



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

**Participación de BMP7
(Bone morphogenetic protein 7)
en la percepción del dolor y las
conductas ansiosas**

**Tesis Doctoral presentada por Rosmarí de la Puerta Huertas
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria**

Santander, abril 2017



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

Dña. **M^a Amor Hurlé González**, Catedrática de Farmacología y Dña. **Mónica Tramullas Fernández**, Profesora Ayudante Doctora, del departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria

CERTIFICAN:

Que han llevado a cabo las funciones de dirección de la Tesis Doctoral de Dña. **Rosmarí de la Puerta Huertas**, que lleva como título:

Participación de BMP7 (Bone morphogenetic protein 7) en la percepción del dolor y las conductas ansiosas.

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

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos la presente certificación.

En Santander, a 21 de abril de 2017.

Fdo. M^a Amor Hurlé González

Fdo. Mónica Tramullas Fernández

Esta Tesis ha sido financiada con ayudas a la investigación procedentes de:
Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2013-47434-R) y Programa de Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (FEDER).

Agradecimientos

Me gustaría que estas pocas líneas sirvieran para expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, especialmente a la Prof^a M^a Amor Hurlé, directora de esta investigación quien me dió la oportunidad, que para mí ha significado más allá de lo que aquí exponemos.

También quiero agradecer a mi co-directora la Dra. Mónica Tramullas, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por el apoyo recibido a lo largo de estos años. Mi agradecimiento a todo el equipo de investigación dirigido por Dra. Hurlé, por su ayuda y su paciencia, y en particular a Nieves García, Ana Cayón y María Navarro.

Agradecer también al grupo del Prof. Miguel Lafarga, del Dpto. de Anatomía y Biología Celular, en especial a La Prof^a Maite Berciano, María y Jorge, por su paciencia, dedicación y por haber compartido conmigo sus conocimientos de forma siempre cercana y por permitirme usar su laboratorio.

A la Dra. Carmen Martínez-Cué y a todo su equipo, siempre cercano, Noemí, Eva, Marian, Sara, Susana y Verónica por transmitirnos sus conocimientos, su ayuda incondicional y por hacernos pasar esos buenos momentos.

Al grupo del Prof. Ángel Pazos y los miembros de su equipo, Álvaro, Elena por ayudarnos con tantos experimentos y por su disponibilidad. También a Elsa por habernos acompañado y compartido con nosotros momentos puntuales.

Al grupo del Prof. Juan Hurlé, especialmente a Susana y Sonia, por habernos ayudado siempre con mucho ánimo.

A todos los que han estado cerca con su apoyo y han participado de forma indirecta en éste trabajo, especialmente a Aquilino Lantero, Ana Villar, Raquel García, Raquel Francés, David Merino, Sara Velategui y Roberto de la Fuente.

A la Prof^a. Ana Baamonde del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, por proporcionarnos la línea tumoral F16B10 y a la Dra. Marta Pevida por su colaboración. Los ratones BMP-7^{+/-} fueron generosamente cedidos por la Dra. Elizabeth J. Robertson,

Agradecimientos

Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA.

Al Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, especialmente al Servicio de Medicina Interna de la 9ª planta. Agradezco también a todo el Equipo de la Unidad del Dolor por compartir conmigo sus conocimientos y a todo el Equipo de Valdecilla Sur, por su acogimiento, apoyo y disponibilidad.

A mis amigos y a mi familia, pero especialmente a Julio, a Irina y a Ocsana, porque sin ellos a mi lado nunca hubiera conseguido las cosas que juntos hemos logrado. Han sido incondicionales siempre con su apoyo y ayuda en mis peores días, sin hacerme reproches a pesar del poco tiempo libre para estar juntos en familia.

Gracias a todos.

A Julio, a Irina y a Ocsana

Índice

Índice de figuras y tablas.....	21
Abreviaturas.....	27
Estado actual del tema.....	33
1. Dolor.....	35
1.1. Conceptos generales del dolor: vías, núcleos y áreas de sensibilidad dolorosa.....	35
1.1.1. El nociceptor y las aferencias nociceptivas primarias.....	36
1.1.2. El asta dorsal de la médula espinal.....	38
1.1.3. Proyección ascendente: tracto espino talámico cortical....	40
1.1.4. Vías de proyección indirectas.....	44
1.2. Fisiología de la nocicepción.....	45
1.2.1. Transducción.....	45
1.2.2. Transmisión.....	49
1.2.3. Modulación.....	51
1.2.4. Percepción.....	54
1.3. Fisiopatología del dolor.....	55
1.3.1. Dolor agudo y dolor crónico.....	55
1.3.2. Dolor nociceptivo y dolor neuropático.....	55
1.3.3. Sensibilización periférica.....	56
1.3.4. Sensibilización central. Potenciación a largo plazo (ltp)...	57
1.4. Ejercicio físico y dolor.....	60
2. Ansiedad.....	63
3. BMPs.....	68
Objetivos.....	77
Materiales y métodos.....	81
1. Animales de experimentación.....	83
1.1. Caracterización genotípica de los ratones <i>bmp7^{+/-}</i>	83
2. Estudios conductuales.....	85
2.1. Nocicepción.....	85
2.1.1. Valoración de la respuesta nociceptiva a estímulos de von frey.....	85

2.1.2. Valoración de la respuesta nociceptiva a estímulos químico-inflamatorio: test de la formalina.....	86
2.1.3. Valoración del desarrollo de alodinia mecánica en un modelo de dolor crónico neuropático provocado por la lesión del nervio ciático.....	86
2.1.4. Valoración del desarrollo de alodinia en un modelo de dolor crónico provocado por un tumor óseo.....	88
2.1.5. Valoración del ejercicio diario en el desarrollo de la neuropatía.....	88
2.2. Coordinación locomotora: prueba del rotarod.....	89
2.3. Ansiedad.....	90
2.3.1. Actividad motora y ansiedad: campo abierto.....	90
2.3.2. Laberinto elevado en cruz.....	91
2.3.3. Caja clara-oscura.....	92
3. Tratamientos farmacológicos.....	93
3.1. Agonista opioide: morfina.....	93
3.2. Bmp7 recombinante.....	93
4. Extracción de tejidos y procesado de las muestras.....	93
4.1. Estudios histológicos.....	95
4.1.1. Hibridación in situ.....	95
4.1.2. Inmunofluorescencia.....	96
4.2. Estudios neuroquímicos.....	98
4.2.1. Estudios de expresión génica mediante pcr cuantitativa..	98
4.2.1.1. Extracción de RNA.....	98
4.2.1.2. Transcripción inversa de RNA (rt).....	99
4.2.1.3. Pcr cuantitativa.....	99
4.2.2. Inmunodetección de proteínas mediante western blot....	100
5. Análisis estadísticos.....	102
Resultados.....	103
1. Localización de bmp7 y sus receptores en el sistema nervioso del ratón .	105
1.1. Bmp7 y sus receptores de tipo i se localizan en el sistema nervioso del ratón, en áreas relevantes para el control nociceptivo y de conductas ansiosas.....	105

2. Efectos de la deficiencia en BMP7 en modelos de dolor.....	107
2.1. Dolor crónico neuropático.....	107
2.1.1. Los ratones BMP7 ^{+/-} presentan un fenotipo hiperalgésicofrente a estímulos mecánicos en el modelo de dolor crónico neuropático inducido por lesión del nervio ciático.....	107
2.1.2. El efecto antinociceptivo de la morfina está reducido en los ratones BMP7 ^{+/-} sometidos a la lesión del nervio ciático	112
2.1.3. El ejercicio físico voluntario tras la lesión del nervio ciático atenuó la alodinia mecánica en los ratones silvestres, pero no la modificó en los ratones BMP ^{+/-}	113
2.1.4. El tratamiento crónico con la proteína BMP7 recombinante potencia el efecto antialodínico del ejercicio tras la lesión del nervio ciático en los ratones silvestres.....	117
2.2. Dolor agudo evocado por estímulos químico/inflamatorios: Los ratones BMP7 ^{+/-} no presentan diferencias en la respuesta nocifensiva provocada por estímulos de tipo químico/inflamatorio	119
2.3. Dolor crónico de etiología neoplásica: La deficiencia de BMP7 no modifica el desarrollo de dolor neoplásico	121
3. Efectos de la deficiencia de BMP7 en test conductuales de actividad general, coordinación motora y ansiedad	123
3.1. Los ratones BMP7 ^{+/-} no presentan diferencias en el rotarod	123
3.2. La deficiencia en BMP7 condiciona fenotipos conductuales menos ansiosos en los test de ansiedad.....	124
3.2.1. Campo abierto.....	124
3.2.2. Laberinto en cruz.....	126
3.2.3. Caja clara-oscura.....	127
Discusion.....	129
Conclusiones.....	147
Bibliografía.....	151

Índice de figuras y tablas

Introducción

Figura 1	Figuras nerviosas aferentes sensoriales correspondientes a la transmisión hacia la primera neurona.....	37
Figura 2	Distribución de la estructura correspondiente a las Láminas De Rexed en la sustancia gris de la médula espinal	39
Figura 3	Distribución de los Tractos ascendentes: espino-talámico (TET), espino-reticular (TER) y espino-mesencefálico (TEM)	41
Figura 4	Representación esquemática de las zonas corticales para la nocicepción (SI y SII)	43
Figura 5	Representación esquemática de los distintos canales iónicos presentes en las terminaciones periféricas	48
Figura 6	Esquema simplificado de las vías ascendentes nociceptivas en nivel espinal y supraespinal	53
Figura 7	Generación del potencial de acción en condiciones fisiológicas normales y en una neurona sensibilizada	58
Figura 8	Relación entre ligandos de la familia BMPs, receptores (tipo I y tipo II)	69
Figura 9	Vía canónica de señalización mediada por BMPs.....	71
Tabla A	Diferencias entre fenómeno wind-up y potenciación a largo plazo (LTP)	59

Materiales y métodos

Figura 10	Prueba de von Frey. Monofilamentos de vonFrey y aparato	85
Figura 11	Nervio Ciático con sus ramas distales	87
Figura 12	Jaula con rueda para ratones corredores	89
Figura 13	Prueba del Rotarod (UgoBasile, Comerio, VA, Italia	90
Figura 14	Prueba del Campo abierto	91
Figura 15	Prueba del Laberinto elevado en cruz	92

Figura 16	Prueba de la caja clara oscura	93
Tabla B	Composición de las soluciones I, II y III para <i>hibridación in situ</i>	95
Tabla C	Solución NTMT de lavado para el proceso de revelado.....	96
Tabla D	Composición de membrana para Western blot	101

Resultados

Figura 17	Expresión de BMP7 en el SN del ratón silvestre	106
Figura 18	Expresión de los receptores tipo I de BMPs, ALK3 (BMPR1A) y ALK6 (BMPR1B) en ratón silvestre	107
Figura 19	Efecto de la deficiencia de BMP7 en el desarrollo de alodinia mecánica en la pata ipsilateral a la lesión ciática.....	109
Figura 20	Efecto de la deficiencia de BMP7 en el desarrollo de alodinia mecánica en la pata contralateral a la lesión ciática	110
Figura 21	Evolución temporal del umbral ipsilateral y contralateral a la lesión ciática	111
Figura 22	Efecto de la deficiencia de BMP7 en la respuesta antinociceptiva a lamorfina en ratones neuropáticos	113
Figura 23	Umbrales temporales y de respuesta antinociceptiva a la morfina en ratones en ratones BMP7 ^{+/+} y BMP7 ^{+/-}	114
Figura 24	Ejercicio realizado por ratones BMP7 ^{+/+} y BMP7 ^{+/-} . Distancia y tiempo recorrido	115
Figura 25	Efecto del ejercicio voluntario tras la lesión del nervio ciático en ratones BMP7 ^{+/+} y BMP7 ^{+/-}	116
Figura 26	Efecto del ejercicio sobre el desarrollo del dolor neuropático Umbrales	117

Figura 27	Efecto de la proteína recombinante BMP7 y el ejercicio voluntario tras la lesión del nervio ciático en ratones BMP7 ^{+/+}	118
Figura 28	Efecto de la proteína recombinante BMP7 y el ejercicio voluntario sobre el desarrollo del dolor neuropáticos en ratones BMP7 ^{+/+} . Umbrales	119
Figura 29	Efecto de la deficiencia en BMP7 en la prueba de la formalina	120
Figura 30	Efecto de la deficiencia en BMP7 en la alodinia mecánica inducida por tumor óseo	121
Figura31	Efecto de la deficiencia en BMP7 sobre el desarrollo de alodinia mecánica inducida por tumor óseo. Umbral ipsilateral	122
Figura 32	Latencia de caída en la coordinación motora del Rotarod.....	124
Figura 33	Efecto de la deficiencia en BMP7 en la prueba del campo abierto	125
Figura 34	Efecto de la deficiencia en BMP7 en la prueba del laberinto elevado en cruz	127
Figura 35	Efecto de la deficiencia en BMP7 en la Prueba de la caja clara oscura	128

Abreviaturas

5-HT: Serotonina

ACC: Córtex cingulado anterior

ADME: Asta dorsal de la médula espinal

ALK: Activin receptor-like kinase

AMH: Hormona anti-mülleriana

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ASIC: Canales ácido- sensing Ion

BAMBI: BMP and activin membrane bound inhibitor

BHE: Barrera hematoencefálica

BMP: Proteína morfogenética de hueso

BMPR1A: Bone morphogenetic protein receptor tipo 1A

BMPR1B: Bone morphogenetic protein receptor tipo 1B

BRV: Bulbo rostroventral

CanalesTRP: Transient receptor potential channels

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CGS: Células gliales satélite

CSIB: Complejos de señalización inducidos por BMP

dNTPs: Desoxinucleótidostrifosfato

DOR: Receptor opioide delta (δ)

EET: Ácidos epoxieicosatrienoicos

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GAP 43: Proteína del crecimiento 43.

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GDFs: Growth and differentiation factors

GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GPCR: Receptores de membrana acoplados a proteínas G

GRD: Ganglio de la raíz dorsal

IP: Intraperitoneal

IB4: Isolectina IB4

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina-6

KOR: Receptor opioide Kappa (κ)

LC: Locus ceruleus

LTP: Potenciación a largo plazo

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MIS: Mullerianinhibitorysubstance

MOR: Receptor opioide mu (μ)

MPE: Máximo efecto posible

NE: Neuronas nociceptivas específicas

NPY: Neuropeptido Y

NGC: Núcleo gigantocelular

NMDA: N-metil D-Aspartato

NMR: Núcleo magno del rafe

NOR: Receptor de nociceptina

NT-3: Neurotrofina 3

P2X3: Receptor purinérgico activado por ATP

PCR: Polimerase chain reaction

PDYN: Prodinorfina

PENK: Proencefalina

PFA: Paraformaldehido

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PKA: Proteína kinasa A
PKC: Proteína kinasa C
POMC: Proopiomelanocortina
RDA: Neuronas de rango dinámico amplio
RPF: Receptores preformados
RT-PCR: Retrotranscripción inversa
SI: Corteza somatosensorial primaria
SII: Corteza somatosensorial secundaria
SED: Sociedad Española del Dolor
SMA: Sistema multisináptico ascendente
SMAD: Small mothers against decantaplegic
SN: Sistema nervioso
SNAP1: Sinapsina I
SP: Sustancia P
SGPA: Sustancia gris periacueductal
TEM: Tracto espino mesencefálico
TER: Tracto espino reticular
TET: Tractoespinalámico
TGF- β : Transforming growth factors-beta
TNF: Factor de necrosis tumoral
TrkA: Receptor tirosina quinasa A
TRPM: Receptor potencial transitorio mentol
TRPV: Receptor potencial transitorio vanilloide
TTT: Tracto trigémino talámico
VL: Ventró lateral
VPL: Ventral pósteró lateral

Estado actual del tema

1. El dolor

1.1. Conceptos generales sobre el dolor: Vías, núcleos y áreas de la sensibilidad dolorosa

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (International Association for the Study of Pain, IASP) define el dolor como una experiencia sensorial displacentera, asociada con una lesión tisular presente o potencial. La IASP enfatiza en el hecho de que el dolor, tanto agudo como crónico, es un fenómeno multidimensional, en el que además de los factores desencadenantes biológicos (físicos), la percepción del dolor está condicionada por factores psicológicos, afectivos, emocionales y cognitivos, que son específicos de cada persona. El resultado de esta combinación de factores particulares determina el impacto específico que el dolor tiene sobre la vida de cada individuo que lo padece.

El dolor fisiológico es un mecanismo de alerta precoz esencial, que nos advierte de la presencia de estímulos lesivos en el entorno, y motiva al individuo a huir de la situación en el momento del daño y a evitar situaciones lesivas similares en el futuro. El dolor agudo cumple una función de protección y defensa, que impulsa a la reacción/evitación frente a estímulos nocivos. Esta capacidad de detectar y recordar el peligro forma parte de la evolución y es clave en el desarrollo de un sistema nervioso plástico. La sensación dolorosa fisiológica es proporcional al estímulo desencadenante y desaparece una vez extinguido el agente causal o tras la curación de la lesión que lo provocó. Sin embargo, en determinadas situaciones de daño neural o inflamación, el dolor puede persistir mucho tiempo después de la curación de la lesión debido al establecimiento de fenómenos de plasticidad patológica en el sistema nervioso (SN) (Basbaum y cols., 2009). Cuando el dolor se cronifica y pierde su función protectora de supervivencia es contemplado como un proceso patológico en sí mismo (Cerveró, 2009). Además, la persistencia patológica del dolor puede derivar en ansiedad, depresión y pérdida de la calidad de vida, contribuyendo todo ello al desgaste emocional del paciente.

El sistema nociceptivo detecta y procesa la sensación dolorosa. Entre la zona donde ocurre la agresión (piel, córnea, vísceras, tejidos conectivos, etc.) y

la percepción del daño, se producen una serie de procesos neurofisiológicos que se desencadenan de forma simultánea y que conjuntamente se denominan nocicepción.

Estos procesos neurofisiológicos que participan en el dolor son: (i) Transducción: activación y sensibilización de los nociceptores periféricos. (ii) Transmisión de los estímulos por las vías aferentes primarias. (iii) Transmisión por vías ascendentes (espino-encefálicas). (iv) Percepción (integración de la respuesta en los centros superiores (estructuras encefálicas). (v) Control descendente por las vías encéfalo-espinales. (vi) Modulación e integración de respuesta nociceptiva a nivel del asta dorsal.

1.1.1. El nociceptor y las aferencias nociceptivas primarias.

Las neuronas de primer orden de la vía nociceptiva se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y en los pares craneales. Los nociceptores son las terminaciones periféricas de las neuronas sensitivas de primer orden que inervan la piel, el músculo, las articulaciones y las vísceras, y responden a estímulos de alto umbral potencialmente dañinos (Basbaum y cols., 2009). En función de sus propiedades electrofisiológicas, la velocidad de conducción del impulso nervioso, del diámetro de sus axones y la existencia o ausencia de mielina en las fibras nerviosas sensoriales se han clasificado en tipo A ($A\beta$, $A\delta$) y tipo C (Craig, 2002; Manzano y cols., 2008) (Figura 1): Tipos de fibras sensoriales primarias:

- a. El grupo $A\alpha/\beta$: axones gruesos (6-20 μm) y mielinizados con alta velocidad de conducción (30-120 m/s). Son responsables de la propiocepción, tacto, vibración y presión.
- b. Fibras $A\delta$: de escasa cantidad de mielina, diámetro de calibre mediano (1-5 μm) por lo que conducen a una velocidad moderada (12-30 m/s). Transmiten temperatura, sensibilidad táctil y son responsables del dolor concreto e inmediato (dolor epicrítico).
- c. Fibras C: amielínicas, con axones de pequeño diámetro (0,3-1,5 μm) y que conducen a una velocidad más lenta (0,7-1,2). Transmiten temperatura y son responsables de la sensación de dolor difuso y

desagradable (dolor protopático). Representan el 60-90% de las aferencias periféricas cutáneas que conforman un nervio periférico.

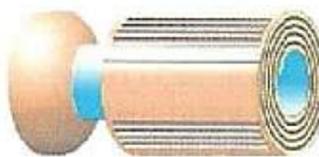
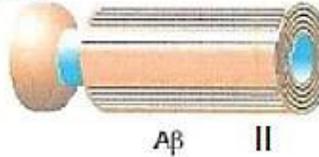
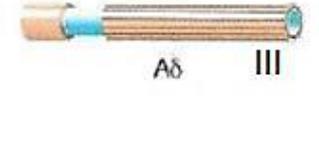
Receptores sensoriales	Axones sensoriales	Diámetro (mm)	Velocidad de conducción (m/seg)
Propiocepción Propioceptores del músculo esquelético	 A α I	13 -- 20	80 -- 120
Tacto, presión, vibración Mecanorreceptores de la piel	 A β II	6 -- 12	35 -- 75
Tacto, frío, dolor Receptores para el dolor, la temperatura y parte de la sensibilidad táctil	 A δ III	1 -- 5	5 -- 30
Calor, dolor Receptores para el dolor y la temperatura	 C IV	.02 -- 1.5	0.5 -- 2

Figura1. Fibras nerviosas sensoriales aferentes (Díaz J. Neurofisiología.(2013).<https://scykness.wordpress.com/tag/propiocepcion/>).

La característica esencial de un nociceptor es su capacidad de diferenciar entre estímulos inocuos y estímulos nocivos, de ahí su nombre. De las fibras sensoriales descritas, en condiciones normales solamente las A δ y C conducen sensibilidad nociceptiva (Woolf & Ma 2007). Los nociceptores constituyen una población heterogénea, tanto a nivel funcional como neuroquímico. Los nociceptores son terminales libres de axones pequeños mielinizados (A δ) o amielínicos (C) de GRD y ganglios sensitivos de pares craneales. Las fibras aferentes mielínicas A δ de diámetro medio transmiten el dolor rápido bien localizado o “primer” dolor y las fibras amielínicas tipo C de diámetro pequeño transmiten el dolor lento, pobremente localizado lejos de la

zona de la lesión o “segundo dolor” (Benarroch, 2015). Las fibras C amielínicas son muy heterogéneas. La mayoría son polimodales y son denominadas aferentes C sensibles al calor, mecanosensibles y al frío. Hay una población de nociceptores C que es insensible al estímulo mecánico en ausencia de inflamación tisular; estos aferentes silentes o mecánicamente insensibles constituyen aproximadamente un 15-20% de los aferentes cutáneos tipo C en la piel humana. Aproximadamente un 5% de las fibras C responden a la histamina y a otros pruritógenos, pero son insensibles a estímulos mecánicos (Benarroch, 2015).

La primera neurona de la vía del dolor es pseudounipolar, tiene su extremo distal en la periferia que funciona como dendrita, el cuerpo en el ganglio raquídeo y el extremo proximal en el asta posterior de la médula espinal. Se denominan pseudounipolares porque una parte de su axón proyecta sobre la periferia formando el terminal sensitivo (nociceptor) y su porción central sinapta en las astas dorsales de la médula espinal.

1.1.2. El asta dorsal de la médula espinal.

En ella se localiza la neurona de segundo orden de la vía nociceptiva. Es la estructura receptora de las aferencias primarias que transmiten la información desde los receptores sensoriales de la periferia. La sustancia gris, dispuesta en la médula espinal en forma de “H” y formada por los cuerpos neuronales, dendritas, axones y células gliales, se encuentra dividida anatómicamente en base a su apariencia microscópica en las llamadas láminas de Rexed (Rexed, 1954) (**Figura 2**). La sustancia gris está dividida en diez láminas. Las astas dorsales están formadas por las capas I a VI y las ventrales por las capas VII y IX. La lámina X está rodeando al canal o epéndimo, y recibe parte de las fibras viscerales tipo C, amielínicas. La zona relevante más característica de estas capas que participan en la nocicepción son:

Lamina I o zona marginal de Waldayer: En la lámina marginal se arborizan terminales amielínicas de tipo C y mielínicas de tipo A δ . Se reconocen dos tipos de células en la lámina marginal: Neuronas nociceptivas específicas (NE), que responde a estímulos dañinos y neuronas de amplio rango dinámico (RDA) que reciben impulsos aferentes de fibras de diversos

diámetros y recogen estímulos inócuos y también estímulos nocivos (Laird y cols.,2002).

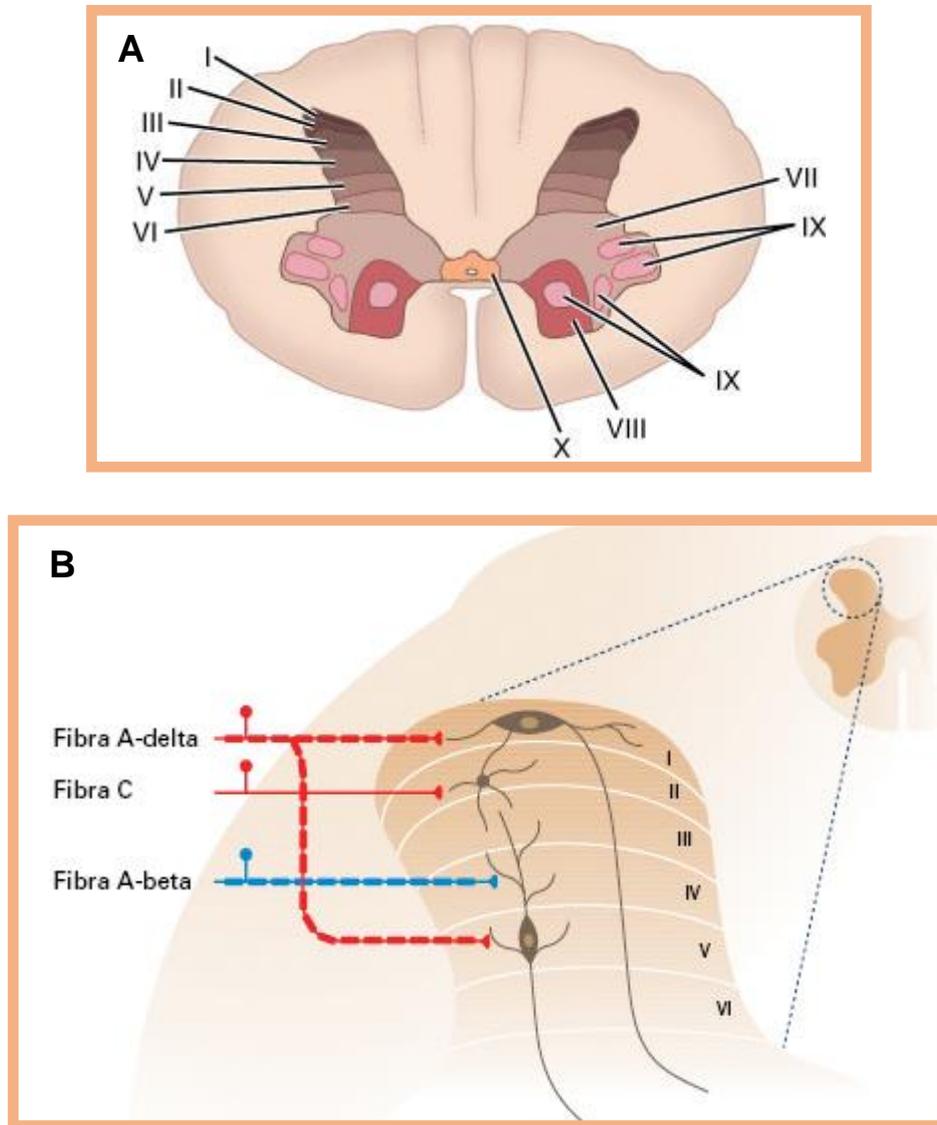


Figura2. Distribución de las láminas de Rexed en la sustancia gris de la médula (A). Las astas dorsales están conformadas por las láminas I-VI, reciben la información sensorial incluida la nociceptiva. Las láminas ventrales de las capas VII a IX tienen funciones motoras. La Lámina X es un conjunto de neuronas rodeando el canal del epéndimo, asociadas con el dolor visceral. **(B)** Distribución de las fibras A β , A δ y C procedentes de los aferentes que conectan con diferentes láminas según el tipo de fibra e información correspondiente. MedicalDictionary.ChangePain (2011). (www.changepain.org).

Lamina II o sustancia gelatinosa de Rolando: Contiene fibras de pequeño tamaño (5-10 μ m). Esta lámina puede subdividirse en dos láminas al situar sus células limítrofes en la porción externa de la sustancia gelatinosa y sus células centrales en la porción interna: la porción externa (Ilo o IIA) que recibe aferencias nociceptivas A δ y C, y otra interna (Ili o IIB) que recibe aferencias no nociceptivas.

Lámina V: Es una capa importante en el proceso nociceptivo. En esta lámina predominan las denominadas neuronas RDA. Recibe influencias directas no nociceptivas (A α y A β) y nociceptivas (A δ y C). Las neuronas RDA reciben aferentes primarios tanto cutáneos como viscerales de tipo químico, térmico o mecánico de alto y bajo umbral, e identifican las diferentes intensidades de dolor. Las neuronas RDA de la lámina V, junto con las neuronas NE de la lámina I, forman el grueso del tracto espino talámico (TET).

Lámina X: Sus neuronas están ubicadas a nivel de la comisura gris que rodea el epéndimo. Tiene una función interioceptiva (estímulos o sensaciones que provienen de los órganos internos del cuerpo) asociada con la transmisión del dolor visceral. Transporta información, simpática-parasimpática y visceromotora. Comunica la médula espinal con el tronco encefálico e interviene en la nocicepción, ya que responde a estímulos de alta intensidad.

1.1.3. Proyecciones ascendentes: Tracto espino-talámico-cortical.

Una gran proporción de las neuronas nociceptivas de segundo orden del asta dorsal de la médula espinal envían sus axones directamente a las neuronas de tercer orden localizadas en los núcleos mediales y laterales del tálamo, a través del Tracto espino-talámico. Este haz es el más estrechamente relacionado con la transmisión del dolor, temperatura y picor (Cerveró & Laird 2002). **Figura 3.**

El dolor se asocia con la activación de numerosas áreas cerebrales que, en su conjunto, han sido denominadas “matriz del dolor”. Las principales áreas son: la corteza somatosensorial, la corteza cingulada anterior, la corteza prefrontal, la ínsula y el tálamo (Wager y cols., 2013).

En el tálamo confluyen todas las vías sensitivas aferentes a excepción de la visual. Actúa como una estación integradora y de relevo de la información que pasa a todas las áreas de la corteza cerebral. Funcional y anatómicamente el tálamo se encuentra subdividido en multitud de núcleos. En los núcleos ventroposteromedial (VPM) y el ventroposterolateral (VPL) se localizan la mayor parte de las neuronas de tercer orden de la vía nociceptiva que reciben la mayor parte de las aferencias nociceptivas procedentes de la neurona espinal de segundo orden y emiten eferencias hacia la corteza.

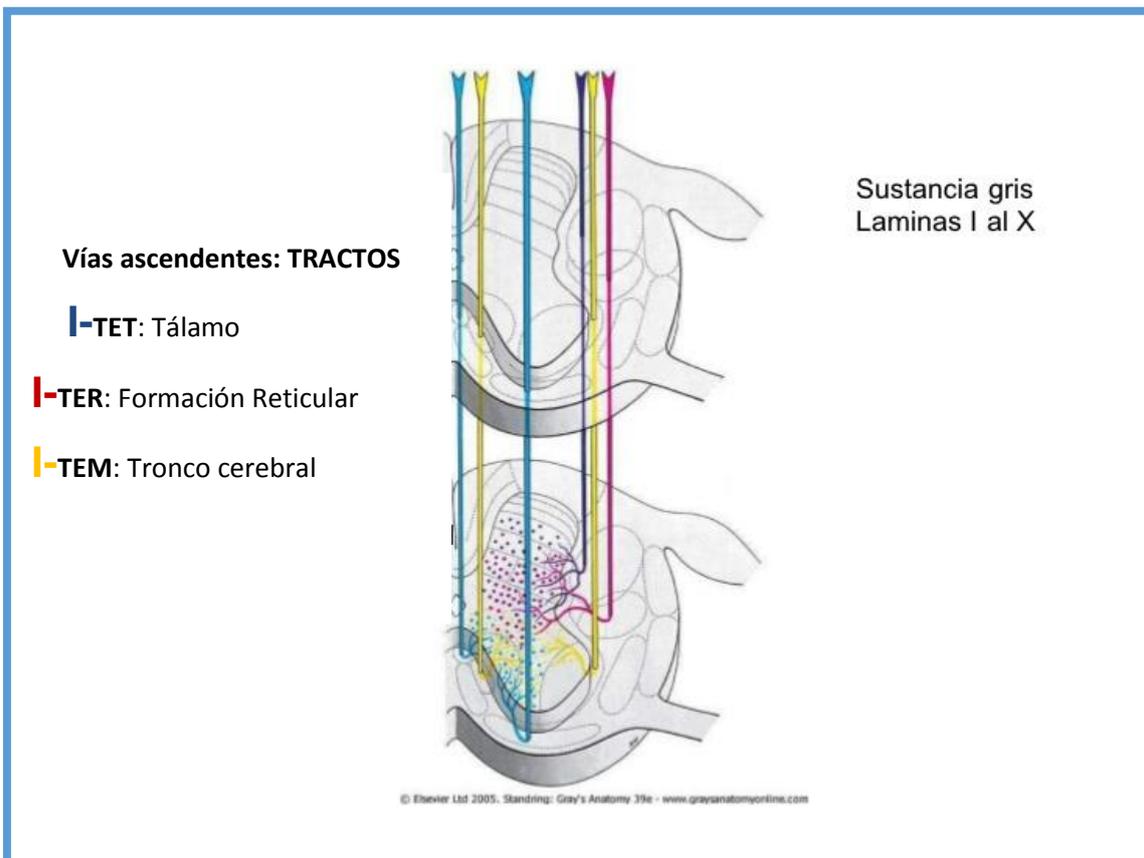


Figura 3. Distribución de los tractos ascendentes: Espino-talámico (TET), espino-reticular (TER) y espino-mesencefálico (TEM). La imagen muestra el ascenso de la información nociceptiva por diferentes trayectos en los que la zona de recepción corresponde a diferentes órganos del SNC. TET termina su proyección en el Tálamo, el TER termina su proyección en la Formación Reticular del bulbo y el TEM, proyecta a la SGPA. Cada área de recepción corresponde a diferente tracto al igual que proyecta diferentes informaciones nociceptivas dependiendo de la Lámina de Rexed correspondiente. Imagen modificada de Elsevier LTD. 2005. Standing: Gray's Anatomy 39e. www.Graysanatomyonline.com.

La disposición similar de los estímulos mecanosensitivos y nocivos es la responsable de los mecanismos discriminadores del dolor. Se cree que influyen en los niveles de conciencia y de estado de alerta en un individuo. Envía eferencias por la vía tálamo-cortical a las áreas neocorticales somatosensorial primaria (SI) y secundaria (SII), donde se encuentra la cuarta neurona de la vía nociceptiva (Craig, 2002).

La sensación de dolor comprende dos componentes distintos: el discriminativo-sensorial y el componente afectivo. Los elementos discriminativo- sensoriales están mediados principalmente por el complejo ventro-basal del tálamo y por la corteza somatosensorial, estas áreas poseen neuronas nociceptivas con características similares a las de la médula espinal, con propiedades que permiten clasificarlas dentro de las clases II y III (multirreceptoras o de RDA y nocirreceptoras o NE). El componente afectivo de las sensaciones dolorosas está mediado por núcleos talámicos mediales y por zonas de la corteza que incluyen las regiones prefrontales y especialmente el córtex cingulado anterior (Hutchison y cols., 1999).

Respecto al componente discriminativo-sensorial, una de las proyecciones más importantes parece ser la que va desde los núcleos talámicos ventroposterior lateral (VPL) y ventroposterior inferior (VPI) hasta las áreas corticales SI y SII, que a su vez están interconectadas con áreas visuales, auditivas, de aprendizaje y memoria .

La corteza somestésica primaria (SI) se localiza inmediatamente posterior al surco central, en el giro postcentral del lóbulo parietal. Está integrado por las áreas 1, 2 y 3 (3a y 3b) de Brodmann. El tálamo se interrelaciona con la corteza cerebral a través de proyecciones ascendentes y descendentes. La corteza SI recibe información nociceptiva por la vía espino-tálamo-cortical a través de los núcleos talámicos. Las neuronas de SI están organizadas en un modelo somatotópico en el que cada zona corporal está representada en un sitio definido. El tamaño del área cortical que recibe impulsos de una localización particular depende de la cantidad de receptores presentes en la zona, no de la intensidad del impulso transmitido. La función principal de SI es de discriminación sensorial y localización del estímulo.

Recibe las proyecciones desde los núcleos talámicos posteriores de estímulos dolorosos que desempeñan el papel en el despertar y la atención cortical.

La corteza somestésica parietal secundaria o área de asociación somatosensitiva (SII), se sitúa inmediatamente dorsal a la primaria. La primera proporciona información de la localización nociceptiva (tamaño, forma, textura, etc.) mientras la segunda proporciona la dirección espacial y estática del cuerpo y los miembros. Contiene las áreas 5 y 7 de Brodmann. Tiene función de integración sensorial, discriminación con dirección espacial (tacto, dolor y visión). **Figura 4.**

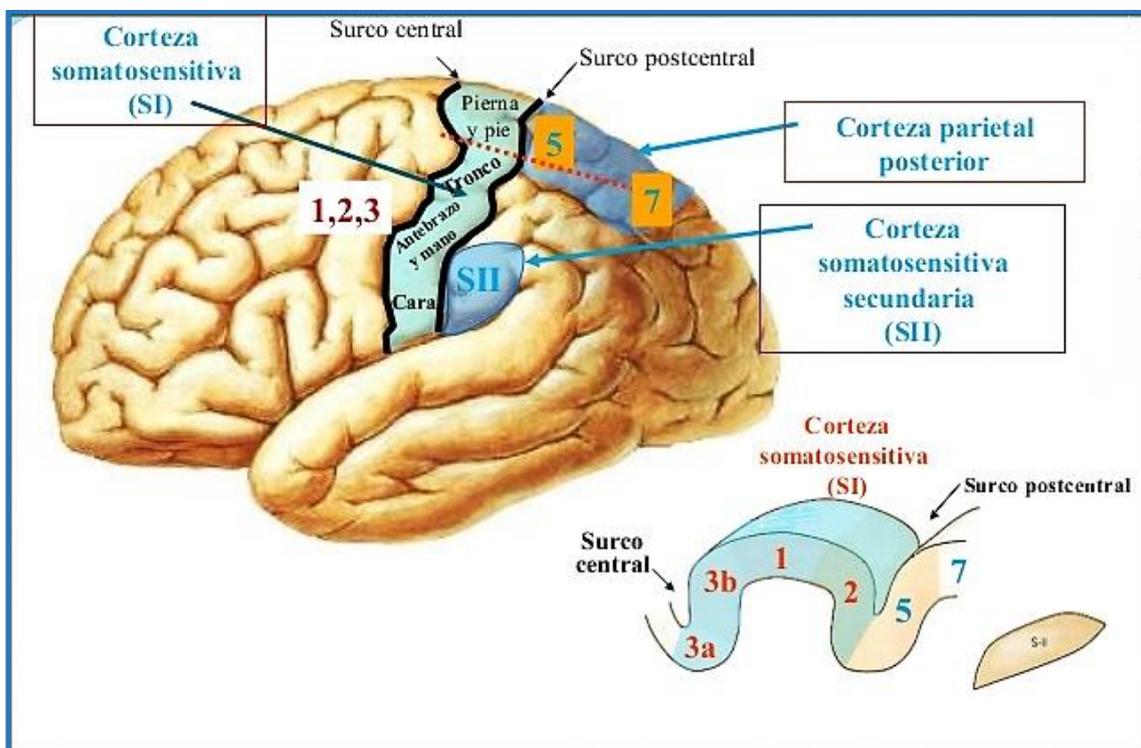


Figura 4. Representación esquemática de las zonas corticales para la nocicepción (SI y SII). Las zonas somatosensoriales localizadas como SI y SII tienen una función relevante para el procesamiento de la información nociceptiva. Imagen: Centeno Pacheco y Yan Quiroz. Slide-share.net. Sensibilidad-fisiología (diap. 27) (2014).

<https://image.slidesharecdn.com/sensibilidad-140907212628-phpapp01/95/>

1.1.4. Vías de proyección indirectas.

Algunas neuronas de segundo orden de la médula espinal emiten proyecciones que se dirigen al tronco cerebral (desde el bulbo hasta el mesencéfalo), hipotálamo y están implicadas en funciones de control homeostático.

1.1.4.1. Vías espinobulbares.

La formación reticular consiste en una red continua desde el tronco de encéfalo hasta el diencefalo. Sus conexiones con la amígdala, hipotálamo y médula espinal le confieren una función importante en el componente afectivo, emocional y neuroendocrino del dolor. Esta estrecha conexión, explicaría la relación que existe entre la ansiedad y dolor, siendo este lugar de interacción entre sistemas nerviosos simpático, parasimpático y el sistema nociceptivo. Dentro de todo este complejo, hay que destacar la participación de núcleos específicos en la transmisión y modulación de la nocicepción. En la región bulbar destacan el núcleo reticular gigantocelular y subnúcleo reticular dorsal. En la región mesencefálica, el área parabraquial lateral recibe aferencias de neuronas NE de la lámina I y, mediante sus proyecciones a la amígdala, tálamo, hipotálamo, etc. Se comporta como un centro integrador y estación intermedia involucrada en el componente afectivo, y las respuestas endocrinas y vegetativas del dolor (Craig, 2002). La sustancia gris periacueductal del mesencéfalo es otro centro integrador en conexión con el cerebro límbico y está íntimamente relacionada con el componente aversivo del dolor. Su proyección descendente forma parte del sistema descendente modulador del dolor. Estas funciones juegan un papel en la defensa homeostática de respuesta del individuo, integrando información aferente de la periferia y enviando señales procesadas a centros superiores (Mendes Gómez y cols., 2011).

Entre las conexiones más relevantes de la SGPA en la percepción del dolor se encuentra la amígdala. El complejo amigdalino es un conjunto de núcleos que se localizan en la profundidad del lóbulo temporal, y que forma parte del sistema límbico. Recibe una gran cantidad de estímulos sensoriales aferentes de una forma altamente procesada y tiene un papel clave en el procesamiento emocional del dolor. Envía y recibe proyecciones de áreas cerebrales a diferentes niveles, y desencadena indirectamente cambios

fisiológicos y respuestas del sistema nervioso autónomo (Méndez-Bértolo y cols 2016). La amígdala tiene una implicación en la transmisión nociceptiva hacia otras estructuras que controlan la emoción, el umbral del dolor, la respuesta anímica, la iniciativa e incluso la memoria. Integra información relevante para el componente aversivo de la experiencia dolorosa. La activación del córtex cingulado anterior también contribuye de forma relevante el componente afectivo-motivacional del dolor (Hutchison y cols., 1999). Esta nueva percepción de cómo circula la información entre el sistema visual y las redes emocionales puede ayudar a comprender mejor las patologías con sentimientos de miedo, como las fobias y la ansiedad, donde se cree que la amígdala desempeña un papel fundamental (Méndez-Bértolo y cols., 2016).

1.2. Fisiología de la nocicepción

Desde que se activa el nociceptor por un estímulo hasta la integración de la información dolorosa más compleja, tiene lugar un proceso continuo y en el que participan simultáneamente numerosos procesos.

1.2.1. Transducción

Los estímulos sensoriales de los nociceptores periféricos se transforman en señales eléctricas mediante flujos iónicos a través de las membranas. Esta señal eléctrica conduce el impulso hasta las neuronas de la médula espinal que, a su vez, proyectan, vía talámica, al córtex, provocando el dolor. En este proceso de transformación, al que denominamos transducción, se producen cambios específicos en la conductancia de canales iónicos de sodio, potasio o calcio, en respuesta a estímulos nocivos químicos, físicos o térmicos. La transducción de la señal desde los nociceptores hasta la médula espinal está ligada al primer impulso que activa los receptores de membrana. Este impulso eléctrico, mediante la apertura de canales iónicos, produce una despolarización de la membrana que genera potenciales de acción que se conducen a través del axón del nociceptor hacia la médula espinal. Los nociceptores están especializados y son capaces de detectar estímulos nocivos específicos (químicos, físicos o térmicos). Están equipados de mecanismos de transducción diferentes para cada categoría de estímulo, en los tejidos periféricos de las fibras aferentes primarias que son activadas exclusivamente por estímulos

nocivos. La trasducción sensorial se produce de forma similar en todos los aferentes sensoriales somáticos y viscerales (Manzano y cols., 2008).

Canales que controlan la excitabilidad de los nociceptores:

Los **canales de Na⁺** dependientes del voltaje, son claves para la excitabilidad del nociceptor. El Na1.7 se expresa en neuronas del GRD grandes y pequeñas, en neuronas ganglionares simpáticas y neuronas sensoriales olfatorias. El Na1.8 tiene un umbral de activación más alto, pero lleva la mayor parte (80-90%) de la corriente generadora del potencial de acción en neuronas tipo C del GRD. El Na1.9 está selectivamente expresado en neuronas GRD pequeñas.

Los **canales de K⁺** dependientes del voltaje, modulan la excitabilidad de los nociceptores y expresan diferentes subtipos de canales de K⁺. Los más relevantes son los canales de K⁺ activados por Ca²⁺, por Na⁺ y, en menor medida, canales de K⁺ rectificadores internos.

Los **canales de Ca²⁺ tipo L, N y T**. Los canales tipo **N** (Ca_v2.2) están localizados en las terminales pre-sinápticas y desencadenan la liberación de glutamato, sustancia P y CGRP, tanto en terminales centrales como periféricos de los nociceptores. Estos canales contribuyen al dolor crónico. Los canales tipo **T** (Ca_v 3.2) presinápticos también promueven la liberación de glutamato de las terminales nociceptivas en el asta dorsal (Benarroch, 2015). El rol de los canales **L** en función normal del nociceptor está pobremente definido en modelos de dolor, pero los antagonistas de dicho receptor se ha demostrado que potencian la analgesia de la morfina en pacientes (Santillán y cols., 1998).

Los **canales TRP** (Transient Receptor Potential), son canales catiónicos no selectivos con alta permeabilidad al Ca²⁺ que actúan como receptores multimodales. Estos receptores se expresan principalmente en la membrana neuronal y en las membranas del retículo endoplásmico. Desempeña un papel clave en la modulación de la nocicepción y la neuroplasticidad (Satheesha y cols., 2016). El TRPV1 es un canal ligandodependiente, marcador de nociceptores peptidérgicos y es activado por el calor nocivo (> 43°C), el bajo pH (5,2), la capsaicina y endocannabinoides (Benarroch, 2015). Los TRPV tienen algunas subunidades que forman un canal de membrana a través del

cual los iones pueden cruzar la membrana (Huynhet y cols., 2014a, b). Aunque la estructura de los TRPV no se conoce completamente, se determinaron algunos motivos y se definió su papel. El TRPV2 es activado a temperaturas $>52^{\circ}\text{C}$, con un mecanismo diferente al anterior, utiliza la fibra de conducción $\text{A}\delta$, y se expresa en procesos inflamatorios. El TRPV3 difiere de los otros receptores por un bucle en N-terminal donde los residuos de aminoácidos (R225, R226, Q255 y F249) juegan un papel crucial (Shi y cols., 2013). El TRPV4 se activa a temperatura $>27^{\circ}\text{C}$, por estímulos mecánicos, hipotonicidad y metabolitos de ácido araquidónico (Levine y Alessandri-Haber, 2007; Watanabe y cols., 2003) y es permeable a los iones Ca^{2+} (Plant y Strotmann, 2007). Los receptores TRPV4 ejercen su función a través de la activación de PKC, PKA, PLC y ácidos eicosatrienoicos (EET) (Vriens y cols., 2004; Levine y Alessandri-Haber, 2007; Satheesh y cols., 2016). TRPV5 y TRPV6 tienen grandes similitudes estructurales entre sí (Chik y Mohamed, 2012). Mientras que TRPV5 es el receptor más común, TRPV6 es un receptor que se encuentra sólo en los seres humanos. El TRPM8 ($<30^{\circ}\text{C}$) relacionado con el frío inocuo y nocivo, así como la sensación refrescante del mentol y el eucaliptol. Contribuye a la hipersensibilidad al frío (Mckemy y cols., 2002; Knowlton y cols., 2010). Requiere PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato) para su activación; la reducción de PIP2 en respuesta a mediadores inflamatorios promueve la desensibilización de TRPM8 (Yudin y cols., 2012; Benarroch, 2015). El TRPA1 está relacionado con la mecano-nocicepción, el frío doloroso y dolor por agentes irritantes como el aceite de mostaza (Story & Gereau 2006; Talavera y cols., 2009). **Figura 5.**

Canales sensores de ácido ASICs (*Acid sensing ion channels*), son canales catiónicos independientes del voltaje que son activados por el pH ácido; son primariamente permeables al Na^{+} y provocan la despolarización celular, llevando a una acumulación secundaria de Ca^{2+} intracelular. Entre estos canales, los ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a y 2b, y ASIC3, están expresados en las neuronas del GRD y del ganglio trigeminal. El ASIC3 es un sensor esencial de pH para el dolor y está primariamente localizado en fibras nociceptivas que inervan el músculo esquelético y cardíaco, las articulaciones y el hueso; en estos tejidos, el metabolismo anaeróbico lleva a un aumento del

ácido láctico y los protones, que activan los ASIC (Wemmie y cols., 2013; Benarroch, 2015).

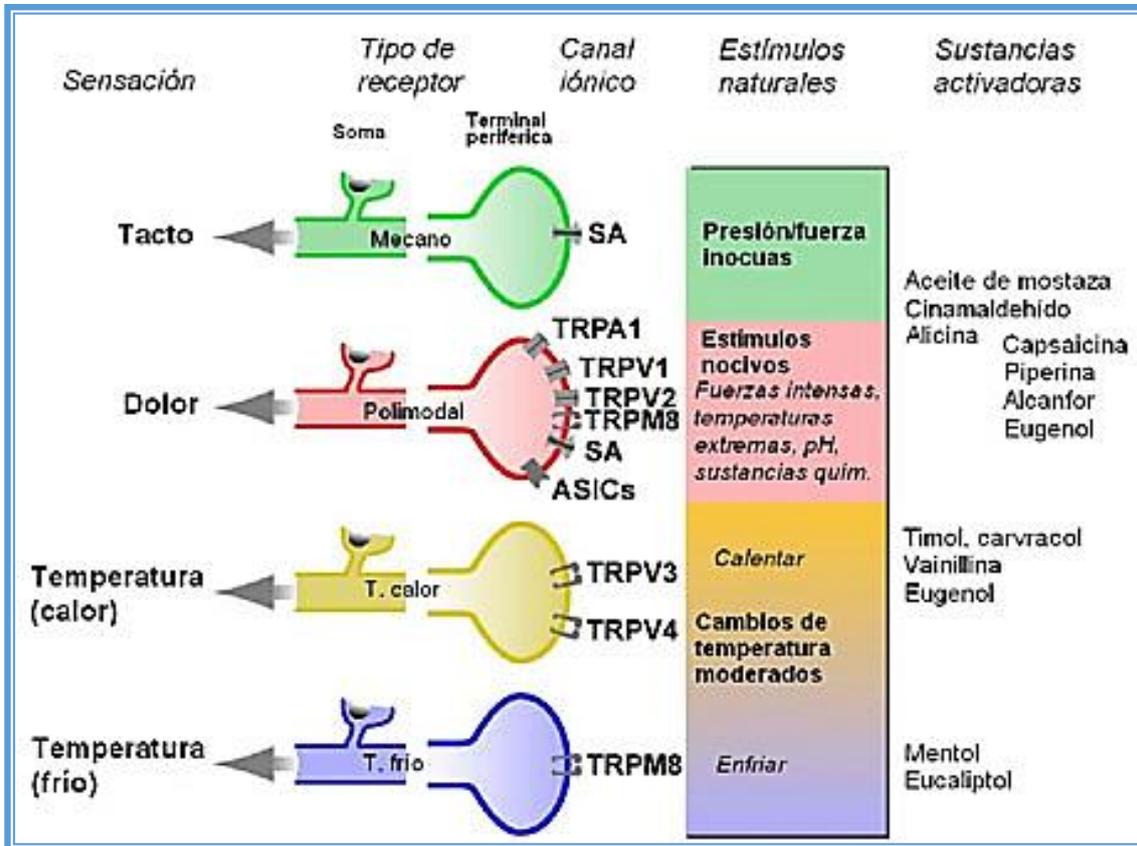


Figura 5. Representación esquemática de los distintos canales iónicos presentes en las terminaciones periféricas. Se muestra la modalidad de la sensación evocada por la activación de las neuronas sensoriales mecanorreceptoras, nociceptoras polimodales, termorreceptoras de calor y de frío, en respuesta a la activación de los diferentes canales de membrana de sus terminaciones periféricas por distintos tipos de estímulos naturales, así como por sustancias de origen vegetal que activan los distintos tipos de canales TRPs. (Basado en Belmonte & Viana, 2008).

Receptores P2X purinérgicos: La señalización purinérgica mediada por ATP actuando a través de receptores ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y tiene un rol importante en la transmisión de información nociceptiva (Tsuda y cols., 2010; Burnstock, 2013).

Los receptores P2X son permeables al Na⁺, al K⁺ y al Ca²⁺, y están involucrados en la transducción mecanosensorial y en el dolor somático y visceral (Burnstock, 2013). El P2X3 y, en menor medida, los heterodímeros

P2X2/3 son los subtipos más comunes en nociceptores y están expresados en las neuronas nociceptivas del GRD no peptidérgicas. Los receptores P2Y, incluso el P2Y1 y el P2Y2, son receptores acoplados a proteínas G que están expresados en nociceptores y pueden interactuar con el TRPV1, promoviendo su respuesta al calor y a los protones en el contexto del dolor inflamatorio o neuropático (Burnstock, 2013). Los receptores purinérgicos expresados en la microglía, que incluyen el P2X4, el P2X7 y el P2Y12, también participan en mecanismos de sensibilización central en respuesta a la injuria nerviosa (Tsuda y cols., 2010; Burnstock, 2013; Benarroch, 2015).

1.2.2. Transmisión

La transmisión sináptica entre los nociceptores periféricos y las neuronas de segundo orden en la médula espinal se realiza mediante neurotransmisores liberados por las terminaciones centrales de las neuronas del GRD. Destacan dos tipos de neurotransmisores importantes por sus efectos excitatorio e inhibitorio.

Glutamato: Es el principal neurotransmisor excitador del SNC, mediador de la información sensorial, motora, cognitiva, emocional e interviene en la formación de memorias y en su recuperación. Está presente en el 80-90% de las sinapsis del cerebro. Es el neurotransmisor principal de las fibras sensoriales aferentes a nivel de la médula, tanto para los nociceptores como para las neuronas no nociceptoras. El glutamato es un aminoácido que produce potenciales sinápticos rápidos en las neuronas del asta dorsal. Interactúa con dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos se dividen de acuerdo a la afinidad de sus agonistas específicos en: N-metil-D-aspartato (NMDA); ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y ácido kaínico (KA) (Flores-Soto y cols., 2011). Interviene en la neuroplasticidad de los procesos de aprendizaje. El estudio del receptor NMDA ha sido de gran interés por la función que desempeña en la plasticidad sináptica, pero sobre todo por la permeabilidad que tiene para el ion Ca^{2+} . La hiperactividad de los receptores glutamatérgicos provoca la muerte neuronal debido al aumento de calcio intraneuronal. Existen varias subunidades en este receptor, de las cuales la NR2B se ha postulado como diana terapéutica en el tratamiento del dolor. La subunidad NR1 está

relacionada con la sensibilización central a estímulos nocivos (Brenner y cols., 2004; Flores-Soto y cols., 2011).

Neuropéptidos: Los neurotransmisores peptídicos mejor caracterizados en las terminaciones nociceptivas primarias son la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). El glutamato y los neuropéptidos se liberan simultáneamente y tienen efectos diferentes sobre las neuronas postsinápticas, siendo los neuropéptidos los que amplifican y prolongan el efecto postsináptico del glutamato. Sin embargo, el glutamato tiene un mecanismo de recaptura muy eficaz y rápido, pero no existen mecanismos de recaptura para los neuropéptidos, que pueden difundir y ejercer efectos a distancia. Esto contribuye al aumento de la excitabilidad del asta dorsal de la médula.

La **Sustancia P** (SP) fue el primer neuropéptido identificado y localizado en el asta dorsal de la médula en 1931 por Von Euler. Su transmisión fue descubierta en 1953 y su composición en 1971. Es un péptido que actúa como un neurotransmisor excitador que se le asocia con el dolor patológico, potenciando los efectos del glutamato a nivel central. Se ha establecido que la liberación de SP en las aferencias sensoriales de la médula espinal está asociada con estímulos nociceptivos procedentes de las fibras amielínicas C. A nivel periférico, produce vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, activación de la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos, aumento de la producción y liberación de mediadores inflamatorios y liberación de la histamina por los mastocitos. Estos efectos mencionados contribuyen a mantener la respuesta inflamatoria y la sensibilización de los nociceptores aunque aparentemente no produce una acción directa. Caracterizado por tres tipos de receptores, NK-1 (con mayor afinidad), NK-2 y NK-3.

El **péptido relacionado con el gen de la calcitonina** (CGRP), se encuentra en terminaciones que se conectan en las láminas I, II y V del asta dorsal y es liberado por estímulos nociceptivos térmicos, mecánicos y eléctricos, aunque por sí mismo tiene efectos escasos, potencia el efecto de la SP y del glutamato, ya que tiene una acción reguladora de la liberación de este último a nivel de las aferencias primarias.

1.2.3. Modulación

La percepción del dolor está modulada por la actividad de mecanismos endógenos localizados en el SNC (García-Porrero & Hurlé, 2015). Existen importantes vías descendentes que, partiendo de núcleos cerebrales y del tronco cerebral, proyectan y terminan sobre las neuronas del asta posterior de la médula espinal, donde modulan de manera específica la información nociceptiva que allí penetra desde la periferia. A diferencia del sistema de la transmisión nociceptiva de características centripeta y ascendente, este sistema inhibitor endógeno es descendente y centrífugo. **Figura6.**

En el asta dorsal de la médula existe un primer nivel segmentario de modulación de la información nociceptiva aferente (Melzak & Wall, 1965). La estimulación intensa de fibras mielínicas gruesas de tipo A α y A β , que vehiculan sensibilidad táctil y vibratoria, promueve la activación de interneuronas inhibitorias GABAérgicas de la sustancia gelatinosa que, a su vez, inhiben a nivel presináptico las aferencias nociceptivas primarias C y A δ a las neuronas NE y RDA, bloqueando el paso de estímulos hacia el tracto espinotalámico (Pricey cols., 2009).

Un punto crítico en los sistemas descendentes de modulación del dolor es la sustancia gris periacueductal (SGPA). La sustancia gris periacueductal está formada por un grupo de neuronas localizadas alrededor del acueducto cerebral, en el mesencéfalo. Estructuras superiores, tales como la corteza prefrontal, corteza cingulada, ínsula, hipocampo, amígdala, hipotálamo, emiten proyecciones a la SGPA. Por otro lado, recibe fibras de las neuronas medulares del tracto espinotalámico. De este modo, en ella confluyen los datos de actividad de las aferencias somáticas y la información emocional y motivacional del individuo, lo que le confiere un papel fundamental en el procesamiento nociceptivo y expresión del dolor. La activación de la SGPA induce la activación de un flujo inhibitor descendente bulboespinal que inhibe las neuronas nociceptivas del asta dorsal. La SGPA contiene una gran densidad de receptores opioides, y de péptidos opioides; por este motivo, su estimulación eléctrica o la inyección de opioides en la sustancia gris periacueductal produce una intensa analgesia. La administración de agonistas opioides a nivel de la

SGPA se asocia con la inhibición selectiva de neuronas nociceptivas del asta posterior, provocando analgesia.

La SGPA proyecta hacia núcleos de la formación reticular en particular a los núcleos que contiene neuronas serotoninérgicas de la región bulbar rostral ventromedial, al núcleo magno del rafe. Se han descrito dos tipos de neuronas en el núcleo magno del rafe: células *on* y células *off*. Ambas poblaciones tienen actividad opuesta y alternante, y se influyen recíprocamente. Se considera que las células *on* facilitan la transmisión nociceptiva, mientras que las células *off* la inhiben. La proyección de la SGPA sobre las células *off*, la mayoría de naturaleza serotoninérgica, es excitadora. Del núcleo magno del rafe parten proyecciones descendentes por el cordón lateral (tracto rafe-espinal) que terminan sobre las neuronas de proyección del asta dorsal (láminas I, IV y V), ejerciendo un efecto inhibitor del estímulo nociceptivo.

Existen otros grupos neuronales que participan en la modulación descendente del dolor. El sistema noradrenérgico se proyecta desde el locus ceruleus (LC) y otras neuronas noradrenérgicas (A4 y A7) hasta el asta posterior, a través del cordón dorsolateral (DL). Su efecto final sobre la transmisión nociceptiva puede ser tanto excitador como inhibitor.

La SGPA, la región rostral ventromedial del bulbo y el núcleo magno del rafe se comportan como elementos fundamentales de las vías que canalizan las influencias endógenas que van a modular, tanto inhibitoria como facilitadoramente, la transmisión nociceptiva a nivel espinal y trigeminal (Serrano-Atero y cols., 2002). Las señales descendentes terminan en el asta posterior de la médula espinal inhibiendo (sistema de neuronas "*off*") o facilitando (sistema neuronas "*on*") la actividad de las neuronas nociceptivas medulares, según el caso. En el asta dorsal de la médula se produce la integración de toda la información nociceptiva. El encuentro final de todas las vías que convergen en este proceso va a condicionar la afluencia de impulsos ascendentes desde la segunda neurona espinal por la vía espinotalámica.

A nivel del asta dorsal de la médula, el sistema modulador descendente ejerce cuatro efectos fundamentales para la adecuada percepción del dolor: (i) atenúa las respuestas de las neuronas nociceptivas con el fin de mantener una nocicepción equilibrada con el estímulo nocivo; (ii) silencia las neuronas

nociceptivas en ausencia de estímulos nocivos con objeto de evitar el dolor espontáneo; (iii) establece líneas de separación entre la información aferente nociceptiva e inocua para evitar cruce de señales entre las diferentes modalidades sensoriales; (iv) confina las señales excitatorias a las áreas somatotópicas del SNC adecuadas y evita su dispersión a otras regiones (Sandkühler, 2009).

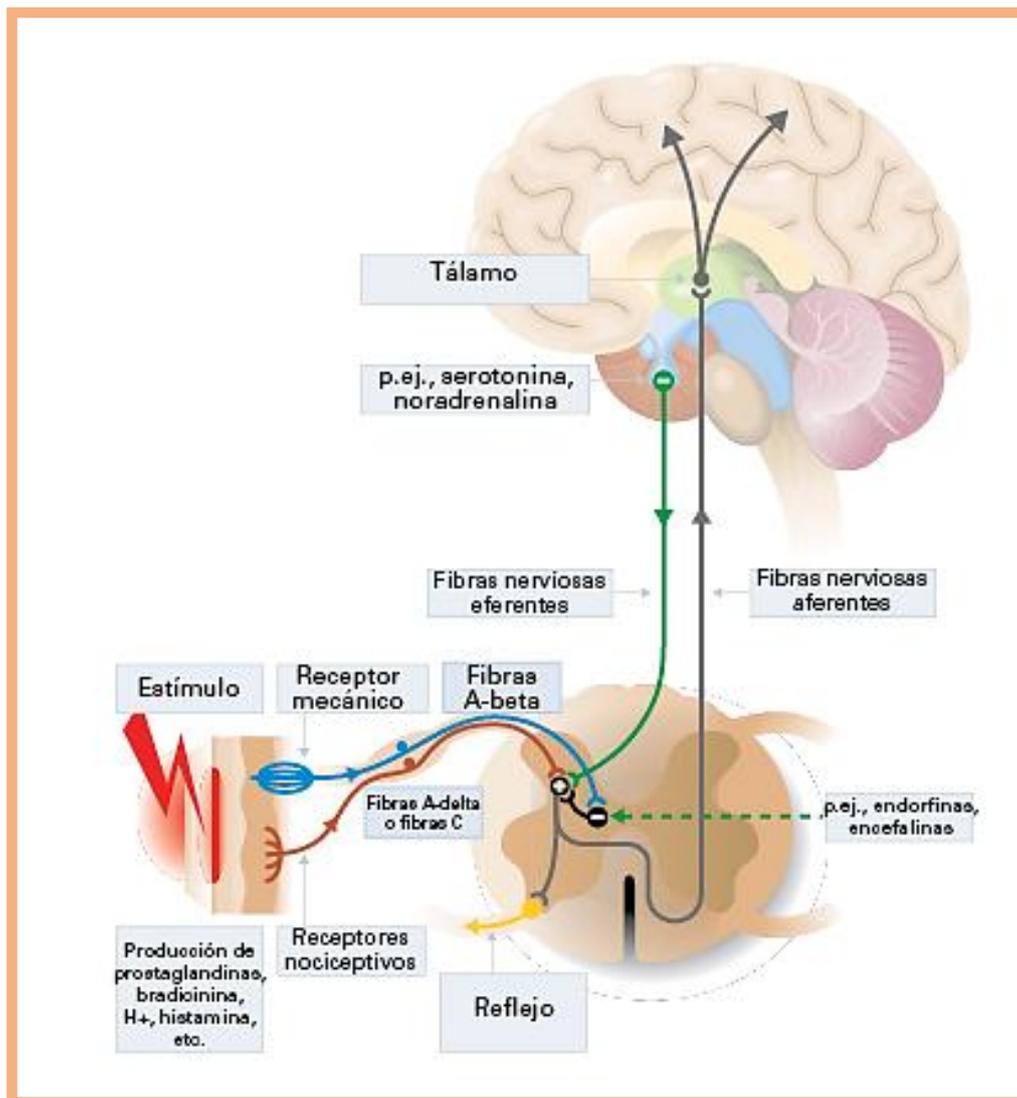


Figura 6. Esquema simplificado de las vías ascendentes nociceptivas a nivel espinal y supraespinal, desde la captación del estímulo y su aferencia hasta niveles supraespinales y su vía eferente. Imágenes Change Pain (www.changepain.org).

1.2.4. Percepción

Un gran paso en la comprensión de los mecanismos de la nocicepción ha sido el enfoque multidimensional que contempla las tres dimensiones básicas del dolor en el ser humano: la sensorial-discriminativa (nociceptores), la afectivo-motivacional (caracterización de estados emocionales en el sujeto) y la cognitivo-evaluativa (creencias, atención y pensamientos influyentes). La percepción es el proceso final por el que la transducción, la transmisión y la modulación interactúan con la psicología del paciente para crear la experiencia emocional, subjetiva y única, que se percibe como dolor. El cerebro actúa como un sistema de realidad virtual, que puede, o no, ser controlado por la interacción con el medio ambiente interno o externo del cuerpo. Las neuronas del córtex sensorial primario (SI) tienen campos receptivos pequeños y están implicadas en la localización exacta de la sensación dolorosa. El córtex cingulado anterior (CCA) está implicado en el componente emocional del dolor. El tracto espinotalámico (TET) está conectado directa e indirectamente con el córtex de la ínsula que procesa la información sobre el estado interno del cuerpo. La vía indirecta pasa por el córtex parietal posterior, un córtex asociativo multimodal (auditivo, visual y somatosensorial) que permite al cerebro elaborar una representación sensorial que incluye todos los elementos sensoriales de entrada en un momento dado. La memoria de procesos anteriores influye en la sensación dolorosa, evaluando la amenaza real como origen del dolor. Toda esta representación virtual se comparte con el córtex asociativo multimodal frontal, que define las prioridades y construye una estrategia para afrontar la situación de dolor, teniendo en cuenta la experiencia pasada y el contexto actual. La discriminación afectiva y conductual del dolor se establece en el tálamo, específicamente en los núcleos centrales y parafasciculares. En la amígdala se integra información relevante para el componente aversivo de la experiencia dolorosa. Los procesos de atención se asocian con la corteza anterior del cíngulo (CAC), la corteza somatosensorial primaria (SI) y la corteza premotora ventral (CPV). Las respuestas vegetativas puestas en marcha por el dolor se relacionan con la corteza anterior del cíngulo y la ínsula. Las respuestas motoras desencadenadas por el proceso doloroso están relacionadas con cerebelo, putamen, globo pálido, corteza motora

suplementaria, corteza premotora ventral y la corteza anterior del cíngulo (Basbaum y cols., 2009; Apkarian y cols., 2011).

1.3. Fisiopatología del dolor

1.3.1. Dolor agudo y dolor crónico

La diferenciación entre dolor agudo y crónico se realiza más que en función del factor tiempo, en base a los distintos mecanismos fisiopatológicos que los originan (Cerveró, y cols., 1995). El dolor agudo es la consecuencia inmediata de la activación del sistema nociceptivo, generalmente por un daño tisular somático o visceral. El dolor agudo es autolimitado y desaparece con la lesión que lo originó. Tiene una función de protección biológica al actuar como una señal de alarma del organismo frente a la lesión de un tejido. Los síntomas psicológicos asociados son escasos y habitualmente limitados a una ansiedad leve. Se trata de un dolor de naturaleza nociceptiva y que aparece por una estimulación química, mecánica o térmica de receptores específicos.

El dolor crónico, sin embargo, no posee una función protectora, más que un síntoma de una enfermedad, es en sí mismo una patología. No es un proceso autolimitado, pudiendo persistir por tiempo prolongado (meses o años) después de la curación de la lesión inicial, o aparece incluso en ausencia de lesión. Suele ser refractario a los tratamientos disponibles y se asocia a numerosos síntomas psicológicos, como ansiedad, depresión, insomnio y profundas alteraciones en las relaciones sociales y de pareja (Breivik y cols., 2008).

1.3.2. Dolor nociceptivo y dolor neuropático

En función de distintos mecanismos neurofisiológicos que lo origina, el dolor se clasifica en nociceptivo y neuropático. El **dolor nociceptivo**, también denominado dolor “normal” o “fisiológico”, aparece como consecuencia de una lesión somática y según su rapidez de viaje en el sistema nervioso se clasifica como dolor “rápido” y dolor “lento” (Fink WA Jr., 2005). El *dolor somático* o dolor rápido es transmitido por fibras A δ , se origina por una lesión a nivel de piel, músculo, ligamentos, articulaciones o huesos. Se caracteriza por ser un dolor bien localizado (epicrítico), circunscrito a la zona dañada y que no suele acompañarse de reacciones vegetativas (náuseas, vómitos, diaforesis, etc). El

dolor visceral, se origina por la lesión de órganos internos, aunque no todas las vísceras son sensibles al dolor. Se caracteriza por ser un dolor mal localizado (protopático), transmitido por fibras C, es difuso, lento y se extiende más allá del órgano lesionado. Con frecuencia se localiza en una superficie del organismo distante de la víscera que lo origina (dolor referido), y suele acompañarse con frecuencia de reacciones vegetativas.

El **dolor neuropático**, llamado también "anormal" o "patológico, "es el dolor que tiene su origen en un daño del propio tejido nervioso somato-sensorial, centralo periférico, que se acompaña por una alteración en los mecanismos moduladores de la transmisión del dolor" (IASP).

Un 20% de la población europea padece dolor crónico (Breiviky cols., 2006), siendo el dolor neuropático una de las causas más frecuentes de persistencia del dolor después de la desaparición de la lesión o disfunción que lo ha provocado. Entre los síndromes de dolor crónico, el dolor neuropático es el más complejo de diagnosticar y de tratar. Una de sus características más típicas es la presencia de alodinia (dolor provocado por estímulos que normalmente no son dolorosos) y de hiperalgesia (aumento de la intensidad dolorosa desencadenada por estímulos que son normalmente dolorosos) (Merskey y cols., 1994). La hiperalgesia a su vez se puede definir como hiperalgesia primaria, circunscrita a la zona de la lesión, e hiperalgesia secundaria, extendida a zonas no afectadas por la lesión causal. Esta última se debe a alteraciones en el procesamiento central de las señales generadas en la periferia, como consecuencia de la sensibilización de los nociceptores y mecanismos de sensibilización central.

A nivel periférico el dolor neuropático puede ser desencadenado por una lesión primaria o disfunción, en nervio periférico, en el ganglio de la raíz dorsal, o en la propia raíz (ej: neuropatía diabética, neuropatía por agentes quimioterápicos, neuropatía por miembro fantasma, etc.). Los síndromes más frecuentes de dolor neuropático de origen central son dolor post-ictus, la esclerosis múltiple y el dolor tras la lesión medular.

1.3.3. Sensibilización periférica

Tras la lesión de un nervio, mecanismos periféricos de transmisión generan una actividad anormal de descargas espontáneas y ectópicas en las fibras nociceptivas primarias, cuya consecuencia es una disminución del umbral de activación de los nociceptores (Bridges y cols., 2001). Se producen cambios en los complejos receptor-canal de sodio en los nervios periféricos (fenómeno denominado autosensibilización) y aumento en la excitabilidad de la membrana terminal de los nociceptores en respuesta a mediadores inflamatorios del nervio afectado (Campbell & Meyer, 2006). Entre los mecanismos responsables de las descargas ectópicas se encuentra la sensibilización de canales de Na⁺ dependientes de voltaje tipo NaV1.3, NaV1.7, y NaV1.8, y de canales de Ca⁺⁺ dependientes del voltaje tipo N. Todos ellos participan en la generación de alodinia e hiperalgesia (Bridges y cols., 2001; Aurilio y cols., 2008). La desensibilización (regulación a la baja) de canales de K⁺ dependientes de voltaje y consecuente inhibición de las corrientes hiperpolarizantes, también contribuye a la hiperexcitabilidad de las fibras nociceptivas dañadas y no dañadas (Baron y cols., 2010; Tulleuda y cols., 2011). Otro elemento relevante es la reducción del umbral de activación de los canales TRP, que son sensibles a los cambios de temperatura, al tacto y al dolor (DibHajj y cols., 1999; Waxman, 2013). La infiltración por macrófagos, linfocitos T y mastocitos del nervio lesionado, los ganglios dorsales y el asta dorsal, promueve la liberación de citoquinas y otras sustancias proinflamatorias que contribuyen a la sensibilización nociceptiva induciendo también la aparición de hiperalgesia y alodinia (Costigan y cols., 2009). La actividad ectópica puede originar parestesias y disestesias (sensación de quemazón, pinchazos, descargas eléctricas, etc.) (Baron, 2006). Puede surgir dolor espontáneo, tanto por actividad ectópica como por disminución del umbral al dolor de los nociceptores (Costigan y cols., 2009). Se sugiere que la actividad espontánea de los nociceptores de tipo C es responsable de la sensibilización de las neuronas del asta dorsal (Woolf & Mannion, 1999) y que la actividad espontánea de las fibras A mielinizadas (las que transmiten señales nocivas) están relacionadas inicialmente con las parestesias, pero posteriormente con disestesias y dolor (Woolf, 2004).

1.3.4. Sensibilización central

La IASP define la "sensibilización central" como una respuesta incrementada de las neuronas nociceptivas del SNC en respuesta a un impulso aferente normal. El incremento de los impulsos nociceptivos que proceden de la periferia terminan por afectar a las neuronas de procesamiento nociceptivo ubicadas en las diferentes láminas del asta dorsal y de otros centros neurales de la vía nociceptiva, dando como resultado el fenómeno de sensibilización central (Baron, 2006).

El proceso de sensibilización central electrofisiológicamente se caracteriza porque las neuronas de segundo orden del asta dorsal presentan un bajo umbral de respuestas a estímulos, una excitabilidad incrementada y actividad espontánea (wind-up), su campo receptivo está incrementado, tiene mayor campo de conectividad sináptica y se han inducido importantes cambios anatómicos en la reorganización de circuitos nociceptivos en el asta dorsal. (Polgary cols., 2004).

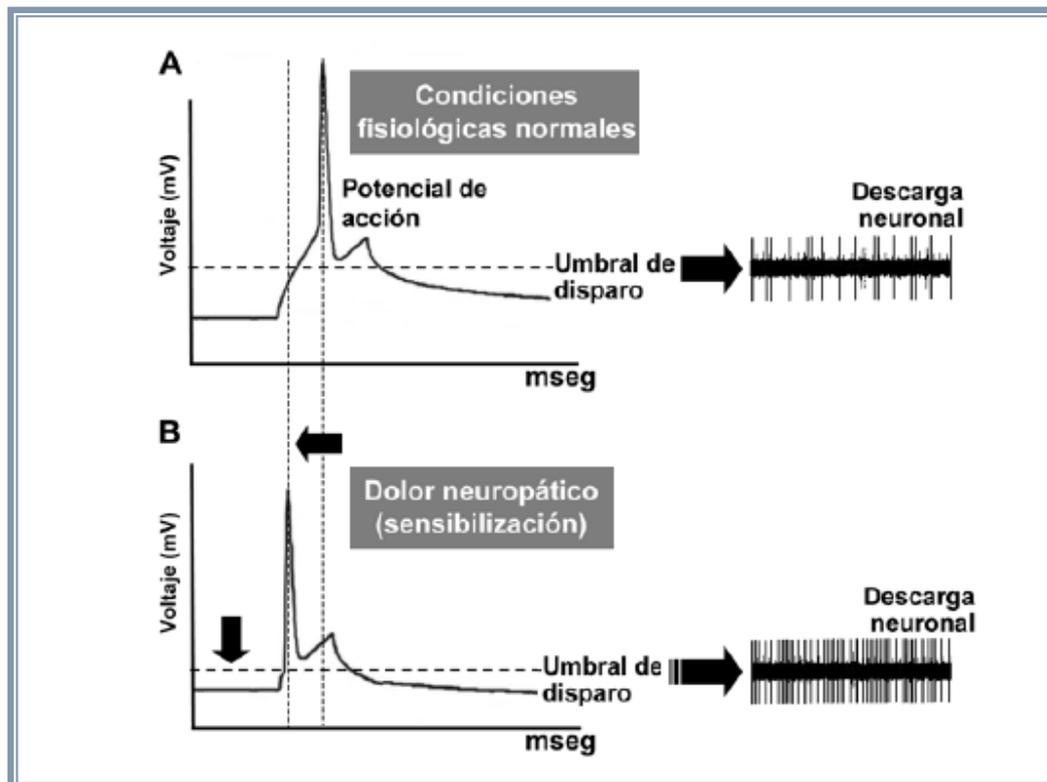


Figura 7. Generación del potencial de acción: (A) en condiciones fisiológicas normales, y (B) en una neurona sensibilizada, el umbral de disparo para el potencial de acción disminuye y la generación de descargas resulta facilitada (Modificado de Basbaum & Jessell, 2001).

Aparecen algunas características como conversión de neuronas específicamente nociceptivas a neuronas de rango dinámico amplio que responden tanto a estímulos nocivos como inocuos (Latremolière & Woolf, 2009). Estos cambios representan una reorganización estructural irreversible de la red neural en el seno del asta dorsal. Adicionalmente, las interneuronas inhibitorias, mueren como consecuencia de la activación excesiva de los receptores NMDA (van Wilgen & Keizer, 2012). **Figura 7.**

Aunque nuestro conocimiento sobre el desarrollo de los estados de dolor crónico e hiperalgesia se han focalizado tradicionalmente en el dolor asociado con las vías ascendentes (desde la periferia hasta el asta dorsal de la médula espinal y centros supraespinales) un creciente volumen de investigación amplía nuestro conocimiento de las influencias descendentes en la génesis y mantenimiento de la sensibilización central (Kindler y cols., 2011).

Tabla A. Diferencias entre los fenómenos wind-up y potenciación a largo plazo (LTP).

<u>Wind-Up</u>	<u>Potenciación a largo plazo (LTP)</u>
<p>Estimulación de baja frecuencia (0,3 a 0,5Hz)</p> <p>Dura minutos tras la estimulación</p> <p>Zona descrita: médula espinal</p>	<p>Estimulación alta frecuencia (50-100Hz)</p> <p>Dura horas o días.</p> <p>Aumento prolongado de potenciales excitatorios post sinápticos.</p> <p>Zona descrita: Típicamente hipocampo.</p> <p>Relevante en dolor: médula espinal</p> <p>Necesita una señal intensa durante su fase de inducción.</p> <p>Permanencia de respuesta fortalecida en ausencia de la señal de calcio.</p>

Potenciación a largo plazo (LTP): Se trata de un fenómeno por el que una estimulación aferente y de alta frecuencia (50-100Hz) provoca un aumento prolongado (minutos-horas-días) de potenciales excitatorios post-sinápticos. Se traduce en un aumento persistente en la comunicación sináptica entre dos neuronas. Determina una marcada respuesta post-sináptica después de una estimulación tetánica y se considera mecanismo subyacente relevante del dolor crónico, en el cual persisten las manifestaciones clínicas iniciales tras la desaparición de la lesión que originó el dolor (Sandkühler, 2007). Se ha descrito en neuronas del hipocampo, córtex, tronco cerebral, médula espinal, etc. **Tabla A.** La potenciación a largo plazo (LTP) en las sinapsis entre fibras aferentes C y las neuronas nociceptivas de la lámina I de la médula espinal que expresan receptores NK1 para sustancia P se considera un mecanismo potencial de amplificación del dolor en el animal de experimentación y, probablemente en humanos.

1.4. Ejercicio físico y dolor neuropático

El ejercicio es una forma común de tratamiento del dolor musculoesquelético, tanto agudo como crónico, que ha mostrado efectos beneficiosos, en términos de reducción del dolor y mejoría funcional, en la población general sana y en algunas patologías osteoarticulares inflamatorias. El incremento en el umbral nociceptivo, es debido a una activación de las vías descendentes inhibitoras del dolor a través de la liberación de opioides endógenos, citoquinas y factores de crecimiento, catecolaminas o glucocorticoides, y a la presencia de señales somáticas tras el ejercicio que podrían desviar la atención de los estímulos dolorosos. El ejercicio promueve la liberación de β -endorfina por el hipotálamo y la hipófisis y esta, a su vez, produce analgesia activando receptores opioides μ centrales y periféricos, respectivamente. El hipotálamo, a través de sus proyecciones a la sustancia gris periacueductal, es capaz de activar los mecanismos descendentes inhibidores del dolor. La contracción muscular activa de forma generalizada los sistemas de analgesia endógena en individuos sanos y en pacientes con lumbalgia crónica, osteoartritis o artritis reumatoide. Sin embargo, el ejercicio provoca sensibilización al dolor generalizada en determinados pacientes con síndromes dolorosos crónicos asociados a disfunción del sistema inhibitor

descendente, como es el caso de la fibromialgia (Petersen & Pedersen, 2005; Lannersten & Kosek, 2010; Daenen y cols., 2015). Por este motivo, históricamente, los médicos han sido reticentes al uso terapéutico del ejercicio en pacientes con dolor crónico neuropático. A pesar de ello, en la actualidad el uso de la actividad física como herramienta terapéutica para el tratamiento del dolor neuropático de diversas etiologías es un campo en expansión, y su investigación está ofreciendo información importante sobre mecanismos subyacentes aún poco conocidos (Cooper y cols., 2016).

En el animal de experimentación, el ejercicio voluntario o forzado ha mostrado efectos positivos, elevando el umbral nociceptivo, en modelos de dolor neuropático inducido por paclitaxel (Park y cols., 2015), estreptozotocina y otros modelos de diabetes (Chen y cols., 2013; Groover y cols., 2013; Yoo y cols., 2015), lesión nerviosa periférica (Molteni y cols., 2004; Seo y cols., 2009; Stagg y cols., 2011; Bobinsky y cols., 2011; Chen y cols., 2012; Shen y cols., 2013; López-Álvarez y cols., 2015), y lesión medular (Hutchinson y cols., 2004; Sharma y cols., 2014).

Algunos de estos estudios han analizado los cambios moleculares y celulares inducidos por el ejercicio en las neuronas de la vía nociceptiva. Se han descrito cambios en la expresión de factores neurotróficos en los ganglios sensoriales y/o médula espinal que podrían ejercer efectos beneficiosos sobre la regeneración axonal y recuperación funcional del nervio lesionado. Entre ellos se encuentran: factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento nervioso (NGF); neurotrofina 3 (NT-3); sinapsina I (SNAP1), factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), artemina, y la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP 43) (Molteni y cols., 2004; Keeler y cols., 2012; Khan y cols., 2014; Detloff y cols., 2014; López Álvarez y cols., 2015).

En roedores sometidos a modelos de lesión traumática del nervio ciático o de neuropatía diabética, se ha demostrado que el ejercicio reduce la hiperalgesia y la alodinia desarrolladas, a través de mecanismos ligados al incremento de la actividad de los sistemas endógenos inhibidores del dolor. Este podría ser un mecanismo antinociceptivo relevante en la clínica ya que los pacientes con dolor crónico muestran disfunción del sistema de inhibición del dolor y presentan un desequilibrio de la modulación descendente del dolor a

favor de sistemas proalgésicos (Denk y cols., 2014). En los diversos modelos experimentales se han descrito: (i) aumentos de opioides endógenos en la sustancia gris periacueductal (SGPA) y bulbo rostral ventromedial (BRVM) (Stagg y cols., 2011; Kim y cols., 2015); (ii) incrementos en la producción de GABA por las interneuronas del asta dorsal de la médula (Kami y cols., 2016); (iii) actividad incrementada de la vía dopaminérgica que conecta el área tegmental ventral con el núcleo accumbens (Wakaizumi y cols., 2016); (iv) actividad incrementada de la neurotransmisión serotoninérgica en el tronco del encéfalo (Bobinsky y cols., 2015); y (v) actividad incrementada del sistema adenosinérgico (Martins y cols., 2013).

El ejercicio físico mantenido ha mostrado tener importantes efectos antiinflamatorios beneficiosos para patologías muy variadas (Gleeson y cols., 2011), incluido el dolor crónico en pacientes obesos (Paley & Johnson, 2015). Por otro lado, la neuroinflamación es un mecanismo de relevancia en el desarrollo de dolor neuropático (Lantero y cols., 2012; Fitzgerald & McKelvey, 2016). Es por ello que citoquinas pro y antiinflamatorias han sido objeto de intenso estudio para explicar la reducción de la alodinia y otros síntomas nociceptivos en modelos de dolor neuropático de origen traumático o diabético. Así, se ha demostrado que la acción antialodínica del ejercicio en el animal de experimentación se asocia con una reducción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β), junto a un incremento de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) (Chen y cols., 2012; Bobinsky y cols., 2015; Chen y cols., 2015; Huang y cols., 2017).

El uso terapéutico del ejercicio en la clínica, dirigido específicamente al tratamiento del dolor neuropático es un campo muy reciente, pero en expansión, aunque los resultados son variables. El ejercicio agudo no induce analgesia en pacientes con neuropatía diabética dolorosa, en contraste con los pacientes diabéticos sin dolor neuropático (Knauf & Koltyn, 2014). Sin embargo, los programas mantenidos de ejercicio aeróbico reducen la percepción por parte de los pacientes de la interferencia del dolor en su vida cotidiana (Yoo y cols., 2015); además, reduce la severidad del dolor, incrementa la inervación cutánea y mejora la conducción neural (Kluding y cols., 2012; Fisher y cols., 2007; Kluding y cols., 2015), todo ello acompañado

de efectos positivos sobre el estado vascular (Billinger y cols., 2017). Los pacientes con fibromialgia, a pesar de referirse al ejercicio agudo como desencadenante del dolor y agravante de sus síntomas negativos, estudios recientes muestran que el ejercicio mantenido mejora la calidad de vida de estos pacientes (Nijs y cols., 2012; Daenen y cols., 2015).

En pacientes cancerosos con neuropatía inducida por quimioterápicos neurotóxicos, el ejercicio moderado-vigoroso se ha mostrado eficaz reduciendo el dolor neuropático comparado con duloxetina, sin provocar efectos negativos (Majithia y cols., 2016). En pacientes con síndrome de dolor regional complejo, el ejercicio terapéutico no ha mostrado eficacia para el alivio del dolor (Smart y cols., 2016).

Se han probado varias modalidades e intensidades de ejercicio para tratar el dolor neuropático pero no todas las formas y tipos de ejercicio proporcionan el mismo tipo o grado de beneficio (Seo y cols., 2009; Cobiانchi y cols., 2013). Muy probablemente la intensidad, modalidad, tiempo de inicio y duración del ejercicio sean factores determinantes, todavía poco perfilados, de los beneficios de la actividad física terapéutica en los pacientes con dolor neuropático

2. Ansiedad

La ansiedad, dependiendo de su intensidad y de su repercusión sobre la actividad de la persona, puede ser una emoción normal o un trastorno psiquiátrico. En condiciones normales, la ansiedad es una emoción con función de alerta, que prepara al organismo para reaccionar ante determinadas situaciones estresantes o de emergencia. Como tal, se comporta como un mecanismo de defensa y adaptación a situaciones nuevas, motiva al individuo a realizar sus funciones y tiene un papel en la supervivencia de las especies, junto con otras emociones como el miedo, la ira o el dolor. Sin embargo, cuando su intensidad es excesiva o hay una gran desproporción entre el estímulo desencadenante y la ansiedad desencadenada se convierte en patológica, y provoca respuestas de estrés ante situaciones de la vida cotidiana. En términos patológicos, la ansiedad se describe como un malestar generalizado caracterizado por un estado de inquietud, angustia, excitación y

una extrema inseguridad, y se acompaña de un sentimiento de amenaza constante, preocupación, expectación tensa ante el futuro, que interfirieren con el funcionamiento cotidiano y deterioran la calidad de vida del paciente.

En la ansiedad coexisten varios componentes: (i) sentimiento de aprensión, temor o angustia, frente situaciones percibidas como amenazantes; (ii) estado de irritabilidad acompañado de pérdida de la capacidad de concentración, y (iii) un conjunto de síntomas vegetativos somáticos: hipersudoración, taquicardia y palpitaciones, opresión precordial, fatiga, micciones frecuentes, cefalea, mialgias, insomnio, molestias digestivas, etc.

Se considera que en los trastornos de ansiedad interviene cierta predisposición biológica, o vulnerabilidad, que puede tener una base genética o ser adquirida a través de las experiencias de los primeros años de vida. El impacto de los acontecimientos y el medio ambiente sobre un cerebro mal configurado puede conducir a la aparición del trastorno por ansiedad patológica. La ansiedad también constituye un síntoma que acompaña a una gran variedad de enfermedades neuropsiquiátricas, como la esquizofrenia, el trastorno bipolar, la enfermedad de Alzheimer, etc. En estas enfermedades cualquier tipo de factor estresante puede desencadenar situaciones de ansiedad que pueden llegar a ser muy graves.

Como describen Hurlé y cols., (2014), se pueden distinguir en la ansiedad los siguientes componentes: (i) la evaluación por la que se valora como de resaltable es el estímulo y su relación con condicionamientos y experiencias previas; (ii) la expresión o respuesta emocional con sus manifestaciones conductuales, incluidas las motoras de aproximación o evitación, endocrinas y vegetativas, y (iii) la experiencia emocional que describe el sentimiento íntimo subjetivo que acompaña a la respuesta. Con el fin de preservar intacta su capacidad para guiar adecuadamente a la conducta, todos estos componentes del proceso emocional son modulados por complejos sistemas neurobiológicos que son capaces de evitar que se hagan persistentes, excesivos, inapropiados o capaces de conformar una mala adaptación (Hurlé y cols., 2014).

Los estudios de neuroimagen en humanos que padecen ansiedad, así como los estudios en modelos animales, han proporcionado una visión

bastante coherente de los circuitos neuronales implicados en la ansiedad (Duval y cols., 2015). Existen tres niveles de organización que interactúan entre sí (Bishop y cols., 2007). Las estructuras del tronco del encéfalo, como la sustancia gris periacueductal y el locus coeruleus, e hipotalámicas son responsables de las respuestas automáticas más simples. Las estructuras límbicas, en las que destaca de manera prominente la amígdala, los núcleos septales y el hipocampo son mediadores de respuestas que contienen un mayor nivel de elaboración, especialmente la emocional. Por último, la corteza prefrontal medial y paralímbica (orbitofrontal, insular, temporal anterior y cingulada anterior) intervienen en la elaboración de las respuestas que requieren una mayor demanda cognitiva. Evidentemente, todas estas estructuras están interconectadas y orquestan la respuesta de forma integrada (Tovote y cols., 2015).

La SGPA recibe aferencias descendentes de la corteza paralímbica y del sistema límbico, y ascendentes procedentes de sistemas sensoriales. Coordina las respuestas autonómica y conductual (huida, lucha o paralización) específicas frente al miedo, en función de la naturaleza de los estímulos amenazantes. Está implicada en la analgesia ante el estrés agudo, mediada por la liberación de péptidos opioides. El locus coeruleus, principal núcleo noradrenérgico cerebral, recibe aferencias del córtex, sistema límbico y tálamo. Sus eferencias conectan con áreas cerebrales responsables de las alteraciones conductuales, somáticas y vegetativas propias de los estados de ansiedad y miedo. Su papel es fundamental en la reacción de alarma y en la hipervigilancia, así como en la respuesta neuroendocrina propia de los estados de ansiedad. El hipotálamo es responsable de la respuesta endocrina al estrés. La amígdala constituye un elemento clave en la adquisición y procesamiento de la información y en la extinción del miedo condicionado. La información sensorial es transmitida a los núcleos de la amígdala, bien directamente, o tras ser procesada por el tálamo, la corteza sensorial, prefrontal y paralímbica. El núcleo lateral de la amígdala es la primera interfase que recibe la información sensorial. Desde allí la información se distribuye en paralelo a otros núcleos amigdalares mediante proyecciones recíprocas, especialmente los núcleos basales y el núcleo central de la amígdala. De este

núcleo surgen respuestas organizadas mediante sus proyecciones al tronco cerebral y mesencéfalo (p. ej., locus coeruleus y SGPA); al hipotálamo lateral, donde activan el sistema simpático, produciendo taquicardia, dilatación pupilar, palidez y elevación de la presión arterial; al núcleo dorsal motor del vago y el núcleo ambiguo, donde activan el sistema parasimpático, con manifestaciones como diarrea, micción, úlceras y bradicardia; a los núcleos de los nervios facial y trigémino, originando expresiones faciales de miedo. Además, las proyecciones al núcleo paraventricular del hipotálamo provocan la respuesta endocrina al estrés, y consiguiente activación del eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal; al núcleo parabraquial, donde provocan hiperventilación y disnea; al área tegmental ventral, donde activarán la vía dopaminérgica mesocortical que va al núcleo accumbens, así como al caudado ventromedial y putamen ventral, originando respuestas motoras bien organizadas (Tovote y cols., 2015).

La corteza prefrontal medial, la corteza cingulada anterior y la corteza insular reciben importantes influencias de la amígdala, de naturaleza recíproca, así como del tálamo; merced a ellas se puede interpretar el significado de orden superior de los estímulos sensoriales, modificar las respuestas conductuales en razón de la experiencia, predecir las consecuencias sociales de una determinada conducta, etc. La activación exagerada de estas regiones se ha asociado a la interpretación errónea de los estímulos amenazantes, la ansiedad anticipatoria, los componentes interoceptivos del miedo y la predisposición ansiosa (Tovote y cols., 2015).

En los últimos 20 años, ha habido un incremento en el número de publicaciones que han centrado su investigación en la comorbilidad existente entre el dolor crónico y la ansiedad (Asmundson y cols., 2009). Así, numerosos estudios han mostrado que pacientes con dolor neuropático (Nicholson y Verma, 2004; McCarberg, 2003), fibromialgia (Gormsen y cols., 2009), artritis reumatoide (Ryan y McGuire, 2016), dolor de espalda (Demyttenaere y cols., 2007) o migraña (Peres y cols., 2017) presentan niveles de ansiedad mayores que los pacientes libres de dolor. Además, y no menos importante, un número pequeño pero creciente de estudios ha centrado su foco de atención en evaluar la prevalencia del dolor en pacientes con ansiedad, trastorno del pánico o trastorno de estrés post-traumático. Los tipos de dolor más frecuentes en estos

pacientes son dolor de espalda, hombros, cuello, cabeza, estómago, articular y migraña(Asmundson y cols., 2009).

La alta comorbilidad entre la ansiedad y el dolor crónico sugiere una íntima relación entre estas dos condiciones, con varios escenarios posibles; a) existe una relación de causalidad entre ambas, es decir, dolor crónico causa es causa de ansiedad y viceversa; b) las dos condiciones se influyen mutuamente y ambas se retroalimentan, es decir, el dolor exacerba síntomas de la ansiedad y viceversa; y c) la existencia de un tercer factor, por ejemplo, una predisposición común y/o un evento ambiental compartido.

El dolor crónico causa ansiedad al generar un sentimiento de impotencia y desesperación por no saber qué hacer para calmar el dolor, o cómo reaccionar frente a él. La ansiedad generada cierra un círculo vicioso que, a su vez, produce más dolor. Sin embargo, los trabajos publicados hasta el momento no avalan esta hipótesis. La mayoría de los estudios sustentan la idea de que ambas patologías se influyen mutuamente y se retroalimentan de forma paulatina. Podría asociarse, también, un factor ambiental o predisposición genética responsables de que estas dos patologías se desarrollen de forma concomitante. Sin embargo, la naturaleza de la asociación entre dolor y ansiedad, así como los mecanismos subyacentes que podrían explicar su conexión no han sido todavía bien caracterizados.

Como ya hemos desarrollado en apartados anteriores, para la transmisión de información dolorosa (o nociceptiva), las neuronas del asta dorsal de la médula espinal reciben aferencias sensoriales desde la periferia. A través de la proyección espinotalámica, la información nociceptiva se transfiere al tálamo. Las neuronas del tálamo envían proyecciones a regiones cerebrales superiores, como la corteza somatosensorial, la corteza cingulada anterior, la corteza insular, y la amígdala. La corteza somatosensorial es importante para el proceso de discriminación de las diversas formas de dolor. La corteza cingulada anterior, la amígdala y la ínsula contribuyen a conferir un carácter desagradable al dolor y a su componente afectivo. Se cree que estas tres regiones están involucradas en el proceso de dolor y ansiedad en diferentes condiciones(Basbaum y cols., 2009). Esta red de neuronas localizadas en diferentes regiones del cerebro que generan el vínculo entre las condiciones de

dolor y ansiedad. La ansiedad promovería una activación de las vías descendentes facilitadoras del dolor que facilitan la transmisión nociceptiva espinal. Por el contrario, la activación de la corteza prefrontal tiene efectos antinociceptivos y ansiolíticos en condiciones de dolor neuropático. En condiciones de dolor crónico, esta región cortical sufre importantes cambios plásticos de larga duración (Zhuo, 2016)

La comorbilidad dolor-ansiedad es altamente prevalente entre la población, y tiene unas severas consecuencias negativas sobre el estado de salud de los individuos que los padecen y, consecuentemente, sobre su calidad de vida. Frecuentemente, los pacientes se sienten incapaces de realizar tareas cotidianas, mantener sus relaciones sociales (amigos, familia, pareja) y, en un porcentaje nada despreciable de casos, el binomio dolor-ansiedad condiciona una incapacitación laboral. La combinación dolor-ansiedad dificulta sustancialmente el tratamiento de estos pacientes (Bair y cols., 2013).

3. Proteínas morfogenéticas de hueso

Los factores de crecimiento transformante β (TGF β) constituyen una familia multifuncional de citoquinas compuesta por más de 30 miembros con acciones pleiotrópicas y contextuales. En los mamíferos, estas citoquinas se agrupan en diferentes subfamilias: TGF β s, proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), activinas, factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), hormona anti-mülleriana (AMH) y factor neurotrófico derivado de glía (GDNF).

Las BMPs constituyen el mayor subgrupo de proteínas dentro de la superfamilia TGF β . Se trata de un amplio grupo de factores de crecimiento secretados, altamente conservados, de los cuales se han identificado más de 20 miembros en mamíferos (Bragdon y cols., 2011). Fueron descubiertas en extractos proteicos de hueso en 1965 (Urist, 1965) y posteriormente, se identificaron como factores de crecimiento y diferenciación de células osteogénicas (Wozney y cols., 1988). Las citoquinas de la familia de BMPs en mamíferos pueden ser subdivididas en varios grupos, basándose en su estructura (**Figura 8**, panel A).

Hoy en día las BMPs son consideradas citoquinas multifuncionales con un rango de acción muy amplio. Además de su papel esencial durante el desarrollo

embrionario (Bier & De Robertis, 2015; Hegarty y cols., 2013), las BMPs siguen participando durante la vida adulta en la homeostasis de un gran número de funciones fisiológicas en diversos órganos y tejidos, incluidos hueso, cartilago, músculo, riñón, corazón y vasos sanguíneos, y sistema nervioso (Massagué & Chen, 2000; Katagiri & Watabe, 2016). Su desregulación está implicada en procesos patológicos y algunas de ellas tienen aplicaciones en el tratamiento de fracturas óseas, procesos fibróticos renales y pulmonares (Ali, 2014).

Los miembros de la familia BMP señalizan a través de receptores con actividad serina-treonina quinasa de tipo I, también denominados ALK (activin receptor like kinases) y receptores de tipo II (**Figura 8**). La unión de ligando induce la formación de un complejo receptor heterotetramérico formado por dos unidades de cada tipo de receptor (Sebald & Mueller, 2003), y ambos tipos de receptores son imprescindibles para la transducción de la señal. La unión del ligando al receptor de tipo II promueve el reclutamiento de los receptores tipo I y, una vez formado el oligómero, el receptor de tipo II, cuya actividad proteínquinasa es constitutiva, transfosforila al receptor de tipo I. El receptor de tipo I, una vez fosforilado, transmite la señal intracelular específica. Los dos tipos de receptores comparten propiedades estructurales similares; están formados por un dominio extracelular relativamente corto, un solo dominio transmembrana y una cola citoplasmática que contiene un dominio serina-treonina quinasa.

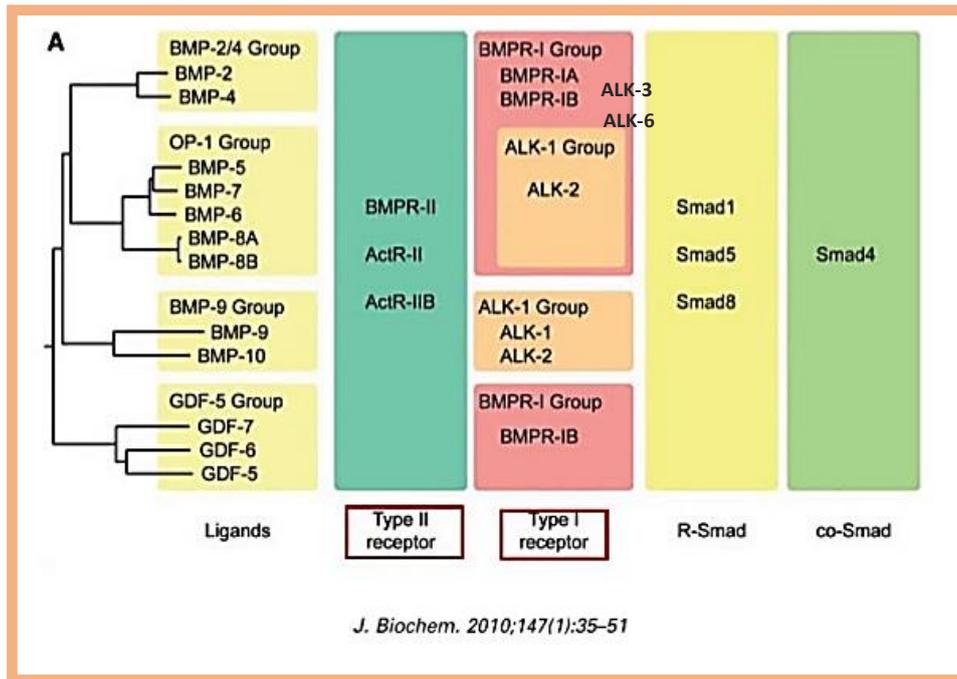


Figura 8. Relación entre ligandos de la familia BMPs, receptores (tipo I y tipo II) y vías de señalización canónicas a través de las proteínas Smads.

Se han identificado en mamíferos cinco receptores tipo II y siete receptores de tipo I diferentes para las diversas citoquinas de la superfamilia TGF- β , que son compartidos entre ligandos. Cada miembro de la superfamilia TGF- β se une a una combinación característica de receptores de tipo I y tipo II (**Figura 8**). Tres de los receptores de tipo I son activados por ligandos BMP: el receptor de Activina tipo IA (ActRIA/ALK2), el receptor de BMP tipo IA (BMPRI1A /ALK3) y el receptor de BMP tipo IB (BMPRI1B/ALK-6). Los receptores de BMPs son capaces de activar diferentes vías de señalización clásicamente divididas en canónicas y no canónicas (Massagué, 2000; Yadin y cols., 2016).

La vía canónica de señalización de BMPs se lleva a cabo a través de las proteínas Smads (**Figura 9**). Las Smads se clasifican en base a su función como: (i) BR-Smads o Smads activadas por el receptor de BMPs: Smad1, Smad5 y Smad8; (ii) Co-Smad o Smad común: Smad4 que es común a todas las vías y actúa como mediador común; y (iii) I-Smads o Smads Inhibitorias: Smad6 y Smad7.

Una vez activados por los receptores tipo II, los receptores tipo I fosforilan a las Smad reguladas por receptor de BMPs (BR-Smad). Las BR-Smads activadas forman complejos heterodiméricos o heterotetraméricos con Smad4, que son translocados al núcleo. Allí regulan la transcripción de genes diana a través de la interacción con diversos factores de transcripción, co-activadores y co-represores transcripcionales (Derynck y cols., 2003; Miyazono y cols., 2005). **Figura 9.**

La interacción de las R-Smads con el receptor tipo I se produce a través de una región altamente conservada en BR-Smads (Smad-1/5/8) y AR-Smads (Smad2/3), pero divergente entre ambos grupos (Wu y cols., 2000). Una vez fosforiladas, la interacción de las R-Smads con sus respectivas proteínas de anclaje a los receptores tipo I se desestabiliza, lo que facilita la formación del complejo heteromérico con Smad4 (Xu y cols., 2000; Shi y cols., 2007). La proteína Smad4 es el único componente del grupo de Smads mediadoras comunes o co-Smads en mamíferos y es compartida por BMPs, TGF- β s y activinas. El tercer grupo de proteínas Smad lo forman las Smad inhibidoras o I-Smads (Smad6 y Smad7) que juegan un papel esencial en la regulación de la señalización BMP (Hollnagel y cols., 1999; Miyazono & Miyazawa 2002; Miyazawa & Miyazono, 2017). Smad7 es capaz de inhibir señales mediadas por BMPs y TGF β s, mientras que Smad6 afecta de forma más específica a la vía de señalización de BMPs (Goto y cols., 2007). Las I-

Smads regulan negativamente la función de las R-Smads y la Co-Smad por medio de tres mecanismos distintos: (i) Uniéndose a los receptores tipo I e impidiendo la activación de las R-Smad respectivas (Mochizuki y cols., 2004; Dominguez-Soto y cols., 2005); (ii) Compitiendo con la co-Smad para formar oligómeros con las R-Smads (Murakami y cols., 2003; Fainaru y cols., 2005); (iii) A nivel nuclear, uniéndose al ADN en secuencias de respuesta a Smads e impidiendo la formación de complejos ADN-Smad funcionales (Fainaru y cols., 2004; Zhang y cols., 2007).

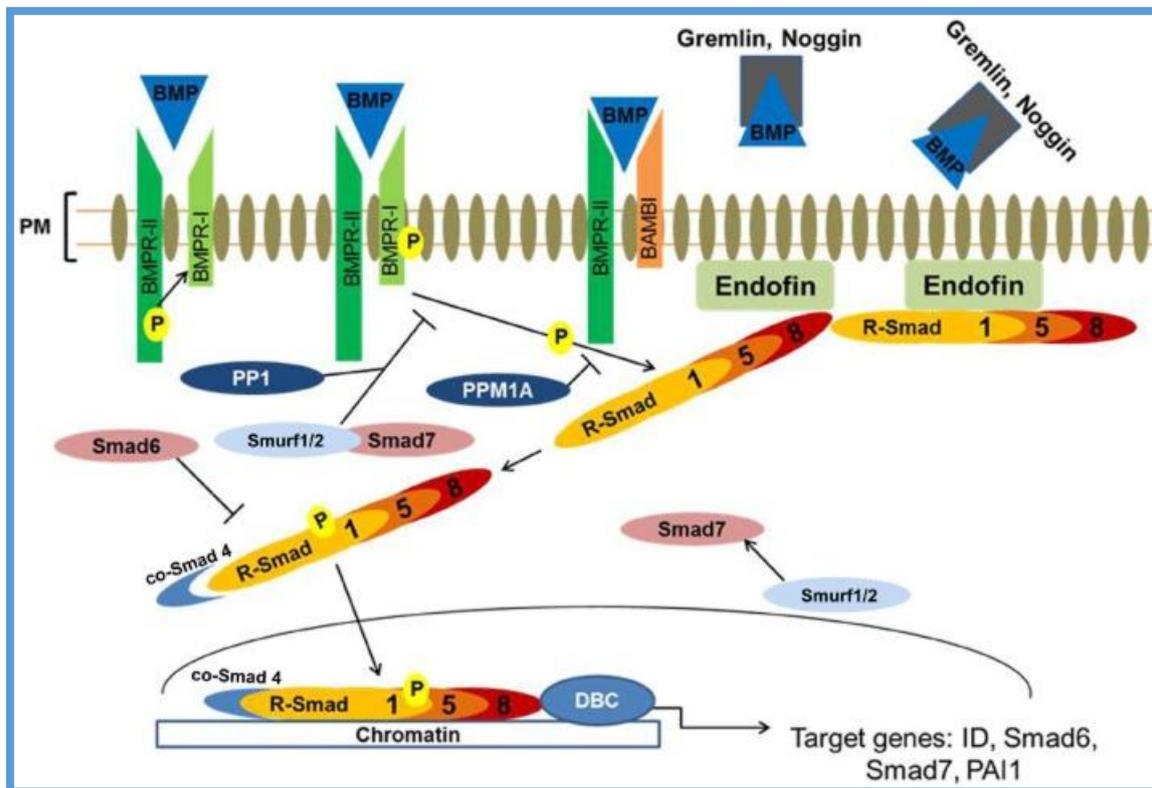


Figura 9. Vía canónica de señalización mediada por BMPs. (Tomada de Imran & Derek, 2014).

Además de la vía canónica, se ha descrito la existencia de rutas no canónicas capaces de transmitir las señales de BMPs. Ambos tipos de rutas de señalización pueden coexistir en un mismo tipo celular (Perron & Dodd, 2009; Perron & Dodd, 2011). La disponibilidad de los distintos ligandos y la batería de receptores que exprese la célula son factores críticos para el tipo de respuesta generada. Los ligandos BMP pueden unirse a receptores preformados (RPF) (heterotetraméricos), o bien inducir la formación de heterotetrámeros a partir de homo o heterodímeros, los cuales se denominan complejos de señalización

inducidos por BMP (CSIB). Se ha postulado que CSIB y RPFs determinan rutas de señalización diferentes. La unión de un ligando BMP a un RPF induciría la endocitosis del complejo vía clatrina, iniciando la ruta canónica, mediada por Smads1/5/8. La señal a través de CSIBs promovería la endocitosis del complejo vía caveolas y condicionaría la señalización a través de rutas alternativas, principalmente MAPK (Nohe y cols., 2002; Hartung y cols., 2006). La versatilidad de la señalización de las proteínas Smad y las interacciones funcionales de los mecanismos de señalización de las proteínas Smad y no-Smad definen la respuesta celular a TGF β s, BMPs y otras proteínas de la familia (Massagué, 2012).

La actividad celular desencadenada por BMPs está determinada por las interacciones ligando-receptor, oligomerización de receptores, proteínas moduladoras extracelulares, y fosforilación de proteínas intracelulares, incluidas algunas Smads (Miyazono y cols., 2005; Yadin y cols., 2016). En el dominio extracelular, el control sobre la unión de los ligandos BMP a sus receptores está modulado por moléculas antagonistas solubles, como gremlin, nogina, cordina o folistatina. Estos factores solubles se caracterizan por su capacidad de unirse a las proteínas BMPs bloqueando su unión a los complejos receptoriales. Su afinidad por los ligandos BMP puede ser variable, dándole un carácter altamente promiscuo. También ha sido descrito que la proteína transmembrana endoglina es capaz de unir los ligandos BMP2 y BMP7, aumentando la respuesta inducida por éstos miembros de la superfamilia TGF- β , entre otros (Wu & cols., 2012). Recientemente se ha descrito que el receptor TGF- β tipo III denominado betaglicano puede actuar como co-receptor de múltiples ligandos BMP, incrementando la fosforilación de Smad1 en respuesta a éstos (Kirkbride y cols., 2008). BAMBI es un pseudorreceptor estructuralmente relacionado con los receptores tipo I, pero que carece de dominio intracelular característico de éstos receptores. Su mecanismo de acción es el bloqueo de la unión entre los receptores tipo I y tipo II, modulando negativamente la respuesta a los diferentes miembros de la superfamilia TGF- β (Onichtchouk y cols., 1999).

BMPs en el sistema nervioso

Aunque la expresión de BMPs es más prominente durante el desarrollo (Bier & De Robertis, 2015), en el SN adultotambién se expresan abundantemente en una variedad de áreas anatómicas y en diferentes tipos de células y compartimentos celulares. Numerosos trabajos demuestranel importante papel desempeñado porBMPs en la regulación de procesos fisiológicos en el SNC adulto. Sirvan como por ejemplo la regulación de células madre neurales, el control de la proliferación y diferenciación glial, el destino del linaje neuronal o el proceso de mielinización axonal. Las señales de BMPs son imprescindibles para el control de los nichos de células progenitoras neurales en el hipocampo y de la neurogénesis y gliogénesis a lo largo de la vida adulta (Talbot y cols., 2006; Cheng y cols., 2007; Hampton y col., 2007; Eade &Allan, 2009; Weng y cols., 2012). En el sistema nervioso periférico, la señalización mediada por BMPs juega un papel importante en el equilibrio de los procesos degenerativos/regenerativos y de remielinización que se ponen en marcha precozmente tras la lesión de un nervio periférico (Kuo y cols., 2011; Ma y cols., 2011).

La desregulación de BMPs se ha sugerido que tiene importantes repercusiones patológicas en enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Kitterman y cols., 2012; Ordway y cols., 2012; Grinspan, 2015; Hossein-Nezhad y cols., 2016; Eixarch y cols., 2017).

Existen muy pocos estudios dirigidos al análisis las funciones de BMPs en la regulación de la transmisión y procesamiento de las señales nociceptivas, en condiciones fisiológicas o patológicas (Lantero y cols., 2012). La citoquina de esta familia mejor estudiada, en este contexto, ha sido BMP2. Probablemente, la razón esté relacionada con la repercusión clínica de la penetración intratecal de BMP2 recombinante durante los procedimientos de artrodesis espinal en la clínica, que se ha relacionado frecuentemente con la aparición de radiculitis en algunos pacientes (Dmitriev y cols., 2011; Lykissas y cols., 2014). En ratas, BMP2 desencadena una respuesta neuroinflamatoria en la médula espinal y en los ganglios dorsales, que conduce al desarrollo de alodinia (Dmitriev y cols., 2010; Mitchell y cols., 2016). Sin embargo, en ratas sometidas a lesión mediante ligadura del nervio ciático, la administración

perineural de BMP2 no produjo efectos sobre el desarrollo de hiperalgesia térmica (Zanella y cols., 2016).

En ratas sometidas a lesión traumática de la médula espinal, el trasplante de astrocitos obtenidos de células precursoras gliales embrionarias sometidas a pretratamiento con BMP4, a pesar de que promueve la supervivencia neuronal, regeneración axonal, y la recuperación funcional, no modula, ni positiva ni negativamente, la nocicepción de los animales (Macias y cols., 2006; Davies y cols., 2008; Davies y cols., 2011).

Centrándonos en BMP7, durante la vida postnata esta citoquina ejerce efectos, pleiotrópicos y contextuales tanto en el SNC como en el periférico, donde participa en importantes funciones fisiológicas. Sus efectos en diversas situaciones patológicas podrían conferir a esta citoquina un valor potencial como diana terapéutica (Schallert y cols., 2010). BMP7 ha mostrado efectos neuroprotectores y neuroreparadores en el sistema nervioso sometido a agresiones, tanto en el animal de experimentación como en el humano (Harvey y cols., 2005). En modelos experimentales de hipoxia/isquemia cerebral, BMP7 promueve el pre-acondicionamiento isquémico, y la administración de BMP7 recombinante inmediatamente antes de la agresión hipóxica reduce el tamaño del área infartada y la mortalidad de las ratas (Perides y cols., 1998; Lin y cols., 1999; Chang y cols., 2002; Guan y cols., 2013; Luan y cols., 2015). Además, la administración central de BMP7, transcurridas 24 horas desde el infarto cerebral, promueve una mejor recuperación sensoriomotora del área corporal del animal afectada (Kawamata y cols., 1998; Chang y cols., 2003). La sobreexpresión de BMP7 en el SNC utilizando un vector adenoviral también protege las neuronas corticales del estrés oxidativo y de la apoptosis inducida por la isquemia cerebral provocada en ratones, lo que reduce el área infartada (Heinonen y cols., 2014). Fármacos como la agmatina, que inducen sobreexpresión de BMP7 en el sistema nervioso, proporcionan neuroprotección frente a la isquemia cerebral en el animal de experimentación (Park y cols., 2013). En ratas sometidas a isquemia cortical, el implante de tejido renal fetal, que es extraordinariamente rico en BMP7, reduce la apoptosis mediada por caspasa-3 y el área infartada (Chang y cols., 2002).

BMP7 también se ha postulado como citoquina neuroprotectora y neurorreparadora de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada en un modelo de enfermedad de Parkinson inducida con 6-hidroxidopamina en ratas (Harvey y cols., 2004). BMP7 también protege a las neuronas dopaminérgicas en cultivo del efecto tóxico de la metanfetamina. Por el contrario, la deficiencia en BMP7 hace a los ratones BMP7^{+/-} más vulnerables al efecto neurotóxico de dicho fármaco (Chou y cols., 2008). Estos hallazgos son consistentes con la expresión reducida de BMP7 en el LCR de pacientes con enfermedad de Parkinson (Hossein-Nezhad y cols., 2016). En modelos de lesión traumática de la médula espinal la degeneración axonal y la cicatriz glial reducen el proceso de regeneración axonal ulterior. En este proceso se ha descrito una intensa sobreexpresión de BMP7, tanto en las células gliales como en las neuronas, que promueve su supervivencia (Setoguchi y cols., 2001). Además, la administración de BMP7 recombinante protege frente a la excitotoxicidad del glutamato y promueve la supervivencia de neuronas y células gliales de la zona lesionada (de Rivero Vaccari y cols., 2009).

La desregulación de BMPs se ha sugerido que tiene importantes repercusiones patológicas en enfermedades neurológicas y psiquiátricas y la señalización mediada por BMPs se ha postulado como diana terapéutica potencialmente interesante para dichas patologías (Kitterman y cols., 2012; Ordway y cols., 2012; Grinspan, 2015; Hossein-Nezhad y cols., 2016; Eixarch y cols., 2017).

La señalización BMP en el hipocampo se ha postulado que regula el comportamiento depresivo, y que la disminución de la señalización BMP puede ser necesaria para los efectos de algunos antidepresivos. Así, el tratamiento con fluoxetina reduce la señalización de BMP en el hipocampo del ratón adulto, como consecuencia de la disminución de los niveles de BMP4 y el aumento de la producción del inhibidor de BMPs noguina. La sobreexpresión de BMP4 en el hipocampo bloquea los efectos de la fluoxetina sobre la proliferación neuronal en el giro dentado y sobre el comportamiento depresivo. Por el contrario, noguina promueve efectos antidepresivo y ansiolítico asociados a un aumento de la neurogénesis en el hipocampo. La delección genética condicional del receptor de BMP tipo II en células progenitoras neurales promueve la

neurogénesis y atenúa las conductas de ansiedad y depresión (Brooker y cols., 2016).

El papel clave de las señales mediadas por BMPs en el desarrollo del hipocampo y de su nicho de células madre ha sido demostrado en ratones doblemente deficientes en BMPR1B (ALK6) y en BMPR1A (ALK3). Estos ratones en la edad adulta muestran un giro dentado pequeño y con escasas proyecciones hacia CA3, y un reducido nicho de células madre. La consecuencia funcional, desde un punto de vista conductual, es una menor sensibilidad de los ratones a los estímulos que provocan miedo o ansiedad (Caronia y cols., 2010). Ratones con deficiencia condicionada en receptores de BMP de tipo II (BMPRII), con localización selectiva en el hipocampo o en el prosencéfalo, mantienen la integridad cognitiva en términos de aprendizaje y memoria, pero muestran alteraciones severas en las conductas exploratorias y relacionadas con la ansiedad (McBrayer y cols., 2015).

En relación con BMP7, se ha demostrado su papel como mediador crítico de la diferenciación neuronal noradrenérgica durante el desarrollo, y sus efectos neurotróficos y neuroprotectores en las neuronas catecolaminérgicas maduras. Los pacientes con depresión mayor muestran niveles reducidos de expresión de BMP7 en los astrocitos del locus coeruleus, pero no en otras áreas cerebrales. Ratas sometidas a un modelo experimental de depresión (derrota social crónica) también muestran una reducción en la expresión génica de BMP7 en el locus coeruleus (Ordway y cols., 2012).

Objetivos

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico, causado por la lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial. Algunos individuos, tras la curación de una lesión nerviosa, desarrollan un cuadro doloroso persistente caracterizado por hiperalgesia, alodinia y dolor espontáneo, que se mantienen durante meses e incluso años y es altamente refractario a la terapia con analgésicos convencionales. El conocimiento de los complejos mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático es fundamental para la identificación de dianas apropiadas sobre las que sustentar nuevos abordajes etiológicos para el tratamiento del dolor crónico. Nuestro grupo se ha centrado en el estudio del papel de las citoquinas de la familia TGF- β y moduladores de su vía de señalización en la plasticidad patológica del sistema nervioso que sustenta el dolor neuropático en modelos experimentales en roedores. En esta Tesis Doctoral se analiza el papel desempeñado por un miembro de la familia de BMPs, como es BMP7, que en diversos estudios ha mostrado tener efectos neuroprotectores y neuroregeneradores.

El dolor crónico causa ansiedad en los pacientes que lo sufren al generar un sentimiento de impotencia y desesperación por el fracaso en el alivio del dolor y/o en su gestión emocional. La ansiedad generada cierra un círculo vicioso que, a su vez, produce más dolor. La mayoría de los estudios sustentan la idea de que ambas patologías se influyen mutuamente y se retroalimentan de forma paulatina. Sin embargo, la naturaleza de la asociación entre dolor y ansiedad, así como los mecanismos subyacentes que podrían explicar su conexión no han sido todavía bien caracterizados. En esta Tesis se analiza el papel de BMP7 en las conductas ansiosas no condicionadas de los ratones.

Nuestros objetivos específicos son:

1. Determinar la expresión de BMP7 y sus receptores de tipo I, ALK3 (BMPR1a) y ALK 6(BMPR1b), en áreas relevantes para la percepción dolorosa y la ansiedad del sistema nervioso.
2. Determinar en los ratones deficientes en BMP7 el fenotipo relacionado con el desarrollo de dolor crónico neuropático causado por la lesión del nervio ciático.

3. Evaluar si la deficiencia en BMP7 condiciona cambios en la respuesta antinociceptiva inducida por la morfina.
4. Analizar en animales BMP7^{+/-} y BMP7^{+/+} el efecto del ejercicio físico voluntario en el desarrollo de dolor neuropático.
5. Valorar la influencia sobre la respuesta nociceptiva del ejercicio y la proteína BMP7 recombinante en animales sometidos a dolor crónico neuropático.
6. Estudiar en los ratones deficientes en BMP7 el fenotipo relacionado con la sensibilidad nociceptiva frente a estímulos dolorosos agudos de tipo químico/inflamatorio.
7. Determinar en los ratones deficientes en BMP7 el fenotipo relacionado con el desarrollo de dolor crónico neoplásico.
8. Evaluar si la deficiencia en BMP7 condiciona cambios en la actividad general, la coordinación motora y la ansiedad.

Material y métodos

1. Animales de experimentación

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para el cuidado y uso de Animales de Experimentación de la Universidad de Cantabria y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea (86/609/CEE).

Los sujetos de estudio fueron ratones C57BL/6 y ratones deficientes de BMP7 (BMP7^{+/-}) con un fondo genético C57BL/6 cedidos por la Dra. Elisabeth J. Robertson (Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, USA). Estos animales fueron generados mediante recombinación homóloga. Se eliminaron 263 bases del primer exón codificante que contienen el sitio de comienzo de la traducción de BMP7, y se sustituyeron por el gen reportero LacZ. El nivel de expresión de la proteína BMP7 en estos ratones es aproximadamente el 50% de los niveles detectados en el ratón silvestre (Godin y cols., 1998).

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en machos con una edad comprendida entre los 3 y los 4 meses. Los animales fueron mantenidos en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria, en jaulas transparentes de Plexiglas® (20 cm x 22 cm x 20 cm) en grupos de 3 animales y en condiciones estándar de laboratorio; temperatura ambiente de 22±1°C, humedad relativa del 60-70% y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas invertido (oscuridad de 8:00_{AM}-8:00_{PM}), de modo que los estudios conductuales de nocicepción y de ansiedad se llevaron a cabo durante el periodo activo de los ratones (de 8:00_{AM} a 14:00_{AM}). La comida y el agua fueron suministradas *ad libitum*.

1.1. Caracterización genotípica de los ratones BMP7^{+/-}

Los ratones portadores de un alelo deficiente en BMP7, procedentes de los cruces C57BL/6 y BMP7^{+/-}, se identificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *polimerase chain reaction*), a partir de DNA genómico extraído de un fragmento del extremo distal de la cola del ratón (2-3 mm) en el momento del destete de los animales (a los 21 días). Para la obtención de DNA genómico, se incubó el fragmento de la cola en 300 µl de NaOH 50mM durante 30 minutos a 98°C y se agita con un vórtex, repitiéndose el proceso hasta que

el tejido se digiere completamente. Posteriormente, se añaden 30µl de solución Tris 1M pH 8, agitándolo de nuevo con el vórtex. Finalmente, las muestras se centrifugan a 13.500 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga de mesa (5415R, Eppendorf Ibérica) y se recoge el sobrenadante, que contiene el DNA.

La concentración y pureza del DNA se determinan por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm de longitud de onda en un Nanodrop 1000 (ThermoScientific Inc.). Para determinar la pureza se valora la relación existente entre las absorbancias medidas a 260 nm (absorción por ácidos nucleicos) y a 280 nm (absorción por proteínas). El índice A_{260} / A_{280} debe estar en el rango 1,8 - 2,0 para garantizar la pureza, siendo mayor la concentración de DNA cuanto más próximo esté a 1,8; y mayor concentración de RNA cuanto más próximo esté de 2,0. Todas las muestras usadas en este estudio estuvieron dentro de este rango. Se emplearon 2 µl de DNA por reacción en un volumen final de 25 µl, y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0,02 U de Biotaq DNA pol (Bioline), 2mM de MgCL₂ (Bioline), 0,2ml dNTPs (Bioline) y 1mM de cada uno de los cuatro cebadores, diseñados para amplificar los siguientes fragmentos de BMP7 y LacZ:

BMP7-1(*forward*): 5'-GCCCGGGCCAGAACTGAGTAAA-3'

BMP7-2(*reverse*): 5'-CGTCCACGACCCGAGGTCACCTT-3'

Lac-Z-1(*forward*): 5'-CCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC-3'

Lac-Z-2(*reverse*): 5'-CGGATTGACCGTAATGGGATAG-3'

Las muestras se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 94°C-3'; 40 ciclos (95°C-30"; 58°C-30"; 72°C-30"); 72°C-10', dejándose posteriormente a 4°C en el Termociclador BioRad® / MyCycler™. Seguidamente, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% diluida en TBE 0,5% que contiene un volumen 1:20.000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (RedSafe, Intron, Biotechnology®) en presencia de un marcador de peso molecular (HyperLadder I, Bioline®). Al someter al gel a radiación ultravioleta (UV) en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc, BioRad®), en los ratones BMP7^{+/+} se observa una sola banda de 7 Kb que corresponde a la

región del gen de BMP7, mientras que en los heterocigotos se observan dos bandas: una de 7 Kb y otra de 3,5 Kb que corresponde a LacZ.

2. Estudios conductuales

2.1. Nocicepción

2.1.1. Valoración de la respuesta nociceptiva a estímulos mecánicos: test de von Frey

Se colocaron los animales en compartimentos individualizados con suelo derejilla, donde la movilidad de los ratones quedaba reducida a movimientos sobre sí mismos. Tras un periodo de adaptación de 15 minutos en su nuevo habitáculo, se aplicaron a la superficie plantar de las patas traseras, una serie de monofilamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein von Frey AnesthesiometerforTouchAssessment, Stoelting Co, Illinois EEUU) graduados en una escala en función de la presión en gramos que producen. Se consideró como respuesta positiva, la sacudida, retirada o lamido de la pata. Se estimularon las patas 6 veces con cada uno de los monofilamentos y se valoró el porcentaje de respuestas positivas para cada fuerza aplicada en gramos. Inicialmente, se aplicaron estímulos con un monofilamento de fuerza intermedia y se continuó con monofilamentos de fuerza progresivamente descendente hasta que no se obtuvo respuesta.



Figura 10. Prueba de von Frey. Monofilamentos de von Frey y aparato. La imagen (A) presenta el grupo de monofilamentos de von Frey para evocar estímulos mecánicos en la superficie plantar de la pata trasera de los ratones. La imagen (B) muestra la posición que debe tener el pelo de von Frey para acceder a las patas traseras del animal en el suelo de rejilla desde la parte inferior de ésta.

Posteriormente, se aplicaron monofilamentos de fuerza progresivamente ascendente, partiendo del monofilamento consecutivo al inicial, hasta alcanzar un 100% de respuestas (Bonin y cols., 2014). El umbral nociceptivo se expresó como los gramos que evocaron el 50% de las respuestas de retirada de la pata trasera (3 respuestas positivas de 6 estímulos aplicados en la pata trasera)

Figura 10.

2.1.2. Valoración de la respuesta nociceptiva a estímulos químico-inflamatorio: test de la formalina

Para la valoración de la respuesta nociceptiva en un modelo de inflamación aguda se realizó el test químico/inflamatorio de la formalina (Dubuisson y Dennis, 1977; Tjølsen y cols., 1992). Se realizó la inyección subcutánea de 20 µl de formalina (2% formaldehído en H₂O destilada) en la superficie plantar de la pata trasera izquierda y se introduce al animal en una caja de metacrilato (25 cm x 20 cm x 16 cm). Se valoraron como conductas nocifensivas el tiempo y el número de lamidos de la pata. Es una prueba que produce una respuesta bifásica. La primera fase de la prueba se inicia inmediatamente después de la inyección, dura entre 3-5 minutos y refleja dolor nociceptivo (periférico) provocado por la irritación química directa de la formalina y está mediada por la actividad de las fibras C. La segunda fase se produce tras un periodo de latencia de 10-15 minutos, dura entre 30-40 minutos y refleja el proceso inflamatorio local con sensibilización central tras la liberación de sustancias algógenas y la puesta en marcha de mecanismos a nivel medular inducidos en la primera fase (Shields y cols., 2010).

2.1.3. Valoración del desarrollo de alodinia mecánica en un modelo de dolor crónico neuropático provocado por la lesión del nervio ciático

El modelo de neuropatía elegido para evocar dolor neuropático en los animales fue el del aplastamiento del nervio ciático. (Bester y cols., 2000; Tramullas y cols., 2010). Bajo anestesia inhalatoria con isoflurano (Forane®, 1l/min al 2-2,5%), se realizó una incisión cutánea de 5-7 mm, en la zona lateral externa de la pata trasera izquierda, paralela al fémur. Se seccionó el músculo bíceps femoral, exponiendo el nervio ciático a la altura de su trifurcación en sus ramas terminales: sural, tibial y peroneal. **Figura 11.** Se aplastó, con un

portagujas de superficie lisa, una sección de 2 mm del nervio ciático en la zona más próxima a su trifurcación durante 7 segundos. Una vez realizada la lesión nerviosa, se suturó la piel con Vicryl de 3/0 (Vicryl, Ethicon® Johnson & Johnson). En un grupo de animales control (sham) se realizó el mismo proceso quirúrgico de exposición del nervio ciático y sus tres ramas, pero no se provocó lesión nerviosa. Los animales que desarrollaron neuropatía presentaron hiperalgesia y alodinia a estímulos mecánicos en la zona plantar de la pata ipsilateral en forma de mosaico. Se valoró mediante el estímulo con monofilamentos de vonFrey el grado de hiperalgesia y alodinia mecánica desarrolladas. Se realizó la valoración el día antes de la intervención (basal) y los días 5º, 7º, 9º y 14º posteriores a la intervención hasta su sacrificio. La neuropatía se hizo evidente 5-7 días tras la cirugía. No se observaron conductas de autotomía dedos o uñas.

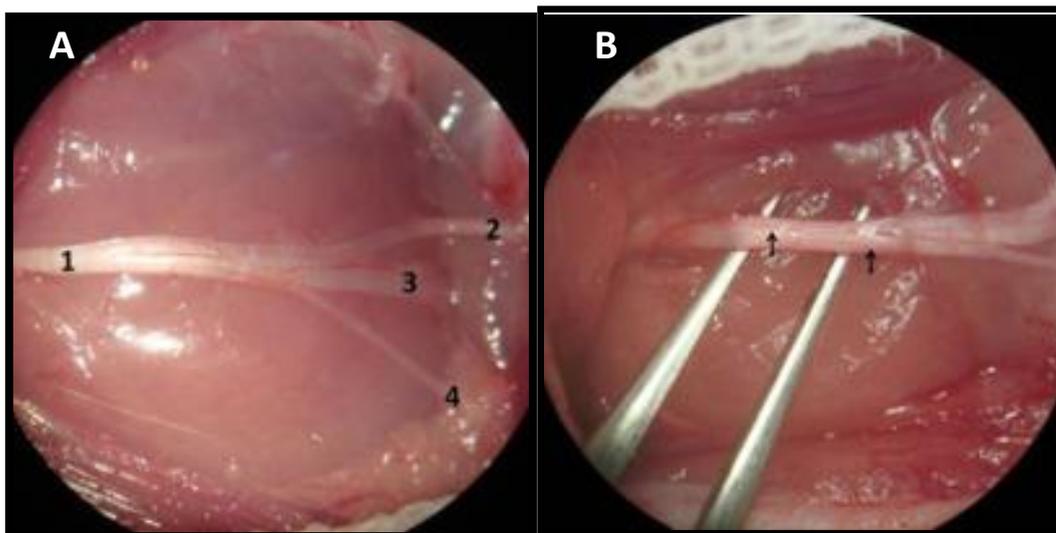


Figura 11. Nervio ciático con sus ramas: distales: La imagen(A) muestra el nervio ciático procedente de las ramas L4, L5, S1, S2 y S3 de la zona lumbo-sacra de la médula espinal. Se muestra descendiente (1) hacia su trifurcación periférica que consta del nervio peroneal (2), tibial(3) y sural (4). La imagen (B) señala entre ambas flechas la zona exacta de la lesión nerviosa por aplastamiento, ubicado inmediatamente antes de la ramificación de los nervios de la rama procedente del nervio ciático. La neuropatía se desarrolló en la primera semana y se manifestó a los 5-7 días tras la cirugía descrita, destacando el día 13º-14º como el punto álgido de hiperalgesia y alodinia. No se observaron conductas de autotomía de dedos o uñas. Imagen tomada de (Bustamante, 2015).

2.1.4. Valoración del desarrollo de alodinia en un modelo de dolor crónico provocado por un tumor óseo

Bajo anestesia con isoflurano (Forane®, 1l/min al 2-2,5 %), se realizó una incisión cutánea de 2 mm en la zona de la meseta tibial de la pata izquierda. Se inoculó en la cavidad medular de la tibia con 5 µl de una suspensión de 10⁵ células tumorales de la línea celular B16-F10 derivada de melanoma en PBS (Curto-Reyes y cols., 2008; Llorián-Salvador y cols., 2015) cedidas por la Profesora Ana Baamonde (Laboratorio de Farmacología, Facultad de Medicina, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Universidad de Oviedo). Una vez realizada la inoculación, se selló la tibia con pegamento acrílico (Hystoacril®, Braum) y se suturó la piel con Vicryl de 3/0 (Vicryl, Ethicon® Johnson & Johnson).

Se valoró mediante el estímulo con monofilamentos de von Frey el grado de alodinia mecánica desarrollada. Se realizó la valoración el día antes de la intervención (basal) y el día 7º tras la inoculación, cuando la neuropatía se hizo evidente.

2.1.5. Valoración del ejercicio diario en el desarrollo de la neuropatía

Se introduce a los animales en jaulas individuales transparentes de Plexiglas® (52 cm x 28 cm x 15 cm) que contenían una rueda giratoria (6 cm de radio) ubicada en el lateral y conectada a un reloj. Se valoró el tiempo y la distancia recorrida diariamente en su periodo activo (8:00_{AM}-8:00_{PM}) durante cinco días previos a la lesión del nerviosa (habitación) y dos semanas tras la lesión, momento más álgido del desarrollo de la neuropatía. Un grupo de animales (sedentarios) fueron mantenidos individualmente en jaulas (20 cm x 22 cm x 20 cm) sin la rueda giratoria. **Figura12.**



Figura 12. Jaula con rueda conectada a un cronómetro para la valoración del ejercicio diario en el grupo de ratones corredores. La imagen muestra una jaula con la rueda en el interior y su conexión lateral a un cronómetro para el registro de los datos durante el ensayo.

2.2. Coordinación motora: Rotarod

Esta prueba se realizó para evaluar la coordinación motora de los animales siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Cuéy cols., (2013) modificado de Sango y cols.(1995). Se utilizó un Rotarod (UgoBasile, Comerio, VA, Italia) **Figura 13**. Que consta de un rodillo de plástico de 37 cm de longitud, con una superficie estriada para facilitar el agarre, dividido por 6 discos de plástico de 12 cm de diámetro que separan la barra en 5 compartimentos y que permite medir la ejecución de 5 animales a la vez. Este aparato gira a distintas velocidades y contiene 5 contadores individuales que se detienen cuando el animal cae del rodillo.

Se realizaron 4 ensayos en una única sesión. El primer ensayo consistió en un entrenamiento en el cual el animal se debía mantener sobre el rodillo durante 60 segundos a una velocidad de 5 revoluciones por minuto (r.p.m.). Si el animal caía antes de completar este tiempo se volvía a colocar en el aparato hasta que se mantenía en el rodillo los 60 segundos. A continuación, se realizaron otros dos ensayos a velocidades de 25 y 50 r.p.m. respectivamente. El tiempo máximo de permanencia fue de 60 segundos. El último ensayo consistió en un ciclo único de aceleración en el cual el rodillo iba girando a velocidad progresivamente superior (máximo de 50 r.p.m.), de tal manera que

el animal tenía que adaptarse a la creciente exigencia de la prueba. El tiempo máximo de permanencia permitido era de 300 segundos (coincidiendo con el momento en el que alcanzaba la velocidad máxima).

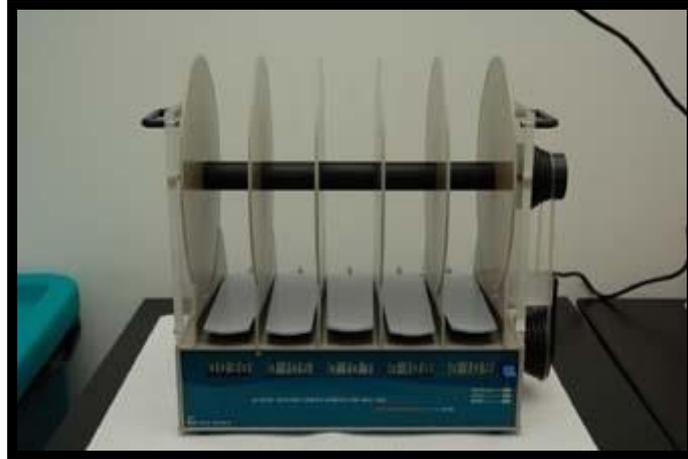


Figura 13. Prueba de coordinación motora: Rotarod (modelo UgoBasile).

2.3. Ansiedad

2.3.1. Actividad motora y ansiedad: Campo abierto

Para estudiar la actividad general y la ansiedad en la prueba de campo abierto se siguió el procedimiento descrito por Escorihuela y cols., (1995). El aparato consiste en una superficie cuadrada de 55 cm de lado rodeada de paredes de 25 cm de altura y pintada de blanco. El suelo está dividido en 25 cuadrados de 11 cm de lado. La superficie del aparato se iluminó con dos fuentes de luz colocadas a ambos lados de la caja, con una intensidad de 540 luxes (Luxómetro Vellman-DVM1300-Lux Light Meter), para someter al animal a una situación estresante. **Figura 14.**

En una única sesión de 5 minutos se midieron la actividad horizontal (distancia recorrida en el centro y en la periferia, tiempo de permanencia en ambas zonas y velocidad del animal durante la prueba) y la actividad vertical (alzamientos o número de veces que el ratón se endereza y apoya su cuerpo sobre sus patas traseras). Todos los ensayos fueron grabados en video y posteriormente analizados con el programa de análisis de imagen Anymaze (ANY-maze®, Stoelting CO, USA).

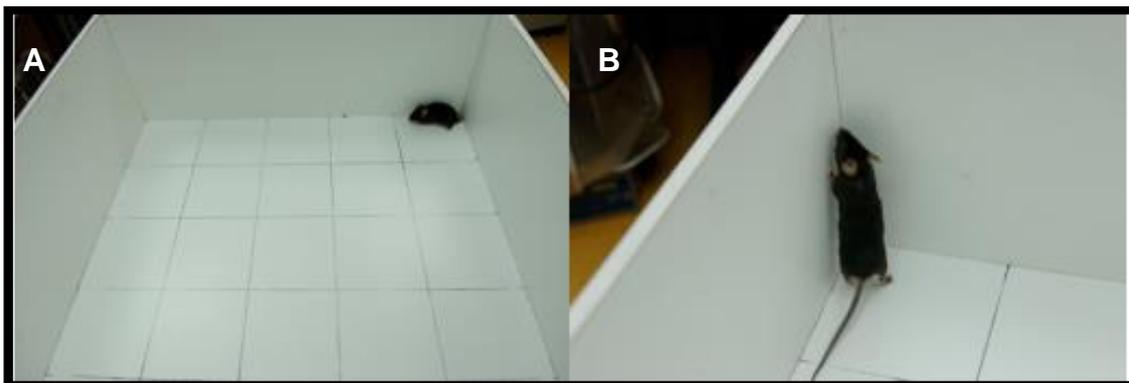


Figura 14. Prueba del campo abierto. (A) La imagen muestra un ratón deambulando por la periferia y (B) realizando un alzamiento.

2.3.2. Laberinto elevado en cruz

Para valorar diferentes aspectos relacionados con la ansiedad, se utilizó la prueba del laberinto elevado en cruz siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Cué y cols. (2005). Esta prueba permite evaluar la ansiedad/miedo en respuesta a estímulos naturales como son los espacios nuevos y abiertos, o la deambulación sobre una superficie angosta y elevada.

El aparato está formado por dos brazos abiertos (5cm de ancho x 30 cm de largo cada uno) y dos brazos cerrados cubiertos con dos láminas de metacrilato oscuras a cada lado (5 cm de ancho x 30 cm de largo) elevados 40 cm sobre el suelo. Se realiza un único ensayo de 5 minutos en el que se coloca al ratón en el centro del aparato (**Figura 15**) y se le deja deambular libremente. Se analizaron la distancia total recorrida, el número de entradas (con las cuatro patas) y el tiempo de permanecía en brazos abiertos y en brazos cerrados. Además, se analizaron las conductas de evaluación de riesgo de los animales, reflejada por número de alzamientos, conductas de aproximación-retirada desde las zonas protegidas del aparato (stretchings) y número de veces que asomaban la cabeza en los brazos abiertos (head-dippings). Todos los ensayos fueron grabados en video y posteriormente analizados con el programa de análisis de imagen Anymaze (ANY-maze[®], Stoelting CO, USA).



Figura 15. Prueba del laberinto elevado en cruz. En la imagen **(A)** se observa un ratón realizando un asomo (head-dipping), **(B)** entrando en uno de los brazos abiertos y en la imagen **(C)** está realizando una conducta de aproximación-retirada (head-dipping).

2.3.3. Caja clara-oscuro

Esta prueba permite valorar la aversión innata de los ratones a los lugares espléndidamente iluminados y el comportamiento espontáneo o tendencia a explorar ambientes nuevos (Crawley & Goodwin, 1980). El aparato consiste en una caja (40 cm x 40 cm x 35 cm) dividida en dos compartimentos de igual tamaño conectados por una puerta, uno oscuro con paredes de metacrilato negro opaco y otro claro con paredes de metacrilato transparente. El compartimento claro del aparato se iluminó con un foco de luz intensa (540 luxes, Luxómetro Vellman DVM1300-Lux Light Meter) situado a 55cm de altura del suelo del aparato (**Figura 16**). Se realizó un único ensayo de 10 minutos. Se colocó el ratón en el compartimento claro, próximo a la puerta de entrada al compartimento oscuro, pero de espaldas a ella. Se cuantificó la latencia de la primera transición, el tiempo total pasado en cada compartimento y el número total de transiciones entre los dos compartimentos. Como criterio se consideró que la entrada en cada compartimento de la caja se debía producir con las 4 patas.

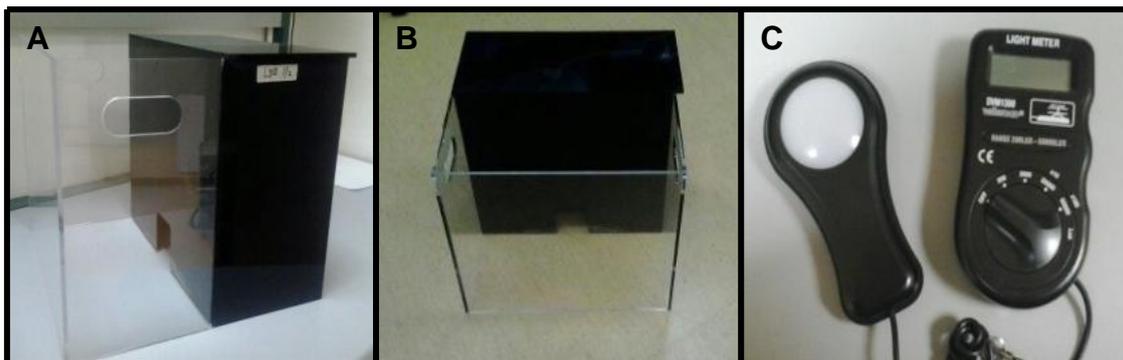


Figura 16. (A y B) Prueba de la caja clara/oscura. (C) Luxómetro (Vellman-DVM1300-Lux Light Meter ©).

3. Tratamientos farmacológicos

3.1. Agonista opioide: Morfina

Se administraron dosis acumulativas de morfina (1, 3, 6 y 10 mg/kg, vía i.p.) de forma aguda en ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-}, a la 4^a semana tras la lesión del nervio ciático, cuando todos los animales presentaban el mismo grado de alodinia e hiperalgesia mecánica. La valoración de las respuestas nocifensivas a la estimulación con monofilamentos de von Frey se realizaron 30 minutos después de la inyección de cada dosis de morfina.

3.2. BMP7 recombinante

Se valoró el efecto de la proteína BMP7 recombinante mouse (R&D Systems, Minneapolis, USA) sobre el desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica en animales BMP7^{+/+} sometidos a lesión del nervio ciático. La proteína recombinante, disuelta a una concentración de 25 µg/ml en CIH 4mM + 2mg/ml de albúmina bovina 0,1%, se administró mediante una minibomba osmótica a nivel subcutáneo, que dispensa el producto a una velocidad constante de 0,25µl/hora durante 14 días (Alzet® model 1002). El tratamiento se inició en el momento en el que se practicó la lesión del nervio ciático.

4. Extracción de tejidos y procesado de las muestras

Para la extracción y procesado de tejidos destinados a la realización de los estudios de biología molecular (cuantificación de genes y proteínas) los animales se decapitaron bajo anestesia con isoflurano (Forane® 1 -1,5%). Se

extrajeron los cerebros y se disecaron las cortezas e hipotálamos sobre hielo. Se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización. Las médulas espinales se extrajeron mediante hidroextrusión. Tras la decapitación del animal, se realizó un corte transversal de la columna vertebral a la altura de las caderas; posteriormente, a través del orificio distal del canal vertebral se conectó una jeringa con suero fisiológico (0.9 % NaCl) y se ejerció presión hasta que la médula espinal salió por el orificio proximal. A continuación, se diseccionó por la línea media para separar las dos hemi médulas (derecha e izquierda) y se obtuvieron las porciones dorsales de la región lumbar. Posteriormente, las muestras se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Para la extracción y procesamiento de cerebro y ganglios dorsales destinados a la realización de los estudios histológicos los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). Comprobada la ausencia de signos reflejos, se procedió a la perfusión por vía intracardiaca para fijar los tejidos. Se realizó una incisión en forma de Y en la piel a nivel torácico, desde la pared abdominal hasta el esternón, cortando posteriormente el diafragma y exponiendo el corazón. A continuación, se introdujo un catéter por el vértice del ventrículo izquierdo para canalizar la entrada de las soluciones de perfusión. Se realizó un corte en el ventrículo derecho para crear un circuito abierto que permite el vaciado del animal, tanto de sangre como de las soluciones de fijación. Para impulsar las soluciones de fijación se utilizó una bomba de perfusión (Ismatec) a un flujo constante de 4-5 ml/minuto. En primer lugar, se hizo pasar un total de 50-100ml de solución salina (0.9 % NaCl) con el fin de eliminar la sangre. A continuación, se procedió a perfundir el ratón con un volumen de 50-100 ml de paraformaldehído (PFA) preparado fresco al 4% en PBS. Una vez perfundidos, se decapitaron y se extrajeron los cerebros y los ganglios dorsales, estos últimos mediante disección de la musculatura hasta alcanzar la columna vertebral, y posterior fractura de las apófisis transversas. Los tejidos se postfijaron en una solución PFA al 4% en PBS durante 2h (ganglios) a temperatura ambiente en agitación o 24 h (cerebros) a 4°C en agitación.

Las médulas espinales se fijaron enteras en PFA preparado fresco al 4 % en PBS, durante 24h a temperatura ambiente, en agitación. Una vez fijado, el tejido fue lavado con PBS. A continuación, se realizaron cortes transversales a nivel lumbar, de 100 µm de espesor, mediante vibratomo (Leica).

4.1. Estudios histológicos

4.1.1. Hibridación *in situ*

Para las hibridaciones *in situ*, se utilizaron ribosondas de los genes de ALK-3(BMP1A) y ALK-6 (BMP1B) marcadas con digoxigenina, proporcionadas por el Dr. Juan Hurlé (Dpto. de Anatomía y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria).

En una placa de cultivos multipocillo (Costar 3512) se introducen dos o tres cortes de médula espinal o cortes de cerebro por pocillo, procediendo a tres lavados de 5 minutos en PBS-T (0,1% Tween20 en PBS 1X). A continuación, se blanquean los cortes con H₂O₂ al 6% en PBS-T, durante 1 hora en oscuridad y se realizan tres lavados de 5 minutos en PBS-T. Los cortes se tratan con 10µg/ml de proteinasa K (Roche 745723) durante 20 minutos, bloqueándose a continuación la reacción mediante glicina 2 mg/ml en PBS-T. Después de dos lavados en PBS-T, los cortes son fijados con una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,2% en PBS. Una vez lavados con PBS-T, los tejidos se incuban con solución de hibridación a 65°C, durante 1 hora. A continuación, se añaden 300µl por pocillo de sonda al 0,05% en solución de hibridación, previamente desnaturalizada durante 2 minutos a 80°C, y se dejan 24 horas a 65°C en un horno de hibridación. Al día siguiente, se retira la sonda y se realizan 2 lavados de 1 hora en solución I a 65-67°C. **Tabla C.**

Tabla B. Composición de las soluciones I, II y III para el proceso de hibridación.

Solución I	Solución II	Solución III
------------	-------------	--------------

- Formamida 50%	- NaCl 0,5M	- Formamida 50%
- SSC 20%, pH 4,5	- Tris 0,01M, pH 7,5	- SSC 10%, pH: 4,5
- SDS: 0,01%	- Tween-20 al 0,1%	

Posteriormente, se pasan los cortes a un baño compuesto por un 50% de solución I y un 50% de solución II a 70 °C, y, por último, se realizan tres pases de 10 minutos por la solución II a temperatura ambiente. Se hace un lavado de 1 hora en solución II a 37 °C y un segundo lavado de 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, hacemos un pase de 10 minutos por la solución III, y posteriormente se dejan las muestras en solución III a 65 °C durante 30 minutos. Realizamos tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST con levamisol 2 mM, a temperatura ambiente y bloqueamos las uniones inespecíficas de los tejidos con suero de cordero al 10% en TBST (TBS +Tween 20 al 0,05%) con levamisol 2 mM, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Incubamos las muestras con el anticuerpo anti-digoxigenina (1:2.000; Roche) en TBST con levamisol 2 mM, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se hacen 7-10 lavados de 30 minutos cada uno con TBST con levamisol 2 mM. Posteriormente, se realizan 2 pases de 15 minutos por NTMT a temperatura ambiente (Tabla C) y se añade el revelador (Roche), manteniendo los cortes en oscuridad hasta que se detecte señal. El proceso se detiene haciendo lavados con NTMT. Finalmente, se procede a lavar los tejidos con PBS teniendo cuidado de que no se formen cristales. Los tejidos se colocan en un portaobjetos y se les añade un medio de montaje formado por glicerina al 50% en PBS. Las imágenes se obtienen mediante estéreo microscopio con cámara digital acoplada (Zeiss KL1500).

Tabla C. Solución NTMT de lavados para detener el proceso antes del revelado.

Solución NTMT
-TrisHCl 0,1M pH 9.5
- MgCl ₂ 0,05M
- NaCl 0,1M
- Tween 20 0,1%

4.1.2. Inmunofluorescencia

Para la localización celular de los receptores ALK-3 (BMPR1A) y ALK-6 (BMPR1B) se realizaron disociados celulares (Lafarga y cols., 1991; Pena y cols., 2001) de los ganglios dorsales fijados por perfusión intracardiaca con PFA al 4% en PBS. Se colocó sobre un portaobjetos (Superfrostplus®) un pequeño fragmento de ganglio dorsal obtenido por micro disección bajo microscopio. Sobre la muestra se añadieron 7µl de PBS y se cubrió con un cubreobjetos de 18 x 18mm. Con una aguja histológica, se percutió sobre el cubre de forma suave y continua, con el fin de disgregar mecánicamente el tejido. Se controló el grado de disociación neuronal mediante observación microscópica de la muestra en un microscopio de contraste de fases. Este paso previo de comprobación es importante para verificar que las neuronas se separaron de manera individualizada del resto del tejido; células, fibras y materia extracelular que conforman el ganglio dorsal. Tras una disociación neuronal óptima, se congela el portaobjetos en nieve carbónica durante 10 minutos para facilitar la retirada del cubreobjetos con una hoja de bisturí evitando que el soma neuronal se quede adherido a él. Se delimita la zona de neuronas disociadas con lápiz de diamante y seguidamente se lava en etanol al 96% durante 7 minutos a 4°C para estabilizar la muestra. A continuación, se rehidrataron las muestras con alcoholes de concentraciones decrecientes y se conservaron en PBS hasta que el momento de su uso.

Estos disociados neuronales obtenidos se lavaron en PBS y se permeabilizaron con glicina 0,1M durante 20 minutos en agitación suave. Se lavan las preparaciones en Tween 20 al 0,05% en PBS durante 10 minutos en agitación. Lavamos la muestra con PBS (x 3 lavados) y lo secamos manualmente para retirar el exceso de humedad. Se incubaron con 7 µl de anticuerpo primario diluido en BSA al 1% en PBS en cámara húmeda, durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario utilizado fue el anticuerpo monoclonal de ratón BMPR-1A (E-16) y BMPR-1B (N-17) (1:100, Sta. Cruz Biotechnology, INC.). Y el anticuerpo policlonal anti-goat IgG-TR- (SC2783). Seguidamente se realizaron 3 lavados en Tween 20 al 0,05% en PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (FITC), y con Texas red (TxRd) durante 60 minutos en cámara

húmeda y oscura a temperatura ambiente. Para el marcaje de núcleos celulares, las preparaciones se tiñeron con DAPI (0,5µg/µl en PBS) durante 10-15 minutos. Los disociados neuronales se visualizaron en un microscopio laser confocal (Zeiss LSM510) con los objetivos de Plan-Neofluar 4X, 10X, 20X o Plan-Apochromat63X y usando el láser de argón (488nm) y el láser de HeNe (543nm) según necesidad, para la excitación de los fluoróforos FITC® y TxRd®. La digitalización de las imágenes se realizó usando el software LSM5 ImageExaminer.

4.2. Estudios neuroquímicos

4.2.1. Estudios de expresión génica mediante PCR Cuantitativa

4.2.1.1. Extracción de RNA

Se extrajo el ARN total de las diferentes muestras de médula espinal hipotálamo utilizando Trizol (TRI Reagent®, Sigma). Para ello, se añadieron 500 µl de Trizol para pesos de tejido de hasta 50 mg y 1 ml para cantidades entre 50 mg y 100 mg. Las muestras se homogeneizaron con el Trizol en un politrón, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugaron en centrífuga (5415R, Eppendorf Ibérica) a 12.000 r.p.m durante 10 minutos, a 4° C. Se recogió el sobrenadante y se transvasó a un tubo estéril, aclarado previamente con agua DEPC para eliminar las RNAasas. Al sobrenadante recogido se le añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol®. Se agitó la mezcla, y se incubó durante 3 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron nuevamente a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4° C. Se recogió la fase acuosa del sobrenadante, que contiene el ARN y se despreció la fase orgánica. Es necesario ser muy cuidadoso en esta separación para evitar la contaminación del ARN con proteínas. La fase acuosa se recogió en un tubo estéril, lavado previamente con agua DEPC, y se añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol añadido. Se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron de nuevo a 12.000 r.p.m durante 10 minutos, a 4° C. Se recogió el pellet que contiene el ARN, eliminándose todo el isopropanol posible, con cuidado de no perder el pellet. Se añadió 1 mililitro de etanol al 75% v/v en agua DEPC y se volteó para arrastrar los restos de isopropanol que pudieran quedar en el pellet. Se centrifugaron las muestras a

7.500 r.p.m. durante 5 minutos, a 4° C. Se eliminó el etanol por decantación y evaporación. Se resuspendieron las muestras en 20 o 30 µl de agua DEPC, en función del peso de muestra inicial y del tamaño del pellet obtenido. Las muestras se incubaron a 50° C durante 5 minutos y se almacenaron a -80° C hasta su posterior uso. Para determinar la concentración y pureza del ARN, se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, ThermoScientificInc).

4.2.1.2. Transcripción inversa de ARN (RT)

La reacción de la transcripción inversa del RNA (RT-PCR) es el método por el cual se obtienen las cadenas de DNA complementario (DNAc) a partir del RNA extraído. Para la transcripción inversa del RNA se utilizó un kit comercial de RT-PCR (Revert-aidTMMinusFirstStrandcDNASynthesis kit, Fermentas®). Para la reacción se usó 1 µg de RNA al que se añadió 1 µl de cebadores genéricos y la cantidad de H₂O DEPC necesaria para alcanzar 12 µl. Esta primera mezcla se incubó a 70° C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 4 µl de tampón de reacción (5X), 1 µl de enzima inhibidora de RNAasas (RibolockRibonucleasInhibitor) y 2 µl de una solución 10 mM de desoxinucleótidostrifosfato (dNTPs). La mezcla se incubó 5 min. a temperatura ambiente y se añadió 1 µl de la enzima transcriptasa inversa, responsable del proceso de retrotranscripción. Una vez completados estos pasos, las muestras se introdujeron en un termociclador (MyCyclerBioRadLaboratoriesInc) programando las siguientes condiciones de reacción: 10 min a 25° C; 60 min a 42° C; 10 min a 70° C; un último ciclo para el mantenimiento de las muestras a 4° C. El ADNc obtenido se conservó a -20° C hasta su utilización.

4.2.1.3. PCR cuantitativa

Los niveles de expresión de genes se determinaron mediante PCR. Se cuantificaron los niveles de expresión de génica de BMP7 y la expresión se normalizó utilizando como gen de referencia el que codifica la subunidad ribosomal 18S. Se utilizaron sondas comerciales TaqMan® (BMP7: Mm00432102-m1; AppliedBiosystems, LifeTechnologies) junto con el reactivo que contiene Mg²⁺ y nucleótidos (Premix Ex TaqTMPerfect Real Time, TakaraBio Inc.). Las amplificaciones se hicieron en un termociclador para PCR cuantitativa a tiempo real (Stratagen MX3000P; AgilentTechnologies; Loveland, USA). La reacción se llevó a cabo por duplicado, en un volumen de 10 µl que

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

a) un primer segmento compuesto de un ciclo:

I. 2 minutos a 50°C

II. 10 minutos a 95°C

b) Un segundo segmento, compuesto de 40 ciclos:

I. 15 segundos a 95°C para desnaturalización del ADNc.

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

Los niveles de expresión se determinan por duplicado en tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como $2^{(Ct \text{ de referencia} - Ct \text{ problema})}$, siendo Ct el ciclo umbral. Posteriormente todos los valores obtenidos se multiplican por 10^6 para un mejor manejo de los datos. Los valores se expresan como la media \pm EEM (error estándar de la media) de las expresiones relativas obtenidas en los diferentes experimentos.

4.2.2. Inmunodetección de proteínas mediante western blot

Para la extracción de proteínas de los diferentes tejidos se añadieron 300 µl de tampón de lisis con detergentes (HEPES 100mM, KCL 100 mM, MgCl 1,5 mM, IGEPAL 10%, deoxilato sódico 5%, SDS 1%, Chaps 25mM) con una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich), por cada 20-40 mg de tejido. Se trituraron con un politrón las muestras hasta deshacer el tejido, y se calentaron a 110° C en baño seco durante 10 minutos, a continuación, se

pasaron a hielo para su enfriamiento. Posteriormente, las muestras se sonicaron a máxima potencia durante 5 segundos y se centrifugaron a 12.000 r.p.m durante 5 minutos, a 4° C. Se recogió el sobrenadante y se dejó en hielo. Finalmente, se midió la concentración de proteínas utilizando el método de Lowry (Sengupta & Chattopadhyay, 1993) en el espectrofotómetro (Multiskan ex, ThermoScientific) a una longitud de onda de 620nm, utilizando una curva patrón de albúmina. Las muestras se conservaron a -20° C hasta su uso. Para la electroforesis de las proteínas, se partió de 50µg de proteína total, al que se añadieron 2 µl de tampón de carga (2X), y PBS-SDS (1X), hasta un volumen final de 10 µl. Se calentaron las muestras a 90° C durante 5 min, y se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 90 s. La electroforesis de las proteínas se realizó en geles de acrilamida al 10%, aunque la concentración se puede variar, en función del peso molecular de la proteína a detectar. Su composición fue según protocolo (**Tabla D**).

Tabla D. Composición de la membrana para Western blot.

Componentes	Gel de separación	Gel de apilamiento
Agua destilada	3,1 ml	1 ml
Acrilamida-bisacrilamida al 30%	2,4 ml	300 µl
Tampón de separación 4X	1,9 ml	----
Tampón de apilamiento 4X	----	445 µl
Persulfato amónico al 10% (APS)	112 µl	28 µl
Temed	5 µl	5 µl

Se utilizó un marcador proteico estándar como referencia para los pesos moleculares, del cual se cargaron 8µl. Una vez cargadas las muestras, se sometieron a una corriente continua de 100V durante 15 min y 130V durante 90 minutos en tampón de migración. Para el proceso de electrotransferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF se preparó un “sándwich” compuesto por una sucesión de los siguientes elementos: esponja, papeles de filtro, membrana, gel, papeles de filtro y esponja. Esta estructura va dentro de un armazón de plástico. Este “sándwich”

se sumergió en una cubeta con tampón de transferencia y se sometió a una corriente continua de 100V durante 60 min, a 4°C. La eficacia de la transferencia se comprobó por tinción de la membrana con rojo Ponceau. Tras la electrotransferencia, la membrana se incubó durante 2 horas en una solución de bloqueo, compuesta por albúmina al 3% en tampón TBST (NaCl 5M, Tris pH 7,6 1M). De esta forma se evitan posibles uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana. A continuación, se retiró la membrana de la solución bloqueadora y se incubó con el anticuerpo primario durante 12 horas a 4°C y en agitación. Los anticuerpos primarios usados fueron: BMP7 Human Antibody Monoclonal Mouse IgG₁Clone#164313. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la membrana en TBST (3 x 10 min) y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia durante una hora, en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se lavó en TBST (3 x 10 min). La detección y revelado de la inmunoreactividad se realizó mediante fluorescencia de infrarrojos con un equipo OdysseyImager (LI-COR Biosciences). La señal se cuantificó mediante densitometría óptica utilizando el programa Image J.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS (Chicago, Illinois) para Windows versión 22.0. Todas las gráficas se realizaron con el programa GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Inc., CA, USA). Los valores se expresaron como la media \pm EEM. Se utilizó el test de la t de Student para valorar las diferencias entre dos medias de variables continuas. Para la comparación de entre más de dos grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Los datos de los estudios conductuales de nocicepción se compararon mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido del test de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05.

Resultados

1. Localización de BMP7 y sus receptores en el sistema nervioso

1.1. BMP7 y sus receptores de tipo I se localizan en el sistema nervioso del ratón, en áreas relevantes para el control nociceptivo y de conductas ansiosas

En primer lugar, nuestros resultados pusieron de manifiesto la presencia de BMP7 en corteza cerebral, hipotálamo, médula espinal y ganglios dorsales de ratones silvestres mediante PCR cuantitativa (expresión génica) y western blot (expresión proteica) (**Figura 17A-B**). Además, hemos procedido a la localización en el SNC de los dominios de expresión de receptores de tipo I de BMPs, ALK3 (BMPR1A) y ALK6 (BMPR1B), mediante hibridación *in situ* con ribosondas específicas, en cortes de cerebro y médula espinal de ratones silvestres (**Figura 18A-B**). La especificidad de las hibridaciones se verificó mediante controles con ribosondas no específicas (sondas de ARN sentido). Se observaron señales de hibridación de ambos receptores en regiones como la corteza cingulada, retrosplenial, somatosensorial y piriforme, núcleos de la amígdala, áreas CA1, CA2 y CA3 y giro dentado del hipocampo, núcleos talámicos e hipotálamicos (núcleo arcuado), habénula medial, sustancia gris periacueductal y capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal.

La expresión de ALK3 y ALK6 en las neuronas sensitivas primarias de los ganglios de las raíces dorso-lumbares se determinó mediante inmunofluorescencia, utilizando preparaciones de neuronas y células gliales disociadas. Ambos receptores se localizaron en neuronas ganglionares (**Figura 18C-D**).

Mediante PCR cuantitativa y western blot confirmamos que los ratones heterocigotos para BMP7 (BMP7^{+/-}) muestran deficiencia de BMP7, tanto a nivel de ARNm (ganglio dorsal: $t=2,47$, $p<0,05$; asta dorsal: $t=4,19$, $p<0,01$) como de proteína.

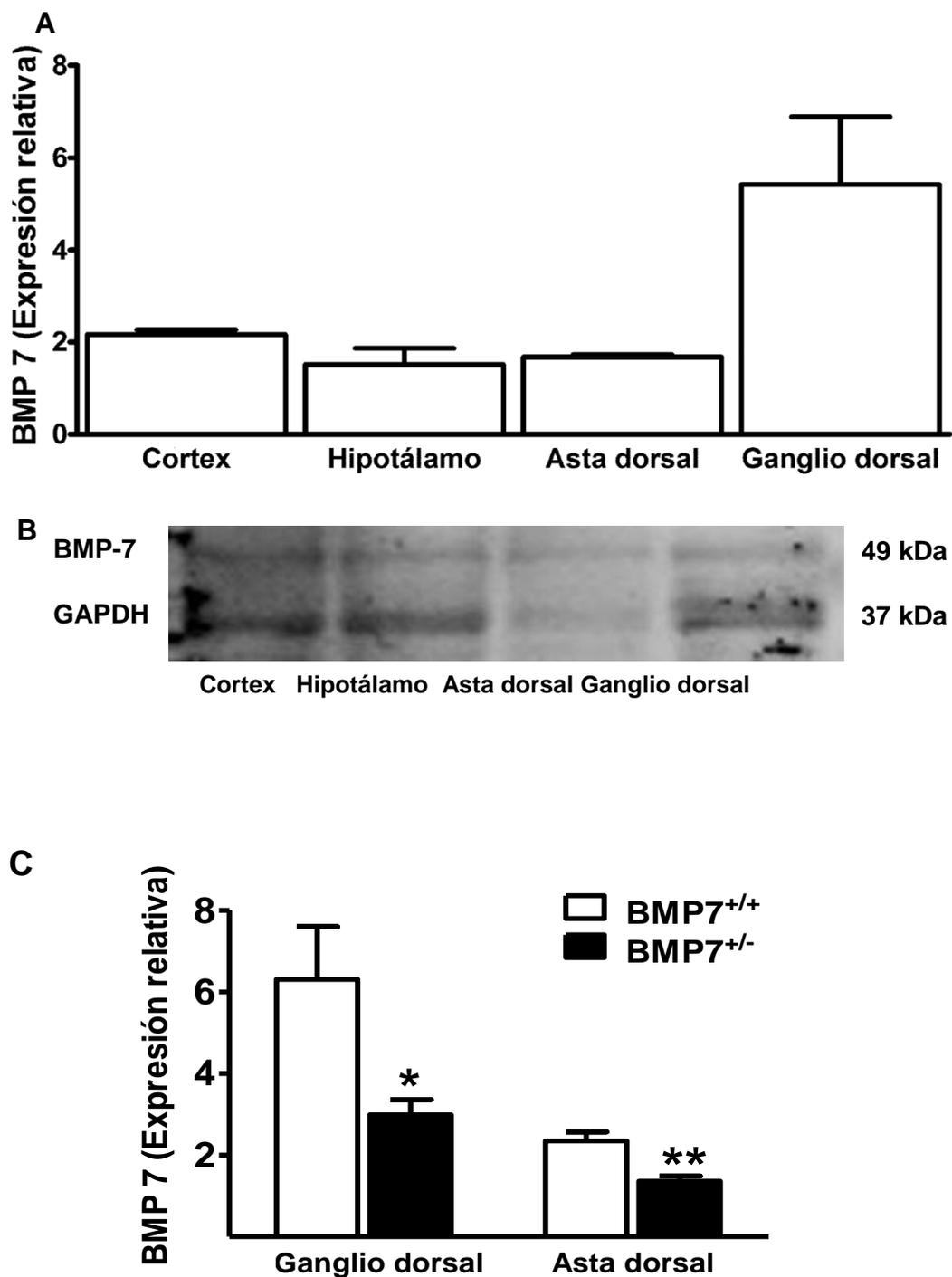


Figura 17. Expresión de BMP7 en el sistema nervioso del ratón. (A) El histograma muestra la expresión génica de BMP7, determinada mediante PCR cuantitativa y normalizada a la expresión de 18S, en diferentes regiones del sistema nervioso en el ratón silvestre. **(B)** Imagen representativa de la expresión proteica de BMP7, determinada mediante western blot, en las mismas regiones. **(C)** Reducción de la expresión génica de BMP7 en los ratones BMP7^{+/-} versus BMP7^{+/+} determinada mediante PCR cuantitativa.

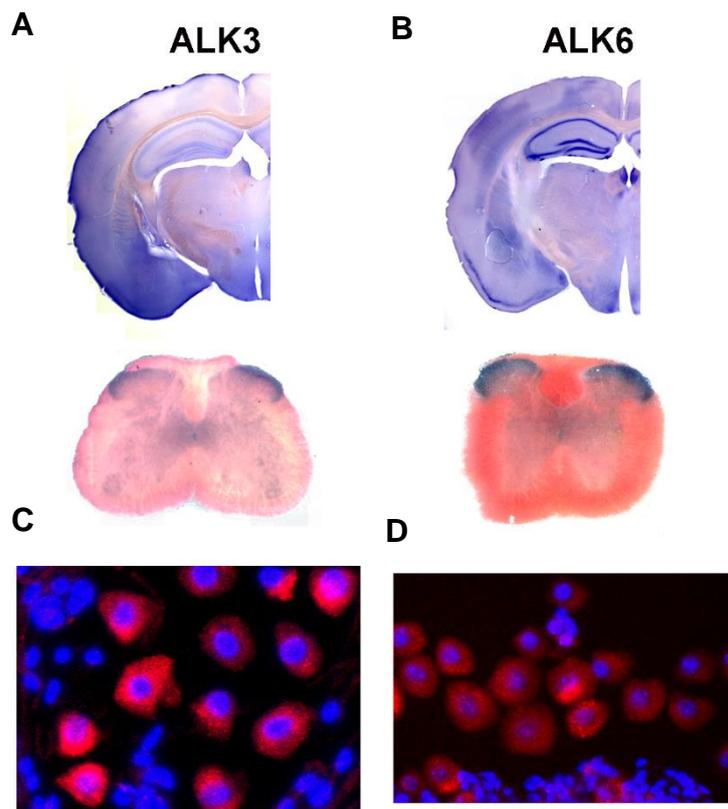


Figura 18. Expresión de los receptores tipo I de BMPs, ALK3 (BMPR1A) y ALK6 (BMPR1B), en el sistema nervioso del ratón silvestre. Hibridaciones in situ representativas de la distribución de ALK3 (A) y ALK6 (B) en cortes de cerebro y médula espinal. Localización de ALK3 (C) y ALK6 (D) mediante inmunofluorescencia en preparaciones de disociados de neuronas y células gliales de ganglios dorsales, realizadas con la técnica de *squash*. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se observa inmunoreactividad para ambos receptores en las neuronas ganglionares.

2. Efectos de la deficiencia en BMP7 en modelos de dolor

2.1. Dolor crónico neuropático

2.1.1. Los ratones BMP7^{+/-} presentan un fenotipo hiperalgésico frente a estímulos mecánicos en el modelo de dolor crónico neuropático inducido por lesión del nervio ciático

Se evaluó la influencia de la deficiencia de BMP7 en el desarrollo de la alodinia mecánica utilizando un modelo experimental de aplastamiento del nervio ciático, que reproduce el dolor crónico neuropático provocado por una

lesión nerviosa en humanos. La sensibilidad mecánica de los ratones se valoró mediante el test de von Frey, en el que monitorizamos la respuesta de retirada de la pata trasera evocada por la aplicación de una batería de monofilamentos que ejercen estímulos mecánicos de fuerza creciente. Se valoraron las respuestas de las patas traseras tanto ipsilateral como contralateral a la lesión frente a la estimulación mecánica, en condiciones basales el día previo a la lesión del nervio ciático, y los 14 días posteriores a la lesión.

En condiciones basales, los animales de ambos genotipos incrementaron significativamente el porcentaje de respuestas positivas conforme aumentó la intensidad de la fuerza aplicada (“intensidad de fuerza”: $F_{(9,270)}=518,3$, $p<0,001$). Los animales BMP7^{+/-} mostraron una mayor sensibilidad a la estimulación mecánica que los ratones silvestres (“genotipo”: $F_{(1,270)}=13,75$, $p<0,001$). Así, el número de respuestas nocifensivas evocadas por cualquier fuerza fueron significativamente superiores en los animales BMP7^{+/-} (“intensidad de fuerza x genotipo”: $F_{(9,270)}= 5,4$, $p<0,001$).

Tras el aplastamiento del nervio ciático, los ratones de ambos genotipos desarrollaron alodinia mecánica. Los ratones BMP7^{+/-} mostraron mayor sensibilidad a estímulos mecánicos durante todo el periodo de seguimiento tras la lesión en comparación con los animales BMP7^{+/+}. En la **figura 19** se muestran las respuestas nocifensivas del día 7^o tras la lesión (“intensidad de fuerza”: $F_{(9,36)}=145,9$, $p<0,001$; “genotipo”: $F_{(1,36)}=37,5$, $p<0,01$ intensidad de fuerza x genotipo”: $F_{(9,36)}= 6,62$, $p<0,001$) y a los 14 días, cuando los animales desarrollaron la máxima expresión de su neuropatía (“intensidad de fuerza”: $F_{(9,216)}=151,4$, $p<0,001$; “genotipo”: $F_{(1,216)}=29,15$, $p<0,001$; “intensidad de fuerza x genotipo”: $F_{(9,216)}=10,71$, $p<0,001$) (**Figura 19**). Consecuentemente, se produjo un decremento progresivo y significativo en el umbral de la retirada de la pata trasera ipsilateral a la lesión, que alcanzó una respuesta alodínica máxima el día 14^o tras la lesión de nervio periférico. Los animales BMP7^{+/-} mostraron un umbral nociceptivo mecánico significativamente menor que los animales BMP7^{+/+} como se ilustra en la figura 5A [día 7^o ($t=50,11$, $p<0,001$); día 14^o ($t=3,1$, $p<0,01$)].

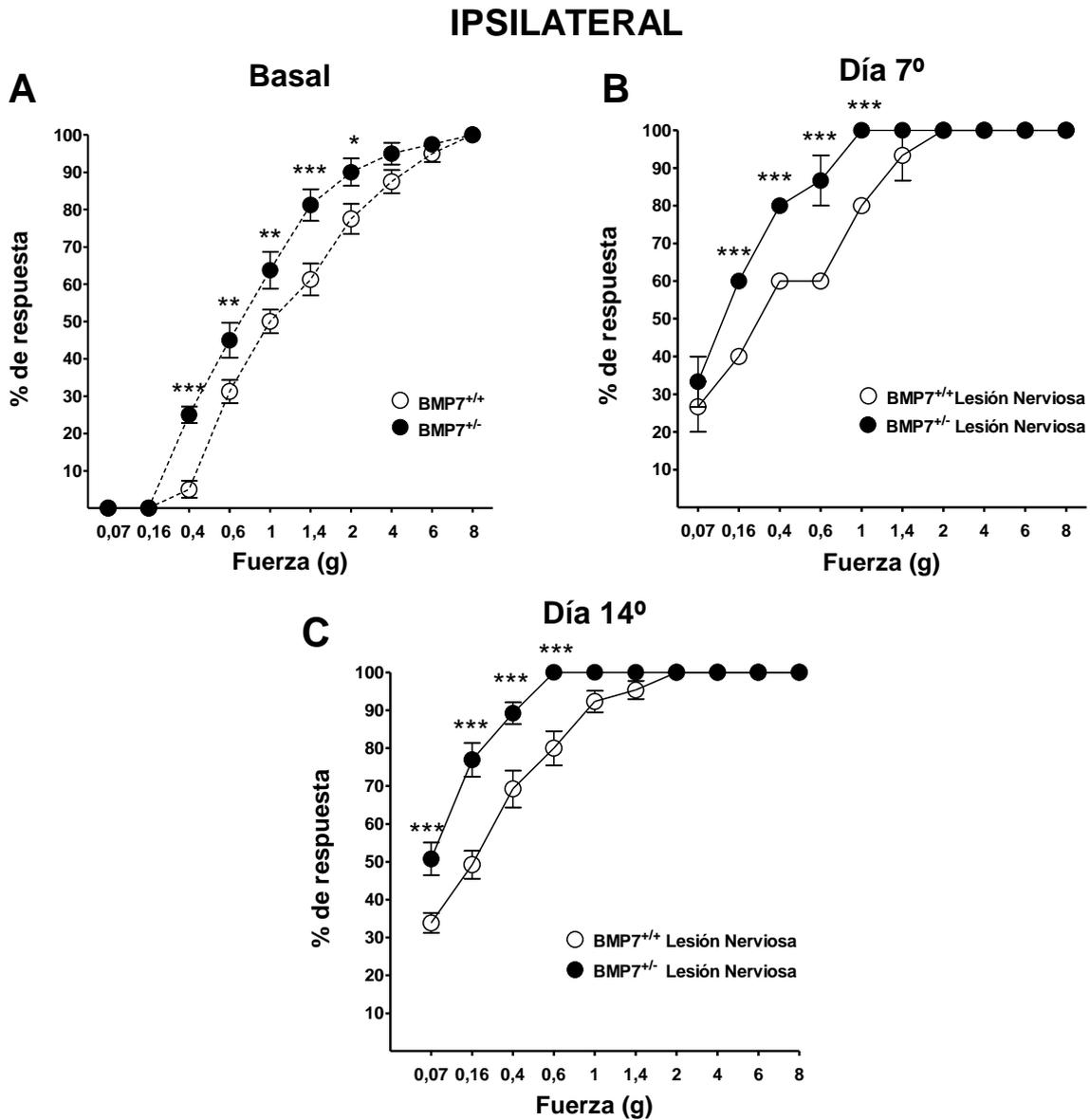


Figura 19. Efecto de la deficiencia de BMP7 en el desarrollo de alodinia mecánica tras la lesión ciática. Las gráficas representan el porcentaje de respuestas de retirada de la pata ipsilateral provocadas por estimulación mecánica de fuerza creciente con monofilamentos de von Frey, en ratones BMP7^{+/+} (n=16, círculos blancos) y BMP7^{+/-} (n=16, círculos negros), **(A)** en condiciones basales, **(B)** y transcurridos 7 y **(C)** 14 días desde la lesión nerviosa. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, prueba de Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

Durante el periodo de seguimiento, la pata contralateral a la lesión nerviosa también experimentó cambios de respuesta a los estímulos mecánicos. Se desarrolló alodinia en espejo, aunque de menor intensidad que

en la pata ipsilateral. En la **figura 20** se muestran las respuestas nocifensivas observadas los días 7^o (“intensidad de fuerza”: $F_{(10,40)}=147,0$, $p<0,001$; “genotipo”: n.s.; “intensidad de fuerza x genotipo”: $F_{(10,40)}=2,65$, $p<0,05$) y 14^o (“intensidad de fuerza”: $F_{(9,36)}=145,0$, $p<0,001$; “genotipo”: $F_{(1,36)}=37,5$, $p<0,01$; “intensidad de fuerza x genotipo”: $F_{(9,36)}=6,62$, $p<0,01$.) (**Figura 20**).

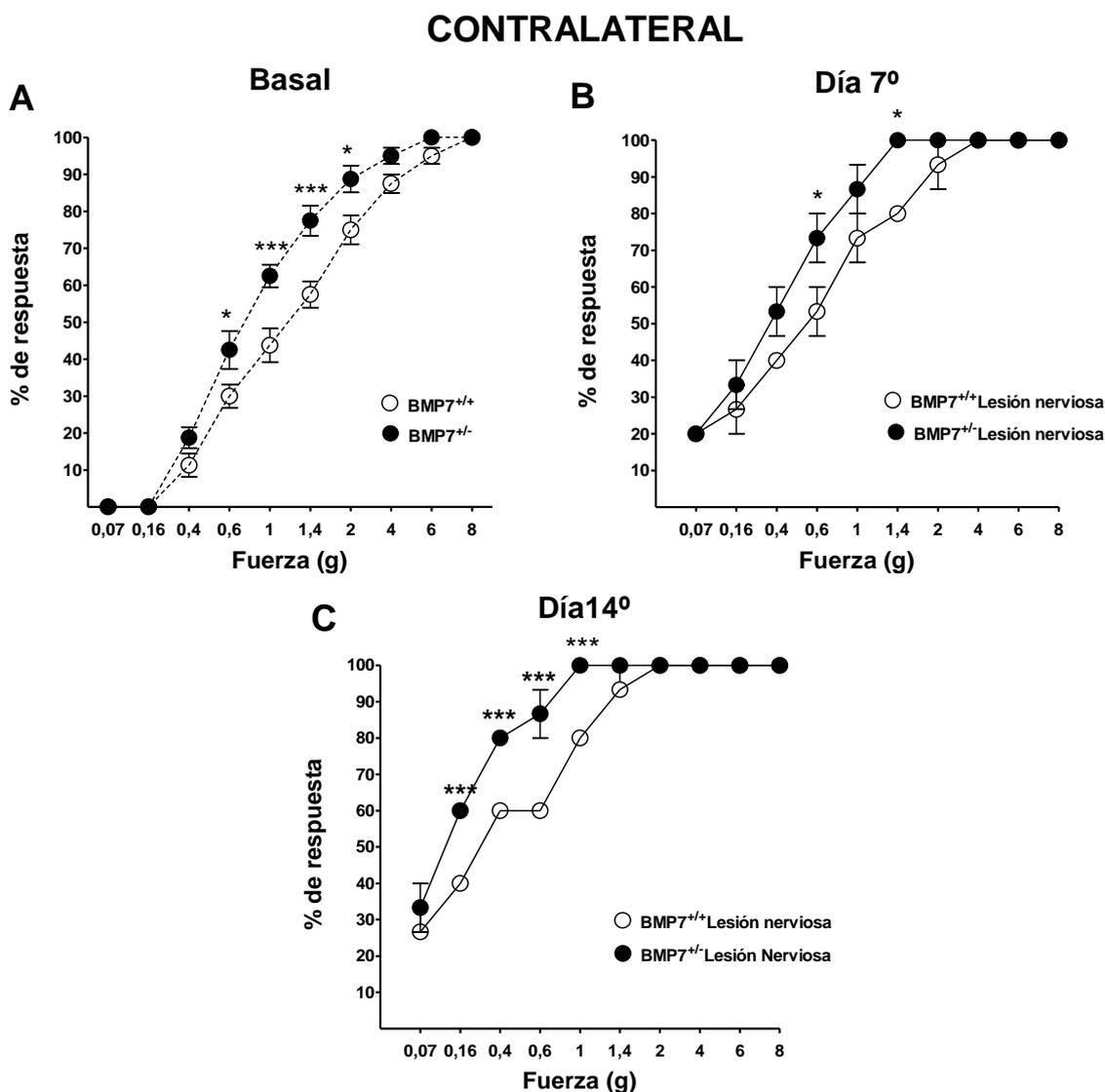


Figura 20. Efecto de la deficiencia de BMP7 en el desarrollo de alodinia mecánica en la pata contralateral a la lesión ciática. Las gráficas representan el porcentaje de respuestas de retirada de la pata contralateral provocadas por estimulación mecánica de fuerza creciente con monofilamentos de von Frey en los ratones BMP7^{+/+} (n=16, círculos blancos) y BMP7^{+/-} (n=16, círculos negros), **(A)** en condiciones basales **(B)** y transcurridos 7 **(C)** y 14 días desde la lesión nerviosa. *** $p<0,001$,

* $p < 0,05$, prueba de Bonferroni, tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

De igual manera, se produjo un decremento progresivo y significativo en el umbral de retirada de la pata trasera contralateral a la lesión. Los animales BMP7^{+/-} mostraron un umbral nociceptivo mecánico menor comparado con los animales BMP7^{+/+} (Figura 21B).

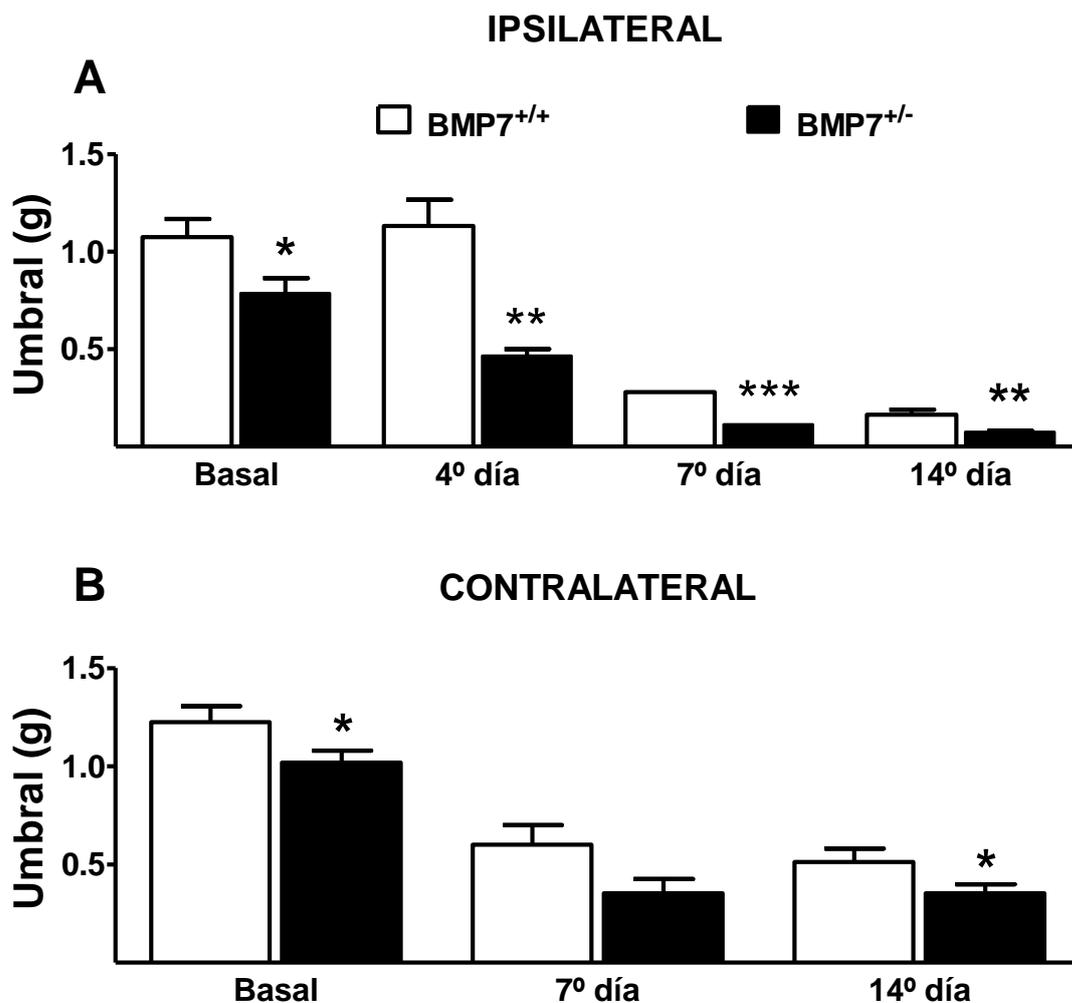


Figura 21. Evolución temporal del umbral ipsilateral y contralateral a la lesión del nervio ciático. Evolución temporal del umbral de respuesta a estímulos mecánicos en ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-} tras la lesión del nervio ciático (A) en la pata ipsilateral (B) y en la pata contralateral; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs control, prueba de Bonferroni tras ANOVA de medidas repetidas.

2.1.2. El efecto antinociceptivo de la morfina está reducido en los ratones BMP7^{+/-} sometidos a dolor neuropático mediante lesión del nervio ciático

En nuestro estudio planteamos si la deficiencia de BMP7 podría tener consecuencias en la respuesta analgésica a fármacos opioides en condiciones de dolor neuropático. Para ello, ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-} sometidos a lesión del nervio ciático recibieron dosis acumulativas de morfina (1, 3, 6 y 10 mg/Kg, i.p; intervalo entre dosis 10 min), el día 28 tras la lesión, cuando los animales habían desarrollado alodinia mecánica de máxima intensidad. Se valoraron los porcentajes de respuesta a cada monofilamento inducido por la morfina, mediante el test de von Frey; se consideró umbral nociceptivo a la fuerza mecánica que provoca un 50% de respuestas nocifensivas. Como se muestra en la figura, se observaron diferencias significativas en el efecto de la morfina entre ambos genotipos. Así, los animales BMP7^{+/+} fueron más sensibles a la analgesia producida por morfina que los ratones BMP7^{+/-} (“genotipo”: $F_{(1,44)}=27,72$, $p<0,001$; “dosis”: $F_{(5,44)}=40,12$, $p<0,001$; “genotipo x dosis”: $F_{(5,44)}=9,69$; $p>0,001$). Esta mayor respuesta antinociceptiva fue evidente con las dosis inferiores del opiáceo [3 mg/Kg (BMP7^{+/+}= $4,0\pm 0$ vs. BMP7^{+/-}= $0,54\pm 0,17$; $p<0,001$); 6 mg/Kg (BMP7^{+/+}= $5,0\pm 0,5$ vs. BMP7^{+/-}= $1,5\pm 0,2$; $p<0,001$, **figuras 22 y 23**). Con la dosis de 10mg/Kg la diferencia entre genotipos no alcanzó significación estadística (BMP7^{+/+}= 6 ± 0 vs. BMP7^{+/-}= $5\pm 0,5$; $p>0,05$).

○ BMP7^{+/+} Lesión nerviosa ● BMP7^{+/+} Lesión nerviosa + Morfina
 □ BMP7^{+/-} Lesión nerviosa ■ BMP7^{+/-} Lesión nerviosa + Morfina

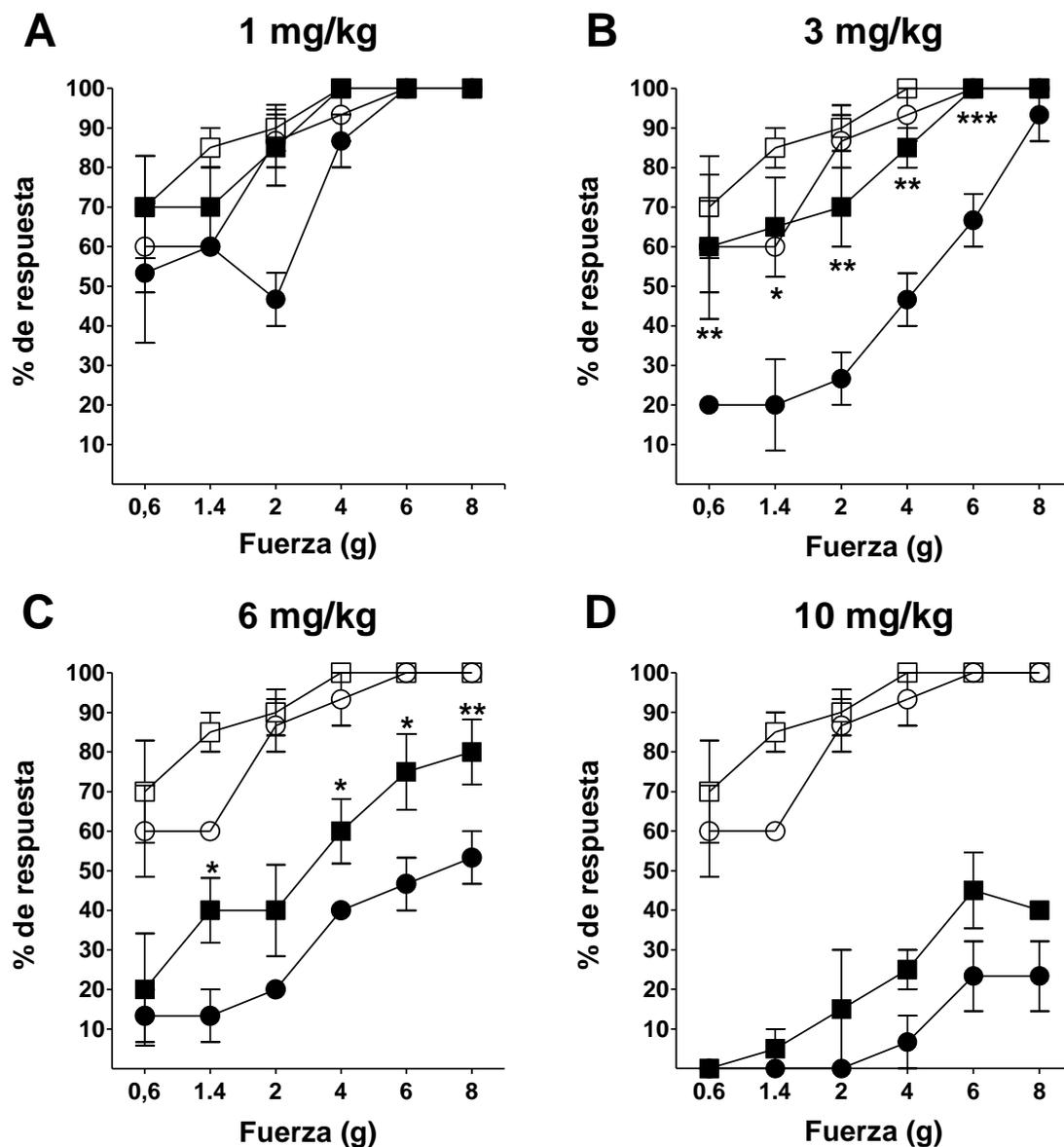


Figura 22. Efecto de la deficiencia de BMP7 en la respuesta antinociceptiva a la morfina en ratones neuropáticos. Las gráficas representan el porcentaje de respuestas de retirada de la pata ipsilateral a la lesión del nervio ciático, provocadas por estimulación mecánica creciente con monofilamentos de von Frey, el día 28 tras la lesión. Los ratones BMP7^{+/+} (n=3, círculos) y BMP7^{+/-} (n=4, cuadrados), recibieron dosis acumulativas de morfina: **(A)** 1 mg/kg, **(B)** 3mg/Kg, **(C)** 6mg/Kg y **(D)** 10mg/Kg. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001, vs. BMP7^{+/+}, prueba de Bonferroni, tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.



Figura 23. Umbrales temporales y de respuesta antinociceptiva a la morfina en ratones neuropáticos BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-}. La gráfica muestra los umbrales de respuesta nocifensiva a la estimulación mecánica (test de von Frey) en ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-} sometidos a dolor neuropático y tratados con dosis acumulativas de morfina (1-10 mg/Kg) el día de máxima alodinia mecánica tras la lesión del nervio ciático. *** $p < 0,001$, prueba de Bonferroni.

2.1.3. El ejercicio físico voluntario tras la lesión del nervio ciático atenúa la alodinia mecánica en los ratones silvestres, pero no la modifica en los BMP7^{+/-}

Hemos analizado en ambos genotipos el efecto del ejercicio físico voluntario sobre el umbral de respuesta a estímulos sensoriales mecánicos y el desarrollo de alodinia tras la lesión nerviosa. Para ello, una vez lesionado el nervio ciático, los animales ($n=3$ por genotipo y condición) fueron establecidos individualmente, de forma aleatoria, en jaulas que disponían de una rueda de actividad o en jaulas de similares dimensiones, pero sin rueda. Se monitorizó diariamente la sensibilidad de la pata ipsilateral a la lesión, así como el tiempo de permanencia en la rueda y la distancia recorrida por los ratones. Como muestra la **figura 24**, no se observaron diferencias significativas en el ejercicio realizado por los ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-} durante todo el periodo de seguimiento.

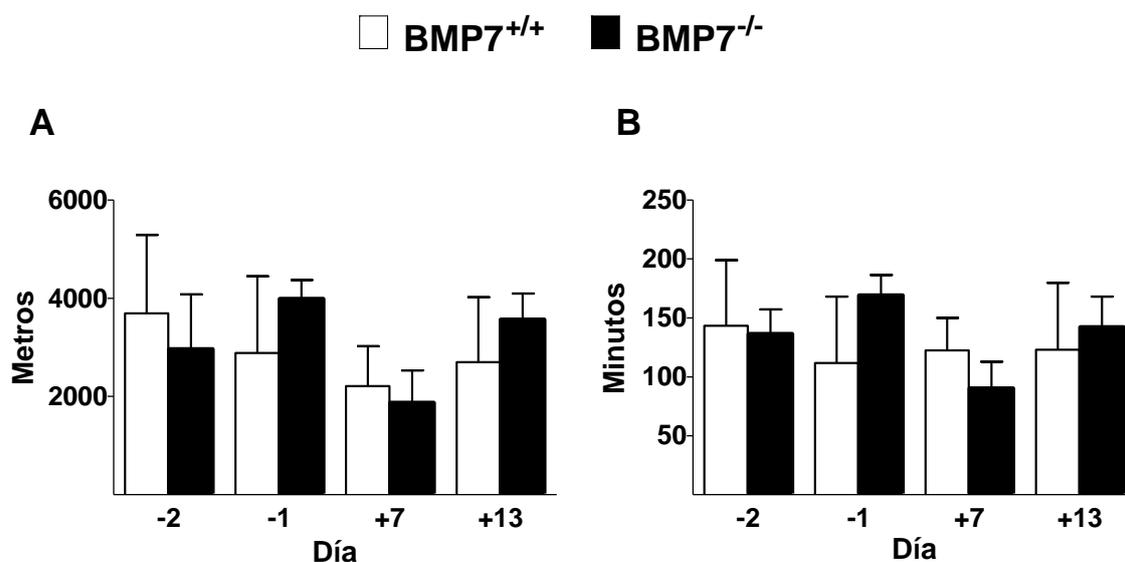


Figura 24. Ejercicio realizado por los animales BMP7^{+/+} y BMP7^{-/-} en la rueda de actividad. En la figura se muestran **(A)** la distancia recorrida y **(B)** el tiempo de permanencia en la rueda dos días antes de la lesión nerviosa (días -2 y -1) y los días 7^o y 13^o tras la lesión del nervio ciático. Prueba *t* de Student de dos colas.

Los animales BMP7^{+/+} sedentarios desarrollaron dolor neuropático tras la lesión del nervio periférico, alcanzando la máxima alodinia mecánica transcurridas dos semanas. Los ratones BMP7^{+/+} que realizaron el ejercicio voluntario en la rueda de actividad tras la lesión del nervio mostraron respuestas nocifensivas significativamente atenuadas durante el periodo de seguimiento [día 7^o (“intensidad de fuerza”: $F_{(8,60)} = 183,6$, $p < 0,001$; “ejercicio”: $F_{(1,80)} = 23,0$, $p < 0,001$; “intensidad de fuerza x ejercicio”: $F_{(8,80)} = 2,65$, $p < 0,05$); día 14^o (“intensidad de fuerza”: $F_{(8,68)} = 104,8$, $p < 0,001$; “ejercicio”: $F_{(1,80)} = 73,4$, $p < 0,001$; “intensidad de fuerza x ejercicio”: $F_{(8,88)} = 6,92$, $p < 0,001$]. (**Figura 25**). Consecuentemente, el umbral nociceptivo fue significativamente superior al de sus compañeros sedentarios (día 7^o: $t = 59,45$, $p < 0,001$; día 14^o: $t = 4,1$, $p < 0,01$, (**Figura 26**)). Por el contrario, en los ratones BMP7^{-/-} no se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales sedentarios y corredores, ni en el curso temporal del desarrollo de alodinia mecánica, ni en los umbrales nociceptivos alcanzados el día 7 y el día 14 tras la lesión ciática.

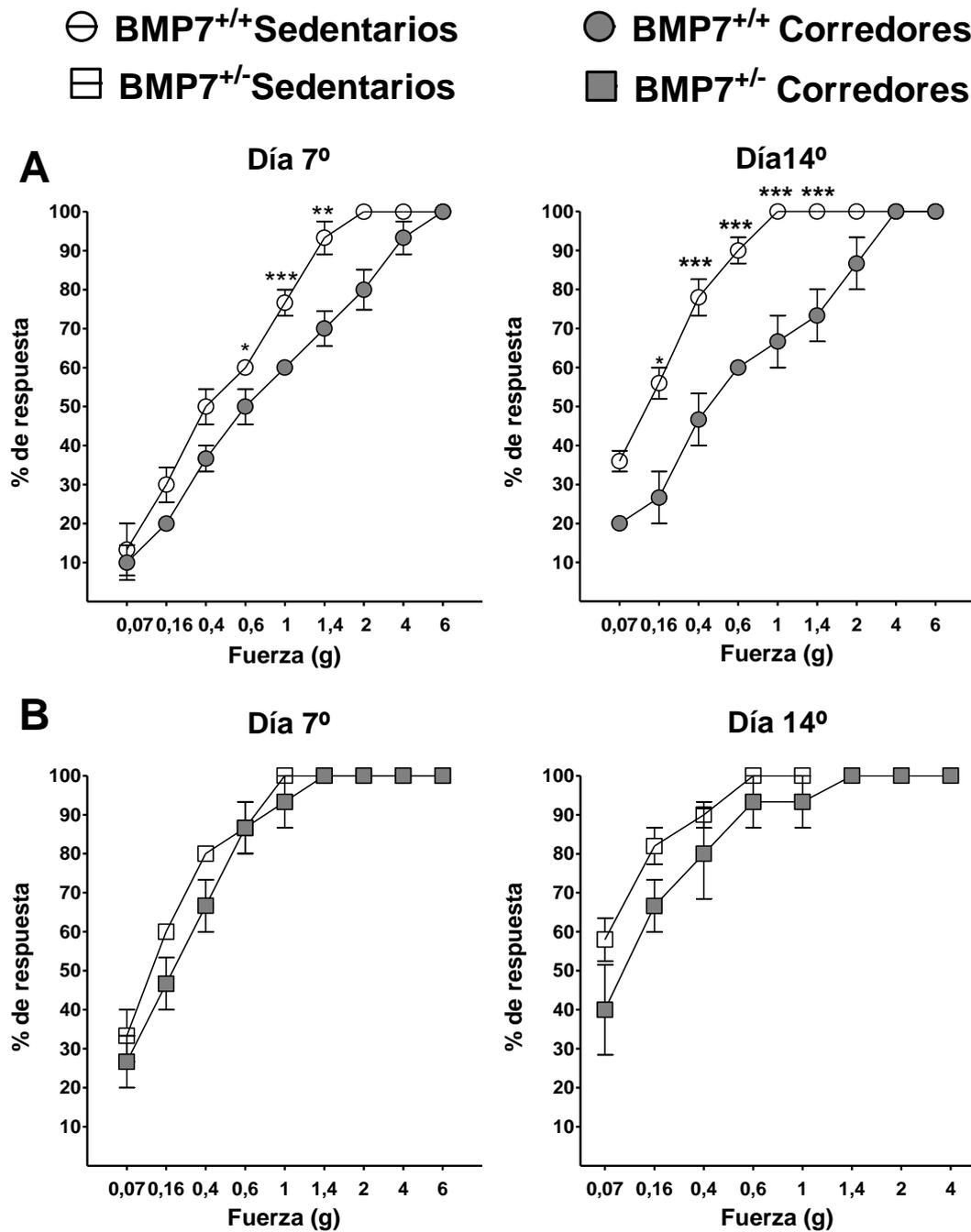


Figura 25. Efecto del ejercicio voluntario tras la lesión del nervio ciático en ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-}. Grupos de ratones BMP7^{+/+} (n=3, **A**) y BMP7^{+/-} (n=3, **B**) fueron sometidos a lesión del nervio ciático y estabulados en jaulas que disponían de una rueda de actividad o en jaulas de similares dimensiones, pero sin rueda. Durante un periodo de seguimiento tras la lesión nerviosa (14 días), se determinó diariamente el porcentaje de respuestas nocifensivas evocadas por la estimulación mecánica en la pata trasera, con monofilamentos de von Frey de intensidades de fuerza (g). Las gráficas muestran las curvas de intensidad de fuerza-respuesta los días 7º y 14º tras la lesión nerviosa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, prueba de Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

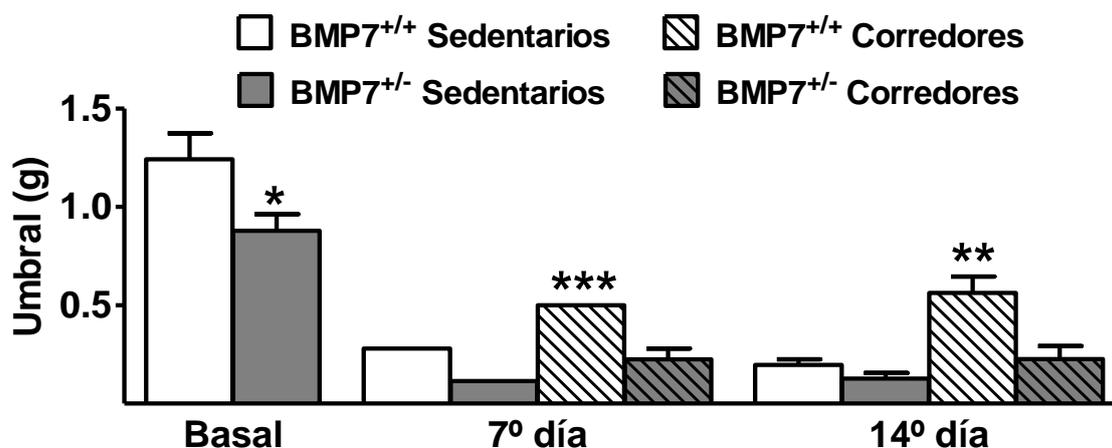


Figura 26. Efecto del ejercicio sobre el desarrollo de dolor neuropático. Umbrales. Evolución del umbral nociceptivo frente a la estimulación mecánica con monofilamentos de von Frey de la pata trasera ipsilateral a la lesión del nervio ciático, a lo largo de los 14 días de seguimiento. Tras la lesión nerviosa, los animales de cada uno de los genotipos fueron aleatoriamente sometidos a ejercicio voluntario en una rueda de actividad o a condiciones sedentarias. Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada en cada uno de los días señalados en el gráfico de barras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, BMP7^{+/+} corredores vs. BMP7^{+/+} sedentarios, prueba *t* de Student de dos colas.

2.1.4. El tratamiento crónico con la proteína BMP7: recombinante potencia el efecto antialodínico del ejercicio tras la lesión del nervio ciático en los ratones silvestres

Dado que el efecto protector del ejercicio solo está presente en los animales que expresan BMP7 en homocigosis, quisimos evaluar el efecto de BMP7 en el desarrollo de alodinia en animales silvestres (BMP7^{+/+}) sometidos a lesión del nervio ciático y expuestos a la realización de ejercicio físico de forma voluntaria. Para ello, un grupo de ratones BMP7^{+/+} fueron tratados con BMP7 recombinante (5µg/Kg/día) administrada durante 14 días mediante una minibomba de infusión continua implantada a nivel subcutáneo, en el momento de la lesión del nervio y a los que se colocó en jaulas con ruedas corredoras para el ejercicio, con habituación de dos días previos a la lesión. Otro grupo de ratones fue sometido a lesión nerviosa, pero sin tratamiento con BMP7 y expuestos a ejercicio y otro grupo no recibió ningún tratamiento y se mantuvo en jaulas de similares dimensiones, pero sin rueda (sedentarios) durante las 2 semanas que duró el estudio.

Los ratones expuestos a la realización de ejercicio voluntario y que no fueron tratados con BMP7 mostraron atenuado el desarrollo de alodinia mecánica comparado con los ratones sedentarios. Esta atenuación en el desarrollo de alodinia mecánica se vio significativamente potenciada en los ratones que habían sido tratados con BMP7 recombinante durante los 14 días que duró el estudio, mostrando un porcentaje de respuestas significativamente menor que lo animales expuestos sólo a ejercicio (“Tratamiento”: $F_{(3,120)} = 4,22$, $p < 0,001$; “Fuerza”: $F_{(8,120)} = 350,9$, $p < 0,001$; “Tratamiento x Fuerza”: $F_{(24,120)} = 22,0$, $p < 0,001$; **Figura 27**).

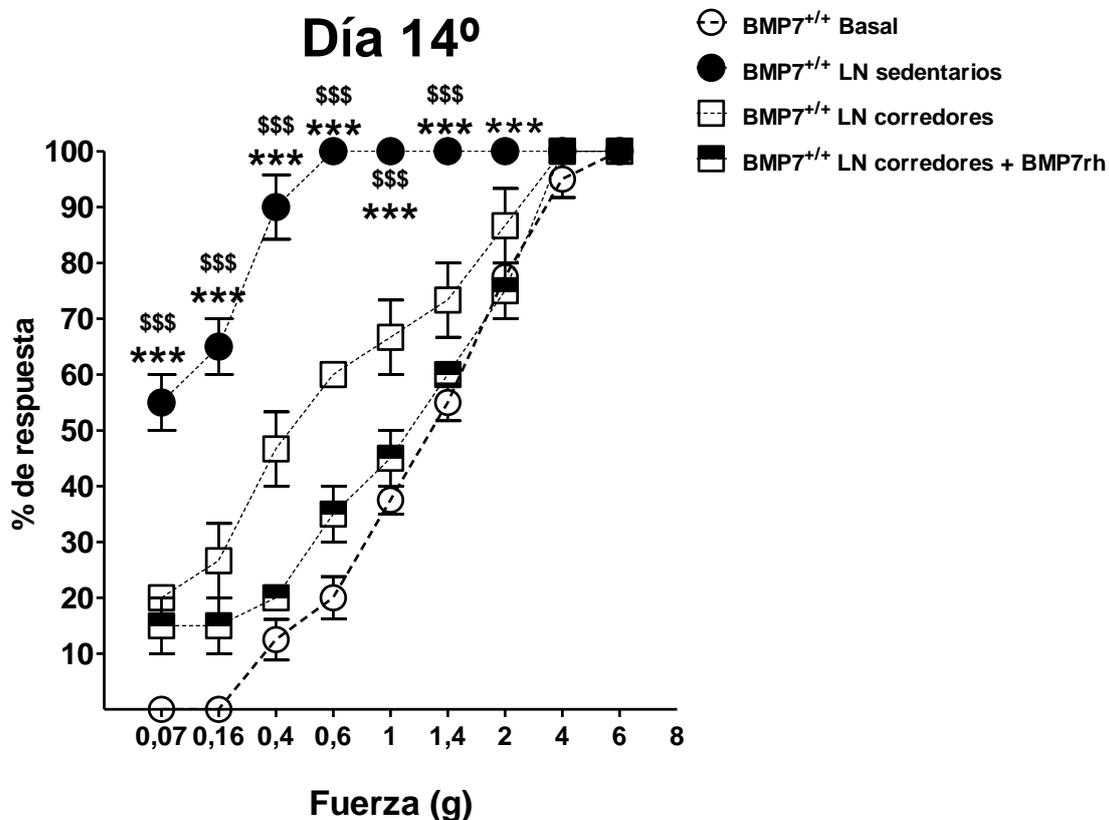


Figura 27. Efecto de la proteína recombinante BMP7 y el ejercicio voluntario tras la LN en ratones. Figura que muestra las curvas de fuerza-respuesta a los 14 días de la LN en un grupo de ratones tratados con BMP7 recombinante que realizaron ejercicio diario de forma voluntaria (n=4, cuadros blancos/negros), otro grupo realizó ejercicio diario tras la LN y sin tratamiento (n=3, cuadros blancos), otro grupo de ratones con LN, sedentarios y sin tratamiento (n=4, círculos negros). La respuesta basal de ratones representada con círculos blancos. *** $p < 0,001$ vs. lesión nerviosa (LN) corredores; \$\$\$ $p < 0,01$, vs. lesión nerviosa (LN) corredores + BMP7rh; prueba de Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

Consecuentemente, el umbral nociceptivo fue significativamente superior al de sus compañeros corredores día 14 tras la lesión ciática y similar a la condición basal ($F_{(3,18)}=44.5$, $p<0.001$, **Figura 28**).

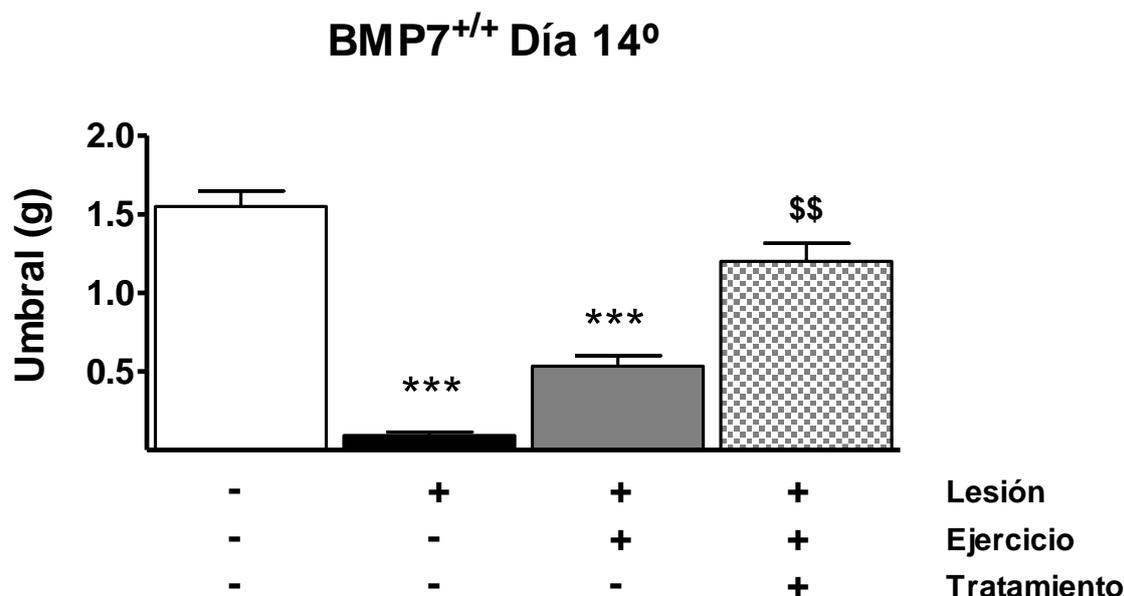


Figura28. Efecto de la proteína BMP7 recombinante y el ejercicio voluntario sobre el desarrollo de dolor neuropático. Umbral nociceptivo frente a la estimulación mecánica con monofilamentos de von Frey a los 14 días de la lesión nerviosa en animales sedentarios (n=4), animales que realizaron ejercicio diario (corredores, n=3) y animales corredores tratados con BMP7 recombinante en el momento de la lesión (n=4). *** $p<0,001$ vs. basales; \$\$\$ $p<0,01$, vs. lesión nerviosa (LN) corredores; prueba de Bonferroni tras ANOVA de una vía.

2.2. Dolor agudo evocado por estímulos químicos/inflamatorios: Los ratones BMP7^{+/-} no presentan diferencias en la respuesta nocifensiva provocada por estímulos de tipo químico/inflamatorio

El estudio de la conducta nociceptiva del dolor agudo evocado por estímulos químicos/inflamatorios se hizo mediante la prueba de la formalina. Tras la inyección subcutánea de formalina (20 μ l al 2%) en la superficie plantar se produce una respuesta nocifensiva bifásica (Shields y cols., 2010). El número de lamidos de la pata durante los primeros 5 minutos (fase temprana: irritativa) está provocada por la irritación química de los nociceptores periféricos por la formalina. El número de lamidos entre los 20-60 minutos (segunda fase:

componente inflamatorio) refleja fenómenos de sensibilización periférica y central (Shields y cols., 2010). En comparación con los animales BMP7^{+/+}, los ratones BMP7^{+/-} no mostraron diferencias significativas ni en el número de lamidos ni el tiempo que permanecieron lamiéndose la pata en ninguna de las fases. (Figura 29).

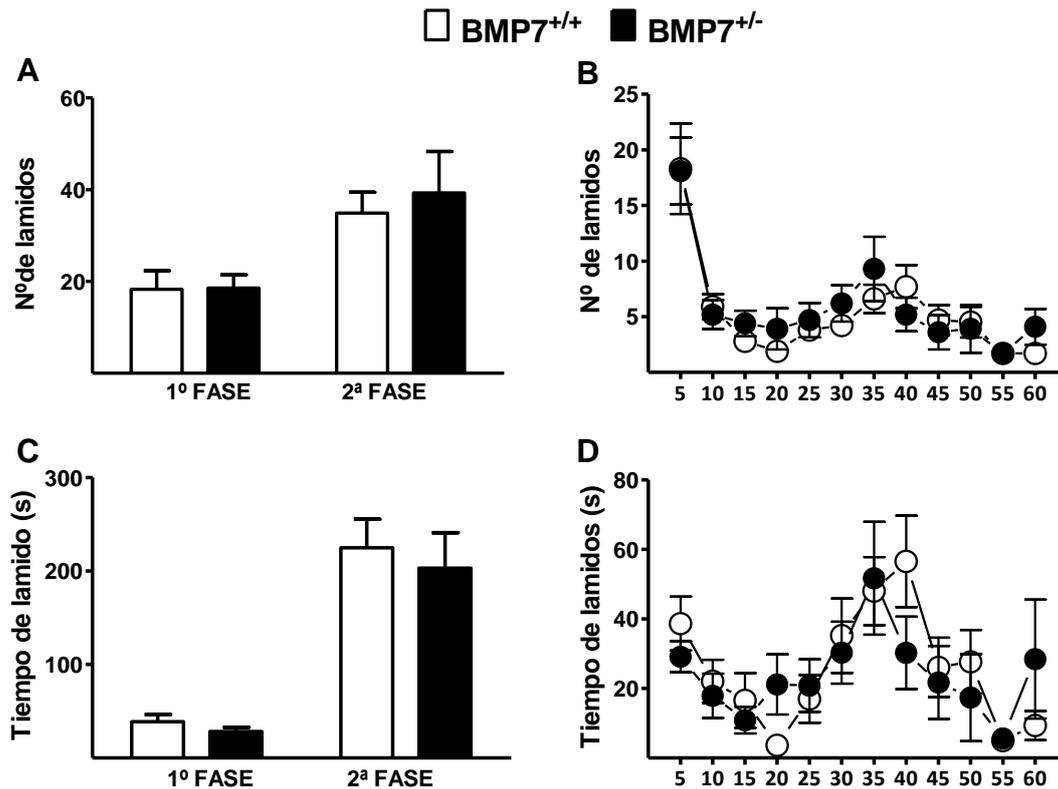


Figura 29. Efectos de la deficiencia en BMP7 en la prueba de la formalina. Las gráficas A y B muestran el número total de lamidos en la primera fase de dolor periférico (0-5 min) y en la segunda fase de sensibilización central (20-60min), analizados secuencialmente en periodos consecutivos de 5 minutos tras la inyección de formalina (20µl al 2%, s.c.) en la pata trasera. Las gráficas C y D muestran el tiempo de lamido (segundos) durante la primera y segunda fases, en periodos consecutivos de 5 minutos. Se observan dos picos que se corresponden con las fases descritas. BMP7^{+/+} (n=10) y BMP7^{+/-} (n=10) Prueba *t* de Student de dos colas y ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

2.3. Dolor crónico de etiología neoplásica: La deficiencia de BMP7 no modifica el desarrollo de dolor neoplásico

Hemos valorado como condiciona la deficiencia en BMP7 el desarrollo de dolor crónico neoplásico óseo. Para ello los ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-} fueron inoculados en la meseta tibial (Llorián-Salvador y cols., 2015) con células tumorales de la línea celular B16-F10 derivada de melanoma. Estas células tumorales producen una intensa actividad osteoblástica que se acompaña de formación y crecimiento de tejido osteoide en la cavidad medular; las lesiones conviven con procesos osteoblásticos de neoformación ósea (Curto-Reyes et al., 2008).

IPSILATERAL

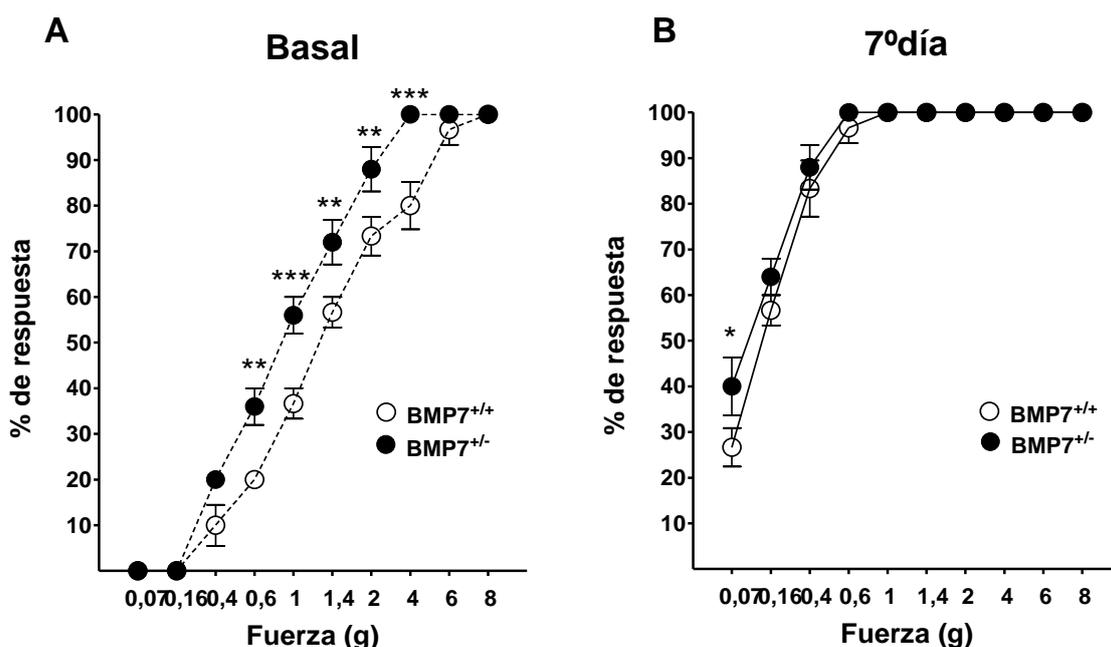


Figura 30. Efecto de la deficiencia en BMP7 sobre el desarrollo de alodinia mecánica inducida por tumor óseo. Se valoraron las respuestas de retirada de la pata ipsilateral en respuesta a la estimulación mecánica con filamentos de vonFrey de intensidades crecientes. Las gráficas muestran las curvas fuerza-respuesta de los animales BMP7^{+/+} (n=6) y BMP7^{+/-} (n=5) **(A)** en condiciones basales y **(B)** transcurridos 7 días desde la inoculación en la meseta tibial de células tumorales derivadas de melanoma, B16-F10. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, prueba de Bonferroni tras ANOVA de dos vías de medidas repetidas.

El proceso tumoral se asocia con el desarrollo de hiperalgesia y alodinia transcurridos 7 días desde la inoculación de las células tumorales en la meseta tibial. En estas condiciones experimentales, se procedió a valorar el desarrollo de alodinia mecánica por parte de los animales BMP7^{+/+} (n=6) y BMP7^{+/-} (n=5).

Antes de ser sometidos a la inoculación de las células tumorales, los animales BMP7^{+/-} mostraron una mayor sensibilidad a la estimulación mecánica que los ratones silvestres (**Figuras 30A y 31A**). Así, los porcentajes de respuestas evocados por cualquier fuerza fueron significativamente superiores (“intensidad de fuerza x genotipo”: $F_{(9,81)}=4,37$, $p<0,001$) y el umbral de respuesta significativamente menor (ipsilateral: $t=3,2$, $p<0,01$; contralateral: $t=2,2$, $p<0,05$) en los animales BMP7^{+/-} que en los animales BMP7^{+/+}.

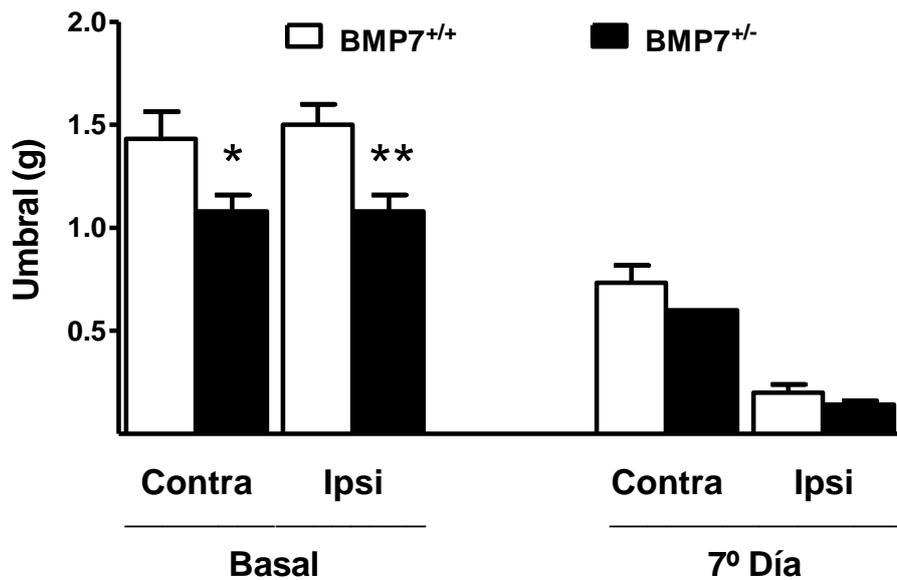


Figura 31. Efecto de la deficiencia en BMP7 sobre el desarrollo de alodinia mecánica inducida por tumor óseo. Evolución del umbral nociceptivo frente a la estimulación mecánica con monofilamentos de von Frey de las patas traseras ipsilateral y contralateral transcurridos 7 días desde la inoculación de células tumorales derivadas de melanoma, B16-F10 en la meseta tibial de la pata izquierda. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, prueba t de Student de dos colas.

Tras la inoculación de las células tumorales, tanto los animales BMP7^{+/+} como los BMP7^{+/-} desarrollaron alodinia mecánica determinada mediante el test de von Frey transcurridos 7 días tras la inoculación tumoral (**Figuras 30B y 31B**). No se observaron diferencias significativas entre genotipos en los umbrales de respuesta nocifensiva frente a estímulos mecánicos.

3. Efectos de la deficiencia en BMP7 en test conductuales de actividad general, coordinación motora y ansiedad

En esta Tesis Doctoral hemos evaluado el efecto de la deficiencia en heterocigosis de BMP7 sobre la actividad general y factores emocionales, como la ansiedad, de los animales BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-}. Con el fin de descartar cualquier anomalía en la coordinación motora que pudiera alterar la ejecución de las pruebas utilizadas para evaluar conductas ansiosas, los animales fueron previamente evaluados en la prueba del rotarod.

3.1. Los ratones BMP7^{+/-} no presentan diferencias en la coordinación motora, determinada en el Rotarod

La coordinación motora en el rotarod no se vio afectada por el genotipo de los ratones. Así, los ratones deficientes en BMP7 mostraron una latencia de caída del aparato similar, tanto cuando la prueba se desarrolla a diferentes velocidades constantes, como en el ciclo de aceleración progresiva (**Figura 32**).

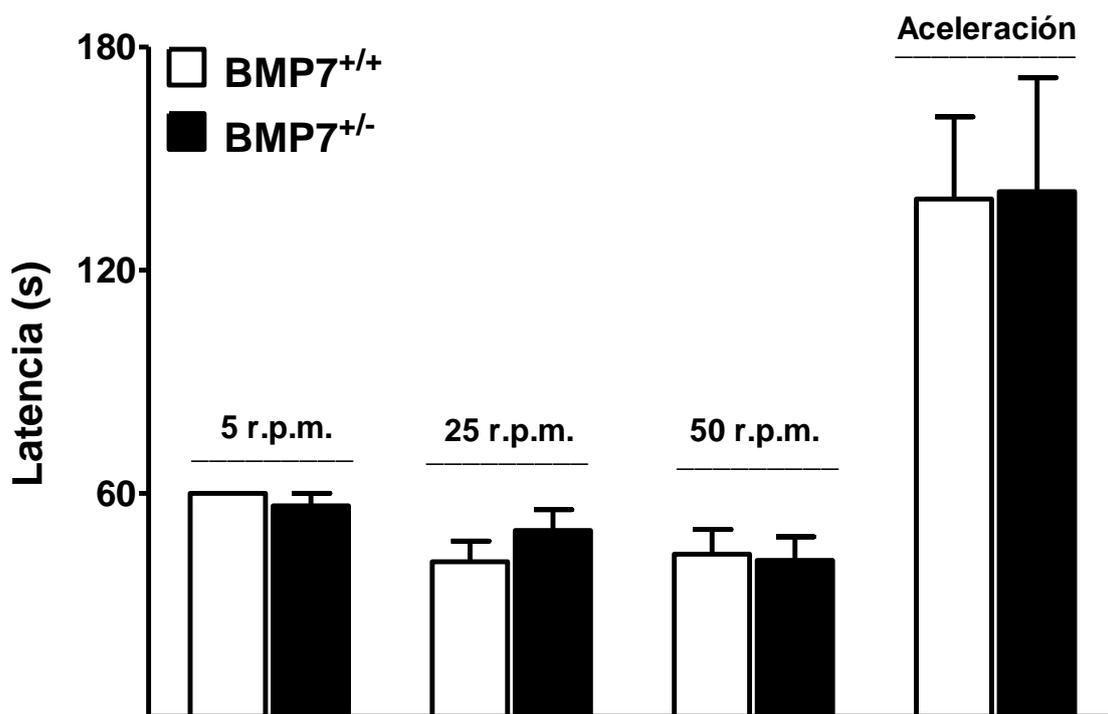


Figura 32. Prueba del Rotarod: En animales BMP7^{+/+} (n=10) y BMP7^{+/-} (n=10) la deficiencia en BMP7 no afectó a la coordinación motora en el rotarod a distintas velocidades constantes ni durante el ciclo de aceleración. La gráfica representa la latencia de caída.

3.2. La deficiencia en BMP7 condiciona fenotipos conductuales menos ansiosos en los test de ansiedad

Se analizó el comportamiento de los ratones BMP7^{+/+} y BMP7^{+/-} en pruebas conductuales donde existe un conflicto entre la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos e iluminados, y a las alturas, frente a su tendencia innata por explorar ambientes nuevos.

3.2.1. Campo abierto

En esta prueba se valoró la respuesta de los ratones frente a una situación estresante como es la exposición a un espacio abierto e iluminado por una fuente de luz controlada (540 luxes). En esta prueba, una menor actividad horizontal en la zona central del aparato, así como un incremento en el número de alzamientos (intento de escapar) son indicativos de una conducta ansiosa.

Los ratones BMP7^{+/-} mostraron una actividad horizontal por el centro del aparato significativamente mayor que los animales BMP7^{+/+} que se reflejó tanto en la distancia recorrida ($t=2,16$, $p<0,05$, **Figura 33A**) como en el tiempo de permanencia en esta zona del aparato ($t=5,23$, $p<0,001$ **Figura 33B**). La actividad horizontal periférica de los ratones BMP7^{+/-} fue significativamente menor que la de los animales BMP7^{+/+} (distancia: $t=2,46$, $p<0,05$; tiempo: $t=5,23$, $p<0,001$). No se observaron diferencias significativas entre genotipos en la actividad general; todos los animales recorrieron la misma distancia durante el ensayo.

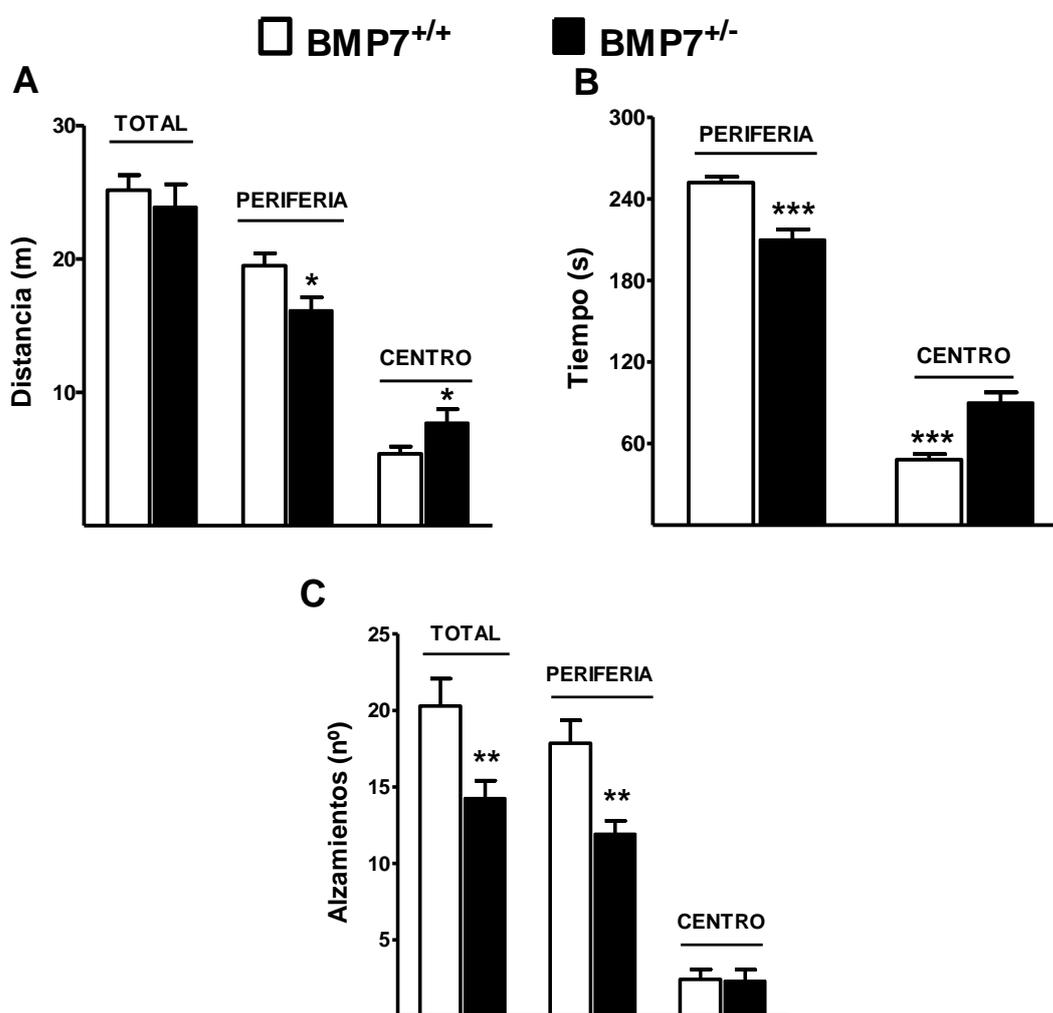


Figura 33. Efecto de la deficiencia de BMP7 en la prueba del campo abierto. Animales BMP7^{+/+} (n=14) y BMP7^{+/-} (n=15). Las gráficas muestran **(A)** la distancia recorrida, **(B)** el tiempo de permanencia y **(C)** número de alzamientos en las zonas periférica y central del aparato, y **(D)** el número de transiciones entre zonas durante la prueba. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Prueba t de Student de dos colas.

Los ratones BMP7^{+/-} mostraron una actividad exploratoria vertical significativamente menor que los ratones BMP7^{+/+}, caracterizada por un menor número de alzamientos tanto totales, como en la periferia del aparato totales, como (total: $t=2,87$, $p<0,01$; periferia: $t=3,5$, $p<0,0$, **Figura 33C**), lo que indicaría una menor percepción de riesgo.

3.2.2. Laberinto en cruz

En la prueba del laberinto elevado en cruz se valoraron la actividad general y los niveles de ansiedad de los ratones expuestos a un ambiente desconocido para ellos, que presenta dos zonas bien diferenciadas: una potencialmente aversiva (brazos abiertos) y otra segura (brazos cerrados).

Como se observa en la **figura 34 A**, no se observaron diferencias significativas entre genotipos en la distancia total recorrida durante la prueba, mostrando todos los animales una actividad motora similar. No obstante, los animales BMP7^{+/-} recorrieron un porcentaje de distancia mayor en los brazos abiertos y menor en los brazos cerrados que los animales BMP7^{+/+} (abierto: $t=3,26$, $p<0,01$; cerrado: $t=3,26$, $p<0,01$. **Figura 34B**). Del mismo modo, el tiempo de permanencia fue significativamente mayor en los brazos abiertos y menor en los brazos cerrados en los animales BMP7^{+/-} *versus* BMP7^{+/+} (abierto: $t=3,15$, $p<0,01$; cerrado: $t=3,15$, $p<0,01$, **Figura 34C**). Otro indicativo del grado de ansiedad es el número de entradas que los animales realizan en ambos brazos. Aunque los ratones de cada genotipo no difirieron significativamente en el número de entradas que realizaron en los brazos cerrados, los animales BMP7^{+/-} realizaron un mayor número de entradas en los brazos abiertos ($t=2,1$, $p<0,05$. **Figura 34D**), lo que es un signo indicativo de un menor grado de ansiedad frente a espacios potencialmente aversivos.

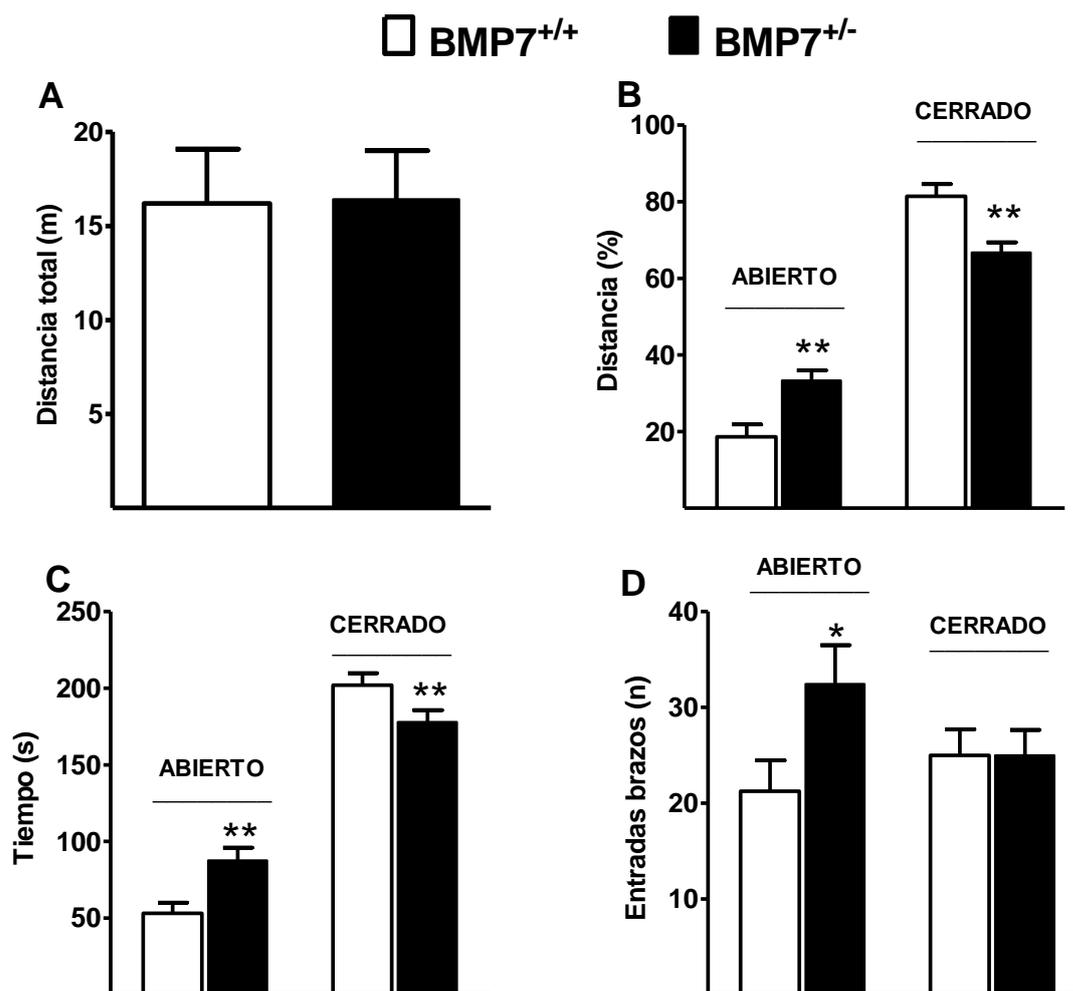


Figura 34. Efecto de la deficiencia de BMP7 en la prueba del laberinto en cruz. Animales BMP7^{+/+} (n=14) y BMP7^{+/-} (n=15). Las gráficas representan (A) la distancia total recorrida en metros, (B) el porcentaje de distancia recorrida en brazos abiertos y cerrados, (C) el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados y (D) número de entradas realizadas en cada brazo del aparato. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Prueba *t* de Student de dos colas.

3.2.3. Caja clara-oscura

En la prueba de la caja clara-oscura se valoró los niveles de ansiedad de los ratones expuestos a un ambiente nuevo e intensamente iluminado, situación que supone un elevado grado de estrés para los roedores. Los animales BMP7^{+/-} mostraron un tiempo de latencia de entrada al compartimento oscuro significativamente mayor que los animales BMP7^{+/+} ($t=2,81$, $p < 0,01$, **Figura 35A**), indicativo de fenotipo menos ansiogénico ante un ambiente de luz

intensa. Sin embargo, esta conducta menos ansiosa de los ratones deficientes en BMP7 no se acompañó de cambios significativos en el tiempo de permanencia en el compartimento claro. **Figura 35B**. Paradójicamente, el número de transiciones entre zonas, reflejo de mayor actividad espontánea durante la prueba e indicativo de un menor nivel de ansiedad, fue significativamente menor en los ratones BMP7^{+/-} ($t=3,01$, $p<0,01$, **Figura 35C**).

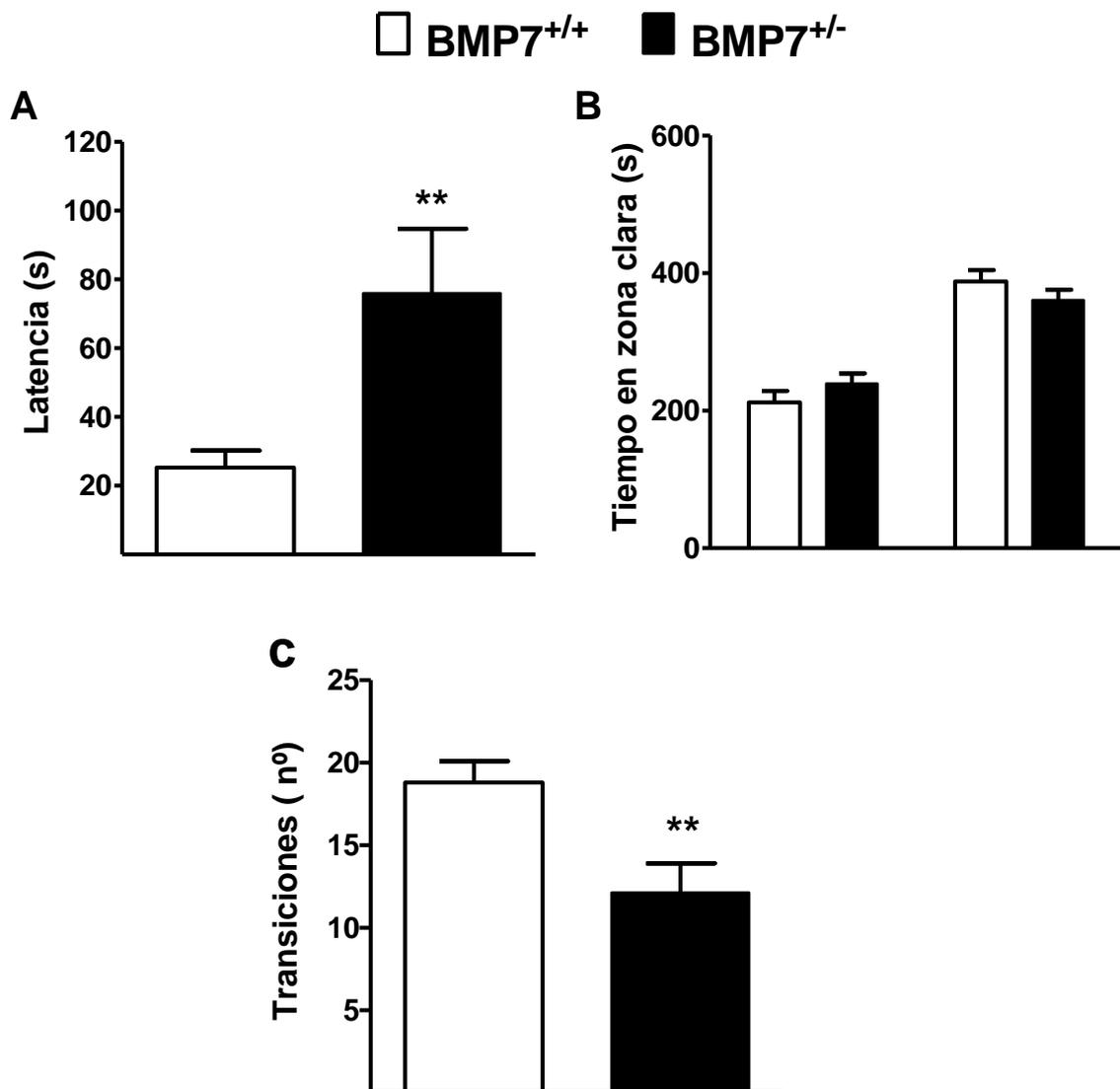


Figura 35. Efecto de la deficiencia de BMP7 en la prueba de la caja clara-oscuro. Animales BMP7^{+/+} (n=14) y BMP7^{+/-} (n=15). Las gráficas representan **(A)** la latencia de entrada en el compartimento oscuro, **(B)** el tiempo de permanencia en cada compartimento y **(C)** el número de transiciones entre compartimentos durante la prueba. ** $p<0,01$. Prueba t de Student de dos colas.

Discusión

DOMINIOS DE EXPRESIÓN DE BMP7 Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA NERVIOSO

El primer objetivo en este trabajo fue determinar los dominios de expresión de BMP7 y de sus receptores de tipo I, ALK3 (BMPR1A) y ALK6 (BMPR1B) en el SNC y periférico mediante PCR, hibridación in situ, western blot o inmunofluorescencia. Nuestros resultados ponen de manifiesto la presencia de BMP7 y/o de sus receptores en regiones estrechamente vinculadas con la transmisión y percepción nociceptiva (ganglios de la raíz dorsal, asta dorsal de la médula espinal, hipotálamo, habénula, hipocampo, amígdala, corteza cingulada, corteza somatosensorial (Flórez, 2007), y con el control de emociones como la ansiedad (corteza cingulada, núcleos de la amígdala, áreas CA1, CA2 y CA3 y giro dentado del hipocampo, núcleos talámicos e hipotálamicos (núcleo arcuado), y habénula medial (Duval y col., 2015).

Como hemos desarrollado en detalle en el Estado Actual, BMP7 tiene un papel clave durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso (Liu y Niswander, 2005), y en la vida adulta, las señales mediadas por esta citoquina ejercen importantes efectos neuroprotectores y reparadores y su desregulación participa en procesos patológicos neuropsiquiátricos (Eixarch y cols., 2017).

En esta Tesis Doctoral hemos centrado nuestra investigación en el análisis de la participación de BMP7 en procesos de dolor patológico y ansiedad en ratón. Para ello, nos hemos servido de un ratón con insuficiencia en BMP7 en heterocigosis, ya que el ratón deficiente en BMP7 en homocigosis es inviable debido a las graves alteraciones en el desarrollo renal que provocan su muerte intrauterina o en las primeras 48 horas postnatales (Dudley y Robertson, 1997; Godin y cols., 1998). Sorprendentemente, los ratones BMP7^{+/-} se desarrollan normalmente y no muestran ningún tipo de anomalía fenotípica aparente, a pesar del importante papel de BMP7 en el desarrollo del sistema nervioso y otros órganos. Ello ha sido atribuido a la suplencia de las funciones de BMP7 por parte de otros miembros de la familia en aquellos órganos con dominios de expresión compartidos (Dudley y Robertson, 1997). Ello no obsta para que dichos ratones expresen alteraciones funcionales

cuando el correspondiente órgano o sistema es sometido a una situación de estrés (Merino y cols., 2016; Chou y cols., 2008).

BMP7 Y DOLOR NEUROPÁTICO

El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico, causado por la lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial (von Hehn y cols., 2012). Algunos individuos, tras la curación de una lesión nerviosa, desarrollan un cuadro doloroso persistente caracterizado por hiperalgesia, alodinia y dolor espontáneo, que se mantienen durante meses e incluso años (Cerveró 2009) y esaltamente refractario a la terapia con analgésicos convencionales (Finnerup y cols., 2016). Entre las causas más frecuentes de dolor neuropático se encuentran los procesos traumáticos, infecciosos, tumorales, metabólicos, etc. (van Hecke y cols., 2014; Hsu y Cohen 2013). En la actualidad, carecemos de fármacos universalmente eficaces para el alivio del dolor neuropático y, los existentes no tienen capacidad para modificar el curso evolutivo del dolor, y carecen de propiedades preventivas/curativas (Dworkin y cols., 2013). La complejidad que entraña identificar las dianas más apropiadas sobre las que sustentar nuevos abordajes etiológicos para el tratamiento del dolor crónico ha condicionado que el progreso en el desarrollo de nuevos fármacos no haya dado los frutos deseados.

La plasticidad patológica del sistema nervioso que sustenta el dolor neuropático implica interacciones complejas entre factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas, aminoácidos excitadores y mediadores inflamatorios liberados por las neuronas, células gliales y células inmunes (Grace y cols., 2014). Nuestro grupo se ha centrado en el estudio del papel de las citoquinas pertenecientes a la familia TGF- β en el desarrollo de dolor neuropático (Lantero y cols., 2012). Para ello, la herramienta utilizada fueron ratones mutantes que carecen de BAMBI (BMP and Activin membrane bound inhibitor), un receptor señuelo de TGF- β s cuya deficiencia incrementa las señales celulares desencadenadas por las citoquinas de dicha familia. En el contexto del dolor neuropático, la deficiencia de BAMBI protege a los ratones de la alodinia mecánica tras la lesión del nervio ciático por un mecanismo dependiente de la actividad del sistema opioide endógeno (Tramullas y cols., 2010; Lantero y cols., 2012 y 2014).

A priori, la ausencia de BAMBI podría conferir al ratón BAMBI^{-/-} un incremento de la señalización mediada por cualquiera de las citoquinas de la superfamilia TGF- β y, por tanto, es necesario desvelar cuales de ellas podrían ser mediadoras del fenotipo antialodínico que presentan dichos ratones.

A partir de los estudios de nuestro grupo y de otros investigadores, se ha demostrado que TGF- β 1 es una de las citoquinas de la superfamilia con papel protector frente al desarrollo de dolor neuropático en modelos animales de lesión del nervio ciático (Chen y cols., 2015; Echeverry y cols., 2009; Tramullas y cols., 2010; Lantero y cols., 2012; Lantero y cols., 2014; Wang y cols., 2015). La administración de TGF- β 1 recombinante promueve la liberación de encefalinas y β -endorfina (Tramullas y cols., 2010; Lantero y cols., 2014), inhibe la reacción neuroinflamatoria espinal (Echeverry y cols., 2009; Chen y cols., 2015) y protege la integridad de la BHE (Ronaldson y cols., 2009). Además, el efecto antialodínico de la inyección intratecal de células estromales de médula ósea a ratones sometidos a lesión ciática tiene lugar a través de la secreción parácrina de TGF- β 1 en el ganglio de la raíz dorsal (Chen y cols., 2015).

Las funciones de BMPs en el ámbito de la nocicepción han sido muy escasamente estudiadas (Lantero y cols., 2012), a pesar de expresar una elevada densidad de receptores de tipo II y de tipo I (ALK3 y ALK6) en áreas del sistema nervioso estrechamente relacionadas con la transmisión, percepción y modulación de las señales nociceptivas (de la Puerta, presentes resultados; Söderström y cols., 1996; Miyagi y cols., 2011 y 2012).

BMP7 tiene efectos neuroprotectores y neuro-reparadores en el sistema nervioso sometido a agresiones, tanto en el animal de experimentación como en el humano (Harvey y cols., 2005). En esta Tesis hipotetizamos que BMP7 podría ser otra de las citoquinas de la superfamilia TGF- β implicadas en la modulación de la transmisión nociceptiva. Es por ello que, en la primera parte de este trabajo, nuestro objetivo ha estado dirigido a determinar el papel de BMP7 en el control de la percepción del dolor en modelos de dolor patológico inflamatorio, neuropático y neoplásico.

Para valorar la posible participación de BMP7 en el desarrollo de dolor neuropático, sometimos a ratones silvestres y BMP7^{+/-} a un modelo de lesión

traumática por aplastamiento del nervio ciático (Bester y cols., 2000), ampliamente validado por nuestro grupo. En nuestras manos, este modelo de neuropatía traumática muestra una gran homogeneidad de resultados en lo que al grado alodinia mecánica y el curso temporal de su desarrollo se refiere. Además, la alodinia aparece más lentamente (una semana) que con otros modelos de lesión ciática (Tramullas y col., 2010; Lantero y col., 2014). Todo ello facilita la valoración de fenotipos hiperalgésicos en los que el curso temporal del desarrollo de alodinia se acelera. Tras la lesión del nervio ciático, los animales BMP7^{+/-} desarrollaron alodinia mecánica antes que los ratones silvestres y mantuvieron umbrales nociceptivos inferiores durante todo el periodo de seguimiento. Estos resultados sugieren un papel protector de BMP7 frente al desarrollo de dolor neuropático. El fenotipo hiperalgésico de los ratones BMP7^{+/-} también asoció una sensibilidad reducida a la acción analgésica de la morfina. En los ratones silvestres, la administración de 3 mg de morfina, cuando el animal había alcanzado el nivel máximo de dolor neuropático tras la lesión del nervio ciático, consiguió revertir completamente la alodinia mecánica, normalizando el umbral nocifensivo. Por el contrario, los ratones BMP7^{+/-} neuropáticos no respondieron en absoluto a la dosis de 3 mg/kg de morfina, y el efecto analgésico de la dosis de 6 mg/kg fue significativamente menor que en los animales silvestres. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que BMP7 recombinante induce la transcripción de los péptidos precursores de β -endorfina (POMC) y encefalinas (PENK) en cultivos organotípicos de explantes de médula espinal (Tramullas y cols., 2010). Sugerimos que la deficiencia en BMP7 podría estar limitando la actividad de los sistemas endógenos moduladores del dolor, dependientes de opioides endógenos. Esta hipótesis se vería reforzada por la menor sensibilidad al efecto analgésico de la morfina que presentan los animales BMP7^{+/-} neuropáticos.

Otros autores, en cambio, cuando sobreexpresan BMP7 en el nervio ciático y su ganglio de la raíz dorsal y en el asta dorsal lumbar, mediante terapia génica con un vector adenoviral, no observan modificaciones en la hiperalgesia inducida por la lesión traumática del nervio ciático, a pesar de que dicho

tratamiento facilita la recuperación histológica y funcional del nervio (Tsai y cols., 2010)

Varios estudios demuestran efectos neuroprotectores inducidos por BMP7 en situaciones variadas de daño del SNC. En modelos experimentales de hipoxia/isquemia cerebral, la administración de BMP7 recombinante reduce el tamaño del área infartada y la mortalidad de las ratas (Perides y cols. 1998; Lin y cols., 1999; Chang y cols., 2002; Schallert y cols., 2010; Guan y cols., 2013; Luan y cols., 2015). Además, la administración central de BMP7, transcurridas 24 horas desde el infarto cerebral, promueve una mejor recuperación sensoriomotora del animal (Kawamata y cols., 1998; Chang y cols., 2003). La sobreexpresión de BMP7 en el SNC utilizando un vector adenoviral protege las neuronas corticales del estrés oxidativo y de la apoptosis inducida por la isquemia cerebral y reduce el área infartada en ratones (Heinonen y cols., 2014). En ratas sometidas a isquemia cortical, el implante de tejido renal fetal, que es extraordinariamente rico en BMP7, reduce la apoptosis mediada por caspasa-3 y el área infartada (Chang y cols., 2002).

BMP7 se ha postulado como citoquina neuroprotectora y neurorreparadora modelos de enfermedad de Parkinson inducida farmacológicamente con 6OH-dopamina o metanfetamina, en ratas (Harvey y cols., 2004) y en ratones BMP7^{+/-} (Chou y cols., 2008). Estos hallazgos son consistentes con la expresión reducida de BMP7 en el LCR de pacientes con enfermedad de Parkinson (Hosseini-Nezhad y cols., 2016).

En modelos de lesión traumática de la médula espinal la administración de BMP7 recombinante protege frente a la excitotoxicidad del glutamato y promueve la supervivencia de neuronas y células gliales de la zona lesionada (de Rivero Vaccari y cols., 2009).

Miembros de la familia BMP también han mostrado efectos neurorreparadores y neurorregenerativos en el adulto con potencial interés de cara a la medicina regenerativa en procesos de lesión traumática medular o de nervios periféricos (Noble y cols., 2011; Sahni y cols., 2010). En ratones sometidos a lesión por aplastamiento del nervio ciático, la sobreexpresión de BMP4 en los ganglios dorsales lumbares, mediante infección con un vector adenoviral administrado por vía intratecal, atenúa el proceso de degeneración

de las aferencias sensoriales y promueve la regeneración axonal (Parikh y cols., 2011). De forma similar, en ratas sometidas a lesión traumática de la médula espinal, el implante de astrocitos obtenidos de células precursoras gliales embrionarias sometidas a pretratamiento con BMP4 promueve la supervivencia neuronal, regeneración axonal, y la recuperación funcional, (Macías y cols., 2006; Davies y cols., 2008; Davies y cols., 2011). Sin embargo, ninguna de estas intervenciones modifica la percepción somatosensorial de los animales.

En general, son muy pocos los estudios que analizan los efectos de citoquinas de la familia BMP sobre la transmisión y procesamiento de los impulsos nociceptivos. Sólo BMP2 ha sido estudiada en este contexto, y su efecto es opuesto al de BMP7. Así, BMP2 recombinante desencadena una respuesta neuroinflamatoria que produce alodinia en ratas. En la clínica, se ha propuesto que la penetración intratecal de BMP2 recombinante durante los procedimientos de artrodesis espinal podría ser responsable de la aparición de radiculitis y dolor neuropático en algunos pacientes (Dmitriev y cols., 2011; Lykissas y cols., 2014).

Así pues, en el momento actual, TGF- β 1 y BMP7 son las únicas citoquinas de la familia TGF- β que han mostrado propiedades antialodínicas en el animal de experimentación. Los resultados de esta Tesis han abierto en nuestro laboratorio una línea de investigación destinada a aclarar los mecanismos implicados en este novedoso efecto de BMP7. En particular dirigiremos nuestra atención al análisis de la participación del sistema opioide endógeno, puesto que trabajos anteriores de nuestro grupo demostraron que BMP7 induce la expresión génica de POMC en la médula espinal (Tramullas y cols., 2010).

BMP7 y analgesia inducida por el ejercicio

El ejercicio es una forma común de tratamiento del dolor musculoesquelético, tanto agudo como crónico, que ha mostrado efectos beneficiosos en términos de reducción del dolor, y mejoría funcional tanto física como anímica, en la población general sana y en algunas patologías osteoarticulares inflamatorias.

El incremento en el umbral nociceptivo producido por el ejercicio se atribuye a una activación de las vías descendentes inhibitorias del dolor a

través, fundamentalmente, de la liberación de opioides endógenos, endocannabinoides, serotonina, citoquinas y factores de crecimiento, y glucocorticoides (Cooper y cols., 2016; Lima y cols., 2017). Este podría ser un mecanismo relevante clínicamente, ya que los pacientes con dolor crónico muestran un desequilibrio de los sistemas descendentes de modulación del dolor a favor de los sistemas proalgésicos (Denk y cols., 2014).

Nuestro siguiente objetivo en esta Tesis fue valorar si una intervención mediante ejercicio voluntario mantenido en los ratones es capaz de modificar el desarrollo de alodinia (curso temporal y/o intensidad) tras la lesión del nervio ciático y, si así fuera, estudiar la implicación de BMP7. Para ello, sometimos a los animales a ejercicio físico voluntario en una rueda de actividad, desde las 48 horas previas a la lesión nerviosa hasta el momento del sacrificio (14 días tras la lesión). Valoramos el umbral de respuesta a estímulos sensoriales mecánicos y el desarrollo de alodinia tras la lesión del nervio ciático. Se monitorizaron diariamente el tiempo de permanencia en la rueda y la distancia recorrida por los ratones, así como la sensibilidad táctil a estímulos mecánicos en el territorio inervado por el nervio lesionado. En ningún momento, a lo largo del periodo de estudio, se observaron diferencias significativas entre genotipos en el ejercicio realizado por los ratones. En los animales silvestres, nuestros resultados ponen de manifiesto que la intervención con una pauta de ejercicio físico, voluntario y mantenido, reduce moderada pero significativamente el grado de hipersensibilidad a estímulos mecánicos táctiles durante todo el periodo de seguimiento tras la lesión neural. Por el contrario, los animales deficientes en BMP7 no ven modificado ni el curso temporal ni el grado de alodinia mecánica desarrollada tras el aplastamiento del nervio ciático. Estos resultados sugieren que BMP7 participa de forma relevante en el efecto antialodínico inducido por el ejercicio físico mantenido. Para confirmarlo, un grupo de animales silvestres sometidos a lesión del nervio ciático fueron tratados con BMP7 recombinante administrada en infusión continua por vía subcutánea y, simultáneamente, expuestos a ejercicio voluntario. Confirmando el papel facilitador ejercido por BMP7 sobre la analgesia inducida por el ejercicio, los ratones sometidos a lesión ciática

expuestos a ejercicio físico y tratados con BMP7 no llegaron a desarrollar alodinia mecánica durante un periodo de seguimiento de dos semanas.

En el animal de experimentación, el ejercicio voluntario o forzado ha mostrado reducir la hiperalgesia y la alodinia desarrolladas en modelos de dolor neuropático inducido por paclitaxel (Park y cols., 2015), estreptozotocina y otros modelos de diabetes (Chen y col., 2013; Groover y cols., 2013; Yoo M. y col., 2015), lesión nerviosa periférica (Molteni y col., 2004; Seo y col., 2009; Stagg y cols., 2011; Bobinsky y cols., 2011; Chen y cols., 2012; Shen y cols., 2013; López-Álvarez y col., 2015), y lesión medular (Hutchinson y col., 2004; Sharma y col., 2014).

En los diversos modelos experimentales se han descrito: (i) aumentos de opioides endógenos en la sustancia gris periacueductal (SGPA) y bulbo rostral ventromedial (BRVM) (Stagg y cols., 2011; Kim y cols., 2015); (ii) incrementos en la producción de GABA por las interneuronas del asta dorsal de la médula (Kami y cols., 2016); (iii) actividad incrementada de la vía dopaminérgica que conecta el área tegmental ventral con el núcleo accumbens (Wakaizumi y cols., 2016); (iv) actividad incrementada de la neurotransmisión serotoninérgica en el tronco del encéfalo (Bobinsky y cols., 2015); (v) Actividad incrementada del sistema adenosinérgico (Martins y cols., 2013); (vi) incremento de niveles séricos de endocannabinoides (Dietrich y McDaniel, 2004); y (vii) fosforilación reducida de receptores NMDA en la región bulbar rostro-ventral (da Silva y cols., 2010).

El uso terapéutico del ejercicio en la clínica, dirigido específicamente al tratamiento del dolor neuropático es un campo muy reciente, pero en expansión, aunque los resultados son variables. El ejercicio agudo no induce analgesia en pacientes con neuropatía diabética dolorosa, en contraste con los pacientes diabéticos sin dolor neuropático (Knauf y Koltyn, 2014). Sin embargo, los programas mantenidos de ejercicio aeróbico reducen la percepción de la interferencia del dolor en su vida cotidiana por parte de los pacientes (Yoo y cols., 2015). También hay trabajos en los que el ejercicio reduce la severidad del dolor, incrementa la inervación cutánea y mejora la conducción neural (Fisher y cols., 2007; Kluding y cols., 2012, 2015), todo ello acompañado de efectos positivos sobre el estado vascular (Billinger y cols., 2017). Del mismo

modo, los pacientes con fibromialgia, a pesar de referirse al ejercicio agudo como desencadenante de dolor y agravante de sus síntomas negativos, estudios recientes muestran que el ejercicio mantenido mejora la calidad de vida de estos pacientes (Nijs y cols., 2012; Daenen y cols., 2015). En pacientes cancerosos con neuropatía inducida por quimioterápicos neurotóxicos, el ejercicio moderado-vigoroso se ha mostrado eficaz reduciendo el dolor neuropático comparado con duloxetina, sin provocar efectos negativos (Majithia y cols., 2016). En pacientes con síndrome de dolor regional complejo, el ejercicio terapéutico no ha mostrado eficacia para el alivio del dolor (Smart y cols., 2016).

Como modelo global, se ha propuesto que, en presencia de dolor crónico, el ejercicio agudo promueve exacerbación del dolor debido a un incremento de la actividad descendente excitadora consecuencia de una hiperfosforilación de receptores NMDA en el tronco cerebral. Por el contrario, el ejercicio regular promueve alivio del dolor crónico a través de la activación de los sistemas endógenos serotoninérgico, opioide y cannabinoide en las vías descendentes inhibitoras del dolor (Lima y cols., 2017).

Nuestro estudio desvela la importancia de la citoquina BMP7 en el mecanismo facilitador de la analgesia mediada por ejercicio físico, y especulamos con la implicación del sistema opioide endógeno, aspecto que nos planteamos esclarecer en los próximos meses.

BMP7 y dolor químico inflamatorio

Para valorar la posible participación de BMP7 en el desarrollo de dolor químico-inflamatorio, sometimos a ratones silvestres y BMP7^{+/-} a la prueba de la formalina. Se trata de un modelo de inflamación localizada, que está a caballo entre los modelos de dolor agudo y crónico. Tras la inyección de 20 µl de formalina al 2% se valora el trabajo activo del animal para paliar el dolor mediante el lamido de la zona afectada, y parámetros reflejos, como son las sacudidas de las extremidades. Este test desencadena una respuesta bifásica conductual: la primera fase refleja el dolor nociceptivo provocado por la irritación química de los nociceptores por la formalina subcutánea; y la segunda fase es dependiente del proceso inflamatorio y subsiguiente sensibilización espinal (Ortega y cols., 2002). Está considerado un excelente modelo de dolor

prolongado de moderada intensidad, que se asemeja al dolor de la inflamación local en humanos.

Nuestros resultados indican que la deficiencia en BMP7 no modifica la respuesta nocifensiva de los ratones tras la administración de formalina en la superficie plantar. Sin embargo, aunque la prueba de la formalina permite detectar fácilmente efectos analgésicos, resulta complicado detectar hiperalgesia, que es la respuesta que cabría esperar de la deficiencia en BMP7. En nuestro laboratorio hemos intentado optimizar esta prueba para valorar efectos pro-álgicos, disminuyendo la concentración de formalina. Pero la respuesta del animal a la formalina no es dosis-dependiente, y no conseguimos un nivel moderado de respuestas nocifensivas susceptibles de ser potenciadas mediante intervenciones farmacológicas (Velategui, 2015). Por lo tanto, para concluir que BMP7 no participa en la modulación del dolor inflamatorio es preciso un análisis ulterior más amplio

BMP7 y dolor neoplásico

Los pacientes con cáncer en estadios avanzados sufren intensos síntomas dolorosos, con una prevalencia que llega al 90% en algunos tipos de tumores (Mercadante, 2016). Entre los dolores cancerosos más frecuentes y difíciles de tratar se encuentra el asociado a los tumores óseos, bien sean primarios o metástasis de tumores primarios de próstata, mama y pulmón, fundamentalmente. Más del 80% de los pacientes con metástasis óseas padecen un dolor que es particularmente resistente a los tratamientos convencionales y es sumamente invalidante (Smith y Barkin, 2014). El dolor tumoral óseo es permanente, incrementa de intensidad conforme progresa la enfermedad y se acompaña de episodios agudos de un dolor irruptivo de intensidad extrema (Mercadante, 2016).

Nuestro siguiente objetivo fue valorar el papel de BMP7 en el desarrollo de dolor oncológico mediante la inducción de un tumor óseo en los ratones BMP7^{+/-}. Para ello inoculamos en la meseta tibial de los ratones la línea celular B16-F10 derivada de melanoma (Sabino et al., 2003). Esta línea celular origina un patrón mixto de lesión, donde las lesiones osteolíticas conviven con los procesos osteogénicos. En este modelo de dolor oncológico, los ratones desarrollan hiperalgesia y alodinia dentro de la primera semana tras la

inoculación de las células tumorales (Curto-Reyes et al., 2008; Pevida y cols., 2012). En nuestro estudio, valoramos la sensibilidad táctil mecánica de la pata afectada por el tumor una semana después de la inoculación celular. No observamos diferencias entre genotipos en el desarrollo de hiperalgesia mecánica inducida por el desarrollo del tumor óseo.

No obstante, antes de confirmar la ausencia de un papel relevante para BMP7 en la modulación del dolor óseo neoplásico, debemos confirmar que el rápido desarrollo de intensa alodinia en este modelo pudiera dificultar la detección de fenotipos hiperalgésicos. Sería necesario confirmar los resultados en otro modelo tumoral menos agresivo.

Aunque escapa del ámbito de este estudio, no podemos dejar de comentar el papel de la señalización de BMPs en la génesis y progresión de tumores, ya que la deficiencia en BMP7 en el tejido óseo que rodea a las células cancerosas implantadas podría modificar su velocidad de crecimiento y/o propiedades invasivas. Existen numerosos estudios que analizan la implicación de las señales mediadas por BMPs en el cáncer. En particular, BMP2, BMP4 y BMP7, susreceptores y actividad de señalización se expresan en numerosos tipos tumorales: mama, próstata, osteosarcoma, glioma, ovario, páncreas, pulmón, etc. En general, se considera que BMPs promueven tumorigénesis y metástasis en los carcinomas de mama, próstata y pulmón, en el astrocitoma, y en el osteosarcoma. Sin embargo, existen estudios que ponen de manifiesto resultados opuestos, probablemente en relación con los efectos típicamente contextuales de esta familia de citoquinas. Así, una misma BMP se ha observado que puede ejercer un efecto supresor tumoral o procancerígeno, dependiendo de la dosis, el tipo celular o tisular, así como del ambiente circundante (Jiramongkolchai y cols., 2016; Zhang y cols., 2016). Esta disparidad de resultados hace que, aun reconociéndose la enorme relevancia biológica de BMPs en este contexto, todavía no se entienda con precisión su papel en la génesis, crecimiento y capacidad metastásica de los tumores.

PAPEL DE BMP7 EN LA ANSIEDAD

El dolor crónico se acompaña, con extraordinaria frecuencia, por comorbilidades y factores que se retroalimentan entre sí; la denominada triada del dolor está conformada por dolor, trastornos emocionales (ansiedad,

depresión, etc.) y trastornos del sueño. El trastorno por ansiedad acompaña a los pacientes con dolor crónico de forma insidiosa e invalidante. En los últimos 20 años, numerosas publicaciones han centrado su objetivo en el estudio de dicha comorbilidad con dolor crónico neuropático (Asmundson y cols., 2009). Así, numerosos estudios han mostrado que pacientes con dolor neuropático (Nicholson and Verma, 2004), neuralgia postherpética (McCarberg, 2003), fibromialgia (Gormsen y cols., 2009), artritis reumatoide (Ryan y McGuire, 2016), dolor de espalda (Atkinson y cols., 1991; Kinney y cols., 1993; McWilliams y cols., 2004; Von Korff y cols., 2005; Raphael y cols., 2006; Demyttenaere y cols., 2007) o migraña presentan niveles de ansiedad mayores que los pacientes libres de dolor. En animales de experimentación, los niveles de ansiedad son fácilmente evaluados utilizando pruebas conductuales en las que se enfrenta al animal a un conflicto entre su tendencia innata por explorar ambientes nuevos y su aversión natural a espacios abiertos e iluminados (Goyld, 2009). Las pruebas de campo abierto y laberinto elevado en cruz son muy utilizadas para la valoración de la ansiedad no condicionada (Treit y cols., 1993, Walf y cols., 2007). Nuestro siguiente objetivo fue valorar si la deficiencia de BMP7 tiene consecuencias sobre el comportamiento exploratorio de los animales en dichas pruebas. Nuestros resultados sugieren que la deficiencia de BMP7 confiere a los ratones BMP7^{+/-} un fenotipo menos ansioso que el de los animales silvestres. En la prueba del campo abierto, se valora la respuesta de los ratones ante una situación estresante, como es la exposición a una superficie abierta e iluminada por una fuente de luz de intensidad controlada. En esta prueba, la actividad horizontal en la zona central versus la periferia del aparato, junto con el número de intentos de huida (alzamientos), nos permiten valorar el nivel de ansiedad provocado a los ratones. Los ratones BMP7^{+/-}, comparados con sus compañeros de camada silvestres, realizaron un número menor de alzamientos totales (actividad vertical) y desarrollaron una actividad horizontal superior por el centro del aparato y menor por la periferia. Estas diferencias conductuales son sugestivas de un menor nivel de ansiedad. Se trata de un efecto específico dado que no se observaron diferencias significativas en la actividad general de los ratones, determinada en esta misma prueba.

Cuando se analizaron las respuestas de los ratones en el laberinto elevado en cruz, la deficiencia en BMP7 también determinó un nivel menor de ansiedad. En esta prueba, los ratones son expuestos a un ambiente nuevo con dos zonas bien diferenciadas: una aversiva por ser potencialmente insegura (los brazos abiertos), y otra segura (los brazos cerrados). La distancia recorrida y/o el tiempo de permanencia en los brazos cerrados, junto con el número de entradas en los brazos cerrados y en los brazos abiertos, nos permiten determinar el nivel de ansiedad del animal. En comparación con los animales silvestres, los animales BMP7^{+/-} recorrieron un porcentaje de distancia mayor en los brazos abiertos y, consecuentemente, permanecieron más tiempo en dichos brazos que en los cerrados. No hubo diferencias entre genotipos en el número de entradas en los brazos cerrados, pero los animales deficientes en BMP7 realizaron un mayor número de entradas en los brazos abiertos. Estos resultados indican que los ratones BMP7^{+/-} desarrollan niveles más bajos de ansiedad que sus homólogos silvestres cuando son enfrentados a espacios potencialmente aversivos. La distancia total recorrida durante la prueba fue similar en ambos grupos de animales, lo que confirma la ausencia de diferencias entre genotipos en la actividad locomotora global.

En la misma línea que nuestros hallazgos, estudios previos han mostrado un papel crucial de la vía de señalización de BMPs en la modulación de la ansiedad. Los ratones portadores de una mutación del receptor de tipo II para BMPs (BMPRII) o de Smad4, delimitadas al prosencéfalo, muestran un fenotipo menos ansioso en la prueba del laberinto elevado en cruz (McBrayer y cols., 2015). Asimismo, una mutación condicionada del receptor de tipo II de BMPs (BMPRII) en las células progenitoras neurales del giro dentado determina una disminución de los niveles de ansiedad en las pruebas del campo abierto y laberinto elevado en cruz, sin afectar a la actividad general de los ratones. Además, tanto la sobreexpresión génica del inhibidor de BMPs, noguina, en el hipocampo, como su administración intracerebroventricular ejercen un efecto ansiolítico en los ratones (Brooker y cols., 2016).

En línea con estos resultados, ratones portadores en el telencéfalo dorsal de una doble mutación, una constitutiva del receptor de tipo Ib (BMPRIb) y otra condicionada del receptor BMPRIa (ALK3), muestran menos niveles de

ansiedad en la prueba del laberinto elevado en cruz. Los ratones no muestran alteraciones en su actividad general (horizontal y vertical) ni en su actividad espontánea (Caronia, et al 2010). La menor señalización a través de BMPs de estos animales favorece la neurogénesis en el hipocampo adulto (Brooker y cols., 2016, Caronia y cols., 2010), que se ha relacionado con protección frente a los trastornos por ansiedad (Kheirbek y cols., 2012). En contraste, la hipofunción de BMPs en estos animales tiene efectos deletéreos sobre la conducta en la prueba de condicionamiento del miedo a un contexto (proceso dependiente del hipocampo), o a un tono (proceso dependiente de la amígdala) (Caronia et al., 2010).

En el presente estudio, también hemos analizado la conducta en la caja clara–oscura, otra prueba extensamente utilizada para valorar niveles de ansiedad (Jacobson, y cols., 2007). En la caja clara-oscura se valoran los niveles de ansiedad de los ratones expuestos a un ambiente nuevo e intensamente iluminado, situación que supone un elevado grado de estrés para los roedores. En esta prueba, son indicadores de una conducta ansiosa una mayor permanencia en el compartimento oscuro, una menor latencia de entrada en el compartimento oscuro, y un menor número de transiciones de un compartimento a otro. En nuestro estudio, los resultados obtenidos en esta prueba son imprecisos. Por un lado, la deficiencia de BMP7 determinó un incremento en la latencia de entrada al compartimento oscuro, que es indicativo de un fenotipo menos ansioso ante un ambiente de luz intensa. Sin embargo, esta conducta menos ansiosa no se acompañó de un incremento en el tiempo de permanencia en el compartimento claro. Además, el número de transiciones entre zonas fue menor en los ratones BMP7^{+/-}, lo que refleja una menor actividad espontánea y un mayor nivel de ansiedad. Estas inconsistencias podrían ser debidas a que la intensidad de luz empleada fuera excesivamente ansiogénica e impidiera establecer diferencias entre genotipos debido un efecto techo. Es conocido que en las pruebas conductuales, diferencias en la intensidad de la luz empleada como estímulo aversivo condicionan diferentes niveles de ansiedad en las respuestas de los animales (Finger y cols., 2010). También podría existir variabilidad en las respuestas dependiendo de la prueba utilizada (Ageta y cols., 2008).

Otros miembros de la superfamilia TGF- β y sus respectivas vías de señalización también se han visto implicados en los procesos cognitivos asociados al trastorno de ansiedad (Ageta y cols., 2008;Zheng y cols., 2009;Low y cols., 2017)

Con el fin de descartar cualquier alteración motora que pudiera interferir con los resultados previamente obtenidos, realizamos la prueba del rotarod. Esta prueba nos permite evaluar la coordinación motora. Un déficit motor podría condicionar la movilidad de los animales en las pruebas conductuales y, de este modo, falsear la interpretación de los resultados obtenidos. En este estudio, la deficiencia de BMP7 no modificó la coordinación motora. Aunque la bibliografía es escasa en relación con las consecuencias que la familia de BMPs o su vía de señalización podría tener sobre la coordinación motora, estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que la deficiencia de BAMBI no interfiere con la coordinación motora (Tramullas y cols., 2010). La deficiencia de Smad3 o Smad 5, proteínas efectoras de la vía de señalización de BMPs, tampoco induce alteraciones en la coordinación motora (Weinstein y cols., 2000).

Nuestros hallazgos nos permiten postular un papel relevante para BMP7 en la ansiedad no condicionada. Los mecanismos que podrían justificar la disminución de los niveles de ansiedad observada en los animales BMP7^{+/-} son variados.

En primer lugar, la deficiencia de BMP7 podría condicionar una disminución de la señalización mediada por esta citoquina y originar un incremento de la neurogénesis en el hipocampo. Las vías de BMPs juegan un papel crítico en la regulación de los procesos de neurogénesis en el adulto; su inhibición determina la activación de las células madre neurales e incrementa la neurogénesis (Bonaguidi y cols., 2008; Bond y cols., 2014). Estudios recientes postulan que alteraciones en los procesos de neurogénesis en el hipocampo adulto, no solo condicionan déficits en los procesos de memoria y aprendizaje, sino que, además, están implicados de forma directa en la etiología de la depresión, la ansiedad y otras patologías neuropsiquiátricas (Snyder y cols., 2011, Ouchi y cols., 2013). Entre una de las rutas de señalización más estudiadas se encuentra la vía de señalización de BMPs, implicada en la

modulación de la función de las células madre neurales en el hipocampo, encargadas de generar nuevas neuronas (Mira y cols., 2010, Lim y cols., 2000; Colak y cols., 2008; Bonaguidi y cols., 2008).

Otro mecanismo plausible podría estar relacionado con una menor producción de proopiomelanocortina (POMC) en el núcleo arcuado del hipotálamo, como consecuencia de la deficiencia de BMP7. Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que la deficiencia del pseudorreceptor BAMBI determina un incremento en la expresión de POMC espinal; además, BMP7 induce un incremento en la expresión génica de POMC en cultivos organotípicos de médula espinal (Tramullas y cols., 2010). En consonancia con estos resultados, la administración intracerebroventricular de BMP7 incrementa los niveles de expresión génica de POMC en el núcleo arcuado del hipotálamo (Kristy y cols., 2012). POMC es la proteína precursora de moléculas que forman parte del eje hipotálamo-hipofisario (adenocorticotropina (ACTH) y β -endorfina), y está implicada de forma directa en la respuesta al estrés y en los trastornos del estado de ánimo y la ansiedad (Raffin-Sanson y cols., 2003, Swaab y cols., 2005). Unos niveles disminuidos de POMC en nuestros ratones BMP7^{+/-} podrían determinar niveles menores de ACTH liberada en respuesta a situaciones estresógenas. Un estudio reciente ha identificado y validado a POMC como gen diana de miR-488. Este miRNA está altamente desregulado en una población de pacientes con trastornos de pánico y ansiedad (Muiños-Gimeno y cols., 2011). Nuestro interés futuro está dirigido a esclarecer los mecanismos implicados en la acción ansiolítica de BMP7 descrita en nuestro estudio, particularmente en lo que se refiere a este último mecanismo.

Conclusiones

1. BMP7 y sus receptores de tipo I, ALK3 (BMPR1A) y ALK 6(BMPR1B), se localizan en el sistema nervioso del ratón, en áreas relevantes para el control nociceptivo y de conductas ansiosas.
2. La deficiencia de BMP7 en heterocigosis condiciona un fenotipo hiperalgésico frente a estímulos mecánicos en el modelo de dolor crónico neuropático inducido por lesión del nervio ciático.
3. El efecto antinociceptivo de la morfina está reducido en los ratones deficientes de BMP7 sometidos a dolor neuropático mediante lesión del nervio ciático.
4. El ejercicio físico voluntario tras la lesión del nervio ciático atenúa la alodinia mecánica en los ratones silvestres, pero no la modifica en los animales deficientes en BMP7.
5. El tratamiento crónico con la proteína BMP7 recombinante potencia el efecto antialodínico del ejercicio tras la lesión del nervio ciático en los ratones silvestres.
6. La deficiencia de BMP7 no tiene consecuencias en la respuesta nocifensiva provocada por estímulos de tipo químico/inflamatorio.
7. La deficiencia de BMP7 no modifica el desarrollo de dolor neoplásico.
8. La deficiencia en BMP7 condiciona un fenotipo conductual menos ansioso en las pruebas de campo abierto y del laberinto elevado en cruz.
9. La deficiencia en BMP7 no afecta la actividad general ni la coordinación motora determinada en el rotarod.

Bibliografía

- Ageta H, Murayama A, Migishima R, Kida S, Tsuchida K, Yokoyama M, et al.: Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS One*. (2008); 3(4): e1869.
- Ali IH, Brazil DP: Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses. *Br. J. Pharmacol*. (2014); 171(15): 3620-32.
- Ali IHA: Bone morphogenetic proteins and their antagonists: current and emerging clinical uses. *British Journal of Pharmacology* (2014); 171(15): 3620-3632.
- Apkarian AV, Hashmi JA, Baliki MN: Pain and the brain: Specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain* (2011);152: 49–64.
- Asmundson GJ, Katz J: Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. *Depress Anxiety* (2009); 26(10):888-901.
- Aurilio C, Pota V, Pace MC, Passavanti MB: Los canales iónicos y dolor neuropático: Fisiopatología y aplicaciones (2008); 215 (1):8-14.
- Bair MJ, Wu J, Damush TM, Sutherland JM, Kroenke K. Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patients. *Psychosom Med* (2008); 70(8):890–7.
- Baron R, Binder A, Wasner G : Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neur*. (2010); 8:807-19.
- Baron R: Mechanisms of disease: neuropathic pain, a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol*. (2006); 2(2):95-106.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D: Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* (2009); 139:267–284.
- Benarroch MD: Canales iónicos en nociceptores. *American Academy of Neurology* (2015); 84:31-42.
- Bester H, Beggs S, Woolf CJ: Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *Journal of Comparative Neurology* (2000); 428(1), 45-61.
- Bier E, De Robertis EM: Embryo development. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science*. (2015); 348(6242): aaa5838.
- Billinger SA, Sisante JV, Alqahtani AS, Pasnoor M, Kluding PM: Aerobic exercise improves measures of vascular health in diabetic peripheral neuropathy. *Int J Neurosci*. (2017); 127(1): 80-85).
- Bishop SJ: Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. *Trends Cogn Sci*. (2007); 11:307-16.
- Bobinsky F, Ferreira TA, Córdova MM, Dombrowski PA, da Cunha C, Santo CC, Poli A, Pires RG, Martins-Silva C, Sluka KA, Santos AR. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on

- neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain* (2015); 156 (12): 2595-606.
- Bobinsky F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG, et al.: Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience* (2011) 194: 337–348.
- Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T, Falciglia G, Gobeske KT, Czeisler C et al.: Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* (2008); 28(37): 9194-204.
- Bond AM, Peng CY, Meyers EA, McGuire T, Ewaleifoh O, Kessler JA: BMP signaling regulates the tempo of adult hippocampal progenitor maturation at multiple stages of the lineage. *Stem Cells* (2014); 32: 2201–2214.
- Bonin RP, Bories C, & De Koninck Y: A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Molecular Pain* (2014); 10(1), 26.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. and Nohe, A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* (2011); 23: 609-620.
- Brazil DP, Church RH, Surrae S, Godson C, Martin F: BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol.* (2015); 25(5): 249-64.
- Breivik H, Borchgrevink PC, Allen SM, Rosseland LA, Romundstad L, Hals EK, Kvarstein G, Stubhaug A: Assessment of pain. *Br J. Anaesth.* (2008); 101 (1): 17-24.
- Breivik H, Collett B. et al.: "Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment." *Eur J Pain* (2006) 10(4): 287-333.
- Brenner J, Ru-Rong Ji, Shaffer S, Woolf CJ: Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site, serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons. *Europ. Journal Neur.* (2004); 20(2):375–384.
- Bridges D, Thompson S, Rice A: Mechanism of neuropathic pain. *Bri J Anaesth* (2001) 87: 12-26.
- Brooker SM, Gobeske KT, Chen J, Peng C-Y, Kessler JA: Hippocampal bone morphogenetic protein signaling mediates behavioral effects of antidepressant treatment. *Molecul. Psychiatry* (2016); 00:1–10.
- Burnstock G: Purinergic mechanisms and pain: an update. *Eur. J. Pharmacol.* (2013); 716:24–40.
- Bustamante JL, Arévalo RP, Lafata JM, Medina L, Herrera JM, Martin C: Estudio prospectivo de microcirugía experimental en neurorrafias con tensión. *Rev. Argent. Neuroc.* (2015); 29:11-38.
- Cajal SR: *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.* Paris: Maloine (1909).
- Campbell JN, Meyer RA: Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* (2006); (5) 52:77-92.

- Caronia G, Wilcoxon J, Feldman P, Grove EA: Bone Morphogenetic Protein Signaling in the Developing Telencephalon Controls Formation of the Hippocampal Dentate Gyrus and Modifies Fear-Related Behavior. *Journal of Neuroscience* (2010); 30(18):6291– 6301 • 6291.
- Cerveró F, Laird LM: Fisiología del Dolor. En L. Aliaga, JL. Baños, de Barutell C, Mollet J, Rodríguez de la Serna A. (Eds.). *Tratamiento del dolor: Teoría y Práctica* (2002) (2ªed.p.9-25) Barcelona, P. Permanyer SL.
- Cerveró F: Spinal cord hyperexcitability and its role in pain and hyperalgesia. *Exp Brain Res.* (2009); 196(1):129-37.
- Chang CF, Lin SZ, Chiang YH, Morales M, Chou J, Lein P, Chen HL, Hoffer BJ, Wang Y: Intravenous administration of bone morphogenetic protein-7 after ischemia improves motor function in stroke rats. *Stroke.*(2003); 34(2): 558-64.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM: Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocrine reviews.* (2002); 23(6): 787-823.
- Chen W, Zheng R, Zeng H, Zhang S, He J: Annual report on status of cancer in China, 2011. *Chinese journal of cancer research* (2015); 27(1), 2-12.
- Chen YW, Chiu CC, Hsieh PL, Hung CH, Wang JJ: Treadmill training combined with insulin suppresses diabetic nerve pain and cytokines in rat sciatic nerve. *Anesth Analg.* (2015); 121(1):239-46.
- Chen YW, Li YT, Chen YC, Li ZY, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesth. Analg.* (2012); 114(6): 1330-7.
- Chen YW, Hsieh PL, Chen YC, Hung CH, Cheng JT : Physical exercise induces excess hsp72 expression and delays the development of hyperalgesia and allodynia in painful diabetic neuropathy rats. *Anesth Analg.* (2013); 116(2):482-90.
- Cheng X, Wang Y, He Q, Qiu M, Whittemore SR, Cao Q: Bone morphogenetic protein signaling and olig1/2 interact to regulate the differentiation and maturation of adult oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cells* (2007); 25(12): 3204-14.
- Chou KC, Shen HB: Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nature protocols* (2008); 3(2): 153-162.
- Cobianchi S, Casals-Diaz L, Jaramillo J, Navarro X: Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Exp Neurol.* (2013); 240:157-67.
- Colak D, Mori T, Brill MS, Pfeifer A, Falk A, Deng C, Monteiro R, Mummery C, Sommer L, Götz M: Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenetic protein signaling in stem cells *J. Neurosci.* (2008); 28:434–446.

- Cooper MA, Kluding PM, Wright DE: Emerging Relationships between Exercise, Sensory Nerves, and Neuropathic Pain. *Front. Neurosci.* (2016); 10:372.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ: Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* (2009); 32:1-32.
- Craig, AD: "How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body." *Nat. Neurosci.* (2002); 3(8): 655-66.
- Crawley J, Goodwin FK: Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* (1980); 13:167-70.
- Curto-Reyes V, Juárez L, García Pérez E, Fresno MF, Hidalgo A, Menéndez L: Local loperamide inhibits thermal hyperalgesia but not mechanical allodynia induced by intratibial inoculation of melanoma cells in mice. *Cell Mol. Neurobiol.* (2008); 28:981-90.
- Da Silva LFS, Walder RY, Davidson BL, Wilson SP, Sluka KA: Changes in expression of NMDA-NR1 receptor subunits in the rostral ventromedial medulla modulate pain behaviors. *Pain* (2010); 151, 155-161.
- Daenen L, Varkey E, Kellmann M, Nijs J: Exercise, not to exercise, or how to exercise in patients with chronic pain? Applying science to practice. *Clin J Pain* (2015); 31(2):1 08-14.
- Dale JK, Vesque C, Lints TJ, Sampath TK, Furley A, Dodd J, Placzek M: Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell.* (1997); 90(2): 257-69.
- Davies JE, Pröschel C, Zhang N, Noble M, Mayer-Pröschel M, Davies SJ: Transplanted astrocytes derived from BMP or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury. *J Biol* (2008); 7:24.
- Davies SJ, Shih CH, Noble M, Mayer-Pröschel M, Davies JE, Pröschel C: Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* (2011) 6:e17328.
- Davis MA, Chew MK, Hobbs RJ, Lugo AE, Ewel JJ, Vermeij GJ, Thompson K: Don't judge species on their origins. *Nature*, (2011) 474(7350):153-154.
- Davis ME, Shin DM: Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews Drug discovery* (2008); 7(9): 771-782.
- De Rivero Vaccari JP, Marcillo A, Nonner D, Dietrich WD, Keane RW: Neuroprotective effects of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) treatment after spinal cord injury. *Neurosci Lett.* (2009); 465(3): 226-9.
- Demyttenaere K, Bruffaerts R, Lee S, et al. Mental disorders among persons with chronic back or neck pain: results from the World Mental Health Surveys. *Pain* (2007); 129:332–342.17.
- Demyttenaere S, Feldman LS, Fried GM: Effect of pneumoperitoneum on renal perfusion and function: a systematic review. *Surgical endoscopy* (2007); 21(2), 152-160.

- Denk F, McMahon SB, Tracey I: Pain vulnerability: A neurobiological perspective. *Nat. Neurosci.* (2014); 17: 192–200.
- Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* (2003); 425: 577-584.
- Detloff MR, Smith EJ, Quiros Molina D, Ganzer PD, Houlé JD: Acute exercise prevents the development of neuropathic pain and the sprouting of non-peptidergic (GDNF- and artemin-responsive) c-fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol.* (2014); 255:38-48.
- Dib Hajj SD, Tyrrell L, Escayg A, Wood PM, Meisler MH, Waxman SG: Coding sequence, genomic organization and conserved chromosomal localization of the mouse gene *Scn11a* encoding the sodium channel Na_v11. *Rev.Genomics* (1999); 59 (3):309-18.
- Dietrich A, McDaniel WF: Endocannabinoids and exercise. *Br J Sports Med.* 2004; 38(5):536-41.
- Dmitriev AE, Farhang S, Lehman RA Jr, Ling GS, Symes AJ: Bone morphogenetic protein-2 used in spinal fusion with spinal cord injury penetrates intrathecally and elicits a functional signaling cascade. *Spine J.* (2010); 10 (1):16-25.
- Dmitriev AE, Lehman RA Jr, Symes AJ: Bone morphogenetic protein-2 and spinal arthrodesis: the basic science perspective on protein interaction with the nervous system. *Spine J.* (2011); 11(6): 500-5.
- Dominguez-Soto, A., Relloso, M., Vega, M.A., Corbi, A.L. & Puig-Kroger, A. *RUNX3* regulates the activity of the *CD11a* and *CD49d* integrin gene promoters. *Immunobiology* (2005); 210: 133-139.
- Dubuisson D, Dennis SG: The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* (1977) 4: 161-174.
- Dudley AT, Robertson EJ: Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in *BMP7* deficient embryos. *Dev. Dyn.* (1997); 208(3): 349-62.
- Duval ER, Javanbakht A, Liberzon I.: Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *TherClin Risk Manag.* (2015); (11): 115-26.
- Dworkin SL, Treves-Kagan S, Lippman SA: Gender-transformative interventions to reduce HIV risks and violence with heterosexually-active men: a review of the global evidence. *AIDS and Behavior.* (2013); 17(9): 2845-2863.
- Eade KT, Allan DW: Neuronal phenotype in the mature nervous system is maintained by persistent retrograde bone morphogenetic protein signaling. *J Neurosci.* (2009) 25; 29(12):3852-3864.
- Echeverry I, Ramírez-Vélez R, Ortega JG, Mosquera M, Mateus JC, De Plata ACA: Efecto potencial del ejercicio físico y del consumo de micronutrientes durante la gestación en factores maternos y placentarios asociados con enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) del adulto. *C. Méd.* (2009); 40(4), 448-459.

- Eixarch H, Calvo-Barreiro L, Montalban X, Espejo C: Bone morphogenetic proteins in multiple sclerosis: Role in neuroinflammation. *Brain Behav. Immun.* (2017); 17: 30061-2.
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Vallina IF, Baamonde C, LumbrerasMA, DierssenM, Tobeña A, Flórez J: "A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model". *Neuroscience Letters* (1995); 199: 143-146.
- Fainaru O, Woolf E, Lotem J, Yarmus M, Brenner O, Goldenberg D, Negreanu V, Bernstein Y, Levanon D, Jung S, Groner Y: Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *EMBO* (2004); J23: 969-979.
- Fainaru, O., Shseyov, D., Hantisteanu, S. & Groner, Y. Accelerated chemokine receptor 7mediated dendritic cell migration in Runx3 knockout mice and the spontaneous development of asthma-like disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005); 102:10598-10603.
- Finger BC, Dinan TG, Cryan JF: Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviours. *Psychopharmacology* (2010); 210(4): 559-68.
- Fink WA Jr.: The Pathophysiology of Acute Pain. *Emerg.Med. Clin. North Am.* (2005); 23(2): 277-284.
- Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DL, Bouhassira D, Raja SN: Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain* (2016) 157(8): 1599.
- Fisher GS, Emerson L, Firpo C, Ptak J, Wonn J, Bartolacci G: Chronic Pain and occupation: An Exploration of the Lived Experience. *American Journal of Occupational Therapy* (2007); 61: 290-302.
- Fitzgerald M, McKelvey R: Nerve injury and neuropathic pain - A question of age. *Exp Neurol.* (2016); 275:296-302.
- Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vázquez-Valls E, González-Castañeda RE, Beas-Zarate C: Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurol.* (2012); 27(5):301-10.
- Flórez J: El dolor: sistemas de proyección y de modulación de la sensibilidad dolorosa. En: *El tratamiento Farmacológico del Dolor*. Director J. Flórez. *Ars Médica* (2007).
- García-Porrero JA, Hurlé JM: *Anatomía Humana*. Ed. Macgraw-Hill. Interamericana (2015); 1(16): 727-734.
- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA: The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat. Immunol.* (2011); 11(9): 607-15.
- Godin RE, Takaesu NT, Robertson EJ, Dudley AT: Regulation of BMP7 expression during kidney development. *Development* (1998). 125(17): 3473-3482.

- Gormsen L1, Rosenberg R, Bach FW, Jensen TS: Depression, anxiety, health-related quality of life and pain in patients with chronic fibromyalgia and neuropathic pain. *Eur J Pain.* (2010);14(2):127.e1-8.
- Gormsen, L., Finnerup, N. B., Almqvist, P. M., & Jensen, T. S. (2009). The efficacy of the AMPA receptor antagonist NS1209 and lidocaine in nerve injury pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, three-way crossover study. *Anesthesia & Analgesia*, 108(4): 1311-1319.
- Goto K, Kamiya Y, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K: Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem.* (2007); 282: 20603-20611.
- Gould TD: Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice Characterization Using Behavioral Tests. Editors: Gould, Todd D (Ed.) *Neuromethods* (2009); 42.
- Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR: Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nature Reviews Immunology* (2014); 14(4), 217-231.
- Grinspan JB: Bone Morphogenetic Proteins: Inhibitors of Myelination in Development and Disease. *Vitam. Horm.* (2015); 99: 195-222.
- Groover AL, Ryals JM, Guilford BL, Wilson NM, Christianson JA, Wright DE: Exercise-mediated improvements in painful neuropathy associated with pre diabetes in mice. *Pain* (2013); 154: 2658–2667.
- Guan J, Zhu Z, Zhao RC, Xiao Z, Wu C, Han Q, Gao J: Transplantation of human mesenchymal stem cells loaded on collagen scaffolds for the treatment of traumatic brain injury in rats. *Biomaterials* (2013); 34(24), 5937-5946.
- Hall AK, Miller RH: Emerging roles for bone morphogenetic proteins in central nervous system glial biology. *J Neurosci Res.* (2004); 76(1): 1-8.
- Hampton DW, Asher RA, Kondo T, Steeves JD, Ramer MS, Fawcett JW: A potential role for bone morphogenetic protein signalling in glial cell fate determination following adult central nervous system injury in vivo. *Eur J Neurosci.* (2007); 26(11): 3024-35.
- Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergemann JH, Hassel S, Henis YI, Knaus P: Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* (2006); 26: 7791-7805.
- Harvey Bk, Oosthuizen F, Brand L, Wegener G, Stein DJ: Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. *Psychopharmacology (Berl).* (2004); 175(4): 494-502.
- Harvey BK: Stroke and TGF β proteínas: glial cell line-derived neurotrophic factor and bone morphogenetic protein. *Pharmacol. Ther.* (2005); 105: 113-25.

- Hegarty JM, Yang H, Chi NC: UBIAD1-mediated vitamin K2 synthesis is required for vascular endothelial cell survival and development. *Development*. (2013); 140(8): 1713-9.
- Hegarty SV, O'Keeffe GW, Sullivan AM: BMP-Smad 1/5/8 signalling in the development of the nervous system. *Prog.Neurobiol.* (2013); 109: 28-41.
- Heinonen I, Rinne P, Ruohonen ST, Ruohonen S, Ahotupa M, Savontaus E: The effects of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice. *Acta Physiologica* (2014); 211(3): 515-527.
- Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U & Nordheim A: Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* (1999); 274: 19838-19845.
- Hosseini-Nezhad A, Fatemi RP, Ahmad R, Peskind ER, Zabetian CP, Shu-Ching Hu SCh., Shi M, Wahlestedt C, Zhang J, Ali Faghihi M: Transcriptomic Profiling of Extracellular RNAs Present in Cerebrospinal Fluid Identifies Differentially Expressed Transcripts in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* (2016); 6(1): 109–117.
- Hsu E, Cohen SP: Postamputation pain: Epidemiology, mechanisms, and treatment. *J Pain Res* (2013) 6, 121–136.
- Huang PC, Tsai KL, Chen YW, Lin HT, Hung CH: Exercise Combined With Ultrasound Attenuates Neuropathic Pain in Rats Associated With Downregulation of IL-6 and TNF- α , but With Upregulation of IL-10. *Anesth Analg.* (2017)
- Hutchinson KJ, Gómez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM: Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* (2004); 127: 1403-14.
- Hutchison WD, Davis KD, Lozano AM, Tasker RR, and Dostrovsky JO: Las neuronas relacionadas con el dolor en la corteza cingulada humana. *Nature Neuroscience* (1999); 2: 403-405.
- Huynh KW, Cohen MR, Chakrapani S, Holdaway HA, Stewart PL, Moiseenkova-Bell, VY: Structural insight into the assembly of TRPV channels. *Structures* (2014a); 22: 260–268.
- Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell, VY: Application of amphipols for structure–functional analysis of TRP channels. *J.Membr.Biol.* (2014b); 247:843–851.
- Jacobson LH, Bettler B, Kaupmann K, Cryan JF: Behavioral evaluation of mice deficient in GABA B1 receptor isoforms in tests of unconditioned anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* (2007); 190: 541–553.
- Jiramongkolchai P, Owens P, Hong CC: Emerging roles of the bone morphogenetic protein pathway in cancer: potential therapeutic target for kinase inhibition. *BiochemSoc Trans.*(2016);44(4):1117-34.
- Kami K, Taguchi Ms S, Tajima F, Senba E: Improvements in impaired GABA and GAD65/67 production in the spinal dorsal horn contribute to exercise-

- induced hypoalgesia in a mouse model of neuropathic pain. *Mol Pain* (2016); 12.
- Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2016); 8(6): a021899.
- Kawamata T, Ren J, Chan TC, Charette M, Finklestein SP: Intracisternal osteogenic protein-1 enhances functional recovery following focal stroke. *Neuroreport.* (1998); 9(7): 1441-5.
- Keeler BE, Liu G, Siegfried RN, Zhukareva V, Murray M, Houlé JD: Acute and prolonged hindlimb exercise elicits different gene expression in motoneurons than sensory neurons after spinal cord injury. *Brain Res.* (2012); 8–2110.
- Khan J, Benavent V, Korczeniewska OA, Benoliel R, Eliav E: Exercise-induced hypoalgesia profile in rats predicts neuropathic pain intensity induced by sciatic nerve constriction injury. *J Pain* (2014); 15(11): 1179-89.
- Kheirbek M A, Klemenhagen K C, Sahay A, Hen R: Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nature Neuroscience* (2012) 15: 1613–1620.
- Kim YJ, Byun JH, Choi IS: Effect of Exercise on μ -Opioid Receptor Expression in the Rostral Ventromedial Medulla in Neuropathic Pain Rat Model. *Ann Rehabil Med.* (2015); 39(3): 331-9.
- Kindler LL, Bennett RM, Jones KD: Central sensitivity syndromes: Mounting pathophysiologic evidence to link fibromyalgia with other common chronic pain disorders. *Pain Manag Nurs.* (2011); 12(1): 15-24.
- Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobe GC: Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* (2008); 283: 7628-7637.
- Kitterman JA, Strober JB, Kan L, Rocke DM, Cali A, Peeper J, Snow J, Delai PL, Morhart R, Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS: Neurological symptoms in individuals with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Neurol.* (2012); 259(12): 2636-43.
- Kluding PM, Pasnoor M, Singh R, D'silva LJ, Yoo M, Billinger SA, et al.: Safety of aerobic exercise in people with diabetic peripheral neuropathy: single-group clinical trial. *Phys. Ther.* (2015); 95: 223–234.
- Kluding PM, Pasnoor M, Singh R, Jernigan S, Farmer K, Rucker J, Sharma NK, Wright DE: The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. *J. Diabetes Complications* (2012) 26(5): 424-9.
- Knauf MT, Koltyn KF: Exercise-induced modulation of pain in adults with and with out pain ful diabetic neuropathy. *J. Pain* (2014); 15(6): 656-663.
- Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD: TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* (2010); 150(2):340-50.
- Kristy L, Townsend, Suzuki R, Huang TL, Jing E, Schulz TJ, Lee K, Taniguchi CM, Espinoza DO, McDougall LE, Zhang H, He TCh., Kokkotou E, Tseng

- YH: Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway. *FASEB J.* (2012)26(5): 2187–2196.
- Kuo LT, Tsai SY, Groves MJ, An SF, Scaravilli F: Gene expression profile in rat dorsal root ganglion following sciatic nerve injury and systemic neurotrophin-3 administration. *J Mol. Neurosci.* (2011); 43(3): 503-15.
- Lafarga M, Andres M.A, Berciano M.T, Maqui E. «Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat». *J Comp Neurol* 308.3 (1991): 329-339.
- Laird JM, Souslova V, Wodd JN: Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in Nav1.8 (SNS/PN3)-null mice. *J. Neurosci.* (2002); 22, 8352-8356.
- Lannersten L, Kosek E: Dysfunction of endogenous pain inhibition during exercise with painful muscles in patients with shoulder myalgia and fibromyalgia. *Pain* (2010); 151:77-86.
- Lantero A, Tramullas M, Díaz A, Hurlé MA: Transforming Growth Factor- β in Normal Nociceptive Processing and Pathological Pain Models. *Mol Neurobiol* (2012); 45:76–86.
- Lantero A, Tramullas M, Pílar-Cuellar F, Valdizán E, Santillán R, Roques BP, Hurlé MA: TGF- β and opioid receptor signaling crosstalk results in improvement of endogenous and exogenous opioid analgesia under pathological pain conditions. *Journal of Neuroscience* (2014); 34(15), 5385-5395.
- Latremolière A, Woolf CJ: Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain.* (2009); 10(9): 895-926.
- Levine JD, Alessandri-Haber N: TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim. Biophys.* (2007); 1772: 989–1003.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A: Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* (2000); 28: 713–726.
- Lima LV, Abner TS, Sluka KA: Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. *J Physiol.*(2017)29.
- Lin R, Heylbroeck C, Genin P, Pitha PM, Hiscott J: Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of rantes chemokine transcription. *Mol Cell Biol* (1999); 19: 959-966.
- Liu A, Niswander LA: Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci.*(2005); 6(12):945-54.
- Llorián-Salvador M, Pevida M, Fernández-García MT, Lastra A, Obaya A, Cal S, Hidalgo A, Menéndez L, Baamonde A: Hypernociceptive responses following the intratibial inoculation of RM1 prostate cancer cells in mice. *Prostate* (2015); 75(1):70-83.

- López-Álvarez VM, Modol L, Navarro X, Cobiañchi S: Early increasing-intensity treadmill exercise reduces neuropathic pain by preventing nociceptor collateral sprouting and disruption of chloride cotransporters homeostasis after peripheral nerve injury. *Pain* (2015) 156: 1812–1825.
- Luan S, Wan Q, Luo H, Li X, Ke S, Lin C, Wu Y, Wu S, Ma Ch.: Running Exercise Alleviates Pain and Promotes Cell Proliferation in a Rat Model of Intervertebral Disc Degeneration. *Int J Mol Sci.* (2015); 16(1): 2130–2144.
- Lykissas MG, Aichmair A, Sama AA, Hughes AP, Lebl DR, Cammisa FP, Girardi FP: Nerve injury and recovery after lateral lumbar interbody fusion with and without bone morphogenetic protein-2 augmentation: a cohort-controlled study. *Spine J.* (2014); 14(2): 217-24.
- Lykissas MG, Li T, Eismann E A, Parikh SN: Does medial patellofemoral ligament reconstruction decrease patellar height? A preliminary report. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, (2014);34(1): 78-85.
- Ma CH, Brenner GJ, Omura T, Samad OA, Costigan M, Inquimbert P, Niederkofler V, Salie R, Sun CC, Lin HY, Arber S, Coppola G, Woolf CJ, Samad TA: The BMP coreceptor RGMB promotes while the endogenous BMP antagonist noggin reduces neurite outgrowth and peripheral nerve regeneration by modulating BMP signaling. *J Neurosci.* (2011); 31(50): 18391-400.
- Ma CHE, Brenner GJ, Omura T, Samad OA, Costigan M, Inquimbert P, Niederkofler V, Salie R, Sun CC, Lin HY, Arber S, Coppola G, Woolf CJ, Samad TA: The BMP Coreceptor RGMB Promotes While the Endogenous BMP Antagonist Noggin Reduces Neurite Outgrowth and Peripheral Nerve Regeneration by Modulating BMP Signaling. *Journal of Neuroscience* 14 December (2011), 31 (50): 18391-18400.
- Macias MY, Syring MB, Pizzi MA, Crowe MJ, Alexanian AR, Kurpad SN: Pain with no gain: allodynia following neural stem cell transplantation in spinal cord injury. *Exp Neurol* (2006); 201: 335–348.
- Majithia N, Loprinzi CL, Smith TJ: New Practical Approaches to Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: Prevention, Assessment, and Treatment. *Oncology (Williston Park)* (2016); 30(11).
- Manzano GM, Giuliano LMP, Nóbrega JAM: A brief historical note on the classification of nerve fibers. *Arq. Neuropsiquiatr.* (2008); 66: 117– 119.
- Martínez-Cué C, Martínez P, Rueda N, Vidal R, García S, Vidal V, Corrales A, Montero JA, Pazos A, Flórez J: “Reducing GABA A $\alpha 5$, Receptor-Mediated Inhibition Rescues Functional and Neuromorphological Deficits in a Mouse Model of Down Syndrome. *The Journal of Neuroscience* (2013). 27; 33(9): 3953–3966.
- Martínez-Cué C, Rueda N, García E, Davisson MT, Schmidt C, Flórez J: Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in mal Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res.* (2005); 163: 174-85.

- Martins DF, Mazzardo-Martins L, Soldi F, Stramosk J, Piovezan AP, Santos AR: High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. *Neuroscience* (2013); 234: 69-76.
- Massagué J. & Chen YG: Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* (2000); 14: 627-644.
- Massagué J: How cells read TGF- β signals. *Nature Rev.* (2000); 1:169-178.
- Massagué J: TGF β signaling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2012); 13: 616-630.
- McBrayer ZL, Dimova J, Pisansky MT, Sun M, Beppu H, Gewirtz JC, O'Connor MB: "Forebrain-Specific Loss of BMPRII in Mice Reduces Anxiety and Increases Object Exploration. *Plos/one.* (2015). 10(10): e 0139860.
- McCarberg B, Barkin RL, Wright JA, Cronan TA, Groessl E, Schmidt SM: Tender points as predictors of distress and the pharmacologic management of fibromyalgia syndrome. *American journal of therapeutics* (2003); 10(3):176-192.
- McCarberg B: Managing the comorbidities of postherpetic neuralgia. *J Am AcadNurse Pract* (2003); 15:16–21
- McKemy D, Neuhausser WM, Julius D: Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* (2002); 416: 52-58.
- Melzack R, Wall PD: "Pain mechanisms: a new theory". *Science.* (1965); 150(3699): 971-9.
- Mendes-Gomes J, Amaral VC, Nunes-de-Souza RL: Ventrolateral periaqueductal gray lesion attenuates nociception but does not change anxiety-like indices or fear-induced antinociception in mice. *Behav. Brain* (2011); 219(2): 248-53.
- Méndez-Bértolo C, Moratti S, Toledano R, López-Sosa F, Martínez-Álvarez R, Mah YH, Vuilleumier P, Gil-Nagel A, Strange, BA: "A fast pathway for fear in human amygdala", *Nature Neuroscience* (2016); 19(8): 1041-9.
- Mercadante S, Marchetti P, Cuomo, A, Mammucari M, Caraceni A: Breakthrough pain and its treatment: critical review and recommendations of IOPS (Italian Oncologic Pain Survey) expert group. *Supportive Care in Cancer.* IOPS MS study Group. (2016). 24(2), 961-968.
- Merino D, Villar AV, García R, Tramullas M, Ruiz L, Ribas C, Cabezudo S, Nistal JF, Hurlé MA: BMP-7 attenuates left ventricular remodeling under pressure overload and facilitates reverse remodeling and functional recovery. *Cardiovasc Res.* (2016); 110(3):33-45.
- Merskey H, Bogduk N.: *Classification of chronic pain.* 2nd.Ed. Seattle: IASP Press (1994)
- Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortigüela R, Marqués-Torrejón MA, Nakashima K, Colak D, Götz M, Fariñas I, Gage FH: Signaling through BMPRI-IA regulates quiescence

- and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *CellStemCell*. (2010) 7(1): 78-89.
- Mitchell K, Shah JP, Dalgard CL, Tsytsikova LV, Tipton AC, Dmitriev AE, Symes AJ: Bone morphogenetic protein-2-mediated pain and inflammation in a rat model of posterolateral arthrodesis. *BMC Neurosci*. (2016); 17(1): 80.
- Miyazawa K, Miyazono K: Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb.Perspect. Biol*. (2017); 9(3): a022095.
- Miyazono K, Miyazawa K: "Id: a target of BMP signaling". *Sci Stke* (2002); pe40.
- Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. (2005); 16: 251-263.
- Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T, Furuya T, Imamura T, Watabe T, Miyazono K: Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J Biol Chem*. (2004); 279: 31568-31574.
- Molteni R, Zheng J Q, Ying Z, Gómez-Pinilla F, and Twiss JL : Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2004); 101: 8473–8478.
- Muñños-Gimeno M, Espinosa-Parrilla Y, Guidi M, Kagerbauer B, Sipilä T, Maron E, Pettai K, Kananen L, Navinés R, Martín-Santos R, Gratacòs M, Metspalu A, Hovatta I, Estivill X: Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 are associated with panic disorder and regulate several anxiety candidate genes and related pathways. *Biol. Psychiatry*. (2011); 69(6): 526-33.
- Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T : Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell*. (2003); 14: 2809–2817.
- Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Masuda J, Kobayashi S, Yamaguchi S, Kim SU: Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuro protection and behavioral improvement. *PLoS One* (2010); 5(7): e11746.
- Nicholson B, Verma S: Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med* (2004); 5(1):9–27
- Nicholson JK, Holmes E, Lindon JC, Wilson ID: The challenges of modeling mammalian biocomplexity. *Nature biotechnology* (2004) 22(10), 1268-1274.
- Nijs J, Kosek E, Van Oosterwijck J, Meeus M: Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? *Pain Physician* (2012); 15(3 suppl), ES205–ES213.
- Noble M, Davies JE, Mayer-Pröschel M, Pröschel C, Davies SJ: Precursor cell biology and the development of astrocyte transplantation therapies: lessons from spinal cord injury. *Neurotherapeutics* (2011); 8(4):677-93.

- Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P: The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* (2002); 277: 5330-5338.
- Okauchi M, Hua Y, Keep RF, Morgenstern LB, Schallert T, Xi G: Deferoxamine treatment for intracerebral hemorrhage in aged rats: therapeutic time window and optimal duration. *Stroke*. (2010); 41(2): 375-82.
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C: Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*. (1999); 401(6752): 480-485.
- Ordway GA, Szebeni A, Chandley MJ, Stockmeier CA, Xiang L, Newton SS, Turecki G, Duffourc MM, Zhu MY, Zhu H, Szebeni K: Low gene expression of bone morphogenetic protein 7 in brainstem astrocytes in major depression. *Int.J. Neuro psychopharmacol*. (2012); 7:855-68.
- Ortega A, Roca A, Micó JA: Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Rev. Soc. Esp. Dolor* (2002); 9: 447-453.
- Ouchi Y, Banno Y, Shimizu Y, Ando S, Hasegawa H, Adachi K, Iwamoto T: Reduced adult hippocampal neurogenesis and working memory deficits in the Dgcr8-deficient mouse model of 22q11.2 deletion-associated schizophrenia can be rescued by IGF2. *J Neurosci*. (2013); 33: 9408-9419.
- Paley CA, Johnson MI: Physical activity to reduce systemic inflammation associated with chronic pain and obesity: an arrat iver view. *Clin. J. Pain* (2015); 32: 365–370.
- Parikh T, Stratton G: (2011). Influence of intensity of physical activity on adiposity and cardiorespiratory fitness in 5–18 year olds. *Sports Medicine*, 41(6), 477-488.
- Park DC: The aging mind: neuroplasticity in response to cognitive training. *Dialogues Clin Neurosci*. (2013); 15(1): 109–119.
- Park JS, Kim S, and Hoke A: An exercise regimen prevents development paclitaxel induced peripheral neuropathy in a mouse model. *J. Peripher. Nerv. Syst*. (2015); 20: 7–14.
- Pena E, Berciano MT, Fernandez R, Ojeda JL, Lafarga M. «Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons.» *J Comp Neurol* (2001); 430.2: 250-263.
- Peres MFP, Mercante JPP, Tobo PR, Kamei H, Bigal ME: Anxiety and depression symptoms and migraine: a symptom-based approach research. *J Headache Pain* (2017); 18(1):37.
- Perides G, Charness ME, Tanner LM, Péter O, Satz N, Steere AC, Klempner MS. «Matrix metallo proteinases in the cerebro spinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis.» *J Infect Dis*. (1998): 177: 401-408.

- Perron JC, Dodd J: ActRIIA and BMPRII Type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis. *PLoS One* (2009) 4: e8198.
- Perron JC, Dodd J: Inductive specification and axonal orientation of spinal neurons mediated by divergent bone morphogenetic protein signaling pathways. *Neural Dev.* (2011); 6: 36.
- Petersen AM & Pedersen BK: The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* (2005); 98:1154–1162.
- Pevida M, González-Rodríguez S, Lastra A, Hidalgo A, Menéndez L, Baamonde A: CCL2 released at tumoral level contributes to the hyperalgesia evoked by intratibial inoculation of NCTC 2472 but not B16-F10 cells in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* (2012); 385(11):1053-61.
- Plant TD, Strotmann R: TRPV4. *Handb. Exp. Pharmacol.* (2007).179; 189–205
- Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ: Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I–III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* (2004); 111(1): 144-150.
- Price TJ, Cerveró F, Gold MS, Hammond DL, Prescott SA: Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res.* (2009) 60:149–170.
- Raffin-Sanson ML, Keyzer Y, Bertagna X.: Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Europ. Journal of Endocrin.* (2003); 149:79–90.
- Raphael KG, Janal MN, Nayak S, Schwartz JE, Gallagher RM. Psychiatric comorbidities in a community sample of women with fibromyalgia. *Pain* (2006); 124:117–125.
- Ronaldson KJ, McNeil JJ: Improving drug safety by locating genetic markers for hypersensitivity reactions. *Med J Aust.* (2009) 190(11), 641-643.
- Ryan S, McGuire B: Psychological predictors of pain severity, pain interference, depression, and anxiety in rheumatoid arthritis patients with chronic pain. *Br J Health Psychol.* (2016); 21 (2): 336-50
- Sabino MAC, Luger NM, Mach DB, Rogers SD, Schwei MJ, Mantyh PW: Different tumors in bone each give rise to a distinct pattern of skeletal destruction, bone cancer-related pain behaviors and neurochemical changes in the central nervous system. *International journal of cancer* (2003); 104(5):550-558.
- Sahni V, Mukhopadhyay A, Tysseling V, Hebert A, Birch D, McGuire TL, Stupp SI, Kessler JA: BMPRIa and BMPRIb signaling exert opposing effects on gliosis after spinal cord injury. *J Neurosci* (2010); 30:1839–1855.
- Sandkühler J: Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev.* (2009); 89(2): 707-58.
- Sandkühler J: Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain.* (2007) 3:9.
- Sango K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A, Westphal H, McDonald MP, Crawley JN, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL.: Mouse

- models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat Genet.* (1995); 11(2): 170-6.
- Santillán R, Hurlé MA, Armijo JA, de los Mozos R, Flórez J: Nimodipine-enhanced opiate analgesia in cancer patients requiring morphine dose escalation: a double-blind, placebo-controlled study. *Pain* (1998); 76(1-2): 17-26.
- Satheesha NJ, Ueharab Y, Fedotovac J, Pohankad M, Büsselberga D, Kruzliake P: TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity. *Neuropeptides* (2016); 57: 1–8.
- Schallert T, Carlson ES, Fretham SJ, Unger E, O'Connor M, Petryk A, Georgieff MK: Hippocampus specific iron deficiency alters competition and cooperation between developing memory systems. *Journal of neurodevelopmental disorders* (2010); 2(3):133.
- Sebald W, Mueller TD. The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly. *Trends Biochem Sci.* (2003); 10: 518-21.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK: Lowry's method of protein estimation: some more insights. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (1993); 45: 80.
- Seo TB, Oh MJ, You BG, Kwon KB, Chang IA, Yoon JH, y cols.: ERK1/2-mediated Schwann cell proliferation in the regenerating sciatic nerve by treadmill training. *J. Neurotrauma* (2009); 26, 1733–1744.
- Serrano-Atero MS, Peramo F, Cañas A, García-Saura P, Serrano- Álvarez C: Modulación descendente de la información nociceptiva (I). *Rev. Soc. Esp. Dolor* (2002) 9: 382-390.
- Setoguchi T, Yone K, Matsuoka E, Takenouchi H, Nakashima K, Sakou T, Komiya S, Izumo S: Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. *Brain Res.* (2001); 921: 219-225.
- Sharma A, Sood A, Dhiman N, Pradesh U: Endorphine-natural. *Pain Killer* (2014); 3(3): 341–350.
- Shen J, Fox LE, Cheng J: Swim therapy reduces mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by chronic constriction nerve injury in rats. *Pain Med.* (2013); 14: 516–525.
- Shi DJ, Ye S, Cao X, Zhang R, Wang K: Crystal structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of TRPV3 reveals unique conformation of finger 3 loop critical for channel function. *Protein Cell* (2013); 4: 942–950.
- Shi L, Yu HH, Yang JS, Lee T: Specific *Drosophila* dscam juxta membrane variants control dendritic elaboration and axonal arborization. *J. Neurosci.* (2007); 27(25): 6723--6728.
- Shields SD, Cavanaugh DJ, Lee H, Anderson DJ, Basbaum AI: Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* (2010); 151(2): 422-429.
- Shin JA, Kang JL, Lee KE, Park EM: Different temporal patterns in the expressions of bone morphogenetic proteins and noggin during astroglial scar formation after ischemic stroke. *Cell Mol.Neurobiol.* (2012); 32 (4): 587-97.

- Sibbe M, and Kulik A: GABAergic Regulation of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Mol Neurobiol.* (2016); doi: 10.1007/s12035-016-0072-3.
- Smart KM, Wand BM, O'Connell NE: Physiotherapy for pain and disability in adults with complex regional pain syndrome (CRPS) types I and II. *Cochrane Database Syst* (2016); 2: CD010853.
- Smith HS, Barkin RL: Painful bone - metastases. *Am J Ther.* (2014); 21(2):106-30.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA: Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* (2011); 476: 458–461.
- Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, et al.: Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology* (2011); 114: 940–948.
- Story GM, Gereau RW: Numbing the senses: role of TRPA1 in mechanical and cold sensation. *Neuron.* (2006); 50(2): 177-80.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ: The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing. Res. Rev.* (2005) 4: 141–194.
- Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JA, Damann N, Everaerts W, Benoit M, Janssens A, Vennekens R, Viana F, Nemery B, Nilius B, Voets T: Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat. Neurosci.* (2009); 12(10): 1293-9.
- Talbott JF, Cao Q, Enzmann GU, Benton RL, Achim V, Cheng XX, Mills MD, Rao MS, Whittemore SR: Schwann cell-like differentiation by adult oligodendrocyte precursor cells following engraftment into the demyelinated spinal cord is BMP-dependent. *Glia* (2006); 54(3): (147-159).
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, & Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* (1992); 51(1): 5-17.
- Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci.* (2015); 16(6):317-31.
- Townsend KL, Ryo Suzuki R, Huang TL, Jing E, Schulz TJ, Lee K, Taniguchi CM, Espinoza DO, McDougall LE, Zhang H, He TCh, EfiKokkotou, Tseng YH. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway". *Faseb J.* (2012); 26(5): 2187–2196.
- Tramullas M, Lantero A, Díaz Á, Morchón N, Merino D, Villar A, Buscher D, Merino R, Hurlé JM, Izpisua-Belmonte JC, Hurlé MA: BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor- β family in pain modulation. *J. Neuroscience* (2010); 30(4): 1502-1511.
- Treit D, Menard J, Royan C: Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze: *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1993) 44: 463-9.

- Tsai MJ, Weng CF, Shyue SK, Liou DY, Chen CH, Chiu CW, Yang TH, Pan HA, Liao RI, Kuo HS, Huang MC, Huang WC, Hoffer BJ, Cheng H: Dual effect of adenovirus-mediated transfer of BMP7 in mixed neuron-glia cultures: neuroprotection and cellular differentiation. *J. Neurosci Res.* (2007); 85(13): 2950-9.
- Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K.: Pain and purinergic signaling. *Brain Res.* (2010)63: 222–232.
- Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J, Gassul X: Tresk channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol Pain* (2011); (7):30.
- Urist MR: Bone, formation by autoinduction. *Science* (1965); 150: 893-899.
- Van Wilgen CP, Keizer D: The sensitization model to explain how chronic pain exists without tissue damage. *Pain Manag Nurs.* (2012) 13(1): 60-65.
- Van Hecke T, Vossen E, Bussche JV, Raes K, Vanhaecke L, De Smet S: Fat content and nitrite-curing influence the formation of oxidation products and NOC-specific DNA adducts during in vitro digestion of meat. *PLoS One.* (2014); 9(6), e101122.
- Velategui S, Tramullas M, Hurlé MA: Papel de microRNA-30c en la percepción dolorosa. Dpto. Farmacología Univ. Cantabria (2015).<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=46105>
- Von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ: Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron.* (2012). 73(4), 638-652.
- Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B: Cell swelling, heat and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101: 396–401.
- Wager TD, Atlas LY, Lindquist MA, Roy M, Woo CW, Kross E: An fMRI-based neurologic signature of physical pain. *N. Engl. J. Med.* (2013); 368(15): 1388-97.
- Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, Watanabe M, Kato S, Senba E, Kobayashi K, Kuzumaki N, Yamanaka A, Morisaki H, Narita M: Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with Gi-DREADD in mice. *Mol Pain* (2016); 12.
- Walf AA, Frye CA: The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* (2007); 2: 322–328.
- Wang L, Nomura M, Goto Y, Tanaka K, Sakamoto R, Abe I, Sakamoto S, Shibata A, Enciso PL, Adachi M, Ohnaka K, Kawate H, Takayanagi R.J: Smad2 protein disruption in the central nervous system leads to aberrant cerebellar development and early postnatal ataxia in mice. *Biol. Chem.* (2011); 286(21): 18766-74.
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B: Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* (2003); 424: 434–438.

- Waxman SG: Painful Na-channelopathies: an expanding universe. *Trends Mol Med* (2013)19: 406–409.
- Weinstein M, Yang X, Deng C: Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2000); 11(1-2):49-58.
- Wemmie JA, Taugher RJ, Kreple CJ. Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* (2013)14: 461–471.
- Weng Q, Chen Y, Wang H, Xu X, Yang B, He Q, Shou W, Chen Y, Higashi Y, van den Berghe V, Seuntjens E, Kernie SG, Bukshpun P, Sherr EH, Huylebroeck D, Lu QR: Dual-mode modulation of Smad signaling by Smad-interacting protein Sip1 is required for myelination in the central nervous system. *Neuron.* (2012); 73(4): 713-28.
- Woolf CJ, Ma Q: Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron.* (2007); 55(3):353-64.
- WoolfCJ, MannionRJ: Neuropathic pain: a etiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet.* (1999); 353(9168): 1959-64.
- WoolfCJ: Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.* (2004) 74(21): 2605-10.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* (1988); 242:1528-1534.
- Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL., Massagué J, & Shi Y: Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* (2000); 287: 92-97.
- Wu Q, Sun CC, Lin HY, Babitt JL: Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). *PLoS One* (2012); 7: e46307.
- Xu S, Huang HK, Kaiser P, Latterich M, Hunter T: Phosphorylation and spindle pole body localization of the Cdc15p mitotic regulatory protein kinase in budding yeast. *Curr Biol.* (2000); 10(6): 329-32.
- Yadin D, Knaus P, Mueller, TD: Structural insights into BMP receptors: specificity, activation and inhibition. *Cytokine & growth factor reviews* (2016); 27: 13-34.
- Yoo M, D'Silva LJ, Martin K, Sharma NK, Pasnoor M, LeMaster JW, Kluding PM: Pilot study of exercise therapy on painful diabetic peripheral neuropathy. *Pain Med.* (2015); 16(8): 1482-9.
- Yudin Y, Rohacs T: Regulation of TRPM8 channel activity. *Mol Cell Endocrinol* (2012); 353: 68–74.
- Zanella JM, Waleh N, Orduña J, Montenegro J, Paulin J, McKay WF, WilseyJ: Evaluating the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on pain-associated behaviors in a rat model following implantation near the sciatic nerve. *J Neurosurg Spine.* (2016); 25(2): 154-64.

- Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J: BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget*. (2016); 7(47):78206-78218.
- Zhang S, Fei T, Zhang L, Zhang R, Chen F, Ning Y, Han Y, Feng XH, Meng A, Chen YG: Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol* (2007); 27: 4488-4499.
- Zhang Z, Winborn CS, Marquez de Prado B, Russo AF: Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion. *J Neurosci*. (2007); 27: 2693–2703.
- Zheng F, Adelsberger H, Müller MR, Fritschy JM, Werner S, Alzheimer C: Activin tunes GABAergic neurotransmission and modulates anxiety-like behavior. *Molecular Psychiatry* (2009); 14:332–346.
- Zhuo M.: Neural Mechanisms Underlying Anxiety-Chronic Pain Interactions. *Trends Neurosci*. (2016); 39(3):136-45.

