

Mecanismos implicados en el efecto protector de citoquinas pertenecientes a la familia Factores de Crecimiento Transformante- β frente al desarrollo de dolor neuropático

Ana M Peiró

Aquilino Lantero^{a,d}, Mónica Tramullas^{a,d}, Alvaro Díaz^{a,b,c}, David Merino^{a,d},
María A. Hurlé^{a,d}

RESUMEN

Un estudio epidemiológico reciente, realizado en más de 46.000 individuos de 16 países europeos, incluida España, puso de manifiesto que aproximadamente 1 de cada 5 adultos padece dolor crónico, de intensidad moderada-severa, de una duración de 7 años en promedio. Además de esta gran prevalencia, destaca el coste humano, el impacto socio-sanitario y las limitaciones de los tratamientos existentes actualmente. Prácticamente, dos tercios de las personas entrevistadas que padecen dolor crónico refirieron tener un control inadecuado del dolor. Estudios recientes demuestran que citoquinas y factores de crecimiento son importantes reguladores de la plasticidad neural patológica que subyace a los procesos de dolor crónico. En este estudio aportamos resultados que sugieren un efecto protector ejercido por citoquinas de la familia de Factores de Crecimiento Transformante-beta (TGF- β) frente al desarrollo de dolor crónico neuropático. Hemos validado en ratones la capacidad de los TGF- β para interferir con el desarrollo de hiperalgesia mecánica tras la lesión de un nervio periférico. Nuestros resultados permiten postular el valor de los TGF- β s como dianas terapéuticas potenciales y podrían constituir el punto de partida para el desarrollo de nuevos analgésicos que actuarían incrementando la actividad del sistema opioide endógeno.

La Sociedad Española del Dolor refiere que el 11 por ciento de la población española padece dolor crónico. Los tipos más frecuentes son el dolor osteoarticular, que padece el 61 por ciento de los pacientes, y el dolor neuropático, que afecta al 49 por ciento de los enfermos. El tiempo medio de evolución del dolor crónico es de seis años y

medio y, como consecuencia del mismo, el 30 por de los pacientes se ven obligados a acogerse a la baja laboral. El impacto en la economía del dolor crónico es superior al 2% del PIB. Un estudio epidemiológico reciente,¹ realizado con más de 46.000 individuos de 16 países de la UE, revela que estos datos son extrapolables a la población adulta europea y, no solo pone de manifiesto la elevada prevalencia del dolor crónico entre la población, sino también su gran coste en términos humanos (un tercio de los entrevistados refiere su deseo de morir por no soportar la intensidad del dolor), y las enormes limitaciones de los tratamientos analgésicos actuales (prácticamente dos tercios de estos pacientes refieren un control inadecuado del dolor). El abordaje terapéutico se concentra en dos grupos farmacológicos fundamentalmente: los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los opioides. Estos fármacos no son universalmente eficaces y hay determinados tipos de dolor crónico que son altamente resistentes a cualquier tipo de tratamiento.

Estudios recientes indican que algunos factores tróficos y citoquinas juegan un papel importante a nivel del SNC y en neuronas sensoriales periféricas, orquestando los cambios dinámicos que determinan la sensibilidad dolorosa del individuo a lo largo de la vida, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.²⁻⁵ Dos estudios muy recientes, uno de ellos de nuestro grupo, ponen de manifiesto que la superfamilia de Factores de Crecimiento Transformante- β (TGF- β : transforming growth factors- β) juega un papel relevante en los procesos de plasticidad neural patológica que conduce al estado de dolor crónico neuropático.^{6,7}

La familia TGF- β constituye el prototipo de

a. Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Cantabria, Spain. *b.* Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria IBBTEC (UC-CSIC-IDICAN), Spain, 39011 Santander, Cantabria, Spain. *c.* Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Spain. *d.* Instituto de Formación Marqués de Valdecilla IFIMAV, 39011 Santander, Cantabria, Spain.

factores de crecimiento multifuncionales, capaces de regular una gran variedad de procesos celulares que abarcan proliferación, diferenciación, muerte celular y reparación de prácticamente todos los tejidos del organismo, incluido el SN.^{8,9} En la actualidad se han identificado numerosos miembros que, en función de la similitud de sus secuencias, se agrupan en varias subfamilias: TGF- β s, activinas, BMPs (bone morphogenetic proteins), etc. Los TGF- β s ejercen sus acciones a través de receptores con actividad serina-treonina quinasa. En base a sus características estructurales y funcionales los receptores se dividen en dos subfamilias: tipo I y tipo II. Los receptores tipo II están fosforilados de forma constitutiva y la fijación del ligando origina el reclutamiento y fosforilación del receptor tipo I. Este último receptor es el elemento responsable de la transmisión de la señal a través de la fosforilación de factores de transcripción denominados SMADs.¹⁰ Una vez fosforilados, las SMADs se incorporan al núcleo donde se unen a determinadas secuencias promotoras de genes diana, interactúan con factores de transcripción o reclutan coactivadores o correpresores, regulando positiva o negativamente la transcripción de genes específicos de cada tipo celular.¹¹ Recientemente, se ha demostrado que estas citoquinas también ejercen efectos a través de otras vías de señalización no canónicas (Rho, Ras-ERK, TAK1-p38MAPK, TAK1-JNK, PI3K-Akt).^{12,13} Además, existen interacciones cruzadas con otras vías de señalización, siendo particularmente relevante la interacción de TGF- β s con la vía de Wnt/beta-catenina.^{14,15} Teniendo en cuenta la simplicidad del sistema de señalización de los TGF- β s, la variedad de respuestas evocadas, y la robustez de su señal, capaz de determinar el destino final de las células sobre las que actúa, se comprende la necesidad de un estrecho control en los distintos niveles de su cascada de señalización.^{17,18} Entre los mecanismos que regulan la señalización a nivel receptorial se encuentra el pseudo-receptor denominado BAMBI (BMP and activin membrane bound inhibitor). BAMBI es una proteína transmembranal cuyo dominio extracelular se asemeja estructuralmente al de los receptores tipo I; sin embargo, el dominio intracelular carece de dominio serina-treonina quinasa. La formación de complejos receptoriales entre BAMBI y los receptores tipo II inhibe la señal de activinas, BMPs y TGF- β s ya que, la ausencia del dominio quinasa, impide la transmisión de la señal al interior celular.^{19,20}

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio⁶ demuestran la existencia de una elevada expresión de transcritos de diversos miembros de la familia TGF- β , sus receptores,

y del pseudorreceptor BAMBI, en regiones estrechamente relacionadas con el control de la transmisión nociceptiva (ganglio dorsal, asta dorsal de la médula, sustancia gris periacueductal, núcleos talámicos, corteza somatosensorial y cíngula), particularmente en áreas del SN ricas en receptores y/o péptidos opioides. En base a estos hallazgos, nos planteamos la hipótesis de que esta familia de factores de crecimiento podría estar implicada en el procesamiento de las señales nociceptivas. Generamos ratones que carecen del gen del pseudorreceptor BAMBI, antagonista fisiológico de TGF- β s. Pudimos constatar que estos animales manifiestan en el SNC hiperfunción de las vías de señalización de TGF- β . El análisis de la respuesta de los ratones *BAMBI-KO* en pruebas conductuales que valoran nocicepción, demostró que la ausencia de *BAMBI* condiciona un incremento del umbral nociceptivo en modelos de dolor agudo, y retrasa el desarrollo de hiperalgesia y alodinia mecánicas en modelos experimentales de dolor crónico neuropático. El umbral nociceptivo recobraba valores similares a los de los animales silvestres cuando los animales *BAMBI-KO* eran tratados con antagonistas opioides, implicando estos resultados al sistema opioide endógeno. Pudimos constatar que en los animales *BAMBI-KO* hay incremento en la producción de péptidos opioides endógenos (encefalinas y beta-endorfina) por parte de neuronas de la médula espinal, lo que confiere a estos animales un fenotipo anti-hiperalgésico dependiente de la activación de receptores opioides. Nuestro análisis de expresión génica sugiere que un incremento de la actividad transcripcional de genes codificantes de péptidos opioides podría ser el sustrato de la menor sensibilidad nociceptiva mostrada por los animales que carecen del gen codificante de BAMBI.

Estos estudios son la base de nuestros actuales objetivos: a) Estudiar los mecanismos moleculares implicados en el efecto protector de TGF- β s frente al dolor crónico patológico, en ratones *BAMBI-KO* y silvestres sometidos a lesión del nervio ciático. b) Validar la eficacia anti-hiperalgésica de tratamientos dirigidos a modificar la función y/o expresión de TGF- β en modelos experimentales de dolor neuropático.

A continuación presentamos un resumen de las actividades realizadas durante el último año y los resultados obtenidos.

En el primer bloque de experimentos, focalizamos nuestra actividad en dilucidar los mecanismos pre- y post-sinápticos implicados en la modulación del sistema opioide endógeno ejercida por la familia TGF- β , así como sus

consecuencias funcionales y farmacológicas en situación de dolor crónico.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE LA FAMILIA TGF- β INDUCEN LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES DE PÉPTIDOS OPIOIDES EN EXPLANTES DE MÉDULA ESPINAL

Nuestros resultados preliminares indicaban la existencia de una correlación lineal directa, significativa, entre los niveles de expresión génica de citoquinas pertenecientes a la familia TGF- β y la de genes codificantes de péptidos opioide endógenos en la médula espinal.⁶ Típicamente, los efectores de la vía de señalización de TGF- β se comportan como factores de transcripción. Así pues, nuestro primer objetivo fue analizar si los TGF- β eran capaces de modificar la expresión de los genes codificantes de péptidos opioides POMC y PENK. Para ello, cultivos organotípicos de explantes de médula espinal fueron incubados en un medio que contenía proteínas recombinantes de la familia TGF- β . Seleccionamos TGF- β 1, activina A y BMP-7 como representantes de las principales subclases de la superfamilia.²¹ Nuestros resultados mostraron que los TGF- β s analizados incrementaban significativamente los niveles medulares de expresión de ARNm de POMC y/o PENK. Estos datos son consistentes con nuestros resultados previos y con trabajos que demostraron la capacidad de diversos miembros de la familia TGF- β para regular la expresión de genes codificantes de opioides endógenos en diversos tipos celulares, tanto de humanos como de ratones, *in vitro*^{21,22,23} e *in vivo*.²⁴

POSTULAMOS QUE EL INCREMENTO DE LA SEÑALIZACIÓN DE TGF- β S PROVOCA UN AUMENTO DE LA TRANSCRIPCIÓN, EXPRESIÓN Y LIBERACIÓN SINÁPTICA DE MEDIADORES OPIOIDES, CUYA CONSECUENCIA SERÍA LA INHIBICIÓN DE LAS SEÑALES NOCICEPTIVAS.

Así pues, este conjunto de resultados sugiere que la señal de TGF- β s incrementada, que es la característica más sobresaliente de los ratones BAMBI-KO, provoca un aumento de la actividad transcripcional, expresión y liberación sináptica de mediadores opioides que, como consecuencia, daría lugar al fenotipo hipoalgésico que hemos descrito previamente.⁶ En este sentido, diversos estudios muestran la acción inhibitoria de encefalinas y β -endorfina

liberadas por interneuronas a nivel espinal sobre la transmisión de la información nociceptiva en la primera sinapsis sensorial del asta dorsal.²⁵ Más aun, la terapia génica medular con POMC o PENK produce analgesia asociada a un incremento en la producción local de β -endorfina o encefalina por poblaciones específicas de neuronas opioidérgicas espinales.^{26,27} Además, se ha demostrado que los ratones deficientes en PENK muestran respuestas incrementadas frente a estímulos nociceptivos,²⁸ y los ratones transgénicos con deficiencia selectiva de β -endorfina no presentan el fenómeno de analgesia inducida por estrés, que está mediada por opioides.²⁸ Por lo tanto nuestros datos sugieren sólidamente que la hipoalgnesia de los ratones BAMBI-KO podría estar mediada por un incremento de la liberación sináptica de opioides y subsiguiente activación de los receptores opioides.

LA INHIBICIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LAS ENCEFALINAS LIBERADAS AL ESPACIO SINÁPTICO POTENCIÓ EL FENOTIPO HIPOALGÉSICO DE LOS RATONES BAMBI-KO EN MODELOS DE DOLOR NEUROPÁTICO

Se ha demostrado en el animal de experimentación que la protección de los péptidos opioides liberados en las sinapsis opioidérgicas frente a la degradación, mediante el tratamiento con inhibidores de ectopeptidasas, proporciona analgesia en diversos modelos de dolor.^{29,30} En particular, la administración sistémica del inhibidor dual de peptidasas RB101 induce una potente acción antinociceptiva tanto en ratas normales como en aquellas sometidas a modelos de dolor neuropático,³¹ debido al consiguiente incremento de los niveles sinápticos de encefalinas.³²

En base a estos hallazgos, nuestro siguiente objetivo fue analizar si el fenotipo antialodínico de los ratones BAMBI-KO era sensible a la protección de los péptidos opioides con inhibidores de peptidasas. Ratones silvestres y BAMBI-KO fueron sometidos a lesión del nervio ciático y se monitorizó diariamente el desarrollo de hiperalgnesia y alodinia mecánicas valorando el reflejo de retirada de la pata lesionada ante la aplicación de monofilamentos de vonFrey, que ejercen presiones crecientes sobre la superficie plantar. Cuando los ratones de cada genotipo alcanzaron un nivel de alodinia mecánica equivalente, previamente determinado, se les administró el inhibidor de encefalinasas RB-101 y se valoró la respuesta a la estimulación

mecánica transcurridos 30 minutos. En estas condiciones, el efecto antialodínico de RB101 fue significativamente superior en los animales BAMBI-KO que en los silvestres, resultado que concuerda con unos niveles superiores de expresión espinal de opioides endógenos. Más aun, el antagonista naltrexona antagonizó completamente el efecto analgésico de RB101 en los ratones BAMBI-KO. Puesto que la potencia analgésica de los inhibidores de peptidasas es dependiente de la magnitud de la liberación sináptica de opioides endógenos, nuestros resultados nuevamente apoyan que el incremento de encefalinas espinales es el mecanismo que protege a los ratones BAMBI-KO del desarrollo de alodinia tras la lesión de un nervio periférico.

Nuestros resultados también confirman que en condiciones de dolor neuropático, existe un tono encefalinérgico inhibitor incrementado, que trataría de neutralizar la respuesta hiperalgésica que se produce tras la lesión nerviosa, que se pone de manifiesto al administrar el inhibidor del catabolismo de los opioides endógenos.³³ Además, es interesante subrayar que la inhibición de los enzimas implicados en la degradación de los péptidos opioides constituye una herramienta eficaz para evaluar el papel del tono opioide endógeno en una situación experimental, en este caso el dolor neuropático.

A NIVEL POST-SINÁPTICO, LA AUSENCIA DE BAMBI NO MODIFICÓ EL ACOPLAMIENTO ENTRE RECEPTORES OPIOIDES Y PROTEÍNAS GAI/GAO TRANSDUCTORAS DE LA SEÑAL TRAS LA ACTIVACIÓN POR AGONISTAS

El solapamiento existente en la localización de diversos receptores de TGF- β s y BAMBI con los receptores opioides de tipo μ ⁶ a nivel del asta dorsal de la médula espinal nos condujo a valorar si la señalización TGF- β , además de modular presinápticamente el sistema opioide endógeno, podría ejercer también acciones post-sinápticas sobre receptores opioides y/o sus vías de señalización. Para ello, determinamos el acoplamiento entre receptores opioides y sus proteínas G asociadas en animales BAMBI-KO y silvestres, mediante el análisis de la fijación inducida por agonistas de un análogo no hidrolizable de GTP, el [³⁵S]GTP γ S, en preparados de membranas de médula espinal. Se utilizaron agonistas selectivos de receptores opioides μ (DAMGO) δ (DESLET) y κ (U69,593). En condiciones control, no se observaron diferencias entre genotipos en la fijación de [³⁵S]GTP γ S basal o estimulada por agonistas opioides μ , δ y κ , siendo el efecto máximo y la potencia de

los diferentes agonistas similar en los ratones BAMBI-KO y silvestres. En ratones sometidos a dolor neuropático mediante lesión del nervio ciático tampoco se observaron diferencias entre genotipos en la estimulación inducida por agonistas de la fijación de [³⁵S]GTP γ S. Estos resultados sugieren que la ausencia de BAMBI no modifica la eficacia del acoplamiento entre receptores opioides y sus proteínas transductoras de la señal G α_i /G α_o tras la activación del receptor por agonistas, ni en condiciones basales ni tras el desarrollo de dolor neuropático.

LA EXPRESIÓN MEDULAR DE GENES CODIFICANTES DE RECEPTORES OPIOIDES SE ENCUENTRA INCREMENTADA EN LOS RATONES BAMBI-KO SOMETIDOS A DOLOR NEUROPÁTICO

El análisis de expresión génica en la región lumbar de la médula espinal, mostró que los animales BAMBI-KO, en condiciones de dolor neuropático, sobre-expresaban genes codificantes de receptores opioides μ y δ , en comparación con los ratones BAMBI-KO control. Obviamente, es imprescindible demostrar que el incremento de ARNm se traduce a un incremento de la síntesis de proteínas y de los receptores a nivel de la membrana celular. De confirmarse, este efecto también contribuiría a incrementar el efecto de los opioides endógenos y, previsiblemente de los fármacos opioides administrados exógenamente.

EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA MORFINA ESTÁ POTENCIADO EN LOS ANIMALES BAMBI-KO SOMETIDOS A DOLOR NEUROPÁTICO

En ratones silvestres y BAMBI-KO sometidos a lesión del nervio ciático se monitorizó diariamente el desarrollo de hiperalgesia y alodinia mecánicas valorando el reflejo de retirada de la pata lesionada ante la aplicación de filamentos de von Frey sobre la superficie plantar. Cuando los ratones de cada genotipo alcanzaron un nivel de alodinia mecánica equivalente, recibieron dosis acumulativas de morfina (1, 3 y 10 mg/kg) y se determinó la respuesta analgésica 30 minutos después de cada dosis. La acción antinociceptiva de la morfina a dosis bajas fue similar en ambos genotipos pero con las dosis intermedias (3 and 6 mg/kg) las respuestas alodínicas fueron significativamente menores en los ratones BAMBI-KO que en los silvestres. Estos resultados indican que los ratones BAMBI-

KO en condiciones de dolor neuropático son más sensibles a la acción antinociceptiva de la morfina que los silvestres, lo que estaría en concordancia con la regulación a la alza de los receptores opioides en la membrana neuronal. No obstante, este mecanismo, como hemos comentado anteriormente, requiere confirmación mediante western blot o autorradiografía.

Estos resultados, sin embargo, son poco conciliables con la ausencia de diferencias entre genotipos observada en los estudios de fijación de [35 S]GTP γ S inducida por agonistas en ratones con dolor neuropático. En este momento se encuentran en marcha en nuestro laboratorio experimentos dirigidos a analizar más profundamente las consecuencias de la delección de BAMBI sobre sistemas de transducción y vías de señalización activadas tras la activación del receptor opioide que podrían explicar esta discrepancia.

LA ADMINISTRACIÓN DE TGF-B1 RECOMBINANTE RETRASA EL DESARROLLO DE DOLOR NEUROPÁTICO TRAS LA LESIÓN DEL NERVO CIÁTICO EN RATONES SILVESTRES, MIENTRAS QUE EL TRATAMIENTO CON UN ANTICUERPO ANTI TGF-B LO ACELERA

Nuestro siguiente bloque de objetivos se centró en validar el posible efecto antialodínico de miembros específicos de la superfamilia TGF- β . La hipótesis de trabajo era que, entre ellos, deberíamos encontrar alguno/s con capacidad para retrasar el desarrollo de dolor neuropático tras la lesión del nervio ciático. El primero en analizarse ha sido el propio TGF- β 1. Nuestros resultados muestran que la administración continua de TGF- β recombinante, mediante mini bombas osmóticas colocadas en el momento en que se practica la lesión del nervio ciático, retrasa significativamente la aparición de dolor neuropático en ratones silvestres. Por el contrario, el tratamiento crónico con un anticuerpo neutralizante dirigido contra las tres isoformas de TGF- β acelera el desarrollo de alodinia mecánica.

En resumen, nuestro estudio aporta resultados que demuestran el papel de las citoquinas pertenecientes a la familia TGF- β como moduladoras de la percepción dolorosa, con un efecto protector frente al desarrollo de dolor neuropático. Hemos validado en animales sometidos a modelos de lesión nerviosa la capacidad de TGF- β 1 para interferir con el desarrollo de alodinia mecánica. Nuestros

resultados permiten postular el valor de los TGF- β s como potenciales dianas terapéuticas y podrían constituir el punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos analgésicos que actuarían incrementando la actividad del sistema opioide endógeno.

AGRADECIMIENTOS

RB-101 fue generosamente facilitado por el Dr. Bernard Roques. El trabajo está financiado por: Sociedad Española de Farmacología y Laboratorios Almirall; Instituto de Salud Carlos III (RTICS: RD06/001/1016); Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-16894); Fundació La Marató de TV3 (Grant 072131).

Bibliografía

1. Breivik H et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*. 10(4):287-333 (2006).
2. Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* 29:507-38 (2006).
3. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*.2001;413:203-10.
4. Boucher TJ et al. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science*, 290:124-127 (2000).
5. Yajima Yet al. Direct evidence for the involvement of brain-derived neurotrophic factor in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *J Neurochem*. 93(3):584-94. (2005).
6. Tramullas M et al. BMP and Activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) reveals the involvement of the TGF- β family in pain modulation. *J. Neurosci.*, January 27, 2010 • 30(4):1502–1511.
7. Echeverry S et al. Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain*. 2009 Mar 27;5:16.
8. Unsicker K, Kriegstein K. TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv Exp Med Biol*. 513:353-74. (2002)
9. Bottner M et al. The Transforming Growth Factor- β s: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J. Neurochem*. 75:2227-2240 (2000).
10. Massague J et al. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 19, 2783-810 (2005).
11. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgfbeta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21:659-93.
12. Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest*. 2007; 87:1077-91.
13. Derynck, R, Zhang, YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425:577–584.
14. Sekiya T et al. Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem*. 2004;279:6840-6846.
15. Zhang M et al. Smad3 prevents beta-catenin degradation and facilitates beta-catenin nuclear translocation in chondrocytes. *Biol Chem*. 2010 Jan 22.
16. Zhu AJ, Scott MP. Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? *Genes Dev*. 2004; 18(24):2985-97.
17. Massagué J, Chen Y-G. Controlling TGF-beta signaling. *Genes And Development*, 14:627-644 (2000).
18. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2007 Apr;19(2):176-84.
19. Onichtchouk D et al. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401, 480-485 (1999)
20. Yan X et al. Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 284(44):30097-104. (2009)
21. Bottner M et al. The Transforming Growth Factor- β s: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J. Neurochem*. 2000; 75:2227-2240.
22. Kamphuis S, et al. T helper 2 cytokines induce preproenkephalin mRNA expression and proenkephalin A in human peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1997; 79:91–99.
23. Kavelaars A, Heijnen CJ. Expression of preproenkephalin mRNA and production and secretion of enkephalins by human thymocytes. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917:778–783.
24. Nudi M, et al. Bone morphogenic protein (Smad)-mediated repression of proopiomelanocortin transcription by interference with Pitx/Tpit activity. *Mol Endocrinol* 2005; 19:1329–1342.
25. Bouret S, et al. Evidence that TGF beta may directly modulate POMC mRNA expression in the female rat arcuate nucleus. *Endocrinology* 2000; 142:4055–4065.
26. Yaksh TL et al. Studies on the intrathecal effect of beta-endorphin in primate. *Brain Res* 1982; 241:261–269.
27. Hao S, et al. Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in neuropathic pain. *Pain* 2003; 102:135–142.
28. Wu CM et al. Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Gene Ther* 2004; 11:933–940.
29. König M et al. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature* 1996; 383:535–538.
30. Rubinstein M et al. Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking β -endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:3995–4000.
31. Jutkiewicz EM. RB101-mediated protection of endogenous opioids: potential therapeutic utility? *CNS Drug Rev*. 2007;13:192-205.
32. Noble F, Roques BP Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opin Ther Targets*. 2007; 11:145-59.
33. Noble Fet al. Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB 101 induces potent analgesic responses in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992; 261:181-90.
34. Nieto MM et al. Facilitation of enkephalins catabolism inhibitor-induced antinociception by drugs classically used in pain management. *Neuropharmacology*. 2001. 41:496-506.