

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Facultad de medicina Departamento de Fisiología y Farmacología

Participación de la familia de factores de crecimiento TGF-beta en la percepción del dolor

Tesis doctoral presentada por Aquilino Lantero García para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria

Santander, Abril 2013



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Facultad de medicina Departamento de Fisiología y Farmacología

Dña. M^a Amor Hurlé González, Catedrática de Farmacología de la Universidad de Cantabria y coordinadora del grupo de investigación de "Citoquinas y factores de crecimiento en los fenómenos de plasticidad tisular patológica" y Dña. Mónica Tramullas Fernández, Investigadora del programa Juan de la Cierva en el 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 D. **Aquilino Lantero García** Licenciado en Biología y en Bioquímica con el título "Participación de la familia de factores de crecimiento TGF-beta en la percepción del dolor"

Consideramos 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 25 de Abril de 2013.

Fdo. M^a Amor Hurlé González

Fdo. Mónica Tramullas Fernández

Esta Tesis ha sido financiada con las siguientes ayudas:

- Instituto de Salud Carlos III (RTICS: RD06/001/1016), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-16894) y Fundació La Marató de TV3 (Ayuda 072131).
- Premio al mejor proyecto de investigación en Farmacología 2010 de la Sociedad Española de Farmacología y Laboratorios Almirall.

Agradecimientos

Escribir la parte de los agradecimientos puede ser tan complicado como cualquier otro apartado de la tesis doctoral, ya que será la única parte que la gran mayoría leerá con atención y criticara con fervor. Es por esto que quiero agradecer a todas las personas que han puesto su granito de arena de una forma u otra para que yo pudiera llevar a buen puerto esta tesis y que seguro que sin su ayuda nunca lo hubiera conseguido.

Quiero empezar estos agradecimientos dando las gracias a mi directora, Maruja Hurlé, por haberme dado la oportunidad de dedicarme a lo que yo quería, por hacerme sentir en mi casa desde el principio, por transmitirme sus conocimientos, por sus consejos y ayuda a la hora de desarrollar y escribir esta tesis, y sobre todo por invitarme a comer la mejor fabada y el mejor arroz con leche.

Darle las gracias a mi co-directora Mónica Tramullas por haber dedicado tantas horas de su tiempo en la escritura de esta tesis doctoral con una gran dosis de paciencia.

A Ana Villar por darme tantos buenos consejos en el laboratorio y estar dispuesta a ayudarme en todo momento.

Al resto de compañeros de laboratorio, Nieves, Ana, Begoña, Raquel, Sara, David y Cecilia, por haberme ayudado con la tesis cuando lo necesitaba pero sobre todo porque con vosotros he pasado muchos buenos momentos.

Al grupo del Dr. Ángel Pazos, a Elsa, Álvaro, Fuen, Rebeca, Pepi, Raquel, Bea, Madureira, Helena y Alicia por ayudarme con tantos experimentos y hacerme pasar muy buenos ratos.

Al grupo de la Dra. Carmen Martínez-Cué, Eva, Paula Vero y Susana, por aguantarme y hacerme reír cuando lo necesitaba.

Al grupo del Dr. Juan Hurlé, Juan Antonio Montero, Sonia, Montse, Susana, Nacho y Lolo por haberme ayudado en tantos experimentos siempre con una sonrisa.

A los Dres. Miguel Lafarga y M^a Teresa Berciano, por su ayuda en la biología celular, transmitiéndome generosamente sus conocimientos, y por permitirme usar sus infraestructuras. A los Dres. Ramón y Jesús Merino y sus colaboradores, por su desinteresada ayuda.

Al grupo del Dr. Peter A. Smith de la Universidad de Alberta, Canadá, Pat, Sascha, Paul, James, Lele y Natalia por aceptarme en su laboratorio, arroparme como uno más del grupo poniendo a mi disposición todo lo que necesitase y por hacer que disfrutara tanto de mi estancia en Canadá.

Al Dr. Juan Carlos Izpisúa-Belmonte del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona y Gene Expression Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA, por cedernos los ratones knock-out de BAMBI. Al Dr. Bernard Roques de la Universidad René Descartes, Pharmaleads, Paris, por proporcionarnos el inhibidor de encefalinasas RB101.

A mis amigos, los de Santander por estar ahí cerquita desde siempre ayudando en lo que haga falta y pasándolo genial en los ratos libres, porque no todo es el laboratorio. Y a los de Pamplona porque a pesar de que me intentaran convencer de ser aparejador gracias a ellos pude acabar la carrera y gracias a ellos también he terminado esta tesis.

A mi madre, por su apoyo incondicional, desde el principio apostando por esta tesis y porque sin ella a mi lado nunca hubiera conseguido muchas otras cosas que juntos hemos logrado. A mi hermana, por ayudarme siempre en todo lo que ha podido intentando hacerme la vida más fácil todos estos años y a las dos por aguantarme de la mejor forma mis peores días. A mí abuela M^a Luisa, porque estos años nos hemos visto menos de lo que quisiéramos pero siempre me ha dado palabras de ánimo para seguir adelante.

Y por último a Uxue, por no hacerme ningún reproche a pesar de la distancia y el poco tiempo libre para estar con ella. Por estar dispuesta siempre a ayudarme y por sacrificarse tanto por esta tesis como yo. Pero sobre todo por hacerme sentir tan especial.

A mi madre, mi hermana y a Uxue

Índice

ABREVIATURAS						
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 25						
ESTADO ACTUAL DEL TEMA						
1	CONCEPTOS GENERALES SOBRE EL DOLOR	33 33				
	1.1 Los sistemas de modulación del dolor	Δ1				
	1.3 Sistema onioide endóaeno	42				
	1.4 Tinos de dolor	46				
	1.4.1 Dolor nociceptivo	. 46				
	1.4.2 Dolor neuropático	. 48				
2	FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-B (TGF-B)	53				
	2.1 Vía de señalización de TGF-8	54				
	2.1.1 Vía canónica de señalización: Smads	. 55				
	2.1.2 Vías no canónicas de señalización	. 57				
	2.1.3 Regulación de la vía de señalización de TGF-β	. 58				
-	2.1.4 Regulación de la señal a nivel de la membrana plasmática: BAMBI	. 60				
3	Participación de la superfamilia de TGF-b en la percepción del dolor	61				
MA	TERIAL Y MÉTODOS	67				
1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	69				
2	Estudios conductuales de nocicepción	69				
	2.1 Valoración de la respuesta a estímulos térmicos	70				
	2.1.1 Test de la placa caliente	. 71				
	2.1.1 Test de inmersión de la cola	. 71				
	2.1.2 Test de retirada de la cola	. 71				
	2.2 Valoración de la respuesta a estímulos mecánicos: test de von Frey	72				
	2.3 Valoración de la respuesta nociceptiva a estímulos químico-inflamatorios	:				
	test de la formalina	73				
	2.4 Valoración del desarrollo de alodinia mecánica en un modelo de dolor					
-	crónico neuropático provocado por la lesión del nervio ciático	73				
3	TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS ADMINISTRADOS	75				
	3.1 Agonista opioide	75				
	3.2 Antagonistas opioides	75				
	3.3 Inhibidor dual de peptidasas degradadoras de encefalinas (RB101)	75				
	3.4 TGF-B1 recombinante	76				
_	3.5 Anticuerpo anti TGF-B	76				
4	EXTRACCIÓN DE TEJIDOS Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS	76				
	4.1 Extracción y procesado de la médula espínal	76				
	4.2 Extracción y procesado del cerebro y los ganglios dorsales para estudios					
_	histológicos	77				
5	ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	78				
	5.1 Hibridación in situ	78				
	5.2 Inmunofluorescencia	80				
	5.2.1 Disociados neuronales	.80				
~	5.3 Initiutionistoquimica	82				
6	ESTUDIOS NEUROQUIMICOS EN MEDULA ESPINAL	82				

	6.1	Determinación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa	82
	6.1.1	Extracción de RNA	82
	6.1.2	Transcripción inversa de ARN	83
	6.1.3	PCR cuantitativa	84
	6.2	Inmunodetección de proteínas mediante western blot	85
	6.3	Radioinmunoensayo	87
	6.4	Estudios de fijación de [³⁵ S]GTPγS en homogenizados de membranas	88
	6.5	Actividad adenilato ciclasa en homogeneizados de membranas	89
7	Estu	DIOS EN CULTIVOS CELULARES	90
8	Anál	ISIS ESTADÍSTICO	91
RESU	JLTADO	OS	93
1	BAM	IBI se localiza en áreas del sistema nervioso relevantes para el control de la	
NC	CICEPCIO	ÓN	95
2	LA AU	JSENCIA DE BAMBI EN RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE CONDICIONA UNA	
SE	ÑALIZACI	ÓN MEDIADA POR TGF-B INCREMENTADA	95
3	LOS R	ATONES QUE CARECEN DE BAMBI PRESENTAN UN FENOTIPO HIPOALGÉSICO FRENTE A	
ES	TÍMULOS	NOCICEPTIVOS AGUDOS DE TIPO TÉRMICO, MECÁNICO Y QUÍMICO/INFLAMATORIO	96
	3.1	Nocicepción evocada por estímulos térmicos	97
	3.2	Nocicepción evocada por estímulos auímico/inflamatorios	97
	3.3	Nocicepción evocada por estímulos mecánicos	98
4	LA AU	JSENCIA DE BAMBI ATENÚA EL DESARROLLO DE ALODINIA MECÁNICA EN UN MODELO DE	
DC	LOR CRĆ	ÓNICO NEUROPÁTICO	98
5	EL FEI	NOTIPO HIPOALGÉSICO DE LOS RATONES BAMBI ^{-/-} ES REVERTIDO POR ANTAGONISTAS	
OP	IOIDES		01
6	LOS R	atones BAMBI ^{-/-} muestran una expresión incrementada de péptidos opioides en	1
IA	MÉDULA	A FSPINAL	03
7	FI TR	ATAMIENTO CON EL INHIBIDOR DE ENCEEALINASAS RB101 POTENCIA EL FENOTIPO	
н	POALGÉS	ICO Y ANTIAL ODÍNICO DE LOS RATONES BAMBI-/-	06
8	FI FFI	ECTO ANALGÉSICO DE LA MOREINA ESTÁ POTENCIADO EN LOS RATONES BAMBI ^{-/-} en	00
M			09
IVIN	8 1	Efecto de la morfina sobre la sensibilidad mecánica	03 N9
	8 7	Efecto de la morfina en un modelo de dolor agudo guímico/inflamatorio 1	na
	8 3	Efecto de la morfina con un modelo de dolor agado químico/mjiamatorio i Efecto de la morfina sobre la alodinia mecánica en un modelo de dolor	05
	neuron		11
۵			11
0		JSENCIA DE DAIVIDI CONDICIONA UN INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES	12
10		IS LA MIEDULA ESPINAL LOMBAR EN AMIMALES CON DOLOR NEOROPATICO	12
10		DENCIA DE DAIVIDI NU MUDIFICA LA CAPACIDAD DE ACUPLAMIENTO DE LOS RECEPTORES	12
01		A PROTEINAS GI/O, EN RESPUESTA A AGONISTAS, EN LA MEDULA ESPINAL	12
11		JSENCIA DE BAIVIBI POTENCIA LA INHIBICIÓN DE LA ADENILATO CICLASA INDUCIDA POR	4 -
AG		DE RECEPTORES OPIOIDES μ , EN RATONES SOMETIDOS A LESION DEL NERVIO CIATICO 1	15
12	IGF-	B PROTEGE FRENTE AL DESARROLLO DE DOLOR NEUROPATICO TRAS LA LESION DEL NERVIO	
CIA	ATICO		16
	12.1	En ratones sometidos a dolor crónico neuropático, el tratamiento con TGF	-
	в1 гесс	ombinante atenúa el desarrollo de alodínia mientras que la neutralización	
	de TGF	-в con un anticuerpo lo potencia1	17

12.2 El tratamiento con TGF-61 recombinante aumenta la expresión de del receptor opioide μ en médula espinal de ratones sometidos a lesión de		
ciático y en cultivos celulares de neuroblastoma	119	
DISCUSIÓN	123	
CONCLUSIONES	139	
BIBLIOGRAFÍA	143	
PUBLICACIONES	161	

Abreviaturas

AC: Adenilato Ciclasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ALK: Activin receptor-like kinase.

AMPc: AMP cíclico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNt: ARN de transferencia

BAMBI: BMP and activin membrane bound inhibitor.

BHE: Barrera hematoencefálica.

BMP: Bone morfogenetic proteins.

BRV: Bulbo rostroventral.

CaMKII: Calcio calmodulina kinasa.

Canales TRP: Transient receptor potential channels.

CX3CL1: Fractalcina.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

DOR: Receptor opioide delta.

FK: Foskolina.

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

GDFs: Growth and differentiation factors.

GDNF: Glial-derived neurotrophic factor.

GFAP: Glial fibrillary acidic protein.

GPCRs: Receptores de membrana acoplados a proteínas G.

I.P: Intraperitoneal.

IASP: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor.

KOR: Receptor opioide Kappa.

MIS: Mullerian Inhibitory Substance.

MOR: Receptor opioide mu.

MEP: Máximo efecto posible.

NE: Neuronas nociceptivas específicas.

NLX: Naloxona.

NOR: Receptor de nociceptina.

Nor-BNI: Nor-binaltorfina.

NP: Neuropático.

NP: Núcleo parabraquial.

PCR: Polimerase chain reaction.

PDYN: Prodinorfina.

PENK: Proencefalina.

PFA: Paraformaldehido.

PKA: Proteína kinasa A.

PKC: Proteína kinasa C.

PNOC: Pronociceptina/orfanina FQ.

POMC: Proopiomelanocortina.

PRGC: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

RDA: Neuronas de rango dinámico amplio.

RT-PCR: Retrotranscripción inversa.

SGPA: Sustancia gris periacueductal.

SN: Sistema nervioso.

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico.

TAK-1: TGF- β activated kinase 1.

TGF-*β*: Transforming growth factors-*β*.

TLR: Toll like receptor.

TRPV1: Receptor vaniloide.

 $T\beta R-I$: Receptores tipo I.

 $T\beta R-II$: Receptores tipo II.

TβR-III: Receptores tipo III.

β-FNA: β-Funaltrexamina.

Introducción y objetivos

La Sociedad Española del Dolor refiere que el 11% 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% de los enfermos. El tiempo medio de evolución del dolor crónico es de seis años y medio y, como consecuencia del mismo, el 30% de los pacientes se ven obligados a acogerse a la baja laboral. El impacto en la economia del dolor crónico es superior al 2% del PIB. Un estudio epidemiológico reciente, 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 manisfiesto 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).

Estudios recientes indican que algunos factores tróficos y citoquinas juegan un papel importante a nivel del sistema nervioso central (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. Estudios muy recientes 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. El mecanismo responsable es complejo, implicando inhibición de la gliosis, la activación glial y la respuesta inflamatoria que son inducidas a nivel espinal por la lesión del nervio periférico. La posibilidad de interferir con el proceso doloroso a través de esta familia de factores de crecimiento podría suponer la apertura de nuevas perspectivas terapéuticas para el tratamiento de situaciones de dolor patológico altamente resistentes al tratamiento farmacológico convencional.

La familia TGF- β constituye el prototipo de 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 sistema nervioso (SN). 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

27

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 del 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. Una vez fosforiladas, las Smads se incorporan al núcleo donde se unen a determinadas secuencias promotoras de genes diana, interactúan con factores de trascripción o reclutan coactivadores o correpresores, dependiendo del contexto. El resultado final es una regulación positiva o negativa de la trascripción de genes diana específicos en cada tipo celular. Estas citoquinas tambien ejercen efectos a través de otras vías de señalización no canónicas, principalmente MAP kinasas.

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. 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 trasmembranal cuyo dominio extracelular se asemeja estructuralmente al de los receptores tipo I; sin embargo, su dominio intracelular carece de actividad 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.

En base a estos datos, hipotetizamos que BAMBI, en caso de expresarse en neuronas y/o células gliales de áreas relevantes para la percepción/modulación de la actividad nociceptiva, debería ejercer un importante efecto regulador de las señales dependientes de TGF- β implicadas en la plasticidad neural subyacente al dolor crónico patológico. Según nuestras previsiones, la deficiencia en BAMBI promovería un incremento de la actividad señalizadora de la superfamilia TGF- β y, consecuentemente, debería ejercer un efecto neuroprotector en proceso dolorosos de diferente índole. Nuestra colaboración con el Dr Juan Carlos Izpisúa Belmonte (Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California) nos ha permitido disponer de ratones modificados genéticamente, deficientes en BAMBI, que fueron utilizados como instrumento para confirmar nuestra hipótesis, a través de los siguientes objetivos:

28

- 1°. Determinar la localización de BAMBI en áreas del SN relevantes para la percepción dolorosa.
- 2º. Estudiar en los ratones deficientes en BAMBI el fenotipo relacionado con la sensibilidad nociceptiva frente a estímulos dolorosos agudos de tipo térmico, mecánico y químico/inflamatorio.
- 3º. Determinar en los ratones deficientes en BAMBI el fenotipo relacionado con el desarrollo de dolor crónico patológico neuropático.
- 4º. Estudiar los mecanismos implicados en el fenotipo nociceptivo de los ratones deficientes en BAMBI, prestando particular atención al sistema opioide endógeno modulador del dolor. Analizaremos:
 - a) Cambios presinápticos en la transcripción de péptidos opioides.
 - b) Cambios postsinápticos en las vías de señalización opioides (densidad de receptores, acoplamiento con proteínas Gi/o y respuesta de la vía efectora de la adenilato ciclasa).
 - c) Cambios en la respuesta antinociceptiva inducida por fármacos moduladores de opioides endógenos y por analgésicos opioides.
- 5°. Valorar la influencia sobre la respuesta nociceptiva de tratamientos dirigidos a modificar la función y/o expresión de TGF-β en animales sometidos a modelos de dolor.

Estado actual del tema

1 Conceptos generales sobre el dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor ("International Association for the Study of Pain", IASP) define el dolor como "una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con una lesión tisular, presente o potencial". Esta definición se refiere al dolor no solo como una experiencia puramente sensorial, sino que además integra componentes subjetivos y emocionales. El dolor debe ser considerado una experiencia altamente subjetiva, que se completa con experiencias físicas, psicológicas y sociales del individuo y que puede estar presente incluso sin causa somática que lo justifique.

La percepción del dolor y los mecanismos que este pone en marcha forman parte del sistema general de defensa del individuo frente a las agresiones del medio. Una adecuada respuesta por parte del sistema nociceptivo a un estímulo potencialmente lesivo permite evitar daños al individuo y es, por tanto, algo positivo de cara a la supervivencia. Cuando la nocicepción cumple estas funciones, el dolor es una señal de alerta que pone en marcha respuestas protectoras. Sin embargo, el sufrimiento prolongado provocado por el dolor crónico puede convertirse en un serio lastre para la calidad de vida de los individuos que lo padecen, y constituye una de las causas más frecuentes de demanda de cuidados médicos y tratamiento farmacológico. Cuando el sistema nociceptivo produce sensaciones dolorosas anómalas, tales como la persistencia de dolor cuando ha desaparecido la lesión que lo provocó o cuando la respuesta dolorosa es desproporcionada al estímulo causal (ej. sensación de dolor por el roce de la ropa sobre una cicatriz meses después de su curación), el dolor pierde su función defensiva y se erige como un proceso patológico en sí mismo que requiere tratamiento específico.

1.1 El sistema nociceptivo

El sistema nociceptivo es el encargado de detectar y procesar las sensaciones dolorosas. Los procesos neurofisiológicos que participan en el dolor son:

- a) Activación y sensibilización de los nociceptores periféricos.
- b) Transmisión de los estímulos nociceptivos a través de las aferencias primarias.
- c) Modulación e integración de la respuesta nociceptiva a nivel del asta dorsal medular.
- d) Transmisión por las vías ascendentes (espino-encefálicas).

- e) Integración de la respuesta en los centros superiores (estructuras encefálicas).
- f) Control descendente por las vías encéfalo-espinales.

La porción periférica de la nocicepción está constituida por aquellos elementos que intervienen en la transmisión del dolor desde el lugar en el que la señal es generada (piel, vísceras, etc.), hasta su entrada en el SNC a nivel de las astas posteriores de la médula espinal (figura 1). La mayor parte de órganos y sistemas del cuerpo están inervados por un grupo especial de receptores sensoriales, a los que se conoce como nociceptores. El nociceptor es la terminación nerviosa periférica de una neurona pseudounipolar (neurona nociceptiva primaria), cuyo soma se encuentra en los ganglios raquídeos y en ganglio del trigémino, y que emite su otra prolongación nerviosa en dirección central para establecer sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal (Flórez, 2007; Woolf y Ma, 2007).

Las neuronas sensoriales primarias se pueden clasificar en base a la velocidad de conducción de sus axones periféricos, la cual está directamente relacionada con el diámetro del axón y con la presencia o ausencia de mielina. De acuerdo a ello, diferenciamos tres grupos de neuronas sensoriales primarias (Aliaga y cols., 2009; Flórez, 2007; Meyer y cols., 2006).

- El grupo Aα/β, sus axones son gruesos (6-20 µm) y mielinizados con alta velocidad de conducción (30-120 m/s).
- El grupo Aδ, cuyos axones tienen calibre mediano (1-5 μm) y están escasamente mielinizados por lo que conducen a velocidad moderada (12-30 m/s).
- El grupo C, caracterizado por poseer axones de pequeño diámetro (0,3-1,5μm), no mielinizados que conducen a velocidad mucho más lenta (0,4-2 m/s).

La principal característica de las terminaciones periféricas de las neuronas nociceptivas primarias es su capacidad diferenciadora entre estímulos nocivos y estímulos inocuos, de ahí que se denominen nociceptores (Woolf y Ma, 2007). Los nociceptores son capaces de codificar estímulos comprendidos dentro del rango de intensidades nocivas, mientras que no responden o responden de forma irregular a estímulos de intensidad baja. De las fibras sensoriales descritas, en condiciones normales solamente las A δ y C conducen sensibilidad nociceptiva. Se considera que las fibras A δ transmiten la sensación de "primer dolor" o "dolor rápido" (tarda unos 300 ms) y median la primera respuesta adaptativa al dolor (retirada). Es un dolor bien delimitado y localizado (epicrítico). Los nociceptores C serían los conductores del

denominado "segundo dolor" que se caracteriza por ser más lento (tarda unos 0,7-1,2 s) y está mal localizado (protopático).



Figura 1. Anatomía de los nociceptores. (A) Las neuronas somatosensoriales se localizan en los ganglios periféricos (trigémino y dorsales) a lo largo de la columna vertebral y de la médula espinal. Las neuronas nociceptivas primarias proyectan sus terminaciones centrales al SNC (tronco del encéfalo y asta dorsal de la médula espinal), y sus terminaciones periféricas a la piel y otros órganos. (B) Los nociceptores C (en rojo) no están mielinizados y sus axones son de pequeño diámetro. Estas fibras inervan la piel (dermis y/o epidermis) y sus proyecciones centrales llegan a las láminas I y II del asta dorsal. (C) Los nociceptores A (azul) están mielinizados y conducen a altas velocidades. Sus proyecciones centrales alcanzan las láminas I y V. (Modificado de Dubin y Patapoutian, 2010).

En función de la localización y la modalidad de estímulo que son capaces de transmitir, podemos diferenciar:

- Nociceptores cutáneos. Las sensaciones asociadas al dolor cutáneo suelen responder a dos modalidades: el dolor punzante y el dolor quemante y urente. El frio intenso produce también dolor. Los nociceptores polimodales de las fibras C responden a estímulos nocivos mecánicos, térmicos y químicos. Representan la mayor parte de los nociceptores en la piel con vello en la especie humana. Son muy sensibles al fenómeno de sensibilización en respuesta al daño tisular, provocando el fenómeno denominado hiperalgesia primaria. Los mecanorreceptores de alto umbral de las fibras Aδ responden a estímulos mecánicos aversivos.
- Nociceptores musculares y articulares. Se han descrito nociceptores en tejidos profundos tales como músculos, ligamentos y articulaciones. En los músculos hay terminaciones de fibras Aδ que responden a sustancias algogénicas como los hidrogeniones, iones potasio, bradikinina o serotonina, y terminaciones de fibras C que responden a estímulos musculares nocivos tales como la presión, el calor o la isquemia. Las articulaciones están inervadas por nociceptores de fibras C y Aδ que responden a movimientos articulares nocivos y a factores liberados por el daño tisular. Son sensibilizados por la inflamación local de la articulación.
- Nociceptores viscerales: Responden a estímulos capaces de causar dolor visceral, pero solamente a intensidades de estimulación por encima del rango nocivo. Se piensa que los nociceptores viscerales participan en las sensaciones generadas por estímulos como la isquemia cardíaca, congestión y embolismo pulmonar, cólicos renales, etc. La mayoría son terminaciones de fibras C y en algunos casos Aδ.

La caracterización neuroanatómica y molecular de los nociceptores ha demostrado una gran heterogeneidad, especialmente en el caso de las fibras C. Por ejemplo, existe una población de nociceptores C denominados "peptidérgicos", los cuales presentan inmunoreactividad positiva frente a neuropéptidos como la sustancia P o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC). La población de nociceptores C denominados "no peptidérgicos", expresan receptores que responden frente a sustancias como GDNF ("glial-derived neurotrophic factor"), neurturina y artemina. Los nociceptores pueden diferenciarse también de acuerdo a la diferente expresión de canales que proporcionan las sensaciones de calor (TRPV1), frío (TRPM8)
y los que se activan por sustancias químicas (TRPA1). Esta heterogeneidad de los nociceptores, se asocia con su función específica en la detección de las diferentes modalidades de dolor (Basbaum y cols., 2009).

Entre la activación de la membrana celular del nociceptor y la integración cerebral más compleja de la información dolorosa, existe un procesamiento continuo en el cual participan innumerables mediadores químicos y procesos fisiológicos. El daño tisular producido por una lesión, enfermedad o inflamación, produce la liberación por las células de los tejidos, vasos sanguíneos, células inflamatorias, terminaciones nerviosas, etc. de una enorme serie de sustancias químicas con capacidad algogénica en el entorno inmediato de las terminaciones periféricas nociceptivas. Entre estas sustancias se encuentran iones $(H^+ y K^+)$, neurotransmisores (serotonina y noradrenalina), mediadores (histamina, bradicinina, prostaglandinas, citoquinas) y péptidos (sustancia P, dinorfina, PRGC). Algunas de estas sustancias excitan directamente la membrana del nociceptor, activándolo, otras actúan de forma permisiva o sinérgica sobre el nociceptor, modulando su sensibilidad. Los mediadores liberados también pueden actuar sobre células no nerviosas del entorno, facilitando procesos inflamatorios que, a su vez, promueven la secreción de sustancias capaces de estimular o sensibilizar los nociceptores periféricos y las vías medulares de la transmisión dolorosa. Cualquiera que sea la vía de activación de un nociceptor, además de producir un potencial de acción nervioso, pone en marcha un conjunto de actividades metabólicas, neurosecretoras y de trasiego intra-axónico, que le permiten interactuar con su entorno y adaptarse de forma dinámica a situaciones cambiantes para desarrollar adecuadamente sus funciones (Woolf y Ma, 2007).

El asta dorsal de la médula espinal es la principal estructura receptora de las aferencias primarias que transmiten información desde los receptores sensoriales de la piel, vísceras, articulaciones, músculos del tronco y extremidades hacia el SNC. Sin embargo, la médula espinal no es una simple estación de relevo sináptico en la transmisión de la nocicepción, sino que representa un lugar de importantes interacciones entre los componentes aferentes periféricos, los sistemas inhibitorios descendentes supraespinales y las propias neuronas medulares. El resultado final de estas interacciones permite que un impulso nociceptivo siga su curso hacia estructuras superiores o sea total o parcialmente bloqueado.

Los principales neurotransmisores liberados por las aferencias nociceptivas primarias en la transmisión del impulso nociceptivo desde la periferia hasta la neurona

37

de segundo orden del asta posterior de la médula son la sustancia P, que interacciona con receptores de taquicininas, el glutamato, que ejerce sus acciones al interactuar con los receptores AMPA, NMDA y metabotropicos, y el PRGC.

Las proyecciones centrales de las neuronas nociceptivas primarias terminan casi exclusivamente en las láminas I, II y V del asta dorsal, donde establecen la primera sinapsis con la neurona de segundo orden de las vías ascendentes encargadas de llevar al cerebro la información dolorosa (figura 2) (Flórez, 2007). La lámina I, también conocida como zona marginal de Waldayer, contiene neuronas nociceptivas específicas (NE) que responden exclusivamente a estímulos nociceptivos. Las neuronas de esta capa son principalmente de proyección supraespinal, enviando conexiones directas al tálamo medial y a su núcleo intralaminal y a los diferentes segmentos espinales. En los primates es el principal punto de origen del haz espinotalámico. La lámina II, también conocida como sustancia gelatinosa, contiene básicamente interneuronas de redes locales excitatorias (glutamatérgicas) e inhibitorias (glicinérgicas y GABAérgicas), que son fundamentales en el procesamiento de la nocicepción. La porción interna IIi recibe aferencias no nociceptivas y la externa IIo recibe aferencias nociceptivas C. La lámina V es una capa importante en el proceso nociceptivo. En esta lámina predominan las denominadas neuronas de rango dinámico amplio (RDA) que reciben tanto influencias directas no nociceptivas (A α/β) como directas e indirectas nociceptivas A δ y C. Recibe aferentes primarios tanto cutáneos como viscerales de tipo químico, térmico o mecánico de alto y bajo umbral. Estas neuronas identifican las diferentes intensidades de dolor. Las neuronas RDA junto con las neuronas de la capa I forman el grueso del haz espinotalámico. La lámina X también se relaciona con la transmisión nociceptiva, se halla situada profundamente alrededor del canal del epéndimo y se ha relacionado con la transmisión del dolor visceral.

Las proyecciones ascendentes permiten la conexión anatómica entre la neurona de segundo orden de la médula espinal y los centros nerviosos superiores relevantes para la nocicepción (figura 3). Las principales vías ascendentes (Bonica, 2001; Flórez, 2007) son:

El tracto espinotalámico, es el haz más estrechamente relacionado con la transmisión del dolor, la temperatura y el picor. Sus células de origen se encuentran básicamente en las láminas I y V; las fibras ascendentes se decusan a la porción contralateral de la medula espinal y ascienden hacia estructuras superiores. Las principales proyecciones de esta vía se dirigen a la neurona de



tercer orden de la vía nociceptiva, localizada en los núcleos mediales e intralaminares del tálamo.

Figura 2. Inserción de las diferentes fibras sensoriales en el asta dorsal de la médula espinal. Las fibras A δ y C se insertan de forma directa en las neuronas de la lámina I además las interneuronas de la lámina II; en la lámina I también se insertan de forma indirecta. En la lámina V predominan las neuronas de RDA que reciben influencias tanto directas no nociceptivas (A α /A β) como directas e indirectas nociceptivas (A δ y C). Las interneuronas de la lámina II conectan también con dendritas de las neuronas RDA. Las vías nociceptivas ascendentes se originan tanto en las neuronas NE como las RDA. (Tomado de Flórez, 2007).

- Los tractos espinoreticular, espinoreticulotalámico y espinomesencefálico, tienen su origen en las neuronas de las láminas I, V y VII y en el núcleo del trigémino. Sus principales proyecciones se realizan sobre diversos núcleos del tronco cerebral como son:
 - a) Los núcleos catecolaminérgicos del tronco, incluido el locus coeruleus, relacionados con las respuestas vegetativas provocadas por el dolor.
 - b) El núcleo parabraquial, centro integrador de la actividad aferente visceral general y estación intermedia hacia regiones telencefálicas con funciones vegetativas, neuroendocrinas y emocionales.
 - c) La sustancia gris periacueductal (SGPA), centro de control homeostático en íntima conexión con el sistema límbico, cuyas proyecciones descendentes sobre las láminas I y V tienen un efecto directo en la integración y entrada de la información nociceptiva a nivel del asta posterior.
 - d) Neuronas de la formación reticular.

A través de las vías descritas, los impulsos dolorosos llegan al cerebro, de modo que la intensidad percibida de los impulsos dolorosos se correlaciona con un incremento de actividad en numerosas estructuras cerebrales entre las que se encuentran las áreas corticales somatosensoriales primarias (SI) y secundarias (SII), los ganglios basales, el núcleo accumbens, la corteza de la ínsula, la corteza prefrontal medial, la corteza cingulada anterior, la amigdala y el cerebelo. La corteza motora suplementaria y área premotora ventral contralaterales también son activadas (Apkarian y cols., 2011).



Figura 3. Anatomía de las vías del dolor. Los nociceptores transmiten la información nociceptiva a las neuronas de proyección del asta dorsal de la médula espinal. Un subconjunto de estas neuronas de segundo orden transmite la información a la corteza somatosensorial a través del tálamo, proporcionando información sobre la ubicación y la intensidad de los estímulos dolorosos. Otras neuronas de proyección acoplan la corteza cingulada y la corteza insular a través de conexiones en el tronco cerebral (núcleo parabraquial. NP) y la amígdala, contribuyendo al componente afectivo de la percepción dolorosa. Esta información ascendente también accede a las neuronas del bulbo rostroventral (BRV) y sustancia gris periacueductal (SGP) del cerebro medio conectando sistemas descendente de retroalimentación que regulan la salida desde la médula espinal. (Modificado de Basbaum y cols., 2009).

El alto nivel de complejidad en la organización del proceso de percepción del dolor, así como las numerosas, y no bien conocidas, conexiones entre las diversas áreas cerebrales hacen difícil establecer con claridad el sitio exacto que percibe el dolor como tal. Parece que la complejidad de la sensación dolorosa obedece a la activación de muchas regiones corticales y subcorticales simultáneamente. Tradicionalmente, se considera que el área somatostésica primaria (SI) es uno de los principales sitios en los que se percibe el dolor; es activada cuando se producen estímulos dolorosos y se asocia a estados patológicos de dolor. Se comporta como integrador de aspectos sensoriales del dolor, incluidos la localización e intensidad. Su activación es modulada por factores cognitivos, por ejemplo la atención o las experiencias previas, que alteran la forma de percepción del dolor. La discriminación afectiva y conductual del dolor se establece en el tálamo, específicamente en los núcleos centrales y parafasiculares. 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, la corteza somatosensorial primaria y la corteza premotora ventral. Las respuestas vegetativas puestas en marcha por el dolor se relacionan con la corteza anterior del cíngulo y la corteza anterior de 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).

1.2 Los sistemas de modulación del dolor

La transmisión de la información nociceptiva desde la médula espinal a los centros supraespinales se encuentra bajo mecanismos de control, que son ejercidos a niveles tanto segmentario como suprasegmentario. A nivel segmentario, las interneuronas inhibitorias presentes en el asta dorsal contactan con dendritas o somas de neuronas de proyección provocando su inhibición postsináptica. Otras, en cambio, proyectan a las terminaciones nociceptivas primarias y, a través de sinapsis axoaxónicas, provocan inhibición presináptica. Un ejemplo de este tipo de control lo constituye el alivio del dolor producido por el frotamiento de una zona cercana a la lesionada o por la aplicación de estímulos eléctricos cutáneos mediante TENS. La explicación radica en la inhibición provocada por las fibras A β sobre las fibras transmisoras de la señal nociceptiva a nivel de las astas posteriores, particularmente sobre las neuronas de amplio rango dinámico. Estos sistemas están mediados por

interneuronas inhibitorias espinales activadas por la excitación de los mecanorreceptores cutáneos de bajo umbral. El sistema de inhibición presináptico afecta a todas las fibras aferentes primarias y no sólo a las de origen nociceptivo, y es un sistema altamente organizado que actúa como mecanismo de autocontrol de los impulsos aferentes de fibras sensoriales complementarias (Aliaga y cols., 2009).

Existe un mecanismo supraespinal de control y regulación de la transmisión de impulsos nociceptivos a través de la médula espinal, que utiliza una serie de transmisores químicos, incluyendo noradrenalina, serotonina, opioides y cannabinoides (Ossipov y cols., 2010). Se trata de un mecanismo de control descendente que se origina en estructuras nerviosas que se encuentran por encima de la médula: mesencéfalo (SGPA), región bulbar ventromedial rostral, que incluye el núcleo magno del rafe, el núcleo reticular paragigantocelular y neuronas de la formación reticular adyacente. En la SGPA convergen señales procedentes de las neuronas nociceptivas de la médula espinal, tálamo, corteza, amigdala, hipotálamo etc. De la SGPA parten proyecciones descendentes al núcleo noradrenérgico, locus coeruleus, y a la región bulbar rostroventromedial. A este nivel, las señales descendentes establecen relevo en los núcleos del rafe y formación reticular adyacente, desde donde parten vías que 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. El sistema on aumenta la actividad después de un estímulo nociceptivo y favorece la transmisión del dolor, mientras que el sistema off ejerce una influencia inhibidora sobre dicha transmisión. Las células off son inhibidas por las células on activadas, y su actividad es promovida por opioides endógenos y exógenos (Ossipov y cols., 2010; Bonica, 2001).

1.3 Sistema opioide endógeno

El sistema opioide endógeno es un elemento esencial en la modulación de la percepción dolorosa. En 1975, se identificaron los dos primeros ligandos endógenos capaces de interaccionar selectivamente con el receptor opioide: los pentapéptidos Met⁵-encefalina y Leu⁵-encefalina (Hughes y cols., 1975). A ellos les siguió el aislamiento de β -endorfina y dinorfina. En la actualidad se conocen tres familias diferentes de péptidos opioides que derivan de precursores diferentes: La proopiomelanocortina (POMC), la proencefalina A o proencefalina (PENK) y la proencefalina B o prodinorfina (PDYN) (Nakanishi y cols., 1979; Noda y cols., 1982; Kakidani y cols., 1982) (tabla 1).

El péptido opioide derivado de la POMC es la β -endorfina, que presenta buena afinidad por los receptores opioides μ y tiene una distribución anatómica restringida a ciertas estructuras neuronales. Los derivados de la PENK son las encefalinas, met- y leu-encefalina, las cuales están presentes en la mayor parte de las estructuras del SNC y activan preferencialmente los receptores opioides δ , aunque también presentan cierta afinidad por los μ . Los derivados de la PDYN son las dinorfinas y neoendorfinas; ambos grupos de péptidos presentan afinidad preferencial por los receptores opioides κ y se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC. Posteriormente, se aisló la nociceptina/orfanina FQ, cuyo precursor es la pronociceptina/orfanina FQ (PNOC). Las propiedades de este péptido difiere en gran medida de las que presentan los pertenecientes a las otras tres familias. Finalmente, se aislaron en el SNC dos péptidos endógenos con gran afinidad y selectividad por el receptor μ , las endomorfinas 1 y 2, de los que aún no se han identificado ni el gen codificante ni la proteína precursora. (Stein y Machelska, 2011; Przewłocki y Przewłocka, 2001)

Los péptidos opioides endógenos se expresan en neuronas situadas en regiones implicadas en el control de la percepción nociceptiva. Sin embargo, la distribución en el SNC y periférico de los péptidos propios de cada familia es muy diferente. Las neuronas que contienen POMC se encuentran concentradas en el núcleo arcuado del hipotálamo, desde donde proyectan largos axones hacia estructuras del sistema límbico, tálamo medial, sustancia gris periacueductal, locus coeruleus, formación reticular, núcleo parabranquial y ambiguo, núcleos del tracto solitario y motor dorsal del vago. La transmisión de las señales nociceptivas está bajo el control de neuronas que liberan β endorfina. Las neuronas que contienen PENK se encuentran ampliamente distribuidas por todo el SNC, desde la corteza hasta la médula espinal en sus astas dorsales, incluido el cerebelo. Algunas neuronas forman circuitos locales, mientras que otras extienden sus proyecciones a regiones más distantes. Las neuronas que expresan PDYN se encuentran ampliamente distribuidas por áreas relacionas con la percepción nociceptiva, frecuentemente yuxtapuestas al sistema de PENK. Su presencia es más abundante en corteza, estriado, amígdala, hipocampo, hipotálamo, sustancia gris periacuedultal, tronco cerebral y asta dorsal de la médula espinal. Las dinorfinas están envueltas en circuitos locales dentro de la médula espinal, así como en las funciones supraespinales y se han localizado también en los nervios cutáneos. A nivel periférico, existe una importante fuente de péptidos opioides (β-endorfina, encefalinas, endomorfinas y dinorfina) en las neuronas de los ganglios dorsales y en células circulantes del sistema inmunitario (linfocitos T, granulocitos y monocitos/macrófagos), cuyo papel en la percepción del dolor comienza a ser vislumbrado (Stein y Machelska, 2011; Przewłocki y Przewłocka, 2001).

Péptidos naturales de anfibios
Dermorfinas: Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH2 Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys Deltarfinan: A. Tyr. D. Mat. Pho. His. Ley. Mat. Aca. NH22 (deltarfina, dermonosfelina). D: Tyr. D. Ala. Pho.
Glu-Val-Val-Gly-NH2 (deltorfina II)
Péptidos naturales de mamíferos
Met5-encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Leu5-encefalina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
β-endorfina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Gly-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala- Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
Dinorfina A: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Dinorfina B: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
α-neoendorfina: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
Nociceptina: Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln
Endomorfina 1: Tyr-Pro-Trp-Phe-NH2
Endomorfina 2: Tyr-Pro-Phe-Phe-NH2
Péptidos sintéticos
DAMGO: [D-Ala2, MePhe4,Gly (ol)2]encefalina
DPDPE: [D-Pen2, D-Pen2]encefalina
DSBULET: Tyr-D-Ser(OtBu)-Gly-Phe-Leu-Phr (OtBu)
CTOP: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Ther-Pen-Thr-NH2
Morficeptina: Tyr-Pro-Phe-Pro-NH2-

Tabla 1. Péptidos opioides naturales y sintéticos. (Tomada de Flórez, 2007).

En el año 1973, tres grupos de investigadores descubrieron, casi simultáneamente, la existencia de sitios de fijación específicos para los opioides en el SNC de mamíferos, que se denominaron receptores opioides. Actualmente, se reconoce la existencia de tres tipos fundamentales de receptores opioides, cuyas características moleculares, bioquímicas y farmacológicas se encuentran bien definidas: receptores mu (μ , OP3, MOR), delta (δ , OP1, DOR) y kappa (κ , OP2, KOR) (tabla 2). Posteriormente se identificó un cuarto tipo de receptor opioide inicialmente denominado "huérfano" y que finalmente se denominó receptor de nociceptina (N/OFQ, OP4, NOR), en base a su ligando endógeno (Stein y Machelska, 2011; Waldhoer y cols., 2004).

	μ	δ	κ
Nomenclatura IUPHAR Nomenclatura molecular Estructura Cromosoma humano Sitios de glucosilación Palmitoilación Sistema efector G _{αi} /G _{αo} Sistema efector G _{βγi} /G _{βγo} Ligandos endógenos	MOP MOR 400 aa. (humano) 398 aa. (roedor) 6q24-25 4-5 Sí ↓ AMPc ↓ Canal Ca ²⁺ ↑ Canal Ca ²⁺ ↑ Canal K ⁺ ↑ AMPc ↑ PLC y Ca ²⁺ β-endorfina Endomorfinas	DOP DOR 372 aa. (humano y roedor) 1p34.3-36.1 2 Sí \downarrow AMPc \downarrow Canal Ca ²⁺ \uparrow Canal K ⁺ \uparrow AMPc \uparrow PLC y Ca ²⁺ Encefalinas β -endorfina	KOP KOR 380 aa. (humano y roedor) 8q11.2 2 Sí \downarrow AMPc \downarrow Canal Ca ²⁺ \uparrow Canal K ⁺ \uparrow AMPc \uparrow PLC y Ca ²⁺ Dinorfina A
Ligandos exógenos Selectivos Agonistas No seletivo Agonistas Antagonistas	DAMGO Morfina Metadona Sufentanilo Dermorfina CTOP Levorfanol Etorfina Naloxona Naltrexona β-Funaltrexamina	DPD PE Delto rfina DSB ULET Naltrindol, NNDT, TIPP Levorfanol Etorfina Naloxona Naltrexona	Dinorfin a 1A U69593 C1977 IC1197067 Nor-binaltorfimina Levorfanol Etorfina Etilketociclazo Naltrexona Naloxona



Los receptores opioides están distribuidos por todo el SNC y en tejidos periféricos tanto neurales como no neurales (Zöllner y Stein, 2007). La presencia de receptores opioides en el SNC es particularmente relevante en las áreas implicadas en la percepción/modulación del dolor. Existe una gran riqueza de receptores opioides a nivel de nociceptores periféricos, neuronas nociceptoras de los ganglios dorsales, asta dorsal de la médula espinal, tronco del encéfalo (locus ceruleus, región bulbar rostroventral), mesencéfalo (sustancia gris periacueductal), tálamo, cerebro límbico (hipotálamo, hipocampo, amígdala), corteza somatosensorial, cingulada, insular, etc. La activación de receptores opioides provoca la activación del sistema neuronal inhibidor de la transmisión nociceptiva, de proyección descendente (sistema *off* del bulbo), al tiempo que inhibe el sistema descendente de carácter excitador (sistema *on*) mencionados en apartados anteriores.

Los receptores opioides pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs). Los receptores opioides median su respuesta, fundamentalmente, a través de proteínas G inhibidoras del tipo G_i/G_o (tabla 2). Las

consecuencias moleculares mejor conocidas (Figura 4) son las siguientes (Zhao y cols., 2012; Yoburn y cols., 2003; Law y cols., 2000):

- a) Inhibición de la adenilato ciclasa (AC) por activación de Gα_{i1,2,3}, Gα_o y Gα_z, (Valdizán y cols., 2012; Mostany y cols., 2008;) que origina, entre otros efectos, una reducción de la amplitud de una corriente de entrada (I_h) que es capaz de provocar actividad eléctrica espontánea.
- b) Activación de la conductancia de K⁺, en especial la mediada por el canal GIRK, probablemente dependiente de las subunidades β/γ .
- c) Inhibición de la conductancia del Ca²⁺ tras activación de las subunidades β/γ , debido en parte al cierre de canales tipo N.
- d) Inhibición de la liberación del neurotransmisor debida en proporción diversa, según la neurona implicada, a las tres acciones anteriores.
- e) Activación de la fosfolipasa A₂/C y, consiguientemente, de la proteína kinasa C (PKC), acción en la que intervienen tanto las subunidades β/γ como la G α_q .
- f) Movilización intracelular del Ca^{2+} a partir de los depósitos del retículo endoplasmático, acción que puede estar relacionada con la formación de IP₃ por la activación de la fosfolipasa C.
- g) Activación de la proteína G_s y favorecer la activación de la adenilato ciclasa y de la proteína kinasa A (PKA), dando origen a acciones de carácter estimulador. En general, ésta se ve enmascarada por la acción inhibidora, pero en situaciones de tolerancia a la acción inhibidora puede prevalecer la acción estimuladora.
- h) Activación de vías de señalización relacionadas con MAPKs (Roux y Blenis, 2004). Esta acción se relaciona con una presencia prolongada de opioides y culmina en la modificación de la actividad trascripcional y de la expresión de genes diana que pueden llegar a ser enormemente estables en el tiempo.

1.4 Tipos de dolor

1.4.1 Dolor nociceptivo

Esta mediado por fibras nociceptivas tipo C y Aδ. Estos nociceptores expresan un sistema de transducción especializado mediado por canales iónicos, principalmente los canales TRP ("transient receptor potential channels"), que responden a estímulos intensos de tipo térmico o mecánico, así como a mediadores químicos endógenos y exógenos. La respuesta nociceptiva tiene lugar frente a estímulos nocivos debidos a lesiones, enfermedades o función anormal de músculos y vísceras. Se trata de un dolor agudo, de corta duración que cede al remitir la causa originaria. Su función es alertar de estímulos potencialmente nocivos tanto externos (ej.: pinchazo, calor excesivo, etc.), como internos (ej.: isquemia miocárdica en pacientes con enfermedad coronaria). Algunas patologías pueden generar estímulos nociceptivos recurrentes provocando dolor nociceptivo crónico (ej.: patologías osteoarticulares) (Figura 5) (Basbaum y cols., 2009).



Figura 4. Vías de señalización del receptor opioide. El efecto analgésico de los agonistas opioides se atribuye a la transducción de señales a través de las proteínas Gi/o. Una vez que se une el agonista con su receptor, la subunidad G α pasa de un estado inactivo, determinado por su unión a GDP, a un estado activo al unirse a GTP, y se disocia de las subunidades G $\beta\gamma$. Las subunidades G activas interactúan con los efectores que se encuentran aguas abajo en la cascada de señalización. Las acciones que se originan a través de estas cascadas de señalización incluyen: inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y reducción de la producción de AMPc; apertura de canales de potasio; inhibición de canales de calcio; activación de MAPKs y otras quinasas. (Modificado de Zhao y cols., 2012).

1.4.2 Dolor neuropático

De acuerdo con la IASP, el dolor neuropático se define como un dolor causado por lesión o enfermedad del sistema nervioso. Lesión hace referencia a daño directo del sistema somatosensorial, mientras que enfermedad se refiere al daño indirecto provocado por alteraciones metabólicas, toxicidad química, procesos autoinmunes o inflamatorios, tumores, etc. (Jensen y cols., 2011). Se trata de un dolor patológico (carece de función defensiva), provocado por el procesamiento aberrante de la información somatosensorial, hasta el punto de existir una ausencia total de relación causal entre el grado de estimulación o lesión y la intensidad del dolor evocado. El dolor de origen neuropático es uno de los más complejos y de difícil tratamiento. Se trata de un dolor persistente, a veces de aparición tardía después de la curación de la lesión y rebelde a los fármacos convencionales. En la región afectada coexisten áreas en las que la sensibilidad está reducida con zonas en las que aparece un dolor exagerado o sin causa aparente. Los principales síntomas son parestesias, dolor espontáneo, sensación de quemazón y calambres; los pacientes también refieren hipersensibilidad mecánica y térmica al calor y, en ocasiones, al frio (figura 5). Aún no está claro por qué, después de una lesión nerviosa, sólo una pequeña proporción de pacientes desarrollan dolor neuropático, mientras que la mayoría de los pacientes no lo hace (Bouhassira y cols., 2008; von Hehn y cols., 2006).

Atendiendo a la localización del daño neural, el dolor neuropático se puede clasificar en periférico y central. El dolor neuropático periférico sería el resultado de una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial periférico. Algunas causas frecuentes son las neuralgias postraumática, postherpética o del trigémino, la neuropatía diabética, el síndrome del miembro fantasma, etc. Por su parte, el dolor neuropático central se produce por el daño o enfermedad en el sistema somatosensorial central, siendo las causas más frecuentes las lesiones medulares, infarto cerebral, esclerosis múltiple, etc. En ambos casos, existe una plasticidad neural anómala que afecta tanto a sinapsis centrales como periféricas (Costigan y cols., 2009).

En respuesta al daño tisular, se producen cambios adaptativos reversibles en el sistema nervioso que llevan a la generación de un estado de hipersensibilidad dolorosa (hiperalgesia primaria y secundaria). El umbral nociceptivo se reduce drásticamente y estímulos que normalmente se perciben como ligeramente dolorosos, se transmiten como muy dolorosos (hiperalgesia) y estímulos normalmente inocuos (ej. el roce de una

48

pluma) provocan dolor (alodinia). Denominamos hiperalgesia primaria a la que se produce en el lugar donde se ha producido el daño y es debida, en parte, a la sensibilización del nociceptor. La hiperalgesia secundaria aparece en las zonas adyacentes al tejido dañado y es debida a la sensibilización del SNC. Estas adaptaciones del sistema nociceptivo constituyen un mecanismo de protección de los tejidos dañados que salvaguarda el proceso de cicatrización. En condiciones fisiológicas, como es el caso del dolor agudo nociceptivo, los fenómenos de hiperalgesia y alodínia desaparecen cuando finaliza su valor defensivo tras la curación del daño tisular. Lo que caracteriza al dolor neuropático es que la percepción anómala de las señales nociceptivas se estabiliza en el tiempo, de forma patológica, y se mantiene mucho más allá de la curación de la lesión (Campbell y Meyer, 2006).

Típicamente, tras la lesión de un nervio periférico, se produce una sensibilización del sistema nervioso periférico (SNP) que provoca una actividad anormal persistente de las vías aferentes primarias. Se caracteriza por una reducción del umbral nociceptivo, un incremento de la excitabilidad de los nociceptores en respuesta a mediadores inflamatorios y activación ectópica de las vías aferentes primarias. Se produce una disminución del umbral de activación de diversos canales iónicos presentes en el nociceptor. Entre ellos, el TRPV1 o receptor vaniloide juega un papel relevante en la sensibilización periférica (O'Neill y cols., 2012). Tras una lesión nerviosa, el receptor TRPV1 se sobreexpresa en las fibras no dañadas, mientras que se regula a la baja en las fibras lesionadas. El incremento de canales TRPV1 se relaciona con el desarrollo de hiperalgesia térmica neuropática, mientras que la inhibición de su actividad o la reducción de sus niveles de expresión atenúan el desarrollo de hiperalgesia. Los mediadores inflamatorios liberados por los macrófagos y células T que infiltran los nervios dañados modifican el umbral de activación de los TRPV1. Se ha sugerido que la disminución del umbral de estimulación térmica de los canales TRPV1 localizados a lo largo del axón podría condicionar la aparición de potenciales de acción a temperaturas próximas a la fisiológica, dando lugar a la aparición de dolor quemante espontáneo (Costigan y cols., 2009; von Hehn y cols., 2006).

Otro fenómeno característico del dolor neuropático es la aparición de parestesias, disestesias y episodios de dolor agudo, como consecuencia de la generación de potenciales de acción ectópicos, generados en ausencia de estímulo. Esta actividad espontánea es capaz de producirse en múltiples lugares del SNP, como son el neuroma, el cuerpo de la célula dañada situado en el ganglio dorsal, y las fibras aferentes intactas

49

adyacentes a la fibra dañada. Puede surgir dolor espontáneo tanto por actividad ectópica como por disminución del umbral al dolor de los nociceptores (Costigan y cols., 2009). La sobreexpresión de diversos tipos de canales de Na⁺ dependientes de voltaje en las fibras lesionadas y no lesionadas condiciona un incremento de su excitabilidad que se ha relacionado con la activación ectópica de las fibras aferentes. Además, el descenso de canales de K⁺ dependientes de voltaje, y por tanto de las corrientes hiperpolarizantes, también contribuye a la hiperexcitabilidad de las fibras nociceptivas dañadas y no dañadas (Tulleuda y cols., 2011; Baron y cols., 2010).

La sensibilización central representa un incremento en la función de neuronas y circuitos de las vías nociceptivas centrales, que aparece como consecuencia de la hiperactividad ectópica en fibras nerviosas que permanecen intactas tras el daño neural. Es responsable de un estado de facilitación y amplificación espacial y temporal de las señales nociceptivas, que conduce a la instauración de alodinia e hiperalgesia persistentes en la zona de la lesión y en zonas adyacentes al territorio de inervación de los nervios lesionados (Latremoliere y Woolf, 2009). La activación sostenida de las aferencias periféricas provoca la liberación de aminoácidos y neuropéptidos excitadores a nivel del asta dorsal, dando lugar a cambios postsináptica en las neuronas de segundo orden. La activación por glutamato de receptores NMDA y mGluR da lugar a un rápido incremento de $[Ca^{2+}]_i$ que es responsable de la activación de la PKC y de la calcio calmodulina kinasa (CaMKII), principales efectores de la sensibilización central. La activación de receptores NK1 (sustancia P), TrkB (BDNF), PRGC1 (PRGC), B2 (bradicinina), etc., a través de su acoplamiento a proteínas G, promueve la liberación de Ca²⁺ de sus depósitos intracelulares, lo que también contribuye al reclutamiento de PKC y CaMKII y a la amplificación de la transmisión sináptica excitadora (Latremoliere y Woolf, 2009).

El proceso de sensibilización central electrofisiológicamente se caracteriza porque las neuronas de segundo orden del asta dorsal presentan:

- a) Umbral de respuesta a los estímulos aferentes reducido.
- b) Excitabilidad incrementada y actividad espontánea.
- c) Campo receptivo incrementado.
- d) Expansión espacial de la conectividad sináptica.
- e) Reorganización de circuitos nociceptivos centrales.

Además, neuronas nociceptivas específicas sufren una transformación a neuronas de rango dinámico amplio que responden tanto a estímulos dolorosos como a

estímulos inocuos. Como consecuencia, se produce un estado de hiperexcitabilidad e incremento de la eficacia sináptica que reduce el umbral de respuesta de las neuronas nociceptivas de segundo orden tanto a estímulos procedentes de nociceptores A δ y C, como a los mecanosensitivos procedentes de las fibras aferentes A β y A γ . Todo ello se traduce en la aparición de hiperalgesia y alodinia en el área de la lesión así como en zonas alejadas, que pueden persistir durante periodos muy prolongados de tiempo. Mecanismos similares a estos operan no solo en la médula espinal, sino también en niveles supraespinales como son las cortezas somatosensorial, cingulada anterior, prefrontal e insular, la amígdala o la sustancia gris (Baron y cols., 2010).

Los sistemas inhibitorios endógenos juegan un papel muy relevante en el control de la actividad neuronal del asta dorsal de la médula espinal. Numerosos estudios demuestran su capacidad para restringir el desarrollo de hiperalgesia y alodinia tras lesiones neurales. Los principales sistemas receptoriales implicados en la inhibición pre y postsináptica de la transmisión en el asta dorsal de la médula son el opioide, el cannabinoide, el adrenérgico $\alpha 2$, el purinérgico A1, etc. La reducción de actividad de los sistemas inhibidores descendentes también conduce a la exacerbación del dolor a través de una desinhibición de la señal nociceptiva. Una excesiva regulación a la baja de sus sistemas receptoriales a nivel de las aferencias primarias y neuronas postsinápticas, o una reducción de la liberación de neurotransmisores, provoca la reducción de la transmisión de las señales inhibitorias descendentes que contribuye al mantenimiento del dolor neuropático. Asimismo, la lesión nerviosa provoca apoptosis de interneuronas inhibitorias GABAérgicas, cuya prevención se ha mostrado eficaz reduciendo el desarrollo de hiperalgesia mecánica y térmica. Numerosas estrategias farmacológicas para el tratamiento del dolor neuropático (opioides, adrenérgicos $\alpha 2$, antidepresivos, antiepilépticos, etc.) están dirigidas a imitar o incrementar la actividad de estos sistemas de neurotransmisión (Ossipov y cols., 2010).

El proceso fisiopatológico asociado al dolor neuropático no sólo involucra vías neuronales, sino también a células de Schwann, células satélite del ganglio dorsal, microglía, astrocitos y componentes periféricos y centrales del sistema inmunitario (Austin y Mohalem-Taylor, 2010; Scholz y cols., 2007). Tras una lesión en el tejido nervioso se produce una respuesta inmediata en el sitio del daño debida a la liberación de mediadores vasoactivos, (sustancia P, bradicinina, PRGC, NO, etc.) por los axones dañados. Estos mediadores ocasionan una reacción inflamatoria e hiperemia en el microambiente, así como quimiotaxis y activación de células inflamatorias (Chiu y

51

cols., 2012). 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 la aparición de hiperalgesia y alodinia (Costigan y cols., 2009).





Estudios recientes, han desvelado que existe una amplia comunicación entre el sistema inmune y el SNC, siendo las citoquinas proinflamatorias factores clave en esta comunicación. La microglía (los macrófagos del cerebro) constituye una fuente importante de mediadores inflamatorios y, a su vez, responde a las señales proinflamatorias liberadas por otras células no neuronales, principalmente las de origen inmune (Grace y cols., 2011). La participación de la microglía en el mantenimiento del dolor neuropático se inicia con la presencia en las sinapsis del asta dorsal de citoquinas inflamatorias, liberadas por mastocitos infiltrados a través de la barrera hematoencefálica (BHE) lesionada o por las células de Schwann (Skaper y cols., 2012). Las neuronas, bajo la influencia de las citoquinas inflamatorias, liberan una quimiocina denominada fractalcina (CX3CL1) cuya interacción con su receptor específico, localizado exclusivamente en la membrana microglial, promueve la migración y activación microglial. Además, el ATP liberado por la propia microglía o por otros tipos celulares, también juega un papel relevante al unirse a subtipos de receptores purinérgicos selectivos de microglía. La activación de la microglía tras la lesión nerviosa promueve la liberación de sustancias algógenas y mediadores y moduladores inmunológicos que contribuyen a la sensibilización central y al mantenimiento del dolor neuropático a lo largo del tiempo (Calvo y cols., 2012; Milligan y Watkins, 2009). Como comentaremos más adelante, la citoquina antiinflamatoria TGF-ß constituye un elemento protector clave frente al proceso de interacción neuroinmune implicado en el desarrollo de dolor neuropático (Echeverry y cols., 2013; Echeverry y cols., 2009).

2 Factores de crecimiento transformante-β (TGF-β)

La familia de factores de crecimiento transformante- β (TGF- β ; "tranforming growth factors- β ") constituye el prototipo de factores de crecimiento multifuncionales que regulan contextualmente una gran variedad de procesos celulares, tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad adulta. Controlan fenómenos de migración, adhesión, proliferación, diferenciación, apoptosis celular y reparación de prácticamente todos los tejidos del organismo, incluido el sistema nervioso (Gordon y Blobe, 2008). La desregulación de estas citoquinas o de sus vías de señalización se ha implicado en diversos defectos del desarrollo y en enfermedades sistémicas como, el cáncer, enfermedades autoinmunes, fibróticas y cardiovasculares (Akhurst y Hata, 2012). En la actualidad, la superfamilia TGF- β comprende más de 50 miembros (figura 6) en mamíferos (Böttner y cols., 2000) que, en función de la similitud de sus secuencias y de las vías de señalización activadas, se agrupan en dos ramas: la rama TGF- β s/activinas que incluye TGF- β s, activinas, inhibinas, nodal y lefty; la rama BMPs ("Bone morphogenetic proteins")/GDFs ("Growth and differentiation factors") que incluyen BMPs, GDFs y MIS ("Mullerian Inhibitory Substance") (Zi y cols., 2012; Akhurst y Hata, 2012).

2.1 Vía de señalización de TGF-β

En los últimos años se ha profundizado en los mecanismos de señalización de la superfamilia TGF- β y se ha elaborado un modelo bien aceptado, que involucra a complejos de receptores de membrana con actividad quinasa, proteínas efectoras y reguladoras de la transcripción denominadas Smads (vía de señalización canónica), y otras cascadas de señalización no canónicas independientes de Smads (Zi y cols., 2012). Las proteínas de la familia TGF- β señalizan a través de complejos heterotetraméricos de receptores de membrana con actividad serina/treonina quinasa (Massagué, 2008; Shi y Massagué, 2003) que en base a sus características estructurales y funcionales se dividen en dos subfamilias:

- Receptores tipo I: denominados TβR-I o ALK ("Activin receptor-like kinase"), de los que hay descritos siete tipos codificados por genes diferentes.
- Receptores tipo II: denominados TβR-II, de los que hay descritos cinco tipos codificados por diferentes genes.

La unión del ligando induce la formación de complejos receptoriales heterotetraméricos estables, compuestos por dos receptores de cada tipo. La familia de receptores de TGF- β es compartida por todos sus ligandos, y cada miembro de la superfamilia se une y activa una combinación característica de receptores tipo I y tipo II (tabla 3). Los receptores tipo II están fosforilados de forma constitutiva y la fijación del ligando origina el reclutamiento y fosforilación del receptor de tipo I en su dominio GS (secuencias ricas en serina y glicina). Esta fosforilación es necesaria y suficiente para que se produzca la activación de las vías de señalización, cuyos efectores finales regulan la transcripción de genes diana (Perrot y cols., 2013). Recientemente se han descrito receptores de tipo III (T β R-III) denominados betaglicano y endoglina. Estos receptores carecen de dominio con actividad quinasa y actúan como co-receptores que favorecen la unión de TGF- β s y BMPs a los receptores tipo I y tipo II (Wharton y Derynck, 2009).



Figura 6. La superfamilia TGF-β está compuesta por familias de proteínas como son TGF-βs, **BMPs**, inhibinas, GDF, etc. (tomado de Kishigami y Mishina, 2005).

2.1.1 Vía canónica de señalización: Smads

Las proteínas Smads, en base a su función celular, se dividen en tres grupos (Heger y cols., 2009; Schmierer y Hill, 2007):

- Smads reguladas por receptor (R-Smad): Son sustrato de fosforilación por los receptores tipo I. Smad2/3 se activan por TGF-βs y Smad1/5/8 son activadas por BMPs.
- Smad mediadora común (Co-Smad): En vertebrados la única Co-Smad que se ha descrito es la Smad4. Actúa como mediador común, a través de la formación de un complejo heterotrimérico con las R-Smads que se traslocan al núcleo para modular la transcripción de genes diana.
- Smads inhibidoras (I-Smad): Pertenecen a este grupo Smad6 y 7. Tienen una función neutralizadora de la señal de la superfamilia TGF-β a través de la

inhibición de las R-Smads por competición con TβRI (Itoh y ten Dijke, 2007) o por competición con Smad4. Smad7 inhibe preferentemente la vía de TGFβs, mientras que Smad6 inhibe preferentemente la vía de BMPs (Santibañez y cols., 2011; Derynck y Akhurst, 2007).

La unión del ligando al receptor de tipo II recluta al receptor tipo I, induciendo un cambio conformacional en un complejo receptorial tetramérico (figura 7). El receptor tipo I, con actividad quinasa, es el responsable de la transmisión de la señal hacia el interior celular a través de la fosforilación de dos residuos de serina en el extremo carboxilo terminal de las R-Smad. Las R-Smad fosforiladas interactúan con la co-Smad4, cofactor común en las cascadas de señalización de todos los TGF- β , para formar complejos heteroméricos de proteínas Smad que se traslocan al núcleo y regulan la transcripción génica. La interacción entre el receptor tipo I y el tipo específico de R-Smad depende del ligando unido al complejo receptorial (tabla 3): TGF-ßs y activinas activan la señalización celular vía Smad2 y 3 y BMPs transmiten la señal a través de Smads1, 5 y 8. R-Smads y Co-Smad4 tienen dos dominios altamente conservados: el dominio amino-terminal, denominado MH1, y el dominio carboxilo-terminal, denominado MH2. La región que enlaza estos dos dominios es de tamaño y secuencia variables. La unión con el ADN tiene lugar a través de su dominio MH1 (Yagi y cols., 1999). El segmento MH1 puede ser fosforilado por diferentes quinasas, como por ejemplo las MAPKs, lo que permite a R-Smads y Co-Smad interaccionar con otras vías de señalización intracelular modificando sus respuestas. El dominio MH2 del extremo carboxilo-terminal es el responsable de la interacción entre Smads y receptores, entre Smads y otros tipos de Smads y entre Smads y factores de transcripción (co-activadores y co-represores). Los complejos de proteínas Smad que se traslocan al núcleo se unen a las regiones reguladoras de numerosos genes diana. El reclutamiento de Smads en un promotor particular y la respuesta transcripcional específica que se produce, dependen de la interacción de las Smads con diversos co-activadores o co-represores del ADN (Schmierer y Hill, 2007). Esta interacción cooperativa entre Smads y sus socios de unión al ADN confiere un amplio espectro de señalización y un gran potencial de interacción con múltiples cascadas de señalización (Miyazono y cols., 2005).

Ligando	Receptores tipo II	Receptores tipo I	R-Smad	Co-Smad	I-Smads
TGF-βs		ALK5/TβR-I ALK1	Smad2, Smad3	Smad4	Smad7
	TβR-II		Smad1, Smad5, Smad8		
Activins	ActRIIA ActRIIB	ALK4/ActR1B ALK7/ActR1C	Smad2, Smad3	Smad4	Smad7
BMPs	BMPR-II ActRIIA ActRIIB	ALK3/BMPR- IA ALK6/BMPR- IB	Smad1, Smad5, Smad8	Smad4	Smad6, Smad7

Tabla 3. Relación entre ligandos de la superfamilia TGF-β, receptores activados y proteínas Smad efectoras/reguladoras.

2.1.2 Vías no canónicas de señalización

Además de la vía de señalización canónica descrita en el aparrado anterior, existen otras vías de señalización activadas por TGF- β no canónicas, en las que no intervienen las proteínas Smad (figura 7). El mecanismo que empareja a los miembros de la superfamilia TGF- β con los efectores no canónicos y sus consecuencias biológicas no están bien caracterizados. Entre las vías de señalización no-Smad mejor estudiadas se encuentran: MAPKs [quinasa activada TGF- β (TAK-1), Erk, p38-MAPK y c-Jun (JNK)]; la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina-NFATc; quinasas de crecimiento y supervivencia PI3K/AKT/mTOR; y proteínas G pequeñas tipo Ras, Rho, Rac y Cdc42.

Las MAPKs constituyen una vía de señalización intracelular importante para transmitir señales extracelulares hasta el núcleo a través de la fosforilación y modulación de múltiples factores de transcripción (Kang y cols., 2009). Las señales que son transmitidas al núcleo por estás proteínas pueden regular la transcripción de genes diana de forma sinérgica o bien independiente de Smads. Además, proteínas efectoras de vías no canónicas de TGF- β pueden modular la actividad y señalización mediada por Smads y, a su vez, las Smads pueden modular proteína quinasas dependientes de TGF- β (Zhang, 2009). La versatilidad de la señalización por proteínas Smad y las interacciones funcionales de los mecanismos de señalización de las proteínas Smad y no-Smad definen a menudo la respuesta celular a TGF- β s y otras proteínas de la familia (Massagué, 2012).

2.1.3 Regulación de la vía de señalización de TGF-β

La señalización por TGF-ß se lleva a cabo, fundamentalmente de forma paracrina y autocrina. Las respuestas biológicas mediadas por TGF-β son dependientes del tipo celular y del contexto biológico en el que se encuentran. Además, están determinadas por numerosos factores como son la concentración extracelular del ligando, la presencia y cantidad del receptor complementario en la superficie de la célula diana, el tipo de vía intracelular que se active y del ciclo celular en el que se encuentren las células diana (Kang y cols., 2009). La naturaleza pleiotrópica y contextual de los TGF- β se consigue mediante un estrecho control y ajuste fino de la intensidad, localización y duración de la señal. La multifuncionalidad de los TGF-β sirve como mecanismo para la adaptación de la célula a su entorno, de tal manera que le confiere plasticidad para responder apropiadamente a los cambios en el medio ambiente. De todo lo anterior se desprende la necesidad de un estrecho control en los distintos niveles de la cascada de señalización. Se han descrito numerosos mecanismos implicados en la regulación de la señal que operan a nivel extracelular, a nivel de la membrana plasmática, a nivel intracelular y en el propio núcleo, y cuya actividad provoca importantes ganancias o pérdidas de señal (Moustakas y Heldin, 2009; Umulis y cols., 2009).

A nivel extracelular, existen moléculas que atrapan específicamente a los diferentes ligandos de la superfamilia TGF- β en el espacio extracelular que limitan su disponibilidad por los receptores, controlan su difusión desde las células productoras y modulan su tránsito a través de los tejidos. Estas moléculas reguladoras incluyen un largo catálogo de proteínas difusibles como son noguina, folistatina, cordina, Dan, Cerberus/Caronte y Gremlin (Umulis y cols., 2009).

Proteínas asociadas a la membrana también pueden modular la señalización de TGF- β . Los receptores de tipo III (T β RIII), endoglina y betaglicano, son receptores que carecen de actividad quinasa que se comportan como correceptores facilitando la unión de TGF β s y BMPs a los receptores de tipo I o tipo II (Kirkbride y cols., 2008) (figura 7).

Existen, además, procesos de internalización, reciclado y degradación de receptores. Los complejos formados por TGF- β unido a sus receptores son

58

internalizados por endocitosis. Para la activación de las Smads se requiere la internalización mediada por clatrina, mientras que la internalización mediada por caveolinas o por balsas lipídicas se asocia con degradación de receptores.



Figura 7.Vías de señalización canónica y no canónica de TGF-β. TGF-β se une al receptor de tipo II que recluta, fosforila y activa al receptor de tipo I. Existen receptores auxiliares de tipo III (betaglicano, endoglina y cripto) que facilitan la unión del ligando con el complejo heterotetramérico TGF- β RI/II y modular así su señalización. SARA facilita el reclutamiento de R-Smads por el receptor de TGF- β activado y TGF- β RI fosforila R-Smads en su extremo C terminal. Las R-Smads fosforiladas se unen con Co-Smad para formar heterocomplejos que se translocan al núcleo donde ejercen sus funciones transcripcionales en asociación con otros factores de transcripción, co-activadores y co-represores. Las Smads inhibidoras (I-Smads) se unen a T β RI y previenen la fosforilación de las R-Smad. Además, reclutan ligasas (smurf, WW1) y fosfatasas, provocando la degradación o desfosforilación de los receptores. Las vías no canónicas incluyen MAPKs, Rho, PAR6 y PI3K/Akt. (Modificado de Perrot y cols., 2013).

Los receptores también pueden ser regulados a nivel post-traducción a través de procesos de ubiquitinación y sumoilación. Mediante la ubiquitinación se regula la estabilidad de los receptores tipo I y de los complejos de receptores heteroméricos de TGF- β . La ubiquitinación de los receptores tipo I por Smurf1 y Smurf2, a través de Smad7, induce la ulterior degradación de receptores. La sumoilación favorece el

reclutamiento de Smad2y Smad3 al receptor de tipo I y su bloqueo disminuye la respuesta de la célula a TGF- β (Kang y cols., 2009)(figura 7).

Las señales también son reguladas mediante la asociación a los receptores de determinadas proteínas que actúan definiendo su intensidad y duración, así como el reciclado de los receptores. Las Smads inhibidoras I-Smads6 y 7 son reguladores negativos de la intensidad y duración de la señal mediada por TGF β . Las I-Smad se unen a los receptores tipo I inhibiendo de forma competitiva la fosforilación de R-Smads. Smad6 inhibe preferiblemente la señalización por BMPs mientras que Smad7 inhibe las señales de TGF- β s y BMPs. Las I-Smad promueven el reclutamiento de fosfatasas y ubiquitinligasas que regulan a la baja el número de receptores y su actividad. Por el contrario, la asociación de ciertas proteínas con el receptor puede facilitar la señalización por TGF- β . SARA, Axin o Dab-2 son proteínas que promueven la unión de R-Smads con sus respectivos receptores, facilitando su activación. Par-6 y Occludin facilitan la unión del receptor de TGF- β con proteínas de la vía de señalización no canónica (non-Smads) (figura 7) (Kang y cols., 2009).

La respuesta de las Smad también depende de una amplia gama de interacciones entre Smads citoplasmáticas y nucleares que modulan el reclutamiento de complejos de receptores, controlan su propia fosforilación, defosforilación y sumoilación, secuestran Smads, regulan la asociación de los complejos R-Smad/Smad4 con factores de transcripción, co-activadores y co-represores y, por consiguiente, la transcripción dependiente de Smads (Itoh y ten Dijke, 2007).

2.1.4 Regulación de la señal a nivel de la membrana plasmática: BAMBI

Entre los mecanismos que regulan la señalización mediada por las proteínas de la superfamilia de TGF- β , el pseudoreceptor BAMBI (BMP and activin membrane bound inhibitor) constituye el eje central de nuestro estudio. BAMBI es una proteína transmembranal cuyo dominio extracelular es similar al de los receptores TGF- β de tipo I pero, a diferencia de ellos, tiene una porción intracelular relativamente corta que carece de dominio serina/treonina quinasa (Onichtchouk y cols., 1999). La ausencia de actividad quinasa convierte a BAMBI en un pseudoreceptor, incapaz de transmitir la señal al interior de la célula, por lo que se comporta como inhibidor de la señal de TGF- β s, activinas y BMPs. BAMBI actúa substituyendo al receptor de tipo I, formando complejos receptoriales inactivos en respuesta a ligandos y reduciendo, por tanto, la probabilidad de formación de complejos activos de receptores tipo I y II (Chen y cols., 2007). Además de su papel regulador de la señal de TGF- β s, estudios recientes demuestran la capacidad de BAMBI para incrementar la actividad de la vía Wnt/ β -catenina (Lin y cols., 2008).

BAMBI no es imprescindible para el desarrollo embrionario y postnatal en ratones; su ausencia en ratones knock-out no provoca ningún fenotipo morfológico ni conductual aparente (Tramullas y cols., 2010; Chen y cols., 2007). Sin embargo, cada vez son más los estudios que relacionan alteraciones en la función reguladora de BAMBI con procesos patológicos. Así, nuestro grupo ha demostrado el papel modulador de BAMBI en el remodelado cardiaco en un modelo murino de sobrecarga de presión por constricción aórtica (Villar y cols., 2013). Además, varios trabajos otorgan a BAMBI un papel crucial en la etiopatogenia de procesos tumorales. Se ha observado que su expresión se correlaciona con la agresividad y capacidad invasiva de diversos tipos tumorales (colorectal, vejiga, carcinoma gástrico) humanos (Fritzmann y cols., 2009; Khin y cols., 2009; Togo y cols., 2008; Sekiya y cols., 2004) por lo que se postula que la sobreexpresión de BAMBI previene el efecto antiproliferativo ejercido por TGF-β sobre las células cancerosas. En procesos que cursan con inflamación y fibrosis hepática inducidas por activación de receptores "Toll-like" (TLR-4), la expresión de BAMBI está disminuida (Seki y cols., 2007). Por el contrario, ratones TLR-4 sometidos a obstrucción uretral unilateral muestran deficientes de sobreexpresión de BAMBI que se opone al desarrollo de fibrosis renal (Pulskens y cols., 2010). Este conjunto de estudios muestra la importancia fisiopatológica del control ejercido por BAMBI sobre la vía de señalización de la superfamilia TGF-β y su implicación en procesos patológicos sistémicos.

3 Participación de la superfamilia de TGF-β en la percepción del dolor

El empleo de estrategias farmacológicas ha contribuido al conocimiento de la participación de diversos miembros de la familia TGF- β en el control de la transmisión de la señal nociceptiva. En un estudio reciente, publicado cuando esta Tesis se encontraba en un estado avanzado de desarrollo, Echeverry y cols. (2009) pusieron en evidencia la capacidad protectora de TGF- β 1 frente al desarrollo de dolor neuropático. Así, la administración de una infusión intratecal mantenida de TGF- β 1 recombinante en ratas sometidas al modelo de ligadura parcial del nervio ciático, atenúa

significativamente el desarrollo de alodinia mecánica e hiperalgesia térmica. Aún más importante desde el punto de vista terapéutico es el hecho de que TGF- β 1 reduce significativamente la hiperalgesia previamente establecida tras la lesión nerviosa. Los efectos biológicos de TGF- β 1 son atribuidos por los autores a una menor respuesta neuroinflamatoria en la médula espinal en los animales expuestos a la lesión nerviosa. En consonancia, el efecto neuroprotector ejercido por TGF- β 1 se asocia con una menor activación de astrocitos y microglía, con la consiguiente disminución de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β y IL-6) en la médula espinal.

El papel de BMPs en los procesos de transmisión nociceptiva en el SNC ha sido escasamente explorado y los resultados son diferentes dependiendo del BMP específico estudiado. El uso de BMP-2 recombinate como inductor de hueso durante la cirugía de fusión de la columna vertebral provoca una elevación de la señalización mediada por Smads en la médula espinal y en los ganglios dorsales (Dmitriev y cols., 2010). El acceso directo de BMP-2 al sistema nervioso activa una respuesta neuroinflamatoria que empeora la recuperación neurológica y produce alodinia postquirúrgica en ratas (Dmitriev y cols., 2011). Este efecto proalgésico podría tener un correlato clínico con los pacientes que reciben BMP-2 recombinante, ya que refieren más frecuentemente dolor radicular en comparación con aquellos pacientes cuya cirugía de fusión no incluye el uso de BMP-2 (Carragee y cols., 2011). Sin embargo, la presencia de desgarros de la duramadre que podrían favorecer la difusión de BMP-2 hacia la médula espinal no incrementa el riesgo de desarrollo de radiculitis, ni entorpece la recuperación neurológica en pacientes (Glassman y cols., 2011).

Se ha sugerido que BMP-4 podría tener un efecto protector indirecto frente al desarrollo de hiperalgesia. La instauración de dolor neuropático es un efecto secundario común cuando se utiliza el trasplante de células madre como terapia para el daño espinal (Macias y cols., 2006; Hofstetter y cols., 2005). El pre-tratamiento de células precursoras de glía con BMP-4 (GDAs^{BMP}) previene el desarrollo de hiperalgesia térmica y alodinia mecánica en ratas. Esta protección puede estar relacionada con la ausencia de la formación de brotes de fibras C inmunoreactivas para PRGC cuando los ratones son tratados con GDAs^{BMP} (Davies y cols., 2008). Además, las cascadas de señalización de BMP en GDAs^{BMP} promueven la expresión de genes relevantes para la prevención del dolor inflamatorio y neuropático, y para el mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica, como son el transportador de glutamato 1 y AKAP12 (Davies y cols., 2011; Choi y cols., 2007; Maeda y cols., 2005). Por el

contrario, la administración intratecal de ADN complementario (ADNc) de BMP-4 incorporado en un vector adenoviral no modifica la percepción somatosensorial en ratones sometidos a lesión de la médula espinal, aunque sí promueve la regeneración de axones sensoriales (Parikh y cols., 2011). De forma similar, la sobreexpresión de BMP-7 mediante terapia génica en nervio ciático, ganglio dorsal y neuronas de la médula espinal mejora la recuperación funcional después de la lesión pero no modifica el desarrollo del dolor neuropático en ratas (Tsai y cols., 2010).

Estudios electrofisiológicos en cultivos del ganglio dorsal sugieren que la activina A recombinante potencia las corrientes iónicas a través de canales TRPV1 inducidas por capsaicina, por un mecanismo que implica a receptores tipo ALK4 (Zhu y cols., 2007). Como ya hemos descrito en apartados anteriores, el receptor vaniloide (TRPV1) es un canal cationico no selectivo, ampliamente expresado en los nociceptores polimodales de las aferencias somáticas y viscerales, que es activado por calor nocivo y sustancias irritantes, como son la capsaicina y los protones. TRPV1 juega un papel crucial en el desarrollo de hiperalgesia térmica tras la inflamación (Davis y cols., 2000) y produce hiperalgesia visceral en las enfermedades inflamatorias intestinales e hipersensibilidad rectal (Cervero y Laird, 2004). La invección intradérmica de activina A induce una rápida y breve hiperalgesia en ratones silvestres, pero esta respuesta está ausente en ratones que no expresan el receptor TRPV1. Los mediadores inflamatorios pronociceptivos incrementan la fosforilación por múltiples quinasas de TRPV1, provocando una sensibilización de su respuesta a estímulos térmicos que se relaciona con hiperalgesia inflamatoria (Ma y Quirion, 2007). Se postula la implicación de la vía no canónica de PKCE en la sensibilización aguda de TRPV1 por activina A. En cultivos de neuronas del ganglio dorsal, la activina A induce la traslocación de PKCE desde el citoplasma hasta la membrana plasmática, y esta traslocación se puede prevenir mediante el bloqueo de los receptores ALK4. Además, un péptido inhibidor de la translocación de PKCE previene la sensibilización de TRPV1 inducida por activina A (Zhu y cols., 2007). Todos estos datos sugieren que la regulación positiva por activina A de los receptores vaniloides TRPV1 podría ser un nuevo mecanismo subyacente a la hiperalgesia de origen inflamatorio.

Las comunicaciones retrogradas entre la piel y las neuronas nociceptivas por miembros de la superfamilia TGF- β regulan la identidad fenotípica de los nociceptores y de sus circuitos asociados. Esta comunicación también contribuye a los cambios dinámicos en la plasticidad que afectan a la sensibilidad del nociceptor, tanto en

condiciones fisiológicas como patológicas. Los receptores de citoquinas de la superfamilia TGF- β se expresan abundantemente en neuronas adultas y embrionarias de los ganglios sensoriales de la raíz dorsal del trigémino (Zhu y cols., 2007; Ai y cols., 1999). Además, diversos miembros de la superfamilia TGF-β están presentes en nociceptores específicos (Hall y cols., 2002; Takahashi e Ikeda, 1996; Winnier y cols., 1995). Una consecuencia bien estudiada de las señales mediadas por TGF-ß es la especificación del fenotipo de los neurotransmisores de las neuronas de los ganglios dorsales durante el desarrollo embrionario. El PRGC y la sustancia P son los principales péptidos expresados por un importante subconjunto de nociceptores que inervan la piel y las vísceras (Yu y cols., 2009). Los niveles de expresión de PRGC en los nociceptores de los embriones no son detectables hasta que sus axones contactan con los tejidos diana y las conexiones periféricas son funcionales, lo que indica que la especificación del fenotipo peptidérgico en neuronas nociceptivas es dependiente de señales retrogradas procedentes de sus dianas (Hall y cols., 1997; Marti y cols., 1987). Estudios in vitro han mostrado que factores derivados de células cutáneas inducen la expresión de novo de PRGC en neuronas embrionarias del ganglio dorsal, aisladas antes del contacto con la diana periférica. Este efecto es antagonizado con un anticuerpo antiactivina A y con folistatina, una proteína inhibidora de las señales mediadas por activinas y BMPs (Hamza y cols., 2007; Cruise y cols., 2004; Hall y cols., 2001; Ai y cols., 1999). Además, la adición de activina A, BMP-2, BMP-4, BMP-6 o BMP-7 recombinantes a cultivos de neuronas embrionarias disociadas de ganglios dorsales induce un fuerte incremento en la expresión de PRGC por el subconjunto de neuronas peptidérgicas de las fibras C (Cruise y cols., 2004; Ai y cols., 1999). En cultivos de ganglios dorsales postnatales, la activina A recombinante incrementa la expresión de PRGC (Xu y Hall, 2007; Xu y Hall, 2006: Xu y cols., 2005), mientras que TGF-β1 y TGF-β2 incrementan los niveles de sustancia P. En conjunto, estos datos dan soporte a un papel de los miembros de la familia de TGF-β como factores de diferenciación que contribuyen a la especificación de la identidad funcional de neuronas que contienen neuropeptidos durante el desarrollo.

Las activinas están involucradas en la respuesta inflamatoria asociada a la curación y reparación de una lesión tisular en modelos animales experimentales (Antsiferova y cols., 2009; Bamberger y cols., 2005). Aunque el nivel basal de activina A en la piel es notablemente bajo, esta expresión se ve fuertemente incrementada después de una lesión, como un corte en la piel o inflamación producida por el

adyuvante de Freund (Cruise y cols., 2004; Sulyok y cols., 2004). En estas condiciones experimentales, las neuronas sensoriales que contienen PRGC que inervan las regiones de la piel lesionada reciben una importante influencia trófica de la activina A liberada por queratinocitos de la piel y células inflamatorias, lo cual incrementa la expresión de PRGC, además de otros neuropéptidos (Cruise y cols., 2004). Por otro lado, la invección de activina A en la piel de ratas adultas produce alodinia mecánica, asociada a un incremento en la proporción de neuronas con inmunoreactividad positiva frente a PRGC en los ganglios dorsales que inervan el área de la inyección (Xu y cols., 2005). Más importante es el hecho de que β-PRGC está marcadamente incrementado en la piel de pacientes y ratones con dolor crónico inflamatorio o neuropático, lo que sugiere una contribución de los queratinocitos, a través de la liberación de β-PRGC, en la regulación de la plasticidad nociceptiva que conduce al dolor patológico (Hou y cols., 2011). El PRGC liberado por las terminaciones de los nervios periféricos y los queratinocitos causa vasodilatación neurogénica, extravasación de factores necesarios para la curación de las heridas, degranulación de mastocitos y activación de plaquetas. El resultado es una acumulación de factores proinflamatorios en el área lesionada que, tal y como hemos mencionado en apartados anteriores, juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la sensibilización periférica de los nociceptores y en los cambios fenotípicos de las neuronas del ganglio dorsal que contribuyen a la sensibilización periférica. Además, el PRGC liberado por las neuronas aferentes primarias contribuye a la sensibilización central de las neuronas nociceptivas de segundo orden (Benemei y cols., 2009; Zhang y cols., 2001). En resumen, la modulación de los nociceptores que contienen PRGC por señales retrogradas de activina A promueve el aumento de respuestas nocifensivas que protegen contra el daño durante los procesos normales de curación de un tejido (Ho y cols., 2010).

En sentido contrario, un estudio reciente muestra que activina C juega un papel relevante como factor supresor endógeno de las respuestas nociceptivas inducidas por la inflamación. Se ha observado que la expresión de activina C en las neuronas de pequeño diámetro de los ganglios dorsales sufre una reducción significativa durante los primeros días de inflamación tras la inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund. El tratamiento por vía intratecal con ARN de interferencia o con anticuerpos dirigidos contra activina C incrementa las respuestas nociceptivas en el test de la formalina e impiden la recuperación de la hiperalgesia térmica inducida por el adyuvante completo

65

de Freund. Por el contrario, la activina C recombinante intratecal reduce las respuestas nociceptivas en ambos modelos de dolor inflamatorio (Liu y cols, 2012).

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 (86/699/CEE). Hasta su utilización en el proceso experimental o su sacrificio, los animales fueron estabulados en grupos de 4 ó 5 animales por jaula, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura ambiente de 22±1°C y humedad relativa del 60-70%. La comida y el agua fueron suministrados *ad libitum*.

Los sujetos de estudio fueron ratones macho de 3 a 5 meses de edad silvestres (BAMBI^{+/+}) y ratones genéticamente manipulados carentes del gen de BAMBI (BAMBI^{-/-}), todos ellos con un fondo genético C57BL/6. En los animales BAMBI^{-/-}, los exones 2 y 3 del gen BAMBI fueron reemplazados por el marcador de resistencia a la neomicina (figura 8) (Tramullas y cols., 2010). Estos animales fueron cedidos por el Dr. J.C. Izpisúa-Belmonte del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona y Gene Expression Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA.

El genotipado de los ratones se efectuó sobre ADN extraído de la oreja con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siguiendo los protocolos habituales. Los cebadores fueron diseñados para amplificar fragmentos de 398 pares de bases contenidos en la región eliminada del gen de BAMBI (cebador sentido; TGTGATAGCGGTTCCCATTGC: cebador antisentido; CCAGATAAAAGTGCTCCTGTCAGC) y fragmentos de 524 pares de bases contenidas en el casete de neomicina (cebador sentido. TTCGCCAATGACAAGACGCTGG; cebador antisentido, GGACACAAAGAACCCTGGGAAAG). La presencia o ausencia de transcritos de BAMBI en muestras del sistema nerviosos central de ratones BAMBI^{-/-} y BAMBI^{+/+} fue confirmada mediante PCR. Los ratones mutantes BAMBI-/- fueron cruzados con C57BL/6 hasta la generación F10.

2 Estudios conductuales de nocicepción

Con el fin de estudiar el papel de las citoquinas de la superfamilia TGF- β en la percepción nociceptiva, se analizaron en animales BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} las respuestas nociceptivas en diferentes modelos de dolor tanto agudo como crónico.

2.1 Valoración de la respuesta a estímulos térmicos

Se utilizaron tres test diferentes de estimulación térmica; el test de inmersión de la cola y el test de retirada de la cola, que estudian una respuesta nociceptiva de tipo espinal y el test de la placa caliente, en la que la respuesta evocada está mediada por mecanismos de origen tanto espinal como supra-espinal.



Figura 8. Estrategia para la eliminación del gen de BAMBI mediante recombinación homóloga A. En la parte de arriba se muestra el locus de BAMBI con sus 3 exones (cajas rellenas). En la parte de abajo se muestra la inserción del vector utilizado para reemplazar los exones 2 y 3 por el marcador de resistencia a neomicina (neo). B: Para el genotipado de los ratones se determinó por PCR la presencia en el ADN genómico del alelo silvestre y/o del casete de neomicina en los ratones BAMBI^{+/+}, BAMBI^{+/-} y BAMBI^{-/-}. C: La presencia/ausencia de ARNm de BAMBI en el cortex cerebral (Cx) y en la médula espinal (Sc) de los ratones BAMBI^{+/+}, BAMBI^{+/-} y BAMBI^{-/-} se determinó mediante transcripción inversa y posterior PCR. Para el control de carga se utilizó GAPDH (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa). D: Western-blots representativos que muestran una mayor expresión de proteínas Smad1 y 2 fosforiladas en la médula espinal de los ratones BAMBI^{-/-}. Para el control de carga se utilizó la tubulina. (Tomada de Tramullas y cols, 2010).

2.1.1 Test de la placa caliente

Se colocó a los animales dentro de un cilindro metálico mantenido en un baño de agua a una temperatura controlada de $50 \pm 0,5^{\circ}$ C y $52 \pm 0,5^{\circ}$ C. Se definió la latencia al dolor (umbral nociceptivo) como el tiempo transcurrido hasta que se observaron lameteo o sacudida de las patas traseras y primer salto del animal con el fin de escapar del estímulo doloroso. Se estableció un tiempo de corte de 120 segundos para evitar daño tisular.

2.1.1 Test de inmersión de la cola

Se valoró como umbral nociceptivo el tiempo que tardó el ratón en retirar la cola desde que se introdujo el extremo de esta (\approx 3cm) en un baño de agua a temperaturas controladas de 45 ± 0,5 °C, 47 ± 0,5 °C o 49 ± 0,5 °C. Se estableció un tiempo de corte de 60 segundos para evitar daño tisular.

2.1.2 Test de retirada de la cola

Se realizó utilizando un analgesiómetro (Letica, LI7106) que consta de una unidad de estimulación mediante una lámpara térmica y una unidad de control electrónica (figura 9). Los animales fueron inmovilizados con ayuda de una caja de restricción colocada en la unidad de estimulación del equipo, con la cola sobresaliendo. Se aplicó un foco calórico, generado por la lámpara, sobre el tercio distal de la cola del animal y una célula fotoeléctrica detectó la latencia de retirada de la cola que se visualizó en la unidad de control. La lámpara se ajustó a una intensidad en la que los valores de latencia basales de los animales se encontraron en 3 ± 1 s, y se estableció un tiempo de corte de 8 s para evitar daño tisular.



Figura 9. Analgesímetro utilizado para realizar el test de retirada de la cola. Aparato donde se inmoviliza al animal y se cuantifica el tiempo que tarda en retirar su cola cuando se le aplica directamente sobre sobre ella un haz de luz a una intensidad deseada.

2.2 Valoración de la respuesta a estímulos mecánicos: test de von Frey

Se colocaron los animales en compartimentos individualizados con suelo de rejilla, donde la movilidad de los ratones quedaba reducida a movimientos sobre sí mismos. Tras un periodo de adaptación de 20 minutos a su nuevo habitáculo, se aplicaron a la superficie plantar de las patas traseras una serie de monofilamentos de von Frey (Semmes Weinstein von Frey Aesthesiometer for Touch Assessment, Stoelting Co, Illinois EEUU) graduados en una escala en función de la presión en gramos que producen (figura 10). Se consideró respuesta positiva la sacudida, retirada o lamido de la pata. Se estimularon las patas 5 veces con cada uno de los monofilamentos y se valoró el porcentaje de respuestas positivas para cada fuerza aplicada. Inicialmente, se estimuló la pata con un monofilamento de fuerza intermedia y se continuó con monofilamentos de fuerza progresivamente descendente, hasta que no se obtuvo respuesta. Posteriormente, se aplicaron estímulos de fuerza ascendente, partiendo del monofilamento consecutivo al inicial, hasta que se provocó un 100% de respuestas. El umbral nociceptivo se expresó como los gramos que evocaron el 50% de las respuestas de retirada de la pata trasera.


Figura 10. Juego de monofilamentos de von Frey utilizado para inducir estímulos mecánicos en la superficie plantar de las patas traseras de los animales.

2.3 Valoración de la respuesta nociceptiva a estímulos químico-inflamatorios: test de la formalina

Para la valoración de la respuesta nociceptiva en un modelo de inflamación agudo se utilizó el test de la formalina. Este test consiste en la inyección subcutánea de 20 μ l de formalina (2% en H₂O destilada) en la planta de la pata trasera. La primera fase de la prueba (0-5 min) refleja dolor nociceptivo provocado por la irritación química de la formalina. La segunda fase (20-60 min) refleja dolor inflamatorio con sensibilización central (Shields y cols., 2010). En ambas fases se valoraron como conductas dolorosas el tiempo de lamido, el número de lamidos y el número de sacudidas de la pata.

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

El modelo animal de neuropatía elegido para provocar dolor neuropático es el de aplastamiento del nervio ciático (Bester y cols., 2000). Bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane®, 11/min al 2-2,5 %), se realizó una incisión cutánea en la parte lateral de la pata izquierda de 5-7 mm, paralela al fémur. Se seccionó el músculo bíceps femoral, exponiendo el nervio ciático a la altura de la bifurcación de sus tres ramas terminales: sural, tibial y peroneal. Se aplastó, de forma estandarizada, con un portaagujas de punta lisa, una sección de 2 mm del nervio ciático en la zona más próxima a su trifurcación, durante un periodo de 7 segundos. Una vez realizada la lesión nerviosa, se suturó la piel con Vicryl de 5 ceros (Vicryl, Ethicon®; Johnson &Johnson). En los animales control (*sham*), se realizó el mismo proceso quirúrgico de exposición del nervio ciático y sus ramas terminales, pero no se provocó lesión. Los animales con

neuropatía presentaron hiperalgesia y alodinia a estímulos mecánicos en la planta en forma de mosaico (figura 11). Se valoró mediante el estímulo con monofilamentos de von Frey el grado hiperalgesia y alodinia mecánica desarrolladas. Se realizó la valoración el día antes de la intervención (basal) y todos los días posteriores a la intervención hasta su sacrificio. La neuropatía se hizo evidente 8-10 días tras la cirugía y se mantuvo durante más de tres meses. No se observaron conductas de autotomía de dedos o uñas.



Figura 11. A: Esquema de la salida de las raíces del nervio ciático de la médula espinal en L4, L5 y L6. Se muestra el lugar de la lesión nerviosa, inmediatamente antes de la trifurcación de los nervios tibial, sural y peroneal. **B:** Planta de la pata de un ratón en el que se muestra un mosaico de cuadrados oscuros y claros que representan las zonas con hiperalgesia y las zonas que han perdido la sensibilidad debido a la lesión nerviosa del nervio ciático. **C y D:** Fotografías representativas de la intervención quirúrgica. Se muestran las ramas tibial, sural y peroneal del nervio ciático antes de la lesión (**C**) y después del aplastamiento (**D**).

3 Tratamientos farmacológicos administrados

3.1 Agonista opioide

Se administraron dosis acumulativas de morfina (1, 3, 6 y 10 mg/kg, i.p.) de forma aguda a ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}, en condiciones basales y tras la lesión del nervio ciático. Las respuestas nociceptivas en pruebas de analgesia (térmica y mecánica) se realizaron 30 minutos después de la inyección de cada dosis de morfina.

3.2 Antagonistas opioides

Se administraron diferentes antagonistas opioides a grupos de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} en condiciones basales y sometidos a lesión del nervio ciático.

- a) Naloxona (NLX) (Sigma-Aldrich): Antagonista no selectivo de receptores opioides μ, δ y κ. Se disolvió en suero fisiológico y se inyectó a la dosis de 1mg/kg por vía i.p. (intraperitoneal), en un volumen de 150 μl. Las diferentes pruebas de nocicepción fueron realizadas 30 minutos después de la administración de naloxona.
- b) β-Funaltrexamina (β-FNA) (Tocris Bioscience): Antagonista selectivo de receptores opioides μ. Se disolvió en salino y se inyectó a la dosis de 15 mg/kg por vía i.p., en un volumen de 150 μl. Se evaluó su efecto 60 min después de su administración.
- c) Naltrindol (Tocris Bioscience): Antagonista selectivo de receptores opioides δ. Se disolvió en suero fisiólogico y se administró a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p., en un volumen de 150 µl. Se evaluó su efecto 60 min después de su administración.
- d) Nor-binaltorfina (Nor-BNI), (Tocris Bioscience): Antagonista selectivo de receptores opioides κ. Se disolvió en suero fisiológico y se administró a la dosis de 10 mg/kg por vía i.p., en un volumen de 150 µl. Se evaluó su efecto 60 min después de su administración.

3.3 Inhibidor dual de peptidasas degradadoras de encefalinas (RB101)

El inhibidor de ectopeptidasas, *RB101*, fue cedido por el Dr. Bernard Roques, Universidad René Descartes, Pharmaleads, Paris. Se disolvió en 5% de etanol, 5% de cremofor y 90% de agua destilada y se administró a la dosis de 100 mg/kg por vía i.p., en un volumen de 150 µl. La inhibición de encefalinasas prolonga e incrementa la presencia de los péptidos opioides met-encefalina y leu-encefalina en la terminación sináptica (Le Guen y cols., 2003; Daugé y cols., 1996). Se evaluó el efecto antinociceptivo de *RB101* transcurridos 60 min de su administración en animales de ambos genotipos sometidos a pruebas de dolor agudo y crónico.

3.4 TGF-β1 recombinante

Se valoró el efecto de la proteína TGF- β 1 recombinante humana (R&D Systems, Minneapolis, USA) sobre el desarrollo de alodinia e hiperalgesia mecánica en animales BAMBI^{+/+} sometidos a lesión del nervio ciático. La proteína recombinante, disuelta a una concentración de 25 µg/ml en ClH 4mM + 2mg/ml de albúmina bovina, se administró mediante una minibomba osmótica 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.

3.5 Anticuerpo anti TGF-β

Se valoró el efecto del tratamiento con un anticuerpo neutralizante monoclonal (clon 1D11.16.8) dirigido contra las tres isoformas TGF- β , sobre el desarrollo de alodinia mecánica en animales BAMBI^{+/+} sometidos a lesión del nervio ciático. Se administró por vía i.p. a la dosis de 0,35 mg administrados en días alternos, durante 17 días, empezando 48 h antes de la lesión nerviosa. El anticuerpo específico empleado fue desarrollado por el Dr. Merino del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria, Santander.

4 Extracción de tejidos y procesado de las muestras

4.1 Extracción y procesado de la médula espinal

Los animales se decapitaron bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/Kg, i.p). Las medulas 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. En este punto las médulas espinales se procesaron de forma diferente, dependiendo del uso posterior:

a) Las médulas destinadas a biología molecular (cuantificación de genes y proteínas) se diseccionaron por la línea media para separar las dos hemi médulas

espinales (derecha e izquierda) de las que 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.

- b) Las médulas espinales destinadas a técnicas de hibridación *in situ* se fijaron enteras en paraformaldehido (PFA) preparado fresco al 4 % en PBS (solución de tampón fosfato, pH 7), 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).
- c) Las muestras destinadas a técnicas de inmunohistoquímica, una vez fijadas y lavadas en PBS, se deshidrataron mediante pases sucesivos por concentraciones crecientes etanol (70%, 40 min; 96%, 2 x 40 min; 100%, 3 x 40 min). Acabada la deshidratación, se realizó el aclaramiento del tejido introduciendo la muestra en dos baños de xilol de 40 minutos cada uno. A continuación, se incluyó el tejido en un molde con parafina (2x 60min) a 60°C. Para terminar, se confeccionaron los bloques de parafina definitivos y se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesado. En estos bloques de parafina se realizaron cortes de 4-6 µm de grosor y se montaron en portaobjetos tratados con gelatina.

4.2 Extracción y procesado del cerebro y los ganglios dorsales para estudios histológicos

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50mg/Kg, i.p). 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 las paredes abdominales 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 la soluciones de perfusión, seguido de un corte en el ventrículo derecho para de esta forma crear un circuito abierto que permita 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 50-100 ml de solución se procedió a perfundir el ratón con un volumen de 50-100 ml de PFA preparado fresco al 4 % en PBS. Una vez perfundidos, 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.

5 Estudios histológicos

5.1 Hibridación in situ

Para las hibridaciones *in situ*, se utilizaron sondas de ARN sintetizadas a partir de fragmentos de ADN complementario (ADNc) de los genes de BAMBI, ALK- 3, ALK-4 y ALK-6. Los fragmentos de estos genes fueron clonados por Ramón Merino mediante retrotranscripción inversa (RT-PCR) a partir de un 1µg de ARN total procedente de embriones de ratón E15. Los fragmentos de ADN se amplificaron transformando la cepa bacteriana DH5 α FTM de *E-Coli* (Invitrogen; Life technologies) con el plásmido pCR2.1-TOPO conteniendo los fragmentos. Para esto, se incubaron 50µl de suspensión bacteriana con 1,5 µg del plásmido con el injerto durante 30 minutos a 4° C. Posteriormente, se sometió la mezcla a un choque térmico a 37° C durante 90 minutos. A continuación, se sembraron las bacterias en medio LB sólido suplementado con ampicilina (50µg/ml; Sigma- Aldrich Co, LLC. USA) y se incubó toda la noche a 37° C. Al día siguiente solo crecieron las bacterias transformadas, ya que estas, cuentan con un gen de resistencia a la ampicilina activo. El ADN plasmídico amplificado en las bacterias se extrajo del cultivo con un kit de purificación midi-prep (©Quiagen). Se provocó una lisis alcalina parcial de las bacterias que permitió la salida del ADN plasmídico, el cual se purificó posteriormente a través de columnas usando diferentes tampones suministrados en el kit. Una vez que se había aislado el ADN plasmídico se contabilizó la concentración en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific INC). Con el fin de transcribir la sonda específica de ARN, fue necesario linealizar el plásmido mediante enzimas de restricción. A partir del inserto pudimos sintetizar dos tipos de ribosondas dependiendo de la hebra de ADN que se transcribió. La ribosonda antisentido, complementaria del ARNm de la célula, es utilizada para la localización específica de la expresión del gen a estudiar. La ribosonda sentido, idéntica al ARNm de la célula, es utilizada como control de la especificidad de la hibridación de la sonda antisentido. Para la digestión se utilizó la enzima de restricción BAM H1. En un volumen total de 50 µl por cada µg de plásmido se usaron 20 U de enzima de restricción, un volumen máximo del 5 % de tampón de digestión y se dejó 37° C durante 90 minutos. Posteriormente se precipitó el ADN de la mezcla añadiendo 12 μ l de acetato sódico (3 M, pH 5,2) y 200 μ l de etanol absoluto y se dejó durante toda la noche a -20° C. A la mañana siguiente, se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos; seguidamente, se retiró el etanol y se añadieron 50 μ l de etanol al 70 % v/v para lavar el precipitado. Se centrifugó de nuevo 10 minutos a 14000 rpm y se eliminó el etanol para resuspender el precipitado en tampón TE.

Para la hibridación *in situ* se utilizaron sondas marcadas con digoxigenina. Para su transcripción, se incubó durante 120 minutos, a 37° C, 1 μ g del plásmido linearizado en 20 μ l de una mezcla en la que se introdujo DTT 5mM, Inhibidor de ARNasa al 5% (Fermentas, Thermo Fisher scientific Inc), tampón de polimerasa al 20% (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc) 20 unidades de la ARN polimerasa T7, ribonucleotidos trifosfato al 18% y Uracilo trifosfato marcado con digoxigenina (UTP- dig, Roche Farma S.A) al 4% y Uracilo trifosfato al 8% (Roche Farma S.A).

Para su purificación se añadieron 3 μ l de ARNt (ARN de transferencia) (0,5 mg/ml; Boehringer Ingelheim España, S.A), 12 μ l de NaAc 3 M pH 5 y 50 μ l de etanol absoluto, se incubó a -20° C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos a 4° C; se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 300 μ l de etanol al 70 % para después centrifugar de nuevo a 14000 rpm a 4° C durante 10 minutos. Se dejó secar el etanol del precipitado y se resuspendió en 30 μ l de tampón TE. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % para comprobar el resultado de las transcripciones.

Se introdujeron dos o tres cortes de médula espinal en cada pocillo de una placa multipocillo (Costar 3512) y se lavaron 3 veces en PBS-T (PBS + 0.1% Tween 20). A continuación, las secciones se bloquearon en H₂O₂ al 6% en PBS-T, en oscuridad, durante 60 minutos; posteriormente se lavaron 3 x 5 minutos en PBS-T. Los cortes se trataron con 10 μ g/ml de proteinasa K (Roche Farma S.A) durante 20 minutos y se bloqueó la reacción con glicina (2 mg/ml en PBS-T). Los cortes se lavaron tres veces en PBS-T y se fijaron con una solución de PFA al 4% y glutaraldehido al 0.2% en PBS. Una vez fijados, se lavaron bien con PBS-T y se incubaron en la solución de hibridación a 65° C durante 60 minutos. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 300 μ l de sonda al 0,01% en solución de hibridación previamente desnaturalizada durante 2 minutos a 80° C y se dejó hibridando a 65° C durante 24 horas en un horno de hibridación.

Al día siguiente, se retiró la sonda y se realizaron 2 lavados de 1 hora en solución I (50% Formamida + SSC 20% + SDS 0,01%) a 65° C. Posteriormente se incubaron los cortes en un baño compuesto por 50% de solución I y un 50% de solución II (NaCl 0.5M + Tris 0.01M, pH 7.5 + Tween-20 al 0.1 %) a 70° C, y, por último, tres pases de 10 minutos por la solución II a temperatura ambiente. Se realizaron un primer lavado en solución II de 60 minutos a 37º C y un segundo lavado de 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un pase por la solución III (Formamida 50% + SSC 10%, pH 4,5) a 65° C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS-T (TBS+ Tween 20 al 0,05%) con levamisol 2 mM a temperatura ambiente y se bloquearon las uniones inespecíficas de los tejidos con suero de cordero al 10% en TBS-T con levamisol 2 mM, durante 60 minutos, a temperatura ambiente. Una vez bloqueados, los tejidos se incubaron durante toda la noche a 4° C con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche Farma S.A) diluido 1:2.000 en TBS-T con levamisol 2 mM. A la mañana siguiente, se lavaron las muestras 10 x 30 minutos en TBS-T con levamisol 2 mM. Posteriormente, se realizaron 2 incubaciones de 15 minutos en NTMT a temperatura ambiente y se añadió el revelador (Roche Farma S.A) manteniendo los cortes en oscuridad hasta que se detectó la señal, procediéndose a detener la reacción con NTMT. Para terminar, se lavaron los tejidos con PBS y se montaron en un portaobjetos con medio de montaje compuesto por 50% glicerina en PBS. Las imágenes se obtuvieron en un estereomicroscopio con cámara digital acoplada (Zeiss KL1500).

5.2 Inmunofluorescencia

5.2.1 Disociados neuronales

Para los estudios de localización celular de BAMBI mediante inmunofluorescencia con microscopia láser confocal, se realizaron disociados neuronales (Pena y cols., 2001; Lafarga y cols., 1991) de ganglios dorsales fijados por perfusión intracardiaca con PFA al 4 % en PBS.

Se colocó un fragmento de las muestras de ganglio dorsal obtenido por microdisección sobre un portaobjetos (SuperFrost®plus). Se añadieron 10 μ l de PBS sobre la muestra y se cubrió con un cubreobjetos de 18 x 18 mm. Con una aguja histológica, se percutió de forma suave pero continua sobre el cubreobjetos que protege la muestra, con la finalidad de disgregar mecánicamente el tejido. Se controló el grado de disociación neuronal mediante observación microscópica de la muestra en un

80

Material y métodos

microscopio de contraste de fases. Esta comprobación es importante para verificar que las neuronas se separaron de manera individualizada de la maraña de células, fibras y material extracelular que conforman el ganglio dorsal. Tras una disociación neuronal óptima se congelaron los portaobjetos en nieve carbónica durante 5 minutos para facilitar la retirada del cubreobjetos con la ayuda de un bisturí, evitando que los somas neuronales se queden adheridos a él. Posteriormente, se realizó un lavado de los disociados neuronales en etanol al 96% durante 10 minutos a 4° C con el fin de estabilizar las muestras. Transcurrido este tiempo, se rehidrataron las muestras con alcoholes de concentraciones decrecientes y se conservaron en PBS hasta que el momento de su uso. De esta forma, y con la ayuda del microscopio confocal (Zeiss, LSM 510), se pueden realizar secciones ópticas de la totalidad del soma neuronal y ver la distribución celular que presenta el pseudoreceptor de TGF- β BAMBI.

Los disociados neuronales obtenidos se lavaron en PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente, se lavaron las preparaciones en Tween 20 al 0,05% en PBS y se incubaron con 7 μ l de anticuerpo primario diluido en BSA al 1% en PBS en cámara húmeda, durante toda la noche a 4° C. Los anticuerpos utilizados fueron, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-BAMBI (1:50; Abnova) y el anticuerpo policional de conejo anti-GFAP ("Glial Fibrillary Acid Protein"; 1:200; Dako). A continuación, se realizaron 3 lavados en Tween 20 al 0,05% en PBS, y posteriormente las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario, marcado con el fluoroforo fluoresceína (FITC), Texas red (TxRd) o Cy5 (Jackson Inmunoresearch Laboratories) durante 60 min en una cámara húmeda y oscura, a temperatura ambiente. Para la inmunodetección de dos proteínas, se incubaron los anticuerpos primarios de modo independiente, y se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios con fluoroforos diferentes, también de manera secuencial. Para el marcaje de los núcleos celulares, las preparaciones se tiñeron con DAPI (0,5 μ g/µl en PBS) durante 5 minutos.

Los disociados neuronales se visualizaron en un microscopio laser confocal (Zeiss LSM510) con los objetivos de Plan-Neofluar 4X, 10X, 20X o Plan-Apochromat 63X y usando el láser de argón (488nm), el láser de HeNe (543nm) y el láser de HeNe (633nm) según necesidad, para la excitación de los fluoróforos FITC, TxRd y Cy5 respectivamente. La digitalización de las imágenes se realizó usando el software LSM5 Image Examiner. Posteriormente se transfirieron como imágenes JPEG al programa

81

Adobe Photoshop 7.0 para su maquetación, y se ajustaron a patrones semejantes de resolución, brillo y contraste.

5.3 Inmunohistoquímica

Se utilizaron secciones de médula espinal incluidas en bloques de parafina. Los tejidos se desparafinaron manteniendo los portaobjetos a 37° C durante 12 h y se rehidrataron mediante pases sucesivos en xilol (2 x 10 min) y en etanol a concentraciones decrecientes (100%, 2 x 5 min; 96%, 1 min; 70%, 1 min; 50%, 1 min); se finalizó la rehidratación lavando las muestras en H₂O destilada durante 1 min. A continuación, se procedió al desenmascaramiento antigénico, para lo que las muestras se cocieron a 100° C durante 5 min, seguido de 3 lavados de 10 min con agua destilada. Posteriormente, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena introduciendo las preparaciones durante 30 minutos en una solución de PBS + H_2O_2 + metanol en una proporción de 8:1:1, seguido de 3 lavados de 5 min en PBS. Las muestras se incubaron con un anticuerpo policional anti-BAMBI (1:25; R&D Systems, Inc.) durante toda la noche a 4º C. A la mañana siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad. Se lavaron las preparaciones tres veces con PBS y se incubó con el kit ABC (Avidin-Biotin Complex Kit; Vector Laboratories Ltd) según las indicaciones del proveedor. Se aclaró 3 veces con agua destilada y reveló con el sistema que usa la diabinobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako, Glostrup, Denmark) como cromógeno incubando durante 5-7,5 min. Se aclaró nuevamente con agua destilada tres veces y se tiñó con hematoxilina de Harris durante 1 min, aclarándose en agua destilada (3 x 5 min). A continuación, la muestra se deshidrató en pases sucesivos por concentraciones crecientes de etanol (50%, 1 min; 70%; 1 min; 96%; 1 min; 100%, 2 x 5 min) y se montó con medio de montaje DPX (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania).

6 Estudios neuroquímicos en médula espinal

6.1 Determinación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa

6.1.1 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de las diferentes muestras de médula espinal utilizando Trizol (TRI Reagement®, 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 centrifugó en centrífuga (5415R, Eppendorf Ibérica) a 12.000 r.p.m durante 10 minutos, a 4º C. Se recogió el sobrenadante y se transvasó a un tubo estéril, aclarado previamente con agua DEPC para eliminar las ARNasas. 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 4º 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 4º 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 espectofotómetro, (Nanodrop 1000, Thermo Scientific Inc), que permite trabajar con 2 µl de muestra. Para determinar la pureza se valoró la relación obtenida entre las absorbancias medidas a 260 nm (absorción por ácidos nucleicos) y a 280 nm (absorción por proteínas). El índice 260/280 ha de encontrarse en un rango comprendido entre 1,8 y 2,0 para garantizar la pureza. Todas las muestras empleadas estaban en este rango.

6.1.2 Transcripción inversa de ARN

La reacción de la transcripción inversa del ARN (RT-PCR) es el método por el cual se obtienen las cadenas de ADN complementario gracias al ARN extraído en el apartado anterior. Se utilizó un kit comercial de RT-PCR (Revert-aidTM Minus First Strand cDNA Synthesis kit, Fermentas). Para la reacción se usó 1 µg del ARN al que se

añadió 1 µl de cebadores genéricos y la cantidad de agua DEPC necesaria para alcanzar 12 µl. Esta primera mezcla se incubó a 70° C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 4 µl de tampón de reacción (5X), 1 µl de enzima inhibidora de ribonucleasas (Ribolock Ribonuclease Inhibitor) y 2 µl de una solución 10 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). La mezcla total se incubó 5 minutos 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 (MyCycler, Bio-Rad Laboratories Inc) programando las siguientes condiciones de reacción: 10 minutos a 25° C; 60 minutos a 42° C; 10 minutos a 70° C; un último ciclo para el mantenimiento de las muestras a 4° C. El ADN complementario obtenido se conservó a -20° C hasta su posterior utilización.

6.1.3 PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR: polimerase chain reaction) es un método analítico de tipo cuantitativo que constituye uno de los métodos más sensibles para la cuantificación de la expresión de genes a partir del ADN complementario obtenido mediante retrotranscripción del ARN de las muestras que se ha explicado en la sección previa (RT-PCR). Con este método analítico, se cuantificaron los niveles de expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización por TGF- β s y el sistema opioide endógeno: TGF- β 1, BMP-2, BMP-7, activina, Smad4, kinasa activada por TGF- β (TAK1), BAMBI, proopiomelanocortina (POMC), proencefalína (PENK), prodinorfina (PDYN), receptor opioide μ y δ . La expresión se normalizó utilizando como gen de referencia el que codifica la subunidad ribosomal 18S. Se utilizaron sondas comerciales TaqMan® (Applied Biosystems, Life Technologies), junto con el reactivo que contiene Mg2+ y nucleótidos (Premix Ex TaqTM Perfect Real Time, Takara Bio Inc). Las amplificaciones se hicieron en un termociclador para PCR cuantitativa a tiempo real (Stratagen MX3000P; Agilent technologies; Loveland, USA).

La reacción se llevó a cabo por duplicado, en un volumen de 10 µl que contenian 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 agua 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 las 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 la desnaturalización del ADN complementario.
 - II. 1 minuto a 60° C para la unión de los cebadores a la cadena de ADN complementario.

Los niveles de expresión se determinaron por duplicado en tres experimentos independientes, como mínimo. Los resultados se expresaron como: $2^{(Ct \ de \ referencia \ -Ct}$ ^{problema)}; siendo Ct el ciclo umbral. Posteriormente todos los valores obtenidos fueron multiplicados por 10^5 para un mejor manejo de los datos. Los valores se expresaron como la media \pm EEM de las expresiones relativas obtenidas en los diferentes experimentos.

6.2 Inmunodetección de proteínas mediante western blot

Para la extracción de proteínas en médula espinal se añadieron 300 µl de tampón de lisis con detergentes (HEPES 100 mM, 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 y Chattopadhyay, 1993) en el espectofotómetro (Multiskan ex, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 620 nm, utilizando una curva patrón de albúmina. Las muestras se conservaron a -20° C hasta su posterior uso.

Para la electroforesis de las proteínas, se partió de 30 μ g de proteína total, a la que se añadieron 2 μ l de tampón de carga (2X), y PBS-SDS (1X), hasta un volumen final de 10 μ l. 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 muestras se realizó en geles de

Componentes	Gel de separación	Gel de apilamiento			
Agua destilada	3,1 ml	1 ml			
Arcilamida- 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			

acrilamida al 10%, aunque la concentración se puede variar, en función del peso molecular de la proteína a detectar. Su composición fue:

1

I

Se utilizó un marcador proteico estándar como referencia para los pesos moleculares, del cual se cargaron 8 µl. Una vez cargadas las muestras, se sometieron a una corriente continua de 100V durante 15 min y 130V durante 90 min 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 minutos, 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 leche desnatada en polvo al 2% 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 h, a 4° C y en agitación. Los anticuerpos primarios usados fueron: Anti- P-Smad2 (1:1000; cat. 3101; Cell

Signaling Technology); anti- P-Smad1 (1:1000; cedido por el Dr. C. H. Heldin, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala University, Uppsala, Sweden), anti-Proopiomelanocortin (POMC) (1:1000; ab32893; Abcam), anti- receptor opioide μ (1:1000; Ab10275; Abcam) y anti- receptor opioide δ (1:500; SC-9111; Santa cruz).

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la membrana en TBST (3 x 10 min) y se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora, en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se lavó en TBST (3 x 10 min). La fijación del anticuerpo a la membrana se detectó mediante quimioluminiscencia amplificada, utilizando el kit de revelado ECL Advanced western blotting detection kit (GE Healthcare Co.), que produce luminiscencia por oxidación del luminol. Esta luminiscencia se detectó mediante film fotográfico puesto en contacto con la membrana en un chasis de revelado. La cuantificación de la inmunoreactividad se realizó mediante densitometría óptica utilizando el programa "Scion Image Beta" (NIH, USA).

6.3 Radioinmunoensayo

La detección de los péptidos opioides endógenos leu-encefalina y dinorfina- A se realizó por radioinmunoensayo (RIA) usando un kit comercial específico para estos péptidos (Phoenix Pharmaceuticals Inc). En el RIA un péptido sintético marcado con I^{125} similar a nuestro péptido problema compite por unirse a un anticuerpo específico dirigido contra el péptido problema, de tal forma, que contabilizando la cantidad de péptido- I^{125} al final del proceso conoceremos la concentración del péptido problema.

Para la cuantificación de leu-encefalina y la dinorfina-A se siguieron las instrucciones del fabricante:

- I- Preparación de la curva de calibrado con concentraciones crecientes del standard (péptido).
- II- Preparación de los controles positivos y negativos.
- III- Adición de 25 µl de los lisados de médula espinal.
- IV- Se añadieron 100 µl de anticuerpo primario a todos los pocillos. Se mezcló y se incubó toda la noche a 4º C.
- V- Preparación de la solución que contiene el péptido- I¹²⁵ a una concentración conocida.
- VI- Adición del péptido- I^{125} a los pocillos. Se agitó y de incubó toda la noche a 4° C.
- VII- A la mañana siguiente se añadió el anticuerpo secundario a todos los pocillos. Se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 90 min.

- VIII- Se añadieron 500 µl del tampón de reacción del kit.
- IX- Se centrifugó a 3.000 r.p.m durante 30 min a 4° C.
- X- Se desechó con cuidado el sobrenadante.
- XI- Se contabilizan los cpm (cuentas por minuto) del pellet adherido a los pocillos mediante un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS 6000IC (Beckman Instruments Inc, CA, USA).
- XII- La cantidad de radioactividad contenida en el pocillo es inversamente proporcional a la cantidad de leu-encefalina o dinorfina-A que haya en el pocillo. Se determinaron las concentraciones de leu-encefalina y dinorfina-A por extrapolación a partir de la curva patrón. Tanto las muestras de la curva de calibrado como las muestras problema se introdujeron por duplicado.

Los niveles de péptidos se normalizaron con la concentración de proteínas de la muestra determinada por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951), método colorimétrico explicado más arriba en el apartado de inmunodetección de proteínas mediante western blot. Los niveles de los péptidos, una vez normalizados a la concentración de proteínas plasmáticas, se expresaron como pg de péptido/mg de proteína.

6.4 Estudios de fijación de [³⁵S]GTPγS en homogenizados de membranas

Se realizaron ensayos en homogeneizados de membranas del asta dorsal de la médula espinal con el fin de determinar la eficacia (E_{max}) y potencia (EC_{50}) de diferentes agonistas opioides para estimular la fijación específica de [³⁵S]GTPγS. Las muestras fueron homogeneizadas (1:30 peso/vol) en un tampón de homogenización frío (Tris-HCl 50 mM, sacarosa 250mM, MgCl₂ 3mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,4). Los homogeneizados tisulares se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4° C (centrífuge5430R; Eppendorf Iberica). El sobrenadante se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en tampón el tampón (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 3mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,4) y fue centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El pellet final obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso para los experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS.

Los experimentos de fijación de [³⁵S]GTPγS se realizaron como se ha descrito en la literatura (Valdizán y cols., 2012; González-Maeso y cols., 2000) con ligeras modificaciones. Se incubó una alícuota de homogeneizados de membrana (50 mg de proteína) durante 2 horas a 30° C en el tampón del ensayo (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1mM, DTT 1 mM, adenosín deaminasa 3 mU/m, pH 7,4) conteniendo GDP a 100 µM y [³⁵S]GTPγS (Perkin Elmer, Inc. Boston, USA; actividad específica: 1.250 Ci/mmol) a 0,1 nM utilizando tubos tratados con Sigmacote. Para estudiar la fijación del $[^{35}S]$ GTP γ S a los diferentes receptores opioides, se ensayó un amplio rango de concentraciones $(10^{-9} \text{ a } 10^{-3} \text{ M})$ de agonistas específicos para cada receptor: DAMGO (Sigma-Aldrich) para el recetor opioide µ; DSLET (Sigma-Aldrich) para para el recetor opioide δ ; U69593 (Sigma-Aldrich) para el receptor opioide κ . Se determinaron: la actividad basal en ausencia de agonistas; la fijación estimulada en presencia del agonista específico; y la fijación no específica en presencia de 10 mM GTPyS. La especificidad de la respuesta inducida por cada uno de los agonista fue comprobada usando antagonistas selectivos para el receptor μ (β -FNA), el receptor δ (naltrindol) y el recetor κ (Nor-BI), todos ellos a una concentración de 10 mM en presencia del agonista correspondiente. Al final de la incubación, el filtrado y lavado de la mezcla se realizó en un tampón de filtrado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 a 4º C,) usando filtros GF/C. La radioactividad contenida en los filtros se midió por espectroscopia en líquido de centelleo Ecoscint A (National Diagnosis, Atlanta, USA) mediante un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS 6000IC (Beckman Instruments Inc, CA, USA) durante un minuto.

Los experimentos de fijación de [35 S]GTP γ S en membranas de médula espinal se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresan como la media ± E.E.M. de los *n* valores obtenidos de cada grupo experimental. La E_{max} (máximo efecto estimulatorio, expresado como porcentaje de la fijación basal) y pEC₅₀ (potencia expresada como –logEC₅₀) fueron determinados por un análisis de regresión no lineal.

6.5 Actividad adenilato ciclasa en homogeneizados de membranas

El enzima adenilato ciclasa cataliza la formación del segundo mensajero AMPc a partir de ATP, constituyendo un mecanismo de transmisión de la señal al interior celular tras la activación de diversos receptores acoplados a proteínas G.

Las condiciones utilizadas para la determinación de la actividad adenilato ciclasa asociada a receptores opioides acoplados a proteínas Gi en membranas de médula espinal de ratón fueron las descritas por Valdizán y cols., (2012). Para proceder al ensayo, aproximadamente 50 mg de médula espinal fueron homogeneizados (1:60-1:90) en tampón de homogeneización STE (Tris-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, EDTA 5 mM,

89

sucrosa 300 mM, DTT 1 mM, leupeptina 25 μ g/ml, pH 7.4) mediante un potter (Rotor Heidolph RZR 2020, Potter S.B. Braun Biotech Internacional GmbH, Alemania) a 800 r.p.m. El homogeneizado resultante fue centrifugado en una microcentrífuga a 1.500 rpm, durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 14.000 rpm y el *pellet* obtenido fue resuspendido en el mismo STE empleado para la homogeneización. Las muestras se usaron inmediatamente después de su preparación.

Las suspensiones de membrana (50 µg de proteína) se preincubaron durante 5 minutos a 37° C en tampón de reacción (Tris-HCl 80 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 0.2 mM, EDTA 1 mM, sucrosa 60 mM, GTP 10 µM, DTT 1 mM, ácido ascórbico 0.5 mM, IBMX 0.5 mM, fosfocreatinina 5 mM, creatina fosfoquinasa 50 U/ml y mioquinasa 5 U/ml) añadiendo, además, 25 µl de agua destilada (actividad basal), forskolina 10 μ M y el agonista μ , DAMGO (10⁻⁵ y 10⁻⁴ M), o el agonista δ DSLET (10⁻⁵ y 10⁻⁴ M). Para confirmar la selectividad de la respuesta, se utilizaron antagonistas selectivos de receptores μ (β -FNA) y δ (natrindol) a una concentración 10 µM. Tras esta preincubación, se dio comienzo a la reacción de generación de AMPc por adición de Mg-ATP 0,2 mM, y se incubó a 37º C durante 10 minutos. La reacción finalizó por cocción de las muestras a 100° C durante 5 minutos. Seguidamente, las muestras se centrifugaron en una microcentrífuca a 4º C, durante 5 minutos a 14.000 r.p.m, y se determinó el contenido de AMPc en 50 µl de sobrenadante siguiendo las instrucciones del kit comercial (TRK 432, GG Amersham Pharmacia Biotech U.K. Limited, Buckinghamshire, Inglaterra) para ensayos de AMPc. Las concentraciones de proteína de los ensayos de actividad adenilato ciclasa fueron determinadas mediante un kit comercial (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad, Munich, Germany) que emplea γglobulina como estándar. Los resultados se expresaron como pmoles de AMPc /minuto/mg de proteína.

7 Estudios en cultivos celulares

Para la realización de esta tesis doctoral se eligió utilizar la línea estable de células de neuroblastoma humano SH-SY-5Y (ATCC®: CRL-2266) para realizar estudios de expresión génica de los péptidos opioides endógenos y sus receptores opioides bajo la acción de diferentes concentraciones TGF-β1 recombinante. Las células se cultivaron en placas de Petri de cultivo estériles de 55cm² de superficie (Iwaki®, Asahi Techno Glass Corporation), en incubadores (RS Biotech galaxy standard) a una

temperatura constante de 37°C y en atmósfera húmeda con un 5% de CO2. Las células se mantuvieron en medio DMEM (Lonza, Lonza Group Ltd) al que se añadió 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Lonza, Lonza Group Ltd), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (Sigma- Aldrich). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-90%, se aspiró el medio, se lavó con PBS y se añadió tripsina (Sigma- Aldrich Co, LLC. USA) para diluirlas a 1:2. Para la conservación de las células, una vez tripsinizadas, se pasaron a medio de congelación (DMEM 70% + 20% FBS + 10% DMSO (Sigma- Aldrich Co, LLC. USA) y se congelaron lentamente hasta una temperatura de -80° C.

Para los tratamientos con TGF- β 1 recombinante, las células se preincubaron durante 2 horas en medio DMEM sin suero y posteriormente se añadió 0,6 ng/ml o 1 ng/ml de TGF- β 1 recombinante y se mantuvo durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se aspiró el medio, se lavó la placa con PBS y se tripsinizó. Por último se recogieron las células en DMEM y se centrifugaron (Hettich zentrifugen, Universal 32) a 1.500 r.p.m durante 5 min. El pellet se congeló a -80° C para el posterior análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa, utilizando sondas Taq-man y siguiendo el mismo protocolo descrito para tejidos.

8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico GraphPad Prism 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. Los datos de los estudios conductuales se compararon mediante ANOVA de 2 vías de medidas repetidas seguido del test de Bonferroni. Para la comparación de los valores de expresión génica entre más de dos grupos se utilizó un ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. Se realizó análisis de regresión lineal simple de Pearson para correlacionar niveles de expresión génica entre sí. Se consideró estadísticamente significativo un valor de *p* menor de 0,05.

Resultados

1 BAMBI se localiza en áreas del sistema nervioso relevantes para el control de la nocicepción

Mediante hibridación *in situ*, se localizaron los dominios de expresión de ARNm de BAMBI en secciones de cerebro y médula espinal de ratón. Además, se localizó la expresión de los receptores de TGF- β tipo I, *ALK-3/BMPRIa*, *ALK-4/ActRIb* y *ALK-6/BMPRIb* en secciones de médula espinal. En todos los casos, se verificó la especificidad de las hibridaciones mediante controles realizados con ribosondas no específicas (sondas de ARN sentido) de cada transcrito.

Se observó una señal de hibridación específica e intensa de BAMBI en corteza cingulada, piriforme y retroesplenial, en las áreas hipocampales CA1, CA2 y CA3 y giro dentado, en el núcleo talámico posterior, área hipotalámica lateral, sustancia negra, área tegmental ventral, sustancia gris periacueductal y en las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal (figura 12). La expresión de BAMBI en el asta dorsal mostró una localización idéntica a la de los receptores ALK-3/BMPRIa, ALK-4/ActRIb y ALK-6/BMPRIb.

La expresión de BAMBI en el asta dorsal fue confirmada a nivel proteico mediante inmunohistoquímica (figura 12). En preparaciones de disociados de neuronas y células gliales del asta dorsal de la médula espinal y del ganglio dorsal se observó mediante inmunofluorescencia una localización preferente de BAMBI en neuronas, mientras que fue indetectable en las células gliales. Imágenes tomadas mediante microscopía laser confocal pusieron de manifiesto un patrón de expresión periférica de BAMBI, que es congruente con su localización en la membrana neuronal (figura 12).

2 La ausencia de BAMBI en ratones modificados genéticamente condiciona una señalización mediada por TGF-β incrementada

Se valoró si la liberación de la influencia inhibitoria del pseudorrecptor BAMBI en los ratones BAMBI^{-/-} condiciona cambios en la señalización intracelular dependiente de la superfamilia TGF-β. Para ello se determinó mediante western blot la presencia de Smad1 (vía de BMPs) y Smad2 (vía de TGF-β) fosforiladas en la médula espinal. La presencia de proteínas Smads fosforiladas fue superior en los ratones BAMBI^{-/-} que en los silvestres (figura 8), lo que sugiere una señalización mediada por estas citoquinas incrementada.



Figura 12. Inmunolocalización de BAMBI y diferentes receptores de tipo I. Hibridación in situ representativa de la distribución de *BAMBI* en cortes de cerebro (**A**) y médula espinal (**B**). **SGP**, sustancia gris periacueductal; **AD**, asta dorsal de la médula espinal. (**C**) Tinción inmunohistoquímica que muestra la presencia de la proteína BAMBI en las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal. A nivel de la médula espinal, la localización de ARNm de *BAMBI* coincide con la distribución de los receptores de tipo I de la familia TGF- β *ALK-4* (**D**), *ALK-6* (**E**) y *ALK-3* (**F**). Localización de BAMBI mediante inmunofluorescencia en preparaciones de disociados de neuronas y células gliales del asta dorsal de médula espinal (paneles **G**) y del ganglio dorsal (paneles **H**). Los núcleos se tiñeron con DAPI (**G**, **H**). En el asta dorsal, la inmunoreactividad de BAMBI (verde) se localiza en neuronas (**G**²) como indica la ausencia de señal del marcador glial GFAP (rojo)(**G**²). En el ganglio dorsal (**H**²), la señal de BAMBI se observa en las neuronas, pero está ausente en la glía satélite (**H**² y **H**²). En Las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas en el microscopio confocal, muestran una distribución de BAMBI compatible con su localización en la membrana plasmática de las neuronas (**H**²).

3 Los ratones que carecen de BAMBI presentan un fenotipo hipoalgésico frente a estímulos nociceptivos agudos de tipo térmico, mecánico y químico/inflamatorio

Se examinó la respuesta de los ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} en pruebas conductuales que valoran nocicepción evocada por estímulos nocivos térmicos, químico/inflamatorio y mecánicos.

3.1 Nocicepción evocada por estímulos térmicos

Se utilizaron dos modelos diferentes de estimulación térmica: el test de inmersión de la cola, que estudia respuestas de tipo espinal, y el test de la placa caliente, en el que las respuestas tienen componentes espinal y supraespinal.

En el test de la placa caliente se cuantificaron la latencia de lamido de las patas traseras y la latencia de salto a 50° C y a 52° C (figura 13). A la temperatura de 50° C, los ratones BAMBI^{-/-} mostraron latencias de lamido (BAMBI^{+/+}:17 ± 2 vs. BAMBI^{-/-}: 38 ± 1,6; p<0,001) y latencias de salto (BAMBI^{+/+}: 59,2 ± 6,1 vs. BAMBI^{-/-}: 94,1 ± 6,1; p<0,001) significativamente superiores a las de los ratones silvestres. A la temperatura de 52° C, se obtuvieron resultados similares, siendo la latencia de salto salto significativamente mayor en los animales BAMBI^{-/-} (BAMBI^{+/+}:25,36 ± 4,21 vs. BAMBI^{-/-}:52,92 ± 10,3; p<0,05).

En el test de inmersión de la cola en agua a 45° C, 47° C y 49° C, se valoró la latencia de retirada de la cola (figura 13). A todas las temperaturas examinadas, los ratones BAMBI^{-/-} experimentaron un retraso significativo en la latencia de retirada de la cola respecto a los animales BAMBI^{+/+} (45° C, BAMBI^{+/+}: 19,42 ± 6,09 *vs*. BAMBI^{-/-}: 42,26 ± 7,02, *p*<0,05; 47° C, BAMBI^{+/+}: 7,8 ± 0,84 *vs*. BAMBI^{-/-}: 11,25 ± 0,78, *p*<0,01; 49° C, BAMBI^{+/+}: 2,43 ± 0,20 *vs*. BAMBI^{-/-}: 4,10 ± 0,24, *p*<0,001). Además, la latencia de retirada de la cola en los animales heterocigotos (BAMBI^{+/-}) alcanzó valores intermedios entre los animales BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} (figura 13).

3.2 Nocicepción evocada por estímulos químico/inflamatorios

El efecto de la deleción de BAMBI en la respuesta nociceptiva frente a estímulos químico/inflamatorios se estudió mediante la prueba de la formalina (figura 13). En esta prueba valoramos la latencia de lamido durante los primeros 5 minutos (fase temprana de estímulo químico) y entre 20 y 30 min (segunda fase o fase inflamatoria) desde la

inyección intraplantar de formalina. Los animales BAMBI^{-/-} mostraron una reducción significativa en la respuesta nociceptiva en comparación con los animales BAMBI^{+/+} en ambas fases [fase aguda (BAMBI^{+/+}: 83,4 ± 8,8 *vs.* BAMBI^{-/-}: 42,5 ± 6,7, *p*<0,01); segunda fase (BAMBI^{+/+}: 131,3 ± 19,9 *vs.* BAMBI^{-/-}: 78 ± 14,9, *p*<0,05).

3.3 Nocicepción evocada por estímulos mecánicos

La sensibilidad mecánica se valoró mediante el test de von Frey, en el que estudiamos la respuesta evocada por la aplicación de una batería de estímulos mecánicos de fuerza creciente (figura 13). Los animales de ambos genotipos incrementaron significativamente el porcentaje de respuestas positivas conforme se aumentó la intensidad de la fuerza aplicada ("intensidad de fuerza": $F_{(6,108)}$ = 246,0, p<0,001), siendo este incremento más modesto en los animales BAMBI^{-/-} ("intensidad de fuerza x genotipo": $F_{(6,108)}$ = 4,5, p<0,001). Los animales BAMBI^{-/-} (mostraron una menor sensibilidad a la estimulación mecánica que los animales BAMBI^{+/+} (umbral de respuesta en g; BAMBI^{+/+}: 4,4 ± 0,3 *vs*. BAMBI^{-/-}: 6,8 ± 0,3, p<0,001). Los animales heterocigotos BAMBI^{+/-} (umbral de respuesta en g; BAMBI^{+/+} + 0,3 *vs*. BAMBI^{+/-} (5,8 ± 0,3, p<0,01) mostraron una sensibilidad mecánica intermedia entre los animales BAMBI^{+/-} (figura 13).

4 La ausencia de BAMBI atenúa el desarrollo de alodinia mecánica en un modelo de dolor crónico neuropático

Se evaluó la influencia de la ausencia de BAMBI en el desarrollo de alodinia mecánica, en un modelo experimental de aplastamiento del nervio ciático que reproduce el dolor crónico neuropático provocado por una lesión nerviosa en humanos. Se valoró la respuesta nociceptiva de la pata trasera frente a una estimulación mecánica de fuerza creciente mediante monofilamentos de von Frey, un día antes y diariamente durante un periodo de 14 días a partir de la lesión del nervio ciático. Durante este periodo, los ratones BAMBI^{+/+} mostraron un decremento progresivo y significativo en el umbral de retirada de la pata trasera, alcanzando una respuesta alodínica máxima el día 14 tras el aplastamiento del nervio. El ANOVA de dos vías indicó que los ratones BAMBI^{+/+} durante todo el periodo de seguimiento (ANOVA de dos vías; "Genotipo": $F_{(1,90)}$ = 39,9, p<0,001; "Tiempo": $F_{(5,90)}$ = 48,9, p<0,001; "Genotipo x Tiempo": $F_{(5,90)}$ = 6,8, p<0,001).



Figura 13. Respuesta frente a estímulos nociceptivos agudos térmico, químico-inflamatorio y mecánico. *A*: Test de la placa caliente a 50°C. Se muestra el tiempo en segundos que tardan los ratones en lamerse las patas y en saltar fuera de la placa. *B*: Test de inmersión de la cola. Se muestra la latencia en segundos de retirada de la cola del agua a 45° C, 47° C y 49° C. **C**: Test de inmersión de la cola a 49° C que muestra la dependencia del genotipo en la respuesta. **D**: Tiempo de lamido en la primera fase (0-5 min) y en la segunda fase (20-30 min) tras la inyección de formalina (20 µl al 2%) subcutánea en la planta de la pata trasera. **E**: Test de estimulación mecánica con monofilamentos de von Frey. Se muestra el porcentaje de respuesta frente a la presión ejercida (BAMBI^{+/+} vs. BAMBI^{-/-}, **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,01, prueba de Bonferroni). **F**: Los histogramas muestran la dependencia del genotipo del umbral nociceptivo medido en el test de von Frey. (*vs.* BAMBI^{+/+}; **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001. Prueba *t* de Student de dos colas).

momento en que los ratones $BAMBI^{+/+}$ mostraron una intensa alodinia mecánica, mientras que la respuesta nociceptiva de los ratones $BAMBI^{-/-}$ fue significativamente menor (ANOVA de dos vías; "Genotipo": $F_{(1,69)} = 80,7$, p<0,001; "Lesión nerviosa": $F_{(1,69)} = 97,1$, p<0,001; "Genotipo x Lesión nerviosa": $F_{(1,69)} = 25,0$, p<0,001) (figura 14).



Figura 14. Desarrollo de alodinia mecánica en respuesta a la lesión del nervio ciático en ratones **BAMBI**^{+/+} y **BAMBI**^{-/-}. Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. A: Evolución del umbral nociceptivo a lo largo de 14 días tras la lesión del nervio ciático. **B**, **C** y **D**: Curvas fuerza-respuesta a los 14 días de la lesión nerviosa. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; prueba de Bonferroni).

5 El fenotipo hipoalgésico de los ratones BAMBI^{-/-} es revertido por antagonistas opioides

La presencia de transcritos de BAMBI en el asta dorsal de la médula espinal y en la sustancia gris periacueductal, regiones en las que el sistema opioide endógeno desempeña un importante papel regulador de la percepción nociceptiva, nos condujo a examinar la existencia de una relación entre la menor sensibilidad al dolor que presentan los ratones BAMBI^{-/-} con una posible hiperactividad del sistema opioide endógeno.

Con el propósito de verificar esta hipótesis, grupos de ratones silvestres y BAMBI "knockout" homocigotos y heterocigotos fueron tratados con el antagonista opioide no selectivo naloxona (1 mg/kg, i.p.), administrado 30 minutos antes de realizar los test de inmersión de la cola y de estimulación mecánica (test de von Frey). El tratamiento con naloxona no produjo alteraciones significativas en la latencia de retirada de la cola en el test de inmersión de la cola a una temperatura de 49° C en los ratones BAMBI^{+/+} (figura 15). Sin embargo, el retraso en la latencia de retirada de la cola que se observaba en los animales BAMBI^{-/-} (BAMBI^{+/+}: 2,4 ± 0,2 *vs.* BAMBI^{-/-}: 6,9 ± 0,5, p<0,001) y BAMBI^{+/-} (BAMBI^{+/+}: 2,4 ± 0,2 *vs.* BAMBI^{+/-}: 4,7 ± 0,5, p<0,001) desapareció tras la administración de una única dosis de naloxona, alcanzando valores similares a los de los animales BAMBI^{+/+}.

En la prueba de von Frey (figura 15), el tratamiento con naloxona no modificó el umbral de sensibilidad mecánica en los animales BAMBI^{+/+}. En cambio, en los animales BAMBI^{+/-} y BAMBI^{-/-} se produjo una reducción del umbral nociceptivo que alcanzó valores similares a los de los animales BAMBI^{+/+}.

En el modelo de dolor neuropático inducido por aplastamiento del nervio ciático, también se evaluó la existencia de una relación entre el sistema opioide endógeno y el fenotipo antialodínico observado en los animales BAMBI^{-/-}. Dos semanas tras la lesión del nervio, cuando la diferencia entre genotipos en el grado de alodinia desarrollada fue máxima, se valoró la respuesta a la estimulación de los ratones mediante monofilamentos de von Frey, antes y 30 min después de la administración de naloxona.

En los ratones BAMBI^{+/+} con lesión del nervio ciático, la naloxona no modificó significativamente la respuesta nociceptiva, mientras que en los ratones BAMBI^{-/-} precipitó la expresión de alodinia mecánica (ANOVA de dos vías; "Genotipo": $F_{(1,69)} =$



16,6, p<0,001; "Tratamiento NLX": $F_{(1,69)} = 11,5$, p<0,01; "Genotipo *vs*. Tratamiento NLX": $F_{(1,69)} = 4,5$, p<0,05) (figura 16), revirtiéndose el fenotipo antialodínico.

Figura 15. Efecto del tratamiento con el antagonista opioide naloxona (1mg/Kg. i.p.) en animales $BAMBI^{+/+}$ (gris), $BAMBI^{+/-}$ (rojo y negro) y $BAMBI^{-/-}$ (rojo) sometidos a pruebas de dolor agudo. A: Test de inmersión de la cola a 49° C. Los resultados muestran la latencia de retirada de la cola antes y después de la administración de naloxona. B: Test de estimulación mecánica de von Frey. Umbral nociceptivo antes y después de la administración de naloxona. (*vs.* $BAMBI^{+/+}$; **p<0,01, ***p<0,0001; Prueba t de Student de 2 colas).

Con la finalidad de definir el tipo de receptor opioide implicado en el fenotipo anti-alodínico de los animales BAMBI^{-/-}, se evaluó el efecto de antagonistas selectivos de receptores opioides μ , δ y κ en la respuesta nociceptiva frente a estímulos mecánicos, 14 días después de sufrir una lesión nerviosa. A continuación, los ratones recibieron una dosis de naloxona para confirmar el grado de antagonismo provocado por los antagonistas específicos. Como se muestra en la figura 17, el antagonista selectivo de receptores opioides δ , naltrindol, revirtió totalmente el fenotipo antialodínico (ANOVA de dos vías; "Tratamiento": $F_{(1,67)} = 490$, *p*<0,001); el antagonista selectivo del receptor μ , β - funaltrexamina, fue parcialmente efectivo revertiendo la alodinia (ANOVA de dos vías;: "Tratamiento": $F_{(1,67)} = 48,5$, *p*<0,001) y la nor-binaltorfina, antagonista selectivo del receptor κ , (ANOVA de dos vías; "Tratamiento": $F_{(1,67)} = 48,5$, *p*<0,001) y la nor-binaltorfina, antagonista selectivo del receptor del receptor κ , (ANOVA de dos vías; "Tratamiento": $F_{(1,67)} = 48,5$, *p*<0,001) y la nor-binaltorfina, antagonista selectivo del receptor del receptor κ , (ANOVA de dos vías; "Tratamiento": $F_{(1,67)} = 4,7$, *p*<0,05) no modificó la intensidad de la alodinia.



Figura 16. Efecto del tratamiento con el antagonista naloxona sobre el desarrollo de dolor neuropático en respuesta a la lesión por aplastamiento del nervio ciático. Los valores muestran el porcentaje de respuestas de retirada de la pata trasera provocadas por estímulos mecánicos de intensidad creciente en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}. El tratamiento con naloxona (triángulos azules) no produjo cambios significativos en los ratones BAMBI^{+/+}, mientras que desencadenó alodinia mecánica en los ratones BAMBI^{-/-}. ("Lesión nerviosa" vs. "Lesión nerviosa + NLX"; *** p<0,001; prueba de Bonferroni).

6 Los ratones BAMBI^{-/-} muestran una expresión incrementada de péptidos opioides en la médula espinal

Dada la función reguladora de la transcripción génica ejercida por TGF-β, se analizó si la expresión génica de péptidos opioides endógenos está alterada por la eliminación de BAMBI (figura 18). Se observó que los niveles del ARNm de proopiomelanocortina (POMC), la proteína precursora de β-endorfina, eran 2,5 ± 0,3 veces superior en los ratones BAMBI^{-/-} que en los ratones BAMBI^{+/+} (BAMBI^{+/+}: 4,1 x10⁻⁶ ± 3,2 x10⁻⁶ vs. BAMBI^{-/-}: 1,0 x 10⁻⁵ ± 3,5 x10⁻⁶, p < 0,05; prueba *t* de Student de dos colas). También se observó en los ratones BAMBI^{-/-} un incremento de 1.6 ± 0.1 veces en los niveles basales de ARNm de proencefalina (PENK), la proteína precursora de las encefalinas (BAMBI^{+/+}: 0,013 ± 0,005 vs. BAMBI^{-/-}: 0,021 ± 0,003, p < 0,05; prueba *t* de Student de dos colas). Los niveles basales de ARNm de prodinorfina (PDYN), la proteína precursora de las dinorfinas, fueron similares en ambos genotipos (BAMBI^{+/+}: 2,2 x10⁻³ ± 8 x10⁻⁴ vs. BAMBI^{-/-}: 2,1 x 10⁻³ ± 6 x10⁻⁴, *NS*). Se comprobó que el incremento de los ARNm de péptidos opioides endógenos se traduce en un aumento a nivel proteico mediante western-blot o RIA. Los niveles de POMC en la médula espinal, determinados por western blot, y de Leu-encefalina, medidos por RIA, fueron superiores en los animales BAMBI^{-/-} que en los animales BAMBI^{+/+} (POMC: BAMBI^{+/+}: 100 ± 0,1 vs. BAMBI^{-/-}: 144 ± 12, p<0,05; Leu-encefalina: BAMBI ^{+/+}: 32,21 ± 2,45 vs. BAMBI^{-/-}: 46,14 ± 2,02, p<0,05; prueba *t* de Student de dos colas). No se observaron diferencias entre genotipos en la expresión de dinorfina determinada por RIA (BAMBI^{+/+}: 57,74 ± 6 vs. BAMBI^{-/-}: 52,56 ± 5,7, NS).



Figura 17. Efecto de los antagonistas específicos de receptores opioides μ ; β-funaltrexamina (A), δ; naltrindol (B) y κ; nor-binaltorfimina (C) sobre las manifestaciones de dolor neuropático en animales BAMBI^{-/-}. Las gráficas muestran alodinia mecánica, evaluada con monofilamentos de von Frey, el día 14 tras la lesión del nervio ciático (círculos), y el efecto del pretratamiento con los diferentes antagonistas opioides específicos (triángulos rojos). El grado de antagonismo producido por los diferentes antagonistas específicos se valoró mediante la posterior administración del antagonista opioide inespecífico naloxona (triángulos azules). (Salino *vs.* Antagonista específico; *** *p*<0,001; prueba de Bonferroni).

Como muestra la tabla 4, los niveles de expresión en la médula espinal de los genes que codifican POMC, PENK y PDYN están significativa e inversamente relacionados con la expresión génica de BAMBI, mientras que se correlacionan de forma positiva con los niveles de ARNm de varios miembros de la familia de TGF- β (TGF- β 1, activina y BMP-7) y de efectores intracelulares de la vía de señalización de TGF- β (Smad4 y TAK1).



Figura 18. Expressión génica (A, B, C) y proteica (D, E, F) de los precursores de los péptidos opioides endógenos en médula espinal de animales $BAMBI^{+/+}$ (negro) y $BAMBI^{-/-}$ (rojo). ($BAMBI^{+/+} vs$. $BAMBI^{-/-}$; *p < 0.05; Prueba *t* de Student de 2 colas).

	TGF-β1		BMP-2		BMP-7		Activina		SMAD-4		TAK-1		BAMBI
	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+
РОМС	0.65**	0.54*	0.47*	0.48*	0.57*	0.75***	0.54*	0.72***	0.30	0.67**	0.41	0.72***	- 0.62*
PENK	0.76***	0.65**	0.69**	0.65**	0.80***	0.71***	0.58*	0.63**	0.64**	0.80***	0.73***	0.70***	- 0.51*
PDYN	0.71***	0.72***	0.75***	0.80***	0.68***	0.83***	0.61**	0.68**	0.39	0.68***	0.45*	0.77***	-0.54*

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson's (r) obtenidos mediante análisis de regresión lineal de los niveles de expresión génica de POMC, PENK y PDYN y los de TGF- β 1, BMP-2, BMP-7, activina, Smad4, TAK 1 y BAMBI en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}; *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001.

7 El tratamiento con el inhibidor de encefalinasas RB101 potencia el fenotipo hipoalgésico y antialodínico de los ratones BAMBI^{-/-}

En base a estos hallazgos, si el fenotipo hipoalgésico mostrado por los ratones BAMBI^{-/-} está relacionado con una liberación sináptica incrementada de péptidos opioides, debería ser potenciado mediante la inhibición de la degradación de dichos péptidos. Para demostrar nuestra hipótesis, evaluamos el efecto del compuesto RB101, un potente inhibidor dual de encefalinasas (Le Guen y cols., 2003; Daugé y cols., 1996), administrado a la dosis de 100 mg/kg. i.p. sobre la sensibilidad a estímulos mecánicos (test de von Frey) en ratones BAMBI^{-/-} y BAMBI^{+/+}. Como se observa en la figura 19, RB101 produjo un efecto antinociceptivo significativo en los ratones BAMBI^{-/-} (ANOVA de medidas repetidas; "Tratamiento": $F_{(1,18)}= 45$, p < 0,001; "Fuerza": $F_{(3,18)} = 13,7$, p < 0,001; "Tratamiento x Fuerza": $F_{(3,18)} = 0,5$, *NS*), pero no modificó las respuestas nociceptivas en los ratones BAMBI^{+/+} (ANOVA de medidas repetidas; "Tratamiento": $F_{(8,32)} = 49,93$, p < 0,001; "Tratamiento x Fuerza": $F_{(8,32)} = 49,93$, p < 0,001; "Tratamiento x Fuerza": $F_{(8,32)} = 49,93$, p < 0,001; "Tratamiento x Fuerza": $F_{(8,32)} = 49,93$, p < 0,001; "Tratamiento x Fuerza": $F_{(8,32)} = 0,04$, *NS*).

Se analizó el efecto antialodínico de RB101 en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} sometidos a lesión del nervio ciático (figura 20). Una vez que los animales de ambos genotipos alcanzaron un nivel de alodinia mecánica equivalente, se les administró RB101 (100mg/kg) y se valoró la respuesta a la estimulación mecánica transcurridos 60 minutos. En estas condiciones, RB101 redujo significativamente la respuesta a estímulos mecánicos tanto en los animales BAMBI^{-/-} (ANOVA de medidas repetidas; "Tratamiento": $F_{(1,64)} = 12,6, p < 0,01$; "Fuerza": $F_{(8,64)} = 81,7, p < 0,001$; "Tratamiento x Fuerza": $F_{(8,64)} = 3,2, p < 0,01$) como en los animales BAMBI^{+/+} (ANOVA de medidas repetidas; "Tratamiento": $F_{(1,54)} = 10,5, p < 0,05$; "Fuerza": $F_{(9,54)} = 38,2, p < 0,001$;

"Tratamiento x Fuerza": $F_{(9,54)} = 1,7$, *NS*). El efecto antialodínico de RB101 fue significativamente superior en los animales BAMBI^{-/-} que en los animales BAMBI^{+/+} (ANOVA de dos vías de medidas repetidas; "Tratamiento": $F_{(1,13)} = 103,4$, *p*<0,001; "Genotipo": $F_{(1,13)} = 182$, *p*<0,001; "Tratamiento x Genotipo": $F_{(1,13)} = 16,6$, *p*<0,001). El antagonista opioide naloxona antagonizó completamente el efecto analgésico de RB101 en los ratones BAMBI^{-/-} (ANOVA: "Tratamiento": $F_{(2,11)} = 8,75 p < 0,05$) (figura 21).



Figura 19. Test de von Frey donde se muestra el porcentaje de respuesta frente a estímulos mecánicos (prueba de von Frey) en ratones $BAMBI^{+/+}$ (**A**) y $BAMBI^{-/-}$ (**B**) tratados con salino (negro) o con el inhibidor de encefalinasas RB101 (azul). (Salino *vs.* RB101; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; prueba de Bonferroni).

Puesto que la potencia analgésica de los inhibidores de encefalinasas es dependiente de la magnitud de la liberación sináptica de opioides endógenos, nuestros resultados nuevamente apoyan que el incremento del tono opioide endógeno es el mecanismo que protege a los ratones BAMBI^{-/-} del desarrollo de alodínia tras la lesión de un nervio periférico



Figura 20. Efecto antialodínico de RB101 en ratones BAMBI^{+/+} (A) y BAMBI^{-/-} (B), determinado mediante el test de von Frey donde se muestra el porcentaje de respuesta frente a los diferentes estímulos con dolor neuropático con (azul) y sin (negro) tratamiento. (Salino *vs.* RB101; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; prueba de Bonferroni).

•



Figura 21. Umbral nociceptivo determinado mediante estimulación mecánica (test de von Frey) en ratones BAMBI^{-/-} **tratados con salino, RB101 y RB101 + naloxona.** (vs.RB101; **p*<0,05; prueba de Bonferroni).
8 El efecto analgésico de la morfina está potenciado en los ratones BAMBI^{-/-} en modelos de dolor agudo y crónico

Nos planteamos si la ausencia de BAMBI podría tener consecuencias en la respuesta analgésica inducida por fármacos opioides, en condiciones de dolor agudo y de dolor crónico neuropático.

8.1 Efecto de la morfina sobre la sensibilidad mecánica

Animales de ambos genotipos fueron tratados con dosis acumulativas de morfina (1, 3, 6 y 10 mg/kg, i.p.) y se valoró el efecto antinociceptivo mediante la prueba de von Frey. Se valoró el máximo efecto posible (MEP) inducido por la morfina, considerando como umbral nociceptivo un 50% de respuestas (figura 22). Se observaron diferencias significativas en el efecto de la morfina en ambos genotipos (ANOVA de medidas repetidas: "Genotipo": $F_{(1,39)} = 13,8, p<0,01$; "Dosis": $F_{(3,39)} = 38,7, p<0,001$; "Genotipo x Dosis": $F_{(3,39)} = 1,8, NS$), siendo los ratones BAMBI^{-/-} más sensibles a la analgesia producida por la morfina que los ratones BAMBI^{+/+}. La dosis de morfina de 3 mg/kg tuvo un efecto analgésico significativamente mayor en los ratones BAMBI^{-/-} que en animales BAMBI^{+/+} (% MEP: BAMBI^{+/+}; 20,8% ± 10,3% vs. BAMBI^{-/-}; 61,9% ± 14,9%; p<0,01); lo mismo ocurrió con la dosis de 6 mg/kg (% MEP: BAMBI^{+/+;} 60,4% ± 6,9% vs. BAMBI^{-/-}; 92,5% ± 7,1%; p<0,05).

8.2 Efecto de la morfina en un modelo de dolor agudo químico/inflamatorio

Se estudió el efecto de la morfina en la respuesta nociceptiva frente a estímulos químico/inflamatorios mediante la prueba de la formalina (figura 23). En este test la morfina produjo una reducción en el tiempo de lamido en los ratones BAMBI^{-/-}, que fue significativamente superior al que se produjo en los animales BAMBI^{+/+} (ANOVA de medidas repetidas: "Genotipo": $F_{(1,2)} = 24,35$, p<0,001; "Tratamiento": $F_{(1,22)}= 10$, p<0,001; "Genotipo x Tratamiento": $F_{(1,22)}= 5,2$, p<0,05). Asimismo en la segunda fase del test los animales knock-out se mostraron más sensibles al efecto de esta dosis del fármaco que los animales con genotipo salvaje (ANOVA de medidas repetidas; "Genotipo": $F_{(1,18)} = 12,9$, p<0,01; "Tratamiento": $F_{(1,18)}= 528,8$, p<0,001; "Genotipo x Tratamiento": $F_{(1,22)}=5,2,9,000$



Figura 22. Efecto analgésico de la morfina expresado como % del máximo efecto posible (MEP) en ratones **BAMBI**^{+/+} y **BAMBI**^{-/-}. (BAMBI^{+/+} vs. BAMBI^{-/-}; *p<0,05, **p<0,01, prueba de Bonferroni).

BAMBI-/-



Figura 23. Efecto de la morfina en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} sobre el tiempo de lamido en el test de la formalina. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición de la morfina en la capacidad de percepción del estímulo nocivo durante la primera y segunda fases del test respecto a los animales tratados con salino (BAMBI^{+/+} vs. BAMBI^{-/-}; ***p<0,001; prueba de Bonferroni).

8.3 Efecto de la morfina sobre la alodinia mecánica en un modelo de dolor neuropático

Se estudió el efecto antialodínico de la morfina en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{/-} sometidos a dolor neuropático. Se permitió que los dos grupos de animales desarrollasen un grado de alodinia mecánica similar y se administraron dosis crecientes de morfina (1, 3, 6 y 10 mg/kg, i.p.). Se realizó el test de von Frey 30 minutos después de la administración de cada dosis del fármaco (figura 24). El efecto antialodínico ejercido por la morfina a las dosis de 3 y 6 mg/kg fue significativamente superior en los animales BAMBI^{-/-} que en los BAMBI^{+/+} [morfina 3 mg/kg (ANOVA de medidas repetidas, "Genotipo": $F_{(1,18)} = 5,2$, p<0,05; "Tratamiento": $F_{(2,18)} = 59,8$, p<0,001; "Genotipo x Tratamiento": $F_{(2,18)} = 3,4$, *NS*); morfina 6mg/kg (ANOVA de medidas repetidas: "Genotipo": $F_{(1,20)} = 6,32$, p<0,05; "Tratamiento": $F_{(2,20)} = 37,61$, p<0,001; "Genotipo x Tratamiento": $F_{(2,20)} = 6,93$, p<0,01]. Con las dosis de 1 y 10 mg/kg, no se observaron diferencias entre genotipos.



Figura 24. Efecto antialodínico de la morfina en ratones BAMBI^{+/+} (círculos negros) y BAMBI^{-/-} (círculos rojos) sometidos a lesión del nervio ciático. Porcentaje de respuestas de retirada de la pata frente a estímulos mecánicos en el test de von Frey. (BAMBI^{+/+} *vs.* BAMBI^{-/-}; *p<0,05, **p<0,01; prueba de Bonferroni).

9 La ausencia de BAMBI condiciona un incremento en la expresión de receptores opioides en la médula espinal lumbar en animales con dolor neuropático

Con el fin de determinar la existencia de cambios en componentes postsinápticos de la vía se señalización opioide que pudieran justificar el incremento del efecto analgésico de la morfina en los ratones BAMBI^{-/-}, hemos estudiado la expresión de receptores opioides, su acoplamiento a proteínas G y la respuesta evocada sobre uno de sus sistemas efectores mejor estudiado, la vía de la adenilato ciclasa.

Hemos analizado la expresión génica y proteica de los receptores opioides μ y δ , mediante PCR cuantitativa y western blot, en la médula lumbar de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} sometidos a lesión del nervio ciático o a cirugía simulada (figura 25). En los animales BAMBI^{-/-}, la lesión del ciático se acompañó de un incremento significativo de la transcripción de los receptores opioides μ y δ , en comparación con los animales del mismo genotipo sometidos a cirugía simulada [Prueba t de Student de 2 colas, sham BAMBI^{-/-} *vs.* NP BAMBI^{-/-}: receptor μ (t= 8,02, *p*<0,001); receptor δ (t= 3,04, *p*<0,01,)]. Por el contrario, la neuropatía en los animales BAMBI^{+/+} no produjo cambios significativos en la expresión medular de ninguno de estos dos receptores opioides. El incremento en la expresión génica de los dos receptores opioides alcanzó valores significativamente superiores en los animales BAMBI^{-/-} que en los ratones BAMBI^{+/+} [Prueba t de Student de 2 colas, NP BAMBI^{+/+} *vs.* NP BAMBI^{-/-}: receptor μ (*p*<0,001, t= 7,35); receptor δ (t= 2,6, *p*<0,05)].

La expresión proteica de los receptores opioides μ y δ , analizada mediante western-blot en lisados de proteínas de médula espinal en los mismos animales, mostró un patrón de expresión similar al descrito para la expresión génica. Confirmamos, por tanto, que la neuropatía ciática provocó un incremento de receptores opioides μ y δ en la médula espinal lumbar de los ratones BAMBI^{-/-} pero no así en los BAMBI^{+/+}.



Figura 25. Expressión de ARNm de los receptores opioides μ (A) y δ (B) determinada mediante PCR cuantitativa en la médula espinal lumbar de animales sometidos a lesión del nervio ciático (NP) o a cirugía simulada (Sham). Los resultados se expresan como porcentaje de variación de los animales NP vs. Sham de cada genotipo. (Sham BAMBI^{-/-} vs. NP BAMBI^{-/-}; **p<0,01, ***p<0,001; NP BAMBI^{+/+} vs. NP BAMBI^{-/-}; \$p<0,05, \$\$\$ p<0,001; prueba de Bonferroni). Se muestran imágenes representativas, tomadas de un mismo gel para cada receptor, de la expresión proteica determinada mediante western blot (WB) de receptores μ (A') y δ (B').

10 La ausencia de BAMBI no modifica la capacidad de acoplamiento de los receptores opioides a proteínas Gi/o, en respuesta a agonistas, en la médula espinal

Determinamos el acoplamiento entre receptores opioides y sus proteínas G asociadas ($G_{i/o}$) en animales BAMBI^{-/-} y silvestres inducido por agonistas de dichos receptores. Para ello, analizamos la fijación de [³⁵S]GTPγS, un análogo no hidrolizable de GTP marcado con un isotopo radiactivo, en presencia de agonistas selectivos de receptores opioides μ (DAMGO), δ (DSLET) o κ (U69593), en homogenizados de membranas de médula espinal lumbar.

La figura 26 muestra que, en condiciones basales, no existieron diferencias entre los animales BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} en la fijación de [35 S]GTP γ S estimulada por agonistas μ , δ o κ . Así, no observamos diferencias significativas entre genotipos en la potencia (pCE₅₀) ni en la estimulación máxima (E_{max}) inducida por DAMGO (BAMBI^{+/+}: E_{max}= 256 ± 9,6%; pCE₅₀= 5,7 ± 0,2, *vs*.BAMBI^{-/-}: E_{max}= 239% ± 5,8%, pCE₅₀= 6,0 ± 0,1), DESLET (BAMBI^{+/+}: E_{max}= 253 ± 4,62%; pCE₅₀= 5,5 ± 0,1 *vs*.BAMBI^{-/-}: E_{max}= 262 ± 5,0%, pCE₅₀= 5,2 ± 0,1), y U69593 (BAMBI^{+/+}: E_{max}= 143 ± 4,8%; pCE₅₀= 5,8 ± 0,3 *vs*. BAMBI^{-/-}: E_{max}= 161 ± 9,0%, pCE₅₀= 5,1 ± 0,4). Cuando se analizó la estimulación en la fijación de [³⁵S]GTPγS a receptores μ , δ y κ en ratones sometidos a lesión del nervio ciático, tampoco se observaron diferencias significativas entre genotipos ni en la E_{max}, ni en la potencia de ninguno de los agonistas estudiados (tabla 5). Estos resultados indican que la ausencia de BAMBI no modificó la eficacia del acoplamiento entre receptores opioides y sus proteínas transductoras de la señal G_i/G_o tras la activación del receptor por agonistas, ni en condiciones basales ni tras el desarrollo de dolor neuropático.



Figura 26. Porcentaje de incremento en la fijación específica de [³⁵S]GTP γ S inducida por concentraciones crecientes de agonistas específicos de receptores opioides μ (DAMGO), δ (DSLET) y κ (U69593) en ratones BAMBI^{+/+} (negro) y BAMBI^{-/-} (rojo).

Agonista	Sham BAMBI ^{+/+}	NP BAMBI ^{+/+}	Sham BAMBI-/-	NP BAMBI-'-
DAMGO				
Emax	$199 \pm 12{,}6~\%$	$227 \pm 5{,}4~\%$	$196\pm8{,}8~\%$	$219\pm4,8$ %,
pCE50	$6,2 \pm 0,4$	$6.0\pm0,1$	$6,1 \pm 0,2$	$6,1\pm0,1$
DSLET				
Emax	$248 \pm 11{,}7\%$	$251\pm12{,}2~\%$	$265\pm9{,}8~\%$	$238 \pm 10{,}0 \ \%$
pCE50	$5,2\pm0,6$	$5,4\pm0,2$	$5,3 \pm 0,1$	$5,3\pm0,2$
U69593				
Emax	$139\pm6{,}7\%$	$141\pm3{,}6\%$	$143\pm3,5\%$	$136\pm5{,}3\%$
pCE50	$5,4 \pm 0,4$	$5{,}9\pm0{,}3$	$5,7\pm0,2$	$5,3\pm0,5$

Tabla 5. Incremento de la fijación específica de [³⁵S]GTP γ S inducida por los agonistas opioides específicos de los receptores μ (DAMGO), δ (DSLET) y κ (U69593) en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} sometidos (NP) o no (sham) a neuropatía por lesión del nervio ciático. Los valores representan las medias \pm EEM. La pCE50 (-log EC50) y la Emax (% fijación) se obtuvieron mediante un análisis de regresión no lineal.

11 La ausencia de BAMBI potencia la inhibición de la adenilato ciclasa inducida por agonistas de receptores opioides μ, en ratones sometidos a lesión del nervio ciático

Se estudió la capacidad de los agonistas de receptores opioides μ y δ de inhibir la acumulación de AMPc estimulada por forskolina (FK) en homogenizados de membranas de médula espinal en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} sometidos a lesión del nervio ciático durante 14 días. Los experimentos se realizaron en el momento en que los ratones BAMBI^{+/+} mostraban un grado máximo de alodinia, mientras que los BAMBI^{-/-} todavía no habían desarrollado dolor neuropático.

La concentración basal de AMPc (pmol/min/mg proteína) fue similar en los animales BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} (BAMBI^{+/+}: 8,9 ± 0,9; BAMBI^{-/-}: 8,4 ± 1,7). Tampoco hubo diferencias entre genotipos en la acumulación de AMPc inducida por 10⁻⁵M FK (BAMBI^{+/+}= 29,4 ± 3,3; BAMBI^{-/-}= 29,3 ± 7,1). Como se muestra en la figura 27, cuando se incubaron las membranas con el agonista opioide μ , DAMGO (10⁻⁵ M y 10⁻⁴ M), se produjo una inhibición de la formación de AMPc estimulada por FK que alcanzó valores significativamente superiores en los animales BAMBI^{-/-} en comparación con los BAMBI^{+/+} (ANOVA: "Tratamiento": F_(4,25)= 9,2, *p*<0,001). Por otro lado, cuando se incubaron las membranas con el agonista opioide δ , DPDPE (10⁻⁵ M y 10⁻⁴ M), no se apreciaron diferencias en la inhibición de la formación de AMPc inducida por FK entre

los ratones BAMBI^{+/+} y los BAMBI^{-/-} (ANOVA: "Tratamiento": $F_{(4,24)}=$ 1,7, *N.S.*). Los antagonistas opioides selectivos de receptores μ , β -funaltrexamina, y δ , naltrindol, (10⁻⁴M) antagonizaron el efecto de sus respectivos agonistas, indicando la especificidad de las respuestas.



Figura 27. Efecto de la ausencia de BAMBI en la inhibición producida por los agonistas opioides μ (DAMGO) y δ (DPDPE) sobre la acumulación de AMPc estimulada por FK en homogenizados de médula espinal procedente de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}, 14 días tras la lesión del nervio ciático. (BAMBI^{+/+} vs. BAMBI^{-/-}; *p<0,05, ***p<0,001; Prueba de Bonferroni).

12 TGF-β protege frente al desarrollo de dolor neuropático tras la lesión del nervio ciático

Puesto que BAMBI es un antagonista general de las señales mediadas por todos los miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β s, BMPs, activinas, etc., a partir de los resultados precedentes no podemos inferir cuál de los miembros de la superfamilia está implicado de forma específica en el fenotipo antialodínico de los ratones BAMBI^{-/-}. Por ello, en esta parte del trabajo hemos analizado el posible papel protector del propio TGF- β frente al desarrollo de dolor neuropático.

12.1En ratones sometidos a dolor crónico neuropático, el tratamiento con TGF-β1 recombinante atenúa el desarrollo de alodínia mientras que la neutralización de TGF-β con un anticuerpo lo potencia

Hemos evaluado en animales silvestres sometidos a lesión del nervio ciático el papel de TGF- β sobre el desarrollo de alodinia mecánica. Para ello, un grupo de ratones BAMBI^{+/+} fue tratado con salino o TGF- β 1 recombinante (5µg/Kg/día) administrados durante 14 días mediante una minibomba de infusión continua implantada en el momento de la lesión del nervio. Otro grupo de ratones recibió salino o un anticuerpo monoclonal dirigido contra las tres isoformas de TGF- β a la dosis de 0,3 mg cada 3 días durante 2 semanas.

En los ratones tratados con TGF- β 1 recombinante, se redujo el desarrollo de alodinia mecánica en comparación con el grupo tratado con salino (figura 28), siendo el efecto antagonizado por el antagonista opioide inespecífico naloxona (ANOVA de medidas repetidas: "Tratamiento": F_(1,161) = 46,2, *p*<0,001; "Fuerza": F_(7,161) = 67,8, *p*<0,001; "Tratamiento x Fuerza": F_(7,161) = 3,5, *p*<0,01), así como por el antagonista selectivo de receptores μ , β -funaltrexamina. Sin embargo, el antagonista selectivo de receptores δ , apenas modificó la respuesta antialodínica del TGF- β 1.



Figura 28. Desarrollo de alodinia mecánica en respuesta a la lesión del nervio ciático en ratones BAMBI^{+/+} tratados con salino (símbolos negros) o con TGF- β 1 recombinante (símbolos azules) y su antagonismo por naloxona (símbolos verdes). Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. Se muestran las curvas de fuerza-respuesta a los 14 días de la lesión nerviosa. (Salino *vs.* TGF- β 1; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; prueba de Bonferroni).

Por el contrario, el tratamiento crónico con un anticuerpo neutralizante dirigido contra las tres isoformas de TGF- β incrementó el nivel de alodinia mecánica desarrollada (ANOVA de medidas repetidas: "Tratamiento": F_(1,133) = 4,4, *p*<0,05; "Fuerza": F_(7,133) = 43,2, *p*<0,001; "Tratamiento x Fuerza": F_(7,133) = 2,1, *NS*) (figura 29).



Figura 29. Desarrollo de alodinia mecánica en respuesta a la lesión del nervio ciático en ratones BAMBI^{+/+} tratados con salino o con un anticuerpo neutralizante dirigido contra las tres isoformas de TGF- β . Se valoró el porcentaje de respuestas de retirada de la pata provocadas mediante el estímulo con una batería de monofilamentos de von Frey de fuerza creciente. Se muestran las curvas de fuerza-respuesta a los 14 días de la lesión nerviosa. (Salino *vs.* Anticuerpo anti- TGF- β ; **p<0,01; prueba de Bonferroni).

12.2El tratamiento con TGF-β1 recombinante aumenta la expresión de POMC y del receptor opioide μ en médula espinal de ratones sometidos a lesión del nervio ciático y en cultivos celulares de neuroblastoma

Analizamos los niveles de expresión de los genes precursores de POMC y PENK en la médula espinal de ratones silvestres con dolor neuropático y tratados con TGF- β 1 recombinante o con salino. Como se observa en la figura 30, los niveles de ARNm de POMC eran significativamente superiores en los ratones tratados con TGF- β 1 que en los tratados con salino (Salino: 0,3 ± 0.04 *vs*. TGF- β 1: 0,5 ± 0,03, *p*<0,05; prueba t de Student de dos vías). Sin embargo, los niveles de ARNm de PENK no sufrieron cambios tras el tratamiento con TGF- β 1.



Figura 30. Efecto del tratamiento con TGF- β 1 recombinante sobre la expresión génica de los péptidos opioides POMC y PENK en médula espinal de ratones sometidos a dolor neuropático. (Salino vs. TGF- β 1; *p<0,05, Prueba t de Student de dos colas).

En relación con la regulación por TGF- β 1 del sistema opioide endógeno a nivel receptorial, observamos que los niveles de expresión de los genes que codifican el receptor opioide μ y TGF- β 1 se correlacionaron de forma significativa y directa en la médula espinal de los ratones silvestres (figura 31), mientras que no se observó una relación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión génica de TGF- β 1 y de receptores δ . Para comprobar, *in vivo*, la regulación de receptores opioides inducida por TGF- β 1, se cuantificó mediante western blot la densidad de receptores opioides μ y δ en la médula espinal del grupo de ratones tratados con TGF- β 1 recombinante (figura 31). El efecto antialodínico de TGF- β 1 se acompañó de una expresión significativamente superior de receptores opioides μ , en comparación con los animales tratados con salino. Por el contrario, la expresión de receptores δ no se vio modificada.



Figura 31. Efecto del tratamiento con TGF- β 1 recombinante sobre la expresión de receptores opioides μ y δ en la médula espinal de ratones silvestres sometidos a lesión del nervio ciático. Los histogramas representan la expresión proteica de receptores opioides μ (A) y δ (C). Los resultados se expresan como porcentaje de cambio en la densidad óptica observada en los animales tratados con TGF- β 1 respecto a los tratados con salino. (TGF- β 1 vs. Salino; **p<0,01; Prueba t de Student). Se muestran imágenes representativas de western blot. Líneas de regresión entre los niveles de expresión génica de receptores μ (B) y δ (D) y la del el gen codificante de TGF- β 1. Valores del coeficiente de correlación de Pearson's (r) obtenidos mediante análisis de regresión lineal.

Para reforzar la idea de una regulación transcripcional de POMC y receptores μ mediada por TGF- β 1, se estudió el efecto de TGF- β 1 recombinante en cultivos de células de neuroblastoma SH-SY-5Y (figura 32). El tratamiento con TGF- β 1 incrementó significativamente la expresión génica tanto de POMC como de receptores μ , en comparación con las células tratadas con salino [POMC: TGF- β 1 (0,6 ng/ml, 3h): 0,94 ± 0,06 vs. salino, NS; TGF- β 1 (1 ng/ml, 3 h): 1,45 ± 0,09 vs. salino, p<0,01; μ : TGF- β 1 (0,6 ng/ml, 3h): 1,23 ± 0,07 vs. salino, p<0,01; TGF- β 1 (1 ng/ml, 3 h): 1,83 ± 0,2 vs. salino, p<0,001; Prueba t de Student de dos colas] (figura 32).



Figura 32. Efecto de TGF- β 1 recombinante sobre la expresión génica de POMC y de receptores opioides μ en células de neuroblastoma humano SHSY5Y. (Salino *vs.* TGF- β 1; **p<0,01; ***p<0,001; Prueba t de Student de dos vías).

Discusión

Estudios recientes indican que diversos factores de crecimiento y citoquinas inflamatorias juegan un papel fundamental a nivel del sistema nervioso central y en neuronas sensoriales periféricas, orquestando los cambios dinámicos que determinan la sensibilidad dolorosa del individuo a lo largo de la vida. Cada vez es más evidente su función como mediadores y moduladores de la transmisión nociceptiva y de su procesamiento, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Pezet y McMahon, 2006; Yajima y cols., 2005; Julius y Basbaum, 2001; Boucher y cols., 2000).

La superfamilia TGF- β constituye el prototipo de 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 sistema nervioso (Krieglstein y cols., 2011; Unsicker y Krieglstein, 2002; Böttner y cols., 2000). Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la administración por vía intratecal de TGF- β 1 recombinante protege frente al desarrollo de dolor crónico neuropático y revierte la hiperalgesia y alodinia ya instauradas, a través de la inhibición de la respuesta neuroinmune espinal provocada por la lesión de un nervio periférico en ratas (Echeverry y cols., 2009). Estos hallazgos sugieren que miembros de la superfamilia TGF- β juegan un papel relevante en los procesos de plasticidad neural que subyacen al estado de dolor crónico. La posibilidad de interferir con el proceso doloroso modulando la función de estas citoquinas podría suponer la apertura de nuevas perspectivas terapéuticas para el tratamiento de situaciones de dolor crónico patológico, altamente resistentes al tratamiento farmacológico convencional.

En esta tesis doctoral nuestro objetivo se ha dirigido a determinar el papel de las proteínas TGF- β en el control de la percepción dolorosa en condiciones fisiológicas y en modelos de dolor crónico patológico, utilizando como herramienta ratones modificados genéticamente deficientes en BAMBI. El pseudo-receptor BAMBI constituye uno de los mecanismos que regulan la señalización de la familia TGF- β a nivel receptorial. BAMBI es una proteína trasmembranal cuyo dominio extracelular se asemeja estructuralmente al de los receptores tipo I y los substituye en los complejos receptoriales, pero al contrairo de estos, su dominio intracelular carece de actividad serina/treonina quinasa. La formación de Complejos receptoriales entre BAMBI y los receptores de tipo II inhibe la señal de TGF- β ya que la fosforilación de Smads y la subsiguiente transmisión de la señal al interior celular estarían impedidas (Onichtchouk

y cols., 1999). Como era de esperar, los ratones BAMBI^{-/-} mostraron un incremento significativo de proteínas Smad1 y Smad2 fosforiladas en el SNC (corteza cerebral y médula espinal), al igual que sucede en otros tejidos (Villar y cols., 2013). Este incremento de p-Smads es congruente con una señalización canónica dependiente de TGF- β incrementada, consecuencia de su liberación de la acción inhibitoria de BAMBI.

En relación con el fenotipo general de los ratones BAMBI^{-/-}, aunque no son resultados incluidos en esta tesis, en nuestro laboratorio se ha comprobado la ausencia de alteraciones aparentes a simple vista, siendo los animales BAMBI^{-/-} indistinguibles de los silvestres en lo que a sus habilidades sensoriomotoras, actividad locomotora y coordinación motora se refiere. La ausencia en ratones deficientes en BAMBI de alteraciones del desarrollo conducentes a fenotipos macroscópicos o funcionales evidentes también ha sido referida por otro grupo (Chen y cols., 2007).

El primer objetivo de nuestro estudio fue determinar los dominios de expresión de BAMBI en el SNC y periférico. Los resultados obtenidos mediante hibridación *in situ* en secciones de cerebro y médula espinal pusieron de manifiesto la existencia de una elevada expresión de transcritos de BAMBI en regiones estrechamente relacionadas con el control de la transmisión nociceptiva, como son el asta dorsal de la médula espinal, la sustancia gris periacueductal, el tálamo, el hipocampo, la corteza somatosensorial y la corteza cingulada (Todd y Koerber, 2006; Fields, 2000). Los dominios de expresión de BAMBI en el asta dorsal de la médula espinal (y otras regiones cerebrales) mostraron solapamiento con los dominios de diversos receptores de tipo I de miembros de la familia TGF- β como ALK-4/ActRIb, ALK-3/BMPRIa y ALK-6/BMPRIb. Este solapamiento es congruente con la función reguladora de BAMBI sobre la transmisión de señales a través de dichos receptores, y sugiere una implicación funcional de la señalización por TGF- β en esta región (Onichtchouk y cols., 1999).

En un análisis detallado, utilizando inmunofluorescencia con microscopía laser confocal, se puso de manifiesto un patrón de expresión periférica de BAMBI que es coherente con su localización en la membrana neuronal (Onichtchouk y cols., 1999). Nuestros resultados también sugieren una localización preferentemente neuronal de la proteína BAMBI. Así, mediante estudios de inmunofluorescencia en disgregados celulares procedentes de las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal, no se detectaron señales de BAMBI en células con inmunorreactividad positiva para el marcador glial GFAP. La glía satélite de los ganglios dorsales tampoco mostró expresión de BAMBI. Estos hallazgos contrastan con el papel inhibidor de la activación microglial ejercido por TGF- β *in vitro* mostrado recientemente (Spittau y cols., 2013). Sería pues importante confirmar si la expresión de BAMBI también está ausente en células gliales en condiciones de neuroinflamación y microgliosis.

La localización de BAMBI en áreas relevantes en la modulación y transmisión de la información nociceptiva nos sugirió que la familia de factores de crecimiento TGF-ß podría desempeñar un papel relevante en el procesamiento de las señales dolorosas, tanto a nivel central como periférico. Ello nos condujo a valorar en los ratones deficientes en BAMBI el fenotipo relacionado con conductas nociceptivas evocadas por diferentes tipos de estímulos algogénicos, aplicados de forma aguda. Los resultados obtenidos en diferentes pruebas que valoran nocicepción pusieron de manifiesto que la ausencia de BAMBI, y por extensión el aumento de la señalización TGF-β, determina un incremento significativo del umbral nociceptivo. Así, los animales BAMBI^{-/-}, comparados con los silvestres, mostraron un fenotipo hipoalgésico en modelos de dolor agudo, independientemente del estímulo nocivo aplicado, ya fuese térmico (test de la placa caliente y de retirada de la cola), mecánico (test de von Frey) o químico-inflamatorio (test de la formalina). Además, se evidenció que la reducción de la respuesta nociceptiva es dosis-gen sensible, dado que los animales heterocigotos mostraron umbrales nociceptivos intermedios entre los animales silvestres y los deficientes en BAMBI homocigotos. Nuestros hallazgos son consistentes con la hipótesis inicial de esta tesis, y ponen de manifiesto un nuevo mecanismo de control de la transmisión/percepción del dolor nociceptivo fisiológico, que implica a la superfamilia TGF-β.

En la clínica, el dolor nociceptivo que se produce tras un daño tisular tiene funciones defensivas, está autolimitado al periodo de curación y responde bien a los tratamientos con analgésicos convencionales. Sin embargo, el dolor de origen neuropático que aparece tras lesiones neurales es un dolor patológico complejo, que carece de función defensiva, persiste en el tiempo mucho más allá de la curación de la lesión desencadenante y es rebelde a los fármacos convencionales. Como hemos comentado anteriormente, Echeverry y cols. (2009) mostraron que la infusión intratecal de TGF- β 1 recombinante durante 14 días previene el desarrollo de manifestaciones de dolor neuropático tales como la hiperalgesia térmica y alodinia mecánica, tras la lesión del nervio ciático en rata. Lo que es más importante, TGF- β 1 también es capaz de revertir las conductas características del dolor neuropático previamente instauradas. En base a estos hallazgos, nos planteamos determinar la influencia de la deficiencia en BAMBI sobre el desarrollo de dolor neuropático tras una lesión nerviosa. Nuestros resultados demuestran que, en los ratones BAMBI^{-/-}, el desarrollo de alodinia mecánica provocada por la lesión por aplastamiento del nervio ciático está significativamente atenuado durante todo el periodo de seguimiento, en comparación con los animales silvestres. Así, trascurridas dos semanas tras la lesión nerviosa, los animales silvestres mostraban un nivel máximo de alodínia mecánica mientras que en los animales deficientes en BAMBI el umbral nociceptivo era significativamente superior. Este fenotipo antialodínico fue también evidente en otro modelo experimental de mononeuropatia periférica provocada por la denervación parcial del nervio ciático (Spared Nerve Injury) (resultados no mostrados) (Tramullas y cols., 2010).

La intensa expresión de BAMBI en la sustancia gris periacueductal, el asta dorsal de la médula espinal o los ganglios dorsales, áreas del sistema nervioso caracterizadas por su riqueza en péptidos y receptores opioides y que forman parte de los sistemas endógenos de modulación del dolor (Mason, 2005; Hughes y cols., 1975; Pert y Snyder, 1973), nos condujo a postular que los fenotipos hipoalgésico y antialodínico mostrados por los animales BAMBI^{-/-} podrían ser dependientes de la activación del sistema opioide endógeno. Para demostrar nuestra hipótesis, valoramos las consecuencias de la administración del antagonista de receptores opioides no selectivo naloxona antes de someter a los animales BAMBI^{-/-} a las pruebas conductuales de nocicepción. Nuestros resultados muestran que la naloxona revirtió completamente el fenotipo hipoalgésico de los ratones deficientes en BAMBI en las pruebas de dolor agudo con estímulos de cualquier modalidad. Así, en los animales BAMBI^{/-} tratados con naloxona, el umbral nociceptivo en respuesta a estímulos nocivos térmicos y mecánicos alcanzó valores similares a los de los animales silvestres. Del mismo modo, en los ratones sometidos a lesión del nervio ciático la administración de naloxona antes de la realización del test de von Frey redujo drásticamente el umbral nociceptivo frente a estímulos mecánicos de los animales BAMBI^{-/-}, cuya conducta nociceptiva fue idéntica a la de los ratones silvestres. Dicho de otro modo, la naloxona antagonizó la protección frente a la alodínia que les confería la ausencia de BAMBI. La administración de antagonistas opioides selectivos de cada subtipo de receptor opioide puso de manifiesto que el fenotipo antialodínico de los ratones BAMBI^{-/-} es dependiente de la activación de receptores μ y δ , que son los receptores opioides mayoritariamente responsables de la analgesia opioide (Waldhoer y cols., 2004), sin que pudiéramos apreciar la participación de un componente κ .

Nuestros hallazgos nos permiten concluir que la ausencia de BAMBI promueve un incremento de la actividad del sistema opioide endógeno que condiciona una inhibición de las respuestas nociceptivas evocadas independientemente del tipo de estímulo doloroso aplicado (térmico, químico-inflamatorio, mecánico), o de la existencia de remodelado neural patológico de tipo neuropático.

Dado que las respuestas celulares provocadas por la familia TGF-β son consecuencia de los cambios trascripcionales de sus genes diana provocados por sus factores de transcripción efectores, nos planteamos la hipótesis de que la trascripción de los genes codificantes de precursores de péptidos opioides endógenos podría estar bajo el control de esta familia de factores de crecimiento. Los precursores de los péptidos opioides endógenos están codificados por tres genes diferentes: el gen PENK que se traduce en la proteína precursora de encefalinas, el gen PDYN que codifica el precursor de dinorfinas y el gen POMC que da lugar a la proopiomelanocortina, proteína precursora de β-endorfina (Lynch y Snyder, 1986; Udenfriend y Kilpatrick, 1984). Diversos trabajos publicados muestran la capacidad de algunos miembros de la superfamilia TGF-β para regular la transcripción de genes codificantes de péptidos opioides en cultivos celulares de diversos tipos (Nudi y cols., 2005; Kavelaars y Heijnen, 2000; Kamphuis y cols., 1997) y en el núcleo arcuado del hipotálamo *in vivo* (Bouret y cols., 2001).

Con objeto de determinar si los péptidos opioides se comportan como dianas de regulación trascripcional por TGF- β , hemos procedido a un estudio de expresión génica para determinar si existe tal relación entre genes codificantes de péptidos opioides y la familia TGF- β a nivel de la médula espinal. El asta dorsal de la médula espinal es la zona en la que terminan las fibras aferentes nociceptivas primarias, estableciéndose allí la primera sinapsis en las vías de señalización ascendentes que transmiten la información sensitiva de los receptores periféricos hacia el cerebro. Esta región contiene circuitos neuronales locales implicados en la modulación de la información nociceptiva entrante, antes de que esta sea transmitida al cerebro por las neuronas de segundo orden (Todd y Koerber, 2006). Las láminas superficiales del asta dorsal contienen neuronas inhibitorias intrínsecas de naturaleza opioide que expresan encefalinas, dinorfinas y β -endorfina. El asta dorsal también recibe impulsos aferentes β -endorfinérgicos procedentes del núcleo arcuado y del núcleo del tracto solitario (Fields, 2000; Tsou y cols., 1986). En condiciones fisiológicas, los péptidos opioides inhiben las señales nociceptivas entrantes actuando sobre receptores opioides presinápticos localizados en

las terminaciones nociceptivas, y reducen la actividad ascendente actuando sobre receptores opioides postsinápticos, presentes en las neuronas de proyección de las láminas I y II (Pasternak, 2005; Kondo y cols., 2005; Yaksh y cols., 1982). Abundando en este sentido, diversos estudios han mostrado la acción inhibidora de encefalinas y β endorfina liberadas por interneuronas espinales sobre la transmisión de la información nociceptiva en la primera sinapsis sensorial del asta dorsal (Yaksh y cols., 1982). Más aún, la terapia génica medular con POMC o PENK produce analgesia asociada a un incremento en la producción local de β-endorfina o encefalinas por poblaciones específicas de neuronas opioidérgicas espinales (Wu y cols., 2004; Hao y cols., 2003). Además, se ha demostrado que los ratones deficientes en PENK muestran respuestas incrementadas frente a estímulos nociceptivos (König y cols., 1996) y los ratones transgénicos con deficiencia selectiva de β-endorfina no presentan el fenómeno de analgesia inducida por estrés, que está mediada por opioides endógenos (Rubinstein y cols., 1996). En condiciones patológicas, el sistema opioide endógeno se encuentra activado tónicamente como mecanismo compensatorio que se opone al desarrollo de hiperexcitabilidad neuronal provocada por estímulos nocivos (Guan y cols., 2006) y estados de dolor neuropático tras lesiones nerviosas (Mansikka y cols., 2004; Hao y cols., 1998).

Nuestros resultados son congruentes con la idea propuesta, ya que los valores de expresión de ARNm de POMC y PENK, así como los niveles proteicos de POMC y del péptido leu-encefalina, alcanzaron valores significativamente superiores en las médulas de los ratones deficientes en BAMBI que en las de los silvestres. Además, un análisis de regresión lineal puso de manifiesto que la expresión espinal de genes que codifican proteínas precursoras de péptidos opioides se correlacionan de forma directa y significativa con las expresiones génicas de miembros de la familia de TGF- β (TGF- β 1, BMP-2, BMP-7 y activina A) y con las de sus efectores intracelulares de la vía canónica (Smad4) y no canónica (TAK1). Por el contrario, en los animales silvestres, la expresión génica de péptidos opioides es inversamente proporcional a la de BAMBI. Resultados de nuestro grupo, que no forman parte de esta tesis doctoral, muestran que la adición de TGF- β 1, BMP-7 y activina A recombinantes al medio de cultivo modula la expresión de POMC y PENK en explantes de médula espinal (Tramullas y cols., 2010). Así pues, nuestros resultados indican que, en los ratones deficientes en BAMBI, las señales de TGF- β incrementadas provocan un aumento de la transcripción, síntesis y

liberación sináptica de péptidos opioides en la médula espinal. Es importante destacar que en los animales BAMBI^{-/-} con dolor neuropático, la reversión del fenotipo antialodínico provocada por los antagonistas opioides es inmediata. Ello indicaría que la deficiencia en BAMBI no modifica el proceso de plasticidad neuroinmune que subyace al fenómeno neuropático, sino que operaría más bien a través de la potenciación de los sistemas inhibitorios de control del dolor.

Aunque nuestro estudio se ha centrado en mecanismos espinales, no podemos excluir la participación de mecanismos supraespinales y periféricos en las alteraciones en la percepción dolorosa que presentan los ratones BAMBI^{-/-}. La localización de BAMBI en las neuronas de los ganglios dorsales junto con la respuesta atenuada al dolor en el test de la formalina mostrada por los ratones BAMBI^{-/-} podrían indicar una menor excitabilidad y sensibilización de las neuronas sensoriales primarias, cuyo papel en la iniciación y el mantenimiento del dolor crónico es muy relevante (McNamara y cols., 2007; Tjølsen y cols., 1992).

La inhibición de la degradación de los péptidos opioides liberados en las sinapsis mediante fármacos inhibidores de las encefalinasas proporciona analgesia en diversos modelos experimentales de dolor (Jutkiewicz, 2007; Ortega-Alvaro y cols., 1998; Rubinstein y cols., 1996). El inhibidor dual de peptidasas RB101 es un profármaco que combina dos inhibidores de Zn-metalopeptidasas, con actividad encefalinasa, unidos por un puente disulfuro. RB101 atraviesa la barrera hematoencefálica y, una vez en el sistema nervioso, origina dos moléculas que inhiben respectivamente la endopeptidasa neutra y la aminopeptidasa N, dando lugar a una menor degradación de las encefalinas (Jutkiewicz, 2007). La administración sistémica de RB101 promueve una potente acción antinociceptiva, tanto en ratas control como sometidas a modelos de dolor neuropático (Noble y cols., 1992) como consecuencia del incremento de los niveles sinápticos de encefalinas (Noble y Roques, 2007). La sobreexpresión espinal de PENK, administrada en un vector viral, previene la sensibilización nociceptiva postquirúrgica en ratones y su efecto antialodínico es potenciado mediante la administración de RB101 (Cabañero y cols., 2009). En nuestro estudio, la administración sistémica de RB101 potenció significativamente los fenotipos hipoalgésico y antialodínico de los animales BAMBI^{-/-}, siendo el efecto sensible al antagonismo por naloxona. Dado que la potencia analgésica de los inhibidores de encefalinasas ha mostrado ser proporcional a la magnitud de la liberación sináptica de encefalinas (Noble y cols., 1992), nuestros resultados nuevamente apoyan que el incremento de péptidos opioides endógenos es el mecanismo que protege a los ratones BAMBI^{-/-} del desarrollo de alodinia tras la lesión de un nervio periférico.

Nuestro siguiente objetivo fue valorar si el incremento de las señales celulares mediadas por TGF- β , que tienen lugar en los ratones deficientes en BAMBI, tiene consecuencias en la respuesta analgésica inducida por la administración exógena de fármacos opioides de uso clínico, como la morfina. En condiciones de dolor químicoinflamatorio (test de la formalina), la morfina mostró un potente efecto analgésico, como ha sido previamente descrito (Sevostianova y cols., 2003; Dubuisson y Dennis, 1977). Pero lo que es más importante, la analgesia inducida por dosis bajas de morfina fue significativamente superior en los animales deficientes en BAMBI que en los silvestres. Este incremento fue evidente tanto en la primera como en la segunda fase de respuesta nociceptiva tras la administración de formalina. Típicamente, la administración intraplantar de formalina provoca una conducta nociceptiva bifásica; la primera fase se debe a la activación directa de receptores TRPA1 localizados en nociceptores tipo C, mientras que la segunda fase es consecuencia del proceso inflamatorio, y a ella contribuyen la estimulación mantenida de los nociceptores y la hiperexcitabilidad de la neuronas del asta dorsal de la médula (McNamara y cols., 2007; Tjølsen y cols., 1992; Coderre y cols., 1990).

Para valorar el efecto analgésico de la morfina en condiciones de dolor neuropático, utilizamos el modelo de aplastamiento del nervio ciático y dejamos transcurrir el tiempo necesario para que los ratones de ambos genotipos mostraran similar grado de alodinia mecánica. La administración en ese punto evolutivo de dosis crecientes de morfina dio lugar a un escaso efecto analgésico en los animales silvestres; la morfina sólo consiguió elevar el umbral de dolor con la dosis más alta. Esta resistencia relativa a la analgesia opioide ha suscitado en la clínica gran controversia respecto a las indicaciones de uso de esta familia de analgésicos para el tratamiento del dolor de origen neuropático (Noble y cols., 2010). Los hallazgos de este estudio ponen de manifiesto que en los ratones BAMBI^{-/-} el efecto antialodínico de dosis bajas/moderadas de morfina (3 y 6 mg/kg) está significativamente potenciado en relación con los silvestres. Así pues, la deficiencia en BAMBI no solo confiere un fenotipo hipoalgésico y antialodínico mediado por un mecanismo dependiente del sistema opioide endógeno, sino que también incrementa la potencia analgesia de los fármacos opioides exógenos cuando son administrados a los animales sometidos a condiciones de dolor agudo inflamatorio y crónico neuropático.

132

Los mecanismos que podrían justificar el incremento de la respuesta analgésica a la morfina en los animales deficientes en BAMBI son variados. En primer lugar, los péptidos opioides endógenos elevados en los animales BAMBI^{-/-} podrían tener un efecto sinérgico o aditivo con la morfina, tal y como ha sido descrito en la bibliografía. Por ejemplo, durante el estímulo nociceptivo inflamatorio persistente de la pata, provocado por el adyuvante completo de Freund en ratas, se produce un incremento de la liberación sináptica de encefalinas en la región bulbar rostroventromedial. Los péptidos opioides liberados en exceso interactúan de forma sinérgica/aditiva con el opioide exógeno DAMGO (agonista selectivo de receptores μ), dando lugar a una potenciación de su acción antinociceptiva y antihiperalgésica (Hurley y Hammond, 2001). Otro mecanismo posible podría estar en relación con una mayor producción en los animales deficientes en BAMBI de citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10, a consecuencia de la señalización TGF- β incrementada. Se ha demostrado que IL-10, no solo tiene efecto antihiperalgésico y antialodínico, sino que potencia el efecto antinociceptivo de la morfina (Johnston y cols., 2004).

En nuestro estudio, hemos prestado atención a la hipótesis de que un incremento de la señalización TGF- β en ausencia de BAMBI, además de modular presinápticamente el sistema opioide endógeno, podría también ejercer acciones postsinápticas sobre receptores opioides y/o sus vías de señalización. Existen trabajos publicados en los que se refiere una pérdida de eficacia analgésica de los fármacos opioides en animales con dolor neuropático en relación con la reducción de receptores opioides en médula espinal y ganglios dorsales (Obara y cols., 2009, Rashid y cols., 2004; Porreca y cols., 1998). Por el contrario, el aumento en la expresión de receptores opioides se asocia con un incremento del efecto analgésico del agonista correspondiente (Valdizán y cols., 2012; Sirohi y cols., 2007; Cahill y cols., 2003; Díaz y cols., 2002). Es, por tanto, razonable postular que la potenciación del efecto analgésico de la morfina en los animales deficientes en BAMBI, así como la resistencia al desarrollo de alodínia, podrían asociarse a un aumento de la expresión y/o función de los receptores opioides en estos animales.

La regulación de los receptores opioides en modelos experimentales de dolor neuropático es motivo de controversia en la bibliografía. Algunos autores describen un incremento de receptores en la médula espinal, ganglio dorsal y nervio periférico (Bushlin y cols., 2010; Walczak y cols., 2005; Ji y cols., 1995), mientras que otros refieren una disminución (Obara y cols., 2009; Rashid y cols., 2004; Ji y cols., 1995) o

133

ausencia de cambios (Briscini y cols., 2002; Besse y cols., 1992). Otras propuestas son la regulación diferencial de cada tipo de receptor dependiendo del tejido (Üçeyler y cols., 2011) o la regulación bifásica en función del tiempo transcurrido tras la lesión nerviosa, con incrementos receptoriales en los primeros días y disminución a partir del 7º día (Datta y cols., 2010; Obara y cols., 2009; Zhang y cols., 1998; Besse y cols., 1992; Stevens y cols., 1991). Esta diversidad de resultados podría estar en relación con diferencias: a) en el modelo de neuropatía empleado; b) en el punto del curso temporal estudiado; c) en la estructura neural analizada. Lo que ponen de manifiesto estos estudios es el gran desconocimiento del mecanismo regulatorio de los receptores opioides durante el desarrollo del dolor crónico neuropático, el cual merecería ser objeto de atención en los próximos años.

Nuestros resultados indican que los ratones BAMBI^{-/-} presentan un aumento de receptores opioides µ totales en la médula espinal, que se acompaña de un incremento en la capacidad de los agonistas µ para inhibir la producción de AMPc en respuesta a forskolina. A priori, estos resultados están en aparente desacuerdo con los obtenidos en los estudios de fijación de [³⁵S]GTP γ S inducida por agonistas μ , en los que no observamos cambios en el acoplamiento a proteínas G por parte de ninguno de los tres tipos de receptores en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas. Sin embargo, es importante matizar que los estudios de fijación de [35S]GTPγS valoran preferentemente el acoplamiento de los receptores con proteínas Gai/o sensibles a PTX por ser las más abundantes en el SNC, pero no detectan el acoplamiento con proteínas inhibitorias insensibles a PTX, $G\alpha_z$ (Valdizán y cols., 2012; Casey y cols., 1990). En cambio, la inhibición por agonistas de la producción de AMPc inducida por forskolina, refleja la actividad de proteínas G_i sensibles a PTX, y también la de las G_z. Así pues, la ausencia de cambios en los estudios de fijación de $[^{35}S]GTP\gamma S$ no es incompatible con el incremento de la densidad de receptores µ y con el aumento de la inhibición de la AC por agonistas µ que presentan los animales deficientes en BAMBI. Podríamos especular con la posibilidad de un incremento en la capacidad señalizadora a través de proteínas G_z, aunque, evidentemente, son necesarios nuevos estudios dirigidos a confirmar esta hipótesis. No obstante, es interesante señalar que nuestro grupo de investigación describió que un cambio de señalización de Gi/o a Gz asocia un incremento en la eficacia analgésica de los agonistas opioides µ en ratas (Valdizán y cols., 2012; Mostany y cols., 2008). Entre los posibles mecanismos subyacentes se encuentra la formación de dímeros entre receptores μ y δ (Gomes y cols., 2011) ya que se ha descrito que la formación de dímeros μ - δ promueve cambios conformacionales que modifican la vía de señalización activada por cada uno de los monómeros (Gomes y cols., 2011; Ferré y cols., 2009) y que produce una potenciación de las respuestas evocadas por agonistas μ (Stockton y Devi, 2012; Kabli y cols., 2010).

En el caso de los receptores δ , a pesar de que su expresión se encuentra claramente incrementada en la médula espinal de los animales deficientes en BAMBI sometidos a dolor neuropático y que el fenotipo antialodínico de estos animales es antagonizado por naltrindol, un antagonista selectivo de dichos receptores, no hemos observado cambios en su acoplamiento a proteínas G_{i/o}, ni en la capacidad de los agonistas δ para inhibir la actividad de la AC. Estos resultados indican que existen cambios en vías de señalización no relacionadas con la inhibición de la AC asociadas a la activación de dicho receptor y/o en la señalización a través de otras subunidades G_{α} o G_{β_Y} cuyo estudio no ha sido abordado en esta tesis.

BAMBI es un antagonista de las señales mediadas por cualquiera de los miembros de la familia TGF- β , incluyendo TGF- β s, BMPs, activinas, etc. Por lo tanto, a priori, todas estas citoquinas podrían estar implicadas en el fenotipo antialodínico de los animales deficientes en BAMBI. Por ello, en el último bloque de experimentos nos planteamos precisar el papel específico de miembros concretos de la familia, como agentes protectores frente al desarrollo de dolor neuropático, y los mecanismos implicados. Seleccionamos en primer lugar al propio TGF- β 1, ya que ha mostrado una acción antialodínica tras su administración intratecal en ratas sometidas a neuropatía periférica (Echeverry y cols., 2009). Puesto que TGF-\u00b31 atraviesa la barrera hematoencefálica (McLennan y cols., 2005), nos pareció oportuno valorar si su acción analgésica se mantiene cuando se administra por vía sistémica, dada la ventaja que esto supondría. Pudimos comprobar que la infusión subcutánea continua de TGF-^{β1} recombinante, durante un periodo de 14 días, redujo de forma significativa el grado de alodínia mecánica desarrollada por los ratones sometidos a lesión del nervio ciático. Estos resultados indican que no es preciso administrar TGF- β 1 directamente en el LCR para evocar su efecto antialodínico. Además, la contribución de mecanismos periféricos a los efectos de TGF-β podría ser relevante ya que, como hemos descrito en el Estado Actual, varios miembros de la familia TGF- β (principalmente activinas y BMPs) han mostrado efectos pro/antinociceptivos a nivel de los nociceptores (Lantero y cols., 2012). En este sentido, los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que la administración sistémica de un anticuerpo neutralizante, dirigido contra las tres

isoformas de TGF-β (TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3), aumentó significantemente la alodinia mecánica desarrollada tras la lesión del nervio ciático en ratones silvestres. Dado que los anticuerpos no cruzan la barrera hematoencefálica, nuestros resultados apoyan la idea de que TGF- β 1 también ejerce efectos anti-nociceptivos periféricos que contribuirían a atenuar la hipersensibilidad periférica tras la lesión del nervio. El mecanismo por el que TGF- β 1 ejerce sus efectos biológicos a nivel neural ha sido atribuido a sus acciones neuroprotectora y antiinflamatoria (Brionne y cols., 2003; Böttner y cols., 2000) que, en el caso de la neuropatía, disminuirían la respuesta neuroinflamatoria tanto a nivel del asta dorsal (Echeverry y cols., 2009) como en el propio nervio periférico (Echeverry y cols., 2013). Así, en ratas sometidas a lesión del nervio ciático, TGF-\u00df1 inhibe la activación de astrocitos y microglía y, reduce la liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-1ß e IL-6 en la médula espinal (Echeverry y cols., 2009). Además, a nivel del nervio periférico lesionado, la invección local de TGF-β1 reduce la reacción inflamatoria propia de la degeneración Walleriana, reduciendo la infiltración de una subpoblación específica de macrófagos productores de citoquinas inflamatorias (IL-6 y MIP-1a) y de linfocitos T (Echeverry y cols., 2013). Otro mecanismo que se ha implicado en el efecto neuroprotector de TGF-ß es su capacidad de para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica en procesos de inflamación periférica (Ronaldson y cols., 2011; Ronaldson y cols., 2009) o daño neural (Echeverry y cols., 2011). Como consecuencia, se reducirían el acceso al SNC de mediadores inflamatorios y la infiltración medular por células inflamatorias periféricas. En este mecanismo se ha postulado la implicación del receptor ALK 5 y su vía de señalización canónica a través de Smad 2/3 (Ronaldson y cols., 2009).

El conjunto de resultados de esta tesis doctoral en los animales deficientes en BAMBI nos sugirió que, además de la capacidad para interferir con procesos neuroinflamatorios tras la lesión neural, descrita por Echeverry y cols. (2009 y 2013), TGF- β 1 administrado sistémicamente también podría ejercer su acción antialodínica a través de la regulación del sistema opioide endógeno a nivel pre y/o postsináptico. Analizamos, por tanto, en animales sometidos a dolor neuropático los efectos del tratamiento con TGF- β 1 recombinante sobre la expresión de péptidos opioides endógenos y receptores opioides. En consonancia con nuestra hipótesis de partida, TGF- β 1 incrementó significativamente la expresión génica espinal del receptor opioide μ y de POMC, el péptido precursor de su agonista endógeno β -endorfina. Esta regulación trascripcional del sistema de señalización opioide μ fue confirmada en células de neuroblastoma SH-SY-5Y. Así, nuestros resultados *in vitro* pusieron de manifiesto que TGF- β 1 recombinante induce sobreexpresión de receptores μ y de POMC en dichas células. La capacidad de TGF- β 1 para inducir activación trascripcional de receptores opioides μ ya ha sido descrita en células T del timo durante el desarrollo (Zhang y cols., 2012). El tratamiento con TGF- β 1 recombinante no produjo cambios en los niveles de expresión del receptor opioide δ y de PENK, el péptido precursor de sus agonistas mety leu-encefalina, ni en el animal de experimentación, ni en las células SH-SY-5Y en cultivo. Podríamos concluir que la acción de esta citoquina regula pre- y postsinápticamente el sistema de señalización opioide a través de receptores μ de forma selectiva, y que otros miembros de la familia estarían en relación con la señalización δ . Sin embargo, esta interpretación no se concilia con el antagonismo del efecto antialodínico de TGF- β 1 ejercido por el antagonista de receptores δ , naltrindol. En este momento carecemos de una explicación para esta discrepancia neuroquímico-funcional.

Sobre la base de nuestro último bloque de resultados, podemos afirmar que el tratamiento con TGF- β 1 recombinante ejerce una acción antialodínica que es revertida por antagonistas opioides y que este efecto se asocia con un incremento de POMC y de receptores opioides μ en la médula espinal. TGF- β 1 produce efectos neuroquímicos similares *in vitro*. Proponemos, por tanto, que TGF- β 1 es uno de los miembros de esta familia de citoquinas que está implicado en la facilitación pre y postsináptica de la actividad del sistema opioide endógeno.

En conclusión, utilizando como herramienta experimental ratones deficientes en el pseudo-receptor de la superfamilia TGF- β , BAMBI, hemos puesto de manifiesto un papel crítico para la señalización mediada por miembros de esta familia de citoquinas en la percepción nociceptiva, tanto en condiciones fisiológicas de dolor agudo como en la condición patológica de dolor crónico neuropático. La deficiencia en BAMBI confiere un fenotipo hipoalgésico y antialodínico mediado por el sistema opioide endógeno y, además, potencia la analgesia inducida por los fármacos opioides exógenos. Nuestros resultados sugieren que miembros específicos de la familia de TGF- β , los efectores de sus vías de señalización y sus moléculas reguladoras podrían constituir dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos analgésicos que actuarían incrementando la actividad del sistema opioide endógeno.

Conclusiones

- El pseudorreceptor de la superfamilia TGF-β, BAMBI, tiene una localización neuronal en regiones del sistema nervioso central y periférico relevantes en la transmisión y regulación de la percepción nociceptiva.
- Los ratones que carecen de la influencia inhibitoria de BAMBI, muestran una mayor presencia de proteínas Smads fosforiladas en la médula espinal, lo que sugiere una señalización mediada por las proteínas de la superfamilia de TGF-β incrementada.
- La ausencia de BAMBI condiciona un fenotipo hipoalgésico frente a estímulos nociceptivos agudos de tipo térmico, mecánico y químico/inflamatorio, y retrasa el desarrollo de alodinia mecánica en un modelo de dolor patológico crónico de tipo neuropático.
- 4. El fenotipo hipoalgésico y antialodínico de los ratones BAMBI^{-/-} es revertido por fármacos antagonistas opioides, implicando al sistema opioide endógeno.
- 5. A nivel presinático, la ausencia de BAMBI condiciona un incremento en la expresión y liberación de de péptidos opioides en la médula espinal. En consonancia, la inhibición de la degradación de encefalinas mediante el tratamiento con el inhibidor de encefalinasas, RB101, potencia el fenotipo hipoalgésico y antialodínico de los ratones deficientes en BAMBI.
- La expresión espinal de los precursores de opioides endógenos es directamente proporcional a los niveles de expresión de genes que codifican elementos de la vía de señalización de TGF-β.
- 7. Este conjunto de hallazgos nos permite proponer que citoquinas de la superfamilia TGF-β ejercen una modulación presináptica del sistema opioide endógeno, a través del control trascripcional de los péptidos opioides y de su liberación en la sinapsis.
- 8. El efecto analgésico de la morfina está incrementado en los ratones deficientes en BAMBI, tanto en condiciones fisiológicas como de dolor patológico neuropático. Ello sugiere una mayor efectividad postsináptica en la transmisión de la señal opioide. El mecanismo neuroquímico subyacente podría estar ligado al aumento de receptores opioides μ y δ en la médula espinal que, aunque no se

traduce en un acoplamiento más eficaz a proteínas $G\alpha_{i/o}$, se asocia a un incremento en la inhibición de la adenilato ciclasa inducida por agonistas del receptor opioide μ .

- 9. El tratamiento con TGF-β1 recombinante ejerce una acción antialodínica que es revertida por el antagonista opioide naloxona. Este efecto se asocia con un incremento de POMC y de receptores opioides μ en la médula espinal. En cultivos de células de neuroblastoma, TGF-β1 produce efectos neuroquímicos similares. Concluimos que TGF-β1 es uno de los miembros de esta familia de citoquinas que está implicado en la facilitación pre y postsináptica de la actividad opioide.
- 10. Nuestros resultados permiten postular el valor de BAMBI y de la superfamilia TGF-β como dianas terapéuticas potenciales, y podrían constituir el punto de partida para el desarrollo de nuevos analgésicos dirigidos al tratamiento del dolor neuropático que actuarían incrementando la actividad del sistema opioide endógeno.

Bibliografía
- Ai X, Cappuzzello J, Hall AK. «Activin and bone morphogenetic proteins induce calcitonin gene-related peptide in embryonic sensory neurons in vitro.» Mol Cell Neurosci. 14.6 (1999): 506-518.
- Akhurst RJ, Hata A. «Targeting the TGFβ signalling pathway in disease.» Nat Rev Drug Discov. 11.10 (2012): 790-811.
- Aliaga L, Baños JE, De barutell C, Molet J, Rodríguez de la Serna A. Tratamiento del dolor. Teoría y prácrica. 3ª edición. Permanyer, 2009.
- Antsiferova M, Klatte JE, Bodó E, Paus R, Jorcano JL, Matzuk MM, Werner S, Kögel H. «Keratinocyte-derived follistatin regulates epidermal homeostasis and wound repair.» Lab Invest. 89.2 (2009): 131-141.
- Apkarian AV, Hashmi JA, Baliki MN. «Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain.» Pain. 152.3 supl (2011): S49-64.
- Austin PJ, Moalem-Taylor G. «The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines.» J Neuroimmunol. 229.1-2 (2010): 26-50.
- Bamberger C, Schärer A, Antsiferova M, Tychsen B, Pankow S, Müller M, Rülicke T, Paus R, Werner S. «Activin controls skin morphogenesis and wound repair predominantly via stromal cells and in a concentration-dependent manner via keratinocytes.» Am J Pathol. 167.3 (2005): 733-747.
- Baron R, Binder A, Wasner G. «Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment.» The Lancet 9 (2010): 807-819.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. «Cellular and molecular mechanisms of pain.» Cell 139.2 (2009): 267-284.
- Benemei S, Nicoletti P, Capone JG, Geppetti P. «CGRP receptors in the control of pain and inflammation.» Curr Opin Pharmacol. 9.1 (2009): 9-14.
- Besse D, Lombard MC, Perrot S, Besson JM. «Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy.» Neuroscience 50.4 (1992): 921-933.
- 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.» J Comp Neurol 428 (2000): 45–61.
- Bonica, JJ. The Management of Pain. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. «The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions.» J Neurochem. 75.6 (2000): 2227-2240.

- Boucher TJ, Okuse K, Bennett DL, Munson JB, Wood JN, McMahon SB. «Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states.» Science. 290.5489 (2000): 124-127.
- Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. «Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population.» Pain. 136.3 (2008): 380-387.
- Bouret S, Chuoi-Mariot MT, Prevot V, Croix D, Takumi T, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain JC, Mitchell V. «Evidence that TGF beta may directly modulate POMC mRNA expression in the female rat arcuate nucleus.» Endocrinology 142 (2001): 4055–4065.
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T. «Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain.» Neuron. 40.6 (2003): 1133-1145.
- Briscini L, Corradini L, Ongini E, Bertorelli R. «Up-regulation of ORL-1 receptors in spinal tissue of allodynic rats after sciatic nerve injury.» Eur J Pharmacol. 447.1 (2002): 59-65.
- Bushlin I, Rozenfeld R, Devi LA. «Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia.» Curr Opin Pharmacol. 10.1 (2010): 80-86.
- Cabañero D, Célérier E,García-Nogales P, Mata M, Roques BP,Maldonado R, Puig MM. «The pro-nociceptive effects of remifentanil or surgical injury in mice are associated with a decrease in delta-opioid receptor mRNA levels: Prevention of the nociceptive response by on-site delivery of enkephalins.» Pain 141.1 (2009): 88-96.
- Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnell D, Beaudet A. «Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control.» Pain 101.1-2 (2003): 199-208.
- Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. «The role of the immune system in the generation of neuropathic pain.» Lancet Neurol. 11.7 (2012): 629-42.
- Campbell JN, Meyer RA. «Mechanisms of neuropathic pain.» Neuron. 52.1 (2006): 77-92.
- Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. «A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned.» Spine J. 11.6 (2011): 471-491.
- Casey P.J, Fong H.K.W, Simon M.I, Gilman A.G. «Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties.» J. Biol. Chem, 265 (1990): 2383-239.
- Cervero F, Laird JM. «Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events.» J Neurobiol. 61.1 (2004): 45-54.

- Chen J, Bush JO, Ovitt CE, Lan Y, Jiang R. «The TGF-beta pseudoreceptor gene Bambi is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival.» Genesis 45 (2007): 482–486.
- Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. «Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology.» Nat Neurosci. 15.8 (2012): 1063-1067.
- Choi YK, Kim JH, Kim WJ, Lee HY, Park JA, Lee SW, Yoon DK, Kim HH, Chung H, Yu YS, Kim KW. «AKAP12 regulates human blood-retinal barrier formation by downregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha.» J Neurosci. 27.16 (2007): 4472-4481.
- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. «Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection.» Brain Res. 535.1 (1990): 155-158.
- Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M. «T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity.» J Neurosci. 29.46 (2009): 14415-14422.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. «Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage.» Annu Rev Neurosci. 32 (2009): 1-32.
- Cruise BA, Xu P, Hall AK. «Wounds increase activin in skin and a vasoactive neuropeptide in sensory ganglia.» Dev Biol. 27.1 (2004): 1-10.
- Datta S, Chatterjee K, Kline RH 4th, Wiley RG. «Behavioral and anatomical characterization of the bilateral sciatic nerve chronic constriction (bCCI) injury: correlation of anatomic changes and responses to cold stimuli.» Mol. Pain 6.7 (2010).
- Daugé V, Mauborgne A, Cesselin F, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. «The dual peptidase inhibitor RB101 induces a long-lasting increase in the extracellular level of Met-enkephalin-like material in the nucleus accumbens of freely moving rats.» J Neurochem. 67.3 (1996): 1301-1308.
- 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. 7.7 (2008): 24.
- Davies SJ, Shih CH, Noble M, Mayer-Proschel M, Davies JE, Proschel C. «Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury.» PLoS One. 6.3 (2011): e17328.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. «Vanilloid

receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia.» Nature 405.6783 (2000): 183-187.

- Derynck R, Akhurst RJ. «Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease.» Nat Cell Biol. 9.9 (2007): 1000-1004.
- Díaz A, Pazos A, Flórez J, Ayesta FJ, Santana V, Hurlé MA. «Regulation of mu-opioid receptors, G-protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in the rat brain after chronic opioid receptor antagonism.» Neuroscience 112.2 (2002): 345-353.
- 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. 10.1 (2010): 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. 11.6 (2011): 500-505.
- Dubin AE, Patapoutian A. «Nociceptors: the sensors of the pain pathway.» J Clin Invest. 120.11 (2010): 3760-3772.
- 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. 4.2 (1977): 161-174.
- Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J. «Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effect.» Mol Pain 5 (2009): 16.
- Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J. «Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway.» J Neurosci. 31.30 (2011): 10819-10828.
- Echeverry S, Wu Y, Zhang J. «Selectively reducing cytokine/chemokine expressing macrophages in injured nerves impairs the development of neuropathic pain.» Exp Neurol. 240 (2013): 205-218.
- Fields, HL. «Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain.» Prog Brain Res 122 (2000): 245–253.
- Florez, J. El tratamiento farmacológico del dolor. Ars Medica, 2007.
- Fritzmann J, Morkel M, Besser D, Budczies J, Kosel F, Brembeck FH, Stein U, Fichtner I, Schlag PM, BirchmeierW. «A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential.» Gastroenterology 137 (2009): 165–175.
- Glassman SD, Gum JL, Crawford CH 3rd, Shields CB, Carreon LY. «Complications with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in posterolateral spine fusion associated with a dural tear.» Spine J. 11.6 (2011): 522-526.

- González-Maeso J, Rodríguez-Puertas R, Gabilondo AM, Meana JJ. «Characterization of receptor-mediated [35S]GTPgammaS binding to cortical membranes from postmortem human brain.» Eur J Pharmacol. 390 (2000): 25-36.
- Gordon KJ, Blobe GC. «Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease.» Biochim Biophys Acta. 1782.4 (2008): 197-228.
- Grace PM, Rolan PE, Hutchinson MR. «Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain.» Brain Behav Immun. 25.7 (2011): 1322-1332.
- Guan Y, Borzan J, Meyer RA, Raja SN. «Windup in dorsal horn neurons is modulated by endogenous spinal Mu-opioid mechanisms.» J Neurosci 26 (2006): 4298– 4307.
- Hall AK, Ai X, Hickman GE, MacPhedran SE, Nduaguba CO, Robertson CP. «The generation of neuronal heterogeneity in a rat sensory ganglion.» J Neurosci. 17.8 (1997): 2775-2784.
- Hall AK, Burke RM, Anand M, Dinsio KJ. «Activin and bone morphogenetic proteins are present in perinatal sensory neuron target tissues that induce neuropeptides.» J Neurobiol. 52.1 (2002): 52-60.
- Hall AK, Dinsio KJ, Cappuzzello J. «Skin cell induction of calcitonin gene-related peptide in embryonic sensory neurons in vitro involves activin.» Dev Biol. 229.2 (2001): 263-270.
- Hamza MA, Higgins DM, Ruyechan WT. «Two alphaherpesvirus latency-associated gene products influence calcitonin gene-related peptide levels in rat trigeminal neurons.» Neurobiol Dis. 25.3 (2007): 553-560.
- Hao JX, Yu W, Xu XJ. «Evidence that spinal endogenous opioidergic systems control the expression of chronic pain-related behaviors in spinally injured rats.» Exp Brain Res 118 (1998): 259 –268.
- Hao S, Mata M, Goins W, Glorioso JC, Fink DJ. «Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in neuropathic pain.» Pain 102 (2003): 135–142.
- Heger J, Peters SC, Piper HM, Euler G. «SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes.» J Cell Physiol. 220.2 (2009): 515-523.
- Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ. «CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology.» Nat Rev Neurol. 6.10 (2010): 573-582.
- Hofstetter CP, Holmström NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisén J, Olson L. «Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome.» Nat Neurosci. 8.3 (2005): 346-353.

- Hou Q, Barr T, Gee L, Vickers J, Wymer J, Borsani E, Rodella L, Getsios S, Burdo T, Eisenberg E, Guha U, Lavker R, Kessler J, Chittur S, Fiorino D, Rice F, Albrecht P. «Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms.» Pain. 52.9 (2011): 2036-2051.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. «Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity.» Nature. 258.5536 (1975): 577-580.
- Hurley RW, Hammond DL. «Contribution of endogenous enkephalins to the enhanced analgesic effects of supraspinal mu opioid receptor agonists after inflammatory injury.» J Neurosci. 21.7 (2001): 2536-2545.
- Itoh S, ten Dijke P. «Negative regulation of TGF-b receptor/Smad signal transduction.» Curr Opin Cell Biol 19 (2007): 176–184.
- Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. «A new definition of neuropathic pain.» Pain. 121.10 (2011): 2204-2205.
- Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hökfelt T. «Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation.» J Neurosci. 15.12 (1995): 8156-8166.
- Johnston IN, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Frank MG, Zapata V, Campisi J, Langer S, Martin D, Green P, Fleshner M, Leinwand L, Maier SF, Watkins LR. «A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine.» J Neurosci. 24.33 (2004): 7353-7365.
- Julius D, Basbaum AI. «Molecular mechanisms of nociception.» Nature. 413.6852 (2001): 203-210.
- Jutkiewicz, EM. «RB101-mediated Protection of Endogenous Opioids?» CNS Drug Reviews 13.2 (2007): 192–205.
- Kabli N, Martin N, Fan T, Nguyen T, Hasbi A, Balboni G, O'Dowd BF, George SR.
 «Agonists at the δ-opioid receptor modify the binding of μ-receptor agonists to the μ-δ receptor hetero-oligomer.» Br J Pharmacol. 161.5 (2010): 1122-1136.
- Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. «Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor.» Nature. 298.5871 (1982): 245-249.
- Kamphuis S, Kavelaars A, Brooimans R, Kuis W, Zegers BJ, Heijnen CJ. «T helper 2 cytokines induce preproenkephalin mRNA expression and proenkephalin A in human peripheral blood mononuclear cells.» J Neuroimmunol 79 (1997): 91–99.
- Kang JS, Liu C, Derynck R. «New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function.» Trends Cell Biol 19 (2009): 385–394.

- Kavelaars A, Heijnen CJ. «Expression of preproenkephalin mRNA and production and secretion of enkephalins by human thymocytes.» Ann NY Acad Sci 917 (2000): 778 –783.
- Khin SS, Kitazawa R, Win N, Aye TT, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. «BAMBI gene is epigenetically silenced in subset of high-grade bladder cancer.» Int J Cancer 125 (2009): 328 –338.
- 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. 283.12 (2008): 7628-7637.
- Kishigami S, Mishina Y. «BMP signaling and early embryonic patterning.» Cytokine Growth Factor Rev. 16.3 (2005): 265-27.
- Kondo I, Marvizon JC, Song B, Salgado F, Codeluppi S, Hua XY, Yaksh TL. «Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferentevoked substance P release.» J Neurosci 25 (2005): 3651–3660.
- König M, Zimmer AM, Steiner H, Holmes PV, Crawley JN, Brownstein MJ, Zimmer A. «Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in preproenkephalin.» Nature 383 (1996): 535–538.
- Krieglstein K, Zheng F, Unsicker K, Alzheimer C. «More than being protective: functional roles for TGF-β/activin signaling pathways at central synapses.» Trends Neurosci. 34.8 (2011): 421-429.
- 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.
- Lantero A, Tramullas M, Díaz A, Hurlé MA. «Transforming growth factor-β in normal nociceptive processing and pathological pain models.» Mol Neurobiol. 45.1 (2012): 76-86.
- Latremoliere A, Woolf CJ. «Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.» J Pain. 10.9 (2009): 895-926.
- Law PY, Wong YH, Loh HH. «Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling.» Annu Rev Pharmacol Toxicol. 40 (2000): 389-430.
- Le Guen S, Mas Nieto M, Canestrelli C, Chen H, Fournié-Zaluski MC, Cupo A, Maldonado R, Roques BP, Noble F. «Pain management by a new series of dual inhibitors of enkephalin degrading enzymes: long lasting antinociceptive properties and potentiation by CCK2 antagonist or methadone.» Pain 104.1-2 (2003): 139-148.
- Lin Z, Gao C, Ning Y, He X, Wu W, Chen YG. «The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling.» J Biol Chem 283.48 (2008): 33053-8.

- Liu XJ, Zhang FX, Liu H, Li KC, Lu YJ, Wu QF, Li JY, Wang B, Wang Q, Lin LB, Zhong YQ, Xiao HS, Bao L, Zhang X. «Activin C expressed in nociceptive afferent neurons is required for suppressing inflammatory pain.» Brain. 135.Pt 2 (2012): 391-403.
- Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randal R. «Protein measurement with the Folin phenol reagent.» J Biol Chem. 193.1 (1951): 265-275.
- Lynch, D.R., Snyder, S.H. «Neuropeptides: Multiple molecular forms, metabolic pathways, and receptors.» Annu. Rev. Biochem 55 (1986): 773–799.
- Ma W, Quirion R. «Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain.» Expert Opin Ther Targets. 11.3 (2007): 307-320.
- 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. 201.2 (2006): 335-348.
- Maeda S, Kawamoto A, Yatani Y, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. «Gene transfer of GLT-1, a glial glutamate transporter, into the spinal cord by recombinant adenovirus attenuates inflammatory and neuropathic pain in rats.» Mol Pain. 24.4 (2005): 65.
- Mansikka H, Zhao C, Sheth RN, Sora I, Uhl G, Raja SN. «Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice.» Anesthesiology 100 (2004): 912–921.
- Marti E, Gibson SJ, Polak JM, Facer P, Springall DR, Van Aswegen G, Aitchison M, Koltzenburg M. «Ontogeny of peptide- and amine-containing neurones in motor, sensory, and autonomic regions of rat and human spinal cord, dorsal root ganglia, and rat skin.» J Comp Neurol. 266.3 (1987): 332-359.
- Mason, P. «Deconstructing endogenous pain modulations.» J Neurophysiol. 94.3 (2005): 1659-1663.
- Massagué, J. «A very private TGF-beta receptor embrace.» Mol Cell. 129.2 (2008): 149-150.
- Massagué, J. «TGFβ signalling in context.» Nat Rev Mol Cell Biol. 13.10 (2012): 616-630.
- McLennan IS, Weible MW 2nd, Hendry IA, Koishi K. «Transport of transforming growth factor-beta 2 across the blood-brain barrier.» Neuropharmacology. 48.2 (2005): 274-282.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. «TRPA1 mediates formalin-induced pain.» Proc Natl Acad Sci USA 104 (2007): 13525–13530.
- Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN. Peripheral mechanisms of nociception. 5^a edición. Elsevier, 2006.

- Milligan ED, Watkins LR. «Pathological and protective roles of glia in chronic pain.» Nat Rev Neurosci 10 (2009): 23–36.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. «BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk.» Cytokine Growth Factor Rev 16 (2005): 251–263.
- Mostany R, Díaz A, Valdizán EM, Rodríguez-Muñoz M, Garzón J, Hurlé MA. «Supersensitivity to mu-opioid receptor-mediated inhibition of the adenylyl cyclase pathway involves pertussis toxin-resistant Galpha protein subunits.» Neuropharmacology. 54.6 (2008): 989-997.
- Moustakas A, Heldin CH. «The regulation of TGFbeta signal transduction.» Development 136.22 (2009): 3699–3714.
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S. «Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor.» Nature 278.5703 (1979): 423-427.
- Noble F, Roques BP. «Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs.» Expert Opinion on Therapeutic Targets 11.2 (2007): 145-159.
- Noble M, Treadwell JR, Tregear SJ, Coates VH, Wiffen PJ, Akafomo C, Schoelles KM. «Long-term opioid management for chronic noncancer pain.» Cochrane Database Syst Rev. 20.1 (2010): CD006605.
- Noble, Soleihac, Soroca- Lucas, Tur. «Inhibition of the Enkephalin-Metabolizing Enzymes by the First Systemically Active Mixed Inhibitor Prodrug RB 101 Induces Potent Analgesic Responses in Mice and Rats.» the journal of pharmacology and experimental therapeutics 261 (1992): 181-190.
- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. «Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin.» Nature. 295.5846 (1982): 202-206.
- Nudi M, Ouimette JF, Drouin J. «Bone morphogenic protein (Smad)-mediated repression of proopiomelanocortin transcription by interference with Pitx/Tpit activity.» Mol Endocrinol 19 (2005): 1329–1342.
- Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, Przewlocki R. «Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain.» Pain 14.3 (2009): 283-291.
- O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. «Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain.» Pharmacol Rev. 64.4 (2012): 939-971.

- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C. «Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI.» Nature 401 (1999): 480-485.
- Ortega-Alvaro A, Chover-Gonzalez AJ, Lai-Kuen R, Mico JA, Gibert-Rahola J, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Maldonado R. «Antinociception produced by the peptidase inhibitor, RB 101, in rats with adrenal medullary transplant into the spinal cord.» Eur J Pharmacol. 356.2-3 (1998): 139-148.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. «Central modulation of pain.» J Clin Invest. 120.11 (2010): 3779-3787.
- Parikh P, Hao Y, Hosseinkhani M, Patil SB, Huntley GW, Tessier-Lavigne M, Zou H. «Regeneration of axons in injured spinal cord by activation of bone morphogenetic protein/Smad1 signaling pathway in adult neurons.» Proc Natl Acad Sci U S A. 108.19 (2011): E99-E107.
- Pasternak, GW. «Molecular biology of opioid analgesia.» J Pain Symptom Manage 29 (2005): S2–S9.
- 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 430.2 (2001): 250-263.
- Perrot CY, Javelaud D, Mauviel A. «Overlapping activities of TGF-β and Hedgehog signaling in cancer: therapeutic targets for cancer treatment.» Pharmacol Ther. 137.2 (2013): 183-199.
- Pert CB, Snyder SH. «Opiate receptor: demonstration in nervous tissue.» Science. 179.4077 (1973): 1011-1014.
- Pezet S, McMahon SB. «Neurotrophins: mediators and modulators of pain.» Annu Rev Neurosci. 29 (2006): 507-538.
- Porreca F, Tang QB, Bian D, Riedl M, Elde R, Lai J. «Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury.» Brain Res. 795.1-2 (1998): 197-203.
- Przewłocki R, Przewłocka B. «Opioids in chronic pain.» Eur J Pharmacol. 429.1-3 (2001): 79-91.
- Pulskens WP, Rampanelli E, Teske GJ, Butter LM, Claessen N, Lurink IK, van der Poll T,Florquin S, Leemans JC. «TLR4 promotes fibrosis but attenuates tubular damage in progressive renal injury.» J Am Soc Nephrol 21.8 (2010): 1299-1308.
- Rashid MH, Inoue M, Toda K, Ueda H. «Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain.» J Pharmacol Exp Ther 309.1 (2004): 380-387.
- Ronaldson PT, Demarco KM, Sanchez-Covarrubias L, Solinsky CM, Davis TP. «Transforming growth factor-beta signaling alters substrate permeability and

tight junction protein expression at the blood-brain barrier during inflammatory pain.» J Cereb Blood Flow Metab. 29.6 (2009): 1084-1098.

- Ronaldson PT, Finch JD, Demarco KM, Quigley CE, Davis TP. «Inflammatory pain signals an increase in functional expression of organic anion transporting polypeptide 1a4 at the blood-brain barrier.» J Pharmacol Exp Ther. 336.3 (2011): 827-839.
- Roux PP and Blenis J. «ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.» Microbiol Mol Biol Rev 68 (2004): 320–344.
- Rubinstein M, Mogil JS, Japo'n M, Chan EC, Allen RG, Low MJ. «Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis.» Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996): 3995–4000.
- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. «TGF-β/TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions.» Clin Sci (Lond). 121.6 (2011): 233-251.
- Schmierer B, Hill CS. «TGF-β–SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.» Nat Rev Mol Cel Biol 8 (2007): 970-982.
- Scholz J, Woolf CJ. «The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia.» Nature neuroscience 10.11 (2007): 1361-1368.
- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. «TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis.» Nat Med 13 (2007): 1324–1332.
- Sekiya T, Adachi S, Kohu K, Yamada T, Higuchi O, Furukawa Y, Nakamura Y, Nakamura T, Tashiro K, Kuhara S, Ohwada S, Akiyama T. «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 279.8 (2004): 6840-6846.
- Sengupta, S y MK chattopadhyay. «Lowry's method of protein estimation: some more insights.» J Pharm Pharmacol 45.1 (1993): 80.
- Sevostianova N, Zvartau E, Bespalov A, Danysz W. «Effects of morphine on formalininduced nociception in rats.» Eur J Pharmacol. 462.1-3 (2003): 109-113.
- Shi Y, Massagué J. «Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.» Cell 113.6 (2003): 685-700.
- 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 151.2 (2010): 422-429.
- Sirohi S, Kumar P, Yoburn BC. «Mu-opioid receptor up-regulation and functional supersensitivity are independent of antagonist efficacy.» J Pharmacol Exp Ther. 323.2 (2007): 701-707.

- Skaper SD, Giusti P, Facci L. «Microglia and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation.» FASEB J. 26.8 (2012): 3103-3117.
- Spittau B, Wullkopf L, Zhou X, Rilka J, Pfeifer D, Krieglstein K. «Endogenous transforming growth factor-beta promotes quiescence of primary microglia in vitro.» Glia. 61.2 (2013): 283-300.
- Stein C, Machelska H. «Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: implications for pain therapy.» Pharmacol Rev. 63.4 (2011): 860-881.
- Stevens CW, Kajander KC, Bennett GJ, Seybold VS. «Bilateral and differential changes in spinal mu, delta and kappa opioid binding in rats with a painful, unilateral neuropathy.» Pain 46.3 (1991): 315-326.
- Stockton SD Jr, Devi LA. «Functional relevance of μ-δ opioid receptor heteromerization: a role in novel signaling and implications for the treatment of addiction disorders: from a symposium on new concepts in mu-opioid pharmacology.» Drug Alcohol Depend. 121.3 (2012): 167-172.
- Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, Werner S. «Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection.» Mol Cell Endocrinol. 225.1-2 (2004): 127-132.
- Takahashi H, Ikeda T. «Transcripts for two members of the transforming growth factorbeta superfamily BMP-3 and BMP-7 are expressed in developing rat embryos.» Dev Dyn. 207.4 (1996): 439-449.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. «The formalin test: an evaluation of the method.» Pain 51 (1992): 5–17.
- Todd AJ, Koerber R. «Neuroanatomical substrates of spinal nociception.» Wall and Melzack's textbook of pain. London: Elsevier, 2006. 73-90.
- Togo N, Ohwada S, Sakurai S, Toya H, Sakamoto I, Yamada T, Nakano T, Muroya K, Takeyoshi I, Nakajima T, Sekiya T, Yamazumi Y, Nakamura T, Akiyama T. «Prognostic significance of BMP and activin membrane bound inhibitor in colorectal cancer.» World J Gastroenterol 14 (2008): 4880–4888.
- Tramullas M, Lantero A, Díaz A, Morchón N, Merino D, Villar A, Buscher D, Merino R, Hurlé JM, Izpisúa-Belmonte JC, Hurlé MA. «BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation.» J Neurosci. 30.4 (2010): 1502-1511.
- Tsai MJ, Pan HA, Liou DY, Weng CF, Hoffer BJ, Cheng H. «Adenoviral gene transfer of bone morphogenetic protein-7 enhances functional recovery after sciatic nerve injury in rats.» Gene Ther. 17.10 (2010): 1214-1224.
- Tsou K, Khachaturian H, Akil H, Watson SJ. «Immunocytochemical localization of pro-opiomelanocortin-derived peptides in adult rat spinal cord.» Brain Res 378 (1986): 28-35.

- Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J, Gasull X. «TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury.» Mol Pain. 7.30 (2011).
- Úçeyler N, Topuzoğlu T, Schiesser P, Hahnenkamp S, Sommer C. «IL-4 deficiency is associated with mechanical hypersensitivity in mice.» PLoS One. 6.12 (2011): e28205.
- Udenfriend, S., Kilpatrick, D.L. «Proenkephalin and the products of its processing.» Peptides 6 (1984): 25–68.
- Umulis D, O'Connor MB, Blair SS. «The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling.» Development 136 (2009): 3715–3728.
- Unsicker K, Krieglstein K. «TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival.» Adv Exp Med Biol. 513 (2002): 353-374.
- Valdizán EM, Díaz A, Pilar-Cuéllar F, Lantero A, Mostany R, Villar AV, Laorden ML, Hurlé MA. «Chronic treatment with the opioid antagonist naltrexone favours the coupling of spinal cord m-opioid receptors to Gaz protein subunits.» Neuropharmacology 62.2 (2012): 757-764.
- Villar AV, García R, Llano M, Cobo M, Merino D, Lantero A, Tramullas M, Hurlé JM, Hurlé MA, Nistal JF. «BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF-β signaling.» Biochim Biophys Acta. 1832.2 (2013): 323-335.
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. «Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms.» Neuron. 73.4 (2006): 638-652.
- Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P. «Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain.» Neuroscience 132.4 (2005): 1093-1102.
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E. and Whistler, J.L. «Opioid receptors.» Annual Review of Biochemistry 73 (2004): 953-990.
- Wharton K, Derynck R. «TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease.» Development 136 (2009): 3691–3697.
- Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. «Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse.» Genes Dev. 9.17 (1995): 2105-2116.
- Woolf CJ, Ma Q. «Nociceptors--noxious stimulus detectors.» Neuron. 55.3 (2007): 353-364.
- Wu CM, Lin MW,Cheng JT, Wang YM, Huang YW, Sun WZ, Lin CR. «Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats.» Gene Ther 11 (2004): 933–940.

- Xu P, Hall AK. «Activin acts with nerve growth factor to regulate calcitonin generelated peptide mRNA in sensory neurons.» Neuroscience. 150.3 (2007): 665-674.
- Xu P, Hall AK. «The role of activin in neuropeptide induction and pain sensation.» Dev Biol. 299.2 (2006): 303-309.
- Xu P, Van Slambrouck C, Berti-Mattera L, Hall AK. «Activin induces tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation.» J Neurosci 25 (2005): 9227–9235.
- Yagi K, Goto D, Hamamoto T, Takenoshita S, Kato M, Miyazono K. «Alternatively spliced variant of SMAD2 lacking exon 3. Comparison with wild-type SMAD2 and SMAD3.» J Biol Chem 274 (1999): 703–709.
- Yajima Y, Narita M, Usui A, Kaneko C, Miyatake M, Narita M, Yamaguchi T, Tamaki H, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T. «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 (2005): 584-594.
- Yaksh TL, Gross KE, Li CH. «Studies on the intrathecal effect of betaendorphin in primate.» Brain Res 241 (1982): 261–269.
- Yoburn BC, Gomes BA, Rajashekara V, Patel C, Patel M. «Role of G(i)alpha2-protein in opioid tolerance and mu-opioid receptor downregulation in vivo.» Synapse. 47.2 (2003): 109-116.
- Yu LC, Hou JF, Fu FH, Zhang YX. «Roles of calcitonin gene-related peptide and its receptors in pain-related behavioral responses in the central nervous system.» Neurosci Biobehav Rev. 33.8 (2009): 1185-1191.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG. «Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness.» Proc Natl Acad Sci U S A. 95.12 (1998): 7157-7162.
- Zhang L, Belkowski JS, Briscoe T, Rogers TJ. «Regulation of mu opioid receptor expression in developing T cells.» J Neuroimmune Pharmacol. 7.4 (2012): 835-842.
- Zhang L, Hoff AO, Wimalawansa SJ, Cote GJ, Gagel RF, Westlund KN. «Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity.» Pain 89.2-3 (2001): 265-273.
- Zhang, YE. «Non-Smad pathways in TGF-beta signaling.» Cell Res 19 (2009): 128–139.
- Zhao J, Xin X, Xie GX, Palmer PP, Huang YG. «Molecular and cellular mechanisms of the age-dependency of opioid analgesia and tolerance.» Mol Pain. 10 (2012): 38.

- Zhu W, Xu P, Cuascut FX, Hall AK, Oxford GS. «Activin acutely sensitizes dorsal root ganglion neurons and induces hyperalgesia via PKC-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid I.» J Neurosci. 27.50 (2007): 13770-13780.
- Zi Z, Chapnick DA, Liu X. «Dynamics of TGF-β/Smad signaling.» FEBS Lett. 586.14 (2012): 1921-1928.

Zöllner C, Stein C. «Opioids.» Handb Exp Pharmacol. 177 (2007): 31-63.

Publicaciones

Behavioral/Systems/Cognitive

BAMBI (Bone Morphogenetic Protein and Activin Membrane-Bound Inhibitor) Reveals the Involvement of the Transforming Growth Factor- β Family in Pain Modulation

Mónica Tramullas,^{1,2} Aquilino Lantero,^{1,2} Álvaro Díaz,^{1,3,4} Néstor Morchón,¹ David Merino,^{1,2} Ana Villar,^{1,2} Dirk Buscher,⁶ Ramón Merino,^{1,2,3} Juan M. Hurlé,^{1,2} Juan Carlos Izpisúa-Belmonte,^{5,6} and María A. Hurlé^{1,2} ¹Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain, ²Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, 39008 Santander, Spain, ³Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, 39011 Santander, Spain, ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, 39011 Santander, Spain, ⁵Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona, 08003 Barcelona, Spain, and ⁶Salk Institute for Biological Studies, La Jolla,

California 92037

Transforming growth factors- β (TGF- β s) signal through type I and type II serine–threonine kinase receptor complexes. During ligand binding, type II receptors recruit and phosphorylate type I receptors, triggering downstream signaling. BAMBI [bone morphogenetic protein (BMP) and activin membrane-bound inhibitor] is a transmembrane pseudoreceptor structurally similar to type I receptors but lacks the intracellular kinase domain. BAMBI modulates negatively pan-TGF- β family signaling; therefore, it can be used as an instrument for unraveling the roles of these cytokines in the adult CNS. *BAMBI* is expressed in regions of the CNS involved in pain transmission and modulation. The lack of *BAMBI* in mutant mice resulted in increased levels of TGF- β signaling activity, which was associated with attenuation of acute pain behaviors, regardless of the modality of the stimuli (thermal, mechanical, chemical/inflammatory). The nociceptive hyposensitivity exhibited by *BAMBI^{-/-}* mice was reversed by the opioid antagonist naloxone. Moreover, in a model of chronic neuropathic pain, the allodynic responses of *BAMBI^{-/-}* mice also appeared attenuated through a mechanism involving δ -opioid receptor signaling. Basal mRNA and protein levels of precursor proteins of the endogenous opioid peptides *proopiomelanocortin* (POMC) and *proenkephalin* (PENK) appeared increased in the spinal cords of *BAMBI^{-/-}*. Transcript levels of TGF- β s and their intracellular effectors correlated directly with genes encoding opioid peptides, whereas *BAMBI* correlated inversely. Furthermore, incubation of spinal cord explants with activin A or BMP-7 increased *POMC* and/or *PENK* mRNA levels. Our findings identify TGF- β family members as modulators of acute and chronic pain perception through the transcriptional regulation of genes encoding the endogenous opioids.

Introduction

The transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily of cytokines includes activins, TGF- β s, and bone morphogenetic proteins (BMPs). TGF- β s signal through heteromeric combinations of type I receptors, also termed activin-like kinases (ALK), and type II receptors, both of which are serine/threonine kinases (Wrana et al., 1994). Ligand binding leads to downstream propagation of the signal through canonical phosphorylation of Smad proteins, which are translocated into the nucleus to regulate the transcription of TGF- β target genes (Feng and Derynck, 2005; Massagué et al., 2005), as well as through noncanonical signaling, notably via TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) (Yamaguchi et al.,

Received June 2, 2009; revised Dec. 3, 2009; accepted Dec. 8, 2009.

D. Buscher's present address: Cellerix SL, Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2584-09.2010

Copyright © 2010 the authors 0270-6474/10/301502-10\$15.00/0

1995; Zhang, 2009). TGF- β signaling is modulated by BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor), a transmembrane protein that is structurally similar to type I receptors but lacks the intracellular kinase domain. BAMBI acts as a pseudoreceptor that inhibits pan-TGF- β family signaling by preventing the formation of active receptor complexes (Onichtchouk et al., 1999; Yan et al., 2009). BAMBI can also function as a positive regulator of the Wnt/ β -catenin pathway (Lin et al., 2008).

Little is known about the physiological functions regulated by BAMBI or the pathological consequences of an unbalance between BAMBI and TGF- β s. During embryogenesis, *BAMBI* would act as a negative feedback regulator of BMP signaling (Onichtchouk et al., 1999; Tsang et al., 2000), in a context of cooperative function within the *BMP-4* synexpression group (Grotewold et al., 2001; Karaulanov et al., 2004). However, deletion of the BAMBI gene has no apparent phenotypic consequences affecting embryonic development (Chen et al., 2007). BAMBI deregulation has been involved in the pathogenesis of various human pathologies, such as tumor progression and metastatic capability (Togo et al., 2008; Fritzmann et al., 2009; Khin et al., 2009), pathological fibrosis (Seki et al., 2007; Harada et al., 2009), and metaplastic bone formation (Kitazawa et al., 2005).

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación Grant SAF2007-65451, Instituto de Salud Carlos III Grant RD06/0001/1016, and Fundació La Marató de TV3 Grant 072131 (M.A.H.), by Instituto de Salud Carlos III Grant FIS-PI 060240, by Ministerio de Ciencia e Innovación Grant SAF2005-00811 (R.M.), and by the National Institutes of Health and the G. Harold and Leila Y. Mathers Charitable Foundation (J.C.I.-B.). We thank N. García, S. Pérez, M. F. Calderón, and C. Badía for their technical assistance.

Correspondence should be addressed to María A. Hurlé, Departamento Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Avda Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. E-mail: hurlem@unican.es.



Figure 1. Targeted disruption of the BAMBI gene by homologous recombination. *A*, Gene-targeting strategy. Top, Wild-type BAMBI locus showing exons 1–3 (filled boxes). Bottom, Targeting vector in which exons 2 and 3 were replaced with the neomycin (neo) resistance marker. Arrows indicate the position of the primers used for genotyping. *B*, PCR analysis of genomic DNA from $BAMBI^{+/+}$, $BAMBI^{+/-}$, and $BAMBI^{-/-}$ mice. *C*, RT-PCR analysis of *BAMBI* mRNA expression in the brain cortices (Cx) and spinal cords (Sc) of $BAMBI^{+/+}$ and $BAMBI^{-/-}$ mice. GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *D*, Representative Western blot of phosphorylated Smad1 and Smad2 proteins in the spinal cord of $BAMBI^{+/+}$ and $BAMBI^{-/-}$ mice.

The biological processes regulated by the TGF- β family of cytokines in the rodent developing nervous system have been extensively studied (Böttner et al., 2000). In the adult CNS, more or less strong signals for several members and receptors of the TGF- β family are still detectable (Funaba et al., 1997; Mehler et al., 1997; Böttner et al., 2000; Unsicker and Strelau, 2000; Chen et al., 2003; Fan et al., 2003; Mikawa et al., 2006), supporting a role as modulators of neural functions in the adulthood. Among the functions exerted by TGF-Bs in the mature CNS, neuroprotection, neurogenesis, and repair process orchestration are best studied (Brionne et al., 2003; Israelsson et al., 2006; Vivien and Ali, 2006; Ageta et al., 2008). Recently, it has been reported that TGF-B1 alleviates neuropathic pain in rats, and the suggested mechanism involves an inhibitory effect on the spinal cord inflammatory response to nerve injury and a neuroprotective effect on damaged neurons (Echeverry et al., 2009).

In this work, we generated mutant mice, lacking the TGF- β signaling inhibitor BAMBI, to investigate whether the TGF- β family is involved in nociceptive processing under physiological and pathological conditions. Herein, we show that *BAMBI* is expressed in mice nociception-relevant areas and that targeted deletion of *BAMBI* results in attenuation of both acute pain behaviors and neuropathic pain development after nerve injury. The mechanism involves the transcriptional regulation by members of the TGF- β family of genes encoding endogenous opioid peptides.

Materials and Methods

Animals

The experiments were performed in male mice, housed in a room kept at 22°C with and exposed for their whole lifespan to an inverted 12 h light/

dark cycle (dark from 8:00 A.M. to 8:00 P.M.). Food and water were provided *ad libitum*. This study was approved by the Cantabria University Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee, and the experiments were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

Generation of $BAMBI^{-/-}$ mice

Homologous recombination in embryonic stem cells was used to create a 129SvJ imesC57BL/6 mouse line, in which exons 2 and 3 of the BAMBI gene were deleted (Fig. 1A). The remaining exon 1 contains the 5' untranslated region and the first 14 amino acids, which are part of the signaling sequence characteristic of membrane-targeted or -secreted proteins. Mutant mice were backcrossed with C57BL/6 up to the F6 generation. Interbreeding of BAMBI+/- mice resulted in homozygous mutant mice. The experiments were performed in adult (14-16 weeks) BAMBI^{+/+}, BAMBI^{+/-}, and BAMBI-/- mice. Genotyping was performed on genomic DNA extracted from tissue punched from the ear by PCR, following standard protocols with TaqDNA Polymerase (Invitrogen) (Fig. 1B). The primers were designed to amplify a 398 bp fragment containing parts of the deleted region (forward, TGTGAT-AGCGGTTCCCATTGC; reverse, CCAGATA-AAAGTGCTCCTGTCAGC) for the wild-type allele and a 524 bp fragment containing part of

the neomycin cassette (forward, 5'-TTCGCCAATGACAAGACGCT-GG-3'; reverse, 5'-GGACACAAAGAACCCTGGGAAAG-3') for the targeted allele. The existence of *BAMBI* transcripts in the CNS of wild-type mice as well as its absence in *BAMBI*^{-/-} mice was confirmed by reverse transcription (RT)-PCR analyses (Fig. 1*C*). An increase in TGF- β family-mediated signaling in mutant mice, compared with their wild-type littermates, was reflected by the increased expression of phosphorylated Smad-1 and Smad-2 proteins observed in the brain cortex and spinal cord by Western blot analyses (Fig. 1*D*).

General behavior studies

Behavioral studies were performed in 14-week-old mice (n = 8-12 per group) by observers blinded to the genotypes of the animals. Mice sensorimotor functions were evaluated in a battery of tests assessing motor activity, sensorimotor reflexes, equilibrium, and coordination as described previously (Martínez-Cué et al., 2005). Mice performed the behavioral tests during their activity (dark) phase, under dim red light.

Acute pain behavior studies

The warm-water tail-flick test was performed by immersing the tip of the tail (2–3 cm) into the water. The time it took to remove the tail from the water heated to 45, 47, and 49°C was measured (cutoff time, 60 s). In the hotplate test, mice were placed on a 50 or 52°C hotplate, and the delay to hindpaw licking and jump were recorded (cutoff time, 120 s). In the Formalin test, mice received a 20 μ l intraplantar injection of a 2% Formalin solution in the left hindpaw, and the time spent licking the paw was recorded within the first 5 min (first phase) and from 20 to 30 min after injection (second phase). The mechanical withdrawal threshold test was performed by applying an ascending series of calibrated von Frey hairs to the plantar surface of each hindpaw until a withdrawal response was observed. The results are expressed as percentage of paw withdrawals in response to stimuli of increasing strength (0.1–10 g) applied five times

each, and 50% of responses is considered the mechanical withdrawal threshold (in grams). All tests were performed with 8–12 animals per group.

Chronic neuropathic pain behavior studies

Sciatic nerve crush injury. To induce the development of neuropathic pain, mice were subjected to sciatic nerve crush injury (Bester et al., 2000) under inhalation anesthesia with isoflurane (induction, 3%; surgery, 1.5%). The left common sciatic nerve was exposed via blunt dissection through the biceps femoris muscle. The nerve was isolated from surrounding connective tissue at the midthigh level and crushed for 7 s using smooth forceps. The muscle and skin layers were closed under aseptic conditions. Control cohorts (sham-operated mice) underwent the same surgical procedure, but the nerve was exposed and left intact. The time course of neuropathic pain development, manifested as mechanical hypersensitivity and tactile allodynia (painful responses to normally innocuous stimuli), was assessed by the application of von Frey filaments to the plantar surface of the hindpaw before surgery and at days 3, 7, 10, 14, and 18 after crush injury of the sciatic nerve. A series of mice, subjected to sciatic injury for 14 d, were treated with either the nonselective opioid antagonist naloxone (NLX) (1 mg/kg; Sigma) or the selective antagonists of μ -opioid [β -funaltrexamine (β -FNA); 15 mg/kg; Tocris Bioscience], δ-opioid (naltrindole; 10 mg/kg; Tocris Bioscience), and κ-opioid [norbinaltorphimine (nor-BNI); 10 mg/kg; Tocris Bioscience] receptors before measuring mechanical responsiveness to von Frey filaments.

Spared nerve injury model of neuropathic pain. An additional set of experiments was performed using the "spared nerve injury" (SNI) model (Decosterd and Woolf, 2000) of neuropathic pain. Mononeuropathy was induced according to the method originally described in the rat (Decosterd and Woolf, 2000) and reproduced in the mouse (Bourquin et al., 2006). Mice were anesthetized with isoflurane (induction, 3%; surgery, 1.5%). The left common sciatic nerve was blunt dissected through the biceps and femoris muscle, freed of connective, and the three peripheral branches (sural, common peroneal, and tibial nerves) of the sciatic nerve were exposed. The tibial and common peroneal nerves were ligated and transacted together. The sural nerve was carefully preserved by avoiding any nerve stretch or nerve contact with surgical tools. The muscle and skin layers were closed under aseptic conditions. Control cohorts (sham-operated mice) underwent the same surgical procedure, but the sciatic nerve was exposed and left intact. The time course of mechanical allodynia-like behavior was measured in the non-injured sural nerve skin territory from days 1 to 15 after surgery by the application of von Frey filaments.

In situ hybridization

In situ hybridization studies were performed, as described previously (Zuzarte-Luís et al., 2004), in paraformaldehyde-fixed CNS coronal sections (100 μ m) using digoxigenin-labeled antisense RNA probes of the BAMBI, ALK-3/BMPRIa, ALK-4/ActRIb, and ALK-6/BMPRIb genes. The specificity of labeling was established using sense riboprobes. Reactions were developed with BM Purple AP substrate (Roche).

Immunohistochemistry and immunofluorescent staining

Immunohistochemical staining was performed in formaldehyde-fixed, paraffin-included spinal cord sections of 6 μ m thickness. Antigen retrieval was performed by heating the slides immersed in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate and 0.05% Tween 20, pH 6.0) for 5 min in a pressure boiler. Sections were incubated overnight at 4°C with a goat anti-BAMBI polyclonal primary antibody (1:25; R & D Systems), followed by a 60 min incubation at room temperature with a peroxidase-conjugated secondary antibody. Slides were developed using diaminobenzidine (Sigma) as chromogen. Omission of primary or secondary antibodies completely abolished specific staining.

For immunofluorescent staining, the animals were perfused, under deep pentobarbital anesthesia, with 3.7% paraformaldehyde in PBS (freshly prepared). Dorsal horn spinal cord and dorsal root ganglion fragments were removed from 300 μ m sections and washed in PBS. Each tissue fragment was transferred to a drop of PBS on a siliconized slide, and squash preparations of dissociated neurons and glia were performed following the procedure reported previously (Pena et al., 2001). Then, the samples were sequentially treated with 0.5% Triton X-100 in PBS for 30 min, PBS for 10 min two times, and 0.01% Tween 20 in PBS for 10 min. The samples were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody anti-BAMBI (1:50; Abnova) and rabbit anti-glial fibrillary acid protein (GFAP) polyclonal antibody (1:200; Dako), followed by 60 min incubation at room temperature in the specific secondary antibodies conjugated with FITC or Texas Red (Jackson ImmunoResearch). 4',6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) was also used as a nuclear counterstain (1:1000; Sigma). Omission of primary or secondary antibodies completely abolished specific staining.

RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time PCR

Total RNA from tissue was obtained by TRIzol extraction (Invitrogen). One microgram of the isolated RNA was reverse transcribed into cDNA with an RT-PCR kit (Fermentas), according to the instructions of the manufacturer. Quantitative, real-time PCR was conducted on an MX-3000P Stratagene thermocycler using specific TaqMan expression assays (Applied Biosystems) and Universal PCR Master Mix (Takara). Results were normalized to the housekeeping genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase or ribosomal 18S subunit expression and measured in parallel in each sample. Results are expressed as $\Delta\Delta$ Ct. Duplicate transcript levels were determined in three independent experiments.

Western blot

Whole-cell lysates were prepared from the cerebral cortices, hippocampus, and spinal cords. Equal amounts of whole-cell protein were resolved on 12.5% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The following primary antibodies were used: anti-phospho-Smad-2 (1:1000; catalog #3101; Cell Signaling Technology); anti-phospho-Smad-1 (1:1000; a gift from Dr. C. H. Heldin, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala University, Uppsala, Sweden), and anti-proopiomelanocortin (POMC) (1:1000; ab32893; Abcam). Immunoreactivity was detected with GE Healthcare ECL Advanced detection reagents and visualized by GE Healthcare Hyperfilm-ECL. Films were scanned, and optical densities were determined by using the Scion Image software (Scion Corporation).

Radioimmunoassay

After decapitation, the spinal cords of the mice were extracted by hydroextrusion and immediately frozen in liquid nitrogen. Peptides were extracted as described. Radioimmunoassay (RIA) of Leu-enkephalin and Dynorphin A was performed using commercial kits (Phoenix Pharmaceuticals), following the recommendations of the manufacturer. Each sample was assayed in triplicate.

Spinal cord explants stimulation

Mice were anesthetized and decapitated. The spinal cord was extracted by hydro-extrusion (De Sousa and Horrocks, 1979) and dissected through the middle line to obtain two hemi-spinal cords. Each hemi-spinal cord was placed onto a Millicell-CM culture plate (Millipore Corporation) and inserted into a six-well plate. Spinal cords were incubated for 1 h in 1.5 ml of DMEM (Sigma) with or without recombinant BMP-7 (20 ng/ml; R & D Systems) or activin (20 ng/ml; R & D Systems), in a humidified atmosphere of 5% CO₂, at 37°C. Each hemi-spinal cord served as the control for its complementary half. RNA isolation, retrotranscription to cDNA, and real-time PCR were performed as described previously.

Data analysis and statistics

Behavioral experiments were conducted blindly as to the genotype of the mice. All results are presented as mean \pm SEM. Statistical differences between genotypes were analyzed with one-way, two-way, or repeated-measures ANOVA, followed by Bonferroni's test. Individual time points were analyzed with unpaired *t* test. For all analyses, *p* < 0.05 was considered significant.

Results

Regional distribution of BAMBI in the nervous system

Representative *in situ* hybridization images at the mesencephalic and spinal cord levels are presented in Figure 2, *A* and *B*. Strong

Tramullas et al. • TGF-β Family Involvement in Pain Modulation



Figure 2. In situ hybridization showing the distribution of BAMBI mRNA in the spinal cord (A) and brain (B) and type I receptors ALK-4 (C), ALK-3 (D), and ALK-6 (E) mRNA in the spinal cord. One-hundredmicrometer coronal sections were hybridized with digoxigenin-labeled riboprobes. Immunohistochemical staining evidenced the presence of BAMBI immunoreactivity in the superficial layers of the spinal cord dorsal horn (F). Representative immunofluorescence images from squash preparations of dissociated neurons and glia from dorsal horn (G-G'') and dorsal root ganglion (H-H''). The nuclei were counterstained with DAPI (G, H). BAMBI immunoreactivity (green) was detected in some neurons within dorsal horn (G') with negligible presence in astrocytes stained (red) with GFAP (G''). In dorsal root ganglion, BAMBI signal was present in neurons (H') but absent in their surrounding satellite glial cells. Confocal high-magnification immunofluorescence images indicate a peripheral expression pattern of BAMBI immunoreactivity (H''), consistent with its transmembrane localization. HP, Hippocampus; PG, mesencephalic periaqueductal gray; DH, dorsal horn of the spinal cord.

labeling levels of *BAMBI* were detected in the cingulate, retrosplenial and piriform cortex, the CA1, CA2, and CA3 hippocampal fields, the dentate gyrus, the posterior thalamic nuclei, the lateral hypothalamic area, the substantia nigra, the ventral tegmental area, the periaqueductal gray matter, and the dorsal horn of the spinal cord. The expression of *BAMBI* in dorsal horn overlaps with several type I receptors for TGF- β family members, such as ALK-3, ALK-4, and ALK-6 (Fig. 2*C*–*E*). Control experiments, using sense riboprobes, showed no signal (data not shown).

As observed for *BAMBI* transcripts, immunohistochemical staining evidenced the presence of BAMBI immunoreactivity in the superficial layers of the spinal cord dorsal horn (Fig. 2*F*). Immunofluorescence performed in squash preparations of dissociated neurons and glia evidenced that BAMBI immunoreactivity is located preferentially in neurons (Fig. 2*G'*). High levels of BAMBI immunoreactivity were also detected in virtually all dorsal root ganglion neurons (Fig. 2*H'*,*H''*) but were absent in their surrounding satellite glial cells. High-magnification confocal immunofluorescence images (Fig. 2*H''*) disclosed a peripheral expression pattern of BAMBI immunoreactivity, consistent with its transmembrane localization.

Lack of BAMBI has no effect on general behavior

Mutant mice were fertile, appeared healthy, showed no apparent phenotypic defects, and displayed longevity that was indistinguishable from wild-type littermates. Their sensorimotor abilities, locomotor activity, and coordination, measured in the open field and the rotarod tests, were similar to those of wild-type (data not shown).

Lack of BAMBI reduces basal nocifensive responses in thermal, mechanical, and chemical/inflammatory tests of acute pain

We examined the behavioral responses of $BAMBI^{-/-}$ mice to noxious thermal (n = 12 per group), chemical/inflammatory (n = 8 per group), and mechanical (n = 12 per group) stimuli tests (Vierck, 2006). Two models of thermal nociception were used: the warm-water tail-immersion test that examines spinalmediated responses, and the hotplate test that examines both spinal and supraspinal-mediated responses. In the tail-immersion test, $BAMBI^{-/-}$ mice experienced a significantly greater delay in tail withdrawal than the wild-type mice at 45, 47, and 49°C (Fig. 3*A*). Furthermore, there was a gene-dosage dependence of the response, because the reaction time of the $BAMBI^{+/-}$ mice occurred between wild-type and knock-out mice (Fig. 3*B*). The delays in licking behavior and jumping from a hotplate set at 50°C (Fig. 3*C*) and 52°C were also significantly longer in $BAMBI^{-/-}$ mice than in their wild-type littermates.

The effect of BAMBI deletion on chemical pain behavior was assessed in the Formalin test. Injection of Formalin into the hindpaw induces a biphasic pain response; the first phase is thought to result from direct activation of TRPA1 cation channel in primary afferent sensory neurons, whereas the second phase has been proposed to reflect the combined effects of afferent input and activity-dependent sensitization of CNS neurons within the dorsal horn (Coderre et al., 1990; Tjølsen et al., 1992; McNamara et al., 2007). Intradermal injection of Formalin into the hindpaw produced the typical biphasic paw-licking behavior in wild-type and $BAMBI^{-/-}$ mice; however $BAMBI^{-/-}$ mice showed a signif-



Figure 3. Responses to acute painful stimuli. *A*, Warm-water tail-flick assay assessed at 45, 47, and 49°C. *B*, Effect of the pretreatment with NLX (1 mg/kg, i.p.) on tail-flick latencies. *C*, Hotplate licking and jump latencies at 50°C. *D*, Cumulative time spent licking the hindpaw after subcutaneous injection of Formalin (20 μ l of 2% Formalin) into the plantar surface from 0 –5 min (first phase) and 20 –30 min after injection (second phase). *E*, Mechanical stimulation test (von Frey monofilaments). Values are the percentage of hindpaw withdrawals in response to stimuli of increasing strength. *F*, Effect of NLX (1 mg/kg, i.p.) on the mechanical sensitivity threshold. Note that, after naloxone treatment, *BAMBI*^{-/-} mice showed a normalization in the withdrawal response to both thermal and mechanical stimuli, whereas no changes were evident in wild-type mice. Data are means ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 versus *BAMBI*^{+/++} mice (two-tailed Student's *t* test).

icantly reduced pain behavior during both the early (acute) and the second (tonic) phases of the test (Fig. 3*D*).

In the von Frey test of mechanical sensitivity, which depends on the firing of mechanosensitive $A\delta$ -fibers and polymodal C-fibers, the hindpaw-withdrawal response to stimulation at graded intensities of force was less pronounced in $BAMBI^{-/-}$ mice than in the wild-type mice (Fig. 3*E*). The gene-dosage dependence of the mechanically induced paw response was also evident (Fig. 3*F*).

These results indicate the involvement of TGF- β s in nociceptive processing, regardless of the modality of the noxious stimuli (thermal, mechanical, and chemical/inflammatory).

Lack of BAMBI attenuates the expression of neuropathic pain responses

We assessed the potential involvement of BAMBI in chronic pain behaviors in two models of neuropathic pain that mimics peripheral nerve injury in humans: the crush injury of sciatic nerve (Bester et al., 2000) and the spared nerve injury (Decosterd and Woolf, 2000; Bourquin et al., 2006).

In the crush injury of sciatic nerve model, we evaluated the nocifensive response to the hindpaw tactile mechanical stimulation at graded intensities of stimuli for 18 d after crush (n = 10per group). Wild-type mice displayed a progressive and significant decrease in the paw-withdrawal threshold, starting at day 7 and reaching the maximal allodynic response 14 d after crush. ANOVA indicated that BAMBI^{-/-} mice were significantly less sensitive to mechanical stimuli compared with the wild-type group throughout the follow-up period (ANOVA; genotype: $F_{(1,90)} = 39.9, p < 0.001$; time: $F_{(5,90)} = 48.9, p < 0.001$; genotype × time: $F_{(5,90)} = 6.8, p < 0.001$). In Figure 4 (top), we show representative graphs showing the reduced nocifensive responses of BAMBI^{-/-} mice to hindpaw mechanical stimulation, at graded intensities of force on day 14 after injury compared with their wild-type littermates (genotype: $F_{(1,69)} = 80.7$, p < 0.001; nerve injury: $F_{(1,69)} = 97.1$, p < 0.001; genotype × nerve injury: $F_{(1,69)} = 25.0, p < 0.001$).

In the spared nerve injury model of neuropathic pain (n = 7-9 animals per group) *BAMBI*^{-/-} mice also exhibited a lower degree of mechanical allodynia than their wild-type littermates as indicated two-way ANOVA (genotype: $F_{(1,104)} = 90.8$, p < 0.001; nerve injury: $F_{(1,104)} = 199.3$, p < 0.001; genotype × nerve injury: $F_{(1,104)} = 13.1$, p < 0.001) (Fig. 5).

The opioid antagonist naloxone reverses thermal and mechanical hyposensitivity in *BAMBI*^{-/-} mice

The presence of BAMBI transcripts in the dorsal horn of the spinal cord and the periaqueductal gray matter, paradigmatic areas in which the endogenous opioidergic system plays a key role in processing nociceptive information (Fields, 2000), directed us to examine whether the reduced sensitivity to pain in the mutant mice was linked to an opioid-mediated mechanism. For this purpose, a series of mice (n = 10 per group) were pretreated with the nonselective opioid receptor antagonist naloxone (1 mg/kg, i.p.) 30 min before performing the warm-water tail-immersion and von Frey tests. After naloxone treatment, BAMBI-/mice showed a normalization in the withdrawal response to both thermal and mechanical stimuli, whereas no changes were evident in wild-type mice; thus, both groups of animals became equally responsive to pain (Fig. 3B, F). These results indicate that the endogenous opioid system is involved in the reduced nocifensive responses to painful stimuli displayed by BAMBI^{-/-} mice under basal conditions.

The anti-allodynic phenotype of $BAMBI^{-/-}$ mice involves δ -opioid receptor activity

Fourteen days after sciatic nerve injury (Fig. 4, bottom), when maximal differences in neuropathic pain-related behaviors between genotypes were evident, naloxone administration (n = 10 per group) triggered mechanical hypersensitivity and allodynia in $BAMBI^{-/-}$ mice but did not influence significantly the nociceptive response in the wild-type group (genotype: $F_{(1,69)} = 16.6, p < 0.001$; NLX treatment: $F_{(1,69)} = 11.5, p < 0.01$; genotype × treatment: $F_{(1,69)} = 4.5, p < 0.05$). To further define the opioid receptor subtype(s) responsible for the anti-allodynic phenotype, a series of $BAMBI^{-/-}$ mice, subjected to sciatic nerve injury for 14 d, were



Figure 4. Development of neuropathic pain in response to crush injury of sciatic nerve. Representative graphs showing the behavioral manifestations of neuropathic pain (mechanical allodynia) evaluated with the von Frey monofilaments, on day 14 after nerve injury and the effect of naloxone pretreatment before performing the von Frey test. Values are the mean \pm SEM percentage of hindpaw withdrawals elicited by mechanical stimuli of increasing strength, in wild-type (top graph) and *BAMBI^{-/-}* (bottom graph) mice subjected to sham operation (triangles) or sciatic nerve injury (circles). Two-way ANOVA indicates that *BAMBI^{-/-}* mice were significantly less sensitive to mechanical stimuli compared with their wild-type littermates. Naloxone treatment (filled circles) before performing the mechanical test, on day 14 after nerve injury triggered mechanical allodynia in *BAMBI^{-/-}* mice, whereas no significant changes in mechanical sensitivity were evidenced in wild-type mice.

pretreated with selective antagonists of the different opioid receptor types, 60 min before analyzing the development of mechanical hypersensitivity. Subsequently, mice received a dose of naloxone to evaluate the degree of antagonism reached with each drug. As shown in Figure 6, the δ -selective antagonist naltrindole fully reversed the anti-allodynic phenotype ($F_{(1,67)} = 490$, p < 0.001), whereas the μ -opioid (β -FNA; $F_{(1,67)} = 48.5$, p < 0.001) and κ -opioid (nor-BNI; $F_{(1,67)} = 4.7$, p < 0.05) selective antagonists were barely effective.

Spared nerve injury (SNI)



Figure 5. Development of neuropathic pain in response to spared nerve injury. Representative graphs showing the behavioral manifestations of neuropathic pain (mechanical allodynia) evaluated with the von Frey monofilaments, on day 14 after SNI surgery in $BAMBI^{-/-}$ (filled circles) and wild-type (filled squares) mice. Values are the mean \pm SEM percentage of hindpaw withdrawals elicited by mechanical stimuli of increasing strength, in wild-type (triangles) and $BAMBI^{-/-}$ mice (circles), subjected to sham operation (open symbols) or SNI surgery (filled symbols). Two-way ANOVA indicates that $BAMBI^{-/-}$ mice were significantly less sensitive to mechanical stimuli compared with their wild-type littermates. Note also the difference in mechanical sensitivity between sham-operated $BAMBI^{+/+}$ and $BAMBI^{-/-}$ mice.

Basal expression of POMC mRNA and protein, as well as proenkephalin mRNA and the derived opioid peptide Leu-enkephalin, is increased in *BAMBI*^{-/-} spinal cord

Given the regulatory function exerted by TGF- β s on gene transcription, we analyzed whether the spinal cord expression levels of genes encoding endogenous opioid peptides was affected by BAMBI deletion. Our results indicated that the basal level of *POMC* mRNA, the gene codifying for β -endorphin, was 2.46 \pm 0.30-fold (95% confidence level, 1.63–3.29; *p* = 0.022, two-tailed *t* test) higher in the $BAMBI^{-/-}$ mice (n = 5) than in the wild type (n = 5). We also observed a 1.64 \pm 0.11-fold increase (95%) confidence level, 1.32–1.97; p = 0.007, two-tailed t test) in the basal level of proenkephalin (PENK) mRNA, the gene codifying for enkephalins, in BAMBI^{-/-} mice compared with wild-type mice. Conversely, the basal level of prodynorphin (PDYN) mRNA, the gene codifying for dynorphins, was similar in both genotypes. To assess that increased transcription is translated to the protein level, we determined by Western blot or RIA the expression levels of the different opioid peptides. Spinal expression levels of POMC protein, determined by Western blot, and Leu-enkephalin, measured by RIA, were higher in BAMBI-'than in wild-type mice (POMC: +43.8 \pm 11.9%, p = 0.034; PENK: +44.2 \pm 9.0%, *p* = 0.011). No differences between genotypes were observed in the spinal cord concentration of dynorphin, measured by RIA (data not shown).

As shown in Table 1, the spinal cord expression levels of genes encoding POMC, PENK, and PDYN were significantly and inversely related to *BAMBI* expression, whereas directly correlated with the mRNA levels of various TGF- β family members (TGF- β 1, activin, and BMP-7) and with representative intracellular



Figure 6. Effects of specific opioid antagonists on neuropathic pain behavior in $BAMBI^{-/-}$ mice. Representative graphs showing the behavioral manifestations of neuropathic pain (mechanical allodynia) evaluated with von Frey monofilaments, on day 14 after sciatic nerve crush injury (triangles), and the effect of pretreatment with selective opioid antagonists before

effectors from the TGF-B canonical (common SMAD4) and alternative (TAK1) signaling pathways (Wrana et al., 1994). These results led us to test whether exogenously administered recombinant TGF-Bs influence transcriptional regulation of POMC and PENK under basal conditions. For this purpose, explanted spinal cords from wild-type mice were cultured in the presence of recombinant activin A (20 ng/ml) or BMP-7 (20 ng/ml) for 1 h, and POMC and PENK expression levels were assessed by quantitative RT-PCR. Because the TGF- β members acting physiologically on the spinal cord remain to be identified, we selected activin A and BMP-7 because they signal through the two different major Smad pathways in TGF-B superfamily signaling: activin/TGF-Bspecific R-Smads (Smads 2 and 3) or BMP-specific R-Smads (Smads 1, 5, and 8). One hour incubation of spinal cord explants with activin A or BMP-7 significantly increased POMC mRNA levels [activin A: 2.7-fold vs untreated (95% confidence level, 1.57–3.38; two-tailed *t* test, p = 0.039); BMP-7: 1.74-fold vs untreated (95% confidence level, 1.63–1.84; two-tailed t test, p =0.0001)]. Also, PENK mRNA levels increased significantly in explants incubated with BMP-7 versus untreated (1.64-fold; 95% confidence level: 1.32–1.97; two-tailed *t* test; p = 0.0079).

Discussion

To unravel novel roles for TGF- β s in the adult CNS, we have examined the expression pattern and the function of BAMBI, a pseudoreceptor that modulates negatively pan-TGF-*β* family signaling (Onichtchouk et al., 1999). We show that BAMBI transcripts are abundant in several CNS areas critically involved in pain processing (Fields, 2000; Todd and Koerber, 2006), such as the cingulate cortex, the mesencephalic periaqueductal gray, and the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn. The presence of BAMBI protein and its preferential location in neurons was confirmed on the former structure by immunohistochemistry. At the peripheral level, in the dorsal root ganglion, BAMBI was also detected in virtually all sensory neurons but was absent in their satellite glia. The location of BAMBI expression is indicative of a role for TGF- β family members in nociceptive regulation, both central and peripherally. This suggestion is further supported by a recent report showing the antiallodynic effect exerted by recombinant TGF- β 1 in a rat model of neuropathic pain (Echeverry et al., 2009). Thus, we aimed to assess possible changes in the responsiveness to painful stimuli, under conditions of enhanced TGF- β signaling. This objective directed us to develop a mutant mouse lacking BAMBI. As we expected, the absence of the inhibitory influence of BAMBI in knock-out mice resulted in increased levels of representative downstream effectors of the TGF- β signaling pathway, such as the phosphorylated forms of Smad1 and Smad2 transcription factors, in some regions of the CNS. Our first behavioral analyses was the absence in BAMBI^{-/-} mice of phenotypic defects, affecting general motor and sensory functions, which could constitute confounding factors to interpret pain behaviors. Nevertheless, it should be noted that backcrossing to the sixth generation could be insufficient for complete abolition of potential "hitchhiking donor gene" confounds (Gerlai, 1996).

performing the von Frey test (open circles). The antagonistic effect achieved by subsequent naloxone administration is also shown (filled circles). Values are the mean \pm SEM percentage of hindpaw withdrawals elicited by mechanical stimuli of increasing strength. The selective antagonist of δ -opioid receptors, naltrindole (top graph), fully reversed the anti-allodynic phenotype of *BAMBI*^{-/-} mice, whereas the μ -opioid (β -FNA) and κ -opioid (nor-BNI) selective antagonists were much less effective.

Table 1. Pearson's correlation coefficient values (*R*) obtained from the linear regression analyses correlating spinal cord mRNA expression levels of TGF-*β*1, BMP-2, BMP-7, activin, SMAD4, TAK1, and BAMBI with the expression of genes encoding POMC, PENK, and PDYN

	TGF-β1		BMP-2		BMP-7		Activin		SMAD-4		ТАК-1		RAMRI
	WT	КО	WT	КО	WT	КО	WT	КО	WT	КО	WT	КО	WT
РОМС	0.65**	0.54*	0.47*	0.48*	0.57*	0.75***	0.54*	0.72***	0.30	0.67**	0.41	0.72***	-0.62*
PENK	0.76***	0.65**	0.69**	0.65**	0.80***	0.71***	0.58*	0.63**	0.64**	0.80***	0.73***	0.70***	-0.51*
PDYN	0.71***	0.72***	0.75***	0.80***	0.68***	0.83***	0.61**	0.68**	0.39	0.68***	0.45*	0.77***	-0.54*

WT, Wild type; KO, knock-out. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001.

When acute pain paradigms were tested, we observed that the absence of *BAMBI* conditioned lower nociception-related responses, regardless of the modality of the noxious stimuli used (thermal, mechanical, and chemical/inflammatory). There was gene-dosage dependence in the nocifensive responses to thermal and mechanical stimuli, as indicated by the behavior of the heterocygotes. Thus, the nocifensive responses of $BAMBI^{-/-}$ mice to noxious stimuli are consistent with the hypothesized role for TGF- β s in controlling physiological pain perception under basal conditions. Interestingly, the opioid antagonist naloxone was able to reverse the pain-related behaviors of $BAMBI^{-/-}$ mice to that of wild-type controls, indicating that the hypoalgesia exhibited by $BAMBI^{-/-}$ mice under basal conditions can be attributed to an enhanced endogenous opioid tone.

In the chronic and pathological neuropathic pain model, our results indicate that, in $BAMBI^{-/-}$ mice, the release of TGF- β signaling from the inhibitory influence of BAMBI also attenuated pain hypersensitivity and allodynia induced by sciatic nerve injury over a follow-up period of 18 d. This anti-allodynic phenotype of $BAMBI^{-/-}$ mice was also evidenced in another model of peripheral mononeuropathy, such as the spared nerve injury. These results are in agreement with the aforementioned data of Echeverry et al. (2009) showing that chronic (14 d) intrathecal infusion of recombinant TGF-β1 prevented the development of allodynia and reversed previously established neuropathic pain in rats. The mechanism proposed by the authors involves an inhibitory effect on the spinal cord inflammatory response to nerve injury exerted by TGF-B1. In our study, naloxone completely restored the attenuated allodynic response of $BAMBI^{-/-}$ mice to that of wild type, suggesting that TGF- β signaling is critical in controlling the expression of abnormal nociceptive responses subsequent to nerve injury, by a mechanism fully dependent on ongoing opioid receptor activation. The results obtained with selective opioid antagonists indicate that the anti-allodynic phenotype is mainly dependent on δ -receptor activity.

The expression of BAMBI in dorsal horn overlaps with several type I receptors for TGF- β family members, such as ALK-3, ALK-4, and ALK-6, suggesting a functional implication of TGF- β signaling in this region. It is well known that the dorsal horn of the spinal cord is the zone in which nociceptive primary afferent axons terminate, establishing the first synapse in the ascending pathways that convey the sensory information from peripheral receptors to the brain. It contains local neuronal circuits that are involved in modulating incoming nociceptive information before its transmission up to the brain (Todd and Koerber, 2006). The superficial laminae of the dorsal horn contains intrinsic opioid inhibitory interneurons that express enkephalin, dynorphin, and β -endorphin and also receives afferent β -endorphinergic input from the arcuate and tractus solitarius nuclei (Tsou et al., 1986; Fields, 2000). Under physiological conditions, these opioid peptides exert an inhibitory control on the incoming nociceptive through receptors located both presynaptically on nociceptor

terminals and postsynaptically on intrinsic dorsal horn neurons (Yaksh et al., 1982; Kondo et al., 2005; Pasternak, 2005). Under pathological conditions, the endogenous opioidergic system has been reported to counteract the development of neuronal hyper-excitability after intense noxious drive (Guan et al., 2006) and neuropathic pain-related states after nerve injury (Hao et al., 1998; Mansikka et al., 2004).

The precursors of endogenous opioid peptides are encoded by three different genes: the PENK gene that is translated into the protein precursor of enkephalins, the PDYN gene that encodes dynorphins, and the POMC gene that gives rise to β -endorphin. Our results indicate that basal levels of POMC mRNA and POMC protein, as well as PENK gene and the opioid peptide enkephalin, are higher in the spinal cords of BAMBI^{-/-} mice than in those of wild type. Furthermore, the spinal cord expression levels of genes encoding precursor proteins of the opioid peptides directly correlated with members of the TGF- β family and with their intracellular effectors Smad4 and TAK1, whereas the relationship with BAMBI was inversely proportional. These results suggest that an increased transcriptional activity of endogenous opioids is likely mediating the reduced nociceptive responses in the absence of BAMBI. This interpretation is also supported by the transcriptional regulatory effect exerted by recombinant BMP-7 and activin A on POMC and PENK genes, in spinal cord explants. These results are consistent with previous reports showing in vitro that members of the TGF- β family regulate the transcription of genes coding for the endogenous opioid peptides in a variety of human and rodent cell preparations (Kamphuis et al., 1997; Kavelaars and Heijnen, 2000; Nudi et al., 2005), and in vivo (Bouret et al., 2001).

Many studies support an antinociceptive action of enkephalins and β -endorphin by negatively modulating transmission of nociceptive information at the spinal level (Yaksh et al., 1982). Furthermore, POMC and PENK gene delivery to spinal cord dorsal horn induces analgesia, which is associated with increased production of β -endorphin or enkephalin by specific subsets of spinal neurons (Hao et al., 2003; Wu et al., 2004). In addition, it has been demonstrated that mice deficient in PENK showed exaggerated behavioral responses to painful stimuli (König et al., 1996). Also, transgenic mice, with a selective deficiency of β -endorphin, lack the opioid-mediated (naloxone reversible) analgesia induced by stress (Rubinstein et al., 1996). Therefore, our data suggest that hypoalgesic-related responses in mice lacking BAMBI is attributable to an increased tonic activation of opioid receptors by their endogenous ligands. Particularly, the antiallodynic phenotype is mainly dependent on δ -receptor signaling, which would be consistent with the relatively high affinity of enkephalins for this receptor (Dhawan et al., 1996).

Although our study was focused on spinal mechanisms, we cannot exclude the contribution of supraspinal and peripheral mechanisms in the altered pain processing displayed by $BAMBI^{-/-}$ mice. In fact, BAMBI localization in dorsal root ganglion neurons and the reduced pain behavior of $BAMBI^{-/-}$ mice in the Formalin test could point to a reduction in the excitability and postinjury

1510 • J. Neurosci., January 27, 2010 • 30(4):1502-1511

sensitization of primary sensory neurons (Tjølsen et al., 1992; McNamara et al., 2007) that play important roles in the initiation and maintenance of persistent pain.

Our present results and those of Echeverry et al. (2009) suggest that members of the TGF- β family modulate negatively pain perception under physiological and pathological conditions. However, the opposite response has been described for activin A that is released during peripheral inflammation, acting on sensory nerve terminals to increase the expression of calcitonin-gene related peptide in dorsal root ganglion neurons and leading to enhanced pain responses (Xu et al., 2005). In addition, subcutaneous injection of activin A induced immediate thermal hyperalgesia in rats, through a mechanism involving acute sensitization of TRPV1, which suggests a role for activin A in injury-induced hyperalgesia (Zhu et al., 2007). The extremely variable cellular responses elicited by many TGF-B superfamily members, depending on cell type and stimulation context, could account for these antagonic effects, and the contribution of each of these mechanisms to nociception deserves further investigation.

In conclusion, the absence of BAMBI unravels a critical role for TGF- β signaling in nociceptive perception under physiological and neuropathic pathological conditions, through a mechanism involving transcriptional regulation of the opioid peptides. Moreover, our results suggest that specific members of the TGF- β family, their signaling effectors, and modulator molecules could be used as therapeutic targets for the design of novel analgesic drugs that may act by increasing the activity of the endogenous opioid system.

References

- Ageta H, Murayama A, Migishima R, Kida S, Tsuchida K, Yokoyama M, Inokuchi K (2008) Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. PLoS ONE 3:e1869.
- Bester H, Beggs S, Woolf CJ (2000) Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. J Comp Neurol 428:45–61.
- Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor- β s: structure, signalling, and roles in nervous system development and functions. J Neurochem 75:2227–2240.
- Bouret S, Chuoi-Mariot MT, Prevot V, Croix D, Takumi T, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain JC, Mitchell V (2001) Evidence that TGF beta may directly modulate POMC mRNA expression in the female rat arcuate nucleus. Endocrinology 142:4055–4065.
- Bourquin AF, Süveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I (2006) Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. Pain 122:14.e1–14.
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T (2003) Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. Neuron 40:1133–1145.
- Chen HL, Lein PJ, Wang JY, Gash D, Hoffer BJ, Chiang YH (2003) Expression of bone morphogenetic proteins in the brain during normal aging and in 6-hydroxydopamine-lesioned animals. Brain Res 994:81–90.
- Chen J, Bush JO, Ovitt CE, Lan Y, Jiang R (2007) The TGF-beta pseudoreceptor gene Bambi is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival. Genesis 45:482–486.
- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R (1990) Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. Brain Res 535:155–158.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. Pain 87:149–158.
- De Sousa BN, Horrocks LA (1979) Development of rat spinal cord. I. Weight and length with a method for rapid removal. Dev Neurosci 2:115–121.
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. Pharmacol Rev 48:567–592.

Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J (2009) Transform-

Tramullas et al. • TGF-β Family Involvement in Pain Modulation

ing growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. Mol Pain 5:16.

- Fan X, Xu H, Cai W, Yang Z, Zhang J (2003) Spatial and temporal patterns of expression of Noggin and BMP4 in embryonic and postnatal rat hippocampus. Brain Res Dev Brain Res 146:51–58.
- Feng XH, Derynck R (2005) Secificity and versatility in TGF- β signaling through smads. Annu Rev Cell Dev Biol 21:659–693.
- Fields HL (2000) Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. Prog Brain Res 122:245–253.
- Fritzmann J, Morkel M, Besser D, Budczies J, Kosel F, Brembeck FH, Stein U, Fichtner I, Schlag PM, Birchmeier W (2009) A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential. Gastroenterology 137:165–175.
- Funaba M, Murata T, Fujimura H, Murata E, Abe M, Torii K (1997) Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain. J Neuroendocrinol 9:105–111.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? Trends Neurosci 19:177–181.
- Grotewold L, Plum M, Dildrop R, Peters T, Rüther U (2001) Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. Mech Dev 100:327–330.
- Guan Y, Borzan J, Meyer RA, Raja SN (2006) Windup in dorsal horn neurons is modulated by endogenous spinal μ-opioid mechanisms. J Neurosci 26:4298–4307.
- Hao JX, Yu W, Xu XJ (1998) Evidence that spinal endogenous opioidergic systems control the expression of chronic pain-related behaviors in spinally injured rats. Exp Brain Res 118:259–268.
- Hao S, Mata M, Goins W, Glorioso JC, Fink DJ (2003) Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in neuropathic pain. Pain 102:135–142.
- Harada K, Sato Y, Ikeda H, Isse K, Ozaki S, Enomae M, Ohama K, Katayanagi K, Kurumaya H, Matsui A, Nakanuma Y (2009) Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. J Pathol 217:654–664.
- Israelsson C, Lewén A, Kylberg A, Usoskin D, Althini S, Lindeberg J, Deng CX, Fukuda T, Wang Y, Kaartinen V, Mishina Y, Hillered L, Ebendal T (2006) Genetically modified bone morphogenetic protein signalling alters traumatic brain injury-induced gene expression responses in the adult mouse. J Neurosci Res 84:47–57.
- Kamphuis S, Kavelaars A, Brooimans R, Kuis W, Zegers BJ, Heijnen CJ (1997) Thelper 2 cytokines induce preproenkephalin mRNA expression and proenkephalin A in human peripheral blood mononuclear cells. J Neuroimmunol 79:91–99.
- Karaulanov E, Knöchel W, Niehrs C (2004) Transcriptional regulation of BMP4 synexpression in transgenic *Xenopus*. EMBO J 23:844–856.
- Kavelaars A, Heijnen CJ (2000) Expression of preproenkephalin mRNA and production and secretion of enkephalins by human thymocytes. Ann NY Acad Sci 917:778–783.
- Khin SS, Kitazawa R, Win N, Aye TT, Mori K, Kondo T, Kitazawa S (2009) BAMBI gene is epigenetically silenced in subset of high-grade bladder cancer. Int J Cancer 125:328–338.
- Kitazawa S, Kitazawa R, Obayashi C, Yamamoto T (2005) Desmoid tumor with ossification in chest wall: possible involvement of BAMBI promoter hypermethylation in metaplastic bone formation. J Bone Miner Res 20:1472–1477.
- Kondo I, Marvizon JC, Song B, Salgado F, Codeluppi S, Hua XY, Yaksh TL (2005) Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferentevoked substance P release. J Neurosci 25:3651–3660.
- König M, Zimmer AM, Steiner H, Holmes PV, Crawley JN, Brownstein MJ, Zimmer A (1996) Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. Nature 383:535–538.
- Lin Z, Gao C, Ning Y, He X, Wu W, Chen YG (2008) The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/ beta-catenin signaling. J Biol Chem 283:33053–33058.
- Mansikka H, Zhao C, Sheth RN, Sora I, Uhl G, Raja SN (2004) Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. Anesthesiology 100:912–921.
- Martínez-Cué C, Rueda N, García E, Davisson MT, Schmidt C, Flórez J (2005) Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. Behav Brain Res 163:174–185.

Tramullas et al. • TGF-β Family Involvement in Pain Modulation

- Massagué J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. Genes Dev 19:2783–2810.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM (2007) TRPA1 mediates formalin-induced pain. Proc Natl Acad Sci U S A 104:13525–13530.
- Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, Kessler JA (1997) Bone morphogenetic proteins in the nervous system. Trends Neurosci 20:309–317.
- Mikawa S, Wang C, Sato K (2006) Bone morphogenetic protein-4 expression in the adult rat brain. J Comp Neurol 499:613–625.
- Nudi M, Ouimette JF, Drouin J (2005) Bone morphogenic protein (Smad)mediated repression of proopiomelanocortin transcription by interference with Pitx/Tpit activity. Mol Endocrinol 19:1329–1342.
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. Nature 401:480–485.
- Pasternak GW (2005) Molecular biology of opioid analgesia. J Pain Symptom Manage 29:S2–S9.
- Pena E, Berciano MT, Fernandez R, Ojeda JL, Lafarga M (2001) Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. J Comp Neurol 430:250–263.
- Rubinstein M, Mogil JS, Japón M, Chan EC, Allen RG, Low MJ (1996) Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking β -endorphin by site-directed mutagenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 93:3995–4000.
- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF (2007) TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. Nat Med 13:1324–1332.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992) The formalin test: an evaluation of the method. Pain 51:5–17.
- Todd AJ, Koerber R (2006) Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: Wall and Melzack's textbook of pain, Ed 5 (McMahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 73–90. London: Elsevier.
- Togo N, Ohwada S, Sakurai S, Toya H, Sakamoto I, Yamada T, Nakano T, Muroya K, Takeyoshi I, Nakajima T, Sekiya T, Yamazumi Y, Nakamura T, Akiyama T (2008) Prognostic significance of BMP and activin membranebound inhibitor in colorectal cancer. World J Gastroenterol 14:4880–4888.
- Tsang M, Kim R, de Caestecker MP, Kudoh T, Roberts AB, Dawid IB (2000) Zebrafish nma is involved in TGFbeta family signaling. Genesis 28:47–57.
- Tsou K, Khachaturian H, Akil H, Watson SJ (1986) Immunocytochemical

localization of pro-opiomelanocortin-derived peptides in adult rat spinal cord. Brain Res 378:28–35.

- Unsicker K, Strelau J (2000) Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. Eur J Biochem 267:6972–6975.
- Vierck Jr CJ (2006) Animal models of pain. In: Wall and Melzack's textbook of pain, Ed 5 (McMahon SB, Koltzenburg M), pp 175–186. London: Elsevier.
- Vivien D, Ali C (2006) Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders. Cytokine Growth Factor Rev 17:121–128.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature 370:341–347.
- Wu CM, Lin MW, Cheng JT, Wang YM, Huang YW, Sun WZ, Lin CR (2004) Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. Gene Ther 11:933–940.
- Xu P, Van Slambrouck C, Berti-Mattera L, Hall AK (2005) Activin induces tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation. J Neurosci 25:9227–9235.
- Yaksh TL, Gross KE, Li CH (1982) Studies on the intrathecal effect of betaendorphin in primate. Brain Res 241:261–269.
- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. Science 270:2008–2011.
- Yan X, Lin Z, Chen F, Zhao X, Chen H, Ning Y, Chen YG (2009) Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit TGF- β signaling. J Biol Chem 284:30097–30104.
- Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. Cell Res 19:128-139.
- Zhu W, Xu P, Cuascut FX, Hall AK, Oxford GS (2007) Activin acutely sensitizes dorsal root ganglion neurons and induces hyperalgesia via PKCmediated potentiation of transient receptor potential vanilloid I. J Neurosci 27:13770–13780.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16:109–110.
- Zuzarte-Luís V, Montero JA, Rodriguez-León J, Merino R, Rodríguez-Rey JC, Hurlé JM (2004) A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. Dev Biol 272:39–52.

Se incluye la referencia y el enlace de siguiente artículo, al no contar con la autorización del editor para la difusión de la versión publicada a través de esta tesis.

<u>Transforming Growth Factor-β in Normal Nociceptive Processing and Pathological Pain</u> <u>Models</u> Aquilino Lantero, Mónica Tramullas, Alvaro Díaz, María A. Hurlé

Molecular Neurobiology, February 2012, Volume 45, Issue 1, pp 76-86 DOI 10.1007/s12035-011-8221-1

http://link.springer.com/article/10.1007/s12035-011-8221-1

Neuropharmacology 62 (2012) 757-764

ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neuropharmacology



journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Chronic treatment with the opioid antagonist naltrexone favours the coupling of spinal cord μ -opioid receptors to $G\alpha_z$ protein subunits

Elsa M. Valdizán^{a,b,c,1}, Alvaro Díaz^{a,b,c,1}, Fuencisla Pilar-Cuéllar^{a,b,c}, Aquilino Lantero^{a,d}, Ricardo Mostany^{a,2}, Ana V. Villar^{a,d}, María L. Laorden^e, María A. Hurlé^{a,d,*}

^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), 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 e Investigación Marqués de Valdecilla IFIMAV, 39011 Santander, Cantabria, Spain

^e Grupo de Farmacología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, Spain

A R T I C L E I N F O

Article history: Received 23 March 2011 Received in revised form 3 August 2011 Accepted 19 August 2011

Keywords: Opioid antagonist Opioid receptors G-protein Adenylyl cyclase Constitutive activity Inverse agonism

ABSTRACT

Sustained administration of opioid antagonists to rodents results in an enhanced antinociceptive response to agonists. We investigated the changes in spinal μ -opioid receptor signalling underlying this phenomenon. Rats received naltrexone (120 μ g/h; 7 days) via osmotic minipumps. The antinociceptive response to the µ-agonist sufentanil was tested 24 h after naltrexone withdrawal. In spinal cord samples, we determined the interaction of $\mu\text{-}receptors$ with $G\alpha$ proteins (agonist-stimulated $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding and immunoprecipitation of $[^{35}S]$ GTP γ S-labelled G α subunits) as well as μ -opioid receptor-dependent inhibition of the adenylyl cyclase (AC) activity. Chronic naltrexone treatment augmented DAMGOstimulated [35S]GTPYS binding, potentiated the inhibitory effect of DAMGO on the AC/cAMP pathway, and increased the inverse agonist effect of naltrexone on cAMP accumulation. In control rats, the inhibitory effect of DAMGO on cAMP production was antagonized by pertussis toxin (PTX) whereas, after chronic naltrexone, the effect became resistant to the toxin, suggesting a coupling of µ-receptors to PTX-insensitive $G\alpha_{z}$ subunits. Immunoprecipitation assays confirmed the transduction switch from $G\alpha_{i/0}$ to $G\alpha_{z}$ proteins. The consequence was an enhancement of the antinociceptive response to sufentanil that, in consonance with the neurochemical data, was prevented by $G\alpha_z$ -antisense oligodeoxyribonucleotides but not by PTX. Such changes in opioid receptor signalling can be a double-edged sword. On the one hand, they may have potential applicability to the optimisation of the analgesic effects of opioid drugs for the control of pain. On the other hand, they represent an important homeostatic dysregulation of the endogenous opioid system that might account for undesirable effects in patients chronically treated with opioid antagonists.

This article is part of a Special Issue entitled 'Post-Traumatic Stress Disorder'.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Opioid drugs produce their pharmacological effects by interacting with specific G-protein-coupled receptors (namely μ -, δ - and κ -opioid receptors) (Snyder and Pasternak, 2003). The functional interaction of opioid receptors with the pertussis toxin (PTX)– sensitive G $\alpha_{i1,2,3}$ and G α_0 transducers as well as PTX-resistant G α_z

* Corresponding author. Dpto. Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Avda Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. Tel.: +34 942 20 19 81; fax: +34 942 20 19 03. has been clearly demonstrated in heterologous expression systems, neural cell lines and in the CNS (Chan et al., 1995; Chalecka-Franaszek et al., 2000; Tso and Wong, 2000). In animal models, evidence that $G\alpha_{i1,2,3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$ and $G\alpha_q$ can contribute to μ -opioid signalling and antinociception was provided by studies using PTX, specific antisera or antisense oligodeoxyribonucleotides against specific G-protein subunits and null transgenic mouse strains (Sanchez-Blazquez et al., 1995, 2001; Standifer et al., 1996; Garzón et al., 1998; Hendry et al., 2000; Yang et al., 2000; Yoburn et al., 2003; Mostany et al., 2008; Lamberts et al., 2011). In addition to the specificity of receptor-G-protein coupling, different selective agonists for a specific receptor can induce different modes of ligand-receptor interaction, and the particular activation pattern of G-protein subtypes determines the intrinsic activity of the agonist for the elicited biological response (Garzón et al., 1998; Sanchez-Blazquez et al., 2001; Valdizan et al., 2010).

Abbreviations: AC, Adenylyl cyclase; DAMGO, Tyr-D-Ala-Gly-Me-Fe-Gly-olenkephalin; FK, Forskolin; ODN, oligodeoxyribonucleotides; PTX, Pertussis toxin.

E-mail address: hurlem@unican.es (M. A. Hurlé).

¹ Contributed equally.

² Present address: Department of Neurology, David Geffen School of Medicine at University of California, Los Angeles, California 90095.

^{0028-3908/\$ —} see front matter \odot 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.029

One of the best-characterised effector systems linked to the opioid receptor signalling cascade is the adenyl cyclase (AC)/cAMP pathway (Law et al., 2000). Following receptor activation, opioid drugs exert an inhibitory effect on AC activity through $G\alpha_i$ subunits, resulting in reduced cAMP production (George et al., 2000; Laugwitz et al., 1993; Mostany et al., 2008). The AC/cAMP pathway has long been known to play a crucial role in the processing of painful stimuli, and studies have demonstrated an important role of several AC isoforms in inflammatory and neuropathic pain models, as well as in opioid-induced analgesia (see Pierre et al., 2009).

Chronic treatment with opioid ligands (agonists and antagonists) as well as other non-opioid drugs (for example, calcium channel blockers) critically modifies, quantitatively and qualitatively, opioid receptor signalling. This modification results in important changes in the pharmacological potency, efficacy and intrinsic activity of opioid drugs as well as in the quality of the elicited response (Bannister and Dickenson, 2010; Chang et al., 2007; Diaz et al., 2000; Dierssen et al., 1990; Gullapalli and Ramarao, 2002; Hurlé et al., 2000; Mostany et al., 2008; Santillán et al., 1998; Vanderah et al., 2001). In this context, the development of functional super-sensitivity to opioid agonists after long-term exposure to opioid receptor antagonists, such as naloxone, naltrexone and 6_β-naltrexol, is a well-known phenomenon in rodents (Sirohi et al., 2007). For example, we previously reported that the antinociceptive and respiratory depressant potencies of µ-agonists are enhanced following interruption of long-term treatment with naltrexone in rats (Diaz et al., 2002). In most of the studies in the literature, this increased responsiveness to agonists has been correlated with opioid receptor up-regulation (Diaz et al., 2002; Lesscher et al., 2003; Patel et al., 2003; Sirohi et al., 2007; Unterwald et al., 1995; Yoburn et al., 1986).

Sustained opioid receptor blockade by naltrexone is among the currently available treatments for substance abuse and dependence disorders, and the recently introduced long-acting, sustained-release formulations of naltrexone are considered to be promising strategies for the treatment of heroin (Krupitsky and Blokhina, 2010), alcohol (Anton, 2008; Ray et al., 2010) and nicotine (David et al., 2006) dependence. However, the advantages and disadvantages of these new therapies have not been systematically analysed.

The neurochemical adaptations produced by continued opioid antagonist treatment have scarcely been studied. Here, we further analyse the molecular mechanisms underlying the increased functional responsiveness to opioid agonists produced by sustained administration of antagonists in rats. We demonstrate that following long-term treatment with naltrexone, spinal μ -opioid receptors undergo a transductional shift from PTX-sensitive $G\alpha_{i/o}$ to PTX-resistant $G\alpha_z$ transducer proteins. Consequently, the inhibitory effect of agonists on the AC/cAMP effector pathway is enhanced. In addition, the population of constitutively active μ -receptors in the spinal cord appears to be increased. These neurochemical changes correlate with the pharmacological super-sensitivity to the antinociceptive effect of the μ -opioid agonist sufentanil.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The experiments were carried out using male Sprague–Dawley rats weighing 250–300 g (Charles River, Harlan, Barcelona, Spain). The animals were housed in sawdust-lined cages in an environmentally controlled animal facility at 22 °C with a 12:12 h light–dark cycle and food/water provided *ad libitum*. This study was approved by the Cantabria University Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee and performed in strict accordance with the "European Directive for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (European Union Directive #86/606/EEC).

2.2. Pharmacological treatments

Diagrams showing the pharmacological treatment schedules are depicted in Supplementary figure S1. Chronic saline (1 μ l/h) or naltrexone (120 μ g/h) infusion was administered using Alzet 2001 osmotic minipumps (Alza Corporation, Palo Alto, CA, USA) that were implanted subcutaneously under light ether-induced anaesthesia (Figure S1A). These pumps delivered the solutions at a constant rate of 1 μ l/h for 7 days. On day 7, the minipumps were removed, and the in vivo (antinociceptive response to the μ -opioid receptor agonist sufentanil) or *in vitro* assays (autoradiographic, [³⁵S]GTP γ S binding and adenylyl cyclase studies) were carried out 24 h after withdrawal from a chronic saline or naltrexone treatment.

To interfere with the expression of $G\alpha_z$ proteins, we used a synthetic antisense oligodeoxynucleotide (ODN) that has previously been characterised (Sanchez-Blazquez et al., 1995; Serres et al., 2000). The sequence was 5'-CCTGATCT-CACCCTTGCTCTGCCGGGCCAGT-3'. The ODN was phosphorothioate-modified at the two bases on each end. The sequence of the missense oligodeoxynucleotide was 5'-CCTTATTTACTTTCGCC-3', and it was phosphorothioate-modified at positions 5'-CC and GC-3' (Sanchez-Blazquez et al., 1995; Serres et al., 2000). ODNs (5 µg/10 µl) were administered twice intracerebroventricularly (i.c.v) under light isofluorane-induced anaesthesia with a 24-h interval between administrations (Figure S1B). The $G\alpha_z$ -antisense ODN injection was performed on days 5 and 7 for the rats receiving chronic naltrexone treatment (Figure S1C). The rats were challenged with sufentanil 24 h later to test whether the antinociceptive response elicited by activation of μ -opioid receptors was mediated by $G\alpha_z$.

To prevent the activation of $G\alpha_{i1,2,3}/G\alpha_0$ proteins, PTX was administered (1 µg/10 µl, i.c.v.), and the antinociceptive response of sufentanil was tested 48 h later (Figure S1D). PTX was injected on day 6 to the rats receiving chronic naltrexone treatment (Figure S1E).

2.3. Evaluation of nociception

The tail-flick test was used to assess the nociceptive threshold. A tail-flick response was elicited by applying radiant heat to the surface of the tail. The intensity of the stimulus was adjusted so that control latency was within 3-5 s. A cut-off time of 10 s was established to avoid permanent injury. Tail-flick latencies were measured before the drug injection and 30 min after subcutaneous administration of sufentanil (0.1 or 1 µg/kg; Figure S1). This drug administration schedule was based on dose-response curves obtained in previous studies (Diaz et al., 2002).

2.4. Autoradiography of μ -opioid agonist-stimulated [³⁵S]GTP γ S binding

[³⁵S]GTPγS binding using tissue sections was performed as described previously (Sim et al., 1996; Mostany et al., 2008). Sections were first preincubated in assay buffer (50 mM Tris–HCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA and 100 mM NaCl; pH 7.4) for 15 min at 25 °C, followed by a second 15-min preincubation in the same assay buffer containing 2 mM GDP and 10 mU/ml adenosine deaminase. Sections were then incubated for 2 h at 25 °C in assay buffer containing 1 mM DTT and 0.04 nM [³⁵S]GTPγS. Consecutive sections were used to define basal binding (in the absence of the opioid agonist), stimulated binding (in the presence of agonist) and non-specific binding (without agonist DAMGO was used at concentrations ranging from 10⁻¹⁰ d. After this incubation, slides were rinsed twice in cold Tris buffer (50 mM Tris–HCl; pH 7.4) for 15 min, dipped in distilled water and dried under an ice-cold air stream.

Tissue sections incubated with [³⁵S]GTP_YS were exposed to autoradiographic films (Kodak-MR films, GE Healthcare, Spain) along with [¹⁴C]-radioactive microscales (GE Healthcare, Spain). In order to generate the autoradiograms, films were developed following a 48-h [³⁵S]GTP_YS binding period. Autoradiographic densitometry was performed using Scion Image software (Scion Corporation, Maryland, USA). Autoradiographic values of net agonist-stimulated [³⁵S]GTP_YS binding were calculated by subtracting basal binding from agonist-stimulated binding.

2.5. Immunoprecipitation of $[^{35}S]GTP\gamma S$ -labelled $G\alpha$ subunits

Spinal cord samples were homogenised [1:30 (w/v)] in ice-cold buffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 1 mM DTT; pH 7.4) using a motor-driven glass Teflon tissue potter (10 strokes, 1500 rpm). The homogenates were then centrifuged (1500 x g, 5 min, 4 $^\circ\text{C}$), and the resulting supernatants were centrifuged again (14,000 rpm, 15 min, 4 °C). Resuspended pellets (500 µg protein/ ml/assay) were incubated with 20 nM [35 S]GTP γ S and 10 μ M DAMGO in a final volume of 100 μl for 30 min at 30 °C. Non-specific binding was determined in the presence of 10 μM of GTP\gammaS. Membrane suspensions were then solubilised on ice with in a solution containing 1% Igepal, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2.5 mM CHAPS, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 0.01 M aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 $\mu g/ml$ pestatin, 1 $\mu l/ml$ antipain, and 10 $\mu g/ml$ chymostatin for 30 min. Solubilised membranes were incubated for 3 h at room temperature with 15 μ l of specific rabbit anti-G α_{o} , anti-G $\alpha_{i1,2,3}$ and anti-G α_z antibodies immobilised to superparamagnetic Dynabeads[®] Protein A (overnight, 4 °C). After three washes with 1 ml of PBS, the beads were pelleted, and the bound radioactivity was counted in 4 ml of Ecolite scintillation cocktail. Antibody specificity was confirmed in our experimental conditions by western blot analysis, as previously described (Mato et al., 2010). The amount of coupling of μ -opioid receptors to the diverse G-protein subunits induced by DAMGO (10⁻⁴ M) was expressed as percentage over the basal values in the absence of the agonist (100%).

2.6. Cyclic AMP assays

AC assays were performed using spinal cord samples as described previously (Mostany et al., 2008). Samples were homogenised (1:60 weight/volume dilution) with a Teflon/glass grinder (10 strokes, 800 r.p.m.) in an ice-cold homogenisation buffer (20 mM Tris-HCl. 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 25 uM leupeptin and 300 mM sucrose; pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 1500 x g (5 min at $4 \circ C$), and the resulting supernatants were centrifuged at 13,000 x g (15 min at $4 \circ C$). The pellets were resuspended (120 µg protein/ml) in assay buffer (80 mM Tris-HCl, 0.2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 60 mM sucrose, 1 mM DTT, 10 μM GTP, 0.5 mM IBMX, 5 mM phosphocreatine, 50 U/ml creatine phosphokinase, and 5 U/ml myokinase; pH 7.4) without (basal AC activity) or with 10 μ M forskolin (FK) (FK-stimulated cAMP accumulation). Opioid receptor-mediated inhibition of FK-stimulated cAMP accumulation was determined using different concentrations of the agonist DAMGO (10^{-9} – 10^{-4} M). To test the effect of PTX on DAMGO-induced inhibition of FK-stimulated cAMP accumulation, samples were preincubated for 30 min with or without PTX (1 µg/ml) in buffer (25 mM Tris-HCl buffer containing 0.05% SDS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 2.5 μM NAD, and 10 mM thymidine; pH 7.4, 30 °C). The inverse agonism of naltrexone $(10^{-7}-10^{-3} \text{ M})$ was analysed by measuring cAMP accumulation in the absence of NaCl and FK (Mato et al., 2002). The effects of selective opioid antagonists (μ , β -funaltrexamine; δ , naltrindole; and κ , norbinaltorphimine) added to the media at a concentration of 10^{-4} M were evaluated.

Membranes under the different experimental protocols were preincubated for 5 min at 37 °C, then ATP was added to a final concentration of 200 μ M and the mixture was incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was stopped by boiling for 5 min, and the cAMP concentration was determined in a 50 μ l sample of the supernatant using a commercial kit (Cyclic AMP [³H] assay system, Amersham Biosciences, Barcelona, Spain). Each CAMP assay was performed in triplicate, and the results are expressed as pmol cAMP/min/mg protein.

2.7. Drugs and chemicals

Sufentanil was kindly provided by Janssen Cylag, S.A. (Madrid, Spain). DAMGO, naltrexone and FK were purchased from Sigma (Madrid, Spain). The selective antagonists of μ -opioid receptors (β -funaltrexamine), δ -opioid receptors (naltrindole) and κ -opioid receptors (nor-binaltorphimine) were obtained from Tocris Bioscience (Biogen S.L., Madrid, Spain). [³⁵S]GTP₇S (1250 Ci/mmol) was purchased from Perkin Elmer (Madrid, Spain). PTX was purchased from Calbiochem (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). The ODNs were synthesised by Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, UK). Selective rabbit polyclonal antibodies against G α_0 , G $\alpha_{i1,2,3}$ and G α_z subunits were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Representative immunoblots showing the specificity of the antibodies are shown in Supplementary figure S2.

2.8. Data analysis

Data analysis was performed using the GraphPad Prism statistical software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Data from the [^{35}S]GTP γ S binding and AC assays were fitted to sigmoidal concentration-response curves to determine potency (EC₅₀ and IC₅₀, respectively) and theoretical maximal effect (E_{max} and I_{max}, respectively). The EC₅₀ and IC₅₀ values were normalised as $-\log$ EC₅₀ (pEC₅₀) for statistical comparison. Data represent the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analysis was performed using Student's *t*-tests and one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls *post-hoc* test when appropriate. A *p* < 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Chronic naltrexone treatment increases DAMGO-induced [35 S] GTP γ S binding

Basal and agonist-induced μ -opioid receptor activation of G-proteins was determined by [³⁵S]GTP γ S binding using spinal cord sections. The basal level of [³⁵S]GTP γ S binding was not different between groups. However, animals chronically treated with naltrexone exhibited a significant increase in μ -opioid receptormediated stimulation of [³⁵S]GTP γ S binding. The maximal stimulatory effect induced by the selective μ -opioid agonist DAMGO on spinal cord [³⁵S]GTP γ S binding was significantly enhanced in comparison with saline-treated rats, as indicated by the E_{max} values determined from the concentration-response curves. In contrast, the

potency between groups was not different (Table 1; Fig. 1). These data suggest that the μ -opioid receptor coupling to G-proteins was increased following chronic naltrexone treatment.

We also confirmed that chronic naltrexone treatment increased the specific binding of ³H-DAMGO to μ -opioid receptors (Diaz et al., 2002;), consistent with the reported up-regulation of μ -opioid receptors induced by chronic naltrexone treatment (Yoburn et al., 1986, 1995; Unterwald et al., 1995; Lesscher et al., 2003; Patel et al., 2003; Sirohi et al., 2007).

3.2. Chronic naltrexone treatment causes potentiation of μ -opioid agonist-induced inhibition of cAMP accumulation through a mechanism involving PTX-resistant *G*-proteins

Basal AC activity and the ability of the AC activator FK (10 μ M) to increase cAMP levels were not altered following long-term administration of naltrexone in comparison with saline-treated animals (Table 1). In control rats, incubation of the spinal cord membranes with increasing concentrations $(10^{-9}-10^{-4} \text{ M})$ of the selective μ -opioid agonist DAMGO produced a concentration-dependent inhibition of FK-stimulated cAMP accumulation. Following long-term treatment with naltrexone, the maximal ability of DAMGO to inhibit FK-induced cAMP accumulation was significantly enhanced with no change in potency (Table 1). PTX causes the ADP-ribosylation and inactivation of $G\alpha_{i/o}$ proteins, with the exception of $G\alpha_z$ (Casey et al., 1990). The presence of PTX in the medium did not modify either basal or FK-stimulated cAMP accumulation (Table 1, Fig. 2). However, in saline-treated animals, the maximal inhibitory effect of DAMGO was almost completely prevented by PTX pretreatment, suggesting the involvement of $G\alpha_{i/o}$ proteins. On the contrary, in the group of animals chronically treated with naltrexone, PTX did not antagonise the maximal inhibitory effect of DAMGO on FK-induced cAMP accumulation, suggesting the involvement of $G\alpha_z$ proteins (Fig. 2).

3.3. Chronic naltrexone treatment increases μ -opioid receptor coupling to $G\alpha_z$ protein subunits

To further assess the existence of specific changes in the coupling of μ -opioid receptors to the PTX-resistant G α_z subunits, we performed immunoprecipitation of DAMGO-activated [³⁵S] GTP γ S-labelled G α protein subunits.

In spinal cord homogenates from animals treated with chronic naltrexone, the coupling of μ -opioid receptors to G α proteins was

Table 1

Effect of chronic administration of naltrexone (120 µg/h, 7 days) in µ-opioid receptor density and functionality, and on adenylyl cyclase (AC) activity.

Type of assay	Saline	Chronic naltrexone
Autoradiographic density of [³ H]-DAMGO	42.42 ± 4.15	$75.42 \pm 7.52^{**}$
binding (fmol/mg tissue)		
[³⁵ S]GTPγS binding autoradiography		
Basal binding (nCi/mg tissue)	250.22 ± 40.12	$\textbf{278.23} \pm \textbf{24.12}$
DAMGO-stimulated binding		
E _{max} (nCi/mg tissue)	538.20 ± 48.01	$736.5\pm 39.75^{**}$
pEC_{50} ($-log EC_{50}$)	5.89 ± 0.35	5.86 ± 0.14
Adenylyl cyclase (AC) activity		
Basal AC activity (pmol/min/mg protein)	21.30 ± 3.90	27.50 ± 3.79
Forskolin-induced cAMP accumulation	599.61 ± 25.34	553.98 ± 43.79
(pmol/min/mg protein)		
DAMGO inhibition		
I _{max} (pmol/min/mg protein)	462.42 ± 14.28	$389.44 \pm 29,36^{*}$
pIC ₅₀ (-log IC ₅₀)	$\textbf{6.48} \pm \textbf{0.47}$	$\textbf{6.88} \pm \textbf{0.16}$

 E_{max} represents DAMGO-induced maximal stimulation of [³⁵S]GTP γ S binding; I_{max} represents DAMGO-induced maximal inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation. Values are given as means \pm S.E.M. of data from 6 to 7 animals/group. *p < 0.05 and **p < 0.01 vs. saline-treated group (un-paired *t* test).



Fig. 1. Effect of chronic naltrexone treatment on DAMGO-induced [35 S]GTP γ S binding. Left: Concentration-response curves of DAMGO-stimulated [35 S]GTP γ S binding using spinal cord sections from animals chronically treated for 7 days with saline and naltrexone (120 µg/h). Values (mean ± S.E.M.) represent specific [35 S]GTP γ S binding in nCi/mg tissue. Right: Representative autoradiographic illustrations showing basal (A and B) and 10 µM DAMGO-stimulated (C and D) [35 S]GTP γ S binding in spinal cord sections from animals chronically treated for 7 days with saline (A and C) and naltrexone (B and D). Note the enhanced response to DAMGO following withdrawal from chronic naltrexone in the outer layers of the dorsal horn (laminae I and II). Abbreviations: DH, dorsal horn; VH, ventral horn.

significantly increased in comparison with saline-treated animals (183.0 ± 13.3% vs. 140.1 ± 9.0% of basal binding; p < 0.05). Western blot analysis of spinal cord samples revealed no change in the expression of any G α subunit after chronic naltrexone treatment (see methods and Figure S3 in the supplementary information). However, as shown in Fig. 3, the DAMGO-induced activation of G α_z subunits was significantly increased in chronic naltrexone-treated animals in comparison with the saline group (301.6 ± 39.9% vs. 170.7 ± 10.2% of basal binding; p < 0.05). Significant differences in the coupling with G α_o (194.4 ± 7.7% vs. 172.6 ± 5.8%) and G $\alpha_{i12.3}$ (178.9 ± 7.3% vs. 160.6 ± 9.6%) were not observed between naltrexone- and saline-treated animals.

3.4. Potentiation of μ -opioid antinociception following withdrawal from chronic naltrexone involves $G\alpha_z$ proteins

The functional relevance of the transduction switch from $G\alpha_{i/o}$ to $G\alpha_z$ proteins was assessed by analysing the consequences of PTX or



Fig. 2. Effect of pertussis toxin (PTX) on DAMGO-induced inhibition of FK-stimulated cAMP accumulation in spinal cord homogenates from rats chronically treated with saline or naltrexone. Data represent the mean \pm S.E.M. PTX prevented opioid-induced inhibition of FK-stimulated cAMP accumulation in spinal cord homogenates from saline- but not naltrexone-treated rats (**p < 0.01 and ***p < 0.01 vs. FK).

 $G\alpha_z$ -antisense ODN pretreatment on the antinociceptive response to sufentanil. Under baseline conditions (Fig. 4A), sufentanil, acutely administered at the dose of 1 µg/kg (n = 10), produced an antinociceptive response that almost reached the MPE; this effect was prevented by PTX (1 µg/10 µl, i.c.v.) administered 48 h beforehand (n = 5). In contrast, pretreatment with $G\alpha_z$ -antisense ODN (5 µg/10 µl, two i.c.v. injections on alternate days; n = 5) did not significantly modify the effect of sufentanil. Neither saline nor missense ODN administered i.c.v. modified the tail-flick basal response or sufentanil-induced antinociception. These results indicate that sufentanil-induced antinociception in naïve animals is dependent on the interaction of µ-opioid receptors with PTX-sensitive $G\alpha_{i/o}$ transducer proteins rather than PTX-insensitive $G\alpha_z$ subunits.

In the rats that received the chronic naltrexone treatment (Fig. 4B), the antinociceptive response of sufentanil (0.1 µg/kg; n = 5) was significantly potentiated, confirming "in vivo" the development of functional super-sensitivity to the antinociceptive effect of sufentanil. PTX injected on the 6th day of chronic naltrexone infusion did not prevent the development of opioid super-sensitivity. On the other hand, $G\alpha_2$ -antisense ODN injected i.c.v. on days 5 and 7 of the chronic naltrexone infusion completely prevented the development of super-sensitivity to the antinociceptive response elicited by sufentanil. The reduction in the expression levels of $G\alpha_2$ proteins in the dorsal horn of the spinal cord



Fig. 3. Selective [³⁵S]GTP_YS labelling of $G\alpha_0$, $G\alpha_{i,1,2,3}$ and $G\alpha_z$ protein subunits activated by the μ -opioid agonist DAMGO in the spinal cord homogenates from rats chronically treated with saline or naltrexone. G-protein subunits were isolated using antibodies against each subtype immobilised to superparamagnetic Dynabeads. Data represent the mean \pm S.E.M. of the percent bound relative to basal binding (100%) for each specific G-protein subunit (*p < 0.05 vs. saline (Newman–Keuls post-ANOVA)). Note the selective increase of [³⁵S]GTP_YS labelling of $G\alpha_z$ following chronic administration of naltrexone.



Fig. 4. Antinociceptive effect of sufentanil in the tail-flick test. Naive rats (A) and rats chronically treated with naltrexone (B) were challenged with sufentanil after i.c.v pretreatment with saline, pertussis toxin (PTX; 1 µg/10 µl), $G\alpha_z$ -antisense oligodeox-ynucleotide (ODN; 2 × 5 µg/10 µl) or missense ODN (2 × 5 µg/10 µl). Data represent the mean \pm S.E.M. of the percent antinociception relative to the maximal possible effect (100%) (**p < 0.01 vs. saline; ***p < 0.001 vs. baseline; ##p < 0.001 vs. saline (Newman–Keuls post-ANOVA)).

induced by $G\alpha_z$ -antisense ODN treatment was confirmed by western blotting experiments (Fig. 5). Overall, these results indicate that following withdrawal from chronic naltrexone, the antinociceptive response mediated by μ -opioid receptor activation involved $G\alpha_z$ transducer proteins.

3.5. Chronic naltrexone treatment increases the constitutive activity of μ -opioid receptors

Incubation of spinal cord membranes from saline-treated rats with increasing concentrations of naltrexone induced a concentration-dependent increase in the levels of cAMP ($E_{\rm max} = 29.1 \pm 0.7$ pmol/min/mg; pEC₅₀ = 4.2 ± 0.3). This inverse agonist action of naltrexone was potentiated after chronic administration of naltrexone because the maximal cAMP production



Fig. 5. Effect of $G\alpha_z$ -antisense oligodeoxynucleotide on the levels of $G\alpha_z$ proteins in the dorsal horn of the spinal cord. Representative immunoblots and integrated optical density (OD) of the bands show a down-regulation of $G\alpha_z$ proteins following antisense ODN, both in saline and naltrexone (NTX) treated rats. Data represent the mean \pm S.E.M. from four animals per group of the percent OD relative to missense ODN. (*p < 0.05 vs. missense ODN; Newman–Keuls post-ANOVA).

appeared significantly enhanced ($E_{max} = 35.3 \pm 0.8$, p < 0.01 vs. saline-treated group; pEC₅₀ = 4.1 ± 0.2; p = NS), indicating the existence of constitutively active opioid receptors that uncovered the inverse agonist effect of naltrexone (Fig. 6A).

To determine the subtype of opioid receptor that exhibited constitutive activity, the effect of naltrexone on cAMP levels was evaluated in the presence of selective antagonists to μ - (β -funaltrexamine), δ - (naltrindole) and κ - (nor-binaltorphimine) receptors at a concentration of 10^{-4} M. The effect of each antagonist alone was examined in parallel, and only nor-binaltrophimine increased cAMP levels (data not shown), confirming its reported inverse agonism (Wang et al., 2007). As shown in Fig. 6B,β-funaltrexamineantagonised the naltrexone-induced cAMP increase both in the saline-treated group (109.1 \pm 2.9% vs. 121.1 \pm 5.4% in the absence of β -funaltrexamine; p < 0.05) and in the chronic naltrexone-treated group (114.4 \pm 0.4% vs. 147.2 \pm 2.2% in the absence of β -funaltrexamine; p < 0.01). Naltrindole (10⁻⁴ M) did not modify the naltrexone-induced cAMP increase in any group. The same concentration of naltrindole antagonised the binding of $[^{35}S]$ GTP γ S induced by the δ -specific agonist DSLET (Figure S4). Nor-binaltrophimine not only was unable to antagonise but also increased naltrexone-induced cAMP accumulation in both the saline group (142.2 \pm 2.1%; p < 0.01 vs. the effect of naltrexone alone) and the chronic naltrexone group (165.3 \pm 10.1%; *p* < 0.05 *vs*. the effect of naltrexone alone). Furthermore, immunoprecipitation assays that were carried out using spinal cord samples from saline and chronic naltrexone-treated animals demonstrated the absence of naltrexone-induced coupling with Gas (104 \pm 8.1%). Overall, our data support the interaction of naltrexone with constitutively active μ-opioid receptors.





Fig. 6. Naltrexone-induced cAMP accumulation in spinal cord homogenates from animals chronically treated for 7 days with saline or naltrexone (120 µg/h) and selective opioid antagonists. (A): Concentration—response curves of naltrexone-induced cAMP accumulation (pmol/min/mg protein); (B) Antagonism of naltrexone-induced cAMP accumulation by the selective antagonists of μ - (β -funaltrexamine), δ -(naltrindole) and κ - (*nor*-binaltrophimine) receptors (percentage with respect to the basal value, 100%). Data represent the mean \pm S.E.M. Note the increase in the naltrexone inverse agonist effect following chronic administration of the opioid antagonist β -funaltrexamine, supporting the interaction of naltrexone with constitutively active μ -opioid receptors ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ and $^{**}p < 0.001$ vs. basal value of cAMP level (Newman—Keuls post-ANOVA); $^{+}p < 0.05$ and $^{++}p < 0.01$ vs. naltrexone (Newman—Keuls post-ANOVA).

4. Discussion

Functional super-sensitivity to opioid agonists induced by sustained exposure to antagonists is a well-known phenomenon in rodents. Most studies addressing the underlying mechanisms have focused on the up-regulation of opioid receptors in the CNS subsequent to blockade (Diaz et al., 2002; Lesscher et al., 2003; Patel et al., 2003; Sirohi et al., 2007; Unterwald et al., 1995; Yoburn et al., 1986, 1995). Treatment with naltrexone clearly induces the up-regulation of μ - and, to a lesser extent, δ - and κ -opioid receptors throughout the brain, with differences in the percent change across various brain regions (Lesscher et al., 2003; Yoburn et al., 1995). Furthermore, the increase in the maximal stimulatory effect of DAMGO on the spinal cord binding of [³⁵S]GTP\gammaS indicates the existence of enhanced coupling between μ -opioid receptors and their cognate G-proteins.

Regarding intracellular effectors, one of the best-characterised signalling cascades linked to opioid receptor activation is the AC/cAMP pathway (Law et al., 2000). This pathway has long been known to play a crucial role in processing nociception. In addition to opioids, other pharmacological agents with analgesic properties exert an inhibitory influence on this pathway (Pierre et al., 2009). In agreement with previous reports (George et al., 2000; Laugwitz et al., 1993; Mostany et al., 2008), we observed that PTX-sensitive $G\alpha_i$ subunits were the preferential transducers linking μ -opioid receptor activation to the AC/cAMP pathway in naive animals. Following chronic naltrexone treatment, the inhibitory effect of DAMGO on the AC/cAMP pathway was significantly potentiated. However, under these experimental conditions, the effect was not prevented by PTX, in contrast to the saline-treated group. Thus, our data indicate that following chronic treatment with antagonists, µ-opioid receptors underwent a shift in the transduction of their signal, showing a higher efficiency of interaction with PTX-resistant over PTX-sensitive $G\alpha$ proteins. A likely transducer candidate is $G\alpha_{z}$, which is the only $G\alpha$ subunit resistant to PTX (Casey et al., 1990) that inhibits AC (Kozasa and Gilman, 1995; Mostany et al., 2008). Consistent with this assumption, the immunoprecipitation data indicated that the coupling of μ -opioid receptors to $G\alpha_z$ subunits was augmented following withdrawal from chronic naltrexone, whereas the coupling to $G\alpha_0$ and $G\alpha_{i1,2,3}$ subunits remained similar to that observed in saline-treated rats.

Although the present study provides no information about the mechanisms that could explain why the switch from $G\alpha_i$ to $G\alpha_z$ transducer proteins resulted in an enhancement of the opioid inhibitory effect on the AC/cAMP effector pathway, several observations led us to propose some putative mechanisms for such a phenomenon. First, the rate of $G\alpha_z$ GTP hydrolysis is as much as 200fold slower than that determined for other G-protein α subunits. This extremely slow rate of GTP hydrolysis would then result in a long-lasting signal (Casey et al., 1990; Jeong and Ikeda, 1998). Second, the inhibitory $G\alpha$ subunits differ in their specificity for individual AC isoforms. For example, it has been suggested that the relatively high affinity of $G\alpha_z$ for AC type V, together with its slow GTPase activity, might account for its capacity to induce strong AC inhibition in cultured cells (Ammer and Christ, 2002). Finally, $G\alpha_7$ may be difficult to switch off after receptor activation unless external factors, such as RGS-Rz proteins, accelerate the rate of $G\alpha_z$ GTP hydrolysis. In particular, RGSZ2 plays an important role in controlling μ -opioid signalling induced by $G\alpha_z$ transducer proteins (Garzón et al., 2005). Thus, it may be feasible that, following chronic naltrexone treatment, an inadequate control of $G\alpha_z$ activity may lead to strong inhibition of the AC/cAMP pathway.

The functional relevance of the particular transducer protein linking μ -opioid receptor activation to the AC/cAMP signalling pathway is strengthened by our data that demonstrate the close relationship between agonist-activated signalling "*in vitro*" and agonist-induced pharmacological effects "in vivo". Thus, as observed in the AC assay, sufentanil-induced antinociception in naive rats was prevented by PTX but not by $G\alpha_2$ -antisense ODN, indicating the involvement of $G\alpha_{i/o}$ transducer proteins. In contrast, following withdrawal from chronic naltrexone treatment, the switch from $G\alpha_{i/o}$ to $G\alpha_2$ proteins appeared to be responsible for the enhanced antinociceptive response to μ -opioid agonists because sufentanilinduced antinociception was prevented by $G\alpha_2$ -antisense ODN but not by PTX pretreatment.

Aside from G α transducer proteins and the AC/cAMP pathway, chronic treatment with naltrexone could have additional consequences on other elements linked to μ -opioid receptor signalling that were not analysed in this study. In this regard, voltage-gated Ca²⁺ channels and G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels are fundamental determinants of opioid-induced antinociception

(Law et al., 2000; Heinke et al., 2011), whose modulation by $G\alpha_z$ has been described in several reports (see Ho and Wong, 2001). Moreover, $G_{\beta\gamma}$ -subunits broadly regulate Kir3 channels, voltage-gated Ca^{2+} channels, phospholipase $C\beta$, and several isoforms of AC, among other effectors (Dupré et al., 2009).

In addition to chronic naltrexone treatment, a number of pharmacological interventions induce analogous signalling plasticity on µ-opioid receptors with similar functional consequences. In this regard, we previously reported that 7 days of combined treatment with nimodipine (L-type calcium channel blocker) and sufentanil prevents the development of tolerance and strongly enhances the antinociception in rats (Diaz et al., 2000; Dierssen et al., 1990; Hurlé et al., 2000; Mostany et al., 2008). The underlying mechanism involved efficient inhibition of cAMP production associated with a change in μ -opioid receptor-preferred G-protein coupling from PTX-sensitive $G\alpha_i$ to PTX-resistant $G\alpha_z$ subunits (Mostany et al., 2008). Changes in sensitivity to agonists have also been reported to occur upon heterodimerisation of opioid receptors. Studies using cultured cells provide evidence that δ -selective antagonists enhance µ-opioid receptor signalling through a mechanism involving the formation of μ - δ hetero-oligometric signalling units and a subsequent switch in opioid receptor preference for $G\alpha_7$ over $G\alpha_1$ subunits, which are preferentially activated by individually expressed μ - and δ -receptors (Fan et al., 2005; George et al., 2000; Hasbi et al., 2007). Experiments in vivo demonstrate that this change in opioid receptor transduction leads to increased µ-receptor binding and signalling activity and to an enhancement of morphine antinociceptive potency in mice (Abul-Husn et al., 2007; Gomes et al., 2004). Taken together, these findings suggest that conditions favouring the coupling of μ -opioid receptors to $G\alpha_z$ -protein subunits would increase agonist-induced AC/cAMP signalling pathways, leading to an enhancement of the pharmacological responses.

Another relevant adaptive response prompted by sustained opioid receptor blockade arises from the observation that the inverse agonist effect of naltrexone on the AC activity was significantly potentiated. Opioid receptors, similar to other G-proteincoupled receptors, may exhibit spontaneous constitutive activity even in the absence of agonists (Sadee et al., 2005). It has also been reported that antagonists, such as naloxone and naltrexone, display inverse agonist activity when the population of constitutively active opioid receptors increases, which is typically more prominent following chronic treatment with opioid agonists (Liu and Prather, 2001; Wang et al., 2001, 2007). On the other hand, the in vitro inverse agonist activity of naltrexone and other putative μ -inverse agonists has been questioned by Divin et al., 2009. These authors observed that, under chronic treatment and the subsequent rapid removal of opioid agonist, cells expressing µ-opioid receptors exhibit an enhanced cAMP accumulation not linked to the formation of constitutively active µ-opioid receptors.

Our present results demonstrate for the first time in native tissue that the inverse agonism of naltrexone, reflected by cAMP accumulation, occurs after sustained treatment with opioid antagonists. Furthermore, our findings support the fact that the stimulatory effect of naltrexone on cAMP accumulation was mediated by μ-opioid receptors. In addition, immunoprecipitation assays indicated the lack of involvement of $G\alpha_{s}$ subunits in this effect, demonstrating that naltrexone could not induce the coupling of µ-opioid receptors to these stimulatory subunits. Considering that receptor over-expression leads to a proportional increase in the number of spontaneously active receptors (see Leurs et al., 1998), constitutive signalling may be enhanced after withdrawal from chronic naltrexone treatment as a consequence of µ-opioid receptor up-regulation. However, sensitisation of the receptor to the effects of inverse agonists cannot be ruled out (Divin et al., 2008; Liu and Prather, 2001; Wang et al., 2007).

Interestingly, we observed a potentiation of naltrexone inverse agonism by the κ -opioid antagonist *nor*-binaltorphimine. In this regard, Wang et al. (2007) demonstrated that naltrexone has inverse agonist properties at μ - but not at δ - and κ -opioid receptors in cultured cells over-expressing opioid receptors. In this study and in our study (data not shown), *nor*-binaltorphimine exhibited inverse agonist activity at κ -receptors. Thus, such an increase in cAMP accumulation induced by naltrexone in the presence of *nor*-binaltorphimine may be explained by the sum of their respective inverse agonist effects on μ - and κ -receptors.

5. Conclusions

Following long-term treatment with naltrexone, µ-receptors in the spinal cord experienced a transduction shift from PTX-sensitive $G\alpha_0$ and $G\alpha_{i1,2,3}$ proteins to PTX-resistant $G\alpha_z$ proteins. As a result, the inhibitory effect of the µ-agonist DAMGO on the AC/cAMP effector pathway was enhanced. In addition, constitutively active μ-opioid receptor expression, and possibly κ-opioid receptor expression, in the spinal cord appeared to be increased. The functional consequence of these neurochemical changes is the development of pharmacological super-sensitivity to the antinociceptive effect of µ-receptor agonists, such as sufentanil. Such changes in opioid receptor signalling activity can be a double-edged sword. On the one hand, they may have potential applicability to the optimisation of the analgesic effects of opioid drugs for the control of pain. On the other hand, they represent an important homeostatic dysregulation of the endogenous opioid system that might account for undesirable paradoxical pharmacological effects in patients chronically treated with certain opioid antagonists.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by grants from: Instituto de Salud Carlos III (RTICS: RD06/001/1016 and RD06/001/1006) and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007/65451, SAF2007/61862 and SAF2010/16894). We wish to thank Ms Beatriz Romero, Ms Rebeca Madureira and Ms Susana Dawalibi for their technical assistance.

Appendix. Supplementary material

Supplementary material related to this article can be found at doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.029.

References

- Abul-Husn, N.S., Sutak, M., Milne, B., Jhamandas, K., 2007. Augmentation of spinal morphine analgesia and inhibition of tolerance by low doses of mu- and deltaopioid receptor antagonists. British Journal of Pharmacology 151, 877–887.
- Ammer, H., Christ, T.E., 2002. Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity. Journal of Neurochemistry 83, 818–827.
- Anton, R.F., 2008. Naltrexone for the management of alcohol dependence. The New England Journal of Medicine 359, 715–721.
- Bannister, K., Dickenson, A.H., 2010. Opioid hyperalgesia. Current Opinion in Supportive and Palliative Care 4, 1–5.
- Casey, P.J., Fong, H.K., Simon, M.I., Gilman, A.G., 1990. Gz, a guanine nucleotidebinding protein with unique biochemical properties. The Journal of Biological Chemistry 265, 2383–2390.
- Chalecka-Franaszek, E., Weems, H.B., Crowder, A.T., Cox, B.M., Cote, T.E., 2000. Immunoprecipitation of high-affinity, guanine nucleotide-sensitive, solubilized mu-opioid receptors from rat brain: coimmunoprecipitation of the G proteins G(alpha o), G(alpha i1), and G(alpha i3). Journal of Neurochemistry 74, 1068–1078.
- Chan, J.S., Chiu, T.T., Wong, Y.H., 1995. Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. Journal of Neurochemistry 65, 2682–2689.
- Chang, G., Chen, L., Mao, J., 2007. Opioid tolerance and hyperalgesia. The Medical Clinics of North America 91, 199–211.
- David, S., Lancaster, T., Stead, L.F., Evins, A.E., 2006. Opioid antagonists for smoking cessation. Cochrane Database of Systematic Reviews (Online) (4), CD003086.
- Diaz, A., Pazos, A., Florez, J., Ayesta, F.J., Santana, V., Hurle, M.A., 2002. Regulation of mu-opioid receptors, G-protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in the rat brain after chronic opioid receptor antagonism. Neuroscience 112, 345–353.
- Diaz, A., Pazos, A., Florez, J., Hurle, M.A., 2000. Autoradiographic mapping of mu-opioid receptors during opiate tolerance and supersensitivity in the rat central nervous system. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 362, 101–109.
- Dierssen, M., Florez, J., Hurle, M.A., 1990. Calcium channel modulation by dihydropyridines modifies sufentanil-induced antinociception in acute and tolerant conditions. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 342, 559–565.
- Divin, M.F., Bradbury, F.A., Carroll, F.I., Traynor, J.R., 2009. Neutral antagonist activity of naltrexone and 6beta-naltrexol in naive and opioid-dependent C6 cells expressing a mu-opioid receptor. British Journal of Pharmacology 156, 1044–1053.
- Divin, M.F., Holden Ko, M.C., Traynor, J.R., 2008. Comparison of the opioid receptor antagonist properties of naltrexone and 6 beta-naltrexol in morphine-naive and morphine-dependent mice. European Journal of Pharmacology 583, 48–55.
- Dupré, D.J., Robitaille, M., Rebois, R.V., Hebert, T.E., 2009. The role of gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 49, 31–56.
- Fan, T., Varghese, G., Nguyen, T., Tse, R., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2005. A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers. The Journal of Biological Chemistry 280, 38478–38488.
- Garzón, J., Castro, M., Sanchez-Blazquez, P., 1998. Influence of gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors. The European Journal of Neuroscience 10, 2557–2564.
- Garzón, J., Rodriguez-Munoz, M., de la Torre-Madrid, E., Sanchez-Blazquez, P., 2005. Effector antagonism by the regulators of G protein signalling (RGS) proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS. Psychopharmacology 180, 1–11.
- George, S.R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G., O'Dowd, B.F., 2000. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. The Journal of Biological Chemistry 275, 26128–26135.
- Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H.H., Pintar, J.E., Devi, L.A., 2004. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 5135–5139.
- Gullapalli, S., Ramarao, P., 2002. L-type Ca2+ channel modulation by dihydropyridines potentiates kappa-opioid receptor agonist induced acute analgesia and inhibits development of tolerance in rats. Neuropharmacology 42, 467–475.
 Hasbi, A., Nguyen, T., Fan, T., Cheng, R., Rashid, A., Alijaniaram, M., Rasenick, M.M.,
- Hasbi, A., Nguyen, T., Fan, T., Cheng, R., Rashid, A., Alijaniaram, M., Rasenick, M.M., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2007. Trafficking of preassembled opioid mu-delta heterooligomer-gz signaling complexes to the plasma membrane: coregulation by agonists. Biochemistry 46, 12997–13009.
- Heinke, B., Gingl, E., Sandkühler, J., 2011 Jan 26. Multiple targets of μ-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition at primary afferent Aδ- and C-fibers. Journal of Neuroscience 31 (4), 1313–1322.
 Hendry, I.A., Kelleher, K.L., Bartlett, S.E., Leck, K.J., Reynolds, A.J., Heydon, K.,
- Hendry, I.A., Kelleher, K.L., Bartlett, S.E., Leck, K.J., Reynolds, A.J., Heydon, K., Mellick, A., Megirian, D., Matthaei, K.I., 2000. Hypertolerance to morphine in G(z alpha)-deficient mice. Brain Research 870, 10–19.
- Ho, M.K., Wong, Y.H., 2001. G(z) signaling: emerging divergence from G(i) signaling. Oncogene 20, 1615–1625.
 Hurlé, M.A., Goirigolzarri, I., Valdizan, E.M., 2000. Involvement of the cyclic AMP
- Hurlé, M.A., Goirigolzarri, I., Valdizan, E.M., 2000. Involvement of the cyclic AMP system in the switch from tolerance into supersensitivity to the antinociceptive effect of the opioid sufentanil. British Journal of Pharmacology 130, 174–180.
- Jeong, S.W., Ikeda, S.R., 1998. G protein alpha subunit G alpha z couples neurotransmitter receptors to ion channels in sympathetic neurons. Neuron 21, 1201–1212.
- Kozasa, T., Gilman, A.G., 1995. Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. characterization of alpha 12 and inhibition of adenylyl cyclase by alpha z. The Journal of Biological Chemistry 270, 1734–1741.
- Krupitsky, E.M., Blokhina, E.A., 2010. Long-acting depot formulations of naltrexone for heroin dependence: a review. Current Opinion in Psychiatry 23, 210–214.
- Lamberts, J.T., Jutkiewicz, E.M., Mortensen, R.M., Traynor, J.R., 2011. Mu-opioid receptor coupling to galpha(o) plays an important role in opioid antinociception. Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology.
- Laugwitz, K.L., Offermanns, S., Spicher, K., Schultz, G., 1993. Mu and delta opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Neuron 10, 233–242. Law, P.Y., Wong, Y.H., Loh, H.H., 2000. Molecular mechanisms and regulation of opioid
- Law, P.Y., Wong, Y.H., Loh, H.H., 2000. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 40, 389–430.
- Lesscher, H.M., Bailey, A., Burbach, J.P., Van Ree, J.M., Kitchen, I., Gerrits, M.A., 2003. Receptor-selective changes in mu-, delta- and kappa-opioid receptors after chronic naltrexone treatment in mice. The European Journal of Neuroscience 17, 1006–1012.
- Leurs, R., Smit, M.J., Alewijnse, A.E., Timmerman, H., 1998. Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. Trends in Biochemical Sciences 23, 418–422.

- Liu, J.G., Prather, P.L., 2001. Chronic exposure to mu-opioid agonists produces constitutive activation of mu-opioid receptors in direct proportion to the efficacy of the agonist used for pretreatment. Molecular Pharmacology 60, 53–62.
- Mato, S., Pazos, A., Valdizán, E.M., 2002. Cannabinoid receptor antagonism and inverse agonism in response to SR141716A on cAMP production in human and rat brain. European Journal of Pharmacology 443, 43–46.
- rat brain. European Journal of Pharmacology 443, 43–46. Mato, S., Vidal, R., Castro, E., Diaz, A., Pazos, A., Valdizan, E.M., 2010. Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms. Molecular Pharmacology 77, 424–434.
- Mostany, R., Diaz, A., Valdizan, E.M., Rodriguez-Munoz, M., Garzon, J., Hurle, M.A., 2008. Supersensitivity to mu-opioid receptor-mediated inhibition of the adenylyl cyclase pathway involves pertussis toxin-resistant galpha protein subunits. Neuropharmacology 54, 989–997.
- Patel, C.N., Rajashekara, V., Patel, K., Purohit, V., Yoburn, B.C., 2003. Chronic opioid antagonist treatment selectively regulates trafficking and signaling proteins in mouse spinal cord. Synapse (New York, N.Y.) 50, 67–76.
- Pierre, S., Eschenhagen, T., Geisslinger, G., Scholich, K., 2009. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. Nature Reviews Drug Discovery 8, 321–335. Ray, L.A., Chin, P.F., Miotto, K., 2010. Naltrexone for the treatment of alcoholism:
- Ray, L.A., Chin, P.F., Miotto, K., 2010. Naltrexone for the treatment of alcoholism: clinical findings, mechanisms of action, and pharmacogenetics. CNS & Neurological Disorders Drug Targets 9, 13–22.
- Sadee, W., Wang, D., Bilsky, E.J., 2005. Basal opioid receptor activity, neutral antagonists, and therapeutic opportunities. Life Sciences 76, 1427–1437.
 Sanchez-Blazquez, P., Garcia-Espana, A., Garzon, J., 1995. In vivo injection of anti-
- Sanchez-Blazquez, P., Garcia-Espana, A., Garzon, J., 1995. In vivo injection of antisense oligodeoxynucleotides to G alpha subunits and supraspinal analgesia evoked by mu and delta opioid agonists. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 275, 1590–1596.
- Sanchez-Blazquez, P., Gomez-Serranillos, P., Garzon, J., 2001. Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia. Brain Research Bulletin 54, 229–235.Santillán, R., Hurlé, M.A., Armijo, J.A., de los Mozos, R., Florez, J., 1998. Nimodipine-
- Santillán, R., Hurlé, M.A., Armijo, J.A., de los Mozos, R., Florez, J., 1998. Nimodipineenhanced opiate analgesia in cancer patients requiring morphine dose escalation: a double-blind, placebo-controlled study. Pain 76, 17–26.
- Serres, F., Li, Q., Garcia, F., Raap, D.K., Battaglia, G., Muma, N.A., Van de Kar, L.D., 2000. Evidence that G(z)-proteins couple to hypothalamic 5-HT(1A) receptors in vivo. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 20, 3095–3103.
- Sim, LJ., Selley, D.E., Dworkin, S.I., Childers, S.R., 1996. Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience 16, 2684–2692.
- Sirohi, S., Kumar, P., Yoburn, B.C., 2007. Mu-opioid receptor up-regulation and functional supersensitivity are independent of antagonist efficacy. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 323, 701–707.
- Snyder, S.H., Pasternak, G.W., 2003. Historical review: opioid receptors. Trends in Pharmacological Sciences 24, 198–205.
- Standifer, K.M., Rossi, G.C., Pasternak, G.W., 1996. Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits. Molecular Pharmacology 50, 293–298.
- Tso, P.H., Wong, Y.H., 2000. Deciphering the role of Gi2 in opioid-induced adenylyl cyclase supersensitization. Neuroreport 11, 3213–3217.
- Unterwald, E.M., Rubenfeld, J.M., Imai, Y., Wang, J.B., Uhl, G.R., Kreek, M.J., 1995. Chronic opioid antagonist administration upregulates mu opioid receptor binding without altering mu opioid receptor mRNA levels. Brain Research. Molecular Brain Research 33, 351–355.
- Valdizan, E.M., Castro, E., Pazos, A., 2010. Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT1A receptors in rat dorsal raphe nucleus. The International Journal of Neuropsychopharmacology/Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP) 13, 835–843.
- Vanderah, T.W., Ossipov, M.H., Lai, J., Malan Jr., T.P., Porreca, F., 2001. Mechanisms of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance: descending facilitation and spinal dynorphin. Pain 92, 5–9.
- Wang, D., Raehal, K.M., Bilsky, E.J., Sadee, W., 2001. Inverse agonists and neutral antagonists at mu opioid receptor (MOR): possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. Journal of Neurochemistry 77, 1590–1600.
- Wang, D., Sun, X., Sadee, W., 2007. Different effects of opioid antagonists on mu-, delta-, and kappa-opioid receptors with and without agonist pretreatment. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 321, 544–552.
- Yang, J., Wu, J., Kowalska, M.A., et al., 2000. Loss of signaling through the G protein, gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 9984–9989.
- Yohurn, B.C., Gomes, B.A., Rajashekara, V., Patel, C., Patel, M., 2003. Role of G(i) alpha2-protein in opioid tolerance and mu-opioid receptor downregulation in vivo. Synapse (New York, N.Y.) 47, 109–116.
- Yoburn, B.C., Nunes, F.A., Adler, B., Pasternak, G.W., Inturrisi, C.E., 1986. Pharmacodynamic supersensitivity and opioid receptor upregulation in the mouse. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 239, 132–135.
- Yoburn, B.C., Shah, S., Chan, K., Duttaroy, A., Davis, T., 1995. Supersensitivity to opioid analgesics following chronic opioid antagonist treatment: relationship to receptor selectivity. Pharmacology, Biochemistry, and Behavior 51, 535–539.

Biochimica et Biophysica Acta 1832 (2013) 323-335

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect



Biochimica et Biophysica Acta



journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbadis

BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF- β signaling

Ana V. Villar ^{a,b}, Raquel García ^b, Miguel Llano ^{b,c}, Manuel Cobo ^{b,c}, David Merino ^{a,b}, Aquilino Lantero ^{a,b}, Mónica Tramullas ^{a,b}, Juan M. Hurlé ^{b,d}, María A. Hurlé ^{a,b,*}, J. Francisco Nistal ^{b,e,**}

^a Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

^b Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Santander, Spain

^c Department of Cardiology, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

^d Department of Anatomy and Cellular Biology, School of Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

^e Department of Cardiovascular Surgery, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 17 July 2012 Received in revised form 23 October 2012 Accepted 13 November 2012 Available online 17 November 2012

Keywords: Myocardial remodeling Aortic valve stenosis Pressure overload TGF-β BAMBI miR-21

ABSTRACT

Left ventricular (LV) pressure overload is a major cause of heart failure. Transforming growth factors- β (TGF- β s) promote LV remodeling under biomechanical stress. BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) is a pseudoreceptor that negatively modulates TGF- β signaling. The present study tests the hypothesis that BAMBI plays a protective role during the adverse LV remodeling under pressure overload. The subjects of the study were BAMBI knockout mice (BAMBI^{-/-}) undergoing transverse aortic constriction (TAC) and patients with severe aortic stenosis (AS). We examined LV gene and protein expression of remodeling-related elements, histological fibrosis, and heart morphology and function. LV expression of BAMBI was increased in AS patients and TAC-mice and correlated directly with TGF- β . BAMBI deletion led to a gain of myocardial TGF- β signaling through canonical (Smads) and non-canonical (TAK1-p38 and TAK1-JNK) pathways. As a consequence, the remodeling response to pressure overload in BAMBI^{-/-} mice was exacerbated in terms of hypertrophy, chamber dilation, deterioration of long-axis LV systolic function and diastolic dysfunction. Functional remodeling associated transcriptional activation of fibrosis-related TGF-β targets, up-regulation of the profibrotic micro-RNA-21, histological fibrosis and increased metalloproteinase-2 activity. Histological remodeling in BAMBI^{-/-} mice involved TGF-B. BAMBI deletion in primary cardiac fibroblasts exacerbated TGF-B-induced profibrotic responses while BAMBI overexpression in NIH-3T3 fibroblasts attenuated them. Our findings identify BAMBI as a critical negative modulator of myocardial remodeling under pressure overload. We suggest that BAMBI is involved in negative feedback loops that restrain the TGF-B remodeling signals to protect the pressure-overloaded myocardium from uncontrolled extracellular matrix deposition in humans and mice.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Degenerative aortic valve stenosis (AS) and hypertension have become the most common cardiovascular diseases after coronary disease in developed countries with an increasing worldwide prevalence concomitant with aging of the populations. The chronic left ventricular (LV) pressure overload condition produced by such pathologies triggers severe LV structural modifications, including cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis [1], which are deleterious over time and result in progressive increases in LV stiffness, diastolic and systolic dysfunction and heart failure [2]. Aortic valve replacement, which is currently the only accepted treatment for AS, frequently fails to reverse the LV maladaptive remodeling [3]. Likewise, regression of the LV remodeling under antihypertensive treatment only seldom correlates with the degree of blood pressure reduction [4]. The persistence of either diffuse myocardial interstitial fibrosis or LV hypertrophy after therapeutic intervention predicts poorer short- and long-term survival and functional postoperative status in AS patients [5] and is a strong independent predictor of adverse cardiovascular outcomes in the hypertensive population [6]. Understanding the mechanisms governing the myocardial response to biomechanical stress is crucial to develop therapeutic strategies aimed at slowing disease progression and favoring the regression of the adverse pressure overload remodeling.

Transforming growth factors- β (TGF- β s) are key players in the LV remodeling response to pressure overload [7] in animal models [8] and in

Abbreviations: AS, Aortic stenosis; α -SMA, α -smooth muscle actin; BAMBI, BMP and activin membrane-bound inhibitor; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MMP, Matrix metalloproteinase; PO, Pressure overload; TAC, Transverse aortic constriction; TAK1, Transforming growth factor- β activated kinase; TGF- β , Transforming growth factor- β

^{*} Correspondence to: M.A. Hurlé, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, IFIMAV, E-39011 Santander, Spain. Tel.: + 34 942 201 981.

^{**} Correspondence to: J. F. Nistal, Servicio de Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, IFIMAV, E-39008 Santander, Spain. Tel.: + 34 942 202 536.

E-mail addresses: hurlem@unican.es (M.A. Hurlé), jfnistal@gmail.com (J.F. Nistal).

^{0925-4439/\$ –} see front matter 0 2012 Elsevier B.V. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.007

hypertensive and AS patients [9–11]. In the stressed myocardium, TGF- β overexpression causes fibroblast proliferation and transdifferentiation into myofibroblasts [12], endothelial-to-mesenchymal transition [13], and hypertrophic growth of cardiomyocytes [14], which collectively contribute to the progression of cardiac fibrosis and hypertrophy. TGF-Bs induce these pleiotropic cellular responses by interacting with the receptor complexes of two types of serine/threonine kinase receptors referred to as types I and II, which trigger the phosphorylation of receptor-regulated Smad (R-Smad) proteins. Phosphorylated R-Smads bind to Smad4, and the complexes move into the nucleus, where they regulate transcription [15]. Several downstream mediators of the TGF- β pathway are involved in the adverse myocardial remodeling induced by pressure overload. The TGF-B profibrogenic signals best analyzed in rodent models are mediated by the canonical transcription factors Smad2 and Smad3 [16,17]. The roles of the non-canonical, mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, including TGF_β-activated kinase 1 (TAK1) and its downstream kinases p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) are less well understood [18-20].

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNA, which function as post-transcriptional regulators of gene expression. miRNAs play a central role in diverse cellular processes, including proliferation, differentiation, and death. The last decade has revealed microRNA-21 (miR-21) as a new mediator of TGF- β 1-induced fibrosis [21]. In rodent models of pressure overload, miR-21 acts downstream of TGF- β to modulate several features of the myocardial fibrotic process [22,23]. A recent report from our group also supports such a relevant role for miR-21 in AS patients [24].

The cellular response elicited by TGF-Bs is tightly controlled by multiple mechanisms at each step in their signaling pathway [25]. BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) is a transmembrane glycoprotein structurally related to the TGF-β type I receptors, but it lacks the intracellular kinase domain. BAMBI functions as a decoy type I receptor that antagonizes TGF-\beta-family signals by preventing the formation of active receptor complexes upon ligand binding [26]. Little is known about the physiological functions regulated by BAMBI or the pathological consequences of an imbalance between BAMBI and TGF- β signaling. Recent reports indicate that aberrant BAMBI expression plays a critical role in the pathophysiology of inflammatory [27] and fibrotic processes [28] and in cancer development [29,30]. Here, we demonstrate that BAMBI plays a modulator role in TGF- β -induced profibrogenic signals in the myocardium under biomechanical stress in mice and AS patients. We propose that BAMBI protects the pressure overloaded myocardium against uncontrolled extracellular matrix deposition through a negative feedback loop that restrains TGF- β -mediated deleterious remodeling signals. Alterations in BAMBI may play a role in the pathophysiology of myocardial fibrosis, and manipulation of BAMBI might confer disease-specific therapeutic benefits.

2. Methods

2.1. Pressure overload studies in humans

During surgery, myocardial tru-cut needle biopsies (4–10 mg) were obtained from the lateral LV wall from 45 individuals undergoing cardiac surgery, including 30 patients with isolated severe AS and a control group of 15 patients with pathologies producing no significant LV pressure or volume overload (atrial septal defect, aortic aneurysm, and papillary fibroelastoma). Patients with aortic or mitral regurgitation greater than mild, major coronary stenosis greater than 50%, previous cardiac operations, malignancies or poor renal or hepatic function were ineligible for the study. The demographic and clinical characteristics of the patients are shown in Supplemental Table S1. The study followed the Declaration of Helsinki guidelines for investigation on human subjects. The Institutional Ethics and Clinical Research Committee approved the study, and all patients gave written informed consent.

2.2. Pressure overload studies in mice

Adult (16–20 weeks old) female BAMBI-deficient mice (BAMBI^{-/-}) in a C57BL/6 genetic background [31] were kindly provided by Dr. J.C. Izpisua-Belmonte (The Salk Institute, La Jolla, CA). Wild type female mice (C57BL/6) were used as controls. Mice were housed in a room kept at 22 °C with 12:12 h light/dark cycle and provided with standard food and water ad libitum. The study was approved by the University of Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee (approval ID 2008/05) and conducted in accordance with the "European Directive for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (European Communities Council Directive 86/606/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering.

2.2.1. Transverse aortic constriction

LV pressure overload was induced by calibrated banding of the aorta at the mid-transverse arch level (TAC), as described in Ref. [32]. Briefly, the mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg). The surgery was performed under spontaneous ventilation. The aorta was approached extrapleurally and constricted at the mid-arch level with a 7/0 polypropylene ligature using a blunted 27-gauge (0.41-mm OD) needle as a calibrator. This constriction induced a degree of geometric stenosis of approximately 65% in diameter. The mice were sham operated or subjected to TAC for 1 or 4 weeks (n=5 to 9 per group). After completion of the follow-up, the mice were euthanized, and the cardiac mass was measured gravimetrically and indexed to the animal's body weight. The LV samples were snap frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% paraformaldehyde for histology.

For neutralizing antibody studies, a series of BAMBI^{+/+} and BAMBI^{-/-} mice were treated during the post-constriction follow-up period with a pan-neutralizing monoclonal (1D11.16.8 clone) anti-TGF- β antibody (TGF- β Ab) specific for all isoforms of murine TGF- β or with a control isotype-matched IgG. The mice (n=4 per group) received i.p. injections of TGF- β Ab or IgG1 at the dose of 0.5 mg every other day.

2.2.2. Echocardiographic measurements

Transthoracic echocardiography was performed with ultrasound equipment [Agilent Sonos 5500 (Philips/Hewlett Packard) using 15-MHz linear and 12-MHz sectorial scanheads and Vevo-770 (VisualSonics, Toronto, ON, Canada) using a high-resolution transducer centered at 30 MHz]. Two dimensionally guided, short axis, M-mode recordings of the LV were recorded by an operator blinded to the study groups. Transcoarctation pressure gradients were measured using continuous wave Doppler analysis at the distal arch. LV dimensions and wall thicknesses were measured following the recommendations of the American Society of Echocardiography. The mitral annular plane systolic excursion (MAPSE) measurements were obtained from four-chamber views using M-mode imaging. The parameters of diastolic LV function were obtained by pulsed-wave mitral inflow analysis and tissue Doppler imaging to obtain the ratio of passive inflow by pulsed-wave to tissue Doppler (E/E'). The following parameters were derived from the recordings: heart rate, pressure gradient across the arch constriction, LV end-diastolic (LVEDd) and end-systolic (LVESd) internal diameters, interventricular septum (IVST) and posterior wall (PBW) thicknesses. The LV ejection fraction (LVEF) and mitral annular plane systolic excursion (MAPSE) were used as indices of radial and longitudinal systolic functions, respectively. The ratio of peak early transmitral flow velocity (E) to peak early myocardial tissue velocity (E') was used as an index of LV filling pressure. Cardiac mass, estimated echocardiographically or measured

gravimetrically, was indexed to the animal's body weight and expressed in mg/g.

2.3. Determination of remodeling-related mRNA and microRNA elements in the LV by real-time quantitative PCR

Total RNA from the LV myocardium and cultured cells was obtained by TRIzol extraction (Invitrogen). MirRNA was isolated using a miRNA isolation kit (mirVana, Ambion). The mRNA was reverse transcribed using random primers with an RT-PCR kit (Fermentas). MiRNAs from tissue and cells were reversed transcribed using specific primers for miR-21 and RNU6-2 (Applied Biosystems). The cDNA products were amplified by quantitative PCR (q-PCR) in a MX-3000P Stratagene thermocycler.

The sequences of primers used for SYBR Green real-time PCR were as follows: collagen I (forward primer: 5'-tcctgctgtgtgagaaaggat-3'; reverse primer: 5'-tccagcaataccctgaggtc-3'); and the housekeeping gene, ribo-somal 18S (forward primer: 5'-gtaacccgttgaaccccatt-3'; reverse primer: 5'ccatccaatcggtagtaggg-3'). The specific TaqMan assays (Applied Biosystems) used were miR-21, RNU6-2, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Smad2, Smad3, Smad4, TAK1, BAMBI, collagen III α 1 (Col III), fibronectin-1 (FN), α -smooth muscle actin (α -SMA) and 18S. The expression levels of the myocardial genes were normalized to the housekeeping gene, ribosomal 18S. Myocardial miR-21 expression was normalized to the endogenous control, RNU6-2. Duplicate transcript levels were determined in a minimum of three independent experiments.

2.4. Immunodetection of LV remodeling-related proteins by Western blot

Thirty micrograms of total or nuclear protein extracts were resolved on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad Lab., California, USA) using a Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (Bio-Rad Lab., California, USA). The primary antibodies were against BAMBI (Abnova), fibronectin-1 (Santa Cruz Biotechnology), p38 (Santa Cruz Biotechnology), JNK1/3 (Santa Cruz Biotechnology), smad4 (Cell Signaling), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) and Rb (Santa Cruz Biotechnology). After extensive washings in TBS-T (TBS + 0.05% Tween 20), the membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies. Secondary antibodies were detected using the ECL Advance kit (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany). Blot quantification was performed by densitometry using Scion Image Software.

2.5. Assessment of MMP activity in mouse LV by gelatin zymography

Detection of active forms of MMPs was assessed by zymography, as described previously [33]. Samples for analysis were diluted into a non-reducing SDS-buffer. Ten micrograms of proteins per lane were separated by electrophoresis in 10% SDS-PAGE gel containing 1% gelatin. After running, the gel was renatured through incubation in Triton X-100 (2.5% in 50 mM tris pH 7.4, 5 mM CaCl_2 and 1 μM $ZnCl_2$) for 30 min with gentle shaking at room temperature. The gel was rinsed and incubated overnight at 37 °C with developing buffer (50 mM tris pH 7.4, 5 mM CaCl₂ and 1 μ M ZnCl₂). The gel was stained with 0.5% Coomassie Blue G250 (in 30% ethanol and 10% acetic acid) for 30 min. Staining was stopped with 2% acetic acid. Zymographic bands were scanned and the optical density was measured using the ImageJ software. The problem bands were normalized to the control samples in the same gel and the data were expressed as relative activity in fold increase. Silver staining of a strip obtained from the bottom of the gel (below the 37 kDa marker) was used as loading control.

2.6. Histological assessment of myocardial fibrosis

The hearts were fixed in paraformaldehyde (3.7% in PBS, freshly prepared) for 48 h and then embedded in paraffin. Four coronal sections (5 μ m) at the level of the papillary muscles from each animal (n = 4) were stained using Masson's trichrome. Digital photographs of the full LV sections were captured using a camera (Axiocam MRc5, Zeiss) attached to a stereo-microscope (Zeiss Axiomat). In each complete LV section, the proportion of the total fibrosis area was calculated by densitometric analysis (ImageJ software) as the blue-stained areas divided by the total LV area. The operator was blinded to the experimental group during the analysis.

2.7. BAMBI immunostaining

2.7.1. Immunofluorescence

After deep anesthesia with a mixture of xylazine and ketamine, mice were perfused with heparinized saline for 1 min and fixative solution containing 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. After perfusion, the heart was dissected out and post-fixed for 12 h in the same solution at 4 °C. The tissue blocks were washed in PBS, cryoprotected with 30% sucrose at 4 °C until they sank, and stored at -80 °C. Seven microns LV sections were cut on a cryostat and mounted on gelatin-subbed slides.

Mouse LV squash preparations were prepared from small LV fragments incubated in paraformaldehyde (4% in PBS, freshly prepared) for 2 h and washed in PBS. Each tissue fragment was transferred to a drop of PBS on a siliconized slide and squash preparations of dissociated cardiomyocytes and fibroblasts were performed as previously reported in Ref. [34]. Then, the samples were sequentially treated with 0.25% collagenase in PBS for 30 min at 37 °C and 0.5% Triton X-100 in PBS for 30 min.

The primary cultures of cardiac fibroblasts were fixed with paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After extensive washing in PBS, the cells were permeabilized using 0.2% Triton X-100.

In all preparation types, nonspecific sites were blocked by incubation with PBS containing 1% BSA and 0.3 M glycine for 60 min at room temperature. After extensive washing, the samples were incubated with the primary antibodies (1/50 in PBS) overnight, at 4 °C. After washing in PBS, the samples were incubated with secondary fluorochrome-conjugated antibodies for 45 min at room temperature and washed and mounted in VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). We used primary antibodies against BAMBI (Santa Cruz Biotechnology) and vimentin (Abcam). The specific secondary antibodies were conjugated with FITC (Jackson, USA) or Cy5 (Abcam). Dapi (Sigma) was used as a nuclear counterstain. Omission of the primary or secondary antibodies completely abolished specific staining. Confocal microscope was performed with an LSM-510 laser scanning microscope (Carl Zeiss Inc., Germany) using a $40 \times$ objective.

2.7.2. Avidin-biotin complex (ABC) immunohistochemistry

BAMBI immunostaining was performed in 5 μ m sections from human LV samples fixed in 4% paraformaldehyde and included in paraffin. Heat-induced antigen retrieval was performed in 10 mM citric acid monohydrate (pH 6.0). Endogenous peroxidase was blocked with 0.3% H₂O₂ for 30 min. Sections were incubated in the anti BAMBI primary antibody (1/50 in PBS) overnight at 4 °C. After extensive washing, the sections were incubated with the biotinylated secondary antibody in PBS for 30 min followed by the complex of avidin–biotin peroxidase (Vector ABC kit) and the chromogen diaminobenzidine. Before mounting, the sections were counterstained with Harris hematoxylin. Negative controls were performed using PBS instead of the primary antibody. 2.8. Transcriptional activation of collagen I and BAMBI by recombinant TGF- β 1 in cultured NIH-3T3 fibroblasts as measured by luciferase reporter assays

The changes in collagen I and BAMBI transcription induced by recombinant TGF- β 1 were assessed in NIH-3T3 fibroblasts transiently transfected with the collagen I α 1 or BAMBI promoter regions cloned into the luciferase reporter pGL3 basic vector (pBAMBI-Luc was kindly provided by Dr. Tetsu Akiyama, Institute of Molecular and Cellular Bioscience, Tokyo). The signaling effectors were determined by silencing either Smad2/3 or TAK-1 with specific siRNAs (Santa Cruz Biotechnology). The consequence of BAMBI overexpression on TGF- β 1-induced col I transcriptional activation was assessed in cells co-transfected with the BAMBI open reading frame (BAMBI-ORF) (BAMBI-pFLCI; ImaGenes, Berlin, Germany) and pCol-Luc.

The cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin at 37 °C, in 5% CO₂. The cells were seeded onto 96 well plates $(2 \times 10^4$ /well) and cultured for 12 h. For the collagen I promoter luciferase reporter assays, the cells were transiently transfected with the following: a) pCol-Luc (50 ng); b) pCol-Luc (50 ng) plus Smad2/3 siRNA (10 nM) or control scrambled siRNA; c) pCol-Luc (50 ng) plus TAK1 siRNA (10 nM) or control siRNA; and d) pCol-Luc (50 ng) plus BAMBI-ORF-pFLCI (0.4 µg/ml) using FuGENE®6 transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals). After 8 h of incubation, increasing concentrations (0, 0.3, 0.6 and 1.5 ng/ml) of recombinant TGF- β 1 (R&D Systems) were added to the medium.

For the BAMBI promoter luciferase reporter assays, the cells were transiently transfected with the following: a) pBAMBI-Luc promoter (100 ng); b) pBAMBI-Luc (100 ng) plus Smad2/3 siRNA (10 nM) or control scrambled siRNA and c) pBAMBI-Luc (100 ng) plus TAK1 siRNA (10 nM) or control scrambled siRNA using FuGENE®6 transfection reagent (Roche Molecular Biochemicals). After 8 h of incubation, recombinant TGF- β 1 (0, 0.3 and 0.6 ng/ml) was added to the medium.

Twenty-four hours later, luciferase assays were performed using the Luciferase® Reporter Assay System (Promega) following the manufacturer's protocol. Luciferase activities were expressed in relation to the background activity of the empty pGL3-Basic or pFLCI vectors.

2.9. Effects of recombinant TGF- β 1 on mature miR-21 expression in cultured NIH-3T3 fibroblasts

NIH-3T3 cells (1×10^6) were plated in 25 cm² flasks. Twenty-four hours later, the cells were transiently transfected with 10 nM pre-miR-21 or control miRNA using FuGENE®6 in the presence of increasing concentrations of BAMBI-pFLCI (0, 0.2, 0.4 and 0.6 µg/ml) or the empty pFLCI vector control. In a series of experiments, siSmad2/3, siTAK-1 or scrambled siRNA were transfected. Four hours later, the cells were incubated with recombinant TGF- β 1 (0.3 ng/ml) for 24 h. The cells were harvested, and the mRNA and micro-RNAs were purified and retrotranscribed to perform q-PCR as described above.

2.10. Transcriptional changes induced by recombinant TGF- β 1 in primary cultures of mouse cardiac fibroblasts

Neonatal cardiac fibroblasts were isolated from C57BL/6 and BAMBI^{-/-} mice by enzymatic digestion. Briefly, the ventricles were excised, washed and minced in ice-cold PBS. The minced tissue was then digested at 37 °C with an enzyme cocktail (10 mg trypsine, 5285 units collagenase, and 85,000 units DNAse) for 30 min. The supernatants from these incubations were collected, centrifuged, and resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS, 10% donor bovine serum (DBS), 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomy-cin. For the experiments, low passage cells (p2) were seeded onto

35-mm cell culture dishes and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 15–20 h. The unattached cells were discarded, and the attached cells were cultured until approximately 70% confluent. The cells were then growth arrested by incubation in DMEM containing 1% FBS for 12 h. The fibroblasts were treated for 6 h with recombinant TGF- β 1 (0.6 ng/ml) and harvested for further analysis.

2.11. Statistics

All the assays in mice were performed in a minimum of five individuals per group (n = 5 to 9). The experiments in cultured cells were performed in triplicate and repeated on three separate occasions. Values are reported as means \pm S.E.M. The GraphPad Prism 5.01 and PASW Statistics 18 (SPSS Inc, Chicago, IL) packages were used. Student's *t*-test was used to assess differences between means of continuous variables. The influence of mice genotype and pressure overload on myocardial gene expression was assessed by a two-way ANOVA and, on echocardiographic parameters, by repeated-measures two-way ANOVA. Bonferroni post hoc test was used when appropriate. Linear regression analysis was used to detect correlations between gene expression levels. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Myocardial expression of BAMBI in mice and AS patients

Immunofluorescence studies performed in preparations of dissociated mouse cardiac cells reveal that BAMBI immunoreactivity was present in cardiomyocytes (Fig. 1A) and fibroblasts (Fig. 1B). Fibroblasts were identified based on their positive staining for the mesenchymal marker vimentin (Fig. 1C). Immunohistochemical staining performed in LV sections disclosed the presence of BAMBI immunoreactivity in the myocardium from TAC mice (Fig. 1D) and AS patients (Fig. 1E). BAMBI immunosignals were detected in cardiomyocytes, in the vascular wall (Fig. 1D, insert) including the endothelium, and in fibrotic areas. It is interesting to note that BAMBI immunoreactivity disclosed a peripheral expression pattern in cardiomyocytes, consistent with its transmembrane localization.

3.2. Parallel LV up-regulation of BAMBI and TGF- β under pressure overload in humans and mice

We assessed whether cardiac expression of BAMBI was regulated in response to pressure (Fig. 2). We found that the myocardial BAMBI mRNA and protein levels of were significantly up-regulated in AS patients and mice subjected to TAC. BAMBI mRNA levels correlated, significantly and positively, with the expression of genes encoding TGF- β 1 in AS patients and in mice with TGF- β 1, TGF- β 2 (r = 0.56, p < 0.001; n = 32) and TGF- β 3 (r = 0.69, p < 0.001; n = 32). Moreover, BAMBI also correlated with the canonical (Smad2) and non-canonical (TAK1) TGF- β transducers (Fig. 2). Pressure overload is a hemodynamic condition that is associated with intense myocardial activation of TGF- β signals in experimental models and patients [7]. Our results demonstrate a coordinated transcription of genes encoding agonists and antagonists of the TGF- β pathway during pressure overload. They also suggest that BAMBI could be a transcriptional target of TGF- β s.

3.3. Transcription of BAMBI was activated by TGF-β1 in cultured fibroblasts through Smad and TAK1 pathways

We assessed in cultured fibroblasts whether BAMBI transcription was under the control of TGF- β signaling (Fig. 3). In primary cardiac fibroblasts and NIH-3T3 fibroblasts, the addition of recombinant TGF- β 1 to the medium led to a significant increase in endogenous BAMBI mRNA expression. Cell transfection with specific siRNAs directed



Fig. 1. Immunohistological localization of BAMBI in the LV myocardium. A, B and C: Representative confocal microscopy images showing immunofluorescence staining for BAMBI (green) in a squash preparation of cardiomyocytes (A) and primary cardiac fibroblasts (B). Fibroblasts were identified based on their positive staining for the mesenchymal marker vimentin (C, red). Dapi was used as a nuclear counterstain (blue). D and E: Representative immunofluorescence staining of BAMBI in the mouse LV subjected to aortic constriction (D) and immunohistochemical (avidin-biotin complex) staining of BAMBI in the LV from AS patients (E). BAMBI immunosignals were detected in cardiomyocytes, in fibrotic areas and in the vascular wall (insert in D) including the endothelium. Note the marked peripheral staining for BAMBI in cardiomyocytes, consistent with its transmembrane localization. D' and E': Negative controls using PBS instead of the primary antibody.

against Smad2/3 or TAK1 attenuated significantly the up-regulation of BAMBI mRNA induced by recombinant TGF- β 1 in NIH-3T3 fibroblasts. The effectiveness of siRNA transfection into the cells was confirmed by Western blot experiments showing diminished protein levels of Smad2/3 and TAK1 (Supplemental Fig. S1). Silencing TAK1 also inhibited the nuclear accumulation of the TAK1-downstream kinases p38 and JNK.

We further evaluated whether TGF- β signaling is directly involved in the transcriptional activation of BAMBI in NIH-3T3 fibroblasts transfected with the BAMBI-Luc promoter and treated with recombinant TGF- β 1 (0.3 and 0.6 ng/ml). As shown in Fig. 3, upon administration of TGF- β 1, the transcriptional activity of BAMBI, reflected by the luciferase signal, increased significantly. Co-transfection of the cells with siRNAs (10 nM) against Smad2/3 or TAK1 significantly reduced the luciferase activity induced by TGF- β 1. Overall, these results establish a regulatory role for TGF- β signaling, through canonical and non-canonical pathways, on BAMBI transcriptional activity in fibroblasts.

3.4. BAMBI deletion increased the vulnerability of the LV to biomechanical stress

To determine the functional role of BAMBI in pressure overloadinduced myocardial disease, we studied $BAMBI^{-/-}$ and $BAMBI^{+/+}$ mice subjected to transverse aortic constriction (TAC). The baseline and 4-week post-TAC values of echocardiographic parameters are depicted in Supplemental Table S2. There were no differences between the two genotypes for the transcoarctational gradients at 1 to 4 weeks following TAC, indicating similar degrees of constriction in both groups. The heart rate was not significantly different between the $BAMBI^{+/+}$ and $BAMBI^{-/-}$ groups. The hypertrophy developed after TAC reached greater values and developed at a more accelerated pace in BAMBI^{-/-} mice compared with BAMBI^{+/+}, as indicated by the echocardiographic LV mass (Fig. 4, Supplemental Table S2) and the gravimetric heart mass indexed to the body weight (BAMBI^{+/+}: 6.20 ± 1.5 mg/g vs. $BAMBI^{-/-}$: 7.5 \pm 1.5 mg/g; p<0.001). Additionally, during the 4-week follow up after TAC, significant differences in the LV geometry and function were apparent between the BAMBI^{-/-} and BAMBI^{+/+} mice. The hearts from the BAMBI^{-/-} mice exhibited more severe LV dilation, reaching significantly higher LVEDds and LVESds than the BAMBI^{+/+} mice (Fig. 4 and Supplemental Table S2). The LV PWTs and IVSTs at baseline and their increases after TAC were similar in both genotypes (Supplemental Table S2). The LVEF, which reflects the LV short-axis systolic function, was negligibly, although significantly reduced by TAC in the BAMBI $^{-/-}$ compared with the BAMBI $^{+/+}$ mice (Fig. 4). The LV long-axis systolic function, reflected by MAPSE, was also significantly lower in the KO than in the wild type group, either at baseline or at any time after TAC (Fig. 4). The LV filling pressure, reflected by the ratio E/E' (Fig. 4), increased after TAC in both genotypes, although the rise was significantly higher in the $BAMBI^{-/-}$ than in the $BAMBI^{+/+}$ mice (Fig. 4).

Overall, these results indicate that BAMBI was up-regulated during the pressure overload, and that deletion of the gene encoding BAMBI aggravated pressure overload-induced hemodynamic deterioration.

3.5. BAMBI deletion promoted increased TGF- β signaling in the myocardium

In the next steps, we focused on the mechanisms involved in the detrimental consequences of BAMBI deletion on heart function under biomechanical stress. Given that BAMBI functions as a negative regulator of TGF- β s, we initially assessed whether the release of such inhibition in BAMBI^{-/-} mice resulted in increased TGF- β signaling. The nuclear amounts of canonical and non-canonical TGF- β signaling

A.V. Villar et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1832 (2013) 323-335



Fig. 2. Pressure overload induced LV myocardial up-regulation of BAMBI mRNA relative expression (RE, normalized to 18S) in AS patients (A) and mice subjected to transverse aortic constriction (TAC) (F). Representative Western blots showing myocardial overexpression of BAMBI protein in AS patients (B) and TAC mice (G). Linear regression analysis, in AS patients and TAC mice, showing the positive correlation between the myocardial mRNA expression of BAMBI and TGF- β 1 (C and H), Smad-2 (D and I) and TAK1 (E and J). r = Pearson's correlation coefficient.

mediators were significantly higher in the BAMBI^{-/-} mice compared to the BAMBI^{+/+} mice at baseline and following TAC. As shown in Fig. 5, the nuclear protein levels of Smad4 and the downstream MAP kinases, TAK1, JNK and p38, were significantly higher in the myocardium

from the sham BAMBI^{-/-} mice compared to the sham BAMBI^{+/+} mice. Furthermore, when subjected to pressure overload, the myocardium from the TAC-mice by the 4-week follow up developed a significant up-regulation of genes encoding TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3, with no



Fig. 3. A: Effect of recombinant TGF-β1 on endogenous BAMBI mRNA relative expression (RE, normalized to 18S) in primary cardiac fibroblasts. B: Effect of silencing Smad2/3 and TAK1 with specific siRNAs (10 nM) on TGF-β1-induced BAMBI relative expression in NIH-3T3 fibroblasts. C: Effect of recombinant TGF-β1 on luciferase activity and the antagonism by siRNAs (10 nM) against Smad2/3 and TAK1 in NIH-3T3 cells transfected with the promoter region of BAMBI in a luciferase reporter vector. The results are expressed as relative luciferase units (RLU). ***p<0.001 vs. TGF-β1 + siScr-RNA (ANOVA followed by Bonferroni).

significant differences between the two genotypes (Fig. 5). However, the nuclear accumulations of Smad4, JNK and p38 were higher in the TAC-BAMBI^{-/-} mice compared to their TAC-BAMBI^{+/+} littermates

(Fig. 5). These data indicate that BAMBI deletion prompts a gain of TGF- β canonical and non-canonical signaling with pathophysiological consequences on LV remodeling under biomechanical stress.



Fig. 4. The echocardiographic dimensional and functional changes induced by pressure overload during a 4-week follow-up period in mice subjected to transverse aortic constriction (TAC). IVST: interventricular septum thickness; LVEDd: left ventricular end-diastolic dimension; E/E': ratio of peak early transmitral flow velocity (E) to peak early myocardial tissue velocity (E'); LVEF: left ventricular ejection fraction; MAPSE: mitral annular plane systolic excursion. TAC-BAMBI^{-/-} vs. TAC-BAMBI^{+/+}: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 (Repeated-measures two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test).

A.V. Villar et al. / Biochimica et Biophysica Acta 1832 (2013) 323-335



Fig. 5. Myocardial relative expression (RE) levels of mRNAs (normalized to 18S) encoding TGF- β 1 (A), TGF- β 2 (B), and TGF- β 3 (C) in BAMBI^{+/+} and BAMBI^{-/-} mice, either sham operated or subjected to transverse aortic constriction (TAC) for 1 or 4 weeks. Pressure overload induced a significant up-regulation of TGF- β s, with no significant differences between genotypes (two-way ANOVA). Representative Western blot images showing that the nuclear accumulation of canonical and non-canonical TGF- β s signaling mediators Smad4 (D), p38 (E) and JNK (F) were higher in the BAMBI^{-/-} compared to the BAMBI^{+/+} mice that were either sham operated or subjected to TAC. Loading controls were performed with the nuclear protein ELK-1.

3.6. BAMBI deletion exacerbated the development of myocardial remodeling in response to pressure overload

The pressure overload induced by TAC caused the up-regulation of TGF- β target genes that encode extracellular matrix proteins related to myocardial fibrosis in mice from both genotypes (Fig. 6). Collagen I, collagen III and fibronectin mRNA expression were significantly higher, and their up-regulation was more accelerated during the 4-week follow-up period in the BAMBI^{-/-} mice compared to the BAMBI^{+/+} mice. Histological examination of the hearts with Masson's trichrome staining confirmed that the degree of fibrosis was more severe in the BAMBI^{-/-} mice compared to the BAMBI^{+/+} mice (Fig. 6 and Supplemental Fig. S2). Densitometric analysis indicated that the fraction of the LV surface occupied by fibrosis was 3.5 ± 0.9-fold greater in the BAMBI^{-/-} mice compared to the BAMBI^{+/+} mice (Supplemental Fig. S2). Western blot analysis confirmed that, following TAC, fibronectin also reached higher expression in the myocardium from BAMBI^{-/-} mice (Fig. 6).

Under basal conditions, the myocardial expression of collagen III mRNA was significantly higher in the sham-BAMBI^{-/-} mice compared to the sham-BAMBI^{+/+} group (Fig. 6). However, the percentage of the LV fibrosis area stained by Masson trichrome was negligible (Supplemental Fig. S2) and had no consequences on the systolic function of the sham-BAMBI^{-/-} animals (Fig. 4).

3.7. BAMBI deletion increased myocardial metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and activity in response to pressure overload

The LV transcript levels of MMP-2 increased following TAC, reaching significantly higher values in BAMBI^{-/-} than in BAMBI^{+/+} mice (Fig. 7). Also, gel zymography revealed in both TAC and sham operated mice a band exhibiting gelatin-degrading activity at 64 kDa molecular weight, consistent with active MMP-2 (Fig. 7). Following TAC, the

myocardium from BAMBI^{-/-} mice displayed significantly higher MMP-2-gelatinase activity compared with their wild type littermates (Fig. 7). MMP-2 mRNA levels correlated, significantly and positively with the expression of genes encoding TGF- β 1 (r=0.43, p<0.01; n=32), TGF- β 2 (r=0.69, p<0.001; n=32) and TGF- β 3 (r=0.63, p<0.001; n=32). MMP-2 also correlated with the non-canonical effector TAK1 (r=0.53, p<0.001; n=32) but it was unrelated to the canonical (Smads) TGF- β transducers (data not shown). Overall, these results suggest that MMP-2 may be a transcriptional target of TGF- β s.

The mice subjected to TAC displayed, regardless of genotype, a positive linear correlation between the myocardial transcript levels of MMP-2 and the LVEDd (r=0.56, p=0.02, n=26), supporting the notion that, in this scenario, chamber dilation and MMP activity are linked.

3.8. Treatment with TGF- β neutralizing antibody attenuated pressure overload-induced cardiac fibrosis in the BAMBI^{-/-} mice

The involvement of TGF- β in the myocardial fibrotic process under pressure overload has been previously demonstrated by our group [35] and others [20] using neutralizing monoclonal antibodies against TGF- β in C57BL6 wild-type mice. Here, we assessed whether TGF- β s were also responsible for the severe fibrosis displayed by the BAMBI^{-/-} mice. For this purpose, a series of mice were treated during the post-constriction follow-up period with the neutralizing antibody anti-TGF- β (0.5 mg every other day, starting on the day of surgery) or with an IgG1 control. Both the TAC-BAMBI^{+/+} and TAC-BAMBI^{-/-} mice treated with the TGF- β -Ab displayed markedly reduced fibrosis compared to the control mice of each genotype treated with IgG1, as indicated by Masson's trichrome staining of the heart sections (Supplemental Fig. S2). These results are consistent with a relevant participation of TGF- β s in the fibrotic process induced by pressure overload in both genotypes.



Fig. 6. BAMBI-deficient mice exhibit more severe cardiomyopathy after pressure overload. Relative mRNA expression of genes encoding remodeling-related elements in BAMBI^{+/+} and BAMBI^{-/-} mice, either sham operated or subjected to aortic arch constriction (TAC). A: Collagen I (Col I); B: Collagen III (Col III); C: Fibronectin 1 (FN-1). The mRNA expressions were normalized to 18S. Data are expressed as means \pm SEM. *p<0.01, **p<0.01, **p<0.001, BAMBI^{-/-} vs. BAMBI^{+/+} (two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test). The insert in C shows representative Western blot images of fibronectin protein levels in each experimental group. D: Representative transverse cross-sections of Masson's trichrome-stained hearts. E: Relative gene expression of extracellular matrix proteins (collagen I (col and fibronectin), the myofibroblast marker α -SMA and the housekeeping protein GAPDH in primary cardiac fibroblasts cultured in the presence of recombinant TGF- β 1 (0.6 ng/ml) for 6 h. The results are expressed as the fold increase in the mRNA levels upon TGF- β 1 stimulation in fibroblasts from BAMBI^{-/-} mice compared to BAMBI^{+/+} mice. **p<0.01, *p<0.05 (Student's t test).

3.9. The fibrogenic responses induced by TGF- β 1 were dependent on canonical- and non-canonical effectors

We analyzed the signaling effectors involved in TGF- β 1-induced transcriptional changes in NIH-3T3 fibroblasts by silencing either

Smad2/3 or TAK-1 with specific siRNAs. Cells transiently transfected with pCol-Luc reporter responded upon stimulation with recombinant TGF- β 1 with a significant, concentration-dependent increase in the luciferase activity relative to the vector control, which was antagonized by either siSmad2/3 or siTAK1 (Fig. 8).



Fig. 7. Effects of transverse aortic constriction (TAC) on myocardial relative expression (RE) of mRNA encoding matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) (A) and zymography determined myocardial MMP-2-gelatinase activity (B) in BAMBI^{+/+} and BAMBI^{-/-} mice. The transcript levels of MMP-2 and the gelatinase activity dependent of MMP-2 (64 kDa) reached significantly higher levels in BAMBI^{-/-} compared with BAMBI^{+/+} mice 4 weeks after TAC. A: The mRNA expression was normalized to 18S. B: Representative gel showing gelatin lysis in the regions comigrating with MMP-2. Silver staining of a strip obtained from the bottom of the gel (below the 37 kDa marker) was used for loading control. The bar diagram represents the gelatinase activity determined by optical densitometry of the zymographic bands. The problem bands were normalized to the control bands in the same gel. Data are expressed as means \pm SEM. *p<0.05, ***p<0.001, BAMBI^{-/-} vs. BAMBI^{+/+} (ANOVA and Bonferroni post-hoc test).



Fig. 8. A: NIH3T3 fibroblasts transiently transfected with the Col α 1-luc reporter responded to recombinant TGF- β 1 with a significant, concentration-dependent increase in luciferase activity (black circles), which was prevented by silencing Smad2/3 (open circles) and TAK1 (open diamonds) with specific siRNAs (10 nM). B: Co-transfection of NIH-3T3 cells with collagen α 1-luc reporter plus BAMBI-ORF (0.2 µg/ml) produced a significant reduction in luciferase activity, either basal or induced by TGF- β 1. The results are expressed as luciferase activity relative to the signal of cells transfected with empty vectors (PGL3 in A and pFLC1 in B). Data are the mean±SEM of three independent experiments. *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.001.

3.10. In cultured cells, the fibrogenic effects of recombinant TGF- β 1 were enhanced by BAMBI deletion and attenuated by BAMBI overexpression

To further confirm that TGF- β induces stronger profibrotic responses in the absence of BAMBI, primary cardiac fibroblasts from BAMBI^{-/-} and BAMBI^{+/+} mice were cultured in the presence of recombinant TGF- β 1. Upon TGF- β 1 stimulation, the mRNA expression levels of fibrosis-related TGF- β -target genes, such as collagen I, collagen III, fibronectin and the myofibroblast marker α -SMA (Fig. 6), and

miR-21 (Fig. 9), reached significantly higher values in fibroblasts lacking BAMBI compared to those from $BAMBI^{+/+}$ mice.

We next studied whether BAMBI overexpression has opposite effects on TGF- β 1-induced transcription in NIH-3T3 fibroblasts. For this purpose, cells were co-transfected with BAMBI-pFLC1 and a Col-Luc reporter. The overexpression of BAMBI produced by BAMBI-pFLC1 transfection resulted in a significant reduction in collagen I transcription, as reflected by the luciferase activity (Fig. 8), at baseline and following the addition of TGF- β 1 to the medium.



Fig. 9. A: Myocardial relative expression (RE) of mature miR-21 (normalized to RNU6-2). Up-regulation of myocardial miR-21 after transverse aortic constriction (TAC) was significantly higher in BAMBI^{-/-} mice compared to BAMBI^{+/+} mice (*p<0.05, ***p<0.001, TAC vs. sham; ⁵p<0.05, BAMBI^{+/+} vs. BAMBI^{-/-}; two-way ANOVA followed by Bonferroni). B: Recombinant TGF- β 1 induces mature miR-21 overexpression in primary cardiac fibroblasts from BAMBI^{+/+} and BAMBI^{-/-} mice. The expression of miR-21 was significantly higher in BAMBI^{-/-} mice compared to BAMBI^{+/+} mice (***p<0.001, ANOVA followed by Bonferroni). C: In NIH-3T3 fibroblasts transfected with pre-miR21 (10 nM), TGF- β 1 induces the up-regulation of mature miR-21, which is prevented by silencing Smad2/3 and TAK1 with specific siRNAs (10 nM). D: In NIH-3T3 fibroblasts transfected with pre-miR21 (10 nM), co-transfection of the BAMBI open reading frame (BAMBI-ORF) caused increased expression of BAMBI mRNA (right Y axis) and protein (insert). In parallel, the up-regulation of mature miR-21 (left Y axis) induced by BAMBI overexpression. Insert: representative Western blot showing increased BAMBI protein expression following transfection with BAMBI-ORF.

3.11. BAMBI modulates TGF- β -induced miR-21 overexpression

Recent studies have strongly suggested that overexpression of miR-21 in cardiac fibroblasts is crucially involved in the pro-fibrotic effects of TGF- β in mice subjected to pressure overload [22] and in AS patients [24]. Accordingly, we found that miR-21 was up-regulated in the myocardium from mice of either BAMBI genotype when subjected to TAC, and that its expression reached significantly higher values in BAMBI^{-/-} compared to BAMBI^{+/+} mice (Fig. 9). Moreover, primary cardiac fibroblasts obtained from mice lacking BAMBI responded upon TGF- β 1 stimulation with a significantly higher miR-21 overexpression compared to those obtained from the BAMBI^{+/+} (Fig. 9). Conversely, transfection of NIH-3T3 fibroblasts with BAMBI induced BAMBI overexpression that prevented the up-regulation of mature miR-21 induced by TGF- β 1 (Fig. 9).

Silencing of either Smad2/3 or TAK1 with specific siRNAs prevented TGF- β 1-induced up-regulation of mature miR-21 in NIH-3T3 fibroblasts (Fig. 9), indicating the involvement of canonical and non-canonical TGF- β transducers.

4. Discussion

This study for the first time demonstrates that the TGF- β pseudoreceptor BAMBI is expressed in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes. Our central finding is that BAMBI plays a pathophysiological role in the modulation of the adverse cardiac remodeling by restraining TGF- β signals in the myocardium, and BAMBI is a potentially important target for limiting TGF- β activity in the heart under biomechanical stress. Our characterization of BAMBI functions in vivo and in cultured cells adds new insights to the complex regulation of TGF- β signaling.

In the last few years, the decoy receptor BAMBI has emerged as a crucial negative regulator of the TGF- β superfamily signals [26], with a relevant role for their fine tuning during embryogenesis [36]. Although BAMBI is dispensable for mouse embryo development and postnatal survival [31], several reports have underlined the importance of a reliable negative regulation of TGF- β by BAMBI for tissue homeostasis during adulthood. Aberrant BAMBI expression conveys TGF- β signaling alterations in different organs and tissues, with relevant pathophysiological implications in processes such as neuropathic pain [31,37], hepatic fibrosis [28], and tumor growth and metastasis [29,30,38]. In our study, we identified that myocardial expression of BAMBI mRNA is increased in patients with severe AS and mice subjected to aortic arch constriction. These results support that myocardial BAMBI overexpression is a conserved feature of the pressure overload in the clinic and in experiments. Moreover, in the stressed myocardium from AS patients and TAC-mice, the transcript levels of BAMBI maintained a direct correlation with TGF-B1 and with the major effectors of its canonical (Smads) and non-canonical (TAK1) signaling pathways. Such a coordinated spatio-temporal expression pattern is typically depicted by BAMBI and agonists belonging to the TGF- β family (BMPs) and their effectors during embryogenesis in a gene organization termed synexpression, which reflects a cooperative function in the regulation of biological processes. In this context, a key feature of the BMP synexpression group is the existence of negative feed-back loops in which the agonists induce the transcriptional activation of the antagonists [36,39]. In a similar way, in the adult myocardium, TGF- β could promote the expression of its inhibitory counterpart, BAMBI, setting up an auto-regulatory negative-feedback loop. Our data in cultured cells support that BAMBI is a direct transcriptional target of TGF- β signaling and that the mechanism involves canonical Smad2/3 and non-canonical TAK1 pathways.

In patients with AS, the increased parietal systolic stress induced by the LV outflow obstruction triggers the activation of various signaling cascades [40] that initiate a progressive process of structural and functional abnormalities, which ultimately result in heart failure [41]. TGF- β has been repeatedly reported to exert a myriad of pleiotropic effects on cardiac cells, which underlie the LV remodeling in AS patients [7,9–11] and animal models [8]. Cardiac tissue fibrosis is a major feature among the remodeling phenomena and one that carries with it a bleak clinical prognosis in terms of survival and functional status [42]. Our present results are consistent with the current understanding that augmented TGF- β signaling results in deleterious ECM deposition (mainly collagens I and III and fibronectin) which increases myocardial stiffness and, as a consequence, interferes with LV diastolic and systolic functions [7,42,43]. We propose that the coordinated myocardial expression pattern of BAMBI with TGF- β aims to restrain the hypertrophic and fibrogenic signals of this potent cytokine. In this way, BAMBI could exert a modulation of the turnover of extracellular matrix and sarcomeric components to reach a "balanced" remodeling response to the current hemodynamic loading conditions. Our results in $BAMBI^{-/-}$ and $BAMBI^{+/+}$ mice subjected to transverse aortic constriction further support this hypothesis. As expected, the absence of the inhibitory influence of BAMBI prompted more effective TGF- β cell signaling, both at baseline and after TAC, involving the canonical (Smad) and non-canonical (TAK1) signaling pathways. Thus, BAMBI^{-/-} mice, compared to BAMBI^{+/+} littermates, showed a higher nuclear expression of Smad4 and MAPKs downstream of TAK1, such as p38–MAPK and JNK–MAPK, at any pressure load condition. Consequently, the progression of LV myocardial fibrosis and hypertrophy were exacerbated and accelerated following CAT in BAMBI^{-/-} mice compared to their BAMBI^{+/+} littermates.

From a functional point of view, TAC induced a significant, albeit small, reduction in the short-axis systolic function (reflected by LVEF) in BAMBI deficient mice in comparison with the wild type group. Also, the baseline LV longitudinal systolic function (reflected by MAPSE) was significantly poorer in $BAMBI^{-/-}$ mice than in their wild type littermates and it experienced a significant and similar worsening in both genotypes following TAC. In the clinical scenario, it is repeatedly observed that even severe myocardial fibrosis does not result in a significant deterioration of the LV short-axis systolic function as reflected by LVEF [42,44]. On the other hand, LV longitudinal systolic function deteriorates early under pressure overload, even though short-axis function remains relatively preserved [42], because it is driven by the subendocardial layer of longitudinal muscle fibers which is most vulnerable to the elevated systolic wall stress and subsequent fibrotic reaction [45]. Many clinical research studies underscore the importance of myocardial fibrosis to diastolic dysfunction [42]. LV properties such as passive stiffness, viscoelasticity, distensibility and relaxation, which play a very relevant role in dictating LV behavior during diastole, are strongly affected by even small changes in the amount and composition of the extracellular matrix [45]. In BAMBI^{-/-} mice, the LV filling pressure (reflected by its surrogate variable E/E') increased significantly after TAC and reached higher values than in wild type animals, in the absence of relevant LVEF deterioration, which strongly suggests the existence of diastolic dysfunction. These results are consistent with the more severe fibrosis developed by $\mathrm{BAMBI}^{-/-}$ mice and mirror the findings in patients with severe AS that feature a stepwise positive correlation between the severity of the LV histological fibrosis and E/E' values [42].

BAMBI^{-/-} mice trend to dilate more severely the LVEDD after TAC than the wild type reproduces the clinical finding of greater chamber dilation in those AS patients with more severe myocardial fibrosis [42]. Several clinical and experimental studies suggest that an increase in the activity of MMPs underlies LV dilation while MMP inhibition in mice attenuates LV dilation in experimental models of heart failure [46]. Accordingly, in the present study, MMP-2 was transcriptionally activated following TAC in both BAMBI genotypes and its mRNA levels correlated significantly and positively with the diastolic dilation of the chamber. In parallel with the LV dilation, the transcript levels of MMP-2 and its gelatinase activity reached significantly higher values in BAMBI^{-/-} mice than in the wild type group. Since

TGF- β is a profibrotic cytokine that can inhibit MMP transcription, through its Smad-mediated canonical signaling, and thereby reduce ECM turnover [46], it could be presumed that BAMBI deletion and subsequent TGF- β signaling hyperactivity would exaggerate such an effect. However, in our study MMP-2 expression correlated positively and significantly with the expression of the three isoforms of TGF- β and with their non-canonical effector TAK1, which suggests this signaling pathway to activate MMP-2 transcription under our experimental conditions. Else, it has been demonstrated that TGF-B can activate Smad-independent transcriptional complexes, such as the Ets family of transcription factors, which would also induce certain MMP types [47]. Transcriptional activation of MMP-2 by TGF- β may also occur via an indirect mechanism dependent on miR-21 overexpression [48]. Thus, as pointed out by Spinale [46], TGF- β might exert dual responses with respect to MMP transcriptional activity depending on cell type, local concentration or temporal factors. We suggest that the absence of BAMBI, by altering the level of TAK1-mediated TGF- β signaling, would favor MMP transcription which is translated into increased MMP-2 collagenase activity.

Collagen I is a major target gene of TGF- β 1 and is responsible for more than 85% of the total ECM deposition in fibrotic processes. Consistently, NIH-3T3 fibroblasts transiently transfected with the Col α 1-promoter-Luc reporter, upon stimulation with recombinant TGF- β 1, responded with a significant increase in luciferase activity, by a mechanism involving Smad2/3 and TAK1. In contrast, when NIH-3T3 cells were transiently transfected with BAMBI, a significant reduction in TGF- β 1-induced Col I-luciferase reporter expression was found, which underscores the functional antagonistic effect of BAMBI on TGF- β signaling.

MiRNAs are important regulators of cardiac biology with significant roles in diverse cardiac pathological processes. MiR-21 has been reported as a pro-fibrotic miRNA in many organs, including heart [21]. In the mouse LV subjected to pressure overload, miR-21 is up-regulated to promote fibroblast survival and growth factor secretion, via down-regulation of Spry1 and subsequent increase of ERK-MAP kinase activity. The resultant cardiac interstitial fibrosis and hemodynamic dysfunction can be attenuated by treatment of mice with an antagomir against miR-21 [22,23]. In AS patients, we provided evidence supporting that both myocardial and plasmatic miR-21, acting synergically with TGF- β signal transducers, play a significant role in the maladaptive remodeling of the extracellular matrix triggered by pressure overload [24]. Previous studies evidenced that miR-21 is critically involved in the changes in cellular phenotype produced by TGF- β profibrotic signals, including fibroblast proliferation, myofibroblast differentiation and endothelial to mesenchymal transition [23]. Herein, TAC-induced up-regulation of myocardial mature miR-21 reached significantly higher values in BAMBI^{-/-} compared to $\textsc{BAMBI}^{+/+}$ mice. Accordingly, the overexpression of miR-21 elicited by recombinant TGF-B1 in primary cardiac fibroblasts reached higher values when the fibroblasts were obtained from BAMBI^{-/-} mice. In cultured cells, miR-21 is under the transcriptional and post-transcriptional control by canonical TGF- β signaling; Smad3 is crucial for miR-21 transcription [49] and both Smad2 and Smad3 are able to interact with the p68 RNA helicase of the Drosha microprocessor complex, promoting the restriction of pri-miR-21 into the precursor pre-miR-21 [50]. In our study, TGF-B1 induced up-regulation of mature miR-21 in NIH-3T3 fibroblasts was prevented by silencing Smad2/3 or TAK1 with specific siRNAs and by impairing TGF- β signaling via BAMBI overexpression. Overall, our present results further support that miR-21 biogenesis in fibroblasts is dependent on TGF-B1 signaling, through both canonical Smad-dependent and non-canonical TAK1-dependent pathways, and BAMBI functions as a negative regulator of such TGF- β function.

In conclusion, our findings in AS patients, experimental animals and cultured cells constitute the first evidence identifying the TGF- β pseudoreceptor BAMBI as a new player, and potential target for therapy, in remodeling of the heart under pressure overload. We propose that myocardial expression of BAMBI is regulated in a coordinated manner with TGF- β s to restrain the hypertrophic and fibrogenic signaling of these cytokines through a negative feedback loop. In this way, BAMBI could modulate the turnover of extracellular matrix components to reach a robust remodeling response "balanced" to the current hemodynamic loading condition. Alterations in BAMBI may play a role in the pathophysiology of myocardial fibrosis, and manipulation of BAMBI might confer disease-specific therapeutic benefits. Further experimental and clinical studies are warranted to clarify whether such approaches may offer new therapeutic opportunities for the palliation of pathological myocardial fibrosis.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.007.

Funding

This work was supported by: Instituto de Salud Carlos III (PS09/ 01097); Fundación Marqués de Valdecilla-Universidad de Cantabria (FMV-UC 09/01); Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (FMV-API 10/20); and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-16894).

Acknowledgements

We acknowledge the technical assistance of Nieves García, Ana Cayón, Amalia Cavayé, Elena Martín, RN, Roberto Moreta, RN, and Ana Sandoval.

References

- J.N. Cohn, R. Ferrari, N. Sharpe, R. Int Forum Cardiac, Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. I. Am. Coll. Cardiol. 35 (2000) 569–582.
- [2] J.A. Hill, E.N. Olson, Mechanisms of disease: cardiac plasticity, N. Engl. J. Med. 358 (2008) 1370–1380.
- [3] A. Ozkan, S. Kapadia, M. Tuzcu, T.H. Marwick, Assessment of left ventricular function in aortic stenosis, Nat. Rev. Cardiol. 8 (2011) 494–501.
- [4] L.M. Ruilope, R.E. Schmieder, Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients, Am. J. Hypertens. 21 (2008) 500–508.
- [5] W.M. Yarbrough, R. Mukherjee, J.S. Ikonomidis, M.R. Zile, F.G. Spinale, Myocardial remodeling with aortic stenosis and after aortic valve replacement: mechanisms and future prognostic implications, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 143 (2012) 656–664.
- [6] P.M. Okin, R.B. Devereux, S. Jern, S.E. Kjeldsen, S. Julius, M.S. Nieminen, S. Snapinn, K.E. Harris, P. Aurup, J.M. Edelman, H. Wedel, L.H. Lindholm, B. Dahlöf, LIFE Study Investigators, Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events, JAMA 292 (2004) 2343–2349.
- [7] E.E. Creemers, Y.M. Pinto, Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart, Cardiovasc. Res. 89 (2011) 265–272.
- [8] M. Dobaczewski, W. Chen, N.G. Frangogiannis, Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling, J. Mol. Cell. Cardiol. 51 (2011) 600–606.
- [9] J. Fielitz, S. Hein, V. Mitrovic, R. Pregla, H.R. Zurbrugg, C. Warnecke, J. Schaper, E. Fleck, V. Regitz-Zagrosek, Activation of the cardiac renin–angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease, J. Am. Coll. Cardiol. 37 (2001) 1443–1449.
- [10] A.V. Villar, M. Llano, M. Cobo, V. Exposito, R. Merino, R. Martin-Duran, M.A. Hurle, J.F. Nistal, Gender differences of echocardiographic and gene expression patterns in human pressure overload left ventricular hypertrophy, J. Mol. Cell. Cardiol. 46 (2009) 526–535.
- [11] A.V. Villar, M. Cobo, M. Llano, C. Montalvo, F. Gonzalez-Vilchez, R. Martin-Duran, M.A. Hurle, J.F. Nistal, Plasma levels of transforming growth factor-beta 1 reflect left ventricular remodeling in aortic stenosis, PLoS One 4 (2009).
- [12] V.V. Petrov, R.H. Fagard, P.J. Lijnen, Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta(1) during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts, Hypertension 39 (2002) 258–263.
- [13] E.M. Zeisberg, O. Tarnavski, M. Zeisberg, A.L. Dorfman, J.R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W.T. Pu, A.B. Roberts, E.G. Neilson, M.H. Sayegh, S. Izumo, R. Kalluri, Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis, Nat. Med. 13 (2007) 952–961.
- [14] J.E.J. Schultz, S.A. Witt, B.J. Glascock, M.L. Nieman, P.J. Reiser, S.L. Nix, T.R. Kimball, T. Doetschman, TGF-beta 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II, J. Clin. Invest. 109 (2002) 787–796.

- [15] K.J. Gordon, G.C. Blobe, Role of transforming growth factor-β superfamily signaling pathways in human disease, Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis. 1782 (2008) 197–228.
- [16] J.L. Bjornstad, B. Skrbic, H.S. Marstein, A. Hasic, I. Sjaastad, W.E. Louch, G. Florholmen, G. Christensen, T. Tonnessen, Inhibition of SMAD2 phosphorylation preserves cardiac function during pressure overload, Cardiovasc. Res. 93 (2012) 100–110.
- [17] M. Bujak, G. Ren, H.J. Kweon, M. Dobaczewski, A. Reddy, G. Taffet, X.-F. Wang, N.G. Frangogiannis, Essential role of smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling, Circulation 116 (2007) 2127–2138.
- [18] L. Li, D. Fan, C. Wang, J.-Y. Wang, X.-B. Cui, D. Wu, Y. Zhou, L.-L. Wu, Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF-beta 1 pathways in cardiac fibroblasts, Cardiovasc. Res. 91 (2011) 80–89.
- [19] D. Zhang, V. Gaussin, G.E. Taffet, N.S. Belaguli, M. Yamada, R.J. Schwartz, L.H. Michael, P.A. Overbeek, M.D. Schneider, TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice, Nat. Med. 6 (2000) 556–563.
- [20] N. Koitabashi, T. Danner, A.L. Zaiman, Y.M. Pinto, J. Rowell, J. Mankowski, D. Zhang, T. Nakamura, E. Takimoto, D.A. Kass, Pivotal role of cardiomyocyte TGF-beta signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload, J. Clin. Invest. 121 (2011) 2301–2312.
 [21] T. Bowen, R.H. Jenkins, D.J. Fraser, MicroRNAs, transforming growth factor beta-1,
- [21] T. Bowen, R.H. Jenkins, D.J. Fraser, MicroRNAs, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis, J. Pathol. (2012), http://dx.doi.org/10.1002/path.4119.
- [22] T. Thum, C. Gross, J. Fiedler, T. Fischer, S. Kissler, M. Bussen, P. Galuppo, S. Just, W. Rottbauer, S. Frantz, M. Castoldi, J. Soutschek, V. Koteliansky, A. Rosenwald, M.A. Basson, J.D. Licht, J.T.R. Pena, S.H. Rouhanifard, M.U. Muckenthaler, T. Tuschl, G.R. Martin, J. Bauersachs, S. Engelhardt, MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts, Nature 456 (2008) 980–983.
- [23] R. Kumarswamy, I. Volkmann, V. Jazbutyte, S. Dangwal, D.-H. Park, T. Thum, Transforming growth factor-beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32 (2012) 361-U441.
- [24] A.V. Villar, R. Garcia, D. Merino, M. Llano, M. Cobo, C. Montalvo, R. Martin-Duran, M.A. Hurle, J.F. Nistal, Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients, Int. J. Cardiol. (Aug 8 2012).
- [25] S. Itoh, P. ten Dijke, Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction, Curr. Opin. Cell Biol. 19 (2007) 176–184.
 [26] D. Onichtchouk, Y.G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Dellus, J. Massague, C.
- [26] D. Onichtchouk, Y.G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Dellus, J. Massague, C. Niehrs, Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI, Nature 401 (1999) 480–485.
- [27] D. Droemann, J. Rupp, K. Rohmann, S. Osbahr, A.J. Ulmer, S. Marwitz, K. Roeschmann, M. Abdullah, H. Schultz, E. Vollmer, P. Zabel, K. Dalhoff, T. Goldmann, The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable *Haemophilus influenzae*, Respir. Res. 11 (2010).
- [28] E. Seki, S. De Minicis, C.H. Oesterreicher, J. Kluwe, Y. Osawa, D.A. Brenner, R.F. Schwabe, TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis, Nat. Med. 13 (2007) 1324–1332.
- [29] T. Sekiya, S. Adachi, K. Kohu, T. Yamada, O. Higuchi, Y. Furukawa, Y. Nakamura, T. Nakamura, K. Tashiro, S. Kuhara, S. Ohwada, T. Akiyama, 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. 279 (2004) 6840–6846.
- [30] J. Fritzmann, M. Morkel, D. Besser, J. Budczies, F. Kosel, F.H. Brembeck, U. Stein, I. Fichtner, P.M. Schlag, W. Birchmeier, A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential, Gastroenterology 137 (2009) 165–175.
- [31] M. Tramullas, A. Lantero, A. Diaz, N. Morchon, D. Merino, A. Villar, D. Buscher, R. Merino, J.M. Hurle, J. Carlos Izpisua-Belmonte, M.A. Hurle, BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation, J. Neurosci. 30 (2010) 1502–1511.

- [32] P. Hu, D.F. Zhang, L. Swenson, G. Chakrabarti, E.D. Abel, S.E. Litwin, Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285 (2003) H1261–H1269.
- [33] X. Hu, C. Beeton, Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography, J. Vis. Exp. 45 (2010) e2445.
- [34] E. Pena, M.T. Berciano, R. Fernandez, J.L. Ojeda, M. Lafarga, 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. 430 (2001) 250–263.
- [35] C. Montalvo, A.V. Villar, D. Merino, R. Garcia, M. Ares, M. Llano, M. Cobo, M.A. Hurle, J.F. Nistal, Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF-beta, PLoS One 7 (2012) e35635.
- [36] M. Paulsen, S. Legewie, R. Eils, E. Karaulanov, C. Niehrs, Negative feedback in the bone morphogenetic protein 4 (BMP4) synexpression group governs its dynamic signaling range and canalizes development, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 10202–10207.
- [37] A. Lantero, M. Tramullas, A. Diaz, M.A. Hurle, Transforming growth factor-beta in normal nociceptive processing and pathological pain models, Mol. Neurobiol. 45 (2012) 76–86.
- [38] D. Pils, M. Wittinger, M. Petz, A. Gugerell, W. Gregor, A. Alfanz, R. Horvat, E.-I. Braicu, J. Sehouli, R. Zeillinger, W. Mikulits, M. Krainer, BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment, Gynecol. Oncol. 117 (2010) 189–197.
- [39] M. Tsang, R. Kim, M.P. de Caestecker, T. Kudoh, A.B. Roberts, I.B. Dawid, Zebrafish nma is involved in TGF beta family signaling, Genesis 28 (2000) 47–57.
- [40] E. Yetkin, J. Waltenberger, Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis, Int. J. Cardiol. 135 (2009) 4–13.
- [41] K. Berenji, M.H. Drazner, B.A. Rothermel, J.A. Hill, Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 289 (2005) H8–H16.
- [42] F. Weidemann, S. Herrmann, S. Störk, M. Niemann, S. Frantz, V. Lange, M. Beer, S. Gattenlöhner, W. Voelker, G. Ertl, J.M. Strotmann, Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis, Circulation 120 (2009) 577–584.
- [43] F. Kuwahara, H. Kai, K. Tokuda, M. Kai, A. Takeshita, K. Egashira, T. Imaizumi, Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats, Circulation 106 (2002) 130–135.
- [44] H.P. Krayenbuehl, O.M. Hess, E.S. Monrad, J. Schneider, G. Mall, M. Turina, Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement, Circulation 79 (1989) 744–755.
- [45] S. Heymans, B. Schroen, P. Vermeersch, H. Milting, F. Gao, A. Kassner, H. Gillijns, P. Herijgers, W. Flameng, P. Carmeliet, F. Van de Werf, Y.M. Pinto, S. Janssens, Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart, Circulation 112 (2005) 1136–1144.
- [46] F.G. Spinale, Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function, Physiol. Rev. 87 (2007) 1285–1342.
- [47] M. Taki, K. Verschueren, K. Yokoyama, M. Nagayama, N. Kamata, Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelialmesenchymal transition in human squamous carcinoma cells, Int. J. Oncol. 28 (2006) 487–496.
- [48] S. Roy, S. Khanna, S.R. Hussain, S. Biswas, A. Azad, C. Rink, S. Gnyawali, S. Shilo, G.J. Nuovo, C.K. Sen, MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue, Cardiovasc. Res. 82 (2009) 21–29.
- [49] X. Zhong, A.C. Chung, H.Y. Chen, X.M. Meng, H.Y. Lan, Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis, J. Am. Soc. Nephrol. 22 (2011) 1668–1681.
- [50] B.N. Davis, A.C. Hilyard, G. Lagna, A. Hata, SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation, Nature 454 (2008) 56-U52.