipótesis

Como se mencionó en el apartado anterior, el dolor neuropático, que puede surgir luego de traumatismos o lesiones del sistema nervioso, como es el caso de la médula espinal, resulta refractario a las principales terapias analgésicas disponibles en la actualidad. Por lo tanto, el diseño de nuevas estrategias terapéuticas constituye un verdadero desafío para la investigación biomédica.

En este sentido, se sabe que ciertos esteroides que pueden ser sintetizados en el sistema nervioso (denominados neuroesteroides) juegan un papel determinante en la transmisión y modulación de la información nociceptiva. Nuestra hipótesis es que la maquinaria esteroideogénica se encuentra alterada luego de una injuria espinal y representa un interesante blanco terapéutico para modular el dolor crónico de origen central.

Este trabajo pretende identificar qué enzimas involucradas en la biosíntesis de neuroesteroides muestran niveles de expresión aumentados o disminuidos en la médula espinal dorsal, y si dichas expresiones se relacionan con una exacerbación o atenuación del dolor. Además, dada la experiencia previa del laboratorio en el uso de PG en modelos experimentales de dolor neuropático (Coronel *et al.*, 2011a; 2011b), se planea explorar el impacto de la administración de este esteroide en la expresión de proteínas translocadoras y enzimas esteroideogénicas.

4. Materiales y Métodos

4.1. Animales de experimentación

Todos los protocolos con animales de experimentación siguen las directivas de los Institutos Nacionales de la Salud (National Institute of Health - NIH, USA) y de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP). El bioterio del IBYME guarda estrictas normas éticas y ha sido certificado por el NIH, Bethesda, USA (Assurance Certificate A-5072-01). Los protocolos experimentales cuentan con la aprobación del Comité de Ética Institucional del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CABA, Argentina) (Resolución CE 007-1/2013 del 13/06/13) y del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina (Res. 1517 del 23/8/2010).

Las técnicas empleadas en la manipulación de los animales, los cuidados post-quirúrgicos y las pruebas funcionales fueron diseñados para minimizar el sufrimiento de los mismos. Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (200-220 g), criadas en el bioterio del IBYME.

4.1.1. Hemisección de la médula espinal y administración de progesterona

Los procedimientos que se describirán a continuación son de uso rutinario en el laboratorio y han sido publicados previamente (Coronel et al., 2011b; 2014). En primer lugar se procedió a anestésiar los animales utilizando una mezcla de ketamina (50mg/kg) y xilacina (10mg/kg) por vía intraperitoneal. Una vez comprobado que el animal no presentaba reflejo de pinzamiento podal (por la compresión de los dedos de las extremidades) ni reflejo por compresión de la cola, se procedió a rasurar para generar un campo quirúrgico. Se realizó una laminectomía parcial a fin de exponer la médula espinal. Con la ayuda de un bisturí y de tijeras de iridectomía, se procedió a hemisectar la médula del lado derecho a nivel torácico T13. Luego se suturó la musculatura y la piel del animal. El sitio de la incisión fue tratado con Pervinox (yodo povidona) y con Farm X (undecilenato de cinc, óxido de cinc, ácido salicílico, propionato de sodio) para disminuir el riesgo de infección y favorecer la cicatrización. El cuidado post-operatorio también incluyó control de la temperatura corporal con termostato y administración de cefalexina (20 mg/kg/día) de forma intramuscular durante 6 días consecutivos comenzando inmediatamente luego de terminada la cirugía.

En los animales con hemisección espinal (HX), el miembro inferior ipsilateral (del mismo lado de la lesión) presentó una parálisis temporal que resolvió en 5 días, mientras que en el miembro inferior contralateral (del lado contrario a la hemisección) no se observó ninguna modificación en la locomoción.

Los animales lesionados fueron divididos en dos grupos, uno de ellos recibió inyecciones subcutáneas diarias de PG natural (Sigma, 16 mg/kg/día, HX+PG) disuelta en aceite de ricino (EWE). Otro grupo de animales HX recibió únicamente vehículo. Ya se ha demostrado que este protocolo de administración de PG logra prevenir la formación de edemas y la pérdida neuronal, así como mejorar las respuestas cognitivas luego de injurias cerebrales (Culter *et al.*, 2007) e induce oligodendrogénesis y remielinización luego de injuria de la médula espinal (Labombarda *et al.*, 2006). Se ha observado también que la administración de esta dosis de PG previene el desarrollo de dolor neuropático en modelos de lesión del SNP y SNC (Coronel *et al.*, 2011a; 2011b).

Como controles se utilizaron animales nacidos y criados durante el mismo período y bajo las mismas condiciones en el bioterio del IBYME, que no fueron sometidos a ningún procedimiento quirúrgico ni recibieron tratamiento (CTL). En total se utilizaron 56 animales de experimentación (n=56) teniendo en cuenta que por cada grupo se precisan 8 animales para reducir la variabilidad propia de las pruebas funcionales en animales experimentales.

4.1.2. Pruebas funcionales para evaluar alodinia

Se evaluó el desarrollo de alodinia mecánica y térmica utilizando los tests de von Frey y Choi que se detallan a continuación. Los animales fueron evaluados antes de realizar la cirugía y luego de la misma los días 7, 14, 21 y 28 post lesión. Solo se incluyeron los animales que mostraron conducta nociceptiva normal previo a la cirugía.

4.1.2.1. Test de von Frey: Alodinia Mecánica

Para realizar las pruebas funcionales se siguieron protocolos previamente descritos (Coronel *et al.*, 2011b). En primer lugar se colocaron los animales en cajas de acrílico transparente individuales apoyadas sobre una grilla metálica en un soporte de madera (Fig. 12). En cada soporte de madera se colocaron 4 ratas y se evaluaron en forma simultánea

grupos de 8 animales. Se esperó un tiempo de 15 minutos para permitir la adaptación de los animales al cubículo.



Figura 12: Armado de soporte y preparación de animales de experimentación para las pruebas funcionales. En (a) puede observarse la forma en que se arma el soporte con las cajas de acrílico; en (b) se muestra la presencia de orificios de respiración en las cajas y sus respectivas compuertas; en las imágenes (c) y (d) se presenta la grilla metálica que permite tener acceso a las almohadillas plantares de las patas traseras de las ratas; en la fotografía (e) se puede observar como los animales se acomodan y acostumbran a sus respectivas cajas durante los 15 minutos de adaptación.

Luego se procedió a evaluar los animales utilizando los filamentos de von Frey que varían su graduación entre 1 y 26 gramos. Se utilizaron 8 filamentos de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 26 gramos (Fig. 13). Con los mismos se estimularon ambas patas traseras del animal, una a la vez, en la región de la almohadilla plantar, a través de la grilla metálica. Las estimulaciones se realizaron con un intervalo de 5 segundos.

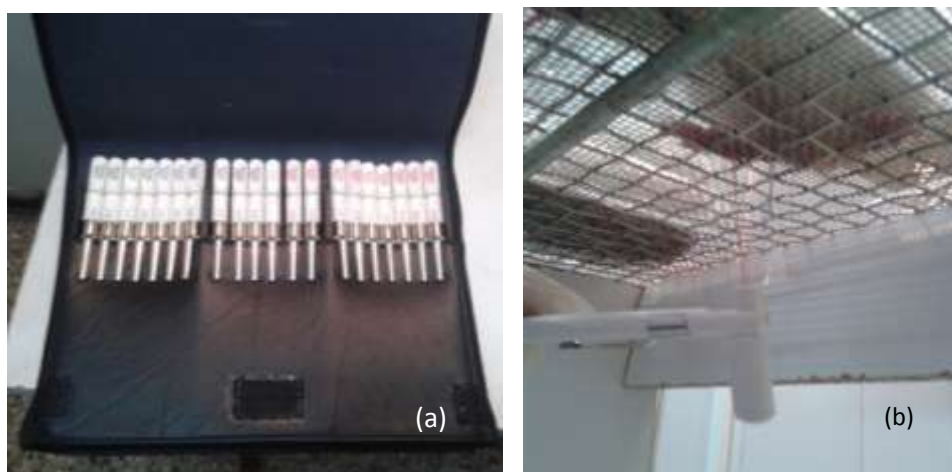


Figura 13: Test de von Frey. (a) Filamentos de von Frey utilizados para evaluar la respuesta del animal frente a estímulos mecánicos. (b) Aplicación de los filamentos de von Frey en las almohadillas plantares traseras a través de la malla metálica del soporte.

Se comenzó con el filamento de menor gramaje. Se repitió el procedimiento 3 veces con cada filamento y luego se pasó al siguiente. Frente a la estimulación ejercida se observaron las distintas reacciones del animal:

- Ausencia de reacción
- Retirada brusca de la pata
- Retirada brusca de la pata que puede acompañarse por movimientos exacerbados de la misma, lamida de la pata, giro dentro de la caja, atención al filamento, vocalización.

Todos los comportamientos fueron registrados para su posterior análisis y se consideró respuesta positiva la retirada brusca de la pata frente al estímulo mecánico. Se determinó el umbral de respuesta teniendo en cuenta el filamento de menor gramaje que indujera la retirada brusca de la pata del animal. Se consideran respuestas alodínicas a aquellas desencadenadas por filamentos de 6 gramos o menos.

4.1.2.2. Test de Choi: Alodinia Térmica Fría

El Test de Choi consiste en evaluar la reacción del animal frente a un estímulo térmico frío (gota de acetona). Con una jeringa sin aguja se generó una burbuja de acetona que se puso en contacto con las almohadillas plantares traseras del animal por debajo de la grilla metálica (Fig. 14). Se estimuló primero la pata derecha de todos los animales y luego la izquierda. Este procedimiento se realizó 5 veces en cada pata dejando un período de descanso de 5 minutos entre dos aplicaciones. Se observaron las distintas reacciones del animal al igual que en el Test de von Frey y se determinó la cantidad de veces que el estímulo frío causó la retirada brusca de la pata. Se consideró respuesta alodínica a la presencia de dos o más retiradas bruscas frente a la estimulación con acetona.



Figura 14: Test de Choi. Se puede observar la burbuja de acetona generada en la punta de la jeringa, con la que se estimula la almohadilla plantar de ambas patas traseras del animal.

Una vez finalizadas ambas pruebas funcionales, se retiraron los animales de las cajas de acrílico y se los colocó nuevamente en sus respectivas jaulas.

4.2. Medición de expresión de proteínas translocadoras y enzimas de la vía esteroidogénica

4.2.1. Preparación de los tejidos

Luego de diferentes tiempos de sobrevida (1, 14 y 28 días), los animales recibieron una sobredosis de anestesia (800 mg/kg de hidrato de cloral) y fueron

guillotinos. El segmento de la médula espinal por debajo del sitio de la lesión (desde T13 hasta L5) fue removido inmediatamente y la médula espinal dorsal fue separada mediante el corte a través del canal central. Se trabajó en condiciones libres de RNAsas, utilizando material de cirugía estéril. Los tejidos fueron inmediatamente congelados sobre hielo seco y guardados a -70°C hasta su procesamiento para los estudios de expresión de las diversas proteínas translocadoras y enzimas esteroídicas. Las muestras de los distintos grupos experimentales fueron procesadas al mismo tiempo.

4.2.2. Extracción de ARN total

El ARN fue extraído utilizando TRIzol® Reagent (Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform, Invitrogen Life Technologies). Este reactivo es utilizado para la extracción de ARN total de alta calidad a partir de una variedad de muestras biológicas. Es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogeneización o lisis de la muestra, mantiene la integridad del ARN al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares (Chomczynski, 1993; Chomczynski y Sacchi, 1987). La extracción del ARN total se realizó en una campana de extracción química. En primer lugar se colocó cada médula congelada en un vial con 1 ml de TRIzol® y con un homogeneizador (LabGen 7, Cole Parmer Instrument Company) se disgregó el tejido. Luego se transfirió la totalidad del homogenato a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Una vez homogeneizadas todas las muestras, los tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se les agregó 200 μl de cloroformo (tricloruro de metilo) a cada tubo y se los agitó por inversión. Se dejaron reposar nuevamente 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron 15 minutos a 14000 rpm a 4°C . El agregado de cloroformo genera la formación de dos fases por diferencia de densidad, la fase fenólica orgánica (inferior) contiene el ADN y restos de proteínas desnaturalizadas y la fase acuosa (superior) contiene el ARN en cloroformo. La fase acuosa fue extraída cuidadosamente y transferida a otro tubo de 1,5 ml. Luego se agregó 550 μl de alcohol isopropílico (2-propanol) a cada uno de los tubos, se los agitó enérgicamente por inversión y se los guardó a -20°C durante 24 hs. El agregado de alcohol isopropílico favorece la precipitación del ARN.

Al día siguiente se procedió a centrifugar las muestras 10 minutos a 14000 rpm a 4°C . Se pudo observar la formación de un pequeño pellet (ARN). A continuación se descartó el sobrenadante (isopropanol) y se lavó el pellet de ARN con 1 ml de etanol 70 %. Se

centrifugó 10 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente (28°C), y se descartó el etanol. Para favorecer la evaporación de todo resto de solvente, se colocaron los tubos con tapa abierta en un baño seco a 50°C durante 5 minutos. A continuación, se resuspendió el pellet con H₂O DEPC (dietil pirocarbonato al 0,1% v/v en agua destilada). Finalmente, las muestras se calentaron durante 5 minutos a 50°C, se agitaron y colocaron en hielo para su posterior análisis.

4.2.3. Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN

Para conocer la concentración del ARN total se midió la absorbancia de las muestras a 260 nm en el Nano Drop 2000 Spectrophotometer® (Thermo Scientific™). Se utilizó como referencia un blanco de agua DEPC y se determinaron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm. La relación [Abs260 nm / Abs280 nm] es un índice que evalúa la integridad del ARN y la presencia de proteínas; la relación [Abs260 nm / Abs230 nm] indica si existen contaminaciones con solventes orgánicos (provenientes del Trizol). Se consideran óptimas las relaciones 260/280, que se encuentra entre 1,8 y 2,0, y 260/230, que se encuentran entre 2,0 y 2,2.

La concentración de ARN en las muestras se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm, sabiendo que una densidad óptica (I OD₂₆₀) equivale a 40 µg de ARN en 1 ml, utilizando la siguiente ecuación:

$$[ARN](\mu\text{g} / \mu\text{l}) = \frac{(\text{Absorb.}260\text{nm}) \times (40\mu\text{g} / \text{ml})}{(1000\mu\text{l} / \text{ml})} \quad (1)$$

A partir de los valores de concentración obtenidos, se calculó el volumen de muestra que contenía 2 µg de ARN, a partir de los cuales se realizó posteriormente la retrotranscripción.

4.2.4. Retrotranscripción - Síntesis de ADNc

La retrotranscripción o transcripción inversa es un proceso de la biología molecular que implica la generación de ADNc (copia) a partir de ARN de cadena simple. Para ello se utiliza la enzima transcriptasa reversa.

En primer lugar las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente con Deoxyribonuclease I (DNasa I - Invitrogen Life Technologies) para remover el ADN genómico contaminante. Esta reacción se frenó mediante el agregado

de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) e incubación a 65°C durante 10 minutos. Luego se realizó una incubación con Random Primers (oligodeoxiribonucleótidos, mayormente hexámeros - Invitrogen Life Technologies) que funcionan como cebadores cortos para generar el ADNc a partir del ARN total. Para la retrotranscripción se utilizaron los siguientes reactivos:

- Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies): transcriptasa reversa.
- 5X First Strand Buffer (Invitrogen Life Technologies): buffer que contiene 250 mM Tris-HCl pH 8,3, 15 mM MgCl₂ y 375 mM KCl. El Tris-HCl controla el pH, el Mg²⁺ actúa como cofactor de la transcriptasa reversa.
- Ditioneitol (DTT - Invitrogen Life Technologies): es utilizado para reducir la unión cruzada de cisteínas. Completa la linearización de las proteínas al romper los puentes disulfuro.
- Desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs - Invitrogen Life Technologies): son necesarios para que la transcriptasa reversa los use como sustrato y pueda llevar a cabo la síntesis de la cadena de ADNc.
- RNAaseOut Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen Life Technologies): inhibidor de RNAasas.

Los reactivos mencionados son agregados a cada una de las muestras en las cantidades que se muestran a continuación:

Preparación de mezcla de reacción por cada muestra:

- 1 µl de Transcriptasa Reversa
- 2 µl de DTT
- 2 µl de dNTPs
- 1 µl de inhibidor de RNAasa
- 1 µl de H₂O DEP
- 6 µl de Buffer

Luego se incubaron los tubos 1 hora a 50°C en baño seco para permitir la retrotranscripción del ARN original. A continuación, se colocaron 15 minutos a 70°C para frenar la reacción y por último se guardaron las muestras a -20°C hasta su uso.

4.2.5. Diseño de los oligonucleótidos para la RT-PCR en tiempo real

Para llevar a cabo los ensayos de PCR en tiempo real se diseñaron oligonucleótidos específicos, también llamados primers o cebadores, para cada uno de los transcritos de las proteínas y enzimas esteroideogénicas analizadas, así como la proteína ciclofilina B (CycB), cuyo transcripto fue utilizado como control de expresión constitutiva o *housekeeping* debido a que su concentración es estable en las células y no se ve afectada por los diferentes tratamientos realizados en este trabajo.

El diseño de los oligonucleótidos para algunas de las proteínas y enzimas esteroideogénicas se realizó con el programa Vector NTI® Software (Invitrogen Life Technologies). Se buscaron las secuencias de las enzimas a analizar correspondientes a rata (*Rattus norvegicus*) en la plataforma web de National Center for Biotechnology Information (NCBI), las mismas se importaron a Vector NTI® y a partir de las mismas, se analizaron diversas opciones de oligonucleótidos de entre 18-24 pb con temperaturas de melting⁵ de aproximadamente 60°C y similares entre sí, verificando que no hubiera formación de dímeros que pudieran generar mediciones erróneas. A continuación se detallan las condiciones que fueron tenidas en cuenta para diseñar los oligonucleótidos:

- Temperatura de melting: entre 55 y 65°C, Tm óptima= 60°C
- Longitud del primer: 18-21 pb
- Longitud de amplicones: 50-150 pb, óptimo: 100pb
- Contenido de C/G: 40 a 60%
- Primers con repeticiones de 4 o más G/C seguidos deben ser evitados.
- El extremo 3' del primer no debe contener más de 2 G/C entre los últimos 5 pares de bases.
- Los primers no deben formar dímeros entre sí o loops con su propia secuencia.
- Los primers deben tener la misma distribución de G/C y A/T.
- Los pares de primers deben tener una Tm similar (+/-2°C).
- La complementariedad en el extremo 3' entre primers debe ser evitada ya que conlleva a la formación de dímeros primer-primer.

⁵ Temperatura a la cual la mitad de las partículas de ADN doble hebra se disocian y se tornan hebra simple. La estabilidad del dúplex de ADN primer-templado puede ser medida por su Tm

- La complementariedad del extremo 3' entre primers y secuencias no específicas presentes en el templado, debe ser evitada.
- El ΔG o energía libre de Gibbs (entalpía libre) de la reacción de unión del primer con la secuencia debe ser lo más negativa posible, expresando que la formación de los enlaces se generan en condiciones de equilibrio y espontaneidad. Por otro lado, el ΔG de los posibles dímeros y loops, deben ser los más positivos posibles, pudiendo tolerarse hasta un $\Delta G = -2$.

Una vez obtenidos los primers que respetaran la mayor cantidad de las premisas anteriores, se procedió a testear los mismos en la plataforma BLAST ofrecida por NCBI para evaluar si los mismos poseían un 100% de homología únicamente con la secuencia deseada en la rata, para lograr especificidad. Si el oligonucleótido generado, mostraba homología con alguna otra proteína de rata, se descartaba y generaba uno diferente.

Con el programa mencionado se generaron los primers para las proteínas TSPO y 3 α HSOR. Los primers para las restantes proteínas y enzimas esteroideogénicas fueron obtenidos de publicaciones en las que se había utilizado el equipo 7500 Real Time PCR System Applied Biosystem. A continuación en la Tabla 1 se detallan las secuencias de los primers utilizados.

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR en tiempo real.

Nombre de enzima o proteína	F / R ⁽¹⁾	Tm de primers (°C)	Longitud de secuencia (nt)	Secuencia (5'>3')
TSPO ⁽²⁾	F	60,7°C	23	CTTGCAGAAACCCTCTGGCATC
	R	60,9°C	24	CCAAGGGAACCATAGCCTCTCTG
StAR ⁽³⁾	F	56.0	21	CTGCTAGACCAGCCCATGGAC
	R	57.9	24	TGATTTCTTGACATTTGGGTTC
P450scc ⁽³⁾	F	57.5	21	GGAGGAGATCGTGGACCCTGA
	R	56.6	20	TGGAGGCATGTTGAGCATGG
3βHSD ⁽³⁾	F	54	20	AGCAAAAAGATGGCCGAGAA
	R	55	21	GGCACAAGTATGCAATGTGCC
3αHSOR ⁽²⁾	F	59,9	23	GCAAGTGCCTTTGAATGCTGAGC
	R	59,3	24	CACAGAAATAGTGGCAGGCAAGGA
3αRedI ⁽⁴⁾	F	51.5	19	ACTGGGCAACCTGCCTAAC
	R	51.7	19	ATCAGAACCGGGAAAACCA
3αRedII ⁽⁴⁾	F	51.7	20	CAGGAAGCCTGGAGAAGTCA
	R	51.9	20	CAATAATCTCGCCAGGAAA

⁽¹⁾ F y R denotan que trata de un oligonucleótido forward (hacia delante) o reversa respectivamente.

⁽²⁾ Diseñado utilizando el programa Vector NTI.

⁽³⁾ Obtenidos a partir de Abarikwu *et al*, 2011.

⁽⁴⁾ Obtenidos a partir de Munetsuna *et al*, 2009.

4.2.6. PCR en tiempo real

Una de las mayores dificultades que conlleva el estudio de una porción de ADN radica en la necesidad de poder disponer de él en estado puro y en grandes cantidades. Kary Mullis en 1983 fue capaz de encontrar una solución a este problema mediante la creación de la PCR (Lorenz, 2012). La gran utilidad de la PCR reside en la capacidad de producir *in-vitro* un gran número de copias de una determinada secuencia sin la necesidad de recurrir al clonaje de ADN.

Este proceso se lleva a cabo por medio de una serie de reacciones que dependen de variaciones de temperatura que se repiten 25-40 veces, llamados ciclos, donde cada uno posee un mínimo de tres etapas. En un primer paso, en torno a los 95 °C, se genera la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena, a este se lo conoce como “paso de denaturalización” (denaturing phase). El segundo, “paso de alineamiento” (annealing phase) es llevado a cabo a una temperatura de 50-60°C, permite el alineamiento de los cebadores al ADN molde. Por último, en una tercera etapa “paso de extensión” (extensión phase) a 68 - 72 °C, se facilita la polimerización por parte de la ADN polimerasa (Rychlik *et al.*, 1990). Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros, como: la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y desoxirribonucleótidos (dNTPs) en la reacción y la temperatura de unión de los cebadores (Russel *et al.*, 2001).

La PCR tradicional toma su medida en la fase del plateau, punto en el cual las reacciones se detienen por falta de algún reactivo (Fig.15), a esto se lo llama detección de punto final. Cada tubo de reacción se estabiliza en un punto diferente, debido a la diferente reacción cinética en cada muestra, por lo tanto las mediciones en la fase del plateau no son precisas. Para obtener una mayor precisión deben tomarse mediciones durante la fase exponencial en la cual los tubos poseen reactivos en grandes cantidades y suficientes para que la reacción ocurra sin limitantes.

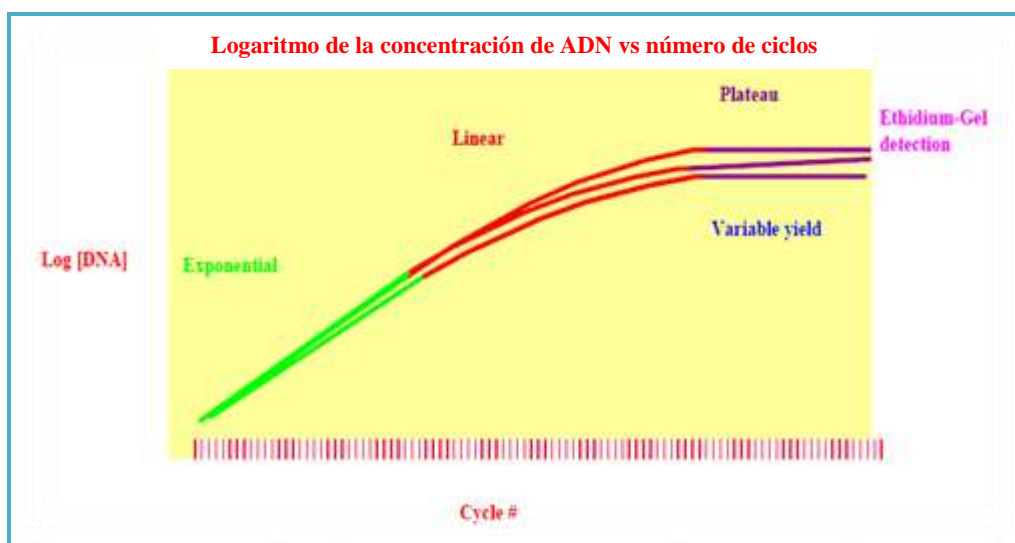


Figura 15: Esquema que representa las 3 fases de una PCR, exponencial (verde), lineal (roja) y plateau (rosa) (Roche Molecular Systems).

La PCR en tiempo real (*real time polymerase chain reaction*) o cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*: qPCR o Q-PCR) es una variante de la PCR de punto final que permite la detección del producto de amplificación de la PCR durante la fase exponencial de la reacción. La amplificación de un determinado número (N_0) de moléculas de ADN rinde una cantidad final (N) que depende del número de ciclos de PCR realizados. La ecuación (2) indica la relación entre N_0 y N , donde Y es la eficiencia de la reacción y n es el número de ciclos (Deepak, 2007).

$$N = N_0 \times (1 + Y)^n \quad (2)^6$$

Las ventajas del uso de la PCR en tiempo real se resumen a continuación:

- Capacidad para supervisar en tiempo real la reacción de PCR.
- Capacidad para medir con precisión la cantidad de amplicón en cada ciclo, lo que permite la cuantificación de alta precisión y exactitud de la cantidad de material de partida en cada tubo.
- La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto.
- Posee un elevado rango dinámico de detección.

⁶ Para que esta ecuación se cumpla ninguno de los componentes de la reacción (nucleótidos, primers o enzima) debe encontrarse en cantidad limitante.

- La amplificación y detección se produce en un solo tubo eliminando la manipulación post-PCR.
- Elevada sensibilidad, capaz de detectar 0,5 femtogramos de ARNr.

Para la realización de una PCR en tiempo real se precisan un molde de ADN, un par de cebadores específicos para la secuencia a analizar, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, ADN polimerasa termoestable y oligonucleótidos marcados fluorescentemente que detectan específicamente la aparición del producto deseado o con cromóforos inespecíficos que se unan únicamente a ADN de doble cadena.

Los marcadores permiten medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo o cromóforo a la longitud de onda apropiada. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que se la denomina PCR en tiempo real (Rychlik *et al.*, 1990). El SYBR Green⁷, el cual fue utilizado en este trabajo, es un fluorocromo inespecífico que se une al surco menor del ADN bicatenario (Fig. 16) aumentando la intensidad de la emisión de fluorescencia, de manera proporcional a la cantidad de producto de PCR producido. Es excitado mediante luz azul ($\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$) emitiendo luz verde ($\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$) (Zipper, 2004). La especificidad, en el caso de utilizar el reactivo SYBR Green, se obtiene con primers específicos para las secuencias que se desean cuantificar. Los mismos permiten que se amplifiquen únicamente las regiones deseadas (Cortazar y Silva Rincón, 2004).

⁷ El reactivo utilizado como marcador inespecífico SYBR Green, en el caso de la presente investigación, se comercializa en forma de Master Mix (*SyBR Green PCR Master Mix (2x) Applied Biosystems*) la cual ya posee el buffer específico, nucleótidos, Taq polimerasa (*AmpliTaq Gold® DNA Polymerase - Applied Biosystems*) y el fluoróforo SYBR Green.

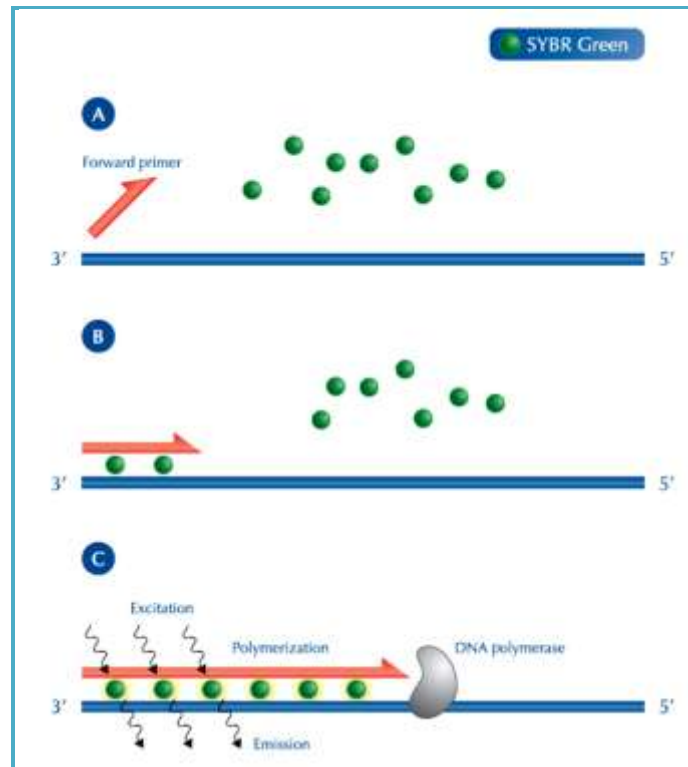


Figura 16. Detección de los productos de amplificación en una PCR en tiempo real basada en la utilización de SYBR Green. (a) El fluorocromo SYBR Green fluoresce cuando se une a ADN doble cadena. Cuando el ADN es denaturalizado a simple hebra, el SYBR Green es liberado y su fluorescencia es reducida drásticamente. (b) Durante la extensión, los primers se pegan al ADN, el producto de PCR es generado y moléculas de SYBR Green comienzan a intercalarse en el ADN de doble hebra generado. (c) Una vez que la polimerización es completada se puede observar como las moléculas de SYBR Green son excitadas a una longitud de onda específica y generan un aumento neto de fluorescencia el cual es detectado por el instrumento.

La cuantificación relativa del gen de estudio se orienta respecto de otro, denominado “normalizador” o “*house-keeping gene*”, el cual es seleccionado debido a sus funciones básicas en la supervivencia celular, que suele implicar una expresión constitutiva (Pfaffl *et al.*, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002). De este modo, efectuando en cada experimento la medición de los genes de interés y el gen normalizador, es posible comparar los primeros aún sin conocer en términos absolutos su nivel de expresión tal como se explica más adelante en la ecuación (3).

Las PCR en tiempo real llevadas a cabo en el Laboratorio de Nocicepción y Dolor Neuropático son realizadas en un termociclador ABI PRISM 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems) con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Este termociclador es un aparato con capacidad para calentar y enfriar rápidamente las muestras, de modo que se aprovechen las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y de la ADN polimerasa. Los cambios de temperatura permiten separar y juntar las hebras y el pegado de la ADN polimerasa y los cebadores a las secuencias a analizar.

Para el análisis de la información que brinda el programa 7500 System SDS Software, el cual analiza los datos proporcionados por el termociclador, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos (Andersen, 2004; Deepak, 2007):

Fondo o Background: se refiere a la fluorescencia no específica en la reacción.

Línea Base o Baseline: Hace referencia a la señal durante los ciclos iniciales de la PCR, donde no hay cambios significativos en la señal de fluorescencia. Determina la fluorescencia basal. Es nivel de ruido en los primeros ciclos donde no hay aumento detectable de la fluorescencia debido a los productos de amplificación.

Umbral o Threshold: Nivel de señal que refleja un incremento significativo sobre la señal calculada de la línea de base. Es establecido para distinguir la señal de amplificación relevante frente al fondo. Se emplea para la determinación del Ciclo Umbral (Fig. 17).

Ciclo Umbral (Ct): Es el número de ciclo en el cual la señal de fluorescencia de la reacción cruza el valor umbral. Se utiliza para estimar la cantidad inicial de moléculas de ADNc, ya que el valor de Ct se encuentra inversamente relacionado con la cantidad inicial de muestra (Fig. 17). Cuanto mayor sea el número de copias del material de partida, menor será el Ct ya que la fluorescencia umbral se obtiene de un número menor de ciclos.

$$\text{Expresión relativa} = \frac{[(E_{target})^{\Delta CT_{target}(\text{control-muestra})}]}{[(E_{housekeeping})^{\Delta CT_{housekeeping}(\text{control-muestra})}]} \quad (3)$$

En la ecuación (3) (Pfaffl, 2001) se detalla la manera de obtener la expresión relativa de la muestra respecto al control. En la misma deben tenerse en cuenta los siguientes valores:

- E *target*: eficiencia de la reacción de amplificación por el gen analizado.
- E *housekeeping*: eficiencia de la reacción de amplificación del gen utilizado como referencia (*housekeeping* / normalizador).
- ΔCT *target*: diferencia en el Ct de la muestra a analizar respecto al control sobre el que se relativiza la expresión, en la reacción de amplificación del gen en estudio.
- ΔCT *housekeeping*: diferencia en el Ct de la muestra a analizar respecto al control sobre el que se relativiza la expresión, en la reacción de amplificación del *housekeeping* / normalizador.

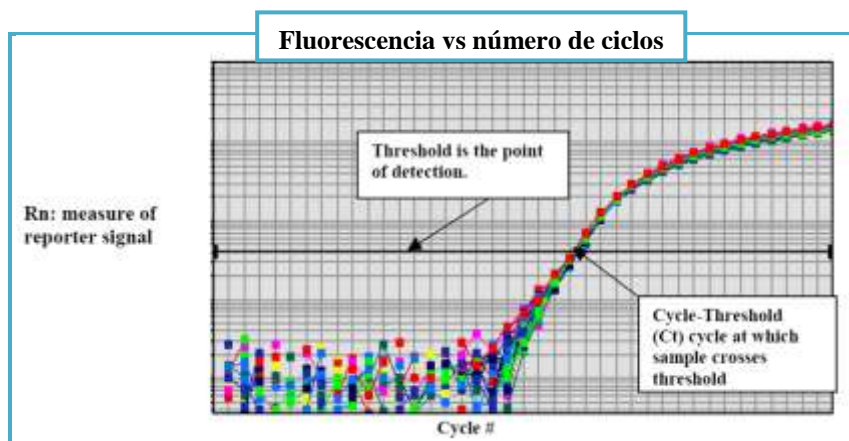


Figura 17: Fluorescencia vs Número de Ciclo. Puede observarse la línea umbral (threshold line) como una línea negra que atraviesa la totalidad del gráfico de forma horizontal. Esta línea representa el punto de detección. Por otro lado el Ct indica el ciclo en el cual la fluorescencia generada dentro de una reacción cruza el umbral de detección (Life Technologies Corporation, 2012).

Curva de Rango Dinámico: A fin de conocer la cantidad de ADN_C inicial, es preciso realizar nuevas transformaciones matemáticas que requieren conocer la eficiencia de PCR, la cual es determinada mediante una recta de calibrado (Fig. 18) (Andersen, 2004). La misma se realiza con diluciones en serie de concentración conocida de un mismo templado. El logaritmo de cada concentración conocida en las diluciones en serie (eje x) es graficado frente el valor de Ct para esa concentración (eje y).

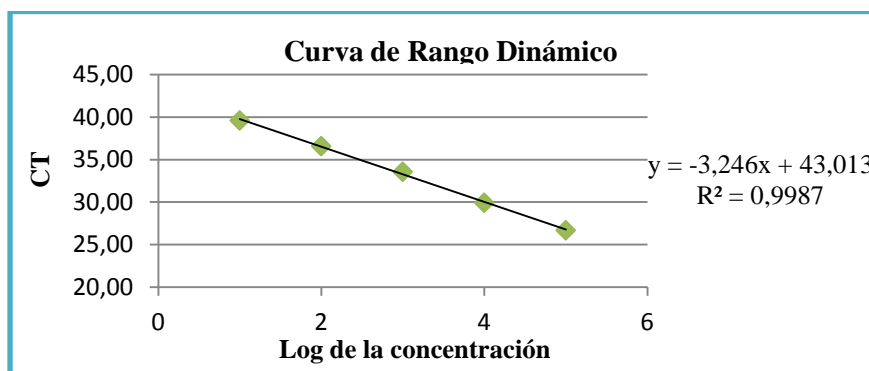


Figura 18: Ejemplo de curva de rango dinámico de PCR en tiempo real. Puede observarse el Ct en el eje y vs el logaritmo de la concentración en el eje x. R^2 representa el coeficiente de correlación el cual refleja la linealidad de la curva (idealmente $R^2=1$). A su vez se representa la ecuación de la curva junto con la pendiente de la misma, en este caso -3,24.

Eficiencia (E): La E de una reacción de PCR debería ser lo más cercana posible a 2 posible lo cual equivale a 100%, describiendo que el templado duplica su cantidad luego de cada ciclo durante la fase exponencial; estos valores de E corresponden a una pendiente de -3,32 determinada por la ecuación (4) (Peinnequin, 2004).

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1 \tag{4}$$

La E puede dar información muy importante acerca de la reacción. Factores experimentales tales como el largo, estructura secundaria y el contenido de GC del amplicón pueden influenciar la E. Una E menor a 90% (1,90) puede deberse al uso de concentraciones inadecuadas de reactivos, mala calidad de las enzimas, una dinámica incorrecta de la reacción. La presencia de inhibidores de la PCR puede generar una E mayor a 110% (2,10). Una reacción que sigue una amplificación exponencial debería tener una E entre 1,90 y 2,10 (en porcentajes: entre 90% y 110%), las cuales corresponden a una pendiente de la curva de calibración entre -3,58 y -3,10. Las eficiencias cercanas a 2 y los R^2 cercanos a 0,99 aseguran la reproducibilidad en los resultados y una precisa cuantificación (Peinnequin, 2004).

Cuantificación: La cuantificación puede ser llevada a cabo de forma absoluta o de forma relativa:

- La cuantificación absoluta describe un experimento de PCR en tiempo real en el cual muestras de cantidad conocida son diluidas de forma seriada y luego

amplificadas para generar una curva de calibración. Las muestras de cantidad de templado desconocido son, luego, cuantificadas siendo comparadas con la curva generada.

- La cuantificación relativa, utilizada en la presente investigación, determina la relación entre la cantidad de ADNc diana y una molécula de referencia endógena (housekeeping o normalizador), un gen cuya cantidad no varía en las condiciones analizadas, ciclofilina B en el caso del presente trabajo. El valor normalizado se determina para cada muestra. Los resultados son expresados como un aumento o disminución de la tasa de cambio (*fold change*) de la expresión del gen de interés en, por ejemplo, el animal tratado, en relación con el no tratado.

4.2.6.2. Determinación de los niveles de expresión relativos de las proteínas translocadoras y enzimas en estudio

Mediante diversas reacciones de PCR en tiempo real, amplificando las secuencias de los ADNc de las proteínas translocadoras y enzimas esteroideogénicas en estudio, se analizó la presencia de la expresión genética de las mismas en cada grupo experimental.

Para realizar la curva de calibración se partió de una muestra de ADNc de un animal lesionado de concentración conocida (66,66 ng de muestra en 1 μ L). A 4,5 μ L de esta solución se le agregaron 10,5 μ L de agua destilada para lograr una concentración de 100 ng/5 μ L, a partir de la cual se realizaron diluciones 1/10 seriadas hasta llegar a una solución de 10 pg en 5 μ L. En total suman 5 concentraciones diferentes de la muestra para generar los 5 puntos de la curva de calibración.

El ADN de las muestras seleccionadas y las diluciones patrón se usaron luego como templados en reacciones de PCR en tiempo real. Se hicieron dos réplicas técnicas para cada una de las réplicas de cada tratamiento en las muestras y dos réplicas técnicas para las reacciones de la curva de calibración. Además se incluyó un blanco con agua bidestilada en lugar de ADNc molde (dos replicas).

Los primers utilizados fueron los que se mencionan en la Tabla I de la sección de “Preparación de oligonucleótidos para la RT-PCR en tiempo real”.

Debajo se detallan las condiciones de reacción para cada tubo de reacción (Tabla II):

Tabla II: Detalle de la reacción de PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen por tubo (µL)
SyBRGreen PCR Master Mix (2x)	6,3
Primer Mix (10 µM c/u, cc de 400 µM en el pocillo)	1
ADNc molde	5
Total	12,3

Los ciclo de amplificación fueron de: 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y una última etapa de 1 minuto a 60 °C.

Se cargó la placa de 96 pocillos primero colocando 7,3 µL de SyBR Green Master Mix y 5µL de cada muestra por duplicado a los correspondientes pocillos. La placa se selló con un film transparente. Se utilizó, como se dijo anteriormente, el termociclador ABI PRISM 7500 Real Time PCR system, conectado a una computadora que nos permite monitorear la reacción. En la sección de “Resultados” pueden observarse las curvas de calibración de cada uno de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para cada secuencia. Esta información permite determinar si las condiciones de corrida son las correctas o si debe modificarse la temperatura de annealing, la concentración, el tiempo de corrida para obtener una mejor eficiencia. En algunos casos se deben generar nuevos cebadores ya que ajustar las condiciones de corrida no es suficiente para obtener resultados correctos a partir de los mismos.

Una vez encontradas las condiciones de corrida que corresponden con una buena eficiencia, se procedió a realizar la PCR en tiempo real de la totalidad de las muestras de los distintos grupos experimentales para obtener información acerca de las cantidades relativas de ARNm de cada una de las proteínas nombrada en las diferentes condiciones de análisis.

Finalmente se normalizaron los resultados brindados por el software expresándolos como niveles relativos de ARNm tomando como referencia a los animales CTL. El análisis estadístico para comparar la diferencia de expresión de las proteínas entre cada grupo de tratamiento se realizó mediante un t-test de Student por medio del programa GraphPad Prism 5.

5. Resultados

5.1. Curvas de rango dinámico de primers para los ensayos de RT-PCR en tiempo real

En primer lugar, se muestra la puesta a punto de los primers utilizados. La misma consiste en la realización de las curvas de rango dinámico de los primers que luego fueron utilizados para analizar los ARNm de las proteínas translocadoras TSPO y StAR, las enzimas esteroideas 5α -reductasa I y II, y la proteína ciclofilina B utilizada como normalizador (Fig. 19). En la Tabla III se muestra la ecuación de cada una de las rectas obtenidas. El dato numérico correspondiente a la pendiente fue utilizado para calcular la eficiencia de cada uno de los primers utilizados (Peinnequin, 2004). En la tabla también se incluyen los coeficientes de correlación de cada una de las rectas (R^2), la eficiencia de la reacción de amplificación, la concentración de primer y de muestra a sembrar en cada pocillo. Todos los primers utilizados presentaron valores de eficiencia adecuados (detallados en la sección de “Materiales y Métodos”) para realizar las posteriores determinaciones por RT-PCR en tiempo real. Los cebadores mencionados se utilizaron siempre bajo las mismas condiciones.

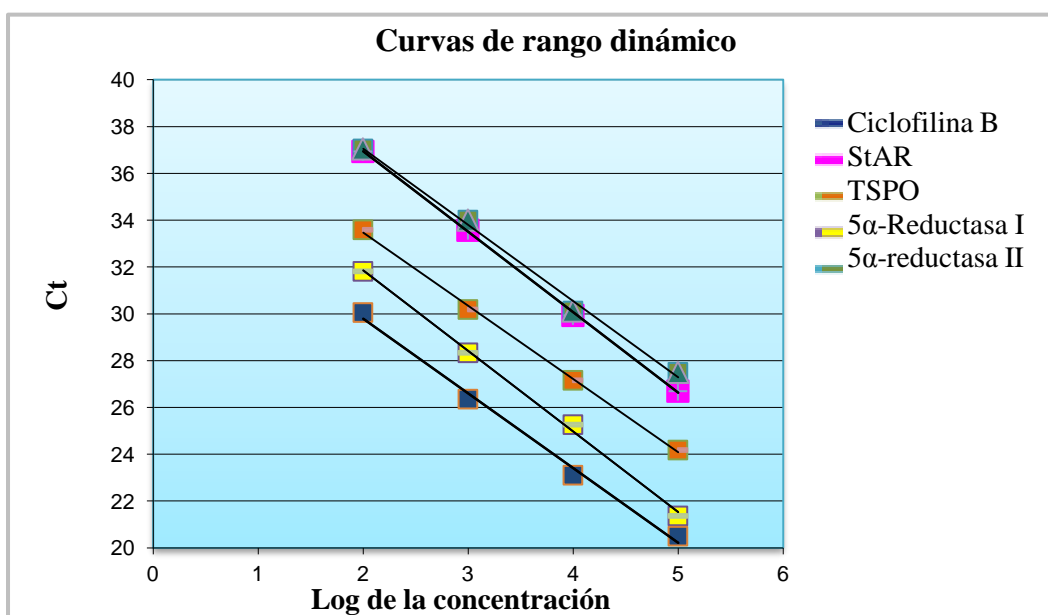


Figura 19: Curvas de rango dinámico. Se grafica el ciclo de amplificación umbral (Ct) en función del logaritmo de la cantidad inicial de ADN copia. Las pendientes de estas curvas de

rango dinámico (Tabla III) permiten calcular las eficiencias de los primers utilizados en este trabajo.

Los primers utilizados para analizar los niveles de los ARNm de las enzimas P450_{scc}, 3 β -HSD y 3 α -HSOR presentaron ciertas limitantes. No se logró obtener curvas de rango dinámico con pendientes que mostraran una amplificación exponencial, a pesar de haber utilizado cebadores específicos para diferentes secuencias de cada uno de los ARNm en estudio, y haber realizado diversas modificaciones en los parámetros de las corridas de PCR en tiempo real (T°, tiempos de cada ciclo, etc).

Tabla III. Valores de eficiencia de cada uno de los primers utilizados

De cada uno de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real se detalla la ecuación y el coeficiente de correlación de la curva de rango dinámico, la eficiencia de la reacción de amplificación, la concentración del primer y de ADNc a sembrar en cada pocillo.

Gen	Ecuación de la recta	R ²	Eficiencia (~ 2)	Eficiencia (%) (~ 100)	Conc. primer	Conc. ADNc
					(en pocillo)	(a sembrar)
CyCB	$y = -3,1915x + 36,174$	0,994	2,06	105,75	400 nM	50 ng/5ul
TSPO	$y = -3,1255x + 39,718$	0,998	2,09	108,905	400 nM	100 ng/5ul
StAR	$y = 3,4375x + 43,815$	0,999	1,95	95,39	400 nM	100 ng/5ul
5aRedI	$y = -3,442x + 38,742$	0,998	1,95	95,22	400 nM	50 ng/5ul
5aRedII	$y = -3,2525x + 43,552$	0,997	2,03	102,98	400 nM	100 ng/5ul

Se detallan a continuación los resultados obtenidos al evaluar la presencia de alodinia mecánica y térmica en los animales de experimentación, mediante pruebas funcionales, y los datos obtenidos en relación a la expresión de proteínas translocadoras y enzimas de la vía esteroideogénica, mediante RT-PCR en tiempo real.

5.2. Pruebas funcionales: alodinia mecánica y térmica

Todos los animales con hemisección espinal (HX) perdieron transitoriamente la movilidad de su pata ipsilateral a la injuria. A partir del día 5 post-lesión, los animales recuperaron la movilidad de la pata afectada. En concordancia con reportes previos (Coronel *et al.*, 2011b), la hemisección espinal indujo una disminución progresiva en el umbral de retirada frente a estímulos mecánicos en ambas patas traseras (ipsi y contralaterales a la lesión). Esta disminución en el umbral de respuesta resultó estadísticamente significativa a partir del día 14 post-lesión ($p < 0,001$ vs CTL; Fig. 20A) y se alcanzaron valores alodínicos a partir del día 21 ($p < 0,001$ vs CTL; Fig. 20A). La respuesta alodínica fue observada aun al día 28 post-lesión ($p < 0,001$ vs CTL, Fig. 20A). Los animales mostraron cambios en su postura, con retracción del miembro afectado y actitudes de guardado del mismo. Al ser estimulados con los filamentos de von Frey, las retiradas bruscas de las patas fueron acompañadas por cambios de posición a fin de evitar el estímulo, giros o reacomodamiento dentro del cubículo, movimientos de cabeza e intentos de ataque al filamento. Todos los animales HX presentaron estos comportamientos defensivos a partir del día 14 post lesión. Estas complejas conductas de defensa descartan posibles respuestas reflejas y representan una fuerte evidencia de que el estímulo fue detectado a nivel supraespinal. De hecho, luego de una hemisección espinal al nivel de T13, determinadas vías persisten intactas y proveen del sustrato anatómico para la transmisión de los estímulos caudales al sitio de la lesión hacia centros supraespinales (Christensen *et al.*, 1996; Christensen y Hulsebosch, 1997).

Al evaluar la sensibilidad frente estímulos fríos se observó un comportamiento similar: disminución gradual en el umbral de retirada con aumento significativo en el número de respuestas positivas de ambas patas traseras a partir del día 14 luego de la lesión ($p < 0,001$ vs CTL, Fig. 20B). El mayor número de respuestas alodínicas fue detectado a los 21 y 28 días ($p < 0,001$ vs CTL, en ambos casos, Fig. 20B).

Los animales hemiseccionados que recibieron el tratamiento con PG (HX+PG) presentaron un comportamiento similar al de animales CTL, tanto frente a estímulos mecánicos como térmicos fríos ($p > 0,05$ vs CTL, a todos los tiempos evaluados, Fig. 20A,B). El grupo HX+PG no desarrolló alodinia mecánica ($p < 0,01$ a día 14, $p < 0,001$ a días 21 y 28 vs HX en ambas patas traseras; Fig. 20A) y mostró un número de respuestas frente a estímulos

fríos significativamente menor al del grupo HX ($p < 0,05$ a día 14, $p < 0,001$ a día 21 y $p < 0,01$ a día 28 en ambas patas traseras; Fig. 20B).

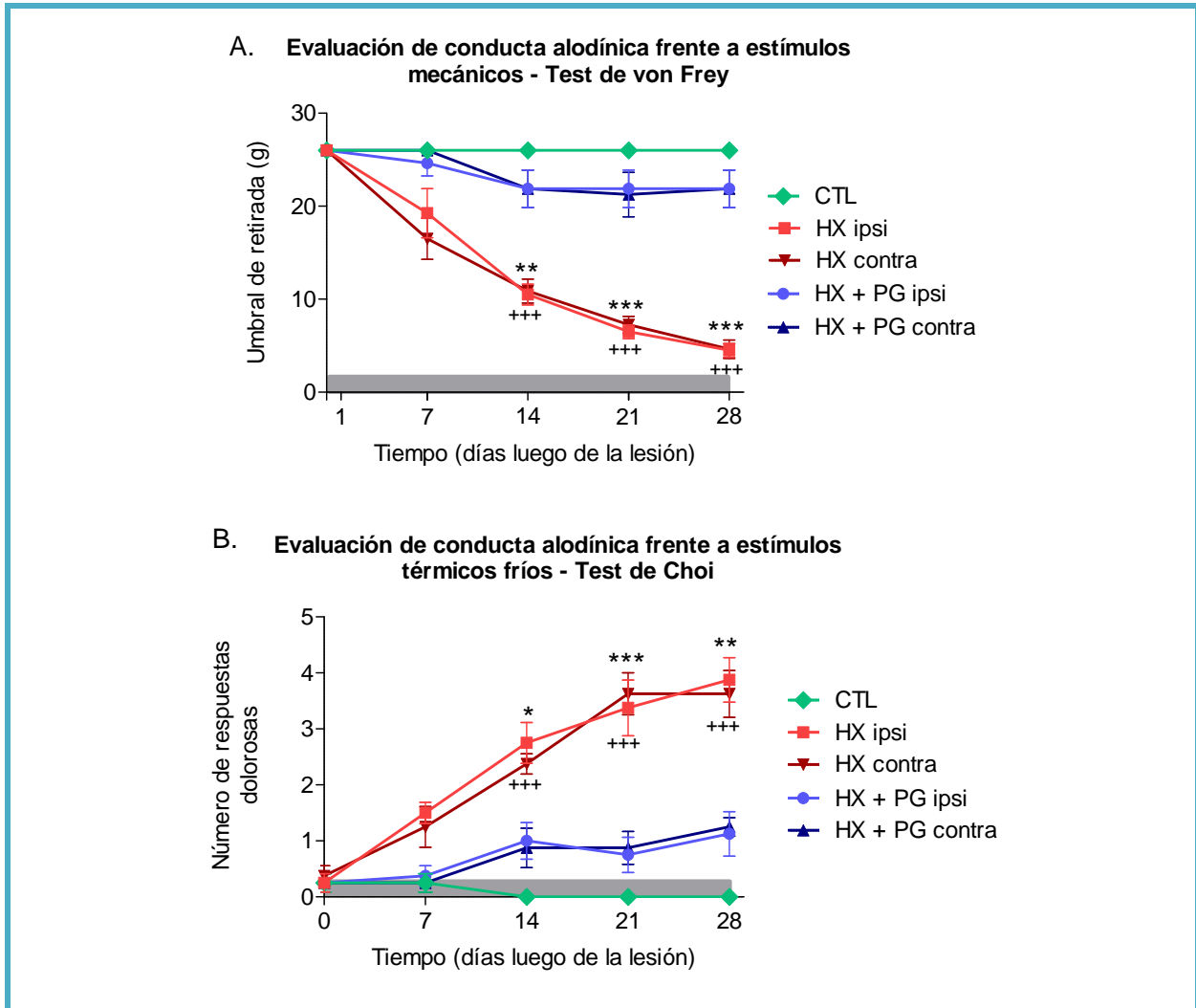


Figura 20: Evaluación de la presencia de alodinia en los tres grupos experimentales. Se muestran los resultados de análisis de la conducta alodínica de animales controles (CTL), con hemisección de su médula espinal (HX) y animales con injuria espinal que recibieron tratamiento con PG (HX+PG). En la sección A, se expone el umbral de retirada frente a estímulos mecánicos (Test de von Frey) y, en B, el número de respuestas dolorosas frente a estímulos térmicos fríos (Test de Choi) de ambas patas traseras (ipsi y contralaterales a la lesión). Los valores corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el Método de Friedman para Análisis de Varianza y un post test de comparación múltiple. Sólo se detallan las diferencias estadísticamente significativas utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ para comparar HX vs HX+PG // + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ y +++

$p < 0,001$ para comparar HX vs CTL. La región sombreada indica el tiempo durante el cual se administró PG o vehículo a los animales.

5.3. Impacto de la lesión espinal sobre la expresión de proteínas translocadoras y enzimas esteroideas

Como se expresó en la sección de “Materiales y Métodos” los niveles de ARNm de las proteínas translocadoras y enzimas esteroideas en estudio fueron evaluados mediante estudios de RT-PCR en tiempo real a 3 diferentes tiempos luego de la injuria espinal (1, 14 y 28 días), a fin de analizar cambios temporales de expresión.

Al día 1 post-lesión, la expresión de los ARNm de StAR y 5α -RI no mostraron variaciones significativas con respecto al grupo CTL ($p > 0,05$ en ambos casos; Fig. 21B,C). Al analizar la expresión de TSPO y 5α -RII, se observó que la injuria espinal desencadenó un incremento significativo en los niveles de ambos ARNm en la médula espinal dorsal ($p < 0,05$ vs CTL en ambos casos; Fig. 21A,D).

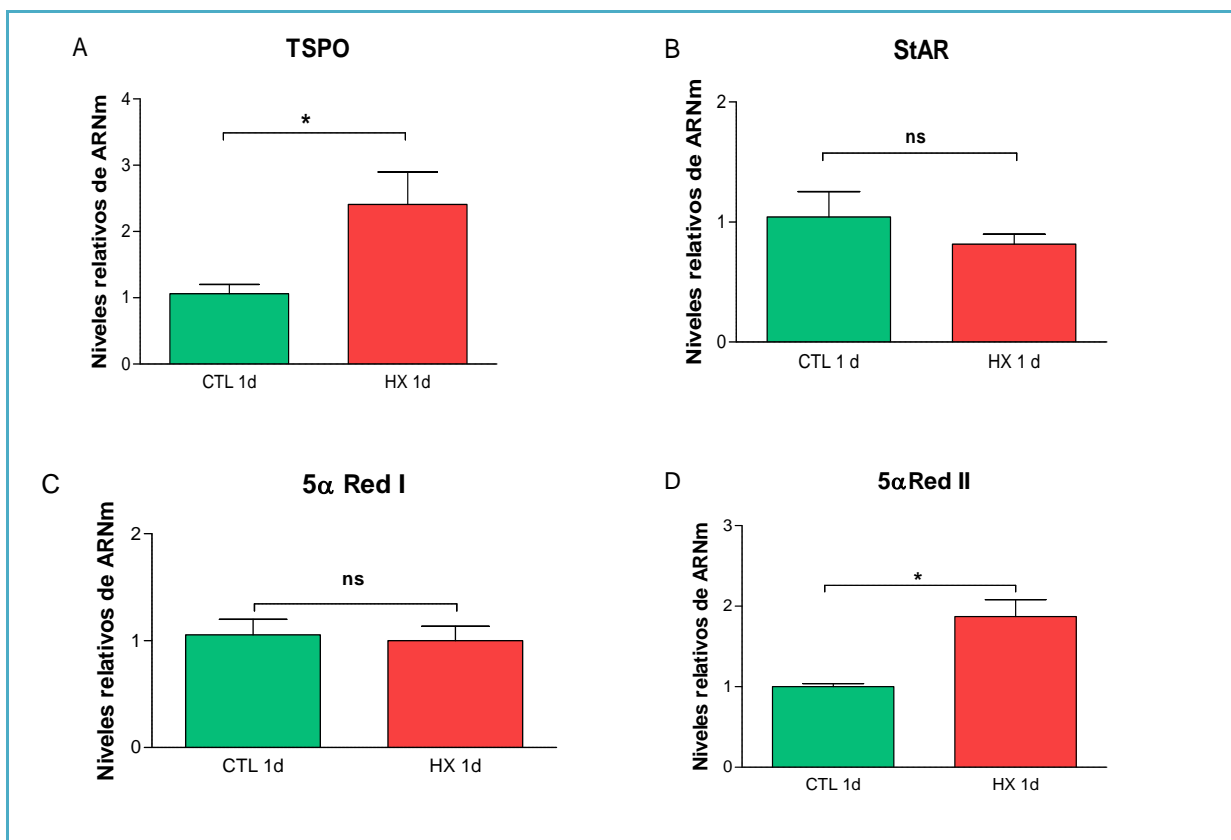


Figura 21: Niveles de los ARNm de TSPO, StAR, 5α -RI y 5α -RII en animales controles (CTL) y con hemisección de su médula espinal (HX), a día 1 luego de producida la injuria.

Los valores que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test T. Las diferencias estadísticamente significativas se detallan utilizando los siguientes símbolos: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En el plazo medio (14 días) los niveles de expresión de StAR y 5α -RI se mantuvieron similares a los detectados en animales CTL ($p > 0,05$ en ambos casos; Fig. 22B,C) mientras que los niveles de los ARNm de TSPO y 5α -RII mantuvieron el aumento significativo en los animales con injuria espinal ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ vs CTL respectivamente; Fig. 22A y D).

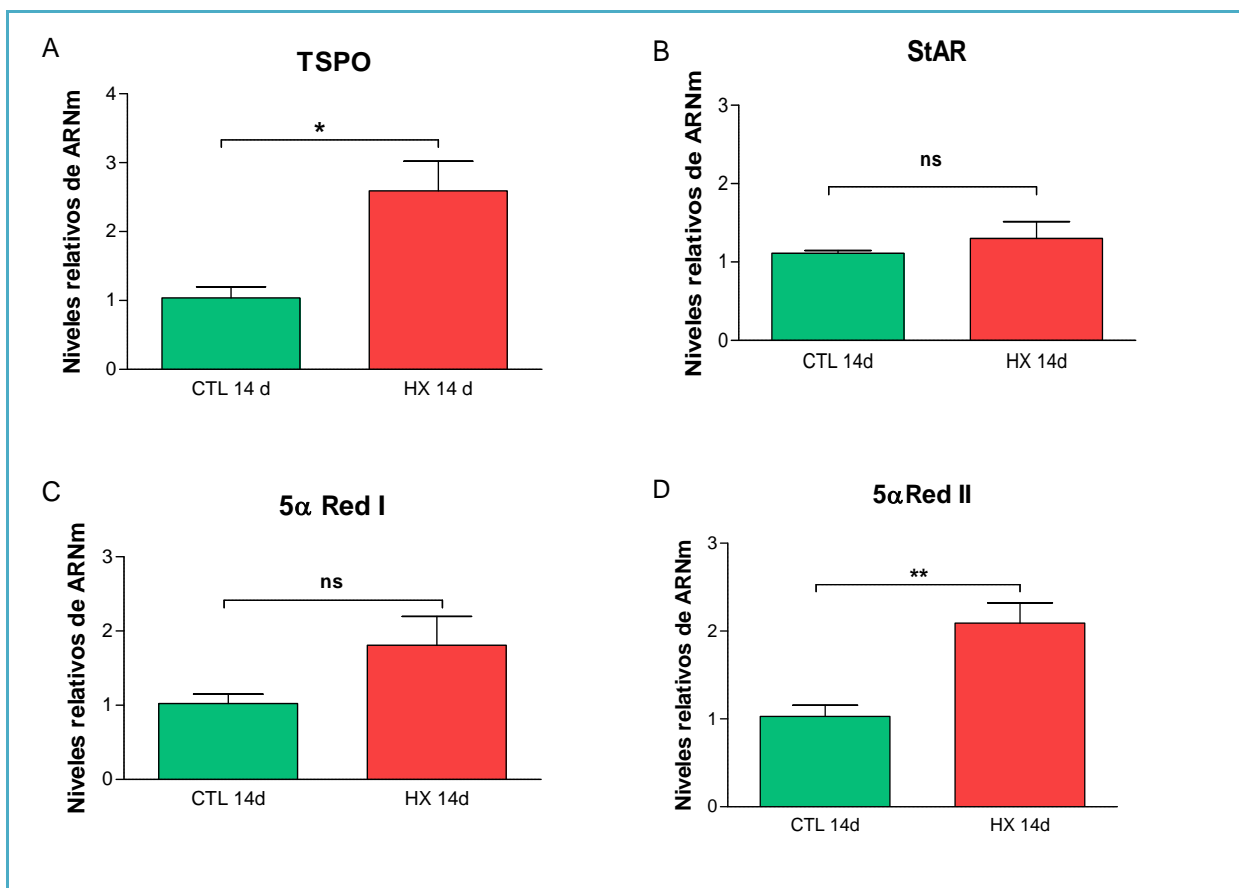


Figura 22: Niveles de los ARNm de TSPO, StAR, 5α -RI y 5α -RII en animales controles (CTL) y con hemisección de su médula espinal (HX), a día 14 luego de producida la injuria. Los valores que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test T. Las diferencias estadísticamente significativas se detallan utilizando los siguientes símbolos: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A día 28 post-lesión, los niveles de ARNm de TSPO y StAR fueron similares a los detectados en animales CTL ($p > 0,05$ en ambos casos; Fig. 23AyB), mientras que la

expresión de las enzimas 5 α -RI y 5 α -RII disminuyó significativamente en los animales con lesión espinal ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ vs CTL respectivamente; Fig. 23CyD).

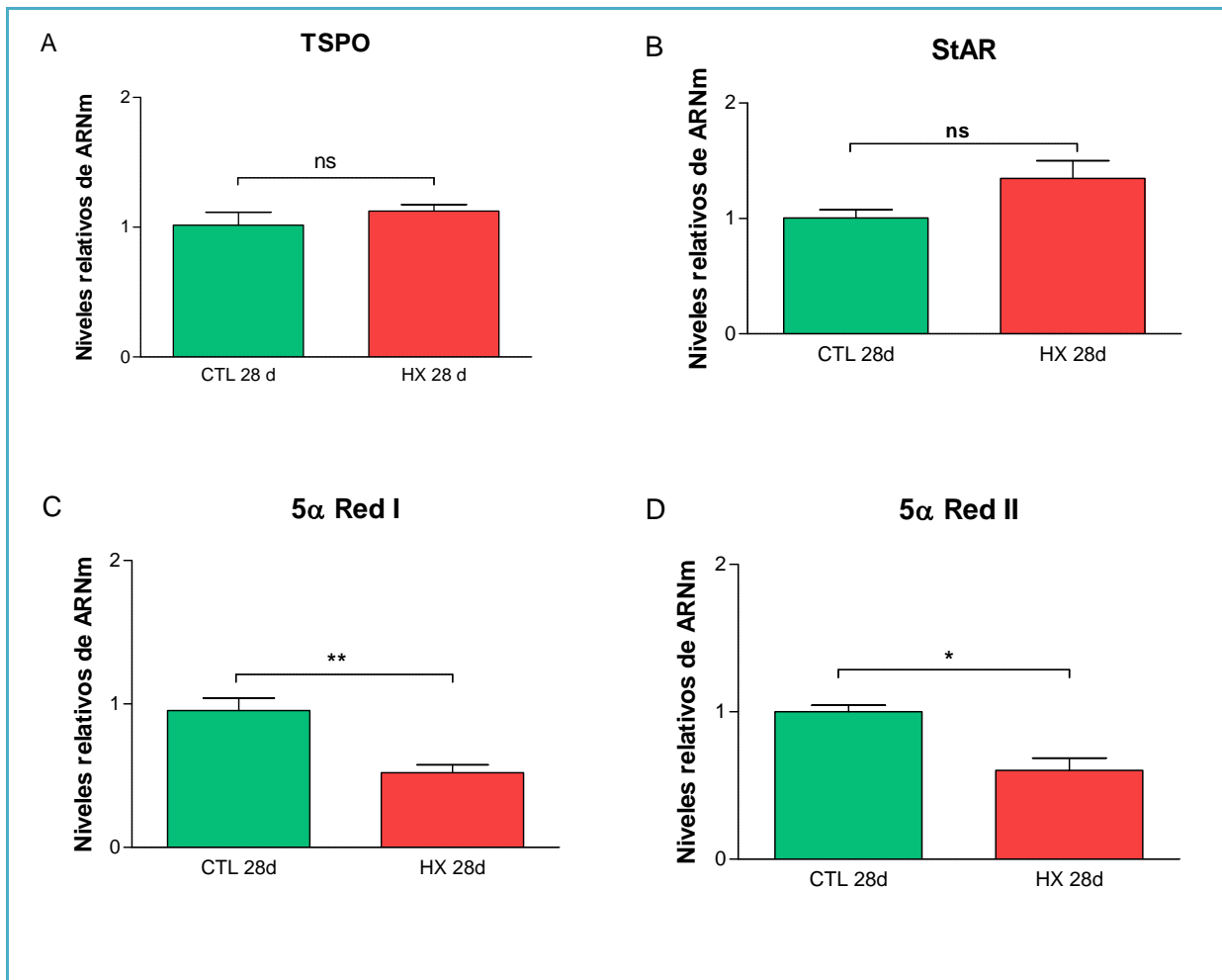


Figura 23: Niveles de los ARNm de TSP0, StAR, 5 α -RI y 5 α -RII en animales controles (CTL) y con hemisección de su médula espinal (HX), a día 28 luego de producida la injuria. Los valores que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando el test T. Las diferencias estadísticamente significativas se detallan utilizando los siguientes símbolos: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.4. Efecto del tratamiento crónico con progesterona sobre los niveles de expresión de proteínas translocadoras y enzimas esteroideogénicas a 28 días

A día 28 luego de la hemisección, los niveles de los ARNm de TSP0 se mostraron incrementados en los animales que recibieron PG en relación a los valores detectados en animales HX y CTL ($p < 0,001$ en ambos casos; Fig. 24.A). Los niveles de StAR

también mostraron un incremento significativo con respecto a los animales CTL y HX ($p < 0,05$ en ambos casos; Fig. 24.B). La enzima esteroideogénica 5α -RI presentó un incremento en los animales que recibieron PG con respecto a los animales HX ($p < 0,01$; Fig. 24.C) pero no mostró diferencias significativas con respecto a los valores detectados en los animales CTL ($p > 0,05$; Fig. 24C). Por último, se observó un aumento significativo en los niveles del ARNm de la enzima 5α -RII luego del tratamiento con PG en relación a los animales con injuria espinal no tratados y los animales CTL ($p < 0,001$ en ambos casos; Fig. 24.D).

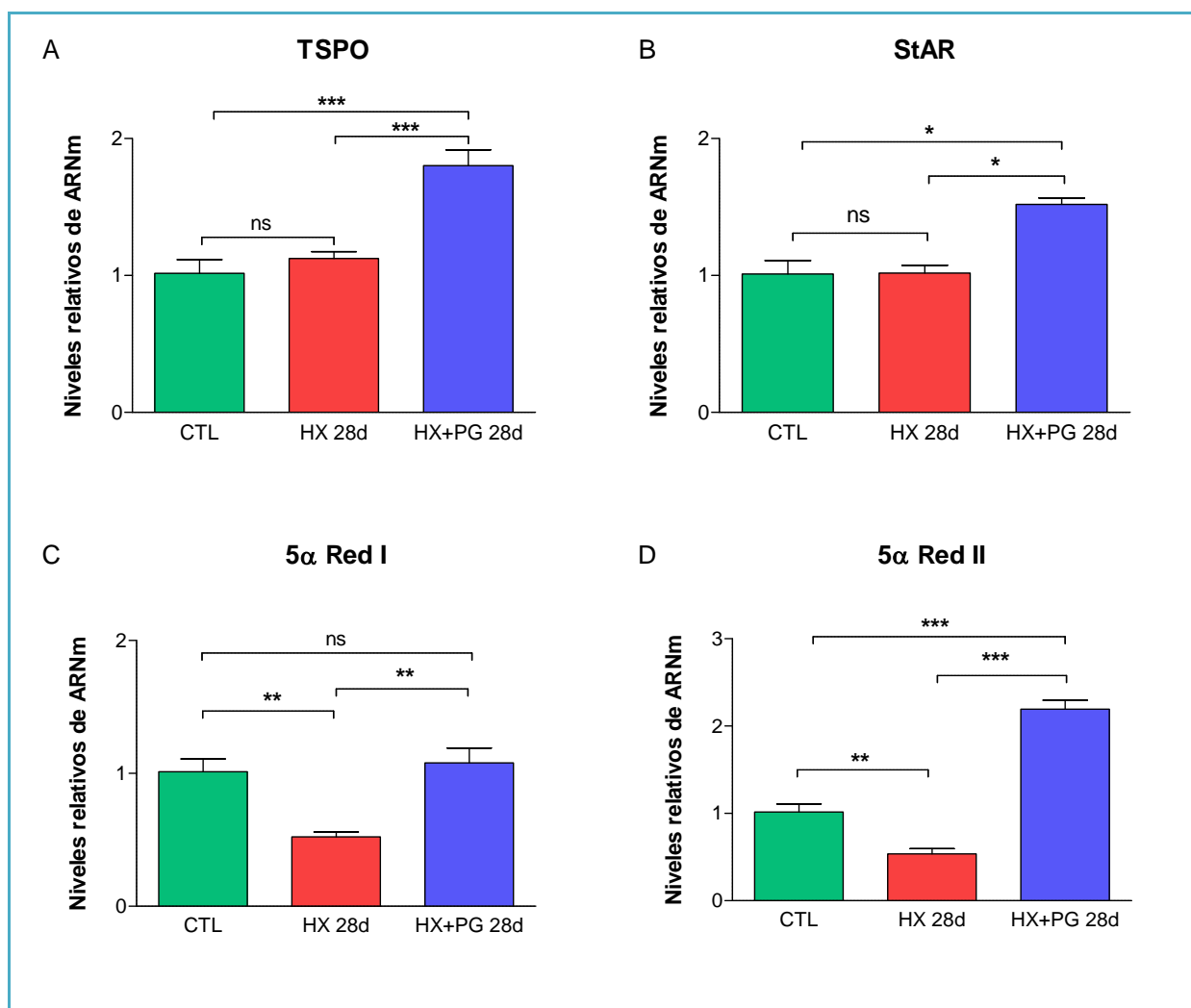


Figura 24: Niveles de los ARNm de TSPO, StAR, 5α -RI y 5α -RII en animales controles (CTL), con hemisección de su médula espinal (HX) o hemisección con tratamiento con progesterona (HX+PG), a día 28 luego de producida la injuria. Los valores que se muestran corresponden a la media \pm SEM y fueron analizados utilizando ANOVA de una vía. Las diferencias estadísticamente significativas se detallan utilizando los siguientes símbolos: ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. Discusión de los resultados

En la década de los 80, el trabajo pionero de un grupo de investigadores permitió demostrar que la síntesis de esteroides era posible en el sistema nervioso (Corpechot *et al.*, 1991; 1993). A partir de ese momento, varios grupos de investigación dedicaron sus esfuerzos a caracterizar e identificar la relevancia fisiológica del proceso de neuroesteroidogénesis estudiando principalmente el cerebro. Gracias a esos trabajos, hoy se sabe que los neuroesteroides se encuentran involucrados en el control de numerosos procesos biológicos, como el estrés, la ansiedad y la depresión (Baulieu, 2001; Robel y Baulieu, 1995). Durante ese período, la médula espinal recibió escasa atención, a pesar de ser una estructura clave en gran parte de los procesos neurofisiológicos como la transmisión somatosensorial, la actividad motora y refleja y las funciones neurovegetativas. Sin embargo, más recientemente se ha comenzado a valorar el papel de los esteroides sintetizados en el asta dorsal como importantes reguladores de los procesos nociceptivos y del dolor neuropático (Mensah-Nyagan *et al.*, 2008; 2009) y se ha postulado la inducción de la neuroesteroidogénesis como posible abordaje terapéutico para el tratamiento del dolor crónico (Melcangi *et al.*, 2014).

En la primera etapa del presente trabajo, utilizando un modelo animal de lesión espinal que desarrolla dolor neuropático, hemos demostrado que la injuria del sistema nervioso es capaz de causar un fuerte impacto en los niveles de ARNm de moléculas que resultan clave tanto para el inicio de la biosíntesis como para la formación de esteroides reducidos a nivel espinal. Nuestros resultados mostraron que durante el período temprano luego de la injuria (1 y 14 días post lesión), los animales presentan un incremento significativo en la expresión de la proteína translocadora TSPO, esencial para la entrada de colesterol a la mitocondria, y de la enzima 5 α -RII, involucrada en la síntesis de metabolitos reducidos. Sin embargo, durante la fase crónica post-injuria espinal (28 días), y coincidente con el desarrollo de dolor neuropático, estos procesos no se mantienen. En ese sentido, la expresión de TSPO disminuyó a los niveles de un animal control, y los niveles de ARNm tanto de 5 α -RI como de 5 α -RII se redujeron significativamente con respecto a los animales no lesionados.

En particular, la proteína TSPO ha sido recientemente involucrada en la modulación del dolor y en la respuesta neuroprotectora luego de injurias del sistema nervioso (Cermenati *et al.*, 2012; Giatti *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2013), y las isoenzimas

5 α -Rs, con la regulación de los niveles tisulares de los metabolitos reducidos de PG, con probadas acciones analgésicas (Meyer *et al.*, 2008; 2011; Melcangi y Panzica, 2014).

Por otro lado los niveles de ARNm de la proteína translocadora StAR no mostraron variaciones significativas a lo largo del tiempo luego de la lesión espinal. Al ser StAR una proteína cuya actividad depende de TSPO (Rone *et al.*, 2009), la proteína podría estar presente en niveles basales y ser activada por TSPO para iniciar la translocación del colesterol. Sin embargo, restaría evaluar en nuestras condiciones experimentales el estado de fosforilación de StAR, ya que constituye un factor clave en la modulación de la actividad/translocación de esta proteína (Arakane *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2014).

Nuestros resultados se hallan en concordancia con el trabajo de Liu y cols., que observaron un incremento de la expresión y actividad de TSPO en el asta dorsal como consecuencia de la ligadura de un nervio espinal, con un pico de expresión al día 14 y una disminución significativa los días posteriores (Liu *et al.*, 2014). El incremento en la expresión génica de TSPO también fue reportada en el asta dorsal de animales diabéticos (Calabrese *et al.*, 2014). A su vez, se ha observado y estudiado la estrecha relación entre el aumento de la expresión de TSPO y la atenuación del dolor neuropático; cuando el receptor de tipo TOLL 4 (TLR4) es activado por un ligando endógeno liberado de un tejido dañado, se genera la activación de células gliales y mayor producción de citoquinas inflamatorias las cuales conllevan a un estado de dolor crónico y mayor producción de TSPO en la médula espinal dorsal. A continuación ocurre una reducción de la activación de astrocitos y de la producción de citoquinas inflamatorias gracias al aumento de la síntesis de neuroesteroides modulada por TSPO, derivando en una mejora frente al dolor neuropático (Wei *et al.*, 2013).

En relación a las enzimas reductasas, varios trabajos han demostrado que la inhibición de las mismas por administración de finasteride aumenta el dolor en modelos animales, ya que previene la formación de metabolitos reducidos de PG y testosterona, potentes moduladores del receptor GABA_A capaces de producir analgesia (Duborija-Kovacevic *et al.*, 2008, Moradi-Azani *et al.*, 2011). A su vez, las variación observadas en la presente investigación en los niveles de 5 α -R también se correlacionan con estudios previos en los cuales en un modelo de dolor crónico por ligadura de nervio periférico mostraron la presencia de un fuerte incremento de 3 α -THP a día 7 post lesión; esto podría deberse a un aumento de 5 α -R que generaría un incremento en la síntesis de 5 α -DHP, metabolito a partir del cual se sintetiza 3 α -THP (Liu *et al.*, 2014).

A diferencia de lo que ocurre en el cerebro, a nivel espinal la 5α -R_{II} se expresa en mayor cantidad que la 5α -R_I. En particular, la 5α -R_{II} se encuentra altamente concentrada en la sustancia gris del asta dorsal, mayormente en neuronas y células gliales, y se ha encontrado que en numerosas células colocaliza con 3α -HSOR. Una de las limitaciones del presente trabajo fue la dificultad para evaluar la expresión de la enzima 3α -HSOR, encargada de la síntesis de $3\alpha,5\alpha$ -THP. Sin embargo, el paso previo, catalizado por las 5α -Rs que sintetizan 5α -DHP, constituye el paso limitante para la síntesis de $3\alpha,5\alpha$ -THP (Li *et al.*, 1997) y podría favorecer el incremento en la concentración de estos metabolitos. A su vez, evidencias experimentales también han demostrado la importancia de las 5α -Rs, ya que la analgesia no se observa en ratones con deficiencia de 5α -Rs (Frye *et al.*, 2002; 2004). Cabe aclarar que si bien en este trabajo se han evaluado exclusivamente los cambios en los niveles relativos de ARNm, consideramos que nuestros resultados abren la oportunidad de extender estas observaciones en el futuro, analizando tanto la actividad de las proteínas translocadoras y las enzimas esteroideas, como los niveles de los neuroesteroides de interés.

Otra limitante de nuestro trabajo fue no poder estudiar los niveles de los ARNm de las enzimas P450_{scc} y 3β -HSD. Sin embargo, trabajos previos realizados en un modelo de lesión completa de la médula espinal en rata, determinaron que si bien los niveles de PREG, PG, 5α -DHP y 3α - 5α -THP aumentan en la médula espinal 75 horas después de realizada una transección de la médula espinal (Labombarda *et al.*, 2006), no se observan variaciones significativas en los niveles de ARNm de P450_{scc} y 3β -HSD. Los autores sugieren que la producción incrementada de estos metabolitos podría estar asociada a la estimulación de la actividad de estas enzimas y/o a la estimulación de la expresión/actividad de TSPO y StAR, involucradas en los pasos previos y limitantes de la síntesis de neuroesteroides (Labombarda *et al.*, 2006). Nuestros hallazgos confirman en parte la hipótesis planteada por estos autores, y sugieren que las variaciones en los niveles de TSPO podrían afectar directamente los niveles de PG y sus metabolitos a nivel espinal luego de la lesión.

A su vez, haber realizado los tests de conducta permitió determinar si los animales desarrollaban alodinia luego de la lesión y relacionarlo con las variaciones en el tiempo de las proteínas translocadoras y las enzimas esteroideas analizadas. Como se explicó anteriormente en el Test de von Frey se considera conducta alodínica cuando el animal muestra respuestas positivas frente a filamentos de 6 gramos o menos y en el caso del Test de Choi, se considera que un animal posee alodinia cuando reacciona positivamente 2 o

más veces frente al estímulo frío. Se puede decir que los animales al día 14 luego de la lesión ya expresaban conductas alodínicas frente a estímulos fríos y que al día 21 ya mostraban conductas alodínicas frente a estímulos mecánicos. Se podría pensar que ante una lesión de la médula espinal el tejido intenta, en un primer momento, generar mayor cantidad de neuroesteroides permitiendo la entrada de colesterol a la mitocondria e iniciando la vía esteroideogénica en el tejido medular. Pero al largo plazo (28 días luego de la lesión), cuando la alodinia mecánica y térmica ya se encuentra establecida, los niveles de las enzimas esteroideogénicas 5α -RI y 5α -RII muestran una disminución significativa al mismo tiempo que TSPO vuelve a sus niveles basales, dando a pensar que los mecanismos intracelulares no fueron suficientes para contribuir a mantener la producción de esteroides y evitar el establecimiento del dolor crónico.

Los derivados reducidos de la PG son de particular interés ya que actúan como potentes moduladores alostéricos positivos del receptor $GABA_A$, participando de este modo en el control de la información somatosensorial a nivel espinal. De hecho, se ha demostrado que incrementar los niveles locales de $3\alpha,5\alpha$ -THP en el asta dorsal produce analgesia en animales con injurias de nervios periféricos, en tanto que inhibir la síntesis de estos esteroides en los circuitos espinales incrementa el dolor crónico (Meyer *et al.*, 2008).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en la etapa temprana luego de la injuria (1-14 días) sugieren que la biosíntesis de neuroesteroides reducidos podría representar un mecanismo endógeno de protección que se activa en respuesta a la lesión, en un intento por reducir el estado de dolor crónico (Mensah-Nyagan *et al.*, 2008; 2009). En este sentido, trabajos previos han sugerido que el incremento en la concentración de neuroesteroides sería un mecanismo clave para enfrentar las consecuencias adversas de la injuria, como la toxicidad ejercida por el glutamato, cuyos niveles se incrementan dramáticamente luego de una lesión espinal (Liu *et al.*, 1991;1999).

En el presente trabajo se ha evaluado, además, el efecto de la PG sobre la conducta alodínica y la expresión de las moléculas en estudio. Hoy se sabe que la PG no es sólo una hormona involucrada en reproducción, y se le han asignado diversas funciones neuroprotectoras (De Nicola *et al.*, 2013; Melcangi *et al.*, 2014; Schumacher *et al.*, 2007). La PG y sus metabolitos reducidos actúan como reguladores fisiológicos de la función nerviosa y como agentes neuroprotectores en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas e injurias del sistema nervioso (Melcangi *et al.*, 2014) incluyendo modelos experimentales de la

enfermedad de Alzheimer (Wang *et al.*, 2008), Parkinson (Bourque *et al.*, 2009; Callier *et al.*, 2001), epilepsia (Rhodes y Frye, 2004), infarto (Chen *et al.*, 1999; Sayeed *et al.*, 2007), degeneración de motoneuronas (Gonzalez-Deniselle *et al.*, 2002), esclerosis múltiple y demielinización (Garay *et al.*, 2007; Giatti *et al.*, 2012b), e injuria traumática cerebral (Culter *et al.*, 2007; Djebaili *et al.*, 2005) y espinal (Coronel *et al.*, 2011b; 2014; Labombarda *et al.*, 2006). En base a estos múltiples antecedentes se podría introducir el uso de esteroides neuroactivos y/o la estimulación de la síntesis de neuroesteroides como posibles estrategias terapéuticas para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos y lesiones del sistema nervioso.

Por otra parte, numerosos estudios también sustentan el importante rol de los esteroides neuroactivos en la modulación del dolor (Mensah-Nyagan *et al.*, 2008; 2009). En condiciones fisiológicas la PG media la antinocicepción gestacional (Gintzler y Liu, 2001), contribuye a las diferencias en dolor relacionadas al sexo (Liu y Gintzler, 2000) y reduce la sensibilidad al dolor en animales controles (Frye y Duncan, 1994). Más aún, la PG ejerce también un potente efecto modulador de la conducta neuropática (Coronel *et al.*, 2011a; 2011b). En trabajos previos del Laboratorio de Nocicepción y Dolor Neuropático del Instituto de Biología y Medicina Experimental se ha demostrado que la PG previene el desarrollo de alodinia mecánica y térmica en animales con hemisección de la médula espinal (Coronel *et al.*; 2011b; 2014). Estos trabajos muestran que la administración de PG es capaz de prevenir el aumento en la expresión de moléculas involucradas en la generación de dolor neuropático, tales como las subunidades de NMDAR y la PKC γ , en animales con injuria espinal (Coronel *et al.*, 2011b). Además, Coronel y cols. demostraron que la PG media la regulación de eventos neuroinflamatorios iniciados luego de la injuria espinal, tales como la activación glial y la producción de moléculas proinflamatorias, y por lo tanto podría representar una interesante estrategia terapéutica para prevenir el desarrollo de dolor crónico de origen central.

En éste contexto se propuso analizar el impacto de la administración de PG sobre los niveles de expresión de las proteínas translocadoras y enzimas de la vía esteroideogénica en un modelo experimental de dolor crónico central, de modo de analizar el rol de la PG como agente regulador de los niveles endógenos de neuroesteroides. En este trabajo, y de acuerdo con la experiencia previa del grupo, el tratamiento crónico con PG (durante 28 días post-lesión) fue capaz de prevenir las conductas alodínicas que se desarrollan en este modelo de injuria espinal. En ese período, los animales mostraron un incremento

significativo en los ARNm de TSPO, StAr, 5 α -RI y 5 α -RII en comparación con los animales lesionados que no recibieron tratamiento, lo que sugiere que la administración de PG favorecería la producción de neuroesteroides luego de la lesión espinal.

Nuestros hallazgos estarían de acuerdo con estudios recientes que demuestran que la PG administrada de manera crónica incrementa los niveles y la actividad de TSPO en la médula espinal de animales con injuria del nervio periférico y disminuye el dolor (Liu *et al.*, 2014). Este efecto de la PG sobre la expresión de TSPO sería dependiente de la producción de metabolitos reducidos (Liu *et al.*, 2014).

En cuanto al efecto de PG sobre la expresión de las 5 α -Rs, estudios funcionales previos revelaron la existencia de secuencias regulatorias capaces de unir el receptor de PG en la región promotora del gen que codifica para la 5 α -RII (Matsui *et al.*, 2002). Dada la presencia del receptor clásico de PG (PR) en las células de la médula espinal, la expresión de la enzima 5 α -RII podría estar regulada por PG a través de mecanismos transcripcionales luego de la lesión espinal, favoreciendo su conversión a metabolitos reducidos que disminuyen el dolor. Cabe aclarar que el PR pertenece a la super-familia de receptores nucleares y actúa como factor de transcripción, regulando la expresión génica mediante su unión a elementos respondedores específicos del ADN. Sin embargo, la PG utiliza múltiples vías de señalización (De Nicola *et al.*, 2013; Guennoun *et al.*, 2014).

Como ya se ha mencionado previamente, PG se une también a receptores de membrana (mPR, PGRMC1) y activa cascadas de señalización intracelular. El PGRMC1 se expresa en neuronas del asta dorsal y en células endocitóticas cercanas al canal central. A su vez, los niveles de expresión de PGRMC1 aumentan luego de la administración de PG por 3 días (durante la etapa aguda) a animales con injuria espinal (Labombarda *et al.*, 2003). Hughes y cols. han descripto que PGRMC1 se encuentra involucrado en la neuroesteroidogénesis y que es requerido para la actividad de P450scc (Hughes *et al.*, 2007). En otros modelos se ha observado que el incremento en la expresión de PGRMC1 inducido por PG en células de Purkinje parecería aumentar la actividad del citocromo P450scc y de 3 β -HSD (Wessel *et al.*, 2014), éste podría ser otro mecanismo por medio del cual la PG logra aumentar la neuroesteroidogénesis. Además, los efectos observados luego de la administración de PG pueden ser mediados por su metabolito 3 α -5 α -THP, un potente modulador alostérico positivo de los receptores GABA_A. Tanto el cerebro como la médula espinal expresan todos estos receptores y poseen la capacidad de metabolizar PG a 3 α -5 α -

THP (De Nicola *et al.*, 2013; Guennoun *et al.*, 2014; Schumacher *et al.*, 2014). Esto sugiere que diferentes mecanismos pueden ser disparados en estos tejidos según la condición fisiológica o patológica, dependiendo de la concentración de los metabolitos y los niveles de expresión de los receptores (Guennoun *et al.*, 2014).

6.1. Perspectiva clínica del Trabajo

El dolor neuropático causado por traumatismos o lesiones del sistema nervioso central, como es el caso de la injuria de la médula espinal, es refractario a las principales terapias analgésicas disponibles en la actualidad. Los pacientes con lesiones espinales, no sólo deben enfrentar la parálisis y/o los variados déficits motores asociados, sino que también resultan víctimas de dolor crónico resistente a las terapias conocidas.

El descubrimiento de nuevas estrategias o de moléculas analgésicas capaces de tratar eficazmente los dolores resistentes constituye un verdadero desafío para la investigación biomédica. Por lo tanto, en el Laboratorio de Nocicepción y Dolor Neuropático, y dada la experiencia previa del equipo de trabajo, se estudia la posibilidad de emplear el tratamiento con PG como una estrategia terapéutica tendiente a atenuar el dolor neuropático de origen central, modulando en parte los procesos neuroesteroidogénicos.

Algunas de las principales ventajas asociadas al uso de PG para el tratamiento del dolor desencadenado por injurias del sistema nervioso son la extensa experiencia de su uso en humanos, la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, permitiendo su administración sistémica, los escasos efectos adversos asociados y el bajo costo (Stein *et al.*, 2011). En los últimos años, se han comprobado los efectos benéficos de la administración de PG a pacientes con injuria cerebral traumática en ensayos clínicos fase II; en ellos no se observaron efectos adversos serios y se detectó una mejoría en la evolución de las funciones neurológicas y una disminución de la mortalidad (Wright *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008). Así mismo se ha evaluado el tratamiento de pacientes con síndrome de túnel carpiano con una única inyección de 17-alpha-hydroxyprogesterona caproato (derivado de la PG), el cual resultó ser efectivo disminuyendo el dolor (Ginanneschi *et al.*, 2012).

Por lo tanto, la PG podría resultar un seguro y efectivo agente terapéutico para la modulación del dolor neuropático.

7. Resumen de resultados y Conclusión

En el presente trabajo hemos demostrado que:

- a) durante el período temprano luego de la injuria (1 y 14 días post lesión), los animales presentan un incremento significativo en la expresión de la proteína translocadora TSPO, esencial para la entrada de colesterol a la mitocondria, y de la enzima 5α -RII, involucrada en la síntesis de metabolitos reducidos.
- b) durante la fase crónica post-injuria espinal (28 días), y coincidente con el desarrollo de dolor neuropático, esos procesos no se mantienen, y se observa una disminución significativa de la expresión de TSPO y de las 5α -Rs con respecto a los animales no lesionados.
- c) el tratamiento crónico con PG (28 días) fue capaz de prevenir las conductas alodínicas que se desarrollan en este modelo de injuria espinal.
- d) los animales tratados con PG mostraron un incremento significativo en los ARNm de TSPO, StAR, 5α -RI y 5α -RII en comparación con los animales lesionados que no recibieron tratamiento.

Se concluye que la injuria espinal afecta los niveles de expresión de importantes proteínas regulatorias y enzimas de la vía esteroideogénica. El tratamiento con PG previene el desarrollo de dolor persistente y favorecería la producción de neuroesteroides luego de la lesión espinal.

8. Bibliografía

ABARIKUW, Sunny O., *et al.* Atrazine induces transcriptional changes in marker genes associated with steroidogenesis in primary cultures of rat Leydig cells. *Toxicology in Vitro*. 2011, vol. 25, p. 1588–1595.

AKISKAL, Hagop S., *et al.* MSD Salud Enfermedades y Transtornos - Cerebro y Sistema Nervioso - Transtornos de la Médula Espinal - OCEANO, 2013. - *Manual Merck de diagnóstico y terapéutica en Español*. [en línea] [consulta 24 agosto 2014] - <https://www.msdsalud.es/manual-merck-hogar/seccion-6/trastornos-medula-espinal.html>.

ALPY, Fabien y TOMASETTO, Catherine. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *Journal of Cell Science*. 2005, vol. 118, p. 2791–2801.

AMORIM, Miguel A., *et al.* Progesterone regulates the phosphorylation of protein phosphatases in the brain. *Journal of Neuroscience Research*. 2010, vol. 88, p. 2826-2832.

ANDERSEN, Lindbjerg Claus. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*. 2004, vol. 64, p. 5245.

ANDERSSON, Stefan y RUSSEL, David W. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proceedings of the National Academy of Science - USA*. 1990, vol. 87, p. 3640-3644.

ARAKANE, Futoshi, *et al.* Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, vol. 272, p. 32656-32662.

ARDESHIRI, Ardeshir, *et al.* Mechanisms of progesterone neuroprotection of rat cerebellar Purkinje cells following oxygen-glucose deprivation. *European Journal of Neuroscience*. 2006, vol. 24, p. 2567-2574.

AREVALO, María Ángeles, *et al.* Gonadal hormones and the control of reactive gliosis. *Hormones and Behavior*. 2012, vol. 63, p. 216-221.

ASOCIACIÓN ARGENTINA PARA EL ESTUDIO DEL DOLOR (AAED). [En línea]. 2009. [consulta 20 de agosto 2014]. < <http://www.aedolor.org.ar/>>.

BAASTRUP, Cathrine y FINNERUP, Nanna B. Pharmacological management of neuropathic pain following spinal cord injury. *CNS Drugs*. 2008, vol. 22, p. 155-475.

BAJO, Michal, *et al.* Chronic morphine treatment alters expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the extended amygdala. *Journal of Neuroscience Research*. 2006, vol.83, p. 532-537.

BALAZY, Tobias E. Clinical management of chronic pain in spinal cord injury. *Clinical Journal of Pain*. 1992, vol. 8, p. 102-110.

BARNEA, Eytan R., FARES, Fuad y GAVISH, Moshe. Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1989. , vol. 64, p. 155–159.

BASBAUM, Allan, *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell - Leading Edge*. 2009, vol. 139 (2), p. 267-84

BASBAUM, Allan y JESSELL, Thomas. The perception of pain. *Principles of Neuroscience*, Ed. Lange New York. 2000.

BAULIEU, Etienne-Emile. Neurosteroids, their role in brain physiology: Neurotrophycity, memory, aging. *Journal Bulletin Academy of National Medicine*. 2001 , vol. 185, p. 267-284.

BAULIEU, Etienne-Emile, ROBEL, Peter y SCHUMACHER, Michael. Neurosteroids: A New Regulatory Function in the Nervous System. *Contemporary Endocrinology, Humana Press*, Totowa. 1999, p. 379.

BELELLI, D y LAMBERT JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *National Review of Neuroscience*. 2005, vol. 6, p. 565-575.

BENMESSAHEL, Yasmina, *et al.* Benmessahel et al. Downregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by cyclic AMP in cultures Schwann cells. *Glia*. 2004, vol. 45, p. 213-228.

BENN, Susanna C. y WOOLF, Clifford. Adult neuron survival strategies - slamming on the brakes. *National Review of Neuroscience*.2004, vol. 5, p. 686-700.

BERIC, Aleksandra, DIMITRIJEVIC, Milan R. Y LINDBLOM, Ulf. Central dysesthesia syndrome in spinal cord injury patients. *Pain*. 1988. , vol. 34, p. 109-116.

BERMAN, David y RUSSEL, David. Cell-type-specific expression of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. *Proceedings of the National Academy of Science - USA*. 1993, vol. 90, p. 9359-9363.

BIGGIO, Giovanni, et al. GABA(A) receptor function and gene expression during pregnancy and postpartum. *International Review of Neurobiology*. 2009, vol. 85, p. 73-94.

BITAR, Milad y PICHER, Charles W. Diabetes attenuates the response of the lumbospinal noradrenergic system to idazoxan. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 2000, vol. 67 (2), p. 247-255.

BOSE, Himangshu S., LINGAPPA, Vishwanath y MILLER, Walter L. The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane. *Endocrinology Research*. 2002, vol. 28, p. 295–308.

BOURQUE, Mélanie, DLUZEN, Dean E. y Di PAOLO, Thèrése. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2009, vol. 30, p. 142-157.

BRIEVIK, Harald, *et al.* Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*. 2006, vol. 10. - p. 287.

a, Robert, *et al.* Progesterone receptors: form and function in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2008, vol. 29, p. 313-339.

BROWN, Rachel C., *et al.* Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology Aging*. 2003, vol. 24, p. 57-65.

BURCHIEL, Kim J. y HSU, Frank P. Pain and spasticity after spinal cord injury: mechanisms and treatment. *Spine*. 2001, vol. 26, p. 146-160.

BUSTIN Samuel A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000, vol. 25 (2), p. 169–193.

CAFFERTY, William B., McGEE, Aaron W. y STRITTMATTER, Stephen M. Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity? *Trends in Neurosciences*. 2008, vol. 31, p. 215-220.

CALABRESE, Donato, *et al.* Neuropathic pain: a role for testosterone metabolites. *Journal of Endocrinology*. 2014, vol. 221, p. 1-13.

CALLIER, Santino, *et al.* Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57B1/6 mice. *Synapse*. 2001, vol. 41, p. 131-138.

CAMPBELL, James N. y MEYER, Richard A. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 2006, vol. 52, p. 77-92.

CASELLAS, Pierre, GALIEGUE, Sylvaine y BASILE, Anthony S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochemistry International*. 2002, vol. 40, p. 475–486.

CERMENATI, Gaia, *et al.* Diabetes-induced myelin abnormalities are associated with an altered lipid pattern: protective effects of LXR activation. *Journal of Lipid Research*. 2012, vol.53 (2), p. 300-310.

CHANGE PAIN - ESPAÑA PAIN EDUCATION. *Curso acreditado y estructurado en módulos de formación, enfocado en la fisiología y mejor abordaje del dolor crónico intenso*. Desarrollado en colaboración con la European Pain Federation EFIC® y coordinado en España por la Sociedad Española del Dolor (SED). [En línea]. 2011. [consulta 22 de agosto 2014]. << http://www.changepain.org/grt-change-pain-portal/GRT-CHANGE-PAIN-PORTAL_es_Home/Iniciativas_CHANGE_PAIN_/Formacion/122000007.jsp. >>.

CHAN, Jonah R., *et al.* Rodriguez-Waitkus, P.M., Ng, B.K., Liang, P., Glaser, M. Progesterone synthesized by Schwann cells during myelin formation regulates neuronal gene expression. *Molecular Biology of Cell*. 2000, vol. 11, p. 2283–2295.

CHEN, Jieli, CHOPP, Michael y LI, Yi. Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of Neurological Science*. 1999, vol. 171, p. 24-30.

CHEN, Shao-Rui y PAN, Hui-Lin. Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats. *Anesthesiology*. 2003, vol. 99 (6), p. 1409-1414.

CHEN, Shao-Rui y PAN, Hui-Lin. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *Journal of Neurophysiology*. 2002, vol. 87 (6), p. 2726-2733.

CHOMCZYNSKI, Piotr. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*. 1993, vol. 15, 532-537.

CHOMCZYNSKI, Piotr y SACCHI, Nicolas. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987, vol.162, 156-159.

CHRISTENSEN, Marc D., *et al.* Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain*. 1996, vol. 68, p. 97-107.

CHRISTENSEN, Marc D. y HULSEBOSCH, Claire E. Chronic central pain after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 1997, vol. 14, p. 517-537.

CHUNG, Bon-Chu, *et al.* Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proceedings of the National Academy of Science - USA*. 1986, vol. 83, p. 8962–8966.

COIRINI, Hector, *et al.* 3 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat spinal cord. *Neuroscience*. 2002, vol. 113, p. 883-891.

COMPAGNONE, Nathalie A., *et al.* Expression of the steroidogenic enzyme P450_{scc} in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology*. 1995, vol. 136, p. 2689–2696.

CORNU, Philippe, *et al.* Increase in omega 3 (peripheral-type benzodiazepine) binding site densities in different types of human brain tumours. A quantitative autoradiography study. *Acta Neurochirurgica*. 1992, vol. 119, p. 146–152.

CORONEL, Maria Florencia, *et al.* Progesterone reduces the expression of spinal cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase and prevents allodynia in a rat model of central neuropathic pain. *European Journal of Pain*. 2014, vol. 18 (3), p. 348-359.

CORONEL, Maria Florencia, *et al.* Progesterone prevents allodynia after experimental spinal cord injury. *Journal of Pain*, January de 2011b, vol. 12, p. 71-83.

CORONEL, Maria Florencia, *et al.* Progesterone prevents nerve injury-induced allodynia and spinal NMDA receptor upregulation in rats. *Pain Medicine*, 2011a, vol. 12 (8), p. 1246-1261.

CORPECHOT, Colette, *et al.* Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Science - USA*. 1981, vol. 78 (8), p. 4704-4707.

CORPECHOT, Colette, *et al.* Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Research*. 1983, vol. 270 (1), p. 119-25.

CORPECHOT, Colette, *et al.* Neurosteroids: 3-alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 1993, vol. 133, p. 1003-1009.

CORTAZAR, Adrian y SILVA RINCON MARTINEZ, Elsa Patricia. Métodos Físico-Químicos en Biotecnología; PCR. *Universidad Nacional de México, Instituto de Biotecnología*, Distrito Federal de México, 2004.

COSTIGAN, Michael, SCHOLZ, Joachim y WOOLF, Clifford J. Neuropathic Pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. *Neuroscience*, 2009, vol. 32, p. 1-32.

COURTEIX, Charles, *ESCHALIER*, Arthur y LAVARENNE, Julius. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioral evidence for a model of chronic pain. *Pain*. 1993, vol. 53 (1), p. 81-88.

CULTER, Sarah M., *et al.* Progesterone improves acute recovery after traumatic brain injury in the aged rat. *Journal of Neurotrauma*. 2007, vol. 24, p. 1474-1486.

DAVIDOFF, Gary, *et al.* Function limiting dysesthetic pain syndrome among traumatic spinal cord injury patients: a cross-section study. *Pain*. 1987, vol. 29, p. 39-48.

DAWSON-BOSOA, Mary y GINTZLER, Alan R. Gestational and ovarian sex steroid antinociception: synergy between spinal kappa and delta opioid systems. *Brain Research*. 1998, vol. 794 (1), p. 61-67.

DAWSON-BOSOA, Mary y GINTZLER, Alan R. Involvement of spinal cord delta opiate receptors in the antinociception of gestation and its hormonal simulation. *Brain Research*. 1997, vol. 757 (1), p. 31-42.

DEEPAK, Shukla, Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*. 2007, vol. 8(4), p. 234-251.

DELEO, Joyce A., SORKIN, Linda S. y WATKINS, Linda R. Immune and glial regeneration of pain. *Conference of Pain, Seattle, 2007*.

DEIELAM, Jeanne P., *et al.* Incidence rate and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain*. 2008, vol. 137, p. 681-688.

DE NICOLA, Alejandro Federico, *et al.* Therapeutic effects of progesterone in animal models of neurological disorders. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 2013, vol. 12 (8), p. 1205-1218.

DISCOVERY CHANNEL. Individual Burdens of Chronic Pain, "*Pain Matter*". [en línea] 2013. [consultado 4 de agosto 2014]. <<<http://www.painmattersfilm.com>>>.

DJEBAILI, Myriam, *et al.* The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. 2005, vol. 22, p. 106-118.

DRAKE, Richard, *et al.* *Anatomía de Gray para estudiantes*. Barcelona, España. Elsevier España S.L., 2010.

DUARTE, Alejandra, *et al.* Mitochondrial fusion and ERK activity regulate steroidogenic acute regulatory protein localization in mitochondria. *PLoS One*. 2014, vol. 9(6), e100387. doi: 10.1371/journal.pone.0100387.

DUCREUX, Denis, *et al.* Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia. *Brain*. 2006, vol. 129, p. 963-976.

DUBORIJA-KOVACEVIC, Natasa, *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory properties of 5alpha-reductase inhibitor finasteride in experimental animals. *European Journal Drug Metabolism Pharmacokinetics*. 2008, vol. 33 (3), p. 181-186.

DWORKIN, Robert H., *et al.* Advances in neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*. 2003, vol. 132, p. 237-251.

ESER, Daniela, *et al.* Neuroactive steroids as endogenous modulators of anxiety. *Current Pharmaceutical Design*. 2008, vol. 14, p. 3525-3533.

FAN, Jinjiang y PAPADOPOULOS, Vassilios. Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals. *PLoS One*. 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0076701.

FINNERUP, Nanna B., SINDRUP, Soren H. y JENSEN, Troels S. Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2007, vol. 21, p. 129-136.

FINNERUP, Nanna B., *et al.* Pain and dysesthesia in patients with spinal cord injury: A postal survey. *Spinal Cord*. 2001, vol. 39, p. 256-262.

FOLLESA, Paolo, *et al.* Role of allopregnonelone in regulation of GABA(A) receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. *Brain Research - Brain Research Reviews*. 2001, vol. 37, p. 81-90.

FRYE, Cheryl A., *et al.* The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Research. Brain Research. Review*. 2001. vols. 37 (1-3), p. 201-222.

FRYE, Cheryl A., *et al.* Testosterone enhances aggression of wild-type mice but not those deficient in type I 5alpha-reductase. *Brain Research*. 2002, vol. 948, p. 165-170.

FRYE, Cheryl A., *et al.* Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type I 5alpha-reductase. *Brain Research*. 2004, vol. 1004, p. 116-124.

FRYE, Cheryl A. y DUNCAN, Jennifer, E. Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Research*. 1994, vol. 643, p. 194-203.

FUNDACIÓN HUMANISTA DE AYUDA A DISCAPACITADOS (FHADI). *¿Qué es la discapacidad motriz?* [En línea]. 2012. [consulta 22 agosto 2014]. << <http://www.fhadi.org/discapacidad-motriz>>>.

GAMBHIRET, Mridula, MEDIRATTA, Pramod K. y SHARMA, Kumari K. Evaluation of the analgesic effect of neurosteroids and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Physiological Pharmacology*. 2002, vol. 46 (2), p. 202-208.

GARAY, Laura, *et al.* Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2007, vol. 107, p. 228-237.

GARAY, Laura, *et al.* Progesterone attenuates demyelination and microglial reactions in the lyssolecithin-injured spinal cord. *Neuroscience*. 2011, vol. 192, p. 588-597.

GARCIA-SEGURA, Luis Miguel y MELCANGI, Roberto Cosimo. Steroids and glial cell function. *Glia*. 2006, vol. 54, p. 485-498.

GRANIER, Mireille , *et al.* In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Molecular Pharmacology*. 1994, vol. 45, p. 201-211.

GAZOULI, Maria, HAN, Zhaojie, PAPADOPOULOS, Vassilios. Identification of a peptide antagonist to the peripheral-type benzodiazepine receptor that inhibits hormone-stimulated leydig cell steroid formation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002, vol. 303, p. 627-632.

GHOUMARI, Abdel. M., BAULIEU, Etienne-Emile. y SCHUMACHER, Michael. Progesterone increase oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice culture. *Neuroscience*. 2005, vol. 135, p. 47-58.

GHOUMARI, Abdel. M., *et al.* Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice culture of rat cerebellum. *Journal of Neurochemistry*. 2003, vol. 86, p. 848-859.

GIACHINO, Claudio, *et al.* Neurogenesis in the subependymal layer of the adult rat: a role for neuroactive derivatives of progesterone. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003, vol. 1007, p. 335-339.

GIATTI, Silvia, *et al.* Neuroprotective effects of a ligand of translocator protein-18 kDa (Ro5-4864) in experimental diabetic neuropathy. *Neuroscience*. 2009, vol.164 (2), p. 520-529.

GIATTI, Silvia, *et al.* Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels. *Neurochemistry International*. *Neurochemistry International*. 2010, vol. 56, p. 118-127.

GIATTI, Silvia, *et al.* Neuroactive steroids, their metabolites and neuroinflammation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2012a, vol. 49, p. R125-R134.

GIATTI, Silvia, *et al.* Neuroprotective effects of progesterone in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroendocrinology*. 2012b, vol. 24, p. 851-861.

GIATTI, Silvia, *et al.* Multimodal analysis in acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013, vol. 8, p. 238-250.

GIBSON, Carolyn, *et al.* Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain*. 2008, vol. 131, p. 318-328.

GINANNESCHI, Federica, *et al.* Evidences for Antinociceptive effect of 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate in carpal tunnel syndrome. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012, vol. 47, p. 59–66.

GINTZLER, Alan R. y LIU, Nai-Jiang. The maternal spinal cord: biochemical and physiological correlates of steroid-activated antinociceptive processes. *Progress in Brain Research*. 2001, vol. 133, p. 87-97.

GINTZLER, Alan R. y LIU, Nai-Jiang. Maternal spinal cord: Biochemical and physiological correlates of steroid-activated antinociceptive processes. *Progesterone Brain Results*. 2001, vol. 133, p. 83-97.

GIULIANI, Fernando A., *et al.* Allopregnonelone and puberty: Modulatory effect on glutamate and GABA release and expression of 3alpha-hydroxysteroid oxidoreductase in the hypothalamus of female rats. *Neuroscience*. 2013, vol. 243, p. 64-75.

GONZALEZ, Suasana Laura, *et al.* Progesterone neuroprotection in spinal cord trauma involves up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in motoneurons. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2005, vol. 94, p. 143-149.

GONZALEZ-DENISELLE, Maria Claudia, *et al.* Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiology of Disease*. 2002, vol. 11, p. 457-468.

GONZALEZ-DENISELLE, Maria Claudia, *et al.* Progesterone modulates brain derived neuropathic factor and chronic acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons. *Experimental Neurology*. 2007, vol. 203, p. 406-414.

GOODCHILD, Colins S., GUO, Zhuoyue y NADESON, Ray. Antinociceptive properties of neurosteroids. Spinally-mediated antinociceptive effects of water-soluble aminosteoids. *Pain*. 2000, vol. 88 (1), p. 23-29.

GRIFFIN, Robert S., *et al.* Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylotoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. *Journal of Neuroscience*. 2007, vol. 27, p. 8699-78.

GUENNOUN, Rachida, *et al.* Progesterone and alloprenanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2014, DOI:10.1016/j.jsbmb.2014.09.001.

GUERRA-ARAIZA, Claud, *et al.* Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after estradiol and progesterone treatments. *Journal of Neuroendocrinology*. 2003, vol. 15, p. 984-990.

GUIDOTTI, Alessandro, *et al.* The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5alpha-dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Research. Brain Research Review*. 2001, vol. 37, p. 110–115.

GUTH, Lisa M., ZHANG, Zhiwei y ROBERTS, Emily. Key role for pregnenolone in combination therapy that promotes recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Science - U.S.A.* 1994, vol. 91 (25), p. 12308-12312.

GUTIERREZ, Alvaro, KHAN, Zia U. y DE-BLAS, Angel L. Immunocytochemical localization of the alpha 6 subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor in the rat nervous system. *Journal of Comparative. Neurology*. 1996, vol. 365 (3), p. 504-510.

HAGEN, Eli M., *et al.* Cardiovascular complications of spinal cord injury. *Tidsskr Nor Legeforen*. 2012, vol.132, p. 1115 –11 20.

HE, Joseph, *et al.* Progesterone and allopregnonelone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Experimental Neurology*. 2004, vol. 189, p. 404-412.

HEBEL, Rudolf y STOMBERG, Melvin. *Anatomy and embriology of the laboratory rat*. Federal Republic of Germany: *BioMed Verlag Wörthsee*, 1986.

HUGHES, Austin L., *et al.* Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metabolism*. 2007, vol. 5, p. 143-149.

HULSEBOSCH, Claire E., XU, Guang-Yin. y PEREZ-POLO, Jose Regino. Rodent model of chronic pain after spinal cord contusion injury. *Journal of Neurotrauma*. 2000, vol. 17, p. 1205-1217.

ISSOP, Leeyah, RONE, Malena B. y PAPADOPOULOS, Vassilios. Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Molecular Cell Endocrinology*. 2013, vols. 371(1-2), p. 34-46.

JAMIN, Nadege, *et al.* Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Molecular Endocrinology*. 2005, vol. 19, p. 588–594.

JEFACOTE, Colin. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *Journal of Clinical Investigation*. 2002, vol. 110, p. 881–890.

JENKINS, Emily P., *et al.* Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 alpha-reductase. *Journal Clinical Investigations*. 1992, vol. 89, p. 293-300.

JEVTOVIC-TODOROVIC, Victoria, *et al.* Are neuroactive steroids promising therapeutic agents in the management of acute and chronic pain? *Psychoneuroendocrinology*. 2009, vol. 34, p. S178-185.

JEZ, Joseph M., FLYNN, Geoffrey T. y PENNING, Trevor M. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology*. 1997, vol. 54, p. 639-647.

JEZ, Joseph y PENNING, Trevor M. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: An update. *Chemical and Biological. Interaction*. 2001, p. 130-132, 499-525.

JOSEPH, Elizabeth K. y LEVINE, Joel D. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 2004, vol. 20 (11), p. 2896-2903.

JULIUS, David y BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001, vol. 413 (6852), p. 203-210.

JUNG-TESTAS, Illinos, *et al.* The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin protein (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 1996b, vol. 16, p. 439-443.

JUNG-TESTAS, Illinos, *et al.* Neurosteroids: Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*. 1989, vol. 125, p. 2083-2091.

JUNSUN, Kim, *et al.* Cold and mechanical allodynia in both hindpaws and tail following thoracic spinal cord hemisection in rats: time courses and their correlates. *Neuroscience Letters*. 2003, vol. 343, p. 200-204.

KAPUR, Deepak. Neuropathic pain and diabetes. *Diabetes Metabolism Research Review*. 2003, vol. 19 (1), p. 1409-1414.

KASSIOU, Michael, MIKLE, Steven y BANATI, Richard B. Ligands for peripheral benzodiazepine binding sites in glial cells. *Brain Res. Review*. 2005, vol. 48, p. 207-210.

KAUR, Prabhjeet, *et al.* Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. *Journal of Neuroscience Research*. 2007, vol. 85, p. 2441-2449.

KRISHNA, Kumar, KELLY, Michael y PIRLOT, Tyler. Continuous intrathecal morphine treatment for chronic pain of nonmalignant etiology: long-term benefits and efficacy. *Surgical Neurology*. 2001, vol. 55, p. 79-86.

UHLMANN, Andrea C. y GUILARTE, Tomas R. Cellular and subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors after trimethyltin neurotoxicity. *Journal Neurochem*. 2000, vol. 74, p. 1694-1704.

LABOMBARDA, Florencia, *et al.* Effects of injury and progesterone treatment on progesterone receptor and progesterone binding protein 25-Dx expression in the rat spinal cord. *Journal Neurochem.* 2003, vol. 87, p. 902-913.

LABOMBARDA, Florencia, *et al.* Progesterone attenuates astro-and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Experimental Neurology.* 2011, vol. 231, p. 135-146.

LABOMBARDA, Florencia, *et al.* Injury elicited increase in spinal cord neurosteroid content analyzed by gas chromatography mass spectrometry. *Endocrinology.* 2006, vol. 147, p. 1847-1859.

LABOMBARDA, Florencia, *et al.* Membrane progesterone receptor localization in the mouse spinal cord. *Neuroscience.* 2010, vol. 166, p. 94-106.

LABOMBARDA, Florencia. Real Time PCR. Exposición sobre PCR en Tiempo Real. *Maestría en Ciencias BioMédicas UBA-IBYME.* Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Marzo de 2014.

LACAPERE, Jean-Jacques, *et al.* Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 2001, vol. 284, p. 536-541.

LACOR, Patrik, *et al.* Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Research.* 1999, vol. 815. - pág. 1999.

LACROIZ-FRALISH, Michael L., *et al.* Progesterone mediates gonadal hormone differences in tactile and thermal hypersensitivity following L5 nerve root ligation in female rats. *Neuroscience.* 2006, vol. 138, p. 601-608.

LAMBERT, Jeremy J., *et al.* Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Progress in Neurobiology.* 2003, vol. 71(1), p. 67-80.

LAMBERT, Jeremy J., *et al.* Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Progress in Neurobiology.* 2003, vol. 71, p. 67-80.

LATREMOLIERE, Alban y WOOLF, Clifford J. Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Journal of Pain.* 2009, vol. 10, p. 382-390.

LA VANGUARDIA. Neurología: El 8% de la población sufre dolor neuropático. [en línea]. 2013. [consulta 24 agosto 2014] << <http://www.lavanguardia.com/salud/neurologia/20131017/54392094015/neurologia-8-poblacion-sufre-dolor-neuropatico.html>>>.

LAVAQUE, Esteban, *et al.* Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience.* 2006, vol. 138, p. 741-747.

LE, Fang G., *et al.* Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. *In vitro studies. Life Sci.* 1983, vol. 32, p. 1839–1847.

LE GASCOGNE, Corinne, *et al.* Neurosteroids: Cytochrome P-450sc in rat brain. *Science.* 1987, vol. 237, p. 1212–1215.

LECANU, Laurent, *et al.* Identification of naturally occurring spirostenols preventing beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Steroids.* 2004, vol. 69, p. 1–16.

LEE, Moonhee, SCHWAB, Claudia y MCGEER, Patrik L. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia.* 2011, vol. 59, p. 152-165.

LEONELLI, Emanuela, *et al.* Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: A multimodal analysis. *Neuroscience.* 2007, vol. 144, p. 1293-1304.

LI, Huihui, *et al.* Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proceedings of the National Academy of Science - U. S. A.* 2001, vol. 98, p. 1267–1272.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION. Real Time PCR Handbook. [En línea]. 2012. [consulta 10 febrero 2014] <<www.lifetechnologies.com>>

LIU, Danxia, THANGNIPON, Wipawan y MCADOO, David. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Research.* 1991, vol. 547 (2), p. 344-348.

LIU, Danxia, *et al.* Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience.* 1999, vol. 93, p. 1383-1389.

LIU, Nai-Jiang y GINTZLER, Alan R. Prolonged ovarian sex steroid treatment of male rats produces antinociception: Identification of sex-based divergent analgesic mechanisms. *Pain.* 2000, vol. 85, p. 273-281.

LIU, Jun, *et al.* PAP7, a PBR/PKA-R1alpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2003, vol. 85, p. 275-83.

LIU, Jun, RONE, Malena B. y PAPADOPOULOS, Vassilios. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry.* 2006, vol. 281(50), p. 38879-93.

LIU, Xiaoming, *et al.* Early repeated administration of progesterone improves the recovery of neuropathic pain and modulates spinal 18 kDa-translocator protein (TSPO) expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014, vol. 143, p. 130-140.

LORENZ, Todd C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, vol. 63, p. e3998.

MAJEWSKA, Magda. Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in Neurobiology*. 1992, vol. 38, p. 379–395.

MANNION, Richard J. y WOOLF, Clifford J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 1999, vol. 353 (9168), p. 1959-1964.

MATSUI, Daisuke, *et al.* Transcriptional regulation of the mouse steroid 5alpha-reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Research*. 2002, vol. 30 (6), p. 1387-1393.

MEFFRE, Delphine, *et al.* Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2013, vol. 231, p. 111-124.

MEFFRE, Delphine, *et al.* Steroid profiling in brain and plasma of male and pseudopregnant female rats after traumatic brain injury: analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Endocrinology*. 2007, vol. 148, p. 2505–2517.

MELCANGI, Roberto Cosimo, *et al.* Testosterone 5 alpha-reductase activity in the rat brain is highly concentrated in white matter structures and in purified myelin sheaths of axons. *Steroid Biochemistry*. 1988, vol. 31, p. 173-179.

MELCANGI, Roberto Cosimo, *et al.* Differential localization of the 5 alpha-reductase and the 3 alpha-hydroxysteroid deshydrogenase in neuronal and glial cultures. *Endocrinology*. 1993, vol. 132, p. 1252-1259.

MELCANGI, Roberto Cosimo, *et al.* The 5alpha-reductase in the central nervous system: Expression and models of control. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1998, vol. 65, p. 295-299.

MELCANGI, Roberto Cosimo, *et al.* Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Research Brain Research Reviews*. 2005, vol. 48, p. 328– 338.

MELCANGI, Roberto Cosimo, *et al.* Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Progress in Neurobiology*. 2014, vol. 113, p. 56-69.

MELCANGI, Roberto Cosimo y PANZICA, Gian Carlo. Allopregnanolone: state of the art. *Progress in Neurobiology*. 2014, vol 113, p. 1-5.

MELCANGI, Roberto Cosimo, GARCIA-SEGURA, Luis Miguel y MENSAH-NYGAN, A G. Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, vol. 65, p. 777-797.

MELCANGI, Roberto Cosimo y GARCIA-SEGURA, Luis Miguel. Sex-specific therapeutic strategies based on neuroactive steroids: in search for innovative tools for neuroprotection. *Hormones and Behavior*. 2010, vol. 57, p. 2-11.

MELLON, Synthia H. y GRIFFIN, Lewis D. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinology Metabolism*. 2002, vol. 13, p. 35-43.

MENSAH-NYGAN, Ayikoe Guy, *et al.* Neurosteroids: expression of steroids enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacology Review*. 1999, vol. 51, p. 63-81.

MENSAH-NYGAN, Ayikoe Guy, *et al.* Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2008, vol. 109, p. 286-293.

MENSAH-NYGAN, Ayikoe Guy, *et al.* Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. *Psychoneuroendocrinology*. 2009, vol. 34 (1), p. S169-177.

MEYER, Leith C., *et al.* Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *Neurobiology Disease*. 2008a, vol. 30 (1), p. 30-41.

MEYER, Leith C., *et al.* The biological activity of 3alpha-hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiology Disease*. 2008b, vol. 30, p. 30-41.

MEYER, Leith, *et al.* Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin-evoked painful neuropathy: Multi-parametric assessment and direct evidence. *Pain*. 2011, vol. 152 (1), p. 170-181.

MILLAR, Jean M. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. 2002, vol. 66 (6), p. 355-474.

MILLS, Charles D, GRADY, James J. y HULSEBOSCH, Claire E. Changes in exploratory behavior as a measure of central pain following spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*. 2001a, vol. 18(10), p. 1091-105.

MILLS, Charles D, *et al.* Strain and model differences in behavioral outcomes after spinal cord injury in rat. *Journal of Neurotrauma*. 2001b, vol. 18, p. 743-756.

MORADI-AZANI, Mahnaz, AHMADIANI, Abolhassan y AMINI, Hossein. Increase in formalin-induced tonic pain by 5alpha-reductase and aromatase inhibition in female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011, vol. 98 (1), p. 62-66.

MUNETSUNA, Eiji, *et al.* Social isolation stimulates hippocampal estradiol synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009, vol. 379, p. 480–484.

MURAKAMI, Ayano G., *et al.* Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science - U.S.A.* 1989, vol. 86, p. 9813–9816.

MURAKAMI, Keiko, *et al.* Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Science - U.S.A.* 2000, vol. 97 (7), p. 3579-3584.

NADAL, Angel, DIAZ, María Cristina y VALVERDE, Miguel A. The estrogen trinity: Membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News in Physiological. Sciences.* 2001, vol. 16, p. 251-255.

NADESON, Ray y GOODCHILD, Colin S. Antinociceptive properties of neurosteroids. II. Experiments with Saffan and its components alphaxalone and alphadolone to reveal separation of anaesthetic and antinociceptive effects and the involve involvement GABA(A) receptors. *Pain.* 2000, vol. 88 (1), p. 31-39.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER - Facts and Figures at a Glance. *Ed. Research National Institute on Disability and Rehabilitation.* Department of Education, Board of Trustees, University of Alabama, 2008. [En línea]. [consulta 23 de mayo 2014]. <<www.spinalcord.uab.edu>>.

NILSEN, Jon y BRINTON, Roberta Diaz. Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response. *Neuroreport.* 2002, vol. 13, p. 825-830.

NOORBAKHS, Farshid, *et al.* Impaired neurosteroids synthesis in multiple sclerosis. *Brain.* 2011 vol. 134, p. 2703-2721.

NORMINGTON, Karl y RUSSEL, David W. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *Journal of Biological Chemistry.* 1992, vol. 267, p. 19548-19554.

O'CONNOR, Alec B. y DWORKIN, Robert H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *The American Journal of Medicine.* 2009, vol. 122(10 Suppl), p. S22-32.

OONK, Rabinosh B., *et al.* Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450scc) gene. Structure and regulation by cAMP in vitro. *Journal of Biological Chemistry.* 1990, vol. 265, p. 22392–22401.

OZACMAK, V. Haktan y SAYAN, Hale. The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiological Research*. 2009, vol. 58, p. 909-912.

PANG, Youwang , DONG, Jie y THOMAS, Philip. Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and (epsilon) (mPRdelta and mPR(epsilon) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*. 2013, vol. 154, p. 283-295.

PANZICA, Gian Carlo y MELCANGI, Roberto Cosimo. The endocrine nervous system: source and target for neuroactive steroids. *Brain Research Reviews*. 2008, vol. 57, p. 271-276.

PAPADOPOULOS, Vassilios, *et al.* The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1990, vol. 265, p. 3772–3779.

PAPADOPOULOS, Vassilios, *et al.* Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Science*. 2006a, vol. 27, p. 402-409.

PAPADOPOULOS, Vassilios, *et al.* Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience*. 2006b, vol. 138, p. 749–756.

PATHIRATHNA, Sriyani, *et al.* New evidence that both T-type calcium channels and GABA_A channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5alpha-reduced neuroactive steroids. *Pain*. 2005, vol. 114 (3), p. 429-443.

PATTE-MENSAH, Christine, *et al.* Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450 side chain cleavage, in sensory neural pathways. *Journal of Neurochemistry*. 2003, vol. 86, p. 1233-1246.

PATTE-MENSAH, Christine, *et al.* Substance P inhibits neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: A potential component of nociception. *Proceedings of the National Academy of Science - USA*. 2005, vol. 102, p. 9044-9049.

PATTE-MENSAH, Christine, *et al.* Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2006, vol. 28 (1), p. 17-31.

PATTE-MENSAH, Christine, PENNING, Trevor M. and MENSAH-NYGAN, Ayikoe Guy. Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 alpha/3 alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*. 2004, vol. 477, p. 286–299.

PAUL, Steven M. y PURDY, Robert H. Neuroactive steroids. *FASEB Journal*. 1992, vol. 6, p. 2311–2322.

PEINNEQUIN, Andre. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunology*. 2004, vol. 5. p. 3.

PELLETIER, Georges, LUU-THE, Van y LABRIE, Fernand. Immunocytochemical localization of 5 alpha-reductase in rat brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1994, vol. 5, p. 394-399.

PELLETIER, Georges, Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. *Progress in Brain Research*. 2010, vol. 181, p. 193-207.

PESARESI, Marzia, *et al.* Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats. *Hormones and Behavior*. 2010, vol. 57, p. 46–55.

PFAFFL, Michael W., *et al.* Relative expression software tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. [En línea]. *Nucl. Acids Res.* 30: e36., 2002. [consulta 1 de marzo 2014].<<[http:// pt. wkhealth. com/ pt/ re/ nar/ abstract. 00006178-200205010-00031. htm](http://pt.wkhealth.com/pt/re/nar/abstract.00006178-200205010-00031.htm)>>.

PFAFFL, Michael W., *et al.* A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001, vol. 29 (9). p. 45.

PLASSART-SCHIESS, Emmanuelle y BAULIEU, Etienne-Emile. Neurosteroids: recent findings. *Brain Research. Brain Research Review*. 2001. vols. 37 (1-3), p. 133-140.

POLETTI, Angelo, *et al.* Identification of type 1 5 alpha-reductase in myelin membranes of male and female rat brain. *Molecular and Cellular. Endocrinology*. 1997, vol. 129, p. 181-190.

POLGAR, Erika, *et al.* Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*. 2005, vol. 25, p. 6658-6666.

POZZI, Paola, *et al.* Androgen 5-alpha-reductase type 2 is highly expressed and active in rat spinal cord motoneurons. *Journal of Neuroendocrinology*. 2003, vol. 15, p. 882-887.

RHODES, Madeline E. y FRYE, Cheryl A. Progestins in the hippocampus of female rats have antiseizure effects in a pentylenetetrazole seizure model. *Epilepsia*. 2004, vol. 45, p. 1531-1538.

ROBEL, Paul y BAULIEU, Emile E. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Critical Review in Neurobiology*. 1995, vol. 9 (4), p. 383-394.

ROBERTSON, Christine L., *et al.* Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Experimental Neurology*. 2006, vol. 197, p. 235-243.

ROCHE MOLECULAR SYSTEMS INC. *La Roche Ltd Real Time PCR vs Traditional PCR*. Applied Biosystems. 2005.

ROGLIO, Ian, *et al.* Neuroprotective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model of nerve crush injury. *Neuroscience*. 2008, vol. 155, p. 673-685.

RONE, Malena B., JINJIANG, Fan y PAPADOPOULOS, Vassilios. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 2009, vol. 1791(7), p. 646–658.

ROOF, Robert L., *et al.* Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Experimental Neurology*. 1996, vol. 138, p. 246–251.

ROOF, Robert L. Y HALL, E D. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *Journal of Neurotrauma*. 2000, vol. 17, p. 267-288.

RUPPERCHT, Ruth M., *et al.* Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *National Review in Drug Discovery*. 2010, vol. 9, p. 971–988.

RUSSEL, Joseph y SAMBROOK, David. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. ISBN 0-87969-576-5., 2001.

RYCHLIK, Will, SPENCER, William J. y RHOADS, Robert E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl Acids Research*. 1990, vol:18 (21), p. 6409–6412.

SATIOH, Heil, *et al.* A study of 5 alpha-reductase in human fetal brain. *Endocrinology Jpn*. 1982. , vol. 29, p. 461-476.

SANNE, Jennifer L. y KRUEGER, Karl E. Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: A study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Journal of Neurochemistry*. 1995, vol. 65, p. 528–536..

SAREDI, Simona, *et al.* Effects of streptozotocin-induced diabetes on the gene expression and biological activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the spinal cord. *Neuroscience*. 2005, vol. 135 (3), p. 869-877.

SAYEED, Iqbal, *et al.* Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnonelone over progesterone. *Brain Research*. 2009, vol. 1263, p. 165-173.

SAYEED, Iqbal, WALI Bushra y STEIN Donald G. Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Retroactive Neurology and Neuroscience*. 2007, vol. 25, p. 151-159.

SCHUMACHER, Michael, *et al.* Local synthesis and dual action of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Hormone & IGF Research*. 2004, vol. 14, p. S18-S33.

SCHUMACHER, Michael, *et al.* Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacol Ther*. 2007, vol 116, p. 77-106.

SCHUMACHER, Michael, *et al.* Revisiting the roles of progesterone and allopregnonelone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptor. *Progress in Neurobiology*. 2014, vol. 114, p. 6-39.

SCHUMACHER, Michael, SITRUK-WARE, Regine y DE NICOLA, Alejandro F., Progesterone and progestins: neuroprotection and myelin repair. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008, vol. 8, p. 1-7.

SHEPHERD CENTER & KPK-INTERACTIVE UNDERSTANDING SPINAL CORD INJURY. *What you should know about spinal cord injury and recovery*. Atlanta, Georgia, 2012. In collaboration with the American Trauma Society, The National Spinal Cord Injury Association and the Christopher & Dana Reeve Foundation.

SHOSHAN-BARMATZ, Varda, *et al.* VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*. 2010, vol. 3, p. 227-285.

SHOSHAN-BARMATZ, Varda, KEINAN, Nurit y ZAID, Harras. Uncovering the role of VDAC in the regulation of cell life and death. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2008, vol. 40, p. 183-191.

SIDDALL, Philip J., YERZIERSKI, Robert P. *Loesser JD Taxonomy and epidemiology of spinal cord injury pain*. Spinal Cord Injury Pain: Assessment, Mechanisms, Management. IASP Press, Seattle WA, 2002, p. 9-24.

SIERRA, Ana, *et al.* Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *European Journal of Neuroscience*. 2003, vol. 18, p. 1458-1467.

SIMPSON, Evan R. y WATERMAN, Michael R. Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Canadian Journal of Biochemistry. Cell Biol.* 1983, vol. 61, p. 692–707.

SINGH, Master. Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005, vol. 1052, p. 145–151.

SINGH, Master y SU, Chein-Ling. Progesterone-induced neuroprotection: factors that may predict therapeutic efficacy. *Brain Research.* 2013a, vol. 1514, p. 98-106.

SMELTZER, Suzanne C, *et al.* *Brunner & Suddarth's Textbook of Medical Surgical Nursing.* 2007. First Canadian Edition.

SOCCIO, Raymond E., *et al.* The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. *Proceedings of the National Academy of Science - U.S.A.* 2002, vol. 99, p. 6943-6948.

STAMNES, Mark A. Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. *Trends Cell Biol.* 2 (9): 272–6, 1992.

STEIN, Donatello G. Progesterone in the treatment of acute traumatic brain injury: a clinical perspective and update. *Neuroscience.* 2011, vol. 191, p. 101–106.

STOFFEL-WAGNER, Birgit. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Annals of New York Academy of Science.* 2003, vol. 1007, p. 64-78.

SRAUSS, Joseph F, *et al.* START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2003, vol. 202, p. 59–65.

THIGPEN, Anthony E., *et al.* Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 alpha-reductase isozymes. *Journal of Biology and Chemistry.* 1993, vol. 268, p. 17404-17412.

THOMAS, Ajith J., *et al.* Chopp Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine.* 1999, vol. 24 (20), p. 2134-2138.

THOMAS, Peter, PANG, Yefei y DONG, Jing. Enhancement of cell surface expression and receptor function of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptor. *Endocrinology.* 2013, pág. 1991.

THOMAS, Peter y PANG, Yefei. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine function in neuronal cells. *Neuroendocrinology.* 2012, vol. 96, p. 162-171.

TORREGOSA, Samuel Z. *Mecanismos y vías del dolor*. Departamento de Anestesiología, Insitituto Politécnico Nacional - Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, 1994. , vol. 23.

TORRES, Juan M. y ORTEGA, Eduardo. Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB Journal*. 2003, vol. 17, p. 1428–1433.

TSUJISHITA, Yatovich y Hurley James H. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2000, vol. 7, p. 408–414.

TSUITSUI, Kazuyoshi, *et al.* Biosynthesis, mode of action, and functional significance of neurosteroids in the pukinje cell. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2011, vol. 2, p. 61.

VAN KAMMEN, Daniel P., *et al.* CSF diazepam binding inhibitor and schizophrenia: clinical and biochemical relationships. *Biological Psychiatry*. 1993, vol. 34, p. 515–522.

VANDESOMPELE, Jo, *et al.* Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3: 1–12. [En línea]. 2002. [consultado 2 de mayo 2014].<<(http:// genomebiology. com/ 2002/ 3/ 7/ RESEARCH/0034. / ABSTRACT/ ADDITIONAL/ ABSTRACT/ COMMENTS/ additional/)>>.

VANLANDINGHAM, Jacob W., *et al.* Neurosteroids reduce inflammation after TBI through CD55 induction. *Neuroscience Letters*. 2007, vol. 425, p. 94-98.

VARSIK, Patricia, *et al.* Is the spinal cord lesion rare in diabetes mellitus? Somatosensory evoked potentials and central conduction time in diabetes mellitus. *Medical Science Monitor*. 2001, vol. 7 (4), p. 712–715.

VEIGA, Santiago, AZCOITA, Ignacio y GARCIA-SEGURA, Luis Miguel. LM Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity. *Journal Neuroscience Research*. 2005, vol. 80, p. 129–137.

VERMA, Ajay, NYE, Jeffrey S y SYNDER, Solomon H. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proceedings of the National Academy of Science - U.S.A.* 1987, vol. 84, p. 2256–2260.

VOWINCKEL, Erika, *et al.* PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research*. 1997, vol. 50, p. 345–353.

WANG, Jing, *et al.* Regenerative potencial of allopregnonelone. *Brain Research Reviews*. 2008, vol. 57, p. 398-409.

- WANG, Ming. Neurosteroids and GABA-A receptor function. *Frontiers in endocrinology* (Lausanne). 2011, vol. 2, p. 44.
- WEI, Xu-Hong, *et al.* The up regulation of translocator proteína (18kDa) promotes recovery from neuropathic pain in rats. *Neurobiology of Disease*. 2013, vol. 33 (4), p. 1540-1551.
- WESSEL, Lisa, *et al.* New aspects of progesterone interactions with the actin cytoskeleton and neurosteroidogenesis in the cerebellum and the neuronal growth cone. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014, DOI: 10.1369/0022155414550691.
- WHITESIDE, Garth T. y MUNGLANI, Raj. Cell death in the superficial dorsal horn in a model of neuropathic pain. *Journal of Neuroscience Research*. 2001, vol. 64 (2), p. 168–173.
- WILLIS, William D., WESTLUND, Karin N. y CARLTON, Susan M. *Pain in the rat nervous system*. in: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, 2nd edn., Academic Press Inc., Sydney. 1995, p.725–750.
- WIRTH, Michelle M. Beyond the HPA axis: progesterone-derives neuroactive steroids in human stress and emotion. *Frontiers in Endocrinology* (Laussane). 2011, vol. 2, p. 19.
- WOOLF, Clifford J. y MANNION, Richard J. Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and managment. *Lancet*. 1999, vol. 353, p. 1959-1964.
- WOOLF, Clifford J. y MA, Chun-hong. Nociceptors- noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007, vol. 55, p. 353-364.
- WRIGHT, David, *et al.* ProTECT: A randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Annal of Emergency Medicine / ed. Physicians American College of Emergency*. 2007, vol. 49, p. 391-402.
- XIAO, Guomin, *et al.* Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Critical Care*. 2008, vol. 12: R61, DOI: doi:10.1186/cc6887.
- YAO, Xing-Lei. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. 2005, vol. 22, p. 656-668.
- YASUNO, Flaua, *et al.* Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in Alzheimer's disease measured by positron emission tomography with [11C]DAA1106. *Biological Psychiatry*. 2008, vol. 64, p. 835–841.
- YEZIERSKI, Robert P. Spinal cord injury pain: Spinal and supraspinal mechanisms. *Journal Rehabilitation Research and Development*. 2009, vol. 46, p. 95-107.

ZCHAROFF, Kevin L. The pathophysiology of pain. *Northwest Regional Primary Care Association*. Alaska, Oregon, Idaho, Washington, 2007.

ZHU, Yanping, BOND, Jeff y THOMAS, Peter. Identification, classification, and partial characterization of genes in human and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 2003, vol. 100, p. 2237-2242.

ZIPPER, Hubert, *et al.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*. 2004, vol. 32, DOI: 1093/nar/gnh 101.

ZURKER, Jeremy R., NADESON, Ray y GOODCHILD, Colin S. Spinal and supraspinal components of opioid antinociception in streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Pain*. 2001, vols. 90 (1-2), p. 57-63.