

VNIVERSITAT ID VALÈNCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Biología Celular y Parasitología

Programa: Neurociencias Básicas y Aplicadas

TESIS DOCTORAL

FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN
DEL DESARROLLO DE LAS VÍAS DEL DOLOR

Teresa Valdés Sánchez

Valencia, 2015

Directora: Martina Kirstein



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Dña. Martina Kirstein, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular y Parasitología, de la Facultad de Biología de la Universitat de València

CERTIFICA QUE:

La presente Tesis Doctoral titulada, “**Factores implicados en la regulación del desarrollo de las vías del dolor**”, elaborada por la licenciada en Biología, **Dña. Teresa Valdés-Sánchez**, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Neurobiología Molecular, del Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultad de Biología de la Universitat de València, y que hallándose concluida, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Fdo: Martina Kirstein

Valencia, a 28 de Octubre del 2015

A mis padres,
Kake, Ramón y Juan.

A mi familia.

A todos los míos.

Agradecimientos

Quisiera agradecer y dedicar mi trabajo de tesis a todas aquellas personas que me han acompañado durante todos estos años y que han aportado infinidad de elementos fundamentales a todos los niveles, que han sido y son, necesarios para mi formación como investigadora, pero sobre todo como persona.

En primer lugar y muy en especial, a mi directora de tesis la Dra. Martina Kirstein sin la que este trabajo no hubiera existido. Gracias además por tu apoyo incondicional y por tu magnífica amistad. No tengo palabras para agradecer todo lo que me has aportado.

Gracias a la Dra. Sacramento Rodriguez, para mi, Sacri, mi amiga y mi compañera durante tantísimos años. He aprendido muchísimo de ti a todos los niveles.

Gracias al Dr. Paco Pérez y a la Dra Rosana Sáez, por tanta ayuda que me habéis prestado, por tantos conocimientos y por tantos consejos. Sin vosotros este trabajo no estaría completo. En especial a Rosana por todo ese cariño y apoyo.

Gracias a todos y cada uno de los miembros del departamento, porque he crecido con vosotros en esta profesión y me habéis aportado tanto.. En especial a la memoria del Dr. Francisco Guijarro que ha sido para mi y para todos, un ejemplo de sencillez, valor y pasión por la Ciencia.

Gracias al Dr. José Luis López Barneo y al Dr. Juan José Toledo-Aral a por confiar en mí en la que fue mi primera colaboración científica y por haberme enseñado tantas cosas durante todos estos años. Es un privilegio haberme formado cerca de vosotros.

Al Dr. Carlos López Otín por cedernos las herramientas que han permitido llevar a cabo gran parte de este trabajo.

A la Dra. Rosa Planells por su colaboración y por acogerme en su laboratorio para realizar algunos de los experimentos de esta tesis, siempre con la ayuda de Sergio Lainez. Una de esas colaboraciones que te enriquecen en conocimientos y que son ejemplo de profesionalidad y humildad. Me alegro de seguir cerca de vosotros.

A todo el personal de administración, a Pilar, Carmen, Asún y Sabina, por su apoyo y paciencia, y como no, al personal del SCSIE: Maritere, Enrique y Pilar, con quienes he compartido tantísimas horas y me han enseñado tanto.

Gracias a todos mis compañeros y compañeras, los del pasado y los del presente:

A Pili, a Miguel, a Elena y a M^a Fe con quienes empecé esta aventura y a quienes siempre tendré en mi corazón. A Celia por compartir tantos momentos conmigo, ofrecerme tanta amistad y enseñarme tanto. A M^a Ángeles por tu increíble carácter, tesón y cariño. A Laura, a Alfredo de Barcelona, a Nati, a Zoraida, a Mireia, a Josema, a M^a José, a M^a Paz, a Helena y a Pili, ha sido estupendo trabajar con vosotros, con todos sin excepción porque todos me habéis

ayudado a crecer y de todos he aprendido muchísimo. Gracias a a mis compañeros Toni, Miguel e Ignasi, por responder a tantas dudas, por ayudarme tanto y por tanto humor sano.

Gracias a mis amigos, aquellos que han creído en mi y que siempre me han empujado a lograr mis metas, con amor y con mucho humor, algo sin lo que no sabría vivir.

Muy especialmente a Lucia, a la que tanto he echado de menos en el laboratorio, pero que siempre ha estado y está a mi lado, porque es parte de mi vida.

A Silvia, que se ha convertido en mi hermana. Parte de esta tesis te pertenece, por ser tan única como persona y tan magnífica como amiga.

A Belen y a Bene, mis compañeras en mis inicios y que aún forman parte de mi vida. Sois mi familia.

A Blanca, que aunque esté físicamente más lejos ahora, siempre se mantiene cerca.

A Joan, por todo tu apoyo y tu cariño incondicional.

Y por último a mi familia, en especial a mi madre, a mi padre y a Juan que siempre me han ayudado y apoyado en todo. A mis tíos Teresa, José, Amparo y Bill, por su cariño, sus ánimos y por creer en mi siempre. A Inma y a mi abuela, que me ayudan cada día.

Todos y cada uno de vosotros, lo sabéis todo, cada bache, cada éxito y cada alegría. Esta tesis lleva vuestro nombre.

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Nocicepción.	3
1.1 Sistema nervioso somático-sensorial.....	3
1.2 Modalidades sensoriales del dolor.	6
1.3 Vías moleculares del dolor. Dolor inflamatorio e hiperalgesia.	7
2. Desarrollo de la neurobiología del dolor.	12
2.1. La familia de las neurotrofinas y sus receptores.....	12
2.2. La hipótesis neurotrófica y el desarrollo sensorial embrionario.	18
3. Modulación de la fisiología del dolor.	20
3.1. Matriz extracelular y su remodelación proteolítica.....	21
3.2. Moléculas de adhesión célula-célula.	25
3.3. Neuritogénesis, elongación y guía axónica.	32
3.4. El papel de la N-cadherina en la neuritogénesis.....	35
4. Metaloproteasas.....	36
4.1. La familia de las metaloproteasas (MMPs y ADAMs).....	36
4.1.1. Miembros y estructura de las metaloproteasas.....	36
4.1.2. Regulación, activación e inhibición de las MMPs.....	39
4.2. Papel de las MMPs y ADAMs en el sistema nervioso: regulación de la neuritogénesis.....	40
4.3. Expresión y función de MT5-MMP en el SN.	43
5. Sistema neuro-inmune.....	44
5.1. Mastocitos.....	44
5.2. Papel de los MC en el dolor inflamatorio.....	46
5.3. Bases moleculares de la interacción neuroinmune.....	48

OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Animales.....	57
1.1. Cepas de ratones.....	57
1.2 Genotipado de los animales.....	57
2. Técnicas histológicas.....	59
2.1. Procesamiento histológico.....	59
2.2. Técnicas inmunohistoquímicas, histoquímicas e impregnación argéntica.....	60
2.3. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión.....	61
3. Preparación del mesenterio para el análisis de mastocitos <i>in vivo</i>.....	61
4. Cultivos celulares.....	62
4.1. Cultivos primarios de neuronas sensoriales.....	62
4.1.1. Preparación de las placas para cultivos de neuronas sensoriales.....	62
4.1.2. Recolección y siembra de las células.....	63
4.1.3. Estudio de la supervivencia neuronal.....	64
4.1.4. Ensayos de bloqueo de supervivencia <i>in vitro</i>	64
4.2. Cultivos y co-cultivos organotípicos.....	64
4.3. Cultivo de mastocitos derivados de la médula ósea (BMMCs).....	65
4.4. Co-cultivos de neuronas sensoriales de los DRGs y BMMCs.....	66
4.5. Ensayos de bloqueo de adhesión <i>in vitro</i>	66
5. Técnicas inmunocitoquímicas.....	66
6. Análisis morfométrico y estereología.....	67
6.1. Recuentos neuronales.....	67
6.2. Recuentos de fibras nerviosas al microscopio óptico.....	68
6.3. Recuentos de fibras nerviosas al microscopio electrónico.....	68

6.4. Análisis morfométrico de estructuras.....	68
6.5. Análisis morfométrico de neuritas.....	69
7. Medida del flujo intracelular de Ca²⁺.....	69
8. Inmunodetección de proteínas mediante <i>western blot</i>.....	70
8.1. Extracción de proteína total.....	70
8.2. Electroforesis y transferencia a membrana.....	70
8.3. Bloqueo de membranas e incubación con anticuerpos.....	70
9. Análisis de la expresión de ARNs mensajeros.....	71
9.1. Extracción de RNA total y retro-transcripción.....	71
9.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	71
9.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (RT-PCR).....	72
10. Análisis estadísticos.....	74
11. Anexo.....	74
Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica o inmunocitoquímica.....	74
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para inmunodetección de proteínas por Western-blot..	75
Tabla 3. Anticuerpos secundarios.....	75
RESULTADOS.....	77
1. El BDNF es un factor neurotrófico esencial para la supervivencia de las neuronas nociceptivas y la regulación de su heterogeneidad.....	79
1.1. Caracterización de las poblaciones de neuronas sensoriales que dependen de BDNF in vivo.....	79
1.2. Caracterización de los diferentes grupos de receptores cutáneos que dependen de BDNF in vivo.	85
1.3. Caracterización in vitro de la población de neuronas sensoriales nociceptivas que depende de BDNF.....	90
1.4. Papel paracrina/autocrino de BDNF en el desarrollo postnatal de las neuronas nociceptoras.....	94

2. La metaloproteasa MT5-MMP está implicada en la regulación de la inervación cutánea nociceptiva neuro-inmune.....	97
2.1. <i>MT5-MMP modula la inervación cutánea nociceptiva in vivo.....</i>	97
2.2. <i>MT5-MMP no está implicada en la supervivencia de las neuronas nociceptivas.....</i>	99
2.3. <i>MT5-MMP modula el crecimiento neurítico in vitro.....</i>	102
2.4. <i>MT5-MMP está implicada en la respuesta al dolor térmico agudo</i>	105
2.5. <i>MT5-MMP modula el procesamiento de la N-cadherina</i>	105
3. La metaloproteasa MT5-MMP está relacionada con la interacción entre los mastocitos y las fibras nerviosas nociceptivas.	107
3.1. <i>MT5-MMP está implicada en la regulación del proceso de “de-granulación” de los mastocitos .</i>	108
3.2. <i>Obtención de mastocitos maduros a partir de cultivos de médula ósea (BMMCs).....</i>	110
3.3. <i>Estudio de las interacciones celulares entre mastocitos y neuronas sensoriales</i>	110
3.4. <i>Implicación de la N-cadherina en la interacción mastocito-neurona sensorial.....</i>	114
DISCUSIÓN.....	117
CONCLUSIONES.....	129
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXO	171

Abreviatura	Descripción
ADAMs	Desintegrinas y metaloproteinasas
ADAMTS	Desintegrinas y metaloproteinasas con actividad trombospondina
Akt	Proteína kinasa de serina-treonina
BAD	Promotor de muerte asociado a Bcl-2/Bcl-x
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BMMC	Mastocitos derivados de médula ósea
BMP	Proteínas morfogenéticas del hueso.
BSA	Albúmina de suero bovino
CADM1	Molécula de adhesión celular-1
CAM	Molécula de adhesión celular
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico.
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CNG	Ganglio Nervioso Craneal
CNTF	Factor Neurotrófico Ciliar
CP	Citoplasma
CRE	Elementos de respuesta a cAMP
CREB	Proteína vinculante a CRE
CSF	Factor estimulador de colonias
CSPG	Proteoglicano condroitín sulfato
CTMC	Mastocitos de tejido conjuntivo
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DIV	Días in vitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	dimetilsulfóxido
DRG	Ganglio de la Raíz Dorsal
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPR1	Receptor de proteasas de células efectoras 1
ERK	Proteína kinasa extracelular reguladora
FAS3	Fasciclina III
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico.
FKHRL1	Factor de transcripción de la familia Forkhead
FP	N-formil-péptidos
Gab-1	Proteína de unión a Grb2
GAG	Glicosaminoglicanos

Abreviaturas

GDNF	Factor neurotrófico derivado de célula glial
GF	Factor de crecimiento
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
Grb-2	Proteína adaptadora de unión al receptor del factor de crecimiento
GSK	Proteína kinasa glicógeno sintasa
HEPES	Ácido (2-(4-(2-hidroximetil)-1-piperalcinil)-etanosulfónico
HIHS	Suero equino inactivado por calor
HMGB1	Proteína del Grupo de Alta Movilidad Box1
HSP	Proteínas de choque térmico
IB4	Isolectina B4
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN	Interferones
Ig	Inmunoglobulina
IgCAM	Molécula de adhesión celular tipo inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleuquina
IRS-1	Receptor de insulina-1
LPS	Lipopolisacárido
IκB	Inhibidor de kinasa B
MAK/ERK	Kinasa activada por mitógenos o por señales extracelulares
MAPK/ERK	Proteína de kinasa activada por mitógenos/o por señales extracelulares
MCP	Fenotipo de progenitores de mastocitos
MMC	Mastocitos de mucosa
MMP	Metaloproteinasa de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
MT-MMP	Membrana-tipo MMP
N-CAM	Molécula de adhesión celular neural
NFκB	Factor nuclear - kappa B
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NGS	Suero de cabra normal
NK	Neuroquinina
NT	Neurotrofina
P	Postnatal
p75 LNGFR	Receptor de Baja Afinidad del Factor de Crecimiento Nervioso p75
p75NTR	Receptor para las Neurotrofinas p75
PAF	Factor activador de plaquetas
PAR	Receptor proteinasa activado.

PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK	Proteína kinasa dependiente de fosfoinositol.
PFA	Paraformaldehido
PKC	Proteína kinasa C
PI3K/Akt	Vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa
PLC-1	Fosfolipasa C-1
PTB	Dominio de unión de fosfotirosinas
RAGE	Receptor de productos finales de la glicación avanzada
Ras/Erk	Ras/Kinasas reguladas por señales extracelulares
RNA	Ácido ribonucleico
RSK	Proteína kinasa ribosomal 6
SAM	Moléculas de adhesión del sustrato intercelular
SglGSF	Superfamilia de las inmunoglobulinas espermatogénicas.
Shc	Proteína con dominio de homología Src 2
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SynCAM	Molécula de adhesión celular sináptica
TBE	Tampón Tris borato EDTA
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TGFβ1	Factor de crecimiento transformante beta-1
TNF	Factor de necrosis tumoral
Trk	Tirosina kinasa
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Organización anatómica y funcional del tacto.....	4
Figura 2	Clasificación de los principales síndromes de dolor.....	7
Figura 3	Dolor fisiológico vs dolor inflamatorio.....	8
Figura 4	Las neurotrofinas y modelos de activación de los receptores Trk y p75....	13
Figura 5	Subclases de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y del “input” de la espina dorsal.....	19
Figura 6	Esquema general de la estructura y composición de la ECM de la piel.	22
Figura 7	Diagrama esquemático de diversas estructuras de dominios de las diferentes superfamilias de CAMs.	27
Figura 8	Representación esquemática de los miembros de la familia de las cadherinas, que todos comparten un motivo estructural común: “el dominio cadherina extracelular (CE)”.....	30
Figura 9	Guía axónica y el papel de las cadherinas en los procesos crecimiento axónico.....	34
Figura 10	Estructura y sustratos específicos de las metaloproteinasas.	37
Figura 11	La proximidad entre mastocitos y fibras nerviosas en los tejidos, facilita la comunicación neuro-inmune implicada en la modulación del dolor.....	47
Figura 12	Pérdida de fibras mielínicas y amielínicas en las raíces dorsales y nervios safenos.....	80
Figura 13	Esquema de la inervación lumbar del ratón y el porcentaje de pérdida de fibras mielínicas en los ratones deficientes en BDNF.	84
Figura 14	Efecto de la falta de señalización de BDNF en la inervación general y sobre los diferentes receptores de la piel pilosa y glabra de ratón.	86
Figura 15	Efecto de la falta de señalización de BDNF en la inervación cutánea y en diferentes nociceptores.....	89
Figura 16	Supervivencia in vitro de neuronas DRG postnatales tempranas en presencia de diferentes factores de crecimiento.....	90

Figura 17	Supervivencia in vitro de neuronas DRG postnatales tempranas en presencia de diferentes factores de crecimiento.....	91
Figura 18	Expresión in vitro del receptor TrkB.....	92
Figura 19	Supervivencia in vitro de las neuronas DRG de pequeño diámetro en presencia de diferentes factores de crecimiento.....	93
Figura 20	Expresión del mRNA de NGF, BDNF y GDNF en la piel y los DRGs y sus efectos autocrinos / paracrinos.....	95
Figura 21	Efectos autocrinos/paracrinos de BDNF.....	96
Figura 22	Modificación genética dirigida del gen MMP-MT5.....	97
Figura 23	Expresión MT5-MMP e hiperinervación de la piel en las almohadillas plantares y en la lengua de los ratones de tipo salvaje y deficientes en Mmp24.....	98
Figura 24	Análisis de fibras mielínicas y amielínicas en L4 raíces dorsales de ratones adultos Mmp24 ^{-/-}	100
Figura 25	El crecimiento normal del CGRP mutante + fibras centrales en la médula espinal.....	101
Figura 26	Fenotipo de las neuritas de las neuronas sensoriales de ratones mutantes de Mmp24 en co-cultivo de explantes de DRGs y piel.....	102
Figura 27	Fenotipo de las neuritas de las neuronas sensoriales mutantes de Mmp24.....	103
Figura 28	Medida del crecimiento neurítico en las neuronas sensoriales Mmp24... ..	104
Figura 29	Los niveles normales de TRPV1 en neuronas sensoriales y mastocitos deficientes en Mmp24.....	105
Figura 30	Aumento de los niveles de N-cadherina en ausencia de MT5-MMP.	106
Figura 31	Reducción de procesamiento N-cadherina y el aumento de los niveles de β -catenina en Mmp24 deficiente en las neuronas sensoriales y mastocitos.....	107

Figura 32	Alteración de las respuestas de capsaicina y degranulación de mastocitos en ratones deficientes en Mmp24.....	109
Figura 33	Expresión in vitro de MT5-MMP en DRGs y BMMCs.....	111
Figura 34	Contactos físicos alterados entre los mastocitos mutantes de Mmp24 ...	112
Figura 35	Papel de N-cadherina y MT5-MMP en la interacción funcional entre neuronas de los DRGs y los BMMCs.....	115
Tabla 1	Principales clases de receptores sensoriales somáticos.....	5
Tabla 2	Recuentos neuronales en los DRGs de ratones BDNF ^{+/+} y BDNF ^{-/-}	79
Tabla 3	Recuentos de fibras mielínicas y amielínicas en los DRGs y en diferentes nervios periféricos de ratones.....	82
Tabla 4	Combinaciones de receptores en las neuronas sensoriales de tamaño pequeño	94
Tabla 5	Porcentaje de mastocitos degranulados (BMMCs) en co-cultivos de neuronas disociadas de DRGs adultos y BMMCs, de diferentes genotipos y con diferentes tratamientos.....	113
Tabla 6	Porcentaje de mastocitos degranulados (BMMCs) en experimentos de bloqueo de función de N-cadherin en co-cultivos de neuronas disociadas de DRGs adultos y BMMCs de diferentes genotipos.	116

1. Nocicepción.

El dolor es una experiencia sensorial y emocional necesaria para la supervivencia de los seres vivos que está asociada a la detección de un daño tisular actual o potencial. Todos los organismos necesitan ser capaces de reaccionar ante los estímulos nocivos y evolutivamente adquirir la capacidad de detectar y recordar el peligro. Sin embargo el dolor no es un proceso homogéneo y comprende tres categorías, el dolor fisiológico, el dolor inflamatorio y el dolor neuropático. La persistencia patológica del dolor puede derivar en ansiedad, depresión y una pérdida importante de la calidad de vida. Estudios recientes han identificado nuevos tipos celulares y moleculares implicados en la regulación de la sensibilidad al dolor y las vías paralelas que distribuyen la información nociceptiva por las diferentes áreas límbicas o sensoriales del prosencéfalo. El objetivo de esta tesis es profundizar en el estudio de aquellos procesos neurobiológicos y celulares resultantes del dolor, especialmente los derivados de la generación y el mantenimiento del dolor hiperalgésico. Los posibles nuevos conocimientos adquiridos sobre su procesamiento podrían cambiar de forma significativa nuestro enfoque preventivo o de control y posibilitaría el desarrollo de nuevas terapias analgésicas en multitud de patologías.

1.1 Sistema nervioso somático-sensorial.

Los sistemas sensoriales nos permiten percibir el entorno y protegernos de él en función de las señales recogidas por los diferentes receptores periféricos que consisten en terminales nerviosos especializados procedentes de las neuronas sensoriales. En las últimas dos décadas la investigación ha revolucionado nuestra comprensión de cómo el cerebro es capaz de adquirir y procesar la información visual, auditiva, gustativa, olfativa y somático-sensorial. Las vías ascendentes del sistema somático-sensorial están divididas básicamente en tres componentes: Un subsistema que transmite la detección de estímulos mecánicos cutáneos tales como el tacto suave, la vibración y la presión; un segundo subsistema que recibe información de receptores especializados, asociados a músculos, tendones y articulaciones y que se encargan de la propiocepción, que es la habilidad que tiene el organismo para percibir la posición exacta en el espacio de sus extremidades y otras partes del cuerpo; y por último, un tercer subsistema especializado en la detección del dolor y la temperatura (Scott, 1992).

La percepción somatosensorial se inicia a partir de la activación de las vías aferentes nerviosas que se ramifican y distribuyen por toda la piel o los músculos. Los cuerpos celulares de las fibras aferentes se localizan, bien en una serie de ganglios pares dispuestos a lo largo de toda la médula espinal denominados ganglios de la raíz dorsal (DRGs) y que inervan el cuerpo o bien en el tronco cerebral, denominados ganglios nerviosos craneales (CNGs) encargados de la inervación de la cabeza.

Las neuronas sensoriales de los DRGs poseen estructuras pseudounipolares de manera que el potencial de acción generado a partir de los estímulos de los receptores es transmitido desde la

Introducción

porción periférica de la fibra aferente directamente hasta la porción central y el terminal sináptico que conecta con la neurona de segundo orden en la médula espinal, de manera que la conducción de la actividad eléctrica a través de la membrana del soma neuronal no es un paso obligatorio para el transporte de la información sensorial hasta el sistema nervioso central. Sin embargo, los cuerpos celulares sí que juegan un papel muy importante en el mantenimiento y regulación de los mecanismos moleculares que median la transducción, conducción y transmisión de señales a través de las fibras aferentes sensoriales, así como la supervivencia, maduración y especificación de las diferentes poblaciones de neuronas sensoriales durante el desarrollo del sistema nervioso periférico (Figura 1).

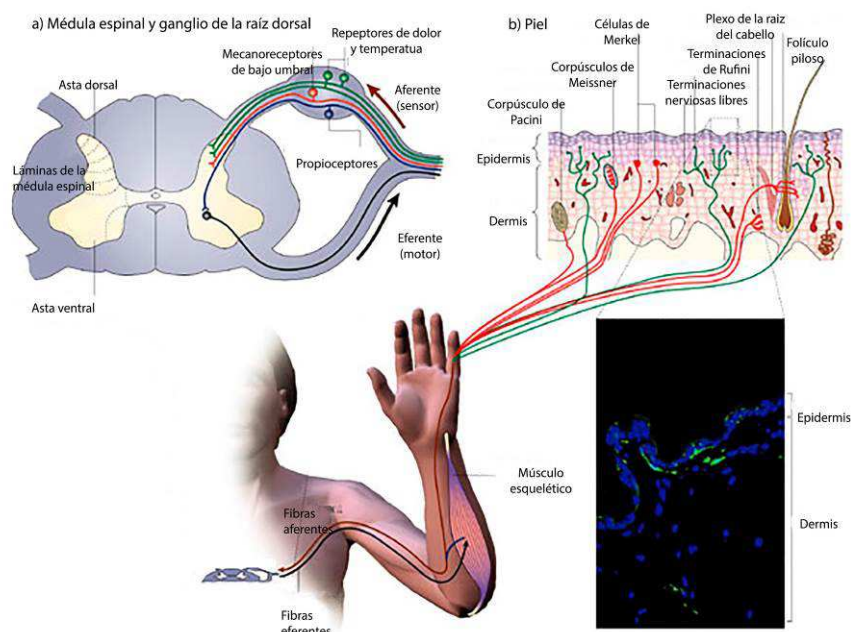


Figura 1. Organización anatómica y funcional del tacto.

a) Los nervios espinales, formados por la unión de las raíces aferentes (sensoriales) y eferentes (motoras), proporcionan inervación periférica a la piel, músculo esquelético, vísceras y glándulas. Las flechas indican la dirección de los impulsos sensoriales y motores, de entrada y salida respectivamente. Los cuerpos celulares de las neuronas motoras se encuentran dentro del asta ventral de la médula espinal (láminas VII-IX), mientras que los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (DRGs). Dentro de los DRGs, existen subclases de neuronas sensoriales, denominadas propioceptivas (en azul), mecanosensitivas (en rojo) y neuronas de detección de temperatura y de dolor (en verde). Estas neuronas proyectan centralmente a las interneuronas del asta dorsal (láminas I-IV de la médula espinal) y periféricamente, a los tejidos diana. Las neuronas propioceptivas, proyectan e innervan (fibra azul) estructuras especializadas dentro de los tejidos diana, como en el caso del músculo y la sensación de extensión muscular. b) Las neuronas mecanosensitivas de bajo umbral (fibras rojas), proyectan hacia los órganos diana que transmiten estímulos mecánicos, como los corpúsculos de Meissner o de Paccini, los terminales de Ruffini, los plexos de los folículos pilosos y las células de Merkel. En la figura se ilustran los cinco tipos de modalidades mecanosensitivas que se han descrito. Las neuronas sensoriales que detectan la temperatura y el dolor (verde) no innervan órganos diana especializados, sino que, forman terminaciones nerviosas libres en todas las capas de la piel y cerca de los vasos sanguíneos y folículos pilosos. c) Sección de la piel que muestra las terminaciones nerviosas libres (fibras verdes) teñidas con PGP9.5, un marcador pan-neuronal. Los núcleos de las células de la piel se tiñeron (azul) con fenilindol 4,6-diamino-2- (DAPI). Las terminaciones nerviosas libres se encuentran tanto en la epidermis como en capas de la dermis. Modificado de Patapoutian et al., 2003.

Clasificación de las fibras nerviosas aferentes cutáneas.

La transducción sensorial, que es el mecanismo primordial para que la energía de un estímulo sea transformada en una señal eléctrica neuronal, es similar en todos los aferentes sensoriales somáticos. En función de sus propiedades electrofisiológicas, la velocidad de conducción del impulso nervioso, y del diámetro de sus axones, las fibras nerviosas sensoriales se han clasificado en tipo A (A α , A β y A δ) y tipo C (Erlanger y Gasser et al, 1930; Gasser et al, 1941; Manzano et al., 2008, Tabla 1):

Tipo de receptor	Características anatómicas	Axones asociados (y diámetros)	Velocidades axonales de conducción	Localización	Función	Tasa de adaptación	Umbral de activación
Terminaciones nerviosas libres	Terminaciones nerviosas mínimamente especializadas	C, A δ (0,2-5 μ m)	0,5-30 m/s	Toda la piel	Dolor, temperatura, tacto grueso, picor	Lenta	Alto
Corpúsculos de Meissner	Encapsulados; entre las papilas dérmicas	A β (6-12 μ m)	35-75 m/s	Principalmente la piel glabra	Tacto, presión (dinámica)	Rápida	Mínimo
Corpúsculos de Pacini	Encapsulados; en capas, como una cebolla	A β (6-12 μ m)	35-75 m/s	Tejido subcutáneo, membranas interóseas, vísceras	Presión profunda, vibración (dinámica)	Rápida	Mínimo
Discos de Merkel	Encapsulados; asociados a células liberadoras de péptidos	A β (6-12 μ m)	35-75 m/s	Toda la piel, folículos pilosos	Tacto fino, presión (estática)	Lenta	Mínimo
Corpúsculos de Ruffini	Encapsulados; orientados a lo largo de líneas estriadas	A β (6-12 μ m)	35-75 m/s	Toda la piel	Estiramiento de la piel	Lenta	Mínimo
Husos musculares	Áltamente especializados	Ia y II (6-20 μ m)	35-120 m/s	Músculos	Longitud muscular	Tanto lenta como rápida	Mínimo
Órganos tendinosos de Golgi	Áltamente especializados	Ib (12-20 μ m)	80-120 m/s	Tendones	Tensión muscular	Lenta	Mínimo
Receptores articulares	Mínimamente especializados	---		Articulaciones	Posición articular	Rápida	Mínimo

Tabla 1: Principales clases de receptores sensoriales somáticos. Modificado de Purves, 2001.

- Las fibras aferentes tipo A α tienen una velocidad de conducción entre 80-120 m/s, un diámetro de axón entre 12-20 μ m, su principal función es la propiocepción y reciben la información sensorial de receptores como los husos neuromusculares, el órgano tendinoso de Golgi y los receptores articulares.

- Las fibras aferentes tipo A β poseen velocidad de conducción entre 35-75 m/s, un diámetro de axón entre 6-12 μ m y son responsables de la transmisión del tacto y de la presión. Los receptores cutáneos que inervan son las células de Merkel, los corpúsculos de Meissner, Paccini o Ruffini y los folículos pilosos.

- Los aferentes A δ tienen velocidad de conducción entre 5-30 m/s, un diámetro de axón entre 1-5 μ m y transmiten la sensación de dolor, temperatura y tacto. Este tipo de fibra inerva los folículos pilosos o forma terminales libres que se ramifican en la epidermis.

- Finalmente las fibras de tipo C, son la únicas que carecen de mielina, tienen una velocidad de conducción entre 0.5-2 m/s, un diámetro de axón entre 0.2-1.5 μ m, su función es la percepción del dolor, de la temperatura y del picor y al igual que las fibras A δ , forman terminaciones libres en la piel.

1.2 Modalidades sensoriales del dolor.

En muchas ocasiones se hace referencia al dolor en ausencia de daño tisular u otra causa conocida, y esta experiencia debe ser considerada también como dolor ya que no puede distinguirse del producido por un daño tisular real. Por lo tanto, el dolor debe ser considerado una experiencia altamente subjetiva que se completa con experiencias físicas, psicológicas y sociales del individuo, siendo importante diferenciar entre la sensación dolorosa y los mecanismos nerviosos de la nocicepción, ya que la activación de estos últimos no conduce necesariamente a la percepción de dolor. En definitiva, la percepción del dolor tiene un componente individual y subjetivo que dificulta su definición y su estudio.

Clásicamente se distinguen tres tipos de dolor de acuerdo con la evolución del mismo:

- El dolor fisiológico: Producido por la estimulación breve de los nociceptores de la piel u otros tejidos en ausencia de daño tisular y considerado como necesario para la supervivencia y el bienestar del individuo.

- El dolor agudo: Producido por un daño tisular importante y cuya duración depende del tiempo que puedan tardar los tejidos en sanar; los factores psicológicos tienen una influencia importante en la manera en que se experimenta este tipo de dolor, que puede desencadenar una serie de acontecimientos que lo perpetúan y favorecen su evolución a dolor crónico.

- El dolor crónico: Producido a consecuencia de la estimulación constante de los nociceptores en zonas en las que se ha producido un daño tisular. Tiene grandes efectos psicológicos sobre el paciente y podría decirse que mientras el dolor agudo es un síntoma de una enfermedad, el dolor crónico constituye una enfermedad por sí mismo.

De acuerdo con su origen, el dolor puede dividirse en: dolor somático, inflamatorio o nociceptivo, que aparece cuando un estímulo potencialmente dañino estimula los receptores nociceptivos, y que incluye el dolor originado en cualquier parte del cuerpo que no pertenezca al sistema nervioso central (SNC); o dolor neuropático, que es el causado por una lesión primaria o una disfunción en el sistema nervioso somatosensorial (definición oficial de la IASP) (Figura 2)

	Dolor nociceptivo	Dolor inflamatorio	Dolor neuropático
Estímulo	Nocivas	Inflamación	Daño neuronal e impulsos ectópicos
Neurona sensorial	Nociceptor	Nociceptor y no-nociceptor	Nociceptor y no-nociceptor
Sitio	PNS	PNS y CNS	PNS y CNS
Participación de los canales	TRP	TRP	TRP
Entorno clínico	Traumatismo agudo	Dolor posoperatorio Artritis	- Lesiones PNS y CNS - Neuropatía diabética. - Radiculopatía lumbar. - Lesión de médula espinal.
Función	Protectiva	Curación / reparación	Patológico
Sensibilidad al dolor	Umbral alto	Umbral bajo	Umbral bajo

Figura 2. Clasificación de los principales síndromes de dolor.

El dolor se puede dividir en tres grandes categorías: nociceptivo, inflamatorio y neuropático. Esta división se basa en el estímulo inicial (presencia de un estímulo nocivo, inflamación o daño neural), en el sustrato neuronal del que se trate (nociceptores o no nociceptores) y la relativa contribución / participación del sistema nervioso periférico (PNS) o del sistema nervioso central (CNS), y la participación relativa de los canales o receptores de potencial transitorio (TRP), las condiciones clínicas típicas, el papel biológico de dolor, y el umbral de dolor. El dolor nociceptivo es generado por estímulos dañinos que actúan sobre los nociceptores en el PNS, activando los canales TRP, mediante estímulos térmicos y químicos irritantes. Este dolor se produce clínicamente en el contexto de un traumatismo agudo, tiene carácter protector y sirve para advertir de daños. El dolor inflamatorio se produce en presencia de tejido dañado o inflamado. Los mediadores inflamatorios pueden sensibilizar a los nociceptores, lo que implica alteraciones en el umbral de los canales TRP. También se inducen cambios en el sistema nervioso central (sensibilización central), de tal manera que el dolor se puede desencadenar por activación de no-nociceptores. Este estado de dolor clínico suele ser reversible y asociado con hipersensibilidad (los estímulos nocivos ya no son necesarios para evocar el dolor). El dolor neuropático es el resultado de daños y lesiones al sistema nervioso. Los cambios fisiopatológicos responsables del dolor espontáneo y de la hipersensibilidad al dolor experimentada por pacientes, se producen tanto en el PNS como en el CNS y representan cambios patológicos no adaptativos. Algunos antagonistas de los canales TRP reducen este dolor, pero el mecanismo de intervención en este proceso aún no se entiende bien. Modificado de Patapoutian et al., 2010.

1.3 Vías moleculares del dolor. Dolor inflamatorio e hiperalgesia.

El dolor proviene de la transmisión de impulsos por aferentes primarios nociceptivos hacia la médula espinal y desde ahí hasta el cerebro. Sin embargo, el dolor que es producido por un estímulo que normalmente no es doloroso y que está asociado a un proceso inflamatorio, conlleva un proceso muy diferente. Las neuronas sensoriales en condiciones fisiológicas son activadas por estímulos dolorosos agudos y en situaciones de lesión nerviosa o de inflamación, la sensibilización de estas neuronas sensoriales primarias, provoca la persistencia de un dolor neurogénico o inflamatorio, respectivamente. Múltiples investigaciones dentro del campo evidencian la contribución de las células gliales e inmunes en el desarrollo de los procesos

Introducción

nociceptivos de estos tipos de dolor. Para entender la fisiología del dolor y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para su control, es importante describir y profundizar en las vías de señalización mediante las cuales se regulan y relacionan los aferentes nociceptivos primarios y las células inmunes.

Una lesión en la piel produce dolor continuo y dos tipos de hiperalgesia: primaria y secundaria (Meyer et al., 2006). La hiperalgesia primaria se produce en el lugar de la lesión tisular y está mediada en parte por la sensibilización de los aferentes primarios nociceptivos. Esto se refleja, por ejemplo, en las respuestas al aumento de los estímulos de calor. La hiperalgesia secundaria se produce en el tejido lesionado que rodea el sitio de la lesión y se piensa que es debida a la sensibilización en el sistema nervioso central. La hiperalgesia secundaria se caracteriza por obedecer a un estímulo mecánico no calórico. Esta hiperalgesia mecánica es comparable a la producida en pacientes con dolor neuropático. Se han descrito dos tipos de esta hiperalgesia: en primer lugar, el dolor producido por estímulos de tacto suave (es decir, alodinia) y en segundo lugar por aumento mayor del dolor ante estímulos punzantes (Figura 3).

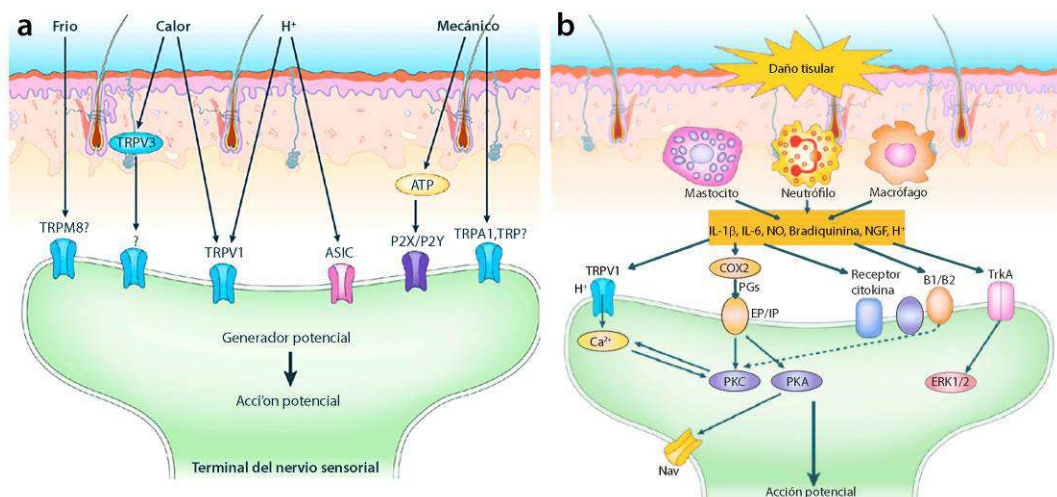


Figura 3. Dolor fisiológico vs dolor inflamatorio.

a) Los nociceptores responden a los estímulos agudos que dañan los tejidos (tales como el calentamiento de la piel), ya sea directamente, a través de la transducción de la energía del estímulo mediante receptores (como el canal iónico, receptor de potencial transitorio (TRP), TRPV1) en los terminales nerviosos, o indirectamente, a través de la activación de canales TRP en los queratinocitos (por ejemplo, TRPV3) y/o la liberación de moléculas intermedias (tales como ATP), que a su vez actúan sobre los receptores de las neuronas sensoriales. Las células inmunes parecen tener poca parte en este proceso. ASIC, canal catiónico sensible a amiloridos 2; P2X, purinoceptor ionotrópico; P2Y, receptor pirimidinérgico acoplado a la proteína G; canales TRPA1, TRPM8, TRPV3, PRT. b) Después de la lesión tisular, los mastocitos y los macrófagos se activan, y algunas células inmunes de origen sanguíneo, incluyendo neutrófilos, pueden ser reclutados para el proceso inflamatorio. Se liberan varios mediadores inmunes, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), la interleukina-1 beta (IL-1beta), la interleukina-6 (IL-6), el óxido nítrico (NO), la bradiquinina, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y protones, que ejercen sus efectos algésicos, actuando directamente sobre los nociceptores o indirectamente a través de la liberación de otros mediadores, principalmente prostanoideos. Cada vez se conocen con más detalle las cascadas intracelulares que se activan en los nociceptores a través de estos mediadores moleculares que, en última instancia, activan o sensibilizan estas neuronas. COX2, ciclooxigenasa 2; B1 / B2, receptor de bradiquinina; EP / IP, receptor prostanoide; ERK1 / 2, proteína quinasa extracelular reguladora; Nav, canal de sodio voltaje-activado; PGs, prostaglandinas; PKA / PKC, proteína quinasa A / C; TrkA, receptor tirosina quinasa A; TRPV1, canal receptor de potencial transitorio. Modificado de Marchand et al., 2005.

La inyección de capsaicina *in vivo* puede provocar la inflamación neurogénica, ya que puede activar los nociceptores y produce hiperalgesia central y periférica (revisado por Fitzgerald et al., 1983; Buck y Burks, 1986; Holzer et al., 1991; Szolcsanyi et al., 1993). Sin embargo, los efectos de la capsaicina en los efectos conductuales del dolor, también parecen requerir de la intermediación de los productos secretados por los mastocitos (Saadé et al, 2002; Massaad et al, 2004).

Por lo tanto, es muy relevante la aclaración de las cascadas de señalización que actúan en esta relación, entre aferentes nociceptores primarios y las células inmunes periféricas, para comprender la fisiología del dolor y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de su control.

La respuesta tisular a la agresión o inflamación en sentido estricto contempla en esquema cuatro acontecimientos interrelacionados: a) la estimulación de las terminaciones nerviosas libres provoca dolor y liberación de unos péptidos bioactivos llamados neuropéptidos; b) el daño celular o piroptosis, conduce a la liberación de proteínas constitutivas intracelulares tales como la HSP, el factor nuclear HMGB1 y los N-formil-péptidos (FP) mitocondriales; c) los microorganismos y sus diferentes productos incitan, en colaboración con los anteriores, a una respuesta inmunológica innata; y d) las señales que emana el foco inflamatorio reclutan leucocitos en el lugar de la lesión. Las terminaciones nerviosas sensoriales libres liberan, tras la lesión o el estímulo correspondiente, neuropéptidos pertenecientes a la clase taquininas (sustancia P y neuroquininas), que representan el estímulo inicial de los mastocitos que exponen sobre su membrana receptores específicos para tales mediadores proinflamatorios.

Una vez iniciada la secuencia inflamatoria, las triptasas liberadas por esas mismas células y por otras participantes en el proceso que actuando sobre receptores activados por proteasas (*Protease-activated receptor*, PAR) de los tipos PAR2 y EPR1 (*Effector cell protease receptor*) refuerzan la respuesta inicial de las terminaciones nerviosas, que incrementan la producción y liberación de CGRP (*Calcitonin gene related product*) y de sustancia P. El primero actúa sobre receptores arteriolares provocando vasodilatación, responsable de los signos inflamatorios rubor y calor, y el segundo sobre receptores venulares, provocando un incremento de la permeabilidad venular y extravasación responsable del edema o tumor inflamatorio. Se ha demostrado que las HSP, liberadas al compartimento extracelular, tienen una serie de efectos inmunológicos, que incluyen la inducción de secreción de citoquinas proinflamatorias y de expresión de moléculas de adhesión por diversos tipos celulares. La HSP60 activa, en humanos, las células endoteliales vasculares para expresar selectina-E, ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) y VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*). La misma proteína de estrés induce la secreción de interleuquina-6 (IL-6) por células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos. De manera similar al lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas, la HSP60 induce la rápida liberación de TNF- α y de óxido nítrico (*Nitricoxide*, NO) por los macrófagos, así como la expresión de IL-12 e IL-15. Las HSP, en su función

extracelular como citoquinas (caperoquinas), activan a los monocitos y macrófagos a través de los mismos correceptores CD14 (del inglés, CD: *Cluster designation* o *cluster of differentiation*) que utilizan los LPS bacterianos para incitar una respuesta inmunológica innata.

La HMGB1 es una proteína abundante, no histona, miembro de la superfamilia que agrupa proteínas nucleares que presentan una movilidad electroforética muy alta. Este grupo de proteínas incluye tres familias. Los miembros de la familia HMGB se encuentran entre las proteínas más ubicuas, abundantes y evolutivamente más conservadas entre las especies eucarióticas; todos ellos comparten un dominio *box* que media el acoplamiento de la proteína al DNA (Goodwin et al., 1973; Weir et al., 1993; Bustin et al., 1999).

La HMGB1, como factor nuclear, actúa como un elemento estabilizador de la arquitectura del DNA y juega un papel relevante en la transcripción, pero cuando abandona su ubicación normal y alcanza el medio extracelular, bien pasivamente por ruptura celular o por secreción de células inflamatorias activadas por citoquinas, actúa como un potente mediador inflamatorio con características citoquínicas y quimioquínicas (Wang et al 1999; Li et al., 2003).

Su receptor RAGE (del inglés *Receptor for advanced glycation end products*), que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se localiza en los endotelocitos y los miocitos vasculares y en los fagocitos, entre otras células. Su actuación sobre estas células potencia el proceso inflamatorio, provocando la disrupción de la pared vascular favoreciendo la extravasación de líquido y de células intravasculares, y es una potente citoquina sobre los fagocitos (revisado en Klune et al., 2008). Los fagocitos profesionales, neutrófilos polimorfonucleares y células mononucleadas (monocitos y macrófagos), juegan un papel clave en la defensa del huésped contra las bacterias invasoras. Las señales quimioatrayentes clásicas de los fagocitos son: los FP bacterianos y mitocondriales, el factor 5a del complemento (C5a), la interleuquina 8 (IL-8) y el factor activador de plaquetas (*Platelet-activating factor*, PAF). Cuando los quimioattractores están presentes a altas concentraciones activan las funciones citotóxicas de los fagocitos y liberan enzimas lisosómicas y otros mediadores inflamatorios.

Mediadores inflamatorios.

Numerosos estudios señalan la importancia del reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio a partir del “*pool*” circulante, sin embargo, una rápida respuesta se requieren células centinelas estacionadas en los tejidos, los macrófagos y especialmente los mastocitos, cumplen tal función. Los mastocitos perivasculares responden a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y estimuladas liberando histamina, triptasa y otras proteasas y TNF- α preformados, y eicosanoides (prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos), citoquinas y quimioquinas neoformadas. La histamina, los eicosanoides y las triptasas causan vasodilatación (responsable del calor y rubor inflamatorios) y extravasación (responsable del tumor o edema inflamatorio). Las triptasas mastocíticas cortan el extremo N-

terminal de receptores activados por proteasas, desenmascarando las secuencias que autoactivan el propio receptor. Por ejemplo, los receptores PAF que pertenecen a la familia de los GPCR (del inglés, *G Protein Coupled Receptor*) y que están presentes en mastocitos, terminaciones nerviosas libres sensitivas, endotelio vascular, plaquetas y neutrófilos. Su activación potencia la estimulación de los mastocitos y de las terminaciones nerviosas, refuerza la adhesividad endotelial que conduce a la migración leucocitaria desde el vaso al foco inflamatorio e induce en aquellos la expresión de receptores de quininas, responsables de la vasodilatación (Martin et al., 2007).

Las citoquinas son pequeñas proteínas o glicoproteínas que actúan como autacoides o como hormonas, producidas generalmente como formas precursoras por células activadas que median el proceso inflamatorio. Algunas de ellas se comportan como factores de supervivencia al prevenir la apoptosis. Las citoquinas también median, de manera directa, interacciones célula-célula. En el sentido más restrictivo, las citoquinas comprenden las interleuquinas, linfoquinas, monoquinas, interferones (IFN), quimioquinas, CSF (del inglés, *Colony Stimulating Factor*,) y los GF (*Growth Factor*). El término citoquinas de tipo 1 se refiere a aquellas producidas por células Th1 (células T *helper- 1* o asistentes): IL-2, IFN- γ (Interferón- γ), IL-12 o TNF- β). Las citoquinas de tipo 2 son las producidas por Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 o IL-13.

Tras la expresión génica, la mayoría de las citoquinas son secretadas por las células utilizando las vías secretoras clásicas, existiendo formas que se asocian a las membranas y otras a la matriz extracelular. Se denominan citoquinas proinflamatorias aquellas que favorecen la inflamación, siendo prototípicas IL-1, IL-6 y TNF- α (Watkins et al., 1999).

Además, actúan como pirógenos endógenos, inducen la síntesis de mediadores secundarios y de citoquinas proinflamatorias por macrófagos y por células mesenquimales, estimulan la producción de proteínas de fase aguda y atraen células inflamatorias. Por ejemplo, el TNF amplifica y prolonga la respuesta inflamatoria al activar otras células que, como respuesta, liberan citoquinas tales como IL-1 y HMGB1, y otros mediadores como eicosanoides, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, que potencian la inflamación y provocan lesiones tisulares. El TNF es esencial para la completa expresión inflamatoria; por el contrario, la autolimitación del proceso inflamatorio se caracteriza por una atenuación de la actividad del TNF (Watkins et al., 1999).

Las quimioquinas constituyen una familia de pequeñas proteínas proinflamatorias que juegan un papel fundamental en la inflamación por atraer y activar clases específicas de leucocitos, participando en tres de las cinco etapas de la cadena de adherencia leucocítica. En primer lugar, favorecen el rodamiento lento y la adherencia de los leucocitos al activar las integrinas leucocitarias; son potentes quimioattractores que guían a los leucocitos hacia el foco inflamatorio y además, activan las funciones efectoras de los leucocitos, incluyendo la producción de productos intermedios reactivos durante el metabolismo del oxígeno y la exocitosis de enzimas hidrolíticas. Las quimioquinas se unen a glicosaminoglicanos y heparina,

formando complejos que se creen de gran importancia en su capacidad para atraer localmente a los leucocitos (Abbadie et al., 2009; Gao and Ji, 2010; Milligan et al., 2008).

2. Desarrollo de la neurobiología del dolor.

2.1. La familia de las neurotrofinas y sus receptores.

Los factores neurotróficos son importantes reguladores en el desarrollo y fisiología del sistema nervioso de los vertebrados. Dentro de este grupo, las neurotrofinas fueron identificadas como moléculas promotoras de la supervivencia neuronal, pero en la actualidad se sabe que regulan muchos aspectos del desarrollo y funciones de las neuronas, incluyendo la diferenciación y la plasticidad sináptica (Lewin y Barde, 1996; Reichardt y Fariñas, 1997; Huang y Reichardt, 2001, 2003; Chao, 2003; Reichardt et al, 2006).

Las neurotrofinas fueron identificadas como moléculas promotoras de la supervivencia neuronal y en la actualidad se sabe que regulan muchos aspectos del desarrollo y función neuronal de las mismas, incluyendo la diferenciación y plasticidad sináptica (Revisión en Lewin y Barde, 1996; Reichardt y Fariñas, 1997; Huang y Reichardt, 2001; Reichardt et al., 2006). En la década de los 50, Levi-Montalcini y Hamburguer descubrieron que un tumor de sarcoma de ratón, implantado cerca de la médula espinal de un embrión de pollo en desarrollo, secretaba un factor soluble que inducía la hipertrofia y el crecimiento de las fibras de las neuronas simpáticas. Seguidamente, estudios *in vitro*, revelaron que este factor era una proteína de relativamente bajo peso molecular que fue identificada como el factor de crecimiento nervioso (Nerve Grow Factor NGF), (Cohen y Levi-Montalcini, 1956; Cohen et al., 1960). Este descubrimiento abrió otro campo de investigación en la neurobiología dedicado a la identificación y elucidación de las funciones celulares de los llamados factores neurotróficos, que actualmente incluyen a la familia de las neurotrofinas, la familia del GDNF (Glial cell Delivered Neurotrophic Factor), ciertas citocinas como la cardiotropina-1 o el CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) y otros factores de crecimiento demostrándose recientemente que ejercen funciones en la supervivencia neuronal, tales como: TGF- β , IGF, EGF, FGF, BMPs y PDGF. Entre estos factores neurotróficos, la familia de las neurotrofinas es de gran importancia, debido a su amplia expresión en diferentes poblaciones neuronales del SNC y SNP.

El hallazgo del NGF validó la hipótesis de acción de un factor neurotrófico: los tejidos diana secretan cantidades limitantes de factores de supervivencia, que permiten un balance entre el tamaño del tejido diana y el número de neuronas que lo inervan. Dos décadas después de la identificación del BDNF como el prototipo de neurotrofina para las neuronas del SNP, (Barde et al., 1982) purificaron una segunda neurotrofina a partir del cerebro de cerdo, la cual se comportaba como un factor de supervivencia para algunas poblaciones neuronales y se denominó factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF). Las secuencias conservadas de estas dos proteínas permitieron el aislamiento de clones que codifican para miembros adicionales de esta familia, como la neurotrofina-3 (NT-3; Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Jones et al., 1990) y la neurotrofina-4/5 (NT-4; Hallböök et al.,

1991; Ip et al., 1992). En la actualidad se conocen cuatro neurotrofinas en los mamíferos: NGF, BDNF, NT-3 y NT-4. En peces se han aislado otras neurotrofinas denominadas NT-6 Y nt-7, las cuales no tienen ortólogos en mamíferos y aves, pero parece que interactúan con los mismos receptores que las proteínas de mamíferos (Goltz et al., 1994; Lai et al., 1998)

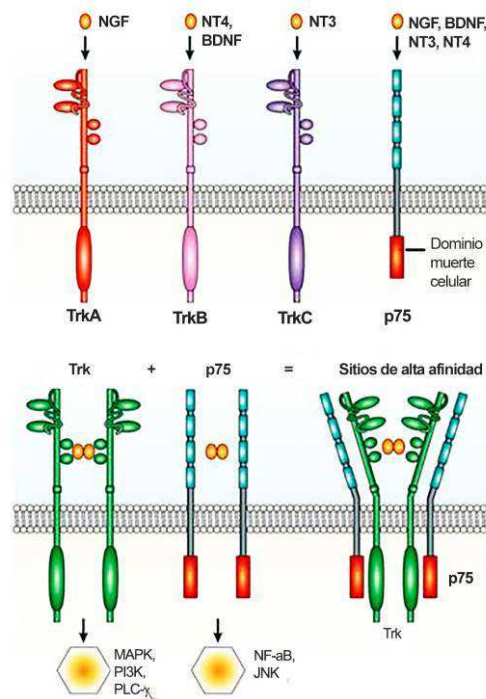


Figura 4. Las neurotrofinas y modelos de activación de los receptores Trk y p75.

La unión de las neurotrofinas resulta en la dimerización de cada receptor. Las neurotrofinas se unen selectivamente a receptores específicos Trk, mientras que todas las neurotrofinas se unen a p75. Los receptores Trk, contienen dominios extracelulares inmunoglobulina G (IgG) de unión al ligando y una secuencia catalítica de tirosina quinasa, en el dominio intracelular. Cada receptor activa varias vías de señal de transducción: NGF se une específicamente a TrkA, BDNF y NT4 reconocen a TrkB, y NT3 activa TrkC. En algunos contextos celulares NT3 podría activar a TrkA y TrkB pero con menos eficiencia. La porción extracelular de p75 contiene cuatro repeticiones ricas en cisteína, y la parte intracelular contiene un dominio de muerte celular. La unión de las neurotrofinas al receptor p75 media supervivencia, migración celular y mielinización a través de varias vías de señalización. Las interacciones entre los receptores Trk y p75 pueden conducir a cambios en la afinidad de la unión de las neurotrofinas. BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; JNK, quinasa N-terminal Jun; MAPK, Vía MAPK; NGF, factor de crecimiento nervioso; NT, neurotrofina; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PLC, fosfolipasa C. Modificado de Chao, 2003.

Las neurotrofinas han tenido un papel clave en el desarrollo neurobiológico. Los ensayos que llevaron a su descubrimiento revelaron una función esencial en el control de la supervivencia celular y la diferenciación. Ciertos estudios demostraron que el GDNF era internalizado mediante un proceso mediado por un receptor y transportado mediante vesículas membranosas a lo largo del axón hacia el soma utilizando el citoesqueleto y la energía necesaria (Thoenen y Barce, 1980). Se ha determinado que la señalización local regula la motilidad del cono de crecimiento, mientras que la señalización en el soma celular controla la supervivencia celular y la expresión génica. Trabajos posteriores, además, han revelado una diversidad de funciones de estos factores fuera del sistema nervioso, como por ejemplo en el

desarrollo del sistema cardiaco, la neovascularización y la función del sistema inmune (Donovan et al., 2000; Lin et al., 2000; Copolla et al., Kermani et al., 2005).

Las neurotrofinas y sus genes comparten homologías en la secuencia y estructura, la organización de los segmentos genómicos adyacentes a estos genes es también similar, por lo que se considera que los genes se han originado por duplicaciones sucesivas de una porción del genoma derivado de un cordado ancestral (Hallböök et al, 1999). Sus genes comparten muchas similitudes, incluyendo la existencia de múltiples promotores y la proteína producto de cada gen incluye una secuencia señal y un pro-dominio, seguido por la secuencia de la proteína madura. De este modo, cada producto génico debe ser procesado por proteólisis para formar una proteína madura. La regulación de la maduración es clave en el control post-transcripcional que limita y añade especificidad a sus acciones. Las proteínas maduras de las neurotrofinas son homodímeros asociados de manera no covalente y, aunque algunos monómeros *in vitro* son capaces de formar heterodímeros con monómeros de otra neurotrofina, *in vivo* no hay evidencias de que estos heterodímeros existan en concentraciones significativas. (McDonals et al., 1991; Robinson et al., 1995; Butte et al., 1998)

Todas las neurotrofinas son generadas como precursores pre-pro-neurotrofinas (de aproximadamente 240-260 aminoácidos), que posteriormente son procesadas hasta que se secretan como proteínas homodiméricas maduras hacia el espacio extracelular (longitud del monómero: 118-129 aminoácidos). Su actividad es regulada por las proteasas responsables de la conversión de pro-neurotrofinas en neurotrofinas maduras. El interés de estas proteasas se ha incrementado debido a ciertos ensayos donde se ha demostrado que las pro-neurotrofinas son secretadas por células y son biológicamente activas (Lee et al., 2001). El procesamiento intracelular de las pro-neurotrofinas no siempre es eficiente, ciertas cantidades de estas moléculas son secretadas en algunos tejidos. Las pro-neurotrofinas se unen con gran afinidad al p75NTR y activan las vías de señalización controladas por este receptor, el cual en muchas células termina promoviendo la apoptosis (Lee et al., 2001). Los datos sugieren que la secreción de las pro-neurotrofinas está incrementada después de una lesión o degeneración cerebral, y la unión de estas proteínas a p75NTR puede aumentar la pérdida neuronal en lesiones y modelos de enfermedades (Pedraza et al., 2005).

En el interior celular las formas maduras del NGF, BDNF, y NT-3 son generadas por furina y otras prohormonas convertasas (Seidah et al., 1996). Como resultado, tamaños variados de pro-neurotrofinas son detectadas en extractos cerebrales (Lee et al., 2001). La pro-BDNF extracelular es fragmentada por plasmita (Pang et al., 2004) y la regulación de esta fragmentación es de gran interés debido a los datos que indican que el BDNF maduro y la pro-BDNF promueven distintas formas de plasticidad sináptica en el hipocampo a través de receptores diferentes (Zakharenko et al., 2003; Pang et al., 2004).

Algunos estudios sobre la expresión de las neurotrofinas dentro de las neuronas se han enfocado principalmente en el BDNF ya que es un importante modulador de la plasticidad

sináptica. La expresión del BDNF está controlada a través de cuatro promotores diferentes. La expresión de uno de estos promotores está regulada por el flujo de Ca^{2+} . Este a su vez activa la transcripción del BDNF a través de cascadas de proteína kinasas que activan ciertos factores de transcripción (Tao et al., 2002).

Los receptores de las neurotrofinas.

Las neurotrofinas interactúan con dos clases distintas de receptores. En mamíferos, los tres miembros de la subfamilia de receptor tirosina kinasa (Trk) constituyen la segunda clase de receptores para las neurotrofinas (Chao et al, 2003; Huang y Reichardt, 2003). El dominio extracelular de cada receptor Trk está formado por un grupo rico en cisteína seguido por tres repeticiones ricas en leucinas y otro grupo rico en cisteína, cada receptor se expande a través de la membrana y termina en un dominio citoplasmático tirosina kinasa. Las tirosinas que rodean a este dominio sirven como sitios de anclaje y son dependientes de fosforilación para adaptadores citoplasmáticos y enzimas. Las cuatro neurotrofinas exhiben especificidad en su interacción con los tres miembros de esta familia de receptores, así tenemos que el NGF activa TrkA, BDNF y NT-4 activan TrkB, mientras que la NT-3 activa TrkC, aunque esta última neurotrofina puede activar a los otros receptores Trks con menos eficacia. El lugar por el cual las neurotrofinas interactúan con estos receptores es el dominio inmunoglobulina proximal a la membrana, cuya estructura tridimensional para cada uno de los receptores Trks ha sido resuelta (Ultsch et al., 1999). (Figura 4).

La expresión de un receptor específico Trk confiere sensibilidad a las neurotrofinas I que se unen, sin embargo, los diferentes procesamientos alternativos introducen algunas limitaciones a esta generalización. Por ejemplo, diferentes procesamientos a través de inserciones de secuencias cortas de aminoácidos en el dominio extracelular del TrkA, TrkB y TrkC afectan a la interacción del ligando con cada receptor (Meakin et al., 1992; Clary y Reichardt, 1994; Shelton et al., 1995; Garner et al., 1996; Strohmaier et al., 1996). Para TrkA y TrkB la inserción de una secuencia que codifica para un pequeño exón, potencia la unión del receptor a ligandos no específicos. Las isoformas del TrkA y TrkB que carecen de estos insertos son activadas únicamente por el NGF y BDNF respectivamente, la isoforma del TrkA que incluye el inserto es activada por NT-3, además del NGF (Clary y Reichardt, 1994), y la isoforma similar del TrkB es activada por NT-3 y NT-4 además de por el BDNF (Strohmaier et al., 1996).

Los diferentes procesamientos de los exones que codifican para porciones de los dominios intracelulares de los receptores Trks también regulan la señalización iniciada por la unión de las neurotrofinas. Ciertas isoformas de TrkB y TrkC incluyen pequeños motivos citoplasmáticos sin el dominio tirosina kinasa y la expresión de esta isoforma inhibe la dimerización de los receptores Trks que contienen el dominio kinasa (Eide et al., 1996). Durante muchos años se pensó que estos receptores truncados no señalizaban, pero de hecho limitan la difusión de las neurotrofinas y posiblemente participan en la transducción de la señal por parte de los

receptores. El procesamiento del mRNA de TrkC produce una isoforma de TrkC con un inserto de aminoácidos dentro del dominio tirosina kinasa, y este inserto modifica la especificidad de este dominio, inhibiendo la activación de algunos sustratos e interfiriendo con la habilidad para promover la diferenciación neuronal (Guiton et al., 1995; Meakin et al., 1997). El procesamiento diferencial de los mRNA de los receptores Trks no es la única influencia que modula la acción y unión de las neurotrofinas. En algunas neuronas del SNC, muchos receptores están localizados en vesículas intracelulares. Segundos mensajeros, tales como cAMP o Ca²⁺, promueven la inserción de los receptores en la superficie de la membrana, donde son accesibles a las neurotrofinas (Meyer-France et al., 1998; Du et al., 2000).

Antes del descubrimiento de los receptores Trks, el primero que se descubrió, se denominó receptor para las neurotrofinas p75 (p75NTR) y fue identificado como un receptor de baja afinidad para el NGF. Seguidamente se descubrió que era capaz de unir a cada neurotrofina con similar afinidad (Rodríguez-Tebar et al., 1990; Frade y Barde, 1998). p75NTR es un miembro de la superfamilia de receptores de necrosis tumoral con un dominio extracelular que incluye cuatro motivos ricos en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que incluye un dominio “*muerte*” similar a los presentes en miembros de esta familia (Liepinsh et al., 1997; He y García, 2004). Aunque este receptor no contiene motivos catalíticos, es capaz de interactuar con algunas proteínas, que transmiten señales claves que regulan la supervivencia y diferenciación neuronal así como la plasticidad sináptica. Por ejemplo, el receptor se une a NGF en la interfase entre los dos monómeros y el resultado de la unión termina con un cambio en la conformación de NGF. Esto sugiere que la unión de receptor y ligando podría disociar los multímeros de p75NTR siendo compatible con la posibilidad de que los Trks y los monómeros de p75NTR se unan al mismo dímero de neurotrofina. Además, la función de los receptores TrkA está regulada en ocasiones por la presencia de p75NTR. Este receptor inhibe la activación de los Trks por neurotrofinas no específicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Benedetti et al., 1993; Brennan et al., 1999; Bibel et al., 1999), es capaz de potenciar la activación de TrkA por concentraciones subóptimas de NGF, (Davies et al., 1993; Mahadeo et al., 1994), colabora con TrkA para formar sitios de unión de alta afinidad para NGF (Espósito et al., 2001) y además de promover la unión del NGF al TrkA, es capaz de promover el transporte retrógrado de otras neurotrofinas (Curtis et al., 1995).

Señalización activada por neurotrofinas.

La teoría clásica sobre los factores neurotróficos sugiere que las neurotrofinas son secretadas en cantidades limitantes por el tejido diana piel, músculo, glándulas, neuronas y mantienen la supervivencia y diferenciación de las neuronas que inervan esta diana (Levi-Montalcini et al, 1987; Toenen et al, 1991). Teniendo en cuenta esta teoría, se espera que las neurotrofinas sean expresadas por células no neurales así como en el soma y dendritas de neuronas sobre las cuales terminan los axones. Después de la secreción por parte del tejido diana, las neurotrofinas se unen a los receptores Trks y/o p75NTR, son endocitadas y

transportadas de manera retrógrada del axón hacia el soma celular donde pueden activar diferentes cascadas de señalización (revisión en Heerssen y Segal, 2002). Se ha demostrado que cada una de las neurotrofinas, través de la interacción con el receptor, internalización y transporte retrógrado, tiene una acción local que afecta al comportamiento del cono de crecimiento y a la función sináptica, así como a las acciones en el cuerpo celular y el núcleo (Fariñas et al., 1996; Yee et al., 2003)

El transporte retrógrado clásicamente lo utilizan las neurotrofinas para ejercer efectos de duración relativamente larga, como por ejemplo, aquellos que impliquen la transcripción de nuevos genes. Sin embargo, existe un transporte anterógrado dirigido hacia los terminales sinápticos, y este proceso parece ser relevante en algunas regiones del cerebro (revisión en Altar y DiStefano, 1998). Por último, pero no por ello menos importante, las neurotrofinas pueden ejercer acciones rápidas (Blum et al., 2002) que conducen a la activación de corrientes de iones de Na⁺. Debido a la desensibilización rápida de estas respuestas, las neurotrofinas son almacenadas en compartimentos especializados que permiten su rápida secreción.

La activación de un receptor Trk produce la fosforilación de algunas de las tirosinas del dominio citoplasmático conservadas evolutivamente, potenciando la actividad tirosina kinasa (Cuningham et al., 1998) y también la fosforilación de residuos adicionales que sirven como sitios de reclutamiento y anclaje de proteínas que contienen dominios PTB (del inglés phosphotyrosine-binding domains) o SH2 (del inglés homology domain 2). Las vías de señalización intracelular activadas por estas proteínas incluyen: Ras/Erk (del inglés Ras/extracelular regulated kinase), PI3K/Akt (del inglés phosphatidylinositol-3 /Akt Kinase), PLC- γ 1 (del inglés phospholipase C-1), NF κ B (del inglés nuclear factor-kappa B), y PKC (del inglés Protein Kinase C) (Wooten et al., 199; Foeht et al., 2000; Kaplan y Miller, 2000).

La familia de proto-oncogenes Ras incluye proteínas que regulan la diferenciación neuronal. En muchas neuronas Ras promueve la supervivencia neuronal a través de PI3K o por la vía MAK/ERK. Si la respuesta a la neurotrofina induce proliferación o diferenciación parece depender de la activación de la vía de MAPK/ERK (Grewal et al., 1999). Shc puede también estimular la actividad transitoria de Ras a través de SOS.

Entre las dianas de ERK están las RSKs (del inglés Ribosomal S6 kinase), que junto con MAPK-2 (del inglés Mitogen Activated Protein Kinase) pueden fosforilar la proteína de unión a CRE (CREB, CRE-binding protein) y otros factores de transcripción. Se ha demostrado que CREB regula genes esenciales para la supervivencia de las células granulares del cerebelo y neuronas simpáticas (Bonni et al., 1999; Riccio et al., 1999). En las células PC12, la activación prolongada de la señalización por B-raf y ERK (York et al., 1998, 2000; Nosaka et al., 1999). Frs-2 también se une a la familia de las Src que están implicadas en la endocitosis del receptor y otras respuestas celulares (Silde et al., 1999; Beattie et al., 2000).

Los receptores Trks pueden activar PI3K a través de al menos dos vías distintas. En muchas neuronas, la activación de PI3K dependiente de Ras es la vía más importante a través de la cual las neurotrofinas promueven la supervivencia (Vaillant et al., 1999). Sin embargo, PI3K también puede ser activada a través de tres proteínas adaptadoras, Shc, Grb-2 y Gab-1 (Holgado-Madruga et al., 1997) o de forma indirecta a través de la fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS-1 que a su vez conduce a la activación de PI3K (Yamada et al., 1997). Los productos lipídicos generados por PI3K reclutan muchas proteínas entre las que se encuentran Akt kinasa y PDKs (del inglés 3-phosphoinositide-dependent kinase). Akt es activado en la membrana por PDK y fosforila a algunas proteínas importantes en el control de la supervivencia celular (Datta et al., 1999; Yuan y Yanker, 2000); entre estas se encuentran BAD (del inglés Bcl-2/Bcl-x-associated death promotor), I κ B (del inglés Inhibitor kinase B), FKHRL1 (del inglés Forkhead family transcription factor), GSK 3- β (del inglés glycogen synthase kinase) y la caspasa-9 (Brunet et al., 1999), muchas de las cuales regulan el proceso de apoptosis celular (revisión general de la señalización por Trks en Patapoutian y Reichardt, 2001; Reichardt et al., 2006).

2.2. La hipótesis neurotrófica y el desarrollo sensorial embrionario.

La muerte neuronal que tiene lugar de forma natural en el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados, está fuertemente regulada por factores neurotróficos (Kirstein y Fariñas, 2002). Dentro de estos factores las neurotrofinas constituyen una pequeña familia que en los mamíferos está compuesta por NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3) y NT-4/5 (neurotrophin-4/5). Originalmente se demostró que estas moléculas eran producidas en cantidades limitantes por los órganos diana justo en el momento de su innervación.

De esta forma, las neuronas compiten por su supervivencia y se establece un equilibrio entre el número de neuronas inervantes y el tamaño del órgano inervado. Actualmente se sabe que estas proteínas de secreción regulan otros muchos aspectos del desarrollo del sistema nervioso como son la diferenciación neuronal o la elongación de los axones, entre otros procesos (Kirstein y Fariñas, 2002). Las neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores extracelulares: el receptor de baja afinidad de NGF, p75^{LNGFR}, que es capaz de unir cualquiera de las neurotrofinas con similar afinidad, y los receptores de alta afinidad pertenecientes a la familia Trk de receptores de membrana tirosina kinasa. NGF activa específicamente TrkA; BDNF y NT-4/5 activan TrkB; NT-3 activa TrkC y ocasionalmente puede activar TrkA o TrkB (Bothwell et al., 1995).

En los últimos años, se han generado numerosas cepas de ratones, con deleciones dirigidas en los genes que codifican para las distintas neurotrofinas o sus receptores. Su análisis ha proporcionado información sobre los requerimientos neurotróficos de determinadas poblaciones neuronales, en el sistema nervioso central y periférico de mamíferos (Reichardt y Fariñas, 1997; Kirstein y Fariñas, 2002). Las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz

dorsal (DRG) son células morfológica y funcionalmente heterogéneas (revisiones en Scott et al., 1992). Las diferentes subpoblaciones están especializadas en la transducción de diferentes modalidades de información sensorial como la posición espacial (propiocepción), el tacto (mecanorrecepción), el dolor (nocicepción), etc... También inervan diferentes tipos de receptores periféricos y proyectan a distintas áreas del sistema nervioso central. Estas neuronas difieren en sus propiedades electrofisiológicas y expresan diferentes neurotransmisores y neuropéptidos. Además, todas ellas expresan los receptores de alta afinidad de las neurotrofinas (Trks) durante el desarrollo embrionario y el periodo postnatal (Mu et al., 1993; McMahon et al., 1994; Fariñas et al., 1998). Todas estas características convierten a los DRGs en un sistema excelente para el análisis de la especificidad de acción de las diferentes neurotrofinas. Durante el desarrollo embrionario y en el momento del nacimiento, el 70-80% de las neuronas sensoriales de los DRGs expresan el receptor TrkA y requieren la presencia de NGF para su supervivencia (Smeyne et al., 1994; White et al., 1996). Este grupo está formado por neuronas de tamaño pequeño o intermedio y con axones envueltos por una fina capa de mielina (fibras tipo Aδ) o totalmente amielínicos (fibras tipo C). (Figura 5)

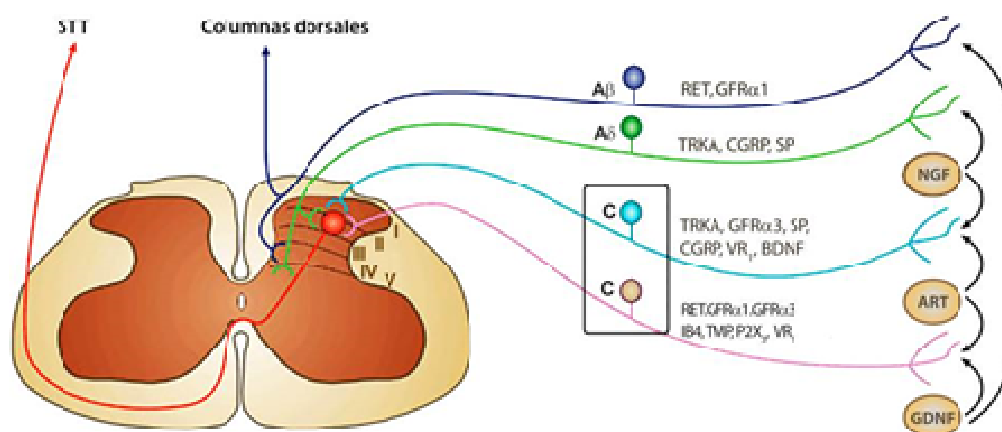


Figura 5. Subclases de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y del "input" de la espina dorsal.

Las fibras mielínicas Aβ de las neuronas de tamaño mediano de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) son mecanorreceptores de bajo umbral que median las sensaciones de tacto, presión y vibración. Estas fibras terminan en las interneuronas localizadas en las láminas III y IV del asta dorsal y a su vez proyectan sus axones por la cara rostral de las columnas dorsales. Las fibras mielinizadas más finas de tipo Aδ y las fibras C no mielinizadas de las neuronas pequeñas de los DRG, median el dolor o las respuestas nociceptivas de los estímulos térmico (frío, calor) y punzantes. Estas fibras de pequeño tamaño (Aδ y C) terminan en las láminas I, II y V del asta dorsal, en las neuronas de segundo orden que dan lugar al tracto espinotalámico ascendente (STT). Las neuronas pequeñas de los DRG expresan diferentes subconjuntos de neurotransmisores (la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)) y receptores de neurotransmisores (el receptor vaniloide subtipo 1 (VR1), el canal de iones dependiente de ATP (purinoceptor) subtipo (P2X3)). Estas neuronas también se pueden clasificar en base a sus receptores para el factor de crecimiento nervioso (NGF) (receptor neurotrófico del tipo tirosina kinasa 1 (TRKA)), para el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (GFRα1, RET) y para artemina (ART) (GFRα3, RET). Dentro de las neuronas pequeñas que dan lugar a las fibras C, un subconjunto expresa TRKA, mientras que el otro se une al isolectina IB4 y contiene la enzima monofosfatasa tiamina (TMP), existiendo un pequeño solapamiento entre estos dos subconjuntos. Modificado de Sah et al, 2003

La mayoría de ellas expresan un neuropéptido asociado a la nocicepción llamado CGRP (calcitonin gene-related peptide). Sin embargo, 15 días después del nacimiento, solo el 40% de

las neuronas sensoriales expresan TrkA o CGRP. El resto de la población original sufre un cambio fenotípico en este periodo del desarrollo postnatal, generando así una nueva población de neuronas de pequeño tamaño que constituyen el 25-35% del ganglio, dejan de depender de NGF, expresan c-ret y se marcan con IB4, una lectina de la planta *Bandeiraea simplicifolia* (Mu et al., 1993; Molliver and Snider, 1997; Molliver et al., 1997; Silos-Santiago et al., 1995; Bachy et al., 2011; Lallemand y Ernfors, 2012).

Los estudios en DRGs de ratones que carecen de NT-3 o de su principal receptor TrkC han demostrado que la presencia de esta neurotrofina es esencial para la supervivencia de una pequeña población de neuronas sensoriales (<20%) de gran tamaño, que expresan parvalbúmina y son responsables de la propiocepción. Estas neuronas inervan receptores que informan sobre el grado de tensión en los músculos y tendones como es el caso de los husos musculares y los órganos tendinosos de Golgi (Ernfors et al., 1994; Fariñas et al., 1994; Klein et al., 1994; Tessarollo et al., 1994; Tojo et al., 1995).

Tanto BDNF como su principal receptor, TrkB, se expresan ampliamente durante el desarrollo embrionario y postnatal (Klein et al., 1990; Ernfors et al., 1990; Schecterson and Bothwell, 1992). Sin embargo, las poblaciones que responden a BDNF o a su receptor TrkB en los DRGs, no han sido caracterizadas. En determinadas cepas de ratones mutantes nulos de BDNF y TrkB, se ha descrito un déficit en el número de neuronas sensoriales de los DRGs (30-35%) a los 15 días postnatales, pero no en el momento del nacimiento (Klein et al., 1993; Jones et al., 1994; Ernfors et al., 1994; Silos-Santiago et al., 1997). No obstante, se han descrito déficits prenatales en cepas diferentes de ratones mutantes nulos de BDNF y TrkB (Minichiello et al., 1995; Liebl et al., 2000) e incluso se ha descrito una ausencia total de déficit en otros trabajos (Carroll et al., 1998). También existe una gran controversia acerca del periodo del desarrollo en el que se produce la muerte de las neuronas que se pierden. Todo esto puede ser debido a la existencia de diferentes cepas de mutantes nulos de BDNF, con fondos genéticos que afectan de distinta manera a la supervivencia de los animales o a problemas con el análisis fenotípico de las cepas.

3. Modulación de la fisiología del dolor.

Como ya hemos descrito, las neuronas sensoriales que inervan la piel son los primeros mediadores en la percepción de los estímulos externos tanto dolorosos como no dolorosos. En condiciones fisiológicas, las neuronas sensoriales conocidas como nociceptores son activadas por estímulos agudos de tipo doloroso, y en los casos de daño de las propias fibras nerviosas o de inflamación, la sensibilización de las neuronas sensoriales primarias deriva respectivamente en un persistente dolor neurogénico o inflamatorio (Hunt et al, 2001; Boucher et al, 2001). Durante las últimas décadas cada vez se ha estudiado más profundamente todo el proceso de regulación del dolor y muchos resultados convergen en la idea de que en estos estados de dolor neurogénico e inflamatorio existe una importante contribución de las células colindantes tanto gliales como inmunes (Scholz et al, 2007). Por lo tanto es fundamental conocer como se

establece la relación entre estos dos sistemas, proceso en el que tiene que darse una remodelación de la matriz extracelular mediada por la proteólisis de sus componentes, para permitir así la aproximación, tanto de las células neurales como de las células inmunes (crecimiento del cono axónico o de expansiones citoplasmáticas) y el establecimiento de una interacción ya sea física o mediante moléculas difusibles entre ambos sistemas. Como veremos a continuación en todos estos procesos, toman gran relevancia la familia de las metaloproteasas, tanto en procesos de degradación de la matriz extracelular en la proteólisis de moléculas de adhesión, como fragmentos bioactivos liberados y factores tróficos o citoquinas retenidos por moléculas de la matriz.

3.1. Matriz extracelular y su remodelación proteolítica.

Muchas de las células en los tejidos de los organismos multicelulares están incrustadas en una matriz extracelular compuesta de proteínas secretadas y de polisacáridos (Figura 6). La matriz extracelular llena los espacios entre las células y establece la unión entre células y tejidos. Un ejemplo de matriz extracelular es la laminar o membrana basal, en la que se apoyan las capas de células epiteliales y que también rodea a las células musculares, las células adiposas y los nervios periféricos. La matriz extracelular, sin embargo, es más abundante en los tejidos conectivos. Por ejemplo, el tejido conectivo que está bajo las capas de células epiteliales consiste fundamentalmente en una matriz en la que se distribuyen los fibroblastos, o los huesos, tendones y cartílagos, donde la matriz extracelular es la principal responsable de su estructura y función.

Las matrices extracelulares están compuestas por complejas proteínas fibrosas integradas en una sustancia fundamental de tipo gelatinoso, constituida por polisacáridos. Además de las proteínas estructurales fibrosas y los polisacáridos, la matriz extracelular contiene proteínas de adhesión que unen los componentes de la matriz unos con otros para anclar las células.

Las diferencias entre los distintos tipos de matriz extracelular son el resultado de variaciones sobre la forma y la composición de este entramado general. Por ejemplo, los tendones contienen una alta proporción de las proteínas fibrosas, mientras que el cartílago contiene una alta concentración de polisacáridos que forman un gel firme resistente a la compresión.

En los huesos, la matriz extracelular se endurece por el depósito de cristales de fosfato de calcio. La estructura laminar de la lámina basal también se deriva de la utilización de los componentes de la matriz que difieren de las que se encuentran en los tejidos conectivos.

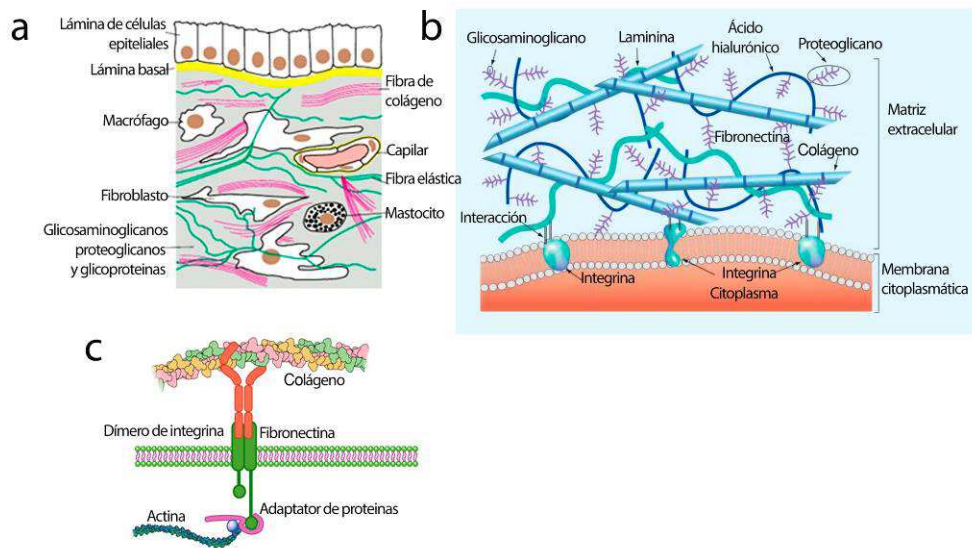


Figura 6. Esquema general de la estructura y composición de la ECM de la piel.

a) Los componentes de la ECM son producidos, secretados y orientados por los fibroblastos del tejido conectivo, que a su vez, quedan englobados por la propia matriz que ellos producen. La ECM del tejido conectivo contiene una sustancia fundamental, amorfa, en la cual se ubican componentes fibrosos: un gel de proteoglicanos, macromoléculas formadas por heteropolisacáridos (también llamados GAG: glucosa-amino-glicanos) y proteínas que suponen un excelente medio para la difusión de nutrientes y de otras moléculas que actúan como mensajeros químicos. Alberts 2008 b) Embebidos en la matriz de proteoglicanos se encuentran las fibras elásticas y las fibras de colágeno. Las primeras están constituidas por la proteína elastina, que se dispone en forma de láminas y redes, mantenidas por enlaces cruzados. Las fibras de colágeno son rígidas y se oponen a las fuerzas de tracción. En la matriz extracelular están presentes otras proteínas que cumplen función de adhesión, por ejemplo, la laminina y la fibronectina. Estas proteínas interactúan, por un lado, con receptores integrinas de la membrana celular y por otro, con los componentes de la matriz. Las proteínas de adhesión, participan en las uniones célula-matriz y célula-célula. Otros componentes de la ECM también poseen dominios de adhesión para unirse a receptores de la superficie celular como integrinas, selectinas, CD44 y sindecán. Modificado de Zhu y Marchant, 2012. c) Las integrinas enlazan el citoesqueleto de actina de una célula a varias estructuras externas. La porción citoplasmática se une a un adaptador de proteínas que a su vez está conectado a los filamentos intracelulares de actina. Por otro lado, la porción extracelular se une a las moléculas en la matriz extracelular o a moléculas ubicadas en la superficie de otras células y estas uniones se pueden romper y recomponer a medida que las células se mueven. Modificado de O'Connor, C. M. & Adams 2010.

Composición de la matriz extracelular:

Colágeno.

Esta es la principal proteína estructural de la matriz extracelular y la más abundante en los tejidos animales. Todos los tipos de colágenos componen una familia de proteínas, que contienen al menos 19 miembros diferentes. Se caracterizan por la formación de triples hélices en las que tres cadenas de polipéptidos se enrollan firmemente una alrededor de la otra en forma de triple hélice cuyos dominios consisten en repeticiones de la secuencia de aminoácidos Gly-X-Y.

De los colágenos, el tipo I es el más abundante, tiene forma fibrilar y constituye el componente estructural básico de todos los tejidos conectivos. Después de ser secretada por la célula, estos colágenos se ensamblan para formar las fibrillas en las que las moléculas de triple hélice forman un empaquetamiento escalonado y periódico. Estas fibrillas no se forman dentro

de la célula, ya que durante la formación del colágeno fibrilar se sintetizan precursores solubles (pro-colágenos) que contienen segmentos no-helicoidales en ambos extremos de la cadena polipeptídica. El pro-colágeno es degradado por proteasas después de su secreción, por lo que el ensamblaje del colágeno en fibrillas tiene lugar sólo fuera de la célula.

Otros tipos de colágeno no forman fibrillas, sino que desempeñan funciones distintas en diferentes tipos de matrices extracelulares, como el colágeno tipo IV que forma las láminas basales o colágenos que forman fibrillas de anclaje que unen algunas láminas basales a los tejidos conectivos subyacentes.

Fibras elásticas.

Los tejidos conectivos también contienen fibras elásticas, particularmente abundantes en los órganos, que regularmente se expanden y luego vuelven a su forma original. Los pulmones, por ejemplo, se expanden cada vez que se inhala y vuelven a su forma original con cada exhalación. Las fibras elásticas están compuestas principalmente de una proteína llamada elastina, que se entrecruza en una red de enlaces covalentes y se forman entre las cadenas laterales de residuos de lisina (similares a los encontrados en el colágeno). Esta red de cadenas de elastina entrecruzada se comporta como una banda de goma, que se extiende bajo tensión y reacciona contrayéndose cuando la tensión se libera.

Proteínas fibrosas.

Son proteínas estructurales de la matriz extracelular y están incrustadas en geles formados a partir de polisacáridos llamados glicosaminoglicanos o GAG, que consisten en unidades repetidas de disacáridos. Al igual que las pectinas de las paredes celulares vegetales, los GAG unen iones con carga positiva y atrapan las moléculas de acumulación de agua para formar geles hidratados, lo que proporciona un soporte mecánico a la matriz extracelular. Se han descrito múltiples GAG como el ácido hialurónico, el condroitín sulfato-4, el condroitín sulfato-6, el dermatán sulfato, el heparán sulfato, la heparina, el queratán sulfato, el agregán, etc.

Ácido hialurónico es el único GAG que se presenta como una larga cadena de polisacáridos individuales. Todos los demás GAGs están ligados a proteínas para formar proteoglicanos que pueden consistir hasta en un 95% de polisacáridos en peso molecular. Los proteoglicanos pueden contener desde tan sólo uno a más de un centenar de cadenas de GAG unidos a los residuos de serina de la proteína. Se han identificado una gran variedad de proteínas esenciales (desde 10 a > 500 Kd), por lo que los proteoglicanos constituyen un grupo muy diverso de macromoléculas. Además, aún siendo componentes de la matriz extracelular, algunos proteoglicanos son proteínas de la membrana celular que trabajan en la adhesión intercelular. Por ejemplo, el perlecan (principal proteoglicano heparán sulfato de las láminas basales) se une a la del colágeno tipo IV y a la proteína de adhesión laminina, que describimos a continuación.

Proteínas de adhesión.

Son los constituyentes de la matriz extracelular responsables de la unión entre los componentes que la conforman así como con las superficies de las células.

El prototipo de estas moléculas es la fibronectina, que es la proteína principal de la adhesión de los tejidos conectivos. La fibronectina es una glicoproteína dimérica compuesta por dos cadenas de polipéptidos, cada uno con cerca de 2.500 aminoácidos. En la matriz extracelular, la fibronectina se encuentra muy reticulada entre las fibrillas por puentes disulfuro. La fibronectina tiene puntos de unión de colágeno y GAG, por lo que se encarga de entrelazar estos componentes de la matriz. Además la molécula posee un sitio de unión distinto que es reconocido por los receptores de superficie celular y que es responsable de la unión de las células a la matriz extracelular. Otras proteínas de adhesión son la laminina, la entactina, la tenascina, la condronectina y la osteonectina. Las proteínas de adhesión suelen fijarse a las integrinas de la membrana celular y establecer un entramado, uniéndose a su vez con las fibras de colágeno y los proteoglicanos.

Las láminas basales contienen una proteína de adhesión distinta llamada laminina. Al igual que el colágeno tipo IV, la laminina puede auto-ensamblarse para formar polímeros con forma de malla. Esta proteína genera lugares de unión a receptores de superficie celular del colágeno tipo IV y del perlecan y además, está estrechamente asociada con otra proteína de adhesión, llamada entactina o nidógeno, que también se une al colágeno tipo IV. Como resultado de estas interacciones múltiples, la laminina, la entactina, el colágeno tipo IV y el perlecan forman grandes redes entrecruzadas en la lámina basal.

Los receptores más importantes de la superficie celular, responsables de la unión de las células a la matriz extracelular, son las integrinas. Estas son una familia de proteínas transmembrana compuestas por dos subunidades, designadas α y β . Se han identificado más de 20 integrinas diferentes, formadas a partir de combinaciones de 18 subunidades α y 8 subunidades β conocidas. Las integrinas se unen a secuencias cortas de aminoácidos presentes en varios componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, la fibronectina y la laminina. No obstante, los proteoglicanos transmembrana de la superficie de una gran variedad de células, también se unen a los componentes de la matriz extracelular y modulan las interacciones célula-matriz.

Además de fijar las células a la matriz extracelular, las integrinas sirven para anclar el citoesqueleto. El anclaje del citoesqueleto a la matriz extracelular es responsable de la estabilidad de las uniones célula-matriz. Se han identificado dos tipos diferentes de interacciones célula-matriz entre las integrinas y el citoesqueleto: adhesiones focales y hemidesmosomas.

Las adhesiones focales conectan una gran variedad de células a la matriz extracelular y los dominios citoplásmicos de las subunidades β de las integrinas en estas uniones célula-

matriz, anclan el citoesqueleto de actina mediante la asociación con haces de filamentos de actina. Los hemidesmosomas son los sitios especializados de anclaje de las células epiteliales donde una determinada integrina (designada $\alpha 6\beta 4$) interactúa con los filamentos intermedios en lugar de con la actina. La integrina $\alpha 6\beta 4$ se une a la laminina, por lo que los hemidesmosomas unen las células epiteliales a la lámina basal.

Como hemos descrito la ECM está compuesta por una mezcla compleja de moléculas insolubles y todo este entramado no solo genera un sólido soporte físico para las células sino que actúa como una reserva de citoquinas y factores tróficos que se encuentran integrados en él. Estas moléculas así como las que componen la propia red de la ECM son capaces de unirse a receptores de la membrana citoplasmática de las células colindantes, proporcionando señales externas que contienen información de su micro entorno y que provocaran una reacción en ellas según el estímulo (Miranti et al, 2002; Michele et al, 2003; Yoneda et al, 2003; Hynes et al, 2002).

Como describiremos posteriormente, la matriz extracelular (ECM) conlleva una extensa remodelación tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas (Chambers et al, 1997; Birkedal-Hansen et al, 1993; Werb et al, 1997). El crecimiento embrionario o la morfogénesis tisular son procesos fisiológicos esenciales que requieren la regulación de la matriz extracelular para su desarrollo. También existen numerosos estudios acerca de la remodelación proteolítica de la ECM en el campo de algunas patologías como el cáncer donde las células neoplásicas necesitan liberarse de esta barrera molecular para que el tumor crezca, para poder adquirir capacidad invasiva o para favorecer la angiogénesis.

En el ámbito del desarrollo neuronal, la remodelación proteolítica de la matriz extracelular (ECM) es un evento esencial en el desarrollo de los sistemas nerviosos periférico y central (Page-McCaw et al., 2007) ya que es necesario un programa regulado de proteólisis pericelular para permitir que tengan lugar procesos como la proliferación, la migración y la diferenciación celular, el crecimiento, la guía axónica y la mielinización.

3.2. Moléculas de adhesión célula-célula.

Los sistemas de adhesión célula-célula están implicados en muchos aspectos del desarrollo neuronal, incluida la migración de las células neuronales, la formación de los haces axónicos, la formación de uniones sinápticas y la formación de complejos de redes gliales que rodean a estos axones y sinapsis. También son muy importantes para la morfología del cerebro y para funciones cerebrales altamente coordinadas, como la memoria y el aprendizaje. Las uniones célula-célula en el sistema nervioso están formadas por una gran variedad de proteínas transmembrana, elementos del citoesqueleto y complejos de señalización. Se han identificado y caracterizado varias proteínas de superficie celular como importantes reguladoras de la orientación de axón y la formación de sinapsis. Estas moléculas son capaces de interactuar entre sí, desde distintas células, de manera que activan diferentes vías de

señalización y consiguen así el contacto físico de las membranas celulares en las que se encuentran adosadas.

Los cambios morfológicos que acompañan al desarrollo de las ramificaciones axónicas en la neuritogénesis, implican una reorganización muy dinámica del citoesqueleto y en parte están reguladas a través de las interacciones entre los receptores de la superficie celular de las neuronas y la matriz extracelular que los rodea (Revisado en Powell and Rivas; 1998; Faivre-Sarrailh et al., 1999; Sakurai et al., 2001). De hecho recientemente se han realizado comparaciones estructurales en poblaciones neuronales mantenidas en presencia de diferentes moléculas de adhesión, solubles o integradas, como sustrato en la matriz extracelular (ECM) y los resultados han implicado la adhesión diferencial como un mecanismo precoz subyacente al crecimiento y a la arborización de las neuritas (Burmeister et al., 1991; Prochiantz et al., 1995; Chamak et al., 1989; Lafont et al., 1992; Edelman et al., 1982; Edelman et al., 1998; Flanagan et al., 1998; Flanagan et al., 2002; Luckenbill-Edds et al., 1997). Dentro de un cono de crecimiento activo, los filamentos de actina son capaces de responder a una gran variedad de sustratos secretados que forman parte de la ECM, a través de su interacción directa con moléculas de adhesión localizadas en la superficie celular (Burmeister et al., 1991; Powell et al., 1998; Bixby et al., 1996; Bixby et al., 1994; Powell et al., 1997; Sanes et al., 1989). Como consecuencia, el crecimiento axónico, su orientación y el establecimiento de las conexiones neuronales adecuadas, dependen en gran medida de la distribución espacial de las señales de la ECM en el medio extracelular. De hecho, la activación de receptores de membrana a través de una exposición local o global de los componentes de la ECM, pueden producir efectos muy diferentes en la regulación de la extensión de las neuritas y su ramificación. Por ejemplo, una fuente local de colágeno IV promueve el crecimiento de árboles dendríticos muy complejos en las células del ganglio cervical superior en ratas, mientras que un sustrato como el matrigel, compuesto por la compleja combinación de moléculas procedentes de un extracto de proteína de la ECM de la membrana basal (laminina), estimula la formación del axón y aumenta la producción de dendritas (Craig et al., 1994; Powell et al., 1998; Ruoslahti et al., 1997; Lein et al., 1992; Esch et al., 1999; Esch et al., 2000).

Los receptores de adhesión de la superficie celular se dividen en cuatro familias diferentes: las integrinas, la superfamilia de genes de inmunoglobulinas y las cadherinas, todos los cuales influyen en la morfogénesis de las ramificaciones, y por otro lado las selectinas que no están implicadas en estos procesos (Figura 7). A pesar de que las familias de CAMs y SAMs están unidas por funciones similares en la regulación de la adhesión celular durante el establecimiento de la morfología neuronal, las acciones específicas mediadas por cada molécula de adhesión durante el desarrollo, son muy distintas y dependientes del contexto celular.

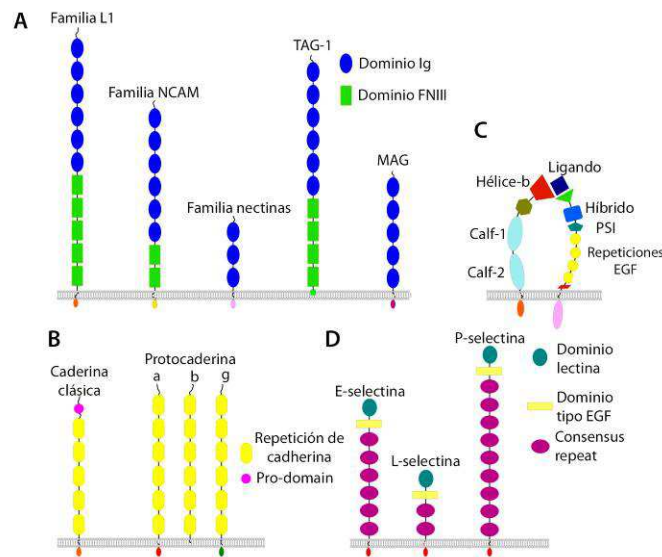


Figura 7. Diagrama esquemático de diversas estructuras de dominios de las diferentes superfamilias de CAMs. A. Proteínas IgSF CAM. B. Cadherinas. C. Integrinas. D. Selectinas. Modificado de Bian, 2013.

Integrinas.

Las integrinas constituyen heterodímeros transmembrana formados por enlaces no covalentes, que facilitan uniones transmembrana puntuales entre la ECM y las estructuras que subyacen en el citoesqueleto, tal como se generan en los complejos de adhesión focal. Las subunidades de las integrinas se pueden expresar de forma individual y se compartimentan selectivamente en un espacio subcelular específico, como por ejemplo, la concentración de la integrina $\alpha 5$ dentro de las dendritas apicales de las principales neuronas piramidales del hipocampo, y su exclusión de los arboles dendríticos basales (Yanagida et al., 1999; Bi et al., 2001; Pinkstaff et al., 1998). Así, los cambios morfogénéticos también se pueden compartimentar selectivamente en determinados dominios axónicos o dendríticos. Por ejemplo, los árboles dendríticos apicales y basales de las neuronas del hipocampo, generan morfologías muy diferentes en respuesta a señales adhesivas locales, debido a la distribución diferencial de los distintos tipos de receptores integrinas.

Superfamilia de las inmunoglobulinas.

Las moléculas responsables de la adhesión celular independiente de Ca^{2+} pertenecen principalmente a la gran y muy conservada superfamilia de proteínas de inmunoglobulinas (Ig). Estas proteínas contienen uno o más dominios tipo Ig, que son característicos de las moléculas de los anticuerpos. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la molécula de adhesión celular neural (N-CAM), que se expresa en una variedad de tipos celulares, incluyendo la mayoría de las células nerviosas. N-CAM es la molécula de adhesión célula-célula independiente de Ca^{2+} más frecuente en los vertebrados y, al igual que las cadherinas, se cree que unen las células entre sí mediante un mecanismo homófilo (entre las moléculas N-CAM localizadas en las células adyacentes). Sin embargo, algunas proteínas de adhesión célula-célula tipo Ig, utilizan

un mecanismo heterófilo, como las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) de las células endoteliales, que se unen a las integrinas en las células sanguíneas cuando estas migran fuera del torrente sanguíneo mediante este tipo de unión heterófila.

Existen, al menos, 20 formas de N-CAM y en todas ellas hay una larga cadena extracelular del polipéptido que se pliega en cinco dominios tipo Ig. Algunas formas de N-CAM llevan una cantidad inusualmente grande de ácido siálico. Cada vez hay más evidencias de que la carga negativa que proporcionan estas largas cadenas sirve para prevenir la adhesión en lugar de favorecerla. Por ejemplo, la presencia de N-CAM normalmente promueve la fasciculación los axones corticoespinales, pero se ha demostrado que en respuesta a la modificación de N-CAM por incorporación de ácido polisiálico (PSA) estos axones son capaces de elaborar ramas intersticiales (Daston et al., 1996).

La importancia de las proteínas de adhesión celular tipo Ig en la conexión de las neuronas del sistema nervioso en desarrollo ha sido claramente demostrada en *Drosophila*. Una proteína del tipo N-CAM llamada fasciclina III (FAS3) se expresa de forma transitoria tanto en algunas neuronas motoras como en algunas de las células musculares que normalmente inervan. Si se elimina genéticamente FAS3 de estas neuronas, no son capaces de reconocer sus dianas musculares y no llegan a realizar sinapsis con ellas, lo que parece indicar que FAS3 media estas conexiones sinápticas mediante un mecanismo de “emparejamiento” homófilo.

A pesar de que las cadherinas y los miembros de la familia de las Ig con frecuencia se expresan en las mismas células, las adhesiones mediadas por estas son mucho más fuertes y en gran parte son las responsables de mantener las células unidas, así como de la separación de colectivos celulares en tejidos discretos y posteriormente del propio mantenimiento de la integridad del tejido. En cambio, las N-CAM y otros miembros de la familia de las Ig, contribuyen más en la puesta a punto de estas interacciones célula-célula, en procesos de desarrollo y la regeneración. Por ejemplo, mientras que los ratones mutantes que carecen de la proteína N-cadherina mueren temprano durante el desarrollo, los ratones mutantes que carecen de N-CAM se desarrollan con relativa normalidad a pesar de que tienen algunos defectos en el desarrollo neural. Sin embargo, al producirse algunas mutaciones en otros genes que codifican proteínas de adhesión celular tipo Ig, como en el gen L1 en los seres humanos, la consecuencia puede ser retraso mental y otros defectos neurológicos provocados por anomalías en la migración de las células nerviosas y la elongación de sus axones.

Selectinas.

Los glóbulos blancos llevan una vida nómada, moviéndose de aquí para allá entre la sangre y los tejidos lo que requiere propiedades adhesivas especiales, y estas dependen de unas proteínas de unión a carbohidratos de superficie celular (lectinas) llamadas selectinas. Las selectinas median una serie de interacciones transitorias célula-célula dependiente de Ca^{2+} y que tienen lugar sobre todo en el torrente sanguíneo. Se han descrito al menos tres tipos de

selectinas: la L-selectina presente en los leucocitos de la sangre, la P-selectina en las plaquetas de la sangre y en células endoteliales que han sido localmente activadas por una respuesta inflamatoria y la E-selectina en las células endoteliales activadas. Cada selectina constituye una proteína transmembrana con dominio para lectinas altamente conservado que se une a un oligosacárido específico en otra célula, estableciendo así la interacción célula-célula.

Las selectinas y las integrinas actúan secuencialmente para permitir que los leucocitos salgan del torrente sanguíneo y entren en los tejidos en cuando se les necesite. Las selectinas establecen una adhesión débil mediante la unión de su dominio lectina a los carbohidratos que son ligandos de baja afinidad. Esto permite que los glóbulos blancos se adhieran débilmente y de forma reversible al endotelio, de manera que quedan rodando por la superficie de los vasos sanguíneos impulsados por el flujo de estos, hasta que se produce la activación de la expresión de integrinas en los linfocitos y es entonces cuando se unen fuertemente a las células endoteliales de la superficie y es esta unión, fuerte y específica, la que finalmente desencadena la extravasación de los glóbulos blancos entre las células endoteliales.

Cadherinas.

Las cadherinas son moléculas de adhesión la célula dependiente de Ca^{2+} , que constituyen una superfamilia integrada por más de 100 miembros en vertebrados, incluyendo las cadherinas clásicas, las desmogleínas, las desmocollinas, las protocadherinas, las cadherinas asociadas a receptores neuronales, las FATS, las cadherinas de siete cruces transmembrana, y la tirosina kinasa Ret (Yagi et al., 2000; Utton et al., 2001; Bahjaoui-Bouhaddi et al., 1997). (Figura 8).

Están ampliamente distribuidas en el SNC de adultos, pero también caracterizadas por sus distintos patrones de expresión región-específicos de las diferentes isoformas según ciertos momentos del desarrollo del sistema nervioso (Powell et al., 1998; Yagi et al., 2000). De hecho, la expresión combinatoria y la localización de miembros de la superfamilia cadherina permite una gran variación en las afinidades adhesivas de desarrollo las neuronas durante la morfogénesis de ramificación y el establecimiento de la conectividad funcional. En el cerebelo en desarrollo, por ejemplo, la N-cadherina indiscriminadamente estimula la adhesión celular dependiente de Ca^{2+} y el crecimiento de las neuritas entre las distintas poblaciones neuronales. Sin embargo la M-cadherina, por el contrario, produce cambios en la afinidad adhesiva neuronal que media selectivamente la formación de glomérulos sinápticos entre las dendritas de la neurona del gránulo y las fibras musgosas de los terminales axonales. (Kollins and Davenport., 2005).

Las cadherinas se expresan tanto en invertebrados como en vertebrados y en el caso de estos últimos, prácticamente todas las células parecen expresar una o más cadherinas, en función del tipo celular

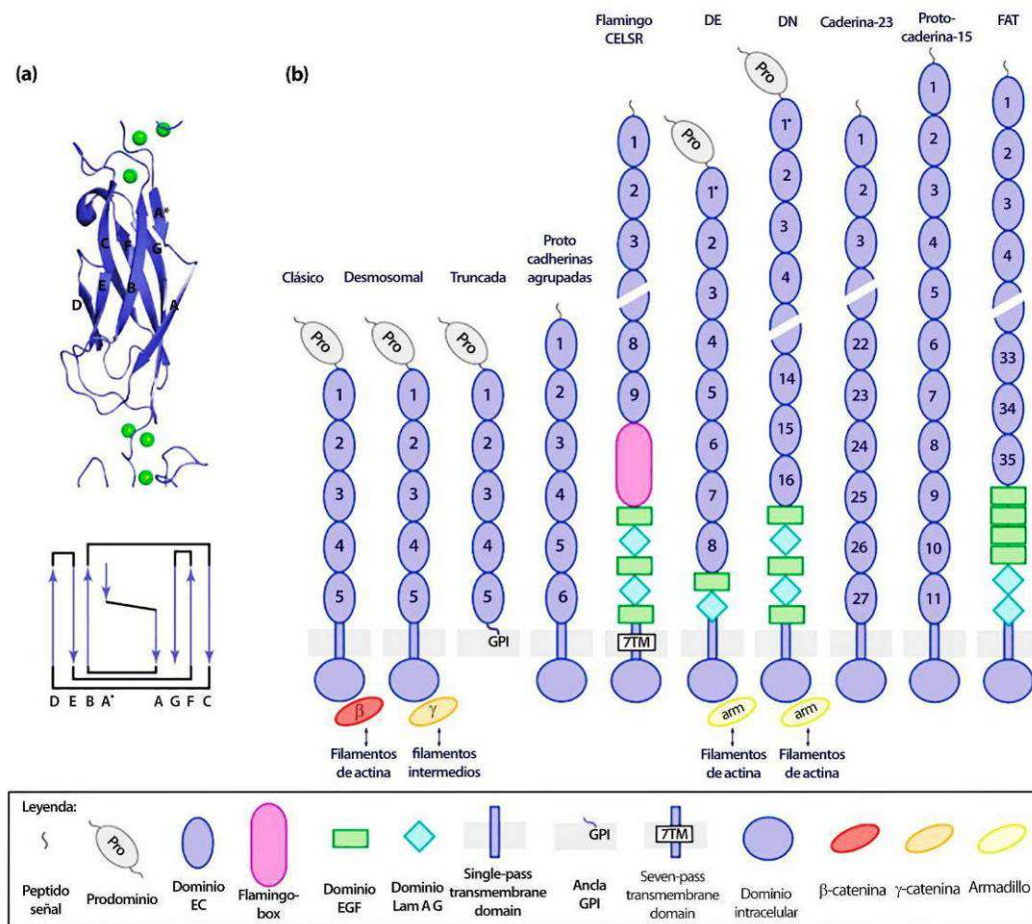


Figura 8. Representación esquemática de los miembros de la familia de las cadherinas, que todos comparten un motivo estructural común: “el dominio cadherina extracelular (CE)”.

(a) Representación en 3D del plegamiento típico del dominio CE. (b) Representación esquemática de la organización general del dominio CE de seleccionados miembros de la familia de las cadherinas. Todas las cadherinas tienen dos o más dominios CE en sus dominios extracelulares (óvalos azules, enumerados de dominio distal a proximal de la membrana), que también pueden contener dominios no comunitarios, tales como repeticiones-EGF (rectángulos verdes), dominios AG-laminina (diamantes cian) y Flamingo-boxes (ovalados de color rosa). Algunas cadherinas tienen, además del péptido señal, un prodominio (óvalos grises) que se elimina por acción de una proteasa furina en la superficie celular. Asterisco: Primer dominio EC de *Drosophila* E (DE) y N (DN) cadherina, determinado a partir de análisis secuencial. Modificado de Brasch et al., 2012.

. Estas proteínas son las principales moléculas de adhesión celular que mantienen unidas las células de los tejidos embrionarios más tempranos, de tal manera, que se ha demostrado que si se elimina el Ca^{2+} extracelular o si se realiza un pre-tratamiento con anticuerpos anti-cadherina se produce una fuerte alteración de los tejidos embrionarios y si la adhesión mediada por cadherinas se deja intacta, el tratamiento con anticuerpos contra otras moléculas de adhesión, tiene poco efecto. Además, las mutaciones que inactivan la función de la E-cadherina producen que los embriones de ratón no puedan mantener su integridad, se desmoronen y mueran temprano en el desarrollo.

Las cadherinas clásicas son proteínas monoméricas transmembrana y tienen cinco cadherinas extracelulares (CE) con dominios de repetición (EC1 a EC5). Todas ellas son moléculas homófilas de adhesión que funcionan mediante su unión a moléculas asociadas del citoplasma (CP), las cateninas. Estas últimas están vinculadas a las cadherinas y se encargan de conectarlas al citoesqueleto de actina conformado por α -catenina, β -catenina y p120 catenina. Se sabe que los complejos cadherina-catenina regulan la polimerización de la actina, una propiedad importante para el mantenimiento de la adhesión célula-célula y, a nivel ultraestructural, estas proteínas se encuentran en las uniones sinápticas de regiones del sistema nervioso, formando una adhesión de tipo “unión adherente”, de estructura simétrica (PAJs) (Peters et al, 1976). Durante el desarrollo, los complejos cadherina-catenina se acumulan en los primeros contactos de los filopodios dendríticos que permanecen como agregados artefactuales y posteriormente se conservan en muchas de las sinapsis adultas.

Las cadherinas son las principales moléculas de adhesión celular (CAM) responsables de la adhesión célula-célula y dependientes de Ca^{2+} , presentes en las células de los tejidos de los vertebrados. Las tres primeras cadherinas que se descubrieron fueron nombradas de acuerdo con los tejidos principales en las que se encontraron: la E-cadherina se expresa en muchos tipos de células epiteliales; la N-cadherina en los nervios, los músculos y las células del cristalino; y la P-cadherina en las células de la placenta y en la epidermis. Sin embargo a medida que se ha ido estudiando esta familia de proteínas se ha descrito que todas ellas también se encuentran en otros tejidos: la N-cadherina, por ejemplo, se expresa en los fibroblastos mientras que la E-cadherina se expresa en diversas partes del cerebro. Estas y otras cadherinas clásicas están relacionadas entre sí por las secuencias conservadas de sus dominios extracelulares e intracelulares. También hay un gran número de cadherinas “no-clásicas”, con más de 50 expresadas tan solo en el cerebro. Las cadherinas “no-clásicas” son proteínas con una conocida función de adhesión, como es el caso de las cadherinas desmosómicas y las diversas protocadherinas localizadas en el cerebro. En este grupo también se incluyen proteínas que parecen tener funciones no adhesivas tales como T-cadherina, que carece de dominio transmembrana y se une a la membrana plasmática de las células nerviosas y musculares mediante el glicosilfosfatidilinositol (GPI) y la proteína Fat, que fue la primera identificada como el producto de la expresión de un gen supresor de tumores en la mosca *Drosophila*.

La mayoría de las cadherinas, incluyendo todas las clásicas y algunas no clásicas, funcionan como proteínas de adhesión transmembrana que se anclan indirectamente al citoesqueleto de actina de las células que unen. El fragmento citoplasmático de las cadherinas está altamente conservado e interactúa indirectamente con los filamentos de actina a través de un complejo de proteínas de anclaje intracelular llamadas cateninas. Esta interacción es esencial para la eficiencia de la adhesión celular, de hecho si las cadherinas clásicas pierden el dominio citoplasmático son incapaces de mantener a las células muy juntas. En el caso de la

cadherinas no-clásicas que forman los desmosomas, estas interactúan con los filamentos intermedios en lugar de con los filamentos de actina y su dominio citoplasmático también se une a un complejo proteico diferente, de anclaje intracelular, en vez de a las cateninas.

En el sistema nervioso, especialmente, hay muchos tipos diferentes de cadherinas, cada una con un patrón de expresión distinto pero a su vez muchas de ellas con superposición. Ya que se concentran en las sinapsis, se piensa que tienen un papel fundamental en su formación y estabilización. Algunas de las cadherinas no clásicas, como las protocadherinas, son muy estudiadas para ayudar a determinar la especificidad de las conexiones sinápticas. Al igual que los anticuerpos, las cadherinas difieren en sus regiones N-terminal pero son idénticas en sus regiones C-terminal.

La N-cadherina participa en una gran variedad de procesos en el sistema nervioso central de los vertebrados. Los fragmentos de N-cadherina que carecen de su región extracelular sirven como mutantes dominantes negativos de las cadherinas e inhiben su actividad de adhesión célula-célula. La expresión del fenotipo de este mutante se manifiesta en la aparición de neuronas que presentan filopodios con morfología de espina, consistente en un aumento de la longitud de la columna vertebral y una disminución del ancho de la cabeza de la columna vertebral. Además afecta a la organización de las sinapsis de las neuronas hipocámpales en cultivo. A pesar de las evidencias de que las cadherinas están implicadas en la formación de las sinapsis, estas no son suficientes para que se puedan formar *in vitro*, ya que la ausencia de expresión de la N-cadherina en células neuronales impide la inducción de la diferenciación de pre-sinapsis en los sitios de contacto con los axones. Algunos estudios recientes también implican a las cateninas en el control de la estructura de la columna vertebral y de la organización sináptica del hipocampo en los cultivos de las neuronas. La supresión de la β -catenina afecta a la localización de las vesículas sinápticas a lo largo del axón y la pérdida de la catenina p120 afecta a Rho, perteneciente a una pequeña familia de proteínas G de señalización, que se traduce en una reducción de la densidad de la columna vertebral. La característica notable de las cadherinas clásicas es su especificidad de unión y distribución específica de la región. En el cerebro, muchos subtipos de cadherinas clásicas están expresados por grupos restringidos, vinculando funcionalmente núcleos y láminas. Por lo tanto podemos afirmar que la adhesión mediada por cadherinas contribuye a la formación selectiva de conexiones entre neuronas durante la formación de redes neuronales, aunque por ahora se desconoce el proceso.

3.3. Neuritogénesis, elongación y guía axónica.

Los conos de crecimiento son estructuras móviles localizadas en la extremidad distal de los axones y son los responsables de la extensión y la búsqueda de caminos durante el desarrollo del sistema nervioso y su reparación. Impulsar el crecimiento del cono depende de dos procesos relacionados. En primer lugar, se requiere una dinámica interna del citoesqueleto: 1) mediante la polimerización de la actina que ocurre en el extremo distal, 2) la actividad de la

despolimerización de la región central y 3) la actividad de la miosina estirando en los filamentos de actina de los lamelipodios. Estos mecanismos integrados por completo dan lugar a un flujo continuo retrógrado de actina. Este flujo proporciona la tensión mecánica necesaria que impulsa la extensión axonal, a través de una conexión dinámica de los microtúbulos presentes en el axón y que invaden el dominio central del cono de crecimiento (Thoumine et al, 2008).

En segundo lugar, se produce una constante formación y disociación de los repetidos contactos de transición entre los conos de crecimiento y la matriz extracelular o las células adyacentes. Estos contactos están mediados por moléculas de adhesión celular (CAM) de tipo transmembrana, como por ejemplo, las integrinas (IgCAMs) y cadherinas, cuyas estructuras específicas de tipo ligando/receptor poseen una unión de vida media variable. Una pregunta que sigue abierta es cómo estos dos procesos, es decir, el flujo de actina y la dinámica de adhesión, se coordinan en el cono de crecimiento y como contribuyen a fijar la velocidad de la migración. Se requiere una comprensión profunda de estos dos mecanismos desde una perspectiva fundamental, para el diseño de nuevos compuestos y para fomentar la regeneración axonal después de una lesión.

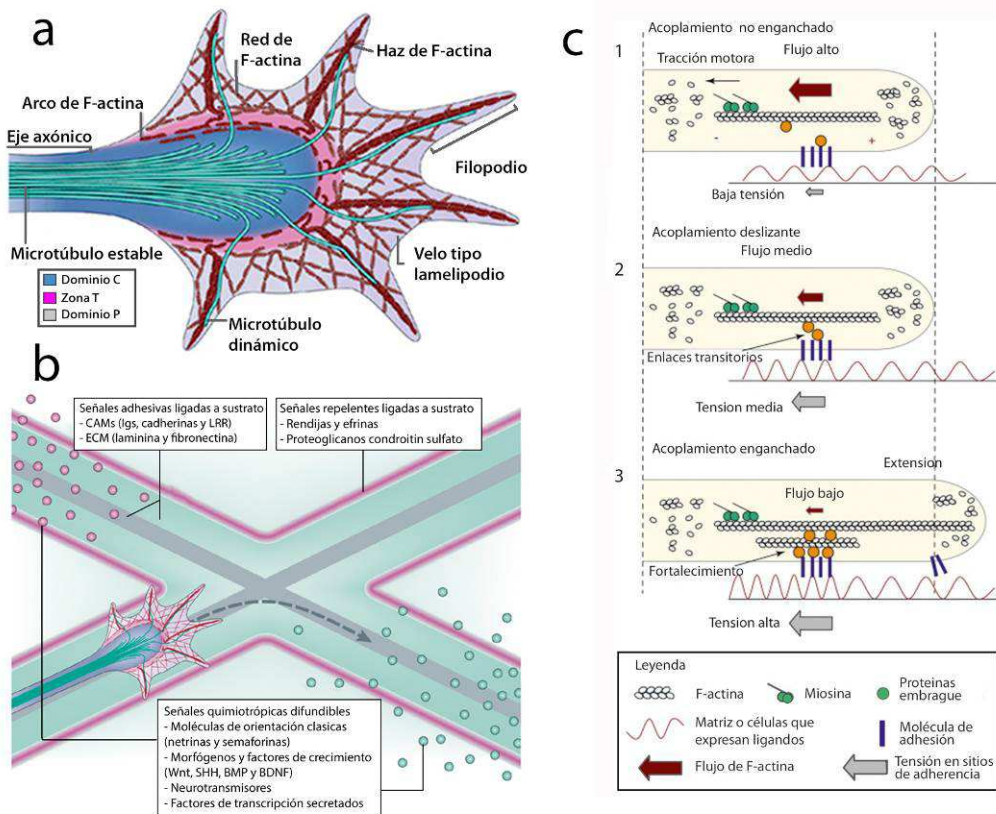


Figura 9. Guía axónica y el papel de las cadherinas en los procesos crecimiento axónico.

a) El extremo distal del cono axónico está formado por filopodios “tipo-dedo”, muy dinámicos, que se encargan de explorar el entorno molecular, separados entre ellos por láminas de membrana llamadas velos tipo-lamelipodio. El cono de crecimiento se puede dividir en tres dominios fundamentales: El dominio periférico (P), con largos filamentos de actina empaquetados y microtúbulos individuales, “pioneros” y dinámicos (MTs), que exploran esta región. El dominio central (C) contiene paquetes estables de MTs que entran en el cono de crecimiento desde el eje del axón, junto con numerosos orgánulos, vesículas y haces de actina centrales. Por último, la zona de transición (T) se encuentra en la interfaz entre el dominio P y el C, donde las estructuras de actomiosina contráctiles (denominadas, arcos de actina) se sitúan perpendiculares a los haces de F-actina y forman un anillo. b) El cono de crecimiento se encuentra con muchos tipos diferentes de señales durante su recorrido, que vienen determinadas por moléculas adhesivas situadas en la membrana de células vecinas (por ejemplo, las moléculas de adhesión celular transmembrana (CAMs) o las cadherinas) o insertadas en la ECM (la laminina y la fibronectina). Por otro lado, las moléculas anti-adhesivas unidas a la superficie (como Slits, efrinas y proteoglicanos condroitin sulfato) pueden impedir el avance del cono de crecimiento delimitando así su camino. Finalmente, las señales quimiotrópicas difusibles son los “semáforos” que presentan más instrucciones de dirección para el cono de crecimiento, e incluyen diversas moléculas solubles (como netrinas y semaforinas), morfógenos (tales como Wnt, sonic hedgehog (SHH) y la proteína morfogenética ósea (BMP)), factores de crecimiento o neurotróficos (tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)), factores de transcripción secretados y neurotransmisores. Sin embargo, la respuesta de atracción o repulsión no es debida a la propiedad intrínseca de la señal en particular, sino más bien a los receptores específicos y a la señalización interna del cono de crecimiento. Los círculos verdes y rojos se interpretan como señales de atracción y repulsión, respectivamente. Modificado de Hirano y Takeichi, 2011. c) La figura muestra los tres estados potenciales del acoplamiento y la función de moléculas de adhesión, como las cadherinas, en el movimiento de los extremos de los conos axónicos. 1) Vista lateral de un lamelipodio en movimiento sobre un sustrato rígido o flexible revestido con moléculas de matriz extracelular (rojo). El reconocimiento específico de ligando-receptor permite la formación de los complejos de adhesión en la superficie ventral. Los filamentos de actina están fluyendo hacia atrás, debido a una combinación de polimerización en la punta (signo +), despolimerización en la parte trasera (signo -) y de la acción de tracción de los motores de miosina (cabezas verdes). La conexión dinámica entre F-actina y los complejos de adhesión es proporcionada por un módulo de acoplamiento compuesto de proteínas adaptadoras (círculos naranja), específicas para cada tipo de adherencia. La fuerza ejercida en los sitios de adhesión se traduce en una deformación de la matriz (arrugas). (a) Acoplamiento desenganchado, no hay acoplamiento entre F-actina y los complejos ligando/receptor. (b) acoplamiento deslizando, donde se forman las conexiones débiles transitorias entre el flujo F-actina y los complejos ligando/receptor mediante proteínas de acoplamiento. (c) acoplamiento enganchado, donde un fuerte acoplamiento entre la F-actina y los complejos ligando/receptor, ralentizan el flujo de F-actina y permiten que avance la polimerización. Modificado de Giannone, 2009

3.4. El papel de la N-cadherina en la neuritogénesis.

Las cadherinas forman una gran familia de moléculas de adhesión implicadas en el reconocimiento célula-célula y la morfogénesis de tejidos (Yap et al., 1997). Estos procesos incluyen la orientación de la célula (Kadowaki et al., 2007), el crecimiento del axón (Riehl et al. 1996; Nakai y Kamiguchi, 2002), la fasciculación y ramificación dendrítica (Yu y Malenka, 2003; Bekirov et al, 2007), la sinaptogénesis (Benson y Tanaka, 1998) y la plasticidad sináptica (Bozdagi et al, 2000; Togashi et al, 2002, Okamura et al, 2004).

La N-cadherina es capaz de inducir el crecimiento axónico y este efecto puede ser reproducido o imitado en un modelo *in vitro* (Matsunaga et al, 1988; Lemmon et al, 1992; Saffell et al, 1997; Kamiguchi y Yoshihara, 2001). Se ha demostrado que el acoplamiento mecánico entre los receptores de N-cadherina y el flujo de actina generado a través de las cateninas es un factor determinante para la motilidad del cono de crecimiento y extensión de las neuritas (Bard et al., 2008). Sin embargo, aún no se ha dilucidado todo el mecanismo molecular del proceso. Más adelante en el desarrollo, la N-cadherina se localiza en las sinapsis (Beesley et al, 1995; Uchida et al, 1996), donde no sólo juega un papel adhesivo, sino que también participa en la regulación de la función sináptica y la plasticidad (Bozdagi et al, 2000; Tanaka et al, 2000; Murase et al, 2002; Togashi et al, 2002; Okamura et al, 2004).

En diversos estudios se ha demostrado que los ectodominios de las cadherinas también son capaces de formar oligómeros laterales (Iino et al., 2001; Troianovski et al, 2003), dando lugar a complejas estructuras adhesivas (He et al., 2003). En la región intracelular, el dominio citoplasmático de la cadherina se puede acoplar a la actina a través de la β -catenina (Yap et al., 1998). Este acoplamiento mecánico podría representar la base molecular para el fortalecimiento de los contactos intercelulares (Adams et al, 1998; Vasioukhin et al, 2000;.. Chu et al, 2004). Estudios recientes indican que, además de su papel como molécula de adhesión, las cadherinas también se comportan como receptores de señalización (Yap y Kovacs, 2003). En particular, se concluye que la unión de la cadherina activa la familia de las Rho-GTPasas, la cual participa en el ensamblaje de la actina del citoesqueleto (Noren et al, 2001; Kovacs et al., 2002). Y a su vez, estas enzimas, junto con el complejo catenina, participan en la regulación de la capacidad adhesiva de la cadherina. Por ejemplo, una forma dominante negativa de Rac inhibe la extensión de las zonas de contacto dependientes de cadherinas (Ehrlich et al, 2002; Gavard et al, 2004.), así como la rápida vinculación de la N-cadherina en la red de actina que se encuentra en constante movimiento localizada en los lamelipodios (Lambert et al., 2002). Por lo tanto, se ha propuesto que la N-cadherina interactúa con el citoesqueleto, como resultado de una unión ligando-receptor (Hirano et al, 1987; Hynes y Lander, 1992; Davis et al, 1993.; Gumbiner et al., 1993; Davis y Bennett et al., 1994).

4. Metaloproteasas.

4.1. La familia de las metaloproteasas (MMPs y ADAMs).

La remodelación proteolítica de la matriz extracelular (ECM) es un suceso esencial en el desarrollo, tanto del sistema nervioso periférico como central (Page-McCaw et al, 2007). Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y las desintegrinas y metaloproteasas (ADAMs) tienen la habilidad de cortar la mayoría de los componentes proteicos de la ECM en condiciones fisiológicas (Page-McCaw et al, 2007; Overall et al, 2002). Por ello, la acción concertada de diferentes proteasas puede ser muy importante para la construcción y la fisiología de los circuitos neurales (Kaczmarek et al, 2002; Yong et al., 2005).

Además, las metaloproteasas tienen un papel importante en la activación y procesamiento de citoquinas o factores de crecimiento (Suzuki M lino et al., 1997), en la exposición de receptores de membrana (Preece G et al., 1996), en la liberación del ligando Fas (Kayagaki N et al., 1996) o en la inactivación del TNF- α (Black RA et al., 1997). La degradación de la matriz extracelular es por lo tanto un proceso necesario para permitir la migración celular y la remodelación de los tejidos. Todo ello juega un papel crucial en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos.

4.1.1. Miembros y estructura de las metaloproteasas.

Numerosos estudios han implicado ADAMs en la formación de conexiones neurales en el sistema nervioso en desarrollo (Fambrough et al, 1996; Galko et al, 2000; Hattori et al, 2000; McFarlane et al, 2003). En contraste con esto, el papel potencial de MMPs en la elongación y guía axónica, mediada por la proteólisis de los ligandos y/o receptores involucrados en estos procesos, aún no se ha conseguido demostrar (Yong et al., 2005; McFarlane et al, 2003; Gonthier et al, 2007; Miller et al, 2008).

Inicialmente, las proteasas se caracterizaron como un grupo degradativo de enzimas, implicados en el catabolismo de proteínas procedentes de la dieta. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que además de estos procesos de hidrólisis inespecífica, las proteasas son capaces de desempeñar funciones mucho más precisas. De esta forma hoy se sabe que los enzimas proteolíticos afectan a prácticamente todos los procesos fundamentales de la vida. El procesamiento selectivo de las proteínas condiciona su localización y su degradación, modula sus interacciones, genera nuevas moléculas bioactivas o inactiva otras contribuyendo a la regulación de numerosas rutas de señalización celular. Todas estas acciones específicas desempeñadas por las proteasas influyen en el desarrollo de procesos biológicos tan importantes como la replicación del DNA, el control del ciclo celular, la proliferación y migración celulares, la morfogénesis y remodelación tisulares, el crecimiento neuronal, la cicatrización de tejidos, la ovulación y fertilización, la inmunidad, la hemostasis, la angiogénesis o la apoptosis (López-Otín y Bond, 2008).

Hasta la fecha, se han identificado 24 metaloendopeptidasas zinc²⁺ dependientes de calcio (MMPs), que poseen actividad catalítica sobre componentes de la matriz extracelular (Nelson AR et al., 2000; Nagase y Woessner., 1999; Massova et al., 1998; Birkedal-Hansen et al., 1995) y todas se pueden englobar en uno de los siguientes subgrupos: MMPs solubles y MT-MMPs.

Encima	Sustratos ECM	Estructura	
MMP7	Colágeno IV, gelatina, fibronectina, laminina, elastina, transferrina, caseína	S Propéptido Catalítico Zn	
MMP26	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, gelatina, pro-MMP9	S Propéptido Catalítico Zn	
MMP1	Colágenos, entactina, PGs, ovostatina, MMP2, MMP9, pro-MMP9	S Propéptido Catalítico Zn HPX Region de enlace	
MMP3	Colágenos, gelatina, agregan, laminina, elastina, caseína, osteocina, fibronectina, ovostatina, entactina, plasminógeno, pro-MMP9		
MMP8	Colágenos, fibronectina, PGs		
MMP10	Colágenos, gelatina, caseína, elastina, fibronectina		
MMP12	Colágeno IV, elastina, gelatina, caseína, fibronectina, vitronectina, laminina, entactina, fibrinógeno.		
MMP13	Colágenos, tenascina, plasminógeno, agregan, fibronectina, osteonectina, MMP9		
MMP19	Colágeno I y IV, gelatina, fibronectina, laminina		
MMP20	Amelogenina		
MMP11	Colágenos, laminina, elastina, fibronectina, caseína, PGs		Escisión tipo-furina S Propéptido Catalítico Zn HPX
MMP21	M.D.		
MMP28	Caseína		
MMP2	Colágenos (IV, V, VII, X), gelatina, elastina, fibronectina	Motivo tipo-fibronectina S Propéptido Catalítico Zn HPX	
MMP9	Colágenos (IV, V, VII, X), gelatina, elastina, fibronectina		
MMP17	Gelatina, fibrinógeno, pro-MMP2	S Propéptido Catalítico Zn HPX GPI	
MMP25	Colágeno IV, gelatina, fibronectina, pro-MMP2, pro-MMPp		
MMP14	Colágenos, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, entactina, pro-MMP2	S Propéptido Catalítico Zn HPX TM Cyto	
MMP15	Fibronectina, gelatina, vitronectina, entactina, laminina, pro-MMP2		
MMP16	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina, pro-MMP2		
MMP24	Fibronectina, pro MMP2, PGs, gelatina		
MMP23A MMP23B	Gelatina	S TM Propéptido Catalítico Zn Cys Ig	
ADAM9	Fibronectina, gelatina	S Propéptido Catalítico Zn Dis Cys EGF TM Cyto	
ADAM12	Colágeno IV, gelatina, fibronectina		
ADAM12	Colágeno IV, gelatina		
ADAM12	Colágeno IV, gelatina, meprina β	S Propéptido Catalítico Zn Dis Cys TM Cyto	
ADAM12	Agregan, versican, brevican, decorina, fibronectina, pro-colágenos, N-propéptidos*	S Propéptido Catalítico Zn Dis Thr EGF Tbs _n	
Meprin α	Colágeno IV, nidogen 1, fibronectina, laminina 111, laminina 332, pro-colágeno I, procolágeno III	S Propéptido Ast-tipo Cat Zn MAM TRAF EGF TM Cyto	
Meprin β	Colágeno IV, nidogen 1, fibronectina, laminina 111, laminina 332, pro-colágeno I, procolágeno III, ADAM10	S Propéptido Ast-tipo Cat Zn MAM TRAF EGF TM Cyto	

Ast-tipo Cat Zn	Dominio Astacina-tipo catalítico	EGF	Factor tipo-EGF	Propéptido	Dominio propéptidos
Catalítico Zn	Dominio catalítico	GPI	GPI	S	Dominio péptido-sígnal
Cyto	Region citosólica	HPX	Dominio tipo-Hemopexina	Tbs	Repetición trombospondina tipo I
Cys	Dominio Cys	Ig	Dominio tipo-Imunoglobulina	TM	Dominio transmembrana
Dis	Dominio desintegrina	MAM	Dominio proteínas meprina A5 y tirosina fosfatasa rec. μ	TRAF	Dominio factor asociado a TNRF

Figura 10. Estructura y sustratos específicos de las metaloproteinasas.

Las metaloproteinasas (MPs) pertenecen a la familia de enzimas metzincinas, que incluye metaloproteinasas de la matriz (MMPs), adamalinas (que incluye Adams (una desintegrina y metaloproteinasas) y ADAMTS (Adams con un motivo de trombospondina)) y astacinas (incluyendo meprinas). Son enzimas multidominio que contienen un motivo altamente conservado con propiedades quelantes para un ion de zinc en el sitio catalítico. Se producen metaloproteinasas solubles o ancladas a la membrana para escindir componentes de la matriz extracelular (ECM). Todas ellas están compuestas por varios dominios funcionales compartidos: un péptido señal, un propéptido, un dominio catalítico y uno tipo hemopexina (excepto en MMP7, MMP23 y MMP26). El dominio amino-terminal que contiene el péptido señal, es necesario para la secreción de las MMPs. El dominio propéptido contiene el motivo Cys-switch. El dominio catalítico con actividad proteolítica, contiene el motivo de unión a zinc; el residuo Cys de este motivo, interactúa con el ión zinc que mantiene las pro-MMPs inactivas, hasta que se elimina el dominio propéptido. El dominio carboxi-terminal tipo hemopexina, que está presente en casi todos los MMPs, está implicado en la especificidad por el sustrato y en las funciones no proteolíticas de las MMPs. Las MMPs de tipo membrana (MT-MMPs) están ancladas a la superficie celular por un dominio transmembrana seguido por una cola citoplásmica corta o por una secuencia glicosilfosfatidilinositol (GPI). Algunos MMPs, incluyendo los MT-MMPs, MMP11, MMP17, MMP21, MMP23, MMP25 y MMP28, pueden ser activados por la convertasa furina, que escinde el propéptido de los precursores inactivos en el aparato de Golgi, para liberar proteínas funcionales. Las ADAMs son proteínas transmembrana estructuralmente similares a MT-MMPs, excepto por que carecen del dominio hemopexina y en su lugar tienen otros tres dominios: un dominio rico en Cys, un dominio de repetición tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) (excepto ADAM10 y ADAM17) y un dominio desintegrina. En la figura sólo se muestran ADAM9, ADAM10, ADAM12 y ADAM15 ya que no se conocen sustratos proteico de la ECM en el resto de ADAMs. Las ADAMTSs son proteinasas secretadas y tienen repeticiones similares a la trombospondina de tipo I en su secuencia C-terminal. Además de los dominios metaloproteinasas, las meprinas también tienen un dominio catalítico de tipo astacina (Ast-like Cat), un dominio MAM (proteína meprina A5 Tyr fosfatasa), un dominio TRAF (factor asociado a TNFR) de dominio TRAF y una cola citosólica C-terminal. La meprina- α también contiene un dominio de corte por furina, escisión que resulta en la pérdida del dominio transmembrana de tipo EGF y del dominio citosólico, y por tanto, la liberación de la enzima en el espacio extracelular. MMP23 contiene un dominio inmunoglobulina (Ig) que es único entre las MMPs. Este dominio Ig facilita las interacciones proteína-proteína o lípido-proteína de forma similar al dominio de hemopexina de otras MMPs. Modificado de Bonnans, 2014.

Las MT-MMPs están ancladas a la membrana plasmática a través del dominio transmembrana (Seiki et al., 1999) o de la porción de glicosilfosfatidilinositol en el terminal COOH (Itoh et al., 1999; Kojima et al., 2000) y seis MMPs han sido asignadas a este grupo. MT1-, MT2-, MT3- y MT5-MMP (MMP 14, -15, -16 y -24 respectivamente) están estrechamente relacionadas entre ellas y muestran alrededor de un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos en sus dominios catalíticos. La MT4-MMP (MMP-17) es única en tanto que muestra un 40% de conservación de secuencia en la misma región (Puente et al., 1996; Kajita et al., 1999). El miembro de este grupo que se ha identificado más recientemente es MT6-MMP (MMP-25), es el más homólogo a MT4-MMP y está expresado en leucocitos (Pei et al., 1999; Velasco et al., 2000). Mientras que las MMPs solubles son presumiblemente responsables de la degradación de la ECM en grandes áreas de tejido, es probable que las MT-MMPs participen en la degradación pericelular de la ECM asociada a funciones celulares como la proliferación, la migración y la capacidad de invasión. Por ejemplo, MT1-MMP, que es la molécula MT-MMP más estudiada, ha sido detectada en células tumorales malignas durante la progresión de cánceres (Seiki et al., 1999), en células endoteliales durante la angiogénesis (Hiraoka et al., 1998; Haas et al., 1998; Zhou et al., 2000), en células mesenquimales durante la embriogénesis (Kinoh et al., 1996; Apte et al., 1997), en tejidos óseos (Zhou et al., 2000; Holmbeck et al., 1999) y en tejidos de cicatrización de heridas (Okada et al., 1997). Como podemos observar en conjunto juegan un papel muy importante en los sucesos fisiológicos y patológicos que dan lugar a la degradación de la matriz extracelular. Todas la demás MMPs son solubles y son secretadas como zimógenos, a excepción de la MMP-11.

La familia de enzimas MMPs comparten una estructura similar en sus dominios. Todos los enzimas de esta familia poseen en común los siguientes:

1- *Péptido señal*: es la secuencia "leader", responsable de la secreción de la molécula, no está presente en la forma inactiva del enzima.

2- *Dominio proteolítico o catalítico*: contiene 2 iones de zinc y al menos un ion de calcio. Uno de los iones de zinc está presente en el centro activo e implicado en el proceso catalítico de las MMPs. Este ion de zinc catalítico está conservado en todas las MMPs.

3- *Dominio propéptido*: este dominio consiste en 80-90 aminoácidos que contienen un residuo de cisteína el cual interactúa con el átomo de zinc del dominio catalítico a través de un grupo tiol. En este dominio hay una secuencia altamente conservada (... PRCGXPD...). La proteólisis de este propéptido da como resultado la activación del zimógeno, y la misma puede darse por la acción de enzimas proteolíticos, agentes mercuriales o el calor (Okada Y et al., 1989; Nagase H et al., 1990; Koklitis PA et al., 1991).

4- *Dominio hemopexina/vitronectina*: está altamente conservado y muestra una secuencia similar a la proteína plasmática hemopexina. Se ha demostrado que este dominio juega un papel funcional en la unión al sustrato y/o en las interacciones con los TIMPs. Además de estos dominios básicos, la familia de las MMPs se despliega en diferentes subgrupos por la incorporación y/o delección de dominios estructurales y funcionales.

Las MMP-2 y MMP-9 contienen uno o dos dominios adicionales con secuencias similares a las de la fibronectina para la unión del colágeno y de la "α2 collagen like" (Wilhelm SM et al., 1989). El miembro más simple de la familia es la MMP-7, con un peso molecular de 28 kD, contiene solo el dominio propeptídico y el dominio catalítico. Los otros miembros de la familia mantienen la unidad básica y además tienen un número de dominios estructurales añadidos.

En el caso de la familia descrita recientemente como MMPs de tipo membrana ("membrane-type MMPs", MT-MMPs), como ya hemos descrito anteriormente, esta se encuentra anclada a la membrana celular por un dominio transmembrana y uno intracitoplasmático (Massova I et al., 1998).

4.1.2. Regulación, activación e inhibición de las MMPs.

En la actualidad, se sabe que las MMPs tienen diferentes sitios de regulación: a) a nivel transcripcional, a través de factores de crecimiento y citoquinas (Birkedal-Hansen H et al, 1993), b) a nivel postranscripcional, por cambios en la estabilidad del ARNm (Schontal A et al, 1988), y c) a nivel post traduccional, a través de la activación de la forma latente secretada. La regulación transcripcional es el punto de control más importante para determinar la expresión de la metaloproteasa latente. Sin embargo, los mecanismos reguladores extracelulares pueden finalmente controlar el nivel de actividad en términos de degradación de ECM. Con frecuencia, la activación de la enzima se lleva a cabo por una activación autocatalítica que da lugar a la

pérdida de un péptido amino terminal (Browner MF et al., Smith WW, Castelahn AL., 1995). Las MMPs pueden ser activadas *in vitro* por diversos agentes entre ellos los detergentes, los compuestos organomercuriales y las enzimas proteolíticas como plasmina, tripsina, calicreína y estromelisin. Independientemente de cuál sea el agente activador, éste debe ser capaz de inducir un cambio conformacional en la molécula de la proenzima para que puedan interactuar con la molécula de zinc. Esta interacción finalmente activa a la proenzima (Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R., 1981).

Asimismo, la actividad de las MMPs puede ser inhibida por sustancias endógenas conocidas como inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs) (Brown PD, Kleiner DE, Unsworth EJ., 1993). Se han caracterizado cuatro miembros de la familia llamados TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. La expresión de los TIMPs en los tejidos también está altamente regulada durante la remodelación en condiciones fisiológicas para mantener el balance en el metabolismo de la matriz extracelular. La falta de este equilibrio induce un descontrol en el “*turn over*” de la matriz produciendo patologías como la artritis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, nefritis, desordenes neurológicos, ulceración y fibrosis en los tejidos (Woessner et al., 1998).

Otro inhibidor de las MMPs es la α 2-macroglobulina, su acción es más lenta y no es específica, sino que es un inhibidor irreversible de proteasas activas que incluye las MMPs. Se cree que el control que ejercen los TIMPs sobre la actividad de la MMPs se localiza en el área pericelular mientras que la α 2-macroglobulina actúa en los fluidos, especialmente en zonas que presentan inflamación (Nagase et al., 1994).

4.2. Papel de las MMPs y ADAMs en el sistema nervioso: regulación de la neuritogénesis.

Todas las características descritas previamente, confieren importantes funciones a las MMPs durante la neurogénesis del sistema nervioso. Sin embargo, las MMPs también pueden jugar papeles distintos y opuestos en una serie de patologías del sistema nervioso central como la esclerosis múltiple, lesiones de la médula espinal, fractura o hemorragia intracerebral (Vu et al., 2000; Yong et al., 2001). De este modo, las MMPs contribuyen a la ruptura de la barrera hematoencefálica, a la modulación de la neuroinflamación a través del procesamiento de los precursores pro- o anti-inflamatorios, a la regulación de la supervivencia de las células neurales o mediante la transformación proteolítica de las pro-neurotrofinas en sus formas activas (Yong et al., 2001; Lee et al., 2001).

Las más expresadas en el sistema nervioso son MMP-9 o gelatinasa B y MMP-2 o gelatinasa A que tienen como sustrato principal la lámina basal, MMP-3 cuyo sustrato principal es la mielina y la metaloproteasa de membrana MT5-MMP que participa en procesos de degradación de la matriz y la red pericelular para permitir el crecimiento axónico, la migración y la plasticidad sináptica.

La rápida transformación que se produce en la matriz extracelular desde su fase embrionaria y postnatal temprana, hasta su forma madura, en el NSC adulto (Rauch et al., 2004), la rápida desaparición de los CSPGs de las rutas axónicas predestinadas, tal y como se observa en las áreas periféricas en desarrollo (Landolt et al. 1995; Oakley y Tosney 1991), así como los cambios reactivos a consecuencia de lesiones del sistema nervioso (Galtrey y Fawcett 2007, Zurn y Bandtlow 2006) no pueden ser atribuidos exclusivamente a los ajustes en los patrones de expresión del ECM, sino que también dependen de procesos proteolíticos altamente activos (Agrawal et al. 2008; Ethell y Ethell 2007; Flannery et al. 2006; Gottschall et al. 2005; Milward et al. 2007; Porter et al. 2005). Este contexto, las metaloendopeptidasas de la familia ADAMTS parecen ser las responsables en primer grado del catabolismo de los CSPGs (ADAMTS: una desintegrina y metaloproteína con actividad trombospondina) y por lo tanto esenciales en la alteración de la migración celular y en las características del crecimiento del axón en muchos tejidos nerviosos. Del mismo modo, las metaloproteasas de la matriz (MMPs) podrían jugar únicamente un papel subordinado en la degradación de los proteoglicanos, pero podrían, de forma preferente, interactuar con las proteínas de unión y las tenascinas del sistema nervioso central.

Los ADAMTS segregados son parientes cercanos de las metaloproteasas ADAMs relacionadas con la membrana celular. Tanto las ADAM como ADAMTS se expresan como zimógenos, conteniendo un predominio y un elemento catalítico que los une al zinc, relacionado con un dominio similar a la desintegrina. Los ADAMT-zimógenos se encuentran en la región trans-Golgi o en la superficie de la célula activados mediante el corte N-terminal del propéptido por convertasas como furina o similares. La extracción adicional de una porción C-terminal de forma proteolítica o autocatalítica ha demostrado poder modular la actividad enzimática de algunas de estas metaloproteasas (Gao et al. 2002; Rodriguez-Manzaneque et al. 2000; Zeng et al. 2006). Por ejemplo, se han caracterizado cinco lugares de unión para la proteína agregán (Caterson et al. 2000; Lemons et al. 2001) y una en brevicán (Matthews et al. 2000; Yamada et al. 1995). En neurocán, que está ampliamente expresado en el tejido nervioso adulto presentando dos fragmentos terminales bien definidos (N- y C-terminal), se ha demostrado que estos pueden ser cortados tanto por proteasas de tipo ADAMTS o de tipo MMP. En concreto, basándose en comparaciones de sustratos conocidos, se han descrito lugares específicos de procesamiento para MMP-2 y de ADAMTS. Sin embargo, mientras MMP-2 se ha demostrado que corta a neurocán *in vitro*, la susceptibilidad a la digestión de ADAMTS tiene que ser todavía confirmada con un modelo experimental (Sandy et al. 2001; Turk et al. 2001).

Inhibición del crecimiento del axón.

Los conos de crecimiento son estructuras móviles que se encuentran en la punta de los axones en desarrollo, interpretan las señales en el medio ambiente con el fin de ampliar y alcanzar sus objetivos. La presentación y la transducción de estas señales dependen de

moléculas adicionales, tanto intrínsecas como extrínsecas al cono de crecimiento (Dickson et al., 2002). En particular, los datos recientes indican que existen dos familias de metaloproteasas capaces de activar o inhibir, mediante proteólisis de ligandos o receptores, la acción de señales producidas en los conos de crecimiento.

Todos los lecticanos del sistema nervioso central inhiben en su forma intacta el crecimiento axonal *in vitro* (Bandtlow and Zimmermann 2000; Yamaguchi et al., 2000). La inhibición del crecimiento axonal es altamente dependiente de la presencia de una capa pericelular hialurónica que cubre muchos tipos de células y a menudo incluye cantidades variables de lecticanos, proteínas conectoras y tenascinas (Evanko et al., 2007). La síntesis aislada de ácido hialurónico o hialuronán promueve la formación de profusiones en la membrana citoplasmática de varios tipos celulares (Kultti et al. 2006; Rilla et al. 2008). La visión clásica era que las metaloproteasas degradan la ECM, de forma que allanaba un pasaje para los axones que se extienden a través del medio ambiente (Muir et al., 1994), sin embargo ahora se sabe que la regulación de las metaloproteasas en la extensión axón y su orientación es mucho más compleja.

Las metaloproteasas se expresan en los conos de crecimiento de numerosas neuronas de vertebrados (Muir et al., 1994; Webber et al, 2002; Zuo et al, 1998). Los primeros estudios sugirieron que las metaloproteasas participaban en la elongación de los axones (Muir et al., 1994; Webber et al, 2002), apoyados por la observación de que los mutantes de *kuzbanian*, la *Drosophila* ortóloga de ADAM10, presenta defectos en la extensión del axón del sistema nervioso central (Fambrough et al., 1996). Varios estudios recientes también han planteado la posibilidad de que las metaloproteasas regulan la orientación del crecimiento de los axones. Existen datos *in vitro* que indican que las metaloproteasas son capaces de regular el comportamiento de los axones durante su extensión mediante la proteólisis de ectodominios de señales de orientación y/o de sus receptores (Galko y Tessier-Lavigne, 2000; Hattori et al, 2000). Por ejemplo, algunas ADAMs como ADAM10 están implicadas en completar la interacción de alta afinidad entre las efrinas y sus receptores Eph (Hattori et al., 2000).

El apoyo a la idea de que las metaloproteasas regulan la guía de los axones de vertebrados proviene de dos trabajos recientes. En primer lugar, un miembro de la familia ADAMs, ADAM23, fue identificado en un experimento de *screening* genético en ratón para genes que controlan la conectividad neuronal (Leighton et al., 2001). Sin embargo, en la actualidad, se sabe que la función de orientación de ADAM23 está restringida, ya que se expresa únicamente en los axones en el SNC de ratón en desarrollo y que los mutantes de ADAM23 son atáxicos (Leighton et al., 2001). El segundo estudio se pregunta si las metaloproteasas regulan el crecimiento y la orientación de los axones del GRC en el desarrollo del sistema visual de *Xenopus laevis*, donde una preparación de cerebro expuesto permitió realizar ensayos *in vivo* para testar el papel de las moléculas candidatas en crecimiento del axón del GRC (Webber et al., 2002).

4.3. Expresión y función de MT5-MMP en el SN.

La familia de MMPs humanas está compuesta de 24 miembros que comparten muchas características estructurales (Overall and Lopez-Otín, 2002). Sin embargo, y a pesar de que la mayoría de las enzimas son secretadas, hay un grupo de seis MMPs de membrana (MT-MMP) que se localizan en la superficie celular a través de un dominio transmembrana C-terminal (MT1, MT2, MT3 y MT5-MMP) o por una unión mediante glicosilfosfatidilinositol (MT4 y MT6-MMP) [(Zucker et al., 2003). MT5-MMP (MMP-24) es la quinta metaloproteínasa de membrana de la matriz identificada en tejidos humanos (Llano et al., 1999; Pei et al., 1999)

MT5-MMP se encuentra ampliamente expresada en todo el sistema nervioso: en los filopodios de las neuronas hipocámpales participando en la regulación del crecimiento del cono axónico y la migración neuronal (Ross et al., 2007; Willem et al., 2015) y además se ha demostrado que también es capaz de degradar las cadherinas. Asimismo, se ha descrito que regula la guía axónica y la plasticidad sináptica mediante la proteólisis de cadherinas, otras moléculas de adhesión celular o moléculas de la matriz extracelular (Ref)

MT5-MMP destaca sobre el resto de MT-MMPs por el hecho de que está presente en un conjunto limitado de tejidos que incluyen el cerebro (Pei et al., 1999; Llano et al., 1999) y en algunas líneas celulares de tumores cerebrales (Llano et al., 1999); varios estudios describen que la expresión de MT5-MMP durante el desarrollo en ratas, se concentra mayoritariamente en el sistema nervioso (Sekine-Aizawa et al., 2001, Jaworski et al., 2000), por consiguiente, MT5-MMP puede jugar un papel específico en el desarrollo y en el mantenimiento del sistema nervioso.

MT5-MMP (Mmp24) se expresa principalmente en las células neuronales tanto del sistema nervioso central como del periférico, además también se ha detectado su expresión en células inflamatorias (Llano et al, 1999; Hayashita- Kinoh t et al, 2001; Bar-Or et al, 2003; Jaworski et al, 2000). MT5-MMP es capaz de degradar algunos componentes de la matriz extracelular como por ejemplo el proteoglicano condroitín sulfato que juega un papel inhibitorio en la neurogénesis y su proteólisis, promueve el crecimiento neurítico *in vitro* pero no puede degradar la laminina, cuyo efecto es el opuesto sobre el crecimiento axónico (Hayashita- Kinoh et al, 2001; Wang et al, 1999). Por otra parte, también se ha demostrado que es capaz de mediar el corte de la molécula de adhesión célula-célula, N-cadherina, células heterólogas (Monea et al, 2006). Partiendo de todas estas afirmaciones junto con la ausencia de ramificaciones tras lesionar el nervio ciático en una cepa de ratones que carecen de la proteína MT5-MMP, se ha sugerido la posibilidad de que esta metaloproteínasa de membrana pueda contribuir a la degradación de la matriz extracelular asociada a la plasticidad neuronal (Komori et al, 2004). Sin embargo todavía disponemos de muy poca información acerca de la importancia de la función *in vivo* de esta metaloproteínasa.

En contraste con la mayoría de las MMP, la expresión MT5-MMP esta principalmente circunscrita a las células neuronales de los dos sistemas nerviosos central y periférico, aunque

su presencia también se ha detectado en las células inflamatorias (Hayashita-Kinoh et al., 2001; Bar-Or et al., 2003). Curiosamente, la expresión de MMP-MT5 en los tejidos neuronales se encuentra espacial y temporalmente regulada en roedores, tanto a lo largo del desarrollo embrionario como del postnatal (Jaworski et al., 2000; Sekine-Aizawa et al., 2001) y como miembro de la familia de las MMPs, MT5-MMP puede degradar varios componentes presentes en el ECM, tales como los proteoglicanos condroitín sulfato (de función inhibitoria), promoviendo así el crecimiento de las neuritas (Wang et al., 1999). Teniendo en cuenta estos datos, junto con los estudios que demuestran la ausencia de crecimiento de las fibras- A β , después de lesionar el nervio ciático, en una cepa de ratones que carecen del enzima MT5-MMP, se ha sugerido que esta metaloproteinasa pueden contribuir a la degradación de la ECM asociada con la plasticidad neuronal y la migración (Komori et al., 2004). Sin embargo, en la actualidad, todavía hay muy poca información disponible acerca de la auténtica relevancia funcional de MT5-MMP, tanto en los procesos normales como patológicos.

Contrariamente al patrón de expresión de otras MMPs, la expresión de MT5-MMP está principalmente circunscrita a las células neuronales de los dos sistemas nerviosos central y periférico, aunque su presencia también se ha detectado en células inflamatorias como los mastocitos (Bar-Or et al., 2003; Hayashita-Kinoh et al., 2001)

5. Sistema neuro-inmune.

Existen cuatro tipos celulares derivados de progenitores hematopoyéticos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos) que tienen un papel fundamental en la inmunidad natural y la inflamación. Todos ellos tienen un citoplasma rico en gránulos, cuyo contenido liberan al exterior cuando son activados, y son estimulados por citocinas segregadas por linfocitos T y antígenos opsonizados.

Las células inmunes y la glía interactúan con las neuronas para modular la sensibilización ante el dolor y para mediar la transición del dolor agudo al dolor crónico. En respuesta a una lesión, se produce una activación inmediata de las células inmunes locales y un reclutamiento hacia la zona lesionada de nuevas células inmunes procedentes del torrente sanguíneo. Las células inmunes no sólo contribuyen a la protección inmune sino que también participan en el inicio de la sensibilización de los nociceptores periféricos. A través de la síntesis y liberación de mediadores del proceso inflamatorio y de las interacciones con neurotransmisores y otros receptores, las células inmunes, la glía y las neuronas forman una red integrada que coordina las respuestas inmunes y modula la excitabilidad de las vías del dolor.

5.1. Mastocitos.

Durante los 100 años posteriores a que Paul Ehrlich los descubriera, los mastocitos o células cebadas eran considerados un componente del tejido conectivo derivado de células mesenquimáticas indiferenciadas (Kitamura et al., 2005). Sin embargo Kitamura y sus colaboradores (Kitamura et al., 1981) demostraron que los mastocitos proceden de

progenitores hematopoyéticos multipotentes de la médula ósea. Los mastocitos normalmente no maduran antes de abandonar la médula ósea sino que circulan por el sistema vascular como progenitores inmaduros y después completan su diferenciación una vez integrados dentro de los tejidos conectivos o mucosos de la periferia. Se identificó una población celular en la sangre fetal murina que cumplía los criterios de un progenitor mastocitario: las células se definieron por un fenotipo de superficie Thy-1^{lo}Kit^{hi}, presencia de gránulos citoplasmáticos y la expresión de RNAs codificantes para proteasas asociadas a los mastocitos, pero ausencia de expresión de FcεRI. Sin embargo, más recientemente Chen et al., en el año 2005 describieron el fenotipo de progenitores de mastocitos (MCPs) procedentes de la médula ósea adulta de ratones, capaces de regenerar la población mastocitaria en ratones deficientes a partir de mastocitos diferenciados en cultivo a partir de MCPs. Este estudio también sugería que estos precursores derivaban directamente de progenitores multipotentes (MPPs) y no de progenitores mieloides comunes (CMPs) o progenitores de granulocitos/macrófagos (GMPs). Si bien otros grupos como el de Arinobu describió el fenotipo de una población de progenitores bipotentes capaces de derivar tanto en un linaje mastocitario como en un linaje basófilo, y que procedía principalmente de GMPs de la médula ósea, el trabajo de Chen et al., refutó estos datos y actualmente es su hipótesis la que es mayormente aceptada.

Los mastocitos son una población de células heterogéneas que derivan de células de la médula ósea y migran a tejidos periféricos como células inmaduras diferenciándose *in situ*. Históricamente se clasificaron según diferencias fenotípicas, básicamente en propiedades de tinción (Enerback et al., 1966a; Enerback et al., 1966b). Pero además de las diferencias morfológicas e histoquímicas, también se diferencian en su desarrollo, perfiles de activación y bioquímica, en su contenido en mediadores y en sus respuestas a secretagogos mastocitarios y a agentes estabilizadores (Lorentz et al., 2000; Metcalfe et al., 1997; Pearce et al., 1982; Pearce et al., 1982b; Shanahan et al., 1985; Theoharides et al., 1982).

Los mastocitos actúan como células proinflamatorias en procesos patológicos como la alergia, la inflamación crónica, las parasitosis por helmintos y los tumores, pero también tienen funciones fisiológicas múltiples, como la cicatrización de heridas (Artuc et al., 1999; Iba et al., 2003) y la regulación de la respuesta inmune del organismo, especialmente frente a bacterias y parásitos (Malaviya et al., 1996). Los mastocitos, tras la activación inducida por mecanismos dependientes o independientes de IgE, liberan gran cantidad de mediadores pre-formados proinflamatorios, inmunorreguladores y reguladores del tejido. Son capaces de degranularse en cuestión de minutos durante un proceso inflamatorio resultando en la liberación de histamina, bradiquinina y otros mediadores que contribuyen a la vasodilatación (Lawrence T et al., 2002).

Origen, maduración y localización de los MC.

Los mastocitos son células inmunes locales que se encuentran siempre cercanas a los capilares que irrigan estos tejidos. Las células precursoras de los mastocitos llegan a través de la circulación hasta los tejidos periféricos, donde maduran. La localización final de los

mastocitos depende de receptores específicos como por ejemplo la integrina β -7, que es crítica para la localización de las células precursoras de mastocitos en el intestino delgado (Gurish et al., 2001).

Los mastocitos maduros son abundantes en los tejidos mucosos (principalmente cerca de vasos sanguíneos y nervios) que están en contacto con el medio externo, como el tracto respiratorio, el tracto intestinal y la piel (Schwartz et al., 1994). También se localizan en órganos linfoides. Una vez han madurado, más del 40% del volumen total del mastocito está ocupado por las membranas de los gránulos de secreción. Estos gránulos se originan en el aparato de Golgi, que es el responsable de la síntesis y organización de los mediadores preformados (Caulfield et al., 1980).

En los roedores los mastocitos maduros son de dos tipos:

- Mastocitos de mucosa (MMC) (intestino, bronquios, timo, hígado y submucosa gástrica): contienen condroitín sulfato como proteoglicano en los gránulos citoplasmáticos y son dependientes de citoquinas producidas por linfocitos T.
- Mastocitos de tejido conjuntivo (CTMC) (piel, pulmón y superficies serosas): contienen heparina como proteoglicano.

Activación de los MC.

Los mastocitos se sitúan cerca de las proyecciones de las neuronas nociceptivas primarias y contribuyen a la sensibilización de los nociceptores en numerosos contextos. La inyección del compuesto secretagogo 48/80 provoca la degranulación de los mastocitos en la duramadre y desencadena la excitación de los nociceptores presentes en las meninges (Levy et al., 2007). La degranulación de las células cebadas también contribuye a la rápida activación de la hiperalgesia termal inducida por NGF (Lewin et al., 1994). Aunque todos estos datos indican que los mastocitos residentes en los tejidos son responsables de la sensibilización de los nociceptores periféricos, no se ha demostrado cuales son los mediadores químicos derivados de los mastocitos que son esenciales para estos efectos. Se sabe que la histamina juega un papel muy importante como mediador de la activación de los nociceptores mediado por mastocitos, pero sorprendentemente el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) parece no ser tan necesario (Rudick et al., 2008), aunque los principales mediadores químicos de los mastocitos son los neuropéptidos como por ejemplo la sustancia P, VIP y el neuropéptido Y que se pueden unir y activar los mastocitos provocando su degranulación y la liberación de histamina (Cross et al., 1996; Ebertz et al., 1987; Stewart et al., 1996).

5.2. Papel de los MC en el dolor inflamatorio.

Se ha reconocido desde la primera parte del siglo que la estimulación de las fibras nerviosas aferentes se asocia con respuestas inflamatorias periféricas como la vasodilatación y la extravasación del plasma sanguíneo (Bruce et al., 1910). Esta observación ha llevado a la idea de que no sólo las neuronas aferentes cumplen una función sensorial, sino que también

participan en sistemas efectores locales que están involucrados en la respuesta inflamatoria, consecuencia de irritación y lesiones tisulares (Holzer et al., 1988). La hipótesis de que los neuropéptidos actúan como un vínculo entre los sistemas inmune y nervioso ha sido apoyada por la demostración de (1) una inervación peptidérgica directa de órganos linfoides primarios y secundarios, (2) una gran proximidad entre las terminaciones nerviosas sensoriales y células del sistema inmune, y (3) receptores específicos neuropeptidérgicos localizados en las células inmunes efectoras (Payan et al., 1989; Felten et al., 1985). Múltiples estudios han demostrado que los neuropéptidos son capaces de interactuar con prácticamente todos los componentes del sistema inmunológico (Guirao et al., 1996). Es necesaria una amplia respuesta inflamatoria para orquestar la reparación de los tejidos después de una lesión (Figura 11).

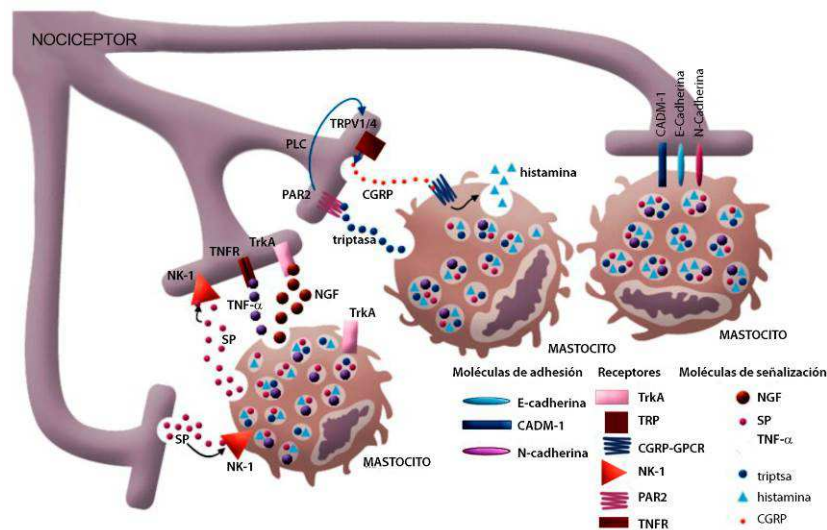


Figura 11. La proximidad entre mastocitos y fibras nerviosas en los tejidos, facilita la comunicación neuro-inmune implicada en la modulación del dolor.

Las interacciones entre las células nerviosas y los mastocitos están facilitadas por moléculas de adhesión como E-cadherina, CADM-1 y N-cadherina (Taiwo et al, 2005; Chen et al., 2011). Tanto las células cebadas como las neuronas tienen la capacidad de secretar el factor de crecimiento nervioso (NGF) y la sustancia P (SP) que se unen a TrkA y a receptores NK-1, respectivamente (Forsythe y Bienenstock, 2012). NGF y SP participan en la señalización nociceptiva. NGF y el factor de necrosis tumoral (TNF), secretados por los mastocitos, inducen el crecimiento neuronal y reducen el posterior umbral de activación neuronal a través de la unión con TrkA y TNFR, respectivamente (Norman et al., 2008; Vincent et al., 2013; Cunha et al., 1992; Verri et al., 2006). La triptasa liberada por los mastocitos se une al receptor de proteinasa activada 2 (PAR2) en las neuronas e inicia una cascada que implica la activación de TRPV1/4 a través de PLC y la liberación de CGRP (Hagiya et al., 2013; Folgueras et al., 2009). CGRP a su vez se une al receptor acoplado a proteína G (GPCR-CGRP) en los mastocitos y promueve la liberación de histamina (Leon et al., 1994; Woolf et al., 1996). Modificado de Chatterjea y Martinov, 2015.

En los últimos años, ha quedado suficientemente acreditado que el sistema nervioso y el inmune no son dos entidades separadas (Ottaway et al., 1991; McKay et al., 1994; Straub et al., 1998; Eskandari et al., 2002; Pedotti et al., 2003; Eskandari et al., 2003; Straub et al., 2004; Brogden et al., 2005; Engelhardt et al., 2005). El sistema nervioso, incluyendo el cerebro y las neuronas periféricas, es capaz de estimular o inhibir actividades del sistema inmune innato y

adaptativo a través de vías hormonales o neuronales. Pero a su vez, el sistema inmune también puede influir en la actividad del sistema nervioso mediante la liberación de mediadores inmunes o citoquinas.

Los mastocitos son conocidos principalmente por su papel en las reacciones de hipersensibilidad dependiente de la inmunoglobulina E (IgE), y aumenta la aceptación sobre su implicación en un amplio número de funciones fisiológicas entre las que destaca la interacción neuro-inmune (Galli et al., 2008). La activación de los mastocitos desencadena la degranulación de los mismos, liberando moléculas mediadoras entre las que destacan la histamina y quimioquinas.

Los mastocitos poseen receptores TrkA que provocan su degranulación ante la presencia de NGF (Mazurek et al, 1986.; Pearce y Thompson, 1986; Horigome et al, 1993), y la consecuente liberación de aminas, citoquinas o enzimas (Harvima et al., 1994; Marshall y Bienenstock, 1994) puede causar un aumento agudo de la sensibilidad actuando en los terminales de los nociceptores (Lewin et al., 1994). Por otra parte, NGF también puede unirse directamente a los receptores TrkA de los terminales periféricos de las neuronas sensoriales primarias y mediante la señalización intracelular mediada por tirosina kinasas (Kaplan et al., 1991b), puede fosforilar proteínas clave relacionadas con la transducción o con la activación de los canales iónicos de la membrana citoplasmática, produciendo la sensibilización del terminal periférico. Finalmente, NGF podría también actuar a nivel local a través de la sensibilización del sistema nervioso simpático. Las neuronas simpáticas postganglionares expresan TrkA (Smeyne et al, 1994) e interactúan con las neuronas sensoriales primarias para producir el componente neurogénico de la inflamación (Levine et al., 1985; Coderre et al., 1991; Green et al., 1993).

5.3. Bases moleculares de la interacción neuroinmune.

Como ya sabemos, los mediadores neuronales que se liberan en los terminales nerviosos se unen a los receptores de las células inmunes. Las neuronas simpáticas, por ejemplo, pueden estimular las células B y las células colaboradoras T (Th1) a través de la activación de receptores β -adrenérgicos y mantener así una respuesta inmune de células Th2 (Kohm y Sanders, 2000; Elenkov et al., 2000). La noradrenalina parece inhibir la actividad de las células en la inmunidad innata, tales como los macrófagos, neutrófilos o células "natural killers" (NK) a través de receptores β 2-adrenérgicos, y a su vez estimular la inmunidad adaptativa relacionada con las células B y T. Además, el sistema nervioso también puede modular la respuesta inflamatoria y la reacción alérgica. El SNC regula respuestas inflamatorias sistémicas a endotoxina a través de las vías humorales (Hu et al., 1991; Lipton et al., 1997; Woiciechowsky et al., 1998).

Por otro lado, la estimulación de neuronas sensoriales sensibles a la capsaicina induce la inflamación neurogénica produciendo síntomas inflamatorios tales como la vasodilatación, extravasación de plasma e hipersensibilidad (Jancso et al., 1967). La evidencia experimental

apoya que algunos neuropéptidos, como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), son capaces de provocar la inflamación neurogénica mediante la interacción con el receptor de la neuroquinina-1 (NK-1) y el receptor de CGRP1, respectivamente, localizados en las células endoteliales, mastocitos, células del sistema inmune y en las arteriolas (Brain et al., 1988; Bowden et al., 1994; Maggi et al., 1995). La destrucción de las fibras nerviosas sensibles a la capsaicina con esta sustancia, durante el periodo neonatal, reduce el contenido de estos neuropéptidos y la inflamación neurogénica.

Además, las neuronas sensoriales no participan únicamente en la inflamación neurogénica sino que se ha demostrado también su mediación en la nocicepción y el dolor. Muchos agentes inflamatorios pueden estimular las neuronas aferentes primarias. Especialmente, la tripsina y triptasa secretada por los mastocitos escinden el receptor proteinasa activado (PAR) 2 en las neuronas aferentes espinales principales y estimulan la liberación de estos neuropéptidos (Steinhoff et al., 2000). Además, los mastocitos que contienen triptasa están muy próximos a las fibras nerviosas que contienen la sustancia P y CGRP (Stead et al., 1987; Naukkarinen et al., 1994; Metcalfe et al., 1997), por lo que el grupo de Bunnett sostiene que la activación de los mastocitos mediada por la IgE provoca la liberación de triptasa de los gránulos secretores intracelulares y esta triptasa activa PAR-2 en las neuronas sensoriales para estimular la liberación de la sustancia P y CGRP (Steinhoff et al., 2000).

Esta asociación mutua entre los nervios y las células inmunes se ha observado en condiciones normales y patológicas y es ampliamente aceptada, sin embargo su base molecular exacta no ha sido aclarada todavía aunque algunos trabajos han sido capaces de dilucidar una parte de la base molecular de comunicación entre los nervios y mastocitos mediante una imagen molecular de CADM1 y N-cadherina.

Las interacciones entre las neuronas y los mastocitos están implicadas tanto en la homeostasis como en regulaciones patológicas y en la estrecha aposición que ambos estados conlleva. Mediante imágenes obtenidas con el microscopio atómico de fuerzas (AFM), se ha podido observar que se producen asociaciones físicas entre neuritas y mastocitos en co-cultivo, mostrando un cono de crecimiento de más de 7 micras, que cubre la superficie de los mastocitos (Suzuki et al., 2001; Suzuki et al., 2007). Para investigar las moléculas de adhesión implicadas en la interacción, en primer lugar se observó la distribución de las cadherinas en los co-cultivos de neuritas y mastocitos (Goda et al., 2002; Tanaka et al., 2000), que son una familia de proteínas de adhesión celular dependientes de Ca^{2+} , de unión homófila, que juegan un papel importante en la formación de la plasticidad sináptica. Analizando diversas inmunotinciones en estos co-cultivos se demostró que tanto las neuronas sensoriales del ganglio cervical superior (SCG) como los mastocitos derivados de la médula ósea (BMMCs) expresan la N-cadherina y la E-cadherina y que ambas están presentes sobre todo en el citoplasma de los BMMCs en ausencia de las neuritas de los SCGs (Tegoshi et al., 2000; Suzuki et al., 2004). Sin embargo, cuando se establece la asociación con las neuritas, la N-

cadherina se localiza en la membrana plasmática de BMMCs, pero no la E-cadherina (Suzuki et al., 2004). También se ha observado un acumulo de β -catenina, que es una proteína que se encuentra íntimamente asociada con las cadherinas, en la periferia de la membrana plasmática en los BMMCs unidos a neuritas. Sin embargo, en cultivos sin neuronas, la β -catenina se distribuye por el citoplasma. Estos resultados sugirieron que la N-cadherina está involucrada en la formación de contactos entre los nervios y mastocitos.

Por otro lado, Biederer et al. demostraron que la molécula de adhesión celular sináptica SynCAM se localiza preferentemente en ambos lados de la mayoría de las sinapsis en el cerebro y funciona como una molécula de adhesión de unión homófila que abarca toda la hendidura sináptica en el sistema nervioso. Ito et al. establecieron que SgIGSF media la adhesión entre los fibroblastos y los BMMCs (Biederer et al., 2002; Ito et al., 2003). Aunque esta molécula de adhesión también se ha descrito con otros nombres diferentes, actualmente su nombre se ha aprobado por el Comité de Nomenclatura Génica de HUGO como la molécula de adhesión celular-1 (CADM1). En los co-cultivos de neuronas del SCG y BMMCs, CADM1 se expresa intensamente en el lugar de contacto entre los mastocitos y las neuritas. Los mastocitos que carecen de CADM1 no contactan bien con los axones, mientras que la expresión ectópica de esta molécula de adhesión, mejora significativamente su acoplamiento. El grado de adhesión de los mastocitos que expresan CADM1 se reduce de una forma dosis-dependiente cuando se cultivan en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-CADM1. Estos resultados sugieren que CADM1 es la principal molécula de adhesión que media la unión *in vitro* entre mastocitos y neuritas (Furuno et al., 2003).

También se ha demostrado la participación de CADM1 en la comunicación entre los mastocitos y las neuronas sensoriales. Existe una diferencia significativa entre la proporción de mastocitos con y sin CADM1 que son capaces de responder a la activación neuronal. Sólo una cuarta parte de los mastocitos sin CADM1 responden a la activación de las neuritas, mientras que con su participación se eleva a más de la mitad. Esta tasa de respuesta de las células cebadas CADM1+ ante la activación neuronal, disminuye de forma dosis-dependiente en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-CADM1. Además, el receptor antagonista NK-1, bloquea la tasa de respuesta de los mastocitos CADM1- a la activación de las neuritas en concentraciones mucho menores que en mastocitos CADM1+. Así CADM1 es probable que no sólo funcione como simple molécula de adhesión en la interacción entre nervios y mastocitos, sino que también sirva para promover el desarrollo de un microambiente donde las células cebadas tengan una mayor susceptibilidad a la activación por parte del sistema nervioso.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral consiste en el estudio de los diferentes factores que regulan las neuronas sensoriales periféricas que están implicadas en la detección del dolor, así como su participación en el desarrollo postnatal del sistema neuroinmune. Con este fin, propusimos estudiar la contribución de neurotrofinas y de metaloproteasas al desarrollo y mantenimiento de esta población sensorial, además de las interacciones que se producen en este periodo entre los terminales nociceptivos y las células inmunes que intervienen en los procesos inflamatorios.

Para lograr el objetivo general nuestros objetivos específicos fueron:

- 1- Estudio del papel de BDNF como factor neurotrófico clave en el desarrollo postnatal de las diferentes modalidades sensoriales cutáneas.
- 2- Estudio de los cambios en los requerimientos neurotróficos postnatales de las neuronas nociceptivas cutáneas que dan lugar a la diversificación de poblaciones nociceptivas.
- 3- Estudio de la regulación de la inervación nociceptiva cutánea por la metaloproteasa MT5-MMP.
- 4- Estudio de las interacciones moleculares de los mastocitos con las neuronas nociceptivas cutáneas y su relación con el dolor inflamatorio.o.

1. Animales.

1.1. Cepas de ratones.

En este estudio se han usado diferentes cepas de ratones modificados genéticamente cuya generación y genotipado han sido descritas con anterioridad. Los animales fueron estabulados según la legislación vigente en el Servicio de Producción Animal del Campus de Burjassot bajo la supervisión de la veterinaria jefe de la Universidad de Valencia. Las cepas de ratones utilizadas, su procedencia y características son las descritas a continuación:

- **Cepa *Bdnf*^{-/-}**: Esta cepa porta una delección del exón único del gen *Bdnf* y, aunque fue generada sobre un fondo genético mixto Sv129 y C57Bl6 (Jones et al., 1994), ha sido retrocruzada sobre fondo genético puro ICR/CD1 durante más de 20 generaciones. La mutación es letal en homocigosis poco después del nacimiento y sólo un 5% de los animales sobreviven hasta p20-25. Por este motivo la colonia se mantuvo en heterocigosis y se realizaron cruces entre padres heterocigotos para la obtención de ratones homocigotos mutantes nulos para BDNF de distintos estadios prenatales y postnatales tempranos.

- **Cepa *Mmp24*^{-/-}**: Esta cepa de ratones ha sido generado en el laboratorio del Dr. Carlos Lopez-Otín (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Instituto Universitario de Oncología, Universidad de Oviedo, Oviedo) y en ella se ha eliminado un fragmento genómico de 6 kb que contiene los exones 5, 6 y 7 del gen endógeno *Mmp 24*. Esta delección produce la pérdida del dominio catalítico y parte del dominio hemopexina de la proteína. La cepa fue generada y mantenida sobre fondo genético puro C57Bl6.

1.2 Genotipado de los animales.

El genotipo de cada animal se determinó mediante el análisis por PCR del DNA genómico extraído a partir de fragmentos de cola de ratones fetales, postnatales o adultos. Los protocolos utilizados se indican a continuación.

Aislamiento de DNA

Fragmentos de cola de ratón de aproximadamente 0,5 cm fueron sumergidos en 400 µl de tampón de lisis (0,5% SDS, 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris pH 8,0 y 3 mM EDTA) con proteinasa K (200 µm/ml) y se incubaron a 60° C toda la noche a fin de conseguir una buena digestión celular. Tras la digestión se centrifugaron los lisados celulares a 14.000 rpm., durante 10 min., y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. A continuación se añadieron 500 µl de cloroformo (Sigma) y 75 µl de acetato potásico 8 M, se agitaron y se guardaron a -80 °C durante al menos una hora. Una vez descongelados se centrifugaron a 2800 g., durante 15 min., para facilitar la separación entre las fases acuosa y orgánica. Se transfirieron 200 µl de la fase acuosa a un tubo *Eppendorf* limpio y se precipitó el DNA genómico con 1 ml de etanol absoluto. A continuación se centrifugaron las muestras a 2800 g., durante 10 min. y los precipitados de DNA generados se lavaron con etanol al 70%, se dejaron secar y se resuspendieron en 100 µl de agua destilada.

Materiales y métodos

Detección de los alelos WT y mutante mediante PCR

Las condiciones de la PCR para cada cepa se detallan a continuación. El tamaño de cada producto de amplificación se resolvió mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% preparado en tampón Tris-borato-EDTA (TBE: Tris a 89 mM, pH 8,0, ácido bórico a 89 mM y EDTA a 2 mM) con 10 µg/ml de bromuro de etidio. Como tampón de carga 6x, se utilizó glicerol al 50%, azul de bromofenol (Sigma) al 0,05%, cianol de xileno (Sigma) al 0,05% y EDTA a 100 mM.

- **Cepa *BDNF*^{-/-}**: El genotipo se determinó mediante amplificación por PCR de DNA genómico utilizando como cebadores:

- "*MBDSA7*": cebador directo (5' GTG GAG TTC TGC TAA TGA GAA GCT GAG 3') común para ambos alelos.

- "*MBSUP2*": cebador inverso (5' CTG GTC CTC ATC CAG CAG CTC TTC G 3') para el alelo salvaje.

- "*PGK2*": cebador inverso (5' GTG CCA GCG GGG CTG CTA AAG CGC 3') para el alelo mutante.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C durante 1 min., anillamiento a 65 °C durante 2 min. y extensión a 72 °C 2 min. Después de una reacción de 40 ciclos el producto del alelo salvaje era de 1400 bp. y el del alelo mutante de 1400 bp.

- **Cepa *TrkB*^{-/-}**: El genotipo de los ratones se determinó mediante amplificación por PCR de DNA genómico utilizando los siguientes cebadores:

- "*TrkB fwd gen*": cebador directo (5' TCG CGT AAA GAC GGA ACA TGA TCC 3') común para ambos alelos.

- "*TrkB rev wt gen*": cebador inverso (5' AGA CCA TGA TGA GTG GGT CGC C 3') para el alelo salvaje.

- "*TrkB rev ko gen*": cebador inverso (5' GAT GTG GAA TGT GTG CGA GGC C) para el alelo mutante.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C durante 1 min., anillamiento a 65 °C durante 30 seg. y extensión a 72 °C durante 1 min. Después de una reacción de 35 ciclos el producto de amplificación del alelo salvaje era de 900 y 1000 bp. para la banda correspondiente al alelo mutante.

- **Cepa *Mmp24^{-/-}***: El genotipo se determinó mediante amplificación por PCR de DNA genómico utilizando como cebadores:

- "*mt5-mmp fwd gen*": cebador directo (5' CGC CAT CTG AGA GGA AGC ACG AG 3') y
- "*mt5-mmp rev gen*": cebador inverso (5' CAC TGT GTT GAA GTT GCC ATC GC 3'), para el alelo salvaje
- "*Neo fwd gen*": (5' AGG ATC TCC TGT CAT CTC ACC TTG CTC CTG 3') y
- "*Neo rev gen*": (5' AAG AAC TCG TCA AGA AGG CGA TAG AAG GCG 3') correspondiente a la secuencia *neo*.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C durante 30 seg., anillamiento a 61 °C durante 1 min. y extensión a 72 °C 45 seg. Después de una reacción de 30 ciclos el producto del alelo salvaje era de 117 bp. y el del alelo mutante de 492 bp.

2. Técnicas histológicas.

2.1. Procesamiento histológico.

Los animales adultos y postnatales (P), de 5 días (P5) a P25, fueron profundamente anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 70 µg de pentobarbital sódico por cada gramo de peso del animal y fijados mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0,1M a pH 7,4 (PB). En algunos animales se empleó el fijador Karnovsky (PFA al 2% y glutaraldehído al 2,5% en PB) con el objetivo de preservar mejor la ultraestructura para su subsiguiente análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los cuerpos se colocaron en la misma solución fijadora durante 1 hora y después se lavaron abundantemente con PB. Las extremidades posteriores, y dorsales tronco fueron utilizados para la disección de la piel glabra y pilosa, de la médula espinal, de los diferentes DRGs y de los nervios periféricos que fueron posteriormente procesados para histoquímica, inmunohistoquímica, tinción argéntica y TEM. Embriones completos de estadios gestacionales (E) 11, 12, 13 y 15 (se consideró estadio 0 la mañana del tapón vaginal) y la región torácico-lumbar y las patas traseras de animales neonatos (postnatal P0) fueron fijados por inmersión en solución de Carnoy (60% etanol absoluto, 30% cloroformo, 10% ácido acético glacial) e incluidos en parafina junto con algunos de los DRGs y fragmentos de piel postnatales o adultos fijados con PFA 4%. Para la inclusión en parafina, las muestras se deshidrataron previamente por inmersión en una batería de alcoholes de graduación creciente (etanol 70%, 96% 100%), se aclararon con tolueno y se sumergieron en parafina a 60°C toda la noche y en parafina nueva varias horas antes de confeccionar los bloques. Las muestras incluidas se cortaron con un microtomo de parafina Leica RM2135 (Leica *microsystems*) y se obtuvieron series de cortes de 7 µm de grosor, excepto en la piel, donde se obtuvieron secciones de 10 µm con un plano de corte perpendicular a la superficie. El resto de tejidos diseccionados de los animales perfundidos se crioprotegieron con sacarosa al 30% en dH₂O, toda la noche a 4 °C, y se obtuvieron secciones de 10 µm mediante un criostato Microm HM 505 N. En ambos

procedimientos los cortes fueron montados en portaobjetos tratados con gelatina-alumbre de cromo (alumbre de cromo al 0,2%, gelatina al 0,5% y azida sódica al 1%), para favorecer su adhesión. Para las distintas tinciones y aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas (ver más adelante), los cortes de parafina fueron desparafinados con xileno durante 15 min. y rehidratados en una batería de alcoholes de concentración decreciente (100%, 70% y 96%) hasta llegar al agua destilada.

2.2. Técnicas inmunohistoquímicas, histoquímicas e impregnación argéntica.

Para las técnicas histoquímicas con lectinas o la técnica inmunohistoquímica empleadas en este estudio se utilizaron tanto las técnicas de detección basadas en la peroxidasa como técnicas inmunofluorescentes. Se emplearon distintos anticuerpos primarios que se encuentran recogidos en la Tabla 1 del Anexo.

El tratamiento de los cortes previo a la incubación con el anticuerpo primario fue variable dependiendo del anticuerpo y la técnica de detección. El bloqueo de la peroxidasa endógena, en los casos en los que se utilizó peroxidasa como marcador de los anticuerpos, se realizó mediante el tratamiento de las muestras con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 min. La fijación con aldehidos forma uniones cruzadas que enmascaran los sitios antigénicos del tejido, proporcionando tinciones inmunohistoquímicas flojas. Para romper estas uniones y desenmascarar los epitopos, se trató el tejido, en algunas ocasiones, con una solución de citrato sódico a 10 mM y pH 6,5, precalentada a 95-100 °C durante 20 min. El bloqueo de uniones inespecíficas en todos los casos se llevó a cabo incubando los cortes con un tampón de bloqueo (Triton X-100 al 0,2% y suero de cabra [NGS] al 10% en PB) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario, durante toda la noche y a temperatura ambiente, en el mismo tampón de bloqueo (Tabla 1, Anexo).

Para las detecciones con peroxidasa se utilizó el método del ABC. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se incubaron los cortes con anticuerpos secundarios acoplados a biotina apropiados para detectar la especie del anticuerpo primario seguido del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Tras varios lavados en PB los cortes se incubaron en diaminobenzidina (DAB) (Sigma) al 0,02% y H₂O₂ (Panreac) al 0,001% en PB, hasta que se observó el marcaje deseado. La tinción argéntica de las terminaciones nerviosas presentes en la piel se realizó mediante una modificación del protocolo original descrito en Tolvía et al., 1997. Este método es aplicable a secciones del sistema nervioso central incluidas en parafina y fijadas con paraformaldehído. Los cortes de piel se desparafinaron, se incubaron en la solución mordiente, tartrato de sodio (C₄H₄O₆Na₂·2H₂O), durante 5 min y posteriormente se lavaron con agua destilada 3 veces durante 5 min. A continuación se incubaron en la solución de nitrato de plata al 20% en agua destilada durante 1min. Una vez teñidos los cortes, se eliminaron los restos de plata lavando primero durante 5-10 s. con acetona a temperatura ambiente y a continuación durante 20s. con una solución reductora entre 70 y 75°C en agitación (pirogalol). Por último se lavaron con agua destilada y se procedió a su contratinción, deshidratación y montaje con Eukitt.

La histoquímica realizada con la lectina de *Griffonia simplicifolia* (IB4) acoplada a biotina (10 µg/ml; Sigma) se realizó bajo las mismas condiciones que las inmunodetecciones. Finalmente se procedió a la deshidratación de las muestras en alcoholes de concentración progresivamente creciente, aclarado con xilol y montaje con Eukitt (Panreac) de las preparaciones.

Para las detecciones fluorescentes se utilizaron anticuerpos secundarios apropiados conjugados con distintos fluoróforos (ver Tabla 3). En estos casos, los cortes fueron teñidos además con DAPI (4',6-diamidino-2-fenolindol dihidrocloruro; Sigma) a 2 µg/ml o TOPRO-3 (Molecular Probes) y montados con el medio de montaje para fluorescencia Prolong Gold® (Molecular Probes). La fluorescencia convencional fue visualizada con un microscopio vertical Nikon E600 (Nikon, Japón) o un invertido Nikon TS2000 y se capturaron imágenes con una cámara digital Nikon DM1200. Para los estudios de colocalización las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal espectral Leica TCSSTL, equipado con láseres de argón.

2.3. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión.

Las piezas extraídas se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% (Sigma) en PB, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%), se contrastaron con acetato de uranilo al 2% en etanol de 70°, se completó la deshidratación hasta 200% etanol puro (70%, 96%, 100% y 200% etanol), se aclararon en óxido de propileno (Panreac) y se incluyeron en araldita (Durcupan-Fluka). Para los recuentos de fibras mielínicas se obtuvieron secciones transversales al nervio de 1µm de grosor mediante un ultramicrotomo Reichert Ultracut E, se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se determinó el número total de axones utilizando el programa CAST-GRID *software package* (Olympus, Denmark) adaptado a un microscopio Olympus BX51. Para los recuentos de las fibras amielínicas se utilizaron secciones de 60 nm de grosor que se contrastaron con citrato de plomo y se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010F.

La piel de las almohadillas plantares de animales de ambos genotipos, se incluyó en resina como se describe anteriormente y se obtuvieron cortes semifinos seriados de 2 µm de grosor que se tiñeron con azul de toluidina-bórax al 1% para su observación al microscopio óptico. Se fotografiaron las regiones de interés y estos semifinos se arrancaron del portaobjetos mediante un choque térmico, usando una plancha metálica enfriada previamente con nitrógeno líquido, después de pegar un bloque de araldita polimerizada sobre el corte. Una vez separado el semifino del portaobjetos se retalló la región de interés y se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 nm de grosor que fueron contrastados con plomo, observados y fotografiados a diferentes magnificaciones con el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010F.

3. Preparación del mesenterio para el análisis de mastocitos *in vivo*.

Los ratones adultos fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de 70 µg de pentobarbital sódico por cada gramo de peso del animal. Después de abrir la cavidad ventral de los animales, los mesenterios fueron expuestos sobre un portaobjetos de vidrio y sobre ellos se colocó un fragmento de gasa estéril para facilitar la incubación con la solución

Materiales y métodos

experimental. Las muestras fueron expuestas durante 30 minutos a una solución de capsaicina 5 μM en suero salino y con 50% de glucosa o a la misma solución basal pero sin capsaicina. Transcurrido este tiempo se lavó el tejido con suero salino, se fijó por inmersión con un fijador orgánico durante 30 minutos (solución de Carnoy) y finalmente se diseccionó el mesenterio. Los animales fueron sacrificados por decapitación inmediatamente antes de aplicar el fijador. Una vez fijados los mesenterios, se lavaron primero 3 veces en etanol de 70%, a continuación 3 más en agua destilada y por último se extendieron cuidadosamente sobre los cubreobjetos. Para determinar el número total de mastocitos y el número total de mastocitos degranulados se tiñeron las preparaciones con violeta de cresilo al 1% durante 5 minutos, para detectar los gránulos por metacromasia, y se montaron con glicerol al 50% en PBS.

4. Cultivos celulares.

Todos los protocolos de cultivos celulares se llevaron a cabo en condiciones de máxima asepsia. Antes de cada disección el área de trabajo y todo el material no estéril fue desinfectado con alcohol al 70%. Para las disecciones se utilizó el siguiente material de microcirugía de acero inoxidable: una pinzas finas, unas pinzas ultrafinas 55 (Dumont Dumostar), dos bisturíes finos, unas microtijeras, unas tijeras pequeñas.

4.1. Cultivos primarios de neuronas sensoriales.

4.1.1. Preparación de las placas para cultivos de neuronas sensoriales.

Para cada tipo de ensayo de cultivo celular se trataron las placas con diferentes sustratos de adhesión. Opcionalmente colocamos cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro o insertos con membranas de 0,4 μm de diámetro de poro en los pocillos de las placas p-24 y tratamos directamente el cristal o la membrana en lugar del plástico. A continuación se detallan los tratamientos con los diferentes sustratos:

Laminina

Incubamos las placas durante toda la noche con poli-DL-ornitina a 0,5 mg/ml (Sigma), en tampón borato a pH 8,4, a temperatura ambiente. A continuación lavamos las placas tres veces con ddH₂O y las dejamos secar. Cubrimos las placas con una solución de laminina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en HBSS [Gibco], stock 1 mg/ml; Sigma) que mantuvimos como mínimo 3 horas y como máximo 48, en el incubador de CO₂ a 37 °C. La laminina la lavamos con medio F12 (Gibco) sin dejar secar en ningún momento y las placas se reservaron hasta el momento de la siembra celular en el medio F12 en el incubador de CO₂ (nunca más de 24 horas).

Matrigel

Incubamos las placas con una solución de *Growth factor reduced* - Matrigel® (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio Hams F12; BD) durante al menos 2 horas en el incubador de CO₂ a 37 °C. A continuación lavamos 3 veces con medio F12 sin dejar secar en ningún momento y las placas se reservaron hasta el momento de la siembra celular en el medio F12 en el incubador de CO₂ (nunca más de 24 horas).

Colágeno tipo I, gelatina y poli-D-lisina

Incubamos las placas con una solución de colágeno tipo I a 1,5 mg/ml (Vitrogen), gelatina al 0,1% (Sigma) o poli-D-lisina a 0,1 mg/ml (Sigma) en PBS durante al menos 2 horas en el incubador de CO₂ a 37 °C. A continuación lavamos 3 veces con PBS y dejamos secar las placas hasta el momento de la siembra celular.

4.1.2. Recolección y siembra de las células.

Protocolo de disección y recolección del tejido

Para el cultivo primario de neuronal sensoriales de los DRGs (Davis y cols., 1993), se sacrificaron por dislocación cervical animales postnatales entre 0 y 20 días de edad de ambos genotipos. Tras la decapitación, se diseccionaron los animales, se extrajeron y limpiaron las columnas vertebrales en medio L15 atemperado y se abrieron desde la zona rostro-dorsal para exponer así los ganglios sensoriales que se sitúan en las raíces dorsales formando nódulos pares a ambos lados de la médula espinal, justo a la altura de los discos intervertebrales pero separados de ellos por las meninges espinales. Para la extracción de los DRGs se utilizó una lupa de disección Leica MZ6 (aumento 25x), unas tijeras finas para abrir la columna y unas pinzas ultrafinas que permitieran la sujeción de los ganglios por la raíz para preservar de esta manera su estructura encapsulada. Los DRGs se fueron depositando uno a uno en una placa con medio L15 y una vez finalizada la extracción (alrededor de 50 ganglios por animal) se utilizaron micro bisturíes para eliminar los restos de raíces dorsales y ventrales así como de nervio raquídeo, para minimizar la fracción glial y los restos de mielina procedentes de los axones.

Preparación de la suspensión celular

Una vez limpios, se transfirieron los ganglios a un tubo de 10 ml mediante una pipeta de vidrio con la punta pulida a la llama y pre-tratada con Sigmacote (Sigma) para evitar la adhesión del tejido. A continuación se lavaron con medio Hams F12 (Gibco) atemperado y se procedió a la disociación enzimática. Los tiempos de incubación en cada una de las soluciones enzimáticas variaron en función de la edad del animal: en primer lugar se incubó durante 30 minutos a 4 °C con colagenasa (Worthington) a 2 mg/ml en medio Hams F12 seguido de 15 (P0-P7) ó 60 minutos (\geq P20) a 37 °C; en segundo lugar, tras lavar con medio Hams F12, se incubó con tripsina (Worthington) al 0,05% en HBSS-CMF (Hanks balanced SALT solution Ca/Mg-free, Gibco) durante 10 (P0-P7) ó 15 minutos (\geq P20) a 37 °C ; a continuación se bloqueó la actividad enzimática con HIHS (Gibco), se lavó con medio Hams F12 y por último se incubó 5 minutos con DNAsa al 0,1% en F12. A continuación se lavaron los ganglios con medio Hams F12 (Gibco) atemperado y se procedió a la disociación mecánica, que se realizó disgregando cuidadosamente el tejido al deslizarlo por una pipeta de vidrio pre-tratada con la punta pulida a la llama y ligeramente cerrada. Una vez conseguida una suspensión celular homogénea se sembraron las células en medio Hams F12 suplementado con SATO (SATO: 2 mM glutamina, 0.35% albúmina de suero bovino (BSA) (Pathocyte-4, ICN, Irvine, CA), 60 ng/ml

Materiales y métodos

progesterona, 16 µg/ml putrescina, 400 ng/ml L-tiroxina, 38 ng/ml selenito sódico, 340 ng/ml tri-iodo-tironina, 60 µg/ml penicilina y 100 µg/ml streptomina) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. La densidad celular empleada para la mayoría de los cultivos primarios de neuronas de los DRGs y en concreto para aquellos en los que se estudiaba la supervivencia neuronal o esta afectaba al resultado del ensayo, fue aproximadamente 2000 células por pocillo, ya que a densidades superiores las neuronas secretan factores neurotróficos suficientes como para camuflar el efecto de los tratamientos.

4.1.3. Estudio de la supervivencia neuronal.

Los ensayos de supervivencia de las neuronas sensoriales se realizaron en cultivos de diferentes edades postnatales (P0, P2, P5, P7 y P15). Los factores neurotróficos NGF, BDNF y GDNF (10 ng/ml; PeProtech) se añadieron al medio Hams F12-SATO, de forma individual o en combinaciones entre ellos, justo en el momento de la siembra celular y como control de su efecto, se sembraron neuronas en ausencia de factores de crecimiento. Para trazar la curva dosis-respuesta de supervivencia neuronal en presencia de NGF, las neuronas se sembraron en presencia de diferentes concentraciones de la neurotrofina (0, 0,1, 1 y 10 ng/ml). En la determinación de la tasa de supervivencia en cada condición, se consideró como el número inicial de neuronas sembradas el total de neuronas adheridas al sustrato 4 horas después de la siembra. Para estimar el número total de neuronas se realizó, en todos los casos, un muestreo usando un microscopio invertido con contraste de fases Nikon TS2000, contabilizando todas aquellas células con morfología claramente neuronal y que habían comenzado a expandir neuritas, presentes en campos no-solapantes (20x), a lo largo de dos líneas perpendiculares imaginarias trazadas a través del cubreobjetos. Los cultivos se mantuvieron durante 48 ó 96 horas en el incubador de CO₂ y tras este periodo se estimó el número total de neuronas supervivientes como se describe anteriormente.

4.1.4. Ensayos de bloqueo de supervivencia *in vitro*.

Los ensayos de bloqueo de función para estudiar la supervivencia neuronal dependiente de BDNF, se realizaron cultivando neuronas sensoriales disociadas de los DRGs, de animales neonatales. Las neuronas se sembraron a una concentración de 2000 ó 10000 células/ml sobre ornitina/laminina y se incubaron en medio Hams F12-SATO con 1 ó 10 ng/ml de NGF (PeProtech) en presencia de anticuerpos IgG anti-BDNF generados en conejo (6 µg/ml; Santa Cruz Labs.) o anticuerpos IgG anti-ratón (6 µg/ml; Sigma), como control de las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos. La tasa de supervivencia neuronal se determinó a los 5 y 10 días respectivamente, tal como se describe con anterioridad.

4.2. Cultivos y co-cultivos organotípicos.

Los cultivos de explantes organotípicos se establecieron a partir de animales postnatales de 20 días (P20) de ambos genotipos ya que las neuronas sensoriales de los DRGs a esta edad pueden sobrevivir sin necesidad de adición exógena de factores neurotróficos. Los DRGs se diseccionaron de la región lumbar como se ha explicado con anterioridad y los fragmentos piel se obtuvieron de las almohadillas plantares de las extremidades traseras del ratón. Todos los

tejidos fueron diseccionados en medio L15 (GIBCO, Grand Island, NY) y posteriormente lavados en medio Hams F12. Utilizando unas pinzas ultrafinas estériles los DRGs y los fragmentos de piel fueron colocados individualmente uno junto al otro sobre una membrana porosa situada en el compartimento superior de insertos (0,4 μm poro, 12-mm diámetro; Millipore) que habían sido pre-tratados con Matrigel (*Growth Factor Reduced*; BD) y suspendidos sobre las placas de 24 pocillos. Para permitir la adhesión de los explantes sobre el sustrato, dada la naturaleza impermeable de la piel, se pipeteó cuidadosamente en el pocillo un volumen de medio F12-SATO suficiente para mantener el tejido húmedo pero sin sumergirlo, durante 1 hora de incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Pasado este tiempo se añadió una pequeña cantidad más de medio para cubrir los explantes y favorecer así su supervivencia. El co-cultivo se mantuvo durante 6 días en el incubador en ausencia de factores tróficos exógenos.

4.3. Cultivo de mastocitos derivados de la médula ósea (BMMCs).

Para establecer los cultivos de mastocitos derivados de la médula ósea (BMMCs) se sacrificaron por dislocación cervical animales adultos de ambos genotipos. La médula ósea se extrajo del fémur y la tibia del animal tras eliminar las epífisis, mediante la inyección de medio atemperado con una jeringuilla a través del interior del hueso hasta vaciar por completo la cavidad medular sobre la placa de cultivo. Para la disección y el cultivo de las células hematopoyéticas empleamos medio RPMI 1640 suplementado (RPMIs: RPMI 1640, 10% suero bovino fetal (FBS), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Gibco), 50 μM β -mercaptoetanol y 1% HEPES, pH 7,5). Una vez extraída la médula ósea se transfirió el tejido a un falcon de 10 ml, se lavó con medio RPMIs, se disgregó cuidadosamente con una pipeta de vidrio con la punta pulida a la llama y ligeramente cerrada hasta obtener una solución celular homogénea. A continuación se sembraron las células en ausencia de sustrato de adhesión a una densidad de aproximadamente 4×10^5 células/ml, se añadió al medio RPMIs 10 ng/ml de interleukina-3 (IL-3; PeProtech), a fin de favorecer la diferenciación de las células madre hematopoyéticas hacia el linaje mieloide, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Algunas de las células aisladas se mantuvieron en suspensión mientras que una fracción de ellas se adhirió de forma espontánea al frasco de cultivo. Ambas fracciones proliferaron pero únicamente la población en suspensión se utilizó para el subcultivo (o pase, cada 3-4 días) ya que estudios previos demuestran que es ésta la población que permite la obtención de un cultivo enriquecido en mastocitos en un 98%, tras un periodo de 4 semanas de diferenciación *in vitro* (Jeffrey y cols., 2006). Transcurrido este periodo y una vez establecido el cultivo de BMMCs se mantuvo como máximo hasta las 9 semanas *in vitro* pasando las células cada 3 días. La identidad de las células se determinó mediante criterios morfológicos y para ello se recogió una muestra de células de cada cultivo en un tubo *Eppendorf* y se fijaron con glutaraldehído al 3,5% en PB, durante 30 min. a 37 °C. Tras diversos lavados en PB se dispensaron gotas de agar (Panreac) al 1,5% sobre las muestras para darles consistencia y se procedió a su inclusión en araldita. Como hemos descrito anteriormente se realizó la postfijación de las células en tetraóxido de osmio al 1% en PB durante 45 min. a

temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron en acetato de uranilo (Aname) al 2% en alcohol del 70%, durante 1 hora. Posteriormente se deshidrataron en baños de alcoholes de graduación creciente muy cortos (5 min.), se aclararon con óxido de propileno y se incluyeron en araldita. Se obtuvieron cortes semifinos de 1 μm de grosor mediante un ultramicrotomo Reichert Ultracut E, se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se analizaron con un microscopio vertical Nikon E600.

4.4. Co-cultivos de neuronas sensoriales de los DRGs y BMMCs.

El estudio de la interacción entre las neuronas sensoriales de los DRGs y los mastocitos se realizó mediante co-cultivos con BMMCs. En primer lugar, se establecieron los cultivos primarios de neuronas disociadas o explantes de DRGs de animales adultos de ambos genotipos, conforme a lo descrito previamente, y se sembraron en placas de 24 pocillos en las que se habían introducido cubreobjetos o insertos pre-tratados con Matrigel (growth factor reduced; BD). Cuando los cultivos primarios alcanzaron los 5 DIV, se lavaron los cultivos con medio Hams F12, se sembraron 1×10^4 BMMCs por pocillo y se incubaron las células en medio Hams F12 suplementado con SATO y con 10 ng/ml de IL-3. Como control del ensayo se cultivaron BMMCs solas y en las mismas condiciones experimentales.

4.5. Ensayos de bloqueo de adhesión *in vitro*.

En los ensayos de bloqueo de función para analizar la tasa de degranulación de los mastocitos mediada por una interacción física neuro-inmune, se utilizaron los co-cultivos de neuronas sensoriales disociadas de los DRGs y BMMCs, descritos previamente. Los BMMCs se pre-incubaron con un anticuerpo IgG monoclonal contra el dominio extracelular de la N-cadherina (mAb GC-4, 40 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) o con IgGs anti-ratón (40 $\mu\text{g/ml}$; Sigma), durante 1 hora a 37 °C en un incubador de CO₂. El co-cultivo se mantuvo durante 72 horas *in vitro* sin eliminar los anticuerpos bloqueantes y a continuación se estimuló la degranulación de las BMMCs incubándolo con capsaicina 1 μM durante 1 hora a 37 °C en el incubador de CO₂, o únicamente con una solución de DMSO vehículo. Como control se aplicaron los mismos tratamientos a BMMCs sembradas en ausencia de neuronas pero bajo las mismas condiciones experimentales (medio de cultivo y sustrato) que los co-cultivos.

5. Técnicas inmunocitoquímicas.

Para la realización de las distintas tinciones de los estudios *in vitro*, las neuronas disociadas, BMMCs, explantes y co-cultivos en general, sembrados sobre cubreobjetos o insertos en placas, se fijaron con PFA al 4% durante 20 min. a temperatura ambiente y a continuación se lavaron varias veces las muestras con PB. En el caso de la inmunodetección de la N-cadherina donde una menor permeabilización nos permitía detectar únicamente la proteína presente en la membrana citoplasmática, se utilizó PFA al 2%. Para determinar el número total de mastocitos y el número total de mastocitos degranulados se tiñeron las células con violeta de cresilo al 1% durante 5 minutos, para detectar los gránulos por metacromasia, y se montaron con glicerol al 50% en PBS.

Para la detección de antígenos por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa y para la histoquímica con la lectina IB4, el bloqueo de uniones inespecíficas se realizó mediante la incubación en tampón bloqueo (suero de cabra al 10% [NGS), Triton X-100 al 0,2% y glicina al 0,5% en PB, excepto en el caso de detección mediante peroxidasa) durante 30 min. A continuación, los cubres o los insertos con las muestras se incubaron con el anticuerpo primario de interés (Tabla 1; Anexo) y/o la lectina IB4 acoplada a biotina (10µg/ml; Sigma), preparado en tampón bloqueo, durante toda la noche. En el caso de la inmunodetección de la N-cadherina, se incubaron las muestras 5 min. en tampón bloqueo con Triton-X-100 al 0,3% y durante el resto del protocolo no se utilizaron detergentes. Para el análisis de los co-cultivos de neuronas disociadas y las BMMCs, las inmunodetecciones se realizaron con peroxidasa utilizando el método del ABC. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se incubaron los cortes con anticuerpos secundarios apropiados acoplados a biotina (Tabla 2; Anexo) seguido del complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector) como se ha explicado anteriormente. Tras varios lavados en PB los cortes se incubaron en diaminobenzidina (DAB) (Sigma) al 0,02% y H₂O₂ (Panreac) al 0,01% en PB, hasta que se observó el marcaje deseado. Posteriormente se tiñeron las células con violeta de cresilo al 1% durante 5 minutos y se lavaron, se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente y se montaron con Eukitt. Para las inmunofluorescencias, después de la incubación con el anticuerpo primario y tras varios lavados, las muestras se incubaron 45 min. con el anticuerpo secundario apropiado en tampón bloqueo (Tabla 2; Anexo). Dado que la heparina que expresan los mastocitos posee una alta afinidad por la avidina y la estreptavidina (Bussolati y Gugliota, 1983) las BMMCs se marcaron directamente con estreptavidina acoplada al fluoróforo Cy3 (1:200; Jackson Inmunochemicals). Finalmente los cubreobjetos y los insertos se lavaron varias veces en PB, se tiñeron con DAPI o TOPRO-3 y se montaron con *Prolong-Gold*[®] (Molecular Probes). Para montar las muestras sembradas sobre insertos, se recortó la membrana porosa con un bisturí, se colocó cuidadosamente sobre un portaobjetos y, tras aplicar una gota del medio de montaje, se cubrió con un cubreobjetos de cristal. Los marcajes fueron analizados mediante microscopía de fluorescencia convencional o mediante microscopía confocal, tal como se ha explicado previamente.

6. Análisis morfométrico y estereología.

6.1. Recuentos neuronales.

El número total de neuronas se determinó en tres DRGs diferentes: torácico (T) 1, lumbar (L) 1 y L4. Para ello se realizaron series de cortes de 7 µm consecutivos a partir de bloques de parafina conteniendo embriones completos o las regiones lumbares de animales neonatos y postnatales y se tiñeron con la tinción de Nissl usando violeta de cresilo. Después de mapear de forma completa cada uno de los ganglios en todos los cortes en los que se encontraba contenido se contaron las neuronas presentes en una de cada cuatro secciones para estimar el número total presente en el ganglio. En los estadios E15, P0 y P15 las neuronas se identificaron usando criterios morfológicos, de forma que, para no sobreestimar su número, únicamente se tuvieron en cuenta aquellas que presentaban nucleolos claramente visibles. En

el estadio E12, las neuronas no pueden ser identificadas basándose únicamente en su morfología por lo que se realizaron inmunotinciones (tal como se ha indicado antes) con anticuerpos anti-neurofilamento (subunidad 150 kDa, NF 150), que en estas estructuras funciona como un marcador muy temprano de diferenciación neuronal. Para calcular el volumen total del ganglio se midieron las áreas de las secciones contadas y se estimó el volumen aplicando la fórmula de Cavalieri.

6.2. Recuentos de fibras nerviosas al microscopio óptico.

Para los recuentos de fibras mielínicas y amielínicas se utilizaron la raíz dorsal de los ganglios L3 y L5 así como los correspondientes nervios raquídeos, además del nervio ciático, el nervio sáveno y los nervios digitales de animales P15 las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica. Para los recuentos de fibras mielínicas se obtuvieron secciones transversales al nervio de 1µm de grosor mediante un ultramicrotomo Reichert Ultracut E, se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se determinó el número total de axones utilizando el programa CAST-GRID *software package* (Olympus, Denmark) adaptado a un microscopio Olympus BX51.

6.3. Recuentos de fibras nerviosas al microscopio electrónico.

Para los recuentos de las fibras amielínicas se utilizaron secciones de 60 nm de grosor que se contrastaron con citrato de plomo y se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010F. Para estimar el número total de fibras amielínicas en cada nervio, se obtuvieron microfotografías a 5200X al azar hasta cubrir una superficie igual para cada muestra y luego se refirió el número obtenido en cada caso a la superficie total del nervio en cuestión. Para calcular el área de los axones amielínicos se dibujaron las secciones transversales de los axones en papel de acetato. Estos dibujos fueron analizados mediante las aplicaciones IPTK4 de análisis de imagen del programa Adobe Photoshop 7.0, obteniéndose los valores de las áreas.

La piel de las almohadillas plantares de animales de ambos genotipos, se incluyó en resina como se describe anteriormente y se obtuvieron cortes semifinos seriados de 2 µm de grosor que se tiñeron con azul de toluidina-bórax al 1% para su observación al microscopio óptico. Se fotografiaron las regiones de interés y estos semifinos se arrancaron del portaobjetos mediante un choque térmico, usando una plancha metálica enfriada previamente con nitrógeno líquido, después de pegar un bloque de araldita polimerizada sobre el corte. Una vez separado el semifino del portaobjetos se retalló la región de interés y se obtuvieron cortes ultrafinos de 60 nm de grosor que fueron contrastados con plomo, observados y fotografiados a diferentes magnificaciones con el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010F.

6.4. Análisis morfométrico de estructuras.

El análisis morfométrico de las áreas y fracción de áreas se realizó en cortes de criostato de 10 µm de médulas de ratones postnatales fijados en PFA al 4% en PB. Mediante inmunofluorescencia se marcaron las medulas espinales con anticuerpos anti-Tuj1, un marcador del citoesqueleto neuronal tal y como se describe anteriormente. La fluorescencia

convencional fue visualizada con un microscopio vertical Nikon E600 (Nikon, Japón), se capturaron imágenes con una cámara digital Nikon DM1200 y el estudio fue realizado mediante las aplicaciones IPTK4 de análisis de imagen del programa Adobe Photoshop 7.0. Las imágenes fueron capturadas con objetivo de 10x en formato 512 x 512, con 8 bits de resolución por pixel.

6.5. Análisis morfométrico de neuritas.

Los análisis de arborización neurítica se realizaron a partir de cultivos de neuronas sensoriales disociadas sembradas sobre colágeno y fijadas a las 48 horas *in vitro* con PFA al 4% en PB. Mediante inmunofluorescencia se marcaron las neuronas con anticuerpos anti-Tuj1, un marcador del citoesqueleto neuronal. Se tomaron imágenes de neuronas a 20x y se dibujaron en papel de acetato las neuritas y las ramificaciones de, al menos, 100 neuronas por condición. Estos dibujos fueron analizados mediante las aplicaciones IPTK4 de análisis de imagen del programa Adobe Photoshop 7.0, obteniéndose los valores del número medio de neuritas y ramificaciones por neurona.

7. Medida del flujo intracelular de Ca²⁺.

El flujo intracelular de Ca²⁺ se determinó usando la sonda fluorescente fura-2 acetoximetil ester (AM) (Molecular Probes) siguiendo la metodología descrita por (McNaughton y Preece, 1986). Las neuronas sensoriales se sembraron en cubreobjetos pre-tratados con ornitina/laminina, como se describe previamente, y se mantuvieron durante 5 DIV. Transcurrido este tiempo se incubaron con Fura-2 AM 5 μ M en pH 7,4 (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 10 mM y glucosa 5 mM) suplementado con 0,025% ácido plurónico (Molecular Probes) durante 1 hora a 37 °C en el incubador de CO₂. A continuación las células se lavaron 3 veces con tampón Tyrode/Hepes y los cubreobjetos se transfirieron a una cámara de perfusión instalada en la platina de un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Diaphot, equipado con una cámara digital. Mediante un sistema de perfusión constante por gravedad, las muestras se perfundieron con tampón Tyrode/Hepes, se les administró una solución de capsaicina (300 nM) durante 30 segundos y se lavaron otra vez con el mismo tampón. Dado que la solución *stock* de capsaicina se prepara en DMSO, se añadió la misma concentración final de DMSO al tampón Tyrode/Hepes que usamos para la perfusión sin tratamiento. Al final de cada experimento se perfundieron las neuronas con una solución de KCl 100mM como control positivo del flujo del Ca²⁺ tras la despolarización de la membrana celular. Los datos de emisión de fluorescencia a 520 nm se registraron mediante el sistema de monitorización de fluorescencia Aquacosmos *software*, en respuesta a una excitación a 340 nm (Ca²⁺ marcado) y a 380 nm (Ca²⁺ libre). La relación F_{340}/F_{380} se adquirió antes, durante y después de los tratamientos a intervalos de tiempo de 1 segundo. Estas determinaciones se realizaron en el laboratorio de la Dra. Rosa Panells en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia.

8. Inmunodetección de proteínas mediante *western blot*.

8.1. Extracción de proteína total.

Para las determinaciones proteicas se sembraron explantes de DRGs y BMMCs en placas, se cultivaron durante 6 y 3 DIV respectivamente su medio estándar y se recogieron tras varios lavados con PBS frío. A continuación se incubaron las muestras en tampón de lisis (50 mM Tris pH 8, SDS 1% y EDTA 10 mM) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (ortovanadato sódico a 1 mM, fluoruro sódico a 1 mM, PMSF a 1 mM, aprotinina a 10 µg/ml y leupeptina a 10 µg/ml) a 4 °C durante 30 minutos, para asegurar la lisis total de las células. Los lisados de las muestras se sometieron a ultrasonidos 10 veces durante 30 segundos en un Bioruptor (Cosmo Bio Co.) para reducir la viscosidad de la muestra debida al DNA. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford modificado (*BCA Protein Assay Kit*[®]; Pierce) usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. A la misma cantidad de proteína (30 µg) por muestra se le añadió un volumen adecuado de tampón de carga 4x (Tris-HCl a 625 mM, pH 6,8, con glicerol al 10 %, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 4% y azul de bromofenol al 0,025%), desnaturalizada por ebullición durante 5 minutos.

8.2. Electroforesis y transferencia a membrana.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Pronadisa) al 8-10% en docecilsulfato sódico (SDS), utilizando el sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad) bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, a un amperaje constante de 25 mA/gel. El tampón de electroforesis utilizado constó de glicina (Sigma) a 0,2 M, Trizma base (Sigma) a 25 mM y SDS al 1% (Sigma). Se utilizó un marcador pre-teñido de pesos moleculares en el rango adecuado (13-220 kDa; Bio-Rad). Los geles se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences), utilizando tampón de transferencia (Tris-HCl a 25 mM, pH 8.3, metanol al 20% y glicina a 192 mM) en un sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad). La eficiencia de la transferencia se analizó mediante tinción de la membrana con rojo Ponceau (al 0,5% en ácido acético glacial al 1%).

8.3. Bloqueo de membranas e incubación con anticuerpos.

Las membranas fueron bloqueadas en leche desnatada en polvo al 5% en Tris-base salino (TBS: Tris-base a 0,1 M, pH 7,5, con NaCl al 0,9%) con detergente Tween-20 (Sigma) al 0,1% (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios a las diluciones adecuadas (ver Tabla) en TBS-T, durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces en TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios adecuados acoplados a peroxidasa (ver Tabla). Tras varios lavados en TBS-T se detectaron las bandas de proteína mediante quimioluminiscencia, incubando las membranas durante 5 minutos con Lumigen TMA-6 (Amersham Pharmacia) y capturando la luminiscencia en un documentador de geles Kodak EL LOGIG 440 Imaging System (Kodak; Japón) hasta la detección óptima de la señal. Las intensidades de las bandas individuales se cuantificaron mediante el programa Molecular Imaging (Kodak). Los niveles de expresión de las proteínas

analizadas en nuestros estudios se normalizaron con respecto a los de la β -actina de las mismas muestras.

9. Análisis de la expresión de ARNs mensajeros.

9.1. Extracción de RNA total y retro-transcripción.

Para el análisis de la expresión de ARNs mensajeros en tejido se recogieron cantidades equivalentes de piel y DRGs de animales postnatales de diferentes edades (P0, P7 y P15) y se aisló el RNA mediante la técnica del fenol/cloroformo usando Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) para la extracción seguido de isopropanol para la precipitación del mismo. El RNA resultante se resuspendió en 100 μ l de ddH₂O libre de ARNasas. Los ARNs totales de los explantes y los BMMCs se extrajeron mediante el *kit* de extracción *Rneasy Mini Kit*[®] (Qiagen; Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello se recolectaron aproximadamente 1×10^6 BMMCs y unos 20 explantes de DRGs cultivados durante 6DIV y el RNA obtenido se resuspendió en 15 μ l de ddH₂O libre de ARNasas. En ambos procedimientos se cuantificó el RNA total mediante espectrofotometría, y únicamente aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 > 1,6 se emplearon para el análisis. Los ARNs totales se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Para la retro-transcripción a ADNc se partió de 1-2 μ g de RNA total, 3 μ g/ μ l de hexanucleótidos al azar (Invitrogen; USA) y 200 U de la transcriptasa reversa SuperScript II RT (Invitrogen), en un volumen de reacción de 20-30 μ l y en presencia de tampón *first strand* (Tris-HCl a 50 mM, KCl a 75 mM, Mg₂Cl a 3 mM) con DTT a 5 mM y 0,25 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia). La reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 50 min. seguido de 15 min. a 70 °C. En todos los casos se incluyeron duplicados de las muestras sin transcriptasa reversa (RT-) para usar posteriormente como control de la amplificación del DNA.

9.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los análisis por PCR para determinar la expresión de distintos genes se realizaron en un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Alemania). Se usó 1 μ l de ADNc en un volumen de reacción de 20 μ l conteniendo Tris-HCl a 4 mM, KCl a 20 mM, EDTA a 20 μ M, DTT a 200 μ M, dNTPs 0,25 mM (Amersham Pharmacia), cebadores a 0,25 μ M (Sigma-Genosys; Anexo II) y 1 U de Taq polimerasa (Promega). Los pares de oligonucleótidos específicos utilizados como cebadores se diseñaron usando los programas Gene Runner y Primer Express 2.0 y su secuencia es la siguiente:

Ngf

cebador directo: 5'-GATCGGCGTACAGG CAGAAC

cebador inverso: 5'-CAGTGGGCTTCAGGGACAGA

TrkB

cebador directo: 5'- GCGAACCTGCAGATACCCAAT

cebador inverso: 5'- CCAAATCCCAACGTCCCA

Materiales y métodos

Mmp24

cebador directo: 5'-TGATTCAGATGAACCCTGGA

cebador inverso: 5'-AAGGGAGCCATGATAGCACT

β-actin 59 °C

cebador directo: 5'-CCGGGACCTGACAG ACTACCT

cebador inverso: 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA

Después de una desnaturalización inicial, se efectuaron los ciclos de amplificación correspondientes a cada pareja de cebadores: *Ngf*, 59 °C - 34 ciclos; *Mmp24*, 57 °C - 40 ciclos; *TrkB*, 56°C - 35 ciclos; *β-actina*, 59 °C - 20 ciclos. El tamaño de cada producto de amplificación se resolvió mediante agarosa al 2% preparado en tampón Tris-borato-EDTA (TBE: Tris a 89 mM, PH 8,0 ácido bórico a 89 mM y EDTA a 2mM) con 10 µg/ml de bromuro de etidio. Como tampón de carga, se utilizó glicerol al 50%, azul de bromofenol al 0,05%, cianol de xileno al 0,05% y EDTA a 100 mM. Los transcritos de *Ngf* fueron cuantificados mediante análisis densitométrico en un documentador de geles Kodak EL LOGIG 440 Imaging System (Kodak; Japón) hasta la detección óptima de la señal. Las intensidades de las bandas individuales se cuantificaron mediante el programa Molecular Imaging (Kodak). Los niveles de expresión de las proteínas analizadas en nuestros estudios se normalizaron con respecto a los de la *β-actina* de las mismas muestras.

9.3. PCR en tiempo real o cuantitativa (RT-PCR).

Los niveles de expresión de los RNA mensajeros se evaluaron utilizando reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real desde DNA complementario generado por transcripción en reverso (RT-PCR) a partir de RNA total extraído de los distintos tejidos o células. Para estos estudios, los distintos RNA celulares fueron extraídos con Trizol como se ha explicado anteriormente. Las muestras se trataron con ADNasa-I siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se comprobó la integridad y se determinó la concentración del RNA por espectrofotometría y electroforesis en minigeles de agarosa al 1%. El ADNc se sintetizó a partir de 3 µg de RNA total como ya se ha explicado. La especificidad de los oligonucleótidos cebadores se comprobó en un termociclador estándar (*Perkin Elmer*). Para las PCRs cuantitativas se utilizó una solución 1/5 de ADNc en un volumen final de 26 µl de mezcla de reacción consistente en 12,5 µl de QuantiTect SYBR Green PCR master mix (*Molecular Probes*), 0,3 µM de la correspondiente pareja de oligonucleótidos cebadores (*Invitrogen*), 11 µl de ddH₂O y 1µl de la muestra de ADNc. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, incluyendo siempre controles negativos de la reacción y se cuantificó simultáneamente la expresión del ARNm de la beta-actina de cada muestra como control interno. Los pares de oligonucleótidos específicos utilizados como cebadores se diseñaron usando los programas Gene Runner y Primer Express 2.0 y su secuencia es la siguiente:

Ngf

cebador directo: 5'-GATCGGCGTACAGGCAGAAC

cebador inverso: 5'-CAGTGGGCTTCAGGGACAGA

Gdnf

cebador directo: 5'-AGCCACCATTAAGACTGAAAAGG

cebador inverso: 5'-CCTGCCGATTCCTCTCTCTTC

Bdnf

cebador directo: 5'-CCAAAGGCCAACTGAAGCAGTA

cebador inverso: 5'-GCAGCCTTCCTTGGTGTAACC

β-actina 60 °C

cebador directo: 5'-CGGGACCTGACAGACTACCTCAT

cebador inverso: 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG

β-actin 59 °C

cebador directo: 5'-CCGGGACCTGACAGACTACCT

cebador inverso: 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA

Para todas las parejas de cebadores se utilizaron las mismas condiciones de PCR, que son las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 50 °C durante 2 min. y a 95 °C durante 10 min. seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 95 °C 30 s, hibridación a 60 °C (BDNF) o 59°C (NGF y GDNF) durante 45 s y una primera elongación de 1 min. a 72 °C. Al finalizar los 35 ciclos, 15 s a 85 °C con adquisición de la fluorescencia del SYBR *Green* en este paso y una elongación final de 2 min. a 72 °C. La especificidad y ausencia de contaminaciones se verificó tanto por las curvas de desnaturalización como por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. En todos los experimentos se incluyó un control negativo de reacción y para determinar la concentración relativa del transcrito, en todas las reacciones se estableció una curva estándar con duplicados de diluciones seriadas de DNA genómico purificado de tejido de ratón. Todas las muestras, los controles negativos, la curva estándar y los controles internos fueron analizados por triplicado y simultáneamente para cada pareja de cebadores. La reproducibilidad de los resultados se confirmó analizando dos reacciones PCR por cada experimento. La cuantificación de los productos se basó en el registro de la fluorescencia del SYBR *Green* durante la fase exponencial de amplificación en un termociclador ABI PRISM 7700 *sequence detection system* (Applied Biosystems) para PCR en tiempo real, y la subsiguiente determinación del ciclo de PCR en el cual el producto amplificado sobrepasó un umbral determinado (llamado *Ct* o *crossing threshold*). El análisis del nivel de expresión de cada factor neurotrófico se realizó con el programa ABI Prism 7000 SDS Software y se normalizó con las cuantificaciones de la *β-actina*. Los datos así estandarizados se usaron para calcular diferencias en la expresión de los distintos genes estudiados.

10. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se han realizado con el programa informático SPSS versión 12.0 para Windows (*Statistical Product and Service Solutions*, SPSS Inc., USA). Para poder aplicar un test de tipo paramétrico a los valores absolutos, se determinó primero si se distribuían de forma normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1995) y se testó la homogeneidad de varianzas mediante el Test de Levene. Para determinar la significación de las diferencias entre las medias de los grupos se usó la prueba de la t de Student. En el caso de las comparaciones entre valores relativos se llevó a cabo la transformación arcsen (raíz (valor)) antes de aplicar el test de la t (Sokal y Rohlf, 1995). En el conjunto de los análisis los valores $P < 0.05$ se han considerado estadísticamente significativos. Todos los valores obtenidos se han expresado como la media \pm error estándar de la media (SEM), en los diferentes grupos descritos. Se ha representado $P < 0.05$ como *, $P < 0.01$ como **, y $P < 0.001$ como ***.

11. Anexo.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica o inmunocitoquímica.

Antígeno	Tipo(*)	Dilución IH/IC	Procedencia
β -catenina	prAc	1:100	Cell Signaling
Calbindina	prAc	1:2000	Swant
Calretinina	prAc	1:250	Swant
CGRP	prAc	1:500	Amersham
CGRP	pgAc	1:500	Abcam
MMP-MT5	prAc	1:15	R&D systems
MMP-MT5	pgAc	1:25	Santa Cruz
N-cadherin	mAc	1:200	BD Traduction
NeuN	mAc	1:500	Chemicon
NF-150	mAc	1:100	Hybridoma Bank
PGP 9.5	prAc	1:500	Ultraclone
S100- β	prAc	1:1000	Sigma
TH	prAc	1:300	Pel-Freez
TrkB	pckAc	1:10	Promega
Tuj1	mAc	1:300	Covance
Tuj1	prAc	1:300/1:500	Sigma
VR1 C-ter	prAc	1:1000	Neuromics

(*) Abreviaturas:

mAc: Anticuerpo monoclonal generado en ratón (IgG)

pckAc: Anticuerpo policlonal generado en pollo (IgY)

pgAc: Anticuerpo policlonal generado en cabra (IgG)

prAc: Anticuerpo policlonal generado en conejo (IgG)

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para inmunodetección de proteínas por Western-blot.

Antígeno	Tipo(*)	Dilución IH/IC	Procedencia
β -actina	mAc	1:5000	Sigma
β -catenina	prAc	1:1000	Cell Signaling
N-cadherin	mAc	1:1000	BD Traduction
VR1 C-ter	prAc	1:1000	Neuromics

Tabla 3. Anticuerpos secundarios.

Antígeno	Tipo(*)	Dilución IH/IC/IB	Procedencia
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Ratón	1:700	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Conejo	1:700	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-IgG	Cabra	1:700	Molecular Probes
HRP-anti-IgG	Ratón	1:300/1:5000	Chemicon
HRP-anti-IgG	Conejo	1:1000	Amersham
Biotinilado anti-IgG	Ratón	1:300	Vector
Biotinilado anti-IgG	Conejo	1:300	Vector
Biotinilado anti-IgY	Chicken	1:300	Promega
Cy TM 3 anti-IgG	Ratón	1:1500	Jackson IR Labs
Cy TM 3 anti-IgG	Conejo	1:1500	Jackson IR Labs
Cy TM 3 Streptoavidina	-	1:200	Jackson IR Labs
Cy TM 2 Streptoavidina	-	1:200	Jackson IR Labs

1. El BDNF es un factor neurotrófico esencial para la supervivencia de las neuronas nociceptivas y la regulación de su heterogeneidad

1.1. Caracterización de las poblaciones de neuronas sensoriales que dependen de BDNF in vivo

Establecimiento del periodo de dependencia trófica del BDNF de las neuronas sensoriales de los DRGs

El recuento de neuronas presentes en los ganglios lumbares L1 y L4/5 de los animales *Bdnf^{+/+}* y *Bdnf^{-/-}* durante el desarrollo embrionario y postnatal (Tabla 2) muestran que en esta cepa de ratones mutantes para *Bdnf* no existe pérdida aparente en el número de neuronas en ninguno de los estadios analizados hasta el momento del nacimiento. Sin embargo, la pérdida es evidente en el día postnatal (P) 15 momento en el que se observa una disminución del 38% de las neuronas en el mutante nulo de BDNF (*Bdnf^{+/+}* 8215 ± 1246, n = 3; *Bdnf^{-/-}* 5071 ± 301, n = 4; p < 0,05). Por lo tanto, podemos concluir que la pérdida neuronal en los ratones mutantes de BDNF es postnatal. Dada la escasa viabilidad de los ratones deficientes en BDNF que sobreviven, en el mejor de los casos, sólo hasta los 20-25 días tras el nacimiento, no ha sido posible analizar un número suficiente de animales mutantes de más de 15 días. Es por ello que no podemos concluir si el déficit que describimos es completo o si más neuronas se perderían en animales deficientes para BDNF de más edad. Para realizar estudios en animales adultos será necesaria la generación de mutantes nulos condicionales en los cuales se elimine el gen de manera específica en los ganglios sin comprometer la viabilidad del organismo.

		E12	E15	P0	P15
L1 DRG	<i>BDNF^{+/+}</i>	2510 ± 227 (6)	5642 ± 457 (4)	6379 ± 460 (5)	
	<i>BDNF^{-/-}</i>	2470 ± 266 (2)	5432 ± 557 (3)	5814 ± 90 (5)	
L4 DRG	<i>BDNF^{+/+}</i>			10099 ± 137 (3)	8215 ± 1246 (3)
	<i>BDNF^{-/-}</i>			10234 ± 1311 (3)	5077 ± 301 (4)
	% reduction	n.s.	n.s.	n.s.	38*

Tabla 2. Recuentos neuronales en los DRGs de ratones *BDNF^{+/+}* y *BDNF^{-/-}*.

Recuentos neuronales en series de secciones de los DRGs L1 y L4, de ratones de genotipo salvaje (*BDNF^{+/+}*) y mutante (*BDNF^{-/-}*). En E12, los números totales de neuronas, se calcularon mediante el recuento de las células marcadas positivamente con el anticuerpo anti-neurofilamento. En el resto de estadios, se contaron las neuronas identificadas con violeta de cresilo (ver Fariñas et al., 1996). El número de animales individuales analizados en cada caso está indicado en paréntesis. Datos representados como media ± s.e.m. * p<0.05; n.s. no significativo.

Resultados

Caracterización de las neuronas perdidas en ausencia de BDNF

Las neuronas de los DRGs son de tipo pseudounipolar con una neurita que se bifurca muy cerca del soma en dos ramas, la periférica y la central. La fibra periférica proyecta a distintas zonas del organismo (músculo, piel, vísceras), en las que termina bien como terminación libre no encapsulada o bien como terminación que forma parte de receptores sensoriales especializados, estructuras encapsuladas más o menos complejas que transducen estímulos sensoriales específicos. La fibra central termina en capas concretas de la médula espinal y transmite la información sensorial periférica al sistema nervioso central. Las neuronas sensoriales maduras de los DRGs constituyen una población heterogénea en cuanto al tamaño de sus somas y al diámetro de sus fibras y consiguiente grado de mielinización, fenotipo neuroquímico, propiedades fisiológicas como la velocidad de conducción o la modalidad sensorial, receptor sensorial que inervan en la periferia, área de proyección en el sistema nervioso central, etc. (ver revisiones en Scott, 1992). Es posible utilizar estos criterios de clasificación para averiguar qué poblaciones concretas de neuronas se pierden en ausencia de un determinado factor trófico, aunque la dificultad estriba en que existe un considerable grado de solapamiento entre las distintas poblaciones.

a Neuronas con fibras mielínicas

La presencia de una vaina de mielina alrededor de las fibras de muchas de las neuronas sensoriales hace posible su recuento a nivel de microscopía óptica, en cortes transversales de 1-2 μm obtenidos a partir de nervios incluidos en resinas epoxi y teñidos con azul de toluidina (ver Figura 12).

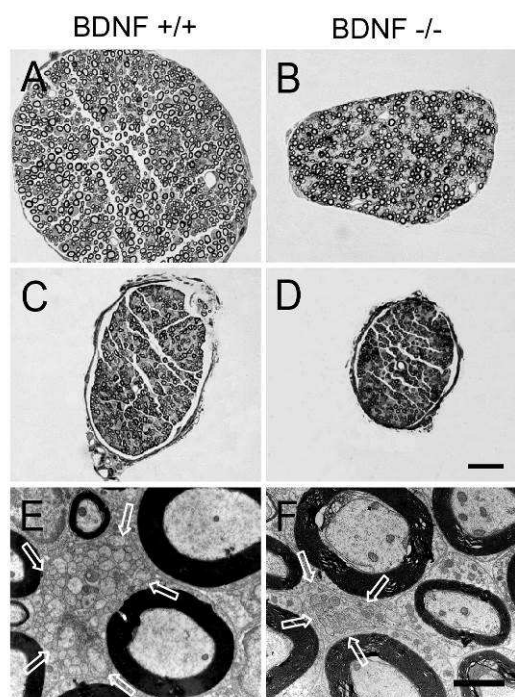


Figura 12. Pérdida de fibras mielínicas y amielínicas en las raíces dorsales y nervios safenos.

Secciones transversales de los nervios periféricos de BDNF^{+/+} (A, C, E) y BDNF^{-/-} (B, D, F) fotografiadas en el microscopio óptico (AD) y electrónico (E, F). (A, B) Secciones transversales de las raíces dorsales L5 de ratones BDNF^{+/+} y BDNF^{-/-}. Se pueden distinguir fácilmente los contornos de las fibras mielínicas al microscopio óptico, debido a la intensa tinción de la vaina de mielina. Se puede observar una clara reducción en el área en la raíz del mutante. (C, D) Secciones transversales de los nervios safenos de ratones BDNF^{+/+} y BDNF^{-/-}. El nervio safeno es un nervio puramente cutáneo que inerva la piel pilosa de mitad de la pantorrilla. Se puede observar una reducción en el área de la sección transversal similar a la encontrada en raíces dorsales. (E, F) Micrografías electrónicas de las secciones transversales de las raíces dorsales L5 de ratones BDNF^{+/+} y BDNF^{-/-}. Las fibras amielínicas se encuentran en paquetes (flechas) entremezcladas con fibras mielinizadas de diferente calibre. Se puede destacar que los paquetes incluyen un menor número de fibras en el animal mutante. Las pérdidas de axones mielínicos y no mielínicos (ver Tabla 2), contribuyen a la reducción de tamaño observada en las secciones transversales de las raíces dorsales de los ratones mutantes para BDNF. Barras de escala: A-D 25 μm , E y F ampliación x 5.200.

Estos recuentos sólo pueden realizarse una vez finalizado el periodo de mielinización en el sistema nervioso periférico que, en el ratón, es de unos diez días (observaciones propias no publicadas).

En concreto, realizamos recuentos de fibras mielínicas correspondientes a los ganglios L3 y L5 en animales de P15, tanto en la raíz dorsal, que contiene las fibras centrales que se dirigen hacia el asta dorsal de la médula espinal, como en el nervio raquídeo, que contiene las fibras periféricas. Los recuentos en los animales *Bdnf*^{-/-} muestran una reducción del 32-36% en las raíces dorsales (Tabla 2; Figura 12A y B) y del 32% en los nervios sáfenos con respecto a los animales *Bdnf*^{+/+} (Tabla 2; Figura 12C y D).

Una deficiencia en fibras mielínicas puede resultar de la pérdida de diversos tipos de neuronas sensoriales. Los músculos y la piel son las áreas periféricas más inervadas por las neuronas de los DRGs. Algunas neuronas sensoriales que tienen fibras mielínicas y que proyectan a los músculos y a los tendones, son propioceptores. Estas neuronas son algunas de las de mayor calibre y poseen fibras de tipo A α con una gruesa vaina de mielina. Estas neuronas son las responsables de inervar los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi y dependen de la señalización de NT-3 a través de TrkC (Fariñas et al., 1994; Enfors et al, 1994; Klein et al, 1994; Tojo et al, 1995; Tessarollo et al, 1994, 1997). En estudios previos de la cepa de mutantes para BDNF utilizada aquí ya se había comprobado que el número de husos neuromusculares en los músculos de las patas en los mutantes no difería del encontrado en los animales de genotipo salvaje (Jones et al., 1994). Dado que el desarrollo y diferenciación de estos receptores sensoriales musculares es absolutamente dependiente de la inervación sensorial, la presencia de un número normal de ellos en animales que carecen de BDNF es una demostración de que las neuronas propioceptivas, con fibras A α no se pierden en ausencia de esta neurotrofina.

Si excluimos la población de neuronas propioceptivas, la mayoría de neuronas con fibras mielínicas restantes pertenecen a un gran grupo heterogéneo de neuronas sensoriales que inervan la piel y que poseen fibras A β o A δ . La mayoría de las neuronas con fibras mielínicas son de tamaño intermedio (fibras A β). Se cree que estas neuronas inervan mecanorreceptores cutáneos, como los corpúsculos de Meissner, de Paccini, folículos pilosos y las células de Merkel, especializados en proporcionar información al sistema nervioso central acerca del tacto, presión, vibración y tensión en la piel (ver, por ejemplo, Koltzenburg et al., 1997). Por otro lado, las de menor calibre entre las mielínicas (fibras A δ), correspondientes, entre otros, a nociceptores polimodales, especialmente termorreceptores, que terminan de forma libre en los territorios que inervan (ver revisiones en Scott, 1992). Los datos previos y nuestras determinaciones de la distribución por tamaños de fibras mielínicas parecen indicar que la deficiencia observada en animales mutantes para BDNF afecta probablemente a neuronas sensoriales de proyección cutánea de tamaño medio a medio-pequeño. En este sentido, ya se había descrito que una subpoblación de neuronas sensoriales de tamaño medio expresaban el

Resultados

receptor *TrkB* (Enfors et al., 1992; Schecterson et al., 1992; Mu et al., 1993) mediante técnicas de hibridación *in situ*.

b Neuronas con fibras amielínicas

Nuestros recuentos a nivel de microscopía óptica no tienen en cuenta posibles efectos sobre una fracción importante de las neuronas los DRGs, aquellas cuyas fibras son de muy pequeño calibre y no están mielinizadas (fibras C) y que, por tanto, sólo son visibles a nivel de microscopía electrónica. Estas neuronas, en su mayoría nociceptivas, constituyen, aproximadamente, el 60% de las neuronas en el ganglio. Por tanto, dado que la reducción en el número de fibras mielínicas observada en los nervios mutantes coincide con la reducción en el número de cuerpos celulares perdidos en los ganglios de ratones mutantes para BDNF, es lógico suponer que en los mutantes se produce también una pérdida de neuronas con fibras amielínicas. Por este motivo estudiamos las raíces dorsales del ganglio L5 de animales de P15 con microscopía electrónica (Figura 12E y F).

	<i>BDNF</i> ^{+/+}	<i>BDNF</i> ^{-/-}	% pérdida
Fibras mielínicas			
Raíz dorsal L3	1473 ± 42	987 ± 89	32*
Raíz dorsal L5	2490 ± 108	1600 ± 39	36*
Nervio sáveno (piel pilosa)	545 ± 29	386 ± 27	29*
Nervio digital (piel pilosa)	40 ± 2	32 ± 2	18*
Nervio digital (piel glabra)	63 ± 4	44 ± 8	29*
Fibras amielínicas			
Raíz dorsal L5	6516 ± 830	3313 ± 339	49*
Nervio sáveno	5787 ± 624	2791 ± 329	48*

Tabla 3. Recuentos de fibras mielínicas y amielínicas en los DRGs y en diferentes nervios periféricos de ratones P15 *BDNF*^{+/+} and *BDNF*^{-/-}. Recuentos de fibras mielínicas en cortes transversales del nervio, de 1 µm de grosor, teñidos con azul de toluidina. Las fibras amielínicas se cuantificaron en micrografías electrónicas. En cada caso se analizaron tres animales independientes. Datos presentados como media ± s.e.m. * p<0.05

Cualitativamente, el aspecto de las fibras amielínicas observadas en cortes ultrafinos obtenidos a partir de nervios de animales *Bdnf*^{-/-} era diferente al de los nervios control. Observamos que los paquetes de fibras amielínicas se ven reducidos en su tamaño mientras que el área media de cada fibra no presenta ninguna diferencia (Figura 12E, F) si se comparan control y mutante nulo (*Bdnf*^{+/+}: 0.130 ± 0.025; *Bdnf*^{-/-}: 0.140 ± 0.014 µm²). Los recuentos de fibras amielínicas muestran que en la misma raíz dorsal donde faltaba el 36% de las fibras

mielínicas, se producía además una pérdida (49%) de fibras amielínicas (Tabla 3, Figura 12E, F).

Estas observaciones demuestran que en animales mutantes nulos para BDNF se pierden tanto neuronas sensoriales con fibras mielínicas como con fibras amielínicas de tipo C.

Neuronas sensoriales cutáneas de proyección a la piel glabra y a la piel pilosa

Los ganglios analizados en este estudio (L3-L5) son especialmente favorables para el estudio de neuronas sensoriales cutáneas porque inervan las extremidades posteriores, donde se encuentran tanto territorios de piel pilosa, a lo largo de la extremidad, como territorios de piel glabra, sin pelo, en las almohadillas plantares. Dado que los diferentes tipos de piel poseen diferentes combinaciones de receptores cutáneos, quisimos averiguar si existían diferencias en el número de fibras mielínicas que inervaban la piel glabra y la pilosa. Para resolver esta cuestión decidimos estudiar las proyecciones a la piel en dos nervios diferentes de la extremidad trasera, el nervio sáveno, puramente cutáneo piloso, y ramas específicas del nervio ciático que inervan selectivamente la piel pilosa o la glabra. Debido a la ausencia de un atlas anatómico de ratón suficientemente exhaustivo como para incluir en detalle los patrones de inervación, realizamos disecciones finas de todo el árbol nervioso desde los ganglios lumbares L3-L6 hasta el extremo de la pata, identificando todas las ramas por comparación con las identificadas en otras especies, como la rata (Hebel y Stromberg, 1976) y el humano (Figura 13).

El nervio ciático, compuesto por fibras procedentes de los ganglios L4, L5 y L6 (ver Figura 13), recorre la parte dorsal interna de la extremidad posterior y da lugar tanto a nervios musculares como a nervios cutáneos a la piel glabra y a la piel pilosa de la pata. Hemos estudiado cual sería la pérdida de los axones si nos acercamos a las ramas más distales, como son las del nervio digital. En la pata trasera del ratón existen dos nervios digitales que recorren el empeine e inervan la piel pilosa y dos nervios digitales que recorren la planta e inervan la piel glabra de las almohadillas plantares.

Los recuentos de fibras mielínicas en cortes transversales a nivel de estos nervios revelan que los nervios digitales que inervan la piel pilosa de los mutantes de BDNF poseen un déficit de, aproximadamente, el 30% (Tabla 2; Figura 13). Por lo tanto, podemos concluir que la pérdida original en el número de fibras mielínicas que observábamos en los nervios raquídeos de los ganglios L3 y L5 se mantiene a lo largo de los principales nervios cutáneos y de sus correspondientes ramificaciones terminales, ya se dirijan a la piel pilosa o no pilosa.

Especialmente interesante es el nervio sáveno (ver Figura 13) que recibe sus aferencias de neuronas de los ganglios L2, L3 y L4 e inerva exclusivamente un área de la piel pilosa a una altura media de la pantorrilla.

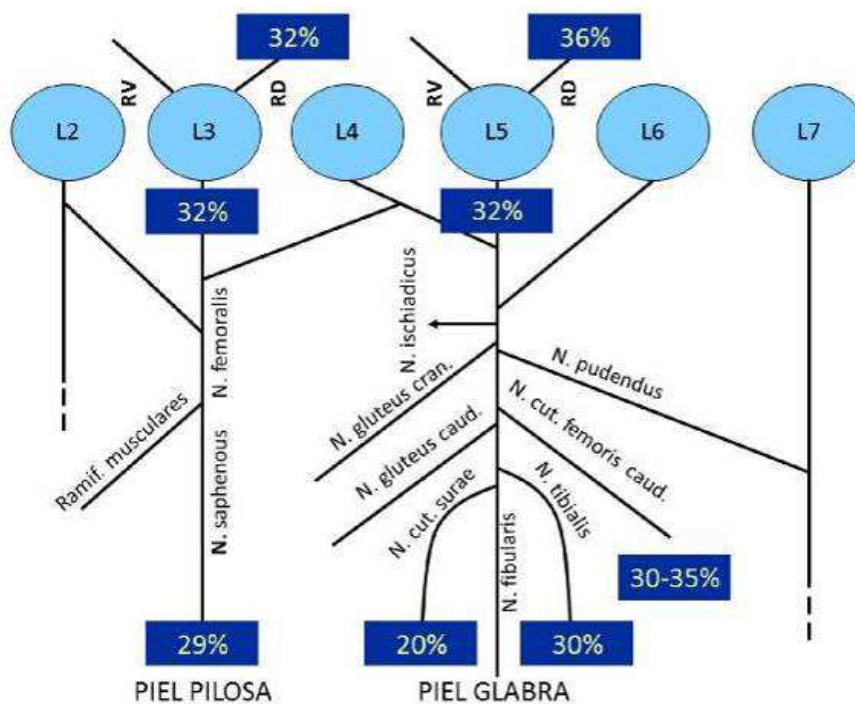


Figura 13. Esquema de la inervación lumbar del ratón y el porcentaje de pérdida de fibras mielínicas en los ratones deficientes en BDNF.

Como mostramos anteriormente, los recuentos de axones mielínicos en los nervios raquídeos de los ganglios de L3, antes de que se ramifiquen sus correspondientes nervios sáfenos, demuestran una pérdida del 32% en los mutantes (Tabla 3; Figura 13). De acuerdo con estos resultados, los recuentos de fibras mielínicas del nervio sáveno de animales control y mutantes nulos de BDNF, indican una reducción estadísticamente significativa (alrededor de 29%, $p < 0.05$) de fibras mielínicas del mutante (Tabla 3; Figura 13). En el caso del nervio sáveno realizamos, además, un recuento de fibras amielínicas al microscopio electrónico que nos permitió comprobar que el déficit observado en los nervios raquídeos se mantenía en los nervios puramente cutáneos (20-30%; Figura 13). Así, todos los nervios cutáneos estudiados en ratones mutantes para BDNF parecen presentar un déficit en el número de fibras mielínicas y amielínicas.

1.2. Caracterización de los diferentes grupos de receptores cutáneos que dependen de BDNF *in vivo*.

Inervación sensorial de la piel glabra y pilosa

Tanto la piel glabra como la pilosa están inervadas por fibras nerviosas somáticas que reciben información de las diversas modalidades sensoriales. Para medir la densidad de la inervación somática general en los diferentes tipos de piel de los ratones mutantes para BDNF, se utilizó un anticuerpo contra PGP 9.5 (*protein gene product 9.5*) que reconoce específicamente una ubiquitina hidrolasa (UCHL-1) presente en todo tipo de fibras nerviosas, tanto mielínicas como amielínicas. En cuanto a los receptores sensoriales presentes en la piel pilosa, se analizaron muestras de piel de la zona medial de la pantorrilla, inervadas por el sáveno y para el análisis de la piel glabra, se seleccionaron muestras de las almohadillas plantares, inervadas por el nervio ciático, en ambos casos localizadas en las extremidades posteriores. Con el marcador general de inervación PGP 9.5 observamos que la densidad de fibras y terminaciones nerviosas marcadas se encontraba sustancialmente reducida tanto en la piel pilosa como en la glabra del mutante nulo de BDNF coincidiendo con la disminución de fibras en el nervio (Figura 14 A-D).

Ambos tipos de piel reciben también la inervación del sistema nervioso simpático y para comprobar si la reducción en la densidad de las fibras nerviosas estaba restringida a los aferentes sensoriales se marcaron las proyecciones simpáticas, que también terminan en forma de terminaciones libres no encapsuladas, usando un anticuerpo contra la TH (tirosina hidroxilasa), un enzima que participa de la ruta biosintética de las catecolaminas y que se expresa en las fibras nerviosas simpáticas pero no en las sensoriales. Este análisis lo realizamos en muestras de piel glabra de las almohadillas plantares del ratón y los resultados de la inmunohistoquímica mostraron que en la piel glabra de los ratones *Bdnf*^{-/-} no había diferencias significativas en la densidad de las fibras nerviosas positivas para TH (datos no mostrados).

Todos estos datos demuestran que se produce una pérdida de proyección nerviosa cutánea en los ratones *Bdnf*^{-/-}, coherente con el déficit de neuronas sensoriales de los DRGs y de las fibras mielínicas y amielínicas en los nervios, y que esta pérdida afecta de forma exclusiva a las fibras nerviosas sensoriales y no a las simpáticas.

Mecanorreceptores cutáneos en la piel glabra y pilosa: fibras A β

Las neuronas sensoriales de proyección cutánea con fibras mielínicas A β inervan a mecanorreceptores especializados. La fisiología de estas neuronas puede ser de dos tipos: a) los aferentes de adaptación rápida que inervan a los corpúsculos de Meissner y Pacini, en la piel glabra y a los pelos de protección o de cobertura (comunes o tilotricos), en la piel pilosa; b) los aferentes de adaptación lenta que inervan a las células de Merkel en los dos tipos de piel (ver Koltzenburg et al., 1997). Al igual que los receptores propioceptivos del músculo, el desarrollo normal de muchos de estos mecanorreceptores cutáneos es absolutamente dependiente de la llegada y mantenimiento de su inervación sensorial. Esto hace que sea

Resultados

posible analizar el déficit en neuronas de los DRGs que inervan a receptores específicos concretos mediante el análisis de si estos están presentes.

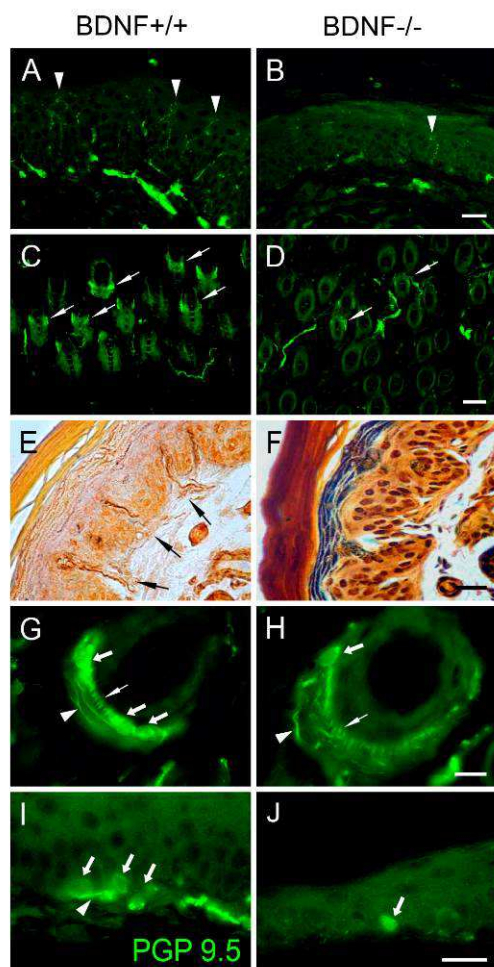


Figura 14: Efecto de la falta de señalización de BDNF en la innervación general y sobre los diferentes receptores de la piel pilosa y glabra de ratón.

(A,D) Innervación general de la piel glabra de la almohadilla plantar (A, B) y de la piel pilosa del empeine (C, D), en ratones BDNF^{+/+} y BDNF^{-/-} de 15 días de edad. La densidad de innervación se evaluó mediante el estudio de secciones transversales de la piel glabra de la almohadilla plantar y de la piel del lado piloso, marcadas con un anticuerpo contra PGP9.5, un marcador general para fibras periféricas. La tinción de los anticuerpos (verde), mostró un patrón de tinción menor tanto en la piel glabra de la almohadilla plantar como en la piel peluda de las patas traseras de ratones de BDNF^{-/-} (B, C). Además, la falta de una alimentación postnatal apropiada en los ratones mutantes para BDNF, hace que su tamaño sea más pequeño que sus hermanos de camada de tipo salvaje y, en consecuencia, la densidad del pelo es mayor (aproximadamente 1,5 veces, D). (E, F) Mediante el método de tinción de plata de "tipo Cajal" se observa una ausencia total de corpúsculos de Meissner en la piel glabra de la almohadilla plantar de ratones BDNF^{-/-}. Tengase en cuenta que en ratones BDNF^{-/-} las diferentes capas de la piel glabra son más delgadas que en ratones normales (B, F). (G, H). Según la evaluación realizada por la tinción de PGP9.5 en la piel del dorso piloso, las terminaciones lanceoladas longitudinales de la mayoría de los folículos pilosos faltaban en ratones mutantes de BDNF, mientras que las terminaciones lanceoladas transversales no se vieron afectadas. (G-J) El número de células de Merkel (flechas), incluyendo las asociadas a los folículos del pelo y sus fibras innervantes, también se redujeron en ratones BDNF^{-/-}.

En el caso de la piel glabra, los corpúsculos de Meissner responden a deformaciones leves de la piel y son especialmente abundantes en las almohadillas plantares, donde se sitúan justo debajo de la epidermis entre las papilas dérmicas (ver Figura 14E). Se encuentran innervados por una o más fibras nerviosas A β de adaptación rápida que discurren de forma sinuosa en el interior de una cápsula formada por células de Schwann modificadas a partir de las que rodean a las fibras sensoriales (Perl et al, 1992). El desarrollo de este tipo de corpúsculos sensoriales se ha estudiado en diferentes especies de mamíferos mediante impregnaciones metálicas con oro o plata, técnicas inmunohistoquímicas y análisis ultraestructural (Renehanand Munger et al, 1990; Zelená et al, 1994; Saxod et al, 1996). Se ha visto que su desarrollo en el ratón comienza dos días después del nacimiento y que alcanzan la conformación adulta sobre P20-P25 y, por lo tanto, decidimos realizar el estudio de los corpúsculos de Meissner en la piel glabra de las extremidades posteriores de animales P15 deficientes para BDNF, usando la técnica de tinción argéntica de Cajal o un anticuerpo contra PGP 9.5. Encontramos que, mientras en los animales controles existía un número elevado de corpúsculos de Meissner situados entre las papilas dérmicas, los mutantes carecían totalmente de estas estructuras (ver Figura 14E y F; Gonzalez-Martín et al., 2005). Además se había demostrado en estudios previos que ratones

de dos o tres semanas de edad, deficientes para el receptor de alta afinidad del BDNF, TrkB, también carecen de corpúsculos de Meissner en la piel glabra de las extremidades posteriores (Gonzalez-Martín et al, 2004). Ya que la diferenciación de estos receptores depende de su inervación (ver revisión en Zelená et al., 1994), podemos concluir que la ausencia de corpúsculos en los animales *TrkB*^{-/-} y *Bdnf*^{-/-} es debida a la pérdida de las neuronas sensoriales aferentes a estos receptores.

Quisimos averiguar en nuestros mutantes nulos de BDNF, si se veía afectada la inervación de los folículos pilosos de la piel. Ya que se conoce que la estructura de la piel y la inervación de los folículos pilosos se completa antes del día 17 de vida postnatal (Peters et al., 2002), realizamos comparaciones entre la inervación de los folículos pilosos de ratones *Bdnf*^{+/+} y *Bdnf*^{-/-} en P15 utilizando la inmunotinción para PGP 9.5 en cortes transversales de piel. Como se puede observar en la Figura 14G, los folículos pilosos de los controles se encuentran rodeados por una empalizada de terminales lanceolados orientados de forma longitudinal dentro del complejo piloneural y por terminales nerviosos circunferenciales que rodean el pelo. Sin embargo, como mostramos en la Figura 14H, en los pelos de protección de los mutantes se observa una desorganización de los terminales circunferenciales y una fuerte pérdida en el número de folículos pilosos que desarrollan terminales lanceolados. Estos datos demuestran claramente que las neuronas sensoriales que dan lugar a los terminales lanceolados de la piel pilosa dependen de BDNF.

Las neuronas con fibras de adaptación lenta están asociadas a complejos de células de Merkel que se denominan *touch dome*. Los *touch dome* están considerados unidades sensoriales que se localizan tanto en el estrato basal de la epidermis de la piel glabra como en la base de los folículos pilosos de la piel pilosa y estudios previos indican que el número final de estos receptores ya está determinado en el momento del nacimiento. Sin embargo, parece ser que el número de células de Merkel que componen cada unidad aumenta hasta que el animal alcanza la edad adulta (Nurse & Diamond et al, 1984). Por este motivo, es difícil observar *touch domes* formados por más de tres o cuatro células de Merkel durante los primeros 15 días postnatales y lo más frecuente es encontrar células únicas. Además se ha descrito que, en el momento del nacimiento, prácticamente todas las células de Merkel están ya inervadas por sus aferentes sensoriales (Pasche et al, 1990). Basándonos en estos datos quisimos comparar los *touch domes* presentes en la piel de los ratones P15 *Bdnf*^{+/+} y *Bdnf*^{-/-}, para ello, realizamos una doble inmunotinción con anticuerpos para PGP 9.5 y S100β en cortes de criostato, de 10 μm de grosor, de manera que pudiéramos teñir las fibras inervantes con el doble marcaje y las células de Merkel únicamente con PGP 9.5 (Fundin et al, 1997; LeMaster et al, 1999). Cómo podemos observar en la Figura 14J, en la piel glabra de la extremidad posterior de los ratones *Bdnf*^{-/-} el número de *touch dome* por mm² está reducido alrededor de un 35-40% en relación a los controles (Figura 14I). El número de células de Merkel por unidad sensorial también se reduce, de tal manera que si la proporción de agrupaciones de dos o más células vs células únicas en los animales salvajes es de 1:3, en los animales deficientes para BDNF llega a ser 1:9 (Figura 14). Y, por último, en la piel glabra también observamos una reducción de la inervación de las células de Merkel: en los animales control, alrededor del 90%

Resultados

de los *touch dome* están inervados mientras que en los animales *Bdnf*^{-/-} sólo lo están un 50% (Figura 14I y J). En cuanto a la piel pilosa, se sabe que las células de Merkel están asociadas a los complejos piloneurales de los folículos pilosos y lo que observamos fue que aproximadamente el 50% de los folículos de cada sección presentaban células de Merkel asociadas en los animales control mientras que sólo el 20% los presentaban en los animales deficientes para BDNF (Figura 14G y H). Todos estos datos que muestran que los animales *Bdnf*^{-/-} tienen menos *touch domes*, menos células de Merkel y menos fibras de adaptación lenta, implican que existe una subpoblación de neuronas sensoriales en los DRGs, responsables de la percepción mecánica de adaptación lenta, que dependen de BDNF para su supervivencia durante su desarrollo postnatal.

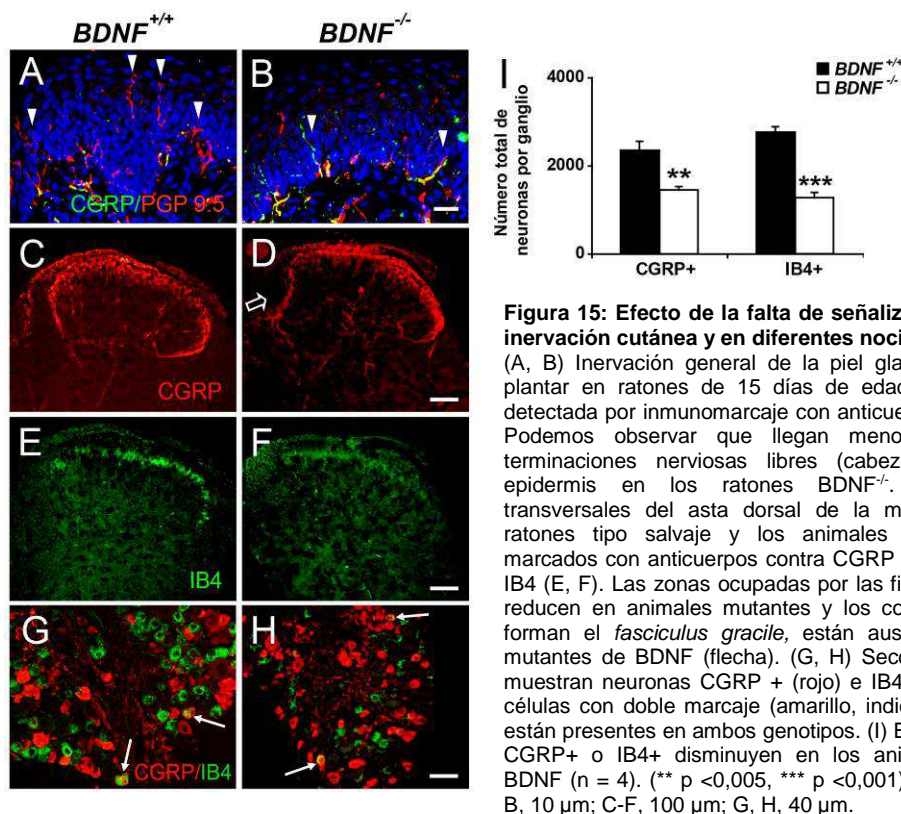
En resumen, todos estos resultados indican que el BDNF es necesario para la supervivencia durante el desarrollo postnatal de diferentes mecanorreceptores cutáneos, con inervación por aferentes mielínicos, tales como los corpúsculos de Meissner, los complejos piloneurales o los complejos de células de Merkel denominados *touch domes*.

Neuronas sensoriales con fibras Aδ y C: nociceptores

Los aferentes amielínicos con fibras de tipo C inervan la epidermis en forma de terminaciones libres (Lynn y Carpenter, 1982; Willis y Coggeshall, 1991) y, en los marcajes con PGP 9.5 para medir la densidad de inervación general de la piel, observamos que el número de fibras nerviosas libres, tanto en la piel glabra como en la piel pilosa, estaba reducido en los animales *Bdnf*^{-/-}. Además, los recuentos en los nervios de los animales *Bdnf*^{-/-} indicaban una pérdida significativa de fibras amielínicas. Con respecto a las fibras Aδ, existía la posibilidad de que también estuvieran reducidas en número, dado el déficit en fibras mielínicas de los nervios principales. Es difícil determinar con precisión una pérdida de fibras Aδ y C a nivel de la epidermis ya que ambos tipos de fibras acaban en forma de terminaciones libres, por lo que su posible cuantificación ya sea con impregnaciones argénticas o con tinciones inmunocitoquímicas es dudosa. Sin embargo, las neuronas sensoriales que dan lugar a estas fibras son las de menor tamaño en el ganglio y expresan algunos marcadores específicos que permiten su análisis con facilidad. Dentro del conjunto de neuronas sensoriales pequeñas, se pueden distinguir dos poblaciones de neuronas nociceptivas durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal: 1) una población de neuronas que expresan TrkA, CGRP y SP, que tienen fibras C o Aδ; 2) una población de neuronas que no contienen TrkA pero sí c-ret, que tienen fibras C y son positivas cuando se marcan con la lectina IB4 (Averill et al., 1995; Silos-Santiago et al., 1995; Bennett et al., 1998).

A fin de determinar con más precisión el efecto de la carencia de BDNF sobre neuronas de los DRG con terminaciones libres en la piel analizamos el número de neuronas positivas para CGRP o para IB4 en cortes a través del ganglio L5 en animales *Bdnf*^{+/+} y *Bdnf*^{-/-} de P15. A esta edad las dos poblaciones se encuentran bien definidas y la co-localización es muy baja, tal como se muestra en la Figura 15G y H donde las neuronas CGRP positivas (rojo) y las IB4 positivas (verde) están presentes en ambos fenotipos. Sin embargo, la cuantificación de ambas poblaciones prueba que existe una pérdida de aproximadamente el 40% de las neuronas CGRP positivas y del 50% de las IB4 positivas en los animales mutantes, indicando así que ambas poblaciones contienen una fracción de neuronas dependientes de BDNF para su

supervivencia (ver Figura 15). Estas dos poblaciones proyectan sus axones hacia el asta dorsal de la médula espinal formando patrones diferentes de inervación en las láminas espinales: las neuronas CGRP positivas proyectan hacia la lámina I y la zona exterior de la lámina II (lamina II_o), mientras que las neuronas IB4 positivas proyectan principalmente hacia el interior de la lámina II (lamina II_i) (Averill et al., 1995; Silos-Santiago et al., 1995; Mollivier et al., 1997; Zylka et al., 2005). En cortes de criostato de 20 μm teñidos con anticuerpos para detectar CGRP y con la lectina IB4 marcada, observamos que en los animales deficientes para BDNF, el patrón de expresión de CGRP de las láminas I y II_o está reducido en área, las fibras presentan una distribución desorganizada en relación con los animales control y, en particular, se produce una pérdida de las fibras CGRP positivas presentes en el *fasciculus gracile* (Figura 15C y D), que contiene las fibras colaterales ascendentes de las neuronas peptidérgicas (Kubota et al., 1988). Del mismo modo, observamos que el área que ocupan las fibras marcadas con IB4 en la lámina II_i, es más estrecha en los mutantes (Figura 15E y F).



Todos estos datos indican que una fracción de cada población se pierde en ausencia de la neurotrofina BDNF y que, por lo tanto, BDNF es necesario para la regulación *in vivo* del número de neuronas sensoriales nociceptivas durante el periodo postnatal, independientemente de su modalidad funcional.

1.3. Caracterización *in vitro* de la población de neuronas sensoriales nociceptivas que depende de BDNF

Determinación del periodo de máxima dependencia trófica de las neuronas nociceptivas y termoceptivas in vitro

Para determinar los requerimientos neurotróficos *in vitro* de los nociceptores durante el periodo postnatal, cultivamos neuronas sensoriales de los DRGs obtenidos a partir de animales de diferentes edades (P0, P2, P5, P8 y P15) en presencia de NGF, BDNF, GDNF o sus diferentes combinaciones, siempre a concentraciones bajas de factores (10 ng/ml). Las neuronas fueron extraídas del ganglio mediante disociación enzimática y mecánica y posteriormente sembradas a baja densidad para evitar efectos paracrinos. Además, siempre se detecta un cierto grado de supervivencia neuronal independiente de factores neurotróficos exógenos que aumenta con la edad del animal hasta alcanzar su nivel máximo en P8, cuando el número de neuronas que sobreviven en cultivo en ausencia de neurotrofinas es el mismo que en cualquiera de las condiciones experimentales probadas (Figura 16A). De todas formas, la morfología que desarrollan las células en presencia de cada factor neurotrófico es muy diferente; por ejemplo, cuando las neuronas crecen en presencia de GDNF alcanzan un mayor tamaño que cuando crecen en presencia de NGF o BDNF (Figura 16B).

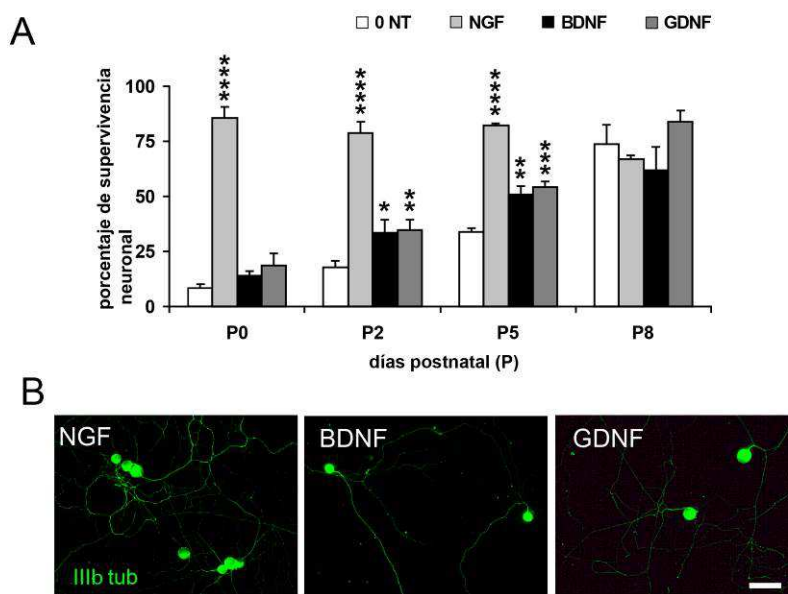


Figura 16: Supervivencia *in vitro* de neuronas DRG postnatales tempranas en presencia de diferentes factores de crecimiento.

(A) Supervivencia de las neuronas sensoriales disociadas de DRGs de tipo salvaje, en diferentes días después de su nacimiento (P) y cultivadas durante 48 horas en presencia de 10 ng/ml de NGF, BDNF o GDNF, o en ausencia de cualquier factor añadido (0 NT) (expresado como el porcentaje del número de neuronas adheridas 4 h después de la siembra). Obsérvese que la supervivencia independiente de factores neurotróficos, se desarrolla progresivamente después del nacimiento. En todas las etapas, se obtiene la supervivencia máxima en presencia de NGF. BDNF o GDNF solo permiten la supervivencia de una población relativamente pequeña de neuronas sensoriales neonatales, pero en P2 y P5 el porcentaje de neuronas dependientes BDNF y GDNF aumenta. P0, n = 3; P2, n = 12; P5, n = 3; P8, n = 4. Los asteriscos indican significatividad (* p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). (B) Neuronas sensoriales de ratones P2 cultivadas en 10 ng/ml de NGF, BDNF o GDNF y marcadas con anticuerpos anti-IIIb tubulina (verde). Barra de escala: 25 μm

Por lo tanto, decidimos centrar nuestro estudio en la primera semana después del nacimiento del ratón. De forma coherente con estudios anteriores, el mayor porcentaje de supervivencia cuantificada a las 48 horas *in vitro* (HIV), que fue de alrededor del 80% lo obtuvimos cuando cultivábamos las neuronas de cualquier edad en presencia de NGF (Figura 17B y C). En neuronas obtenidas de ratones de P0 únicamente un pequeño porcentaje de neuronas sobreviven en presencia de BDNF o GDNF pero, como podemos observar en la Figura, el porcentaje aumenta progresivamente entre P2 y P5 con ambos factores tróficos lo que indica que durante este corto periodo de tiempo, BDNF y GDNF adquieren *in vivo* la misma relevancia para la supervivencia de neuronas sensoriales que, en el momento del nacimiento, dependían exclusivamente de NGF. Estos resultados indican que entre P0 y P5 existe una fracción de neuronas dependientes de NGF que únicamente expresan TrkA y otra fracción de neuronas TrkA+ que aumenta progresivamente con la edad, desde aproximadamente el 10% en P0 hasta el 40% en P5, que también expresan tanto componentes del complejo de GDNF, como el receptor TrkB. Por tanto, las neuronas dependientes de NGF en el nacimiento se hacen sensibles a BDNF y GDNF sin perder su respuesta a NGF en el periodo P0-P5. Además, BDNF y GDNF parecen actuar sobre la misma población, dado que no se produce un efecto aditivo en supervivencia cuando se combinan ambos factores (Figura 17A y ver también Baudet, 2000).

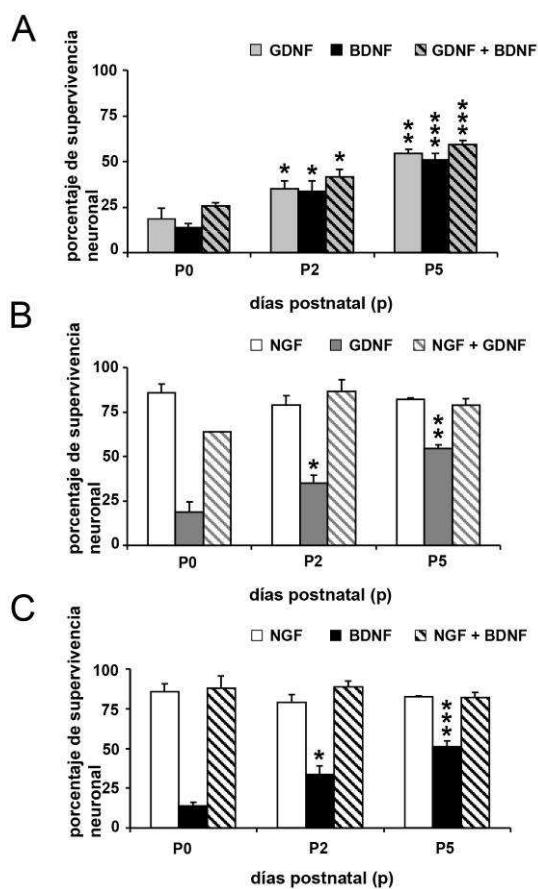


Figura 17: Supervivencia *in vitro* de neuronas DRG postnatales tempranas en presencia de diferentes factores de crecimiento.

(A-C) Supervivencia de las neuronas sensoriales disociadas de DRGs de tipo salvaje en P0, P2 y P5 y cultivadas durante 48 horas en presencia de 10 ng / ml de NGF, BDNF o GDNF, y en combinaciones de dos factores tróficos (expresado como el porcentaje del número de neuronas adheridas 4 H después de la siembra). . P0, n = 3; P2, n = 12; P5, n = 3. A) Las neuronas responden equitativamente bien en presencia de GDNF y BDNF y sus efectos no son aditivos, lo que sugiere que estos dos factores actúan sobre la misma población de neuronas, indicando que una fracción de neuronas IB4+ pueden ser rescatadas por BDNF. B) GDNF provoca un aumento en la respuesta a supervivencia en una fracción de la población dependiente de NGF. C) BDNF, igualmente, provoca un aumento en la respuesta a supervivencia en una fracción de la población dependiente de NGF. * p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.001, **** p <0.0001).

Resultados

Dado que nuestros cultivos indicaban que BDNF podía promover la supervivencia de una fracción de neuronas sensoriales que eran, además, sensibles a NGF decidimos analizar la expresión del receptor TrkB en nuestros cultivos. Cuando se cultivan las neuronas de animales P2 durante 48 o 96 HIV en presencia de NGF, las marcamos con anticuerpos que detectan el receptor TrkB de BDNF y analizamos cuál es la proporción de neuronas que expresan el receptor frente al total de neuronas que sobreviven, se observa que aproximadamente el 50% de las neuronas del cultivo son TrkB+ tras 48 HIV y que este porcentaje está incluso aumentado a las 96 HIV (Figura 18A).

El hecho de que la proporción de neuronas sensoriales que responden a BDNF aumente con el tiempo en los cultivos tratados con NGF sugiere la posibilidad de que la regulación de la expresión TrkB esté controlada por NGF. Para comprobarlo, preparamos cultivos primarios de neuronas neonatales de los DRGs y los mantuvimos 24 HIV en presencia de NGF para asegurar la supervivencia neuronal durante el establecimiento y crecimiento inicial del cultivo. Pasado este tiempo la neurotrofina fue eliminada mediante varios lavados con medio de cultivo para asegurar la ausencia de trazas de la misma.

A continuación mantuvimos los cultivos en estado de deprivación trófica durante 12 horas, seguidamente volvimos a lavar e inmediatamente procedimos a la estimulación de las neuronas sensoriales con 10 ng/ml de NGF durante diferentes períodos de tiempo (4, 8, 12 y 24 h; en dos cultivos independientes). Los niveles de ARNm de TrkB, según lo determinado por RT-PCR, aumentaron progresivamente a medida que aumentaba la exposición a NGF (Figura 18B).

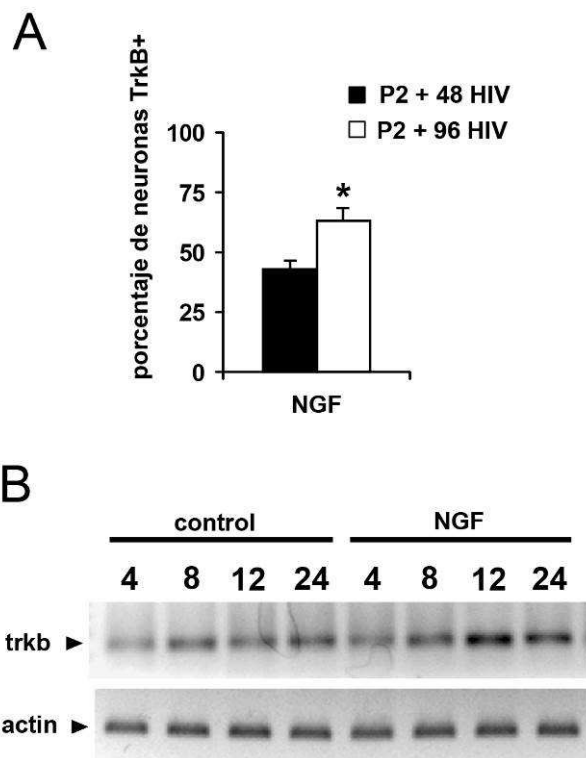


Figura 18: Expresión in vitro del receptor TrkB.

(A) Porcentaje de neuronas que expresan TrkB en cultivos de ratones postnatales de 2 días de edad, mantenidos durante 48 o 96 horas en presencia de 10 ng / ml de NGF. Un porcentaje sustancial de neuronas cultivadas en NGF expresó el receptor TrkB (n = 4). (B) Estudio en el tiempo de la expresión del mRNA de *TrkB* inducida por el tratamiento de los cultivos con NGF, durante diferentes períodos de tiempo y determinado por RT-PCR. Control interno: β actina. * $p < 0.05$.

Aunque en principio no serían descartables posibles efectos producidos por los cambios en la supervivencia neuronal promovida por NGF en el incremento del ARNm de TrkB, hay que resaltar que el aumento en los niveles de expresión de *TrkB* en relación a la situación control sin NGF se observa tan solo 4 horas después de la estimulación con NGF, lo que sugiere que la expresión de TrkB sí es modulada por la señalización de NGF.

Identificación de las subpoblaciones de neuronas nociceptivas y termorreceptivas que dependen de BDNF

Para poder estudiar con más detalle cuales son las subpoblaciones que responden ante cada factor neurotrófico, fijamos los cultivos que habíamos mantenido durante 48 HIV y los procesamos para inmunofluorescencia utilizando anticuerpos para la proteína CGRP para marcar la población TrkA+ y la lectina IB4 para identificar la población de neuronas no-peptidérgicas, c-ret/FRAP+ (Averill et al., 1995; Silos-Santiago et al., 1995; Bennett et al., 1998). En presencia de NGF la mayoría de neuronas que sobreviven en P0 son CGRP+ (75 ± 7%; n = 3 cultivos independientes) y sólo una fracción de ellas son IB4+ (39 ± 7%; n = 3 cultivos independientes). En P15 las poblaciones de neuronas CGRP+ e IB4+ están bien separadas y el índice de co-localización es muy bajo (datos no mostrados), tal como sucede *in vivo* (Figura 15G y H).

Como se puede observar en la figura, la presencia de NGF durante este periodo es suficiente para la supervivencia de todas las neuronas cultivadas. Sin embargo, la comparación de la contribución de los tres factores neurotróficos a la supervivencia entre P0 y P5 indica que también BDNF y GDNF son capaces de mantener ambas poblaciones de nociceptores (Figura 19A) y que, por lo tanto, los DRGs durante este periodo perinatal contienen neuronas peptidérgicas y no-peptidérgicas que expresan los tres receptores: TrkA, TrkB y Ret.

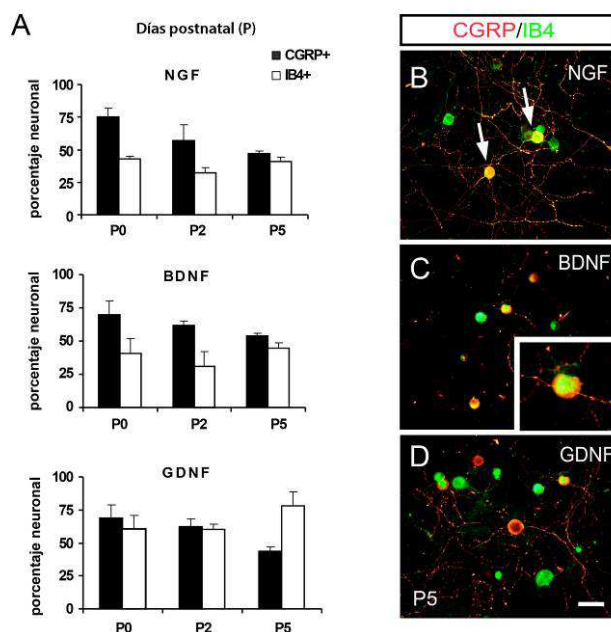


Figura 19: Supervivencia *in vitro* de las neuronas de los DRGs de pequeño diámetro, en presencia de diferentes factores de crecimiento.

(A) Supervivencia de neuronas CGRP+ e IB4+ aisladas de DRGs de ratones P0, P2 y P5 y cultivadas durante 48 horas en presencia de 10 ng / ml de NGF, BDNF o GDNF (expresado como el porcentaje del número de neuronas adheridas a las 4 h después de la siembra), n = 5. (B-D) Doble tinción con anticuerpos CGRP (rojo) y lectina IB4 (verde) en neuronas cultivadas a partir de DRGs de ratones P5, en diferentes condiciones de factores de crecimiento. Barras de escala: 50 μm.

Resultados

Por otro lado, la activación que provoca la presencia de cada neurotrofina tiene un efecto muy diferente en el fenotipo de las neuronas, más allá de los cambios morfológicos descritos en la Figura 16B. Las neuronas con doble marcaje CGRP/IB4 presentan una mayor expresión del neuropéptido cuando crecen en presencia de NGF que en BDNF o GDNF (Figura 19B-D) y, a pesar de que nuestros datos respaldan que BDNF y GDNF mantienen *in vitro* a las mismas neuronas nociceptivas, las neuronas IB4+ que crecen en presencia de GDNF parecen tener un tamaño mayor que las cultivadas en BDNF sugiriendo que el GDNF produce un efecto directo sobre el tamaño neuronal (Moore et al., 1996; Luo et al., 2007).

	P2		P5		
Receptores	IB4	CGRP	Receptores	IB4	CGRP
TrkA	+	+	TrkA	+	-
TrkA/trkB	-	+	TrkA/trkB	-	+
TrkA/c-ret	+	-			
TrkA/trkB/c-ret	+	+	TrkA/trkB/c-ret	+	+
			c-ret	+	-

Tabla 4. Combinaciones de receptores en las neuronas sensoriales de tamaño pequeño.

Propuesta de combinación de receptores de factores tróficos, presentes en las neuronas IB4 o CGRP+ de los DRGs, extraídos de animales P2 o P5, para justificar la supervivencia en cultivo con NGF, BDNF o GDNF.

Para justificar la supervivencia de neuronas IB4 o CGRP+, extraídos de DRGs de animales P2 o P5 y crecidas en cultivo con NGF, BDNF o GDNF proponemos la siguiente combinación de receptores de factores tróficos (Tabla 4).

1.4. Papel paracrino/autocrino de BDNF en el desarrollo postnatal de las neuronas nociceptoras.

Los factores neurotróficos se expresan generalmente en los tejidos diana de las neuronas sensoriales. Sin embargo, estudios previos han demostrado que también pueden expresarse en los propios ganglios donde pueden ejercer efectos paracrinos y autocrinos (Acheson et al., 1995). Ya que nuestros resultados *in vitro* demuestran que las neuronas nociceptivas son capaces de sobrevivir en presencia de cualquiera de los tres factores, examinamos mediante RT-PCR cuantitativa los niveles de expresión de NGF, BDNF y GDNF, tanto en la piel pilosa de las extremidades posteriores como en los DRGs, en animales neonatos, P8 y P15 (Figura 20A y B).

Los niveles de expresión de los factores son más bajos en la piel que en los DRG, probablemente debido a que, tras completar la inervación periférica durante el desarrollo, la expresión de los factores neurotróficos se reduce a células específicas de los receptores sensoriales y no a todas las células epiteliales. Como cabría esperar, basándonos en los estudios previos, en la piel, los niveles de ARNm de NGF son más altos en P0 y van decayendo con la edad. En cambio, los ARNms de BDNF y GDNF también están presentes en P0 pero en menor cantidad (Figura 20A y B), también decrecen durante el desarrollo postnatal

hasta alcanzar P15 donde GDNF aumenta de forma significativa respecto a BDNF y NGF. Sin embargo, el nivel de expresión de los ARNm de BDNF en los DRG son marcadamente altos en relación con sus propios niveles en la piel. Además, su expresión es mucho más elevada en el momento del nacimiento y decrece progresivamente a lo largo del tiempo, aunque siempre con niveles superiores a los otros dos factores neurotróficos.

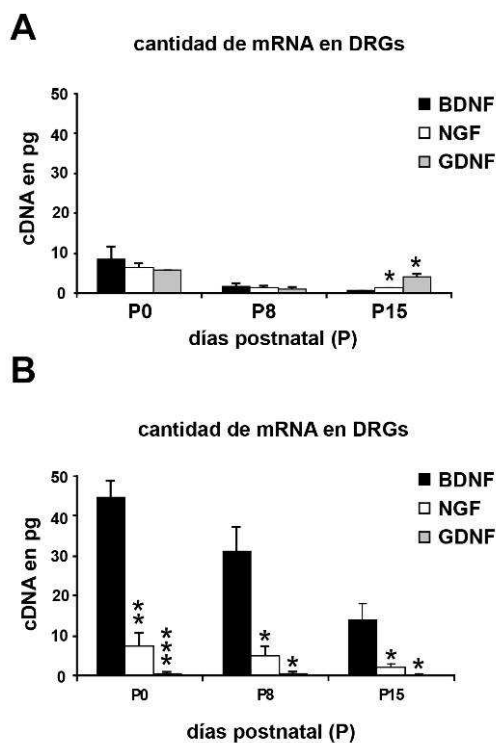


Figura 20: Expresión del mRNA de NGF, BDNF y GDNF en la piel y los DRGs y sus efectos autocrinos / paracrinos.

(A) Se utilizó PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de NGF, BDNF y GDNF en muestras de piel y DRGs de ratones recién nacidos (P0), de 8 días de edad (P8) y de 15 días de edad (P15). Los gráficos muestran que en la piel se expresan cantidades muy pequeñas de mRNA de cada neurotrofina (A), mientras que se observan unas cantidades especialmente altas en la expresión de mRNA de BDNF en los DRGs de animales P0, que van decreciendo progresivamente en P8 y P15 (B) (n = 4). * p < 0.05, ** p < 0.005, *** p < 0.001).

Esta expresión podría sugerir que algunas neuronas sensoriales dependen de BDNF producido en el propio ganglio durante el desarrollo postnatal temprano. Para comprobar esta hipótesis establecimos cultivos de DRGs de animales neonatos en presencia de NGF en concentraciones de máxima supervivencia (10 ng/ml) y los mantuvimos durante 10 DIV añadiendo PBS sólo, anticuerpos anti-BDNF para bloquear su función o una IgG irrelevante como control. A continuación fijamos los cultivos y los procesamos para analizar la supervivencia de las dos subpoblaciones de neuronas nociceptivas. Como podemos observar en la Figura 21A y B, los anticuerpos bloqueantes reducen la supervivencia tanto de las neuronas peptidérgicas (CGRP+) como la de las no-peptidérgicas (IB4+) y lo hacen en proporciones similares a las obtenidas en los recuentos *in vivo* de los animales *Bdnf*^{-/-}. Para confirmar estos datos realizamos un segundo tipo de experimentos, en los que cultivamos neuronas de DRGs de ratones *Bdnf*^{+/-} y *Bdnf*^{-/-} neonatos y los mantuvimos en presencia de NGF, BDNF o GDNF (10 ng/ml cada una) durante 48 HIV. Tras fijar los cultivos, analizamos los resultados de supervivencia neuronal total y concluimos que, en presencia de BDNF, no se observa ninguna diferencia significativa en la tasa de supervivencia entre ambos genotipos, hecho coherente con que la administración exógena de la neurotrofina reemplaza la que las

Resultados

neuronas mutantes no poseen. Sin embargo, en presencia de NGF o GDNF, en los cultivos mutantes se pierde una fracción de las neuronas que normalmente sobreviven en los cultivos procedentes de animales de tipo salvaje (Figura 21C). Estos resultados indican que las neuronas de los DRGs producen BDNF durante su crecimiento *in vitro* y que éste es necesario para la supervivencia de las neuronas nociceptivas TrkA+/TrkB+/Ret+. Los datos también sugieren que la ausencia *in vivo* de BDNF, que probablemente debía ser producido en los propios ganglios, afecta directamente a la supervivencia de una fracción de las dos poblaciones de nociceptores (peptidérgicos y no-peptidérgicos). Todo esto indica que existen neuronas que dependen de NGF en el momento del nacimiento y que expresan BDNF necesario para la supervivencia de las neuronas nociceptivas TrkA+.

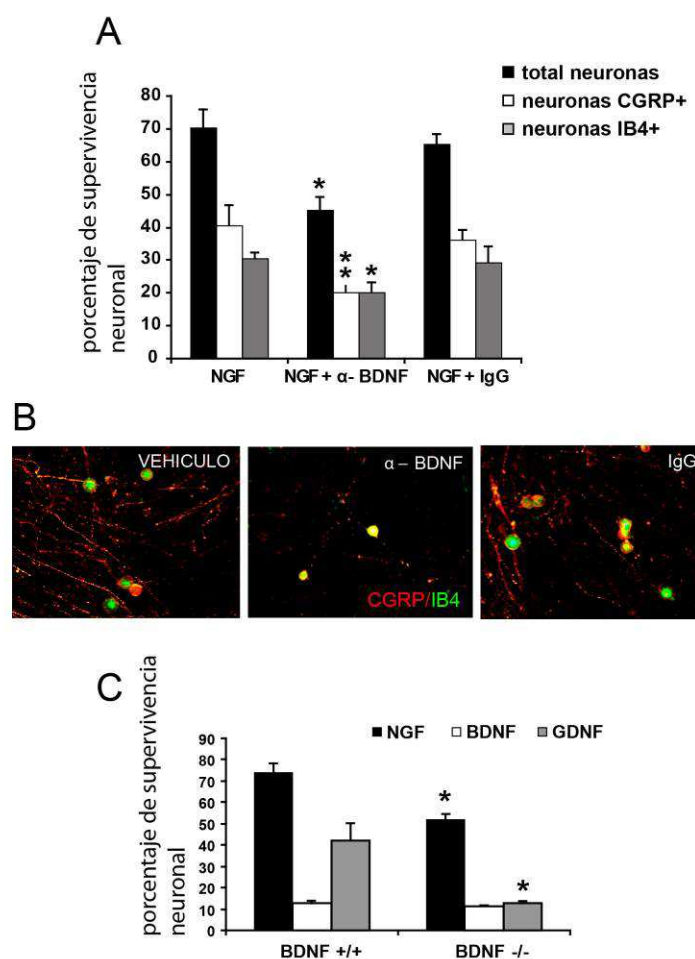


Figura 21: Efectos autocrinos/paracrinos de BDNF.

(A) Histograma que muestra el porcentaje de supervivencia neuronal en experimentos independientes de neuronas sensoriales de los DRGs, cultivadas en presencia de 10 ng/ml de NGF y tratadas simultáneamente con anticuerpos anti-BDNF o con un IgG no relevante. Se puede observar que el bloqueo de BDNF reduce la supervivencia en NGF lo que sugiere efectos autocrinos/paracrinos de esta neurotrofina NGF sobre neuronas-dependientes ($n = 5$). (B) Doble tinción de los cultivos, con anticuerpos anti-CGRP (rojo) y lectina IB4 (verde), en las diferentes condiciones de tratamiento. (C) Histograma que muestra el porcentaje de neuronas que sobreviven en tres cultivos independientes en los cuales neuronas sensoriales de los DRGs neonatales de animales *Bdnf*^{+/+} y *Bdnf*^{-/-}, fueron cultivados en presencia de 10 ng/ml de NGF, BDNF o GDNF, durante 48h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$

2. La metaloproteasa MT5-MMP está implicada en la regulación de la inervación cutánea nociceptiva neuro-inmune

2.1. MT5-MMP modula la inervación cutánea nociceptiva *in vivo*

Diversos estudios previos han demostrado que la metaloproteasa de membrana MT5-MMP se expresa ampliamente en el sistema nervioso central y participa en procesos de guía axónica y establecimiento de sinapsis durante el desarrollo embrionario y postnatal de mamíferos. Se ha descrito también su implicación en la regulación del crecimiento neurítico de las neuronas de los DRGs permitiendo a los axones la invasión de tejidos nuevos para poder alcanzar sus dianas.

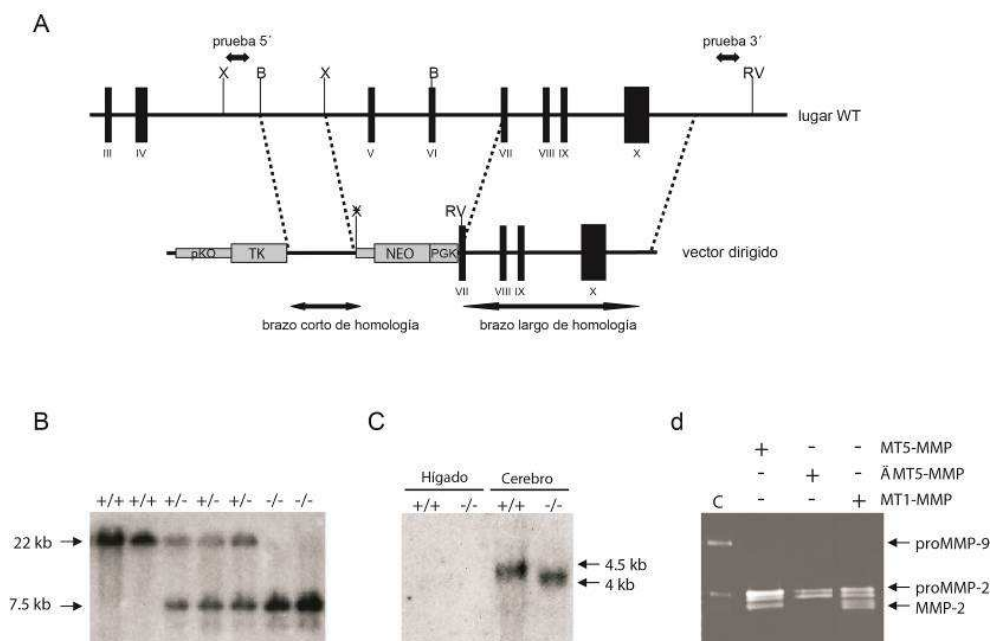
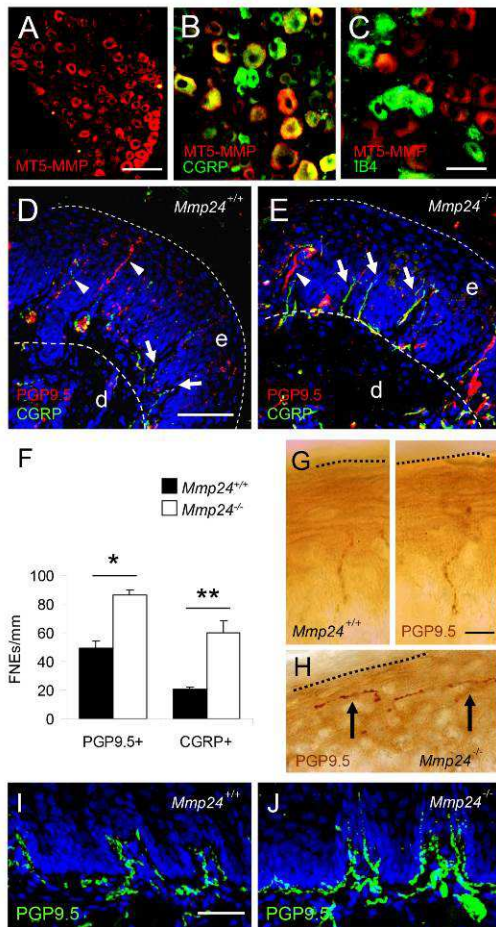


Figura 22. Modificación genética dirigida del gen MMP-MT5.

(A) Mapas de restricción de la región de interés del gen MT5-MMP (*Mmp24*) (arriba) y del constructo genético (abajo). B, BamHI; RV, EcoRV; X, XhoI; X con X superpuesta, XhoI eliminado. (B) Análisis por Southern blot de los ratones *Mmp24*^{+/+}, *Mmp24*^{+/-}, y *Mmp24*^{-/-}. (C) Detección de ARNm de *Mmp24* en el cerebro por análisis Northern blot. El tejido hepático se cargó como un control negativo. (D) Análisis de la activación de proMMP-2 mediante transfecciones transitorias de los cDNA completos de *Mmp24* de tipo salvaje y de la forma truncada Δ MT5-MMP, obtenida a partir de cerebro del ratón mutante nulo.

En este trabajo de tesis doctoral hemos querido profundizar en este segundo punto y, para ello, inicialmente realizamos un estudio histológico de la expresión de la metaloproteasa MT5-MMP en los ganglios L4 y L5 de la raíz dorsal de ratones postnatales y adultos, en cortes de criostato de 20 μ m de grosor y usando anticuerpos específicos anti-MT5-MMP. Nuestros inmunomarcajes indicaban la presencia de un número significativo de neuronas en los DRGs que expresan esta metaloproteasa de membrana (Figura 23A). Para examinar con más detalle su expresión en la población de neuronas sensoriales nociceptivas realizamos dobles marcajes con anticuerpos anti-CGRP o con la lectina IB4 y observamos que la expresión de MT5-MMP estaba restringida a la población peptidérgica dependiente de NGF, ya que no observamos niveles detectables de proteína en la población no-peptidérgica (Figura 23B-C). Por tanto, los nociceptores peptidérgicos expresan la metaloproteasa.

Figura 23. Expresión MT5-MMP e hiperinervación de la piel en las almohadillas plantares y en la lengua de los ratones de tipo salvaje y deficientes en *Mmp24*.



(A, B, C) Secciones de DRGs lumbares, inmuno-teñidas para detectar MT5-MMP (rojo), sólo (A) o en combinación con anticuerpos para CGRP (B) o con la lectina IB4 (C) (verde). Obsérvese que las neuronas MT5-MMP⁺ son CGRP⁺ pero no IB4⁺. (D, E) Micrografías confocales que muestran la innervación de la epidermis y la dermis superior, en lugares comparables de las almohadillas plantares de ratones adultos *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-}, tal como se muestra por doble inmunofluorescencia con anti-CGRP (verde) y anti-PGP9.5 (rojo). La estructura del tejido es revelada por el marcador histoquímico fluorescente de DNA, TOPRO-3 (azul). Las líneas discontinuas indican el límite entre la dermis superior (d) y la epidermis (e), y la superficie de la piel. Las puntas de flecha indican ejemplos de terminaciones nerviosas libres (FNEs) en la epidermis, que sólo están marcadas con anticuerpos anti-PGP9.5. Las flechas señalan las FNEs finas que también están marcadas con anticuerpos anti-CGRP. Obsérvese que la densidad global de innervación aparece aumentada en la piel mutante y que la epidermis de los ratones mutantes contiene más terminaciones nerviosas libres CGRP⁺. (F) Cuantificación de la innervación de las almohadillas plantares de ratones *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-}. Debido a que la piel de ambos genotipos no difiere en el espesor de la epidermis (véase el texto), los análisis cuantitativos se llevaron a cabo en tres cuadrículas, de ancho fijo por sección, en cuatro secciones por animal y se obtuvo la media de cada parámetro. Se muestra la media de FNEs / mm \pm SEM de tres ratones de cada genotipo. Los parámetros analizados fueron el número de PGP9.5 + y CGRP + FNE. Nótese que la densidad de innervación general epidérmica y de fibras CGRP⁺, en particular, aumentan. (G, H) Secciones representativas de la piel de la almohadilla plantar de ratones *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-}, marcados para la detección de PGP9.5 usando inmunoperoxidasa, que muestran la extensión lateral que pueden alcanzar algunas fibras de la epidermis de mutantes (H), algo que nunca se ha observado en la piel de los animales de tipo salvaje (G). La línea discontinua indica la superficie de la piel. (I, J)

Micrografías confocales que muestran la innervación de la epidermis lingual en ratones adultos *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-} mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-PGP9.5 (verde). La estructura del tejido es revelada por el marcador histoquímico fluorescente de DNA, TOPRO (azul). Se puede observar que la epidermis lingual también está hiperinervada por las FNEs en el mutante. Barras de escala: A, 50 μ m; B, C, 25 μ m; D, E, 40 μ m; G, H, 10 μ m; I, J, 30 μ m.

Se decidió entonces comprobar qué papel juega MT5-MMP en el desarrollo de las vías nociceptivas. Para ello, caracterizamos una cepa de ratones mutantes nulos en los que se había deletado el dominio catalítico y parte del dominio hemopexina del gen que codifica para la proteína MT5-MMP (Figura 22); cepa generada en el laboratorio de Dr. Carlos Lopez-Otin). El estudio inicial de esta cepa de ratones mostró que la MT5-MMP no era esencial para el desarrollo embrionario ni para la viabilidad de los ratones. Sin embargo, los estudios de comportamiento realizados en el laboratorio del Dr. Lopez-Otín indicaban que los animales mutantes *Mmp24* mostraban una mayor respuesta ante un estímulo nociceptivo térmico de tipo agudo pero no ante estímulos nociceptivos mecánicos o en ensayos de control de la actividad motora. Más aún los animales deficientes en MT5-MMP mostraban un comportamiento anómalo en paradigmas de dolor inflamatorio (ver más adelante; Folgueras et al., 2009).

A fin de analizar la hiperalgesia térmica basal de los mutantes *Mmp24* realizamos un estudio histológico de la piel de las patas traseras de los ratones adultos para caracterizar la innervación de las neuronas nociceptivas. A pesar de que la piel de los mutantes parecía histológicamente normal (grosor epidérmico: $45.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$ en *Mmp24*^{+/+} y $45.8 \pm 3.1 \mu\text{m}$ en *Mmp24*^{-/-}; n = 3 animales por genotipo), el análisis inmunohistoquímico de la innervación general de la piel determinado con anticuerpos que detectan la proteína neuronal general PGP 9.5 o CGRP, como proteína específica de fibras nociceptivas peptidérgicas, mostró en ambos casos que la densidad de los terminales libres de la epidermis está significativamente aumentada en los mutantes de *Mmp24* (Figura 23D y E). Mediante un análisis más exhaustivo de los terminales libres observamos que, en los animales mutantes, las fibras PGP 9.5+ o CGRP+, no sólo son más numerosas sino que individualmente están más ramificadas y que muchas de sus ramificaciones secundarias se extienden paralelas a la superficie de la piel a diferencia de los animales salvajes que jamás muestran este fenotipo (Figura 23G y H).

Para discernir entre las dos principales poblaciones de nociceptores realizamos dobles marcajes para PGP 9.5 y CGRP, ya que la marca de las fibras IB4 no se distingue con claridad en la epidermis por cuestiones técnicas (Rice et al., 1993). Los resultados indican que es la población PGP 9.5+/CGRP+ y no la PGP 9.5+/CGRP-, la que incrementa su densidad en la epidermis y esto es coherente con la ausencia de expresión de la proteína MT5-MMP en las neuronas IB4+ de los DRGs (Figura 23F). Para comprobar si el fenotipo era exclusivo de los ganglios espinales o si por el contrario era un fenotipo periférico general decidimos analizar otros ganglios sensoriales. Como ejemplo representativo de la innervación nociceptiva de un ganglio craneal estudiamos los terminales libres de las neuronas del ganglio trigémino que inervan la epidermis de la lengua con anticuerpos anti-PGP 9.5 y observamos que también presentan hiperinnervación en los animales mutantes de *Mmp24* (Figura 23I y J), sugiriendo que la proteína MT5-MMP es esencial para determinar el tamaño del campo receptivo de las neuronas nociceptivas cutáneas.

2.2. MT5-MMP no está implicada en la supervivencia de las neuronas nociceptivas

La sobre-expresión en la piel de NGF o de otros factores neurotróficos miembros de la familia de GDNF, produce un aumento en el número de neuronas nociceptivas de los DRGs así como de la hipertrofia de las fibras nociceptivas de la epidermis o aumento en la respuesta al dolor térmico (Malin et al., 2006; Stucky et al. 1999). Para comprobar si nuestro fenotipo de hiperalgesia térmica o de hipertrofia en las fibras nociceptivas en los mutantes para *Mmp24* era consecuencia de una alteración en el tamaño de la población de neuronas nociceptivas, analizamos los ganglios lumbares de la raíz dorsal L4 y L5 de animales adultos ya que son los principales responsables de la innervación de la piel de las extremidades posteriores del ratón.

El estudio histológico de los ganglios se hizo sobre cortes de criostato de $10 \mu\text{m}$ de grosor que posteriormente se tiñeron con anticuerpos anti-CGRP o con la lectina IB4 para detectar las principales poblaciones de nociceptores y determinamos que cualitativamente no se apreciaban diferencias en el número de neuronas nociceptivas CGRP+ o IB4+, así como en el

Resultados

tamaño total del ganglio en los animales mutantes para *Mmp24* comparado con los animales de la cepa salvaje. Para realizar un análisis más exhaustivo y cuantificar de forma precisa el número de neuronas, realizamos cortes semifinos y ultrafinos en las raíces dorsales (DR) de ganglios L4 de animales adultos *Mmp24^{+/+}* y *Mmp24^{-/-}* y calculamos el número total de fibras mielínicas y amielínicas (Figura 24 A-D). Concluimos que no existían diferencias entre los genotipos (*Mmp24^{+/+}*: 1605 ± 100 y *Mmp24^{-/-}*: 1762 ± 99 en fibras mielínicas (Figuras A y B); *Mmp24^{+/+}*: 7276 ± 1285 y *Mmp24^{-/-}*: 6430 ± 1191 en fibras amielínicas (Figuras C y D); n = 3 animales por genotipo). Estos datos indican que MT5-MMP no está implicada en la supervivencia *in vivo* de las neuronas sensoriales de los DRGs, incluyendo a las poblaciones de neuronas nociceptivas CGRP+ e IB4+ que poseen fibras amielínicas y que inervan la piel.

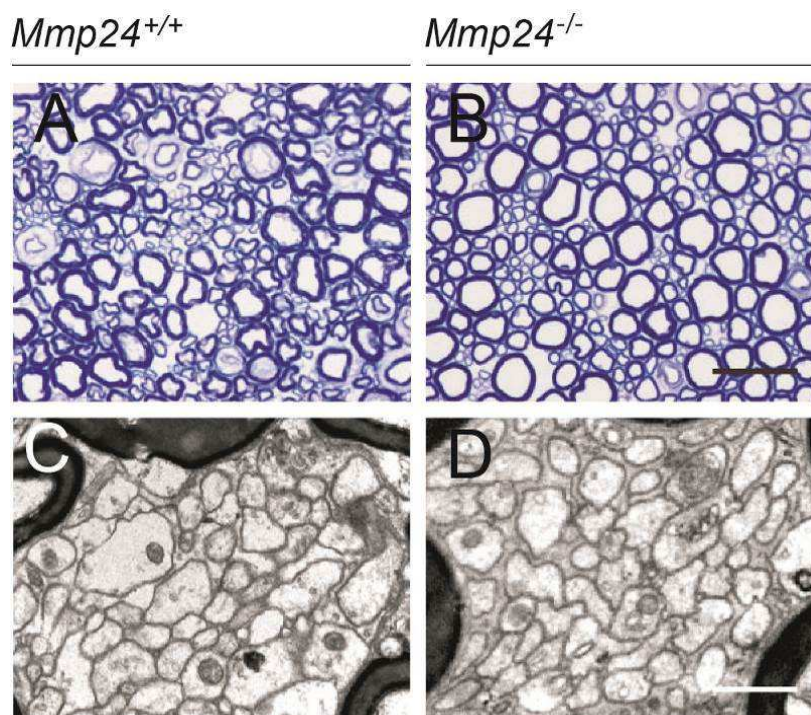


Figura 24. Análisis de fibras mielínicas y amielínicas en L4 raíces dorsales de ratones adultos *Mmp24^{-/-}*. (A, B) Secciones transversales de 1 micras de espesor en resina, de la raíz dorsal L4 de ratones adultos *Mmp24^{+/+}* y *Mmp24^{-/-}*, teñidas con azul de toluidina, que muestran las fibras sensoriales mielinizadas. Micrografías electrónicas (C, D) de las mismas raíces que ilustran la apariencia de las fibras C no mielinizadas. Barras de escala: A, B, 10 μ m; C, D, 1 μ m.

Otra explicación para el fenotipo de hiperalgesia e hipertrofia en las fibras nociceptivas de los ratones mutantes *Mmp24^{-/-}*, podría ser la existencia de una mayor ramificación de las neuronas sensoriales de los DRGs en la médula espinal, que pudiera aumentar sensibilidad del animal a estímulos nociceptivos térmicos, a nivel del sistema nervioso central. Para ello comprobamos si las fibras sensoriales CGRP+ de proyección central abarcaban un área mayor en las láminas I y II del asta dorsal mediante la inmunotinción de cortes coronales de la médula espinal de ratones *Mmp24^{+/+}* y *Mmp24^{-/-}* con anticuerpos que reconocían las proteínas CGRP y neurofilamento 160 kDa (Figura 25 A-D). A continuación medimos el área que ocupaban las fibras nerviosas CGRP+ que además eran negativas para neurofilamento 160 kDa y normalizamos con el área total de la sección coronal de la médula. Los resultados indicaron

que, a pesar del hecho de que las fibras sensoriales CGRP+ son capaces de hiperinervar la piel en los ratones mutantes, su patrón de proyección central a la médula espinal es normal y cuantitativamente similar a la proyección de las fibras de ratones de cepa salvaje (Figura 25 A - E).

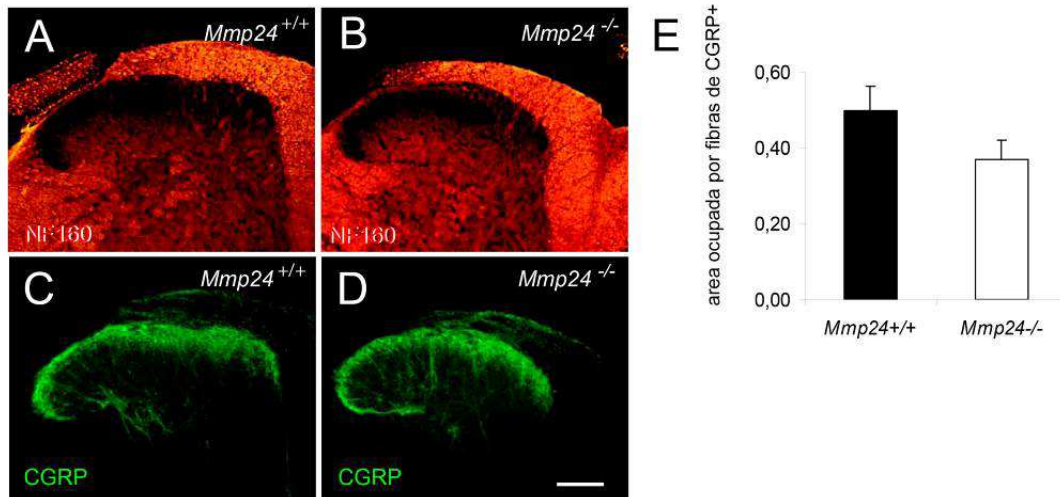


Figura 25. El crecimiento normal del CGRP mutante + fibras centrales en la médula espinal.

(A-D) Micrografías fluorescentes que muestran las astas dorsales en secciones coronales de la médula espinal de ratones adultos *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-} inmunotieñidos para el neurofilamento 160 kDa (NF-160) y CGRP. Obsérvese que en general, el área ocupada por las fibras nerviosas finas CGRP+, procedentes de neuronas sensoriales nociceptivas MT5-MMP+, están prácticamente desprovistas de fibras gruesas NF160+. No se observan diferencias en la presencia o en el área ocupada por las fibras peptidérgicas. (E) Histograma que muestra la cuantificación del área (en mm²) ocupada por las terminaciones nerviosas CGRP+, medido en tres animales adultos independientes por genotipo. Nótese que las fibras deficientes *Mmp24* CGRP+, no hiperinervan la médula espinal, a pesar de ser capaces de tener un crecimiento más extenso en los territorios de la piel. Barras de escala: A-D, 50 μ m.

Una vez estudiado el fenotipo de proyección central, también quisimos contrastar la posibilidad de que la hipertrofia de las fibras CGRP+ en la epidermis pudiera ser consecuencia de una mayor señalización de NGF a través de su receptor de alta afinidad TrkA. En primer lugar comparamos la cantidad de ARNm de *Ngf* que se producía en la piel de animales postnatales y comprobamos por RT-PCR que no existían diferencias significativas entre genotipos (*Ngf*/ β -actin ratio: 1.49 ± 0.11 en ratones *Mmp24*^{+/+} y 1.27 ± 0.13 en ratones *Mmp24*^{-/-}; n = 3 por genotipo). Además, los ensayos *in vitro* realizados con animales neonatales, donde la mayoría de las neuronas sensoriales de los DRGs responden a NGF (Molliver et al., 1997; Baudet et al., 2000), demuestran que tras 48 h no se aprecian diferencias significativas en la supervivencia de las neuronas sensoriales cultivadas en diferentes concentraciones de NGF, ya sean submáximas (0, 0.1, 1 ng/ml) o máximas (10 ng/ml) (el porcentaje de supervivencia neuronal en 10 ng/ml de NGF a las 48 horas, relativo al número total de neuronas presentes en el mismo pocillo 6 horas después de la siembra celular: *Mmp24*^{+/+}, 61.0 ± 3.3 %, n = 7; *Mmp24*^{-/-}, 58.0 ± 7.1 %, n = 6 cultivos independientes). Este resultado indicaba que la viabilidad de esta población de nociceptores en respuesta a NGF no está afectada por la ausencia de la metaloproteasa y, dado que *in vivo* la mutación tampoco altera el número de neuronas

Resultados

sensoriales nociceptivas, podríamos concluir que la carencia de MT5-MMP en la piel produce una mayor ramificación de las fibras termonociceptivas de tipo C.

2.3. MT5-MMP modula el crecimiento neurítico *in vitro*

Para evaluar si la hiperinervación de la piel en los animales mutantes de *Mmp24* era consecuencia de la ausencia de la actividad proteasa en las neuronas sensoriales, realizamos co-cultivos de explantes de piel normal, extraída de las almohadillas plantares de las extremidades traseras del ratón, junto con DRGs *Mmp24*^{+/+} o *Mmp24*^{-/-} aislados de ratones de tres semanas de edad. Los co-cultivos se realizaron en membranas de 0.4 μm de diámetro de poro pre-tratadas con Matrigel, para favorecer la adhesión de ambos tejidos, insertos en pocillos de cultivo de tal forma que el explante de piel permaneciera en contacto con el medio pero sin sumergirlo en profundidad, ya que el carácter impermeable del tejido epidérmico dificulta su inmersión en el medio. Los co-cultivos se mantuvieron durante 6 días *in vitro* (DIV), para asegurar que las neuritas sensoriales llegaran a contactar con el tejido cutáneo. Transcurrido este tiempo se fijaron los co-cultivos y se empleó la tinción con anticuerpos anti-beta-III-tubulina como marcador neuronal específico. En los co-cultivos en los que ambos tejidos eran de genotipo silvestre observamos que las neuritas de los DRGs se aproximan al explante de piel pero en ningún caso se produce la invasión del tejido dérmico (Figura 26A). Sin embargo, las neuritas procedentes de ganglios *Mmp24*^{-/-} invaden el tejido dérmico y son capaces de ramificarse extensamente por todo el tejido cutáneo (Figura 26B). Estos resultados sugieren que la pérdida de MT5-MMP en las neuronas sensoriales de los DRGs altera el crecimiento de sus neuritas en la piel.

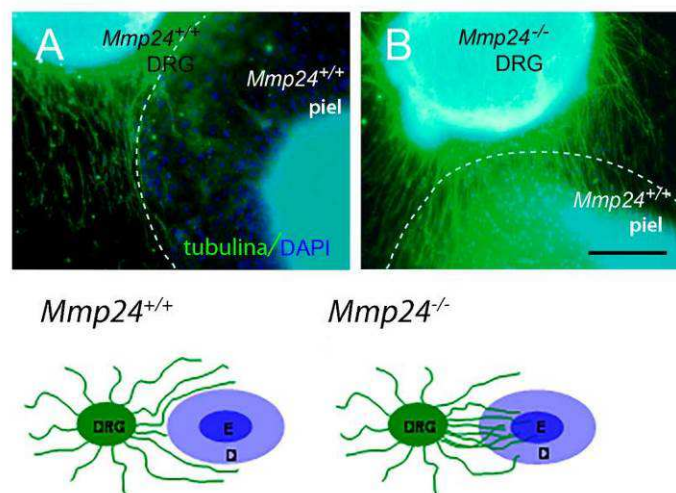


Figura 26. Fenotipo de las neuritas de las neuronas sensoriales de ratones mutantes de *Mmp24* en co-cultivo de explantes de DRGs y piel.

(A, B) Co-cultivos de explantes de DRGs aislados de ratones *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-} de tres semanas de edad con fragmentos aislados de piel de tipo salvaje, después de seis días *in vitro*. Las neuritas están marcadas con una inmunotinción para tubulina neuronal β -III (verde) y el tejido se tiñó con marcador nuclear DAPI. Barras de escala: a, b, 200 μm .

A continuación intentamos determinar si el fenotipo de hiperinervación epidérmica de los animales *Mmp24*^{-/-} era la consecuencia de un mayor crecimiento neurítico en sus neuronas nociceptivas. Para ello realizamos cultivos primarios de neuronas sensoriales disociadas a partir de los DRGs de animales neonatales *Mmp24*^{+/+} o *Mmp24*^{-/-} (Figura 27). Cultivamos las neuronas sobre diferentes sustratos de adhesión (laminina, poli-D-lisina, colágeno tipo IV, Matrigel o gelatina) y en presencia de 10 ng/ml de NGF durante 48 h. Tras este periodo de tiempo fijamos las neuronas y las marcamos con anti-beta-III-tubulina para poder identificar con claridad su citoesqueleto. En todas las condiciones observamos que las neuronas de los animales mutantes mostraban una mayor ramificación de sus neuritas (Figura 27A). Para cuantificar la complejidad de la ramificación de las células, seleccionamos las neuronas sembradas sobre colágeno y analizamos 100-150 neuronas por cada cultivo independiente. Cuantificamos, mediante análisis de imagen, el número de neuritas primarias y secundarias y determinamos que los cultivos obtenidos a partir de los animales mutantes *Mmp24*^{-/-} presentaban un incremento significativo del número de neuronas NGF-dependientes que tenían más neuritas secundarias y, por lo tanto, una mayor arborización (Figura 27A-D y 28A). En general, esta mayor arborización estaba asociada a un incremento en el número de varicosidades a lo largo de las neuritas.

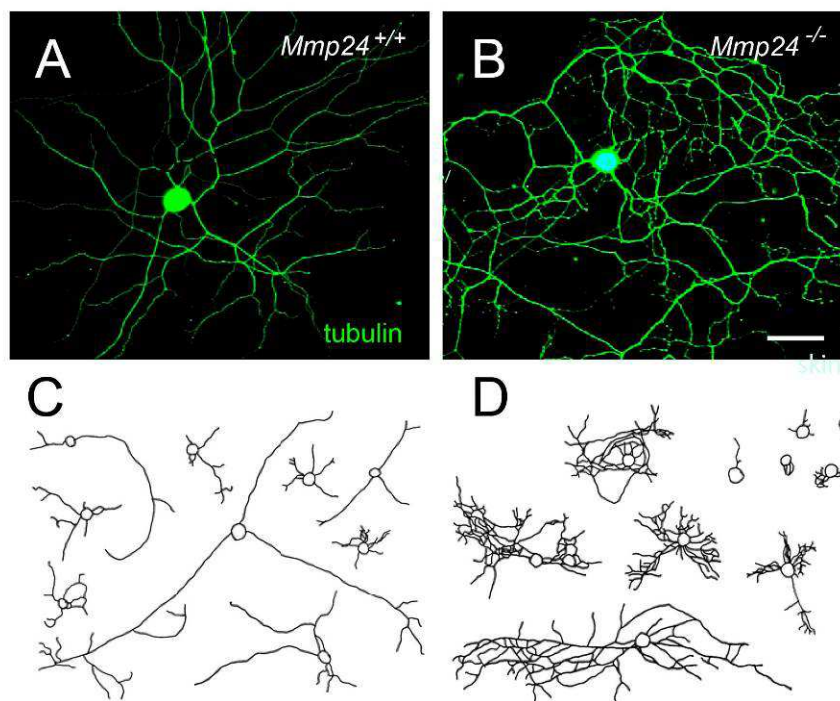


Figura 27. Fenotipo de las neuritas de las neuronas sensoriales mutantes de *Mmp24*.

(A, B) Neuronas de DRGs neonatales aisladas de ratones *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-} sembradas en placas con colágeno, se cultivaron durante 2 días en presencia de 10 ng / ml de NGF, fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos frente a la tubulina neuronal. Se observa que las neuronas *Mmp24*^{-/-} están más profusamente ramificadas. (C, D) Dibujos de varios ejemplos de neuronas *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-} para ilustrar los cambios en la morfología

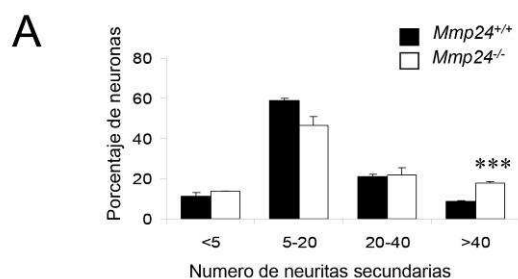
Las varicosidades de las neuritas están asociadas a los procesos de elongación o retracción del cono de crecimiento como consecuencia de la despolimerización de los

Resultados

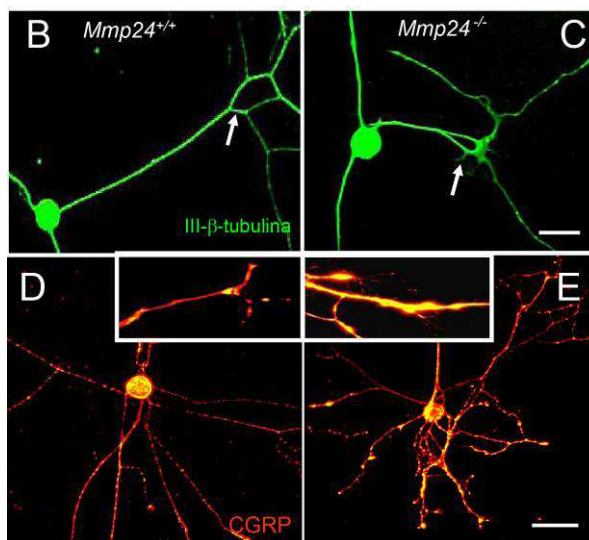
microtúbulos del citoesqueleto durante la neuritogénesis (Jacobs et al., 1986; Ahmad et al., 2000); además, se había descrito previamente la presencia de la proteína MT5-MMP en el cono de crecimiento axónico de neuronas en cultivo (Hayashita- Kinoh et al., 2001; Monea et al., 2006), datos que sugieren la implicación de esta metaloproteasa en la regulación del comportamiento del cono axónico. También acorde con estos resultados, observamos que nuestros cultivos *Mmp24*^{-/-} presentaban mayores proporciones de conos de crecimiento con múltiples filopodios que, a su vez mostraban abundantes expansiones finas a modo de nuevos crecimientos axónicos, cuando se los comparaba con los cultivos *Mmp24*^{+/+} ($12.8 \pm 2.2\%$ conos de crecimiento complejos en *Mmp24*^{+/+} vs $35.7 \pm 4.3\%$ en *Mmp24*^{-/-}; $n = 3$ cultivos independientes por genotipo, $P < 0.05$; Figura 28B y C). Cuando marcamos las neuronas nociceptivas con anticuerpos anti-CGRP o con la lectina IB4, para distinguir entre las dos poblaciones principales de nociceptores térmicos, observamos que los cambios en el patrón de ramificación que acabamos de describir se producían en la población CGRP+ pero no en la IB4+ (Figura 28D y E). Todo esto sugería que la hipertrofia de las fibras nerviosas CGRP+ que se observaba en la piel intacta de los animales mutantes es consecuencia de un proceso autónomo celular de mayor actividad neuritogénica.

Figura 28. Medida del crecimiento neurítico en las neuronas sensoriales *Mmp24*.

(A) Cuantificación de los números relativos de neuronas por neuronas inmunoteñidas con el marcador neuronal tubulina en función de su producción de neuritas secundarias, en cultivos *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-}. Las neuronas



mutantes están más ramificadas, como se refleja por el aumento significativo de los porcentajes de neuronas mutantes *Mmp24*^{-/-} que entran dentro del rango de "más de 40 neuritas secundarias", comparado los tipos silvestres ($n = 3$ cultivos independientes por genotipo; 100-150 neuronas registradas por cultivo; ***, $P < 0.001$). (B) Los ejemplos representativos de la alteración en la morfología de las neuritas *Mmp24*^{-/-} en crecimiento, en el punto de bifurcación, caracterizado por extensiones de membrana. (C) Neuronas de los DRGs neonatales, aisladas de ratones *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-}, sembradas en placas con colágeno y cultivadas durante 2 días en presencia de 10 ng / ml de NGF, fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos frente a CGRP. Las neuronas nociceptivas peptidérgicas en cultivos de mutantes estaban ramificadas más profusamente y sus conos de crecimiento presentaban morfologías anormales caracterizadas por filopodios supernumerarios (inserciones). Barra de escala (B-C): 25 μ m



2.4. MT5-MMP está implicada en la respuesta al dolor térmico agudo

Basándonos en los resultados previos del laboratorio del Dr. López-Otín en colaboración con el laboratorio de farmacología del Dr. Luis Menéndez, que indicaban que los animales mutantes mostraban una mayor respuesta ante un estímulo nociceptivo térmico de tipo agudo (Anexo: Folgueras et al., 2009), quisimos comprobar si esta respuesta era un mecanismo autónomo celular.

El receptor vaniloide TRPV1 o VR1, es un canal de cationes no selectivo que participa en la señalización del dolor térmico. VR1 es capaz de detectar señales físicas o químicas que desencadenan la apertura del canal y, de esa manera, la afluencia de iones Ca^{2+} al interior de la célula. VR1 se activa a 43 °C de temperatura pero también mediante la unión a capsaicina, una molécula extraída de la guindilla que pertenece a la familia de los capsaicinoides (Caterina et al., 1997). Para analizar la respuesta de las neuronas sensoriales al dolor agudo realizamos ensayos de movilización del Ca^{2+} intracelular a tiempo real, mediante pulsos cortos de capsaicina en cultivos de neuronas sensoriales disociadas de DRGs neonatales. Los registros de flujo de Ca^{2+} mostraron que tras un único estímulo de 20" con capsaicina 300 nM, en los cultivos *Mmp24*^{-/-} respondían un 40% más de neuronas que en los normales (37.8 ± 5.0 % de neuronas en *Mmp24*^{+/+}, n = 5, vs 66.2 ± 1.4 % en *Mmp24*^{-/-}; n = 3; $P < 0.01$). Ya que una posible explicación podría ser que MT5-MMP regulara el receptor de capsaicina, comparamos los niveles de TRPV1 en DRGs y en BMMCs (ver apartado *Mmp24*^{-/-} y *Mmp24*^{+/+} sin detectar ningún cambio aparente ni en la cantidad ni en procesamiento de la proteína (Figura 29A y B).

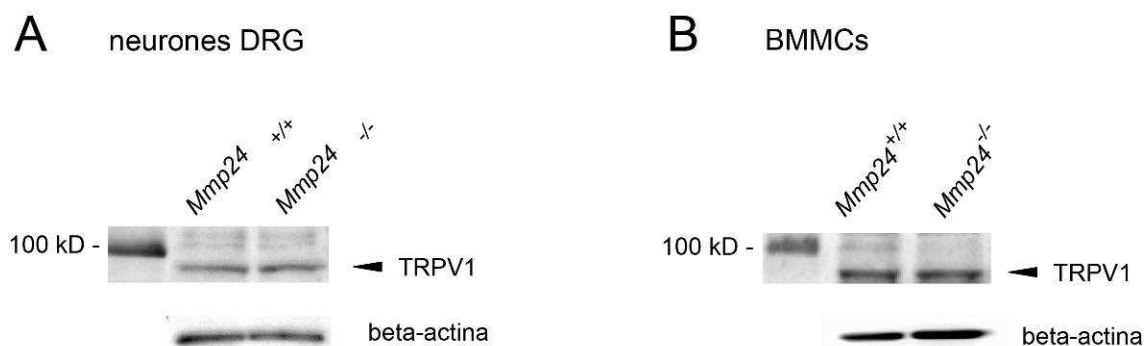


Figura 29. Los niveles normales de TRPV1 en neuronas sensoriales y mastocitos deficientes en Mmp24. (A) Lisados de los DRGs aislados de ratones adultos *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-} analizados por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos contra el dominio intracelular N-terminal del receptor de la capsaicina, TRPV1, y para β -actina que se usa como control de carga. (B) Lisados de BMMCs adultos, *Mmp24*^{+/+} y *Mmp24*^{-/-}, analizados por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos contra el dominio intracelular N-terminal del receptor de la capsaicina TRPV1 y para β -actina que se usa como control de carga. Se observa que no hay cambios aparentes en los niveles del receptor de la capsaicina.

2.5. MT5-MMP modula el procesamiento de la N-cadherina

Nuestros datos indican que las neuronas sensoriales mutantes de *Mmp24* tienen alteraciones en el crecimiento neurítico caracterizado por una mayor ramificación en la piel y que su fenotipo se mantiene *in vitro* indicando que se trata de un mecanismo autónomo celular. Estudios previos muestran que la actividad enzimática de MT5-MMP es capaz de procesar a la molécula de adhesión N-cadherina cuando ambas son sobre-expresadas en células heterólogas,

Resultados

generando un fragmento C-terminal de bajo peso molecular (≈ 35 kDa) (Monea et al., 2006). Así mismo, se ha demostrado que la N-cadherina juega un papel importante en la estabilización de las ramificaciones de las neuritas y que el aumento de la β -catenina que interacciona con ella en el citoplasma desencadena la formación de árboles neuríticos hipertróficos en neuronas hipocampales en cultivo (Yu y Malenka et al., 2003; Ye y Jan et al., 2005). Estos resultados sugerían una posible interacción de ambas moléculas en nuestro sistema para regular la neuritogénesis.

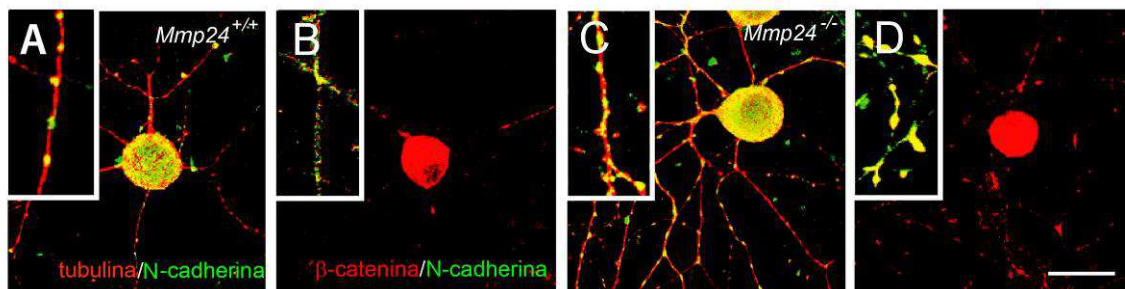


Figura 30. Aumento de los niveles de N-cadherina en ausencia de MT5-MMP.

(A, C) Neuronas de los DRGs aisladas de ratones *Mmp24*^{+/+} (A) y *Mmp24*^{-/-} (C) sembradas sobre colágeno en placas y cultivadas durante 2 días en presencia de 10 ng/ml de NGF, fijadas y marcadas con anticuerpos para tubulina neuronal (rojo) y N-cadherina (verde). Se observa que los focos de expresión N-cadherina son más abundantes en las neuritas de neuronas mutantes. El recuadro muestra un tramo de una neurita marcada a mayor aumento. (B, D) Neuronas neonatales de los DRGs aisladas de ratones *Mmp24*^{+/+} (B) y *Mmp24*^{-/-} (D) sembradas sobre colágeno en placas y cultivadas durante 2 días en presencia de 10 ng/ml de NGF, fijadas y marcadas con anticuerpos para N-cadherina (verde) y de β -catenina (rojo). Se observa que los axones de las neuronas mutantes exhiben una mayor inmunorreactividad. En el recuadro se observa un tramo de una de las neuritas marcada con un mayor aumento, que muestra co-localización en varicosidades. Barras de escala: A-D 20 μ m.

Para comprobarlo, realizamos, en primer lugar, un análisis inmunocitoquímico en cultivos de ambos genotipos y observamos que las neuronas *Mmp24*^{-/-} exhibían más agregados de N-cadherina a lo largo de sus neuritas que las neuronas de genotipo silvestre (Figura 30A y C). Ya que esta diferencia podía ser una consecuencia de la mayor ramificación de las neuritas de las neuronas mutantes, realizamos un análisis del procesamiento de la N-cadherina mediante western blot en homogenados obtenidos a partir de explantes de DRGs adultos de ambos genotipos, cultivados durante 6 días para favorecer una elevada neuritogénesis. Los resultados mostraban una reducción significativa en los niveles de varios fragmentos intracelulares C-terminales en las muestras procedentes de ratones *Mmp24*^{-/-} y un aumento en la forma completa de la N-cadherina (Figura 31A). Además, observamos un aumento en los niveles de la proteína β -catenina en las neuronas mutantes tanto por western blot como por inmunocitoquímica (Figuras 30B, D y 31A), consecuente con los datos previos ya que una mayor presencia de forma completa de N-cadherina en la membrana citoplasmática impediría su degradación.

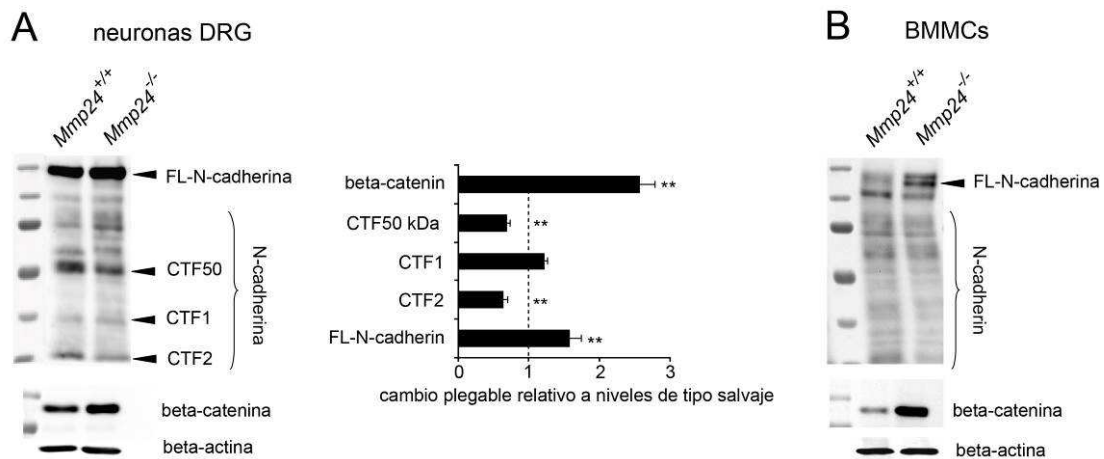


Figura 31. Reducción en el procesamiento de N-cadherina y aumento de los niveles de β -catenina en neuronas sensoriales y mastocitos deficientes en *Mmp24*.

(A) Lisados de explantes de DRG adultos analizados por SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo para el dominio intracelular de N-cadherina. (A) Se puede observar en ambos genotipos tanto la proteína completa (135 kDa) como varios de los fragmentos intracelulares de N-cadherina, pero los niveles de los fragmentos intracelulares escindidos, CTF2 y CTF50 kDa, se reducen significativamente (en relación con β -actina) en células aisladas a partir de ratones mutantes comparados con los de los animales de tipo salvaje, mientras que los niveles de la forma completa se incrementan en las muestras mutantes ($n = 4-7$ experimentos independientes). Los niveles de β -catenina se incrementan significativamente en las neuronas mutantes en relación con tipos salvajes ($n = 4$). (B) Lisados de BMMCs cultivadas analizados por SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo para el dominio intracelular de N-cadherina. Al igual que en las neuronas de los DRG, los niveles de N-cadherina completa (135 kD) se incrementan significativamente (en relación con β -actina) en las células de los ratones de mutantes en comparación con los de los animales de tipo salvaje, mientras el nivel de varias formas escindidas se incrementan en las muestras salvajes ($n = 3$ experimentos independientes). Los niveles de β -catenina también se incrementan significativamente en las BMMCs de mutantes en relación con tipos silvestres.

3. La metaloproteasa MT5-MMP está relacionada con la interacción entre los mastocitos y las fibras nerviosas nociceptivas.

Las neuronas sensoriales peptidérgicas CGRP+ participan en la potenciación de la respuesta nociceptiva durante los procesos inflamatorios de la piel. Los estudios de comportamiento realizados en el laboratorio del Dr. Lopez-Otín indicaban que los animales mutantes de *Mmp24* no solo mostraban una mayor respuesta ante un estímulo nociceptivo térmico de tipo agudo sino que, sorprendentemente, tras la inducción de un proceso inflamatorio mediante la inyección intraplantar de carragenina, los animales mutantes carecían de respuesta hiperalgésica a estímulos térmicos.

Basándonos en estos resultados decidimos analizar los mecanismos celulares que regulan la sensibilización periférica durante los procesos inflamatorios. Se ha descrito que, a pesar de que la propia neurotrofina NGF es capaz de sensibilizar a los nociceptores de una forma autónoma celular, este efecto hiperalgésico se reduce en gran medida evitando la desgranulación de los mastocitos presentes en este entorno inflamatorio, mediante la aplicación de un compuesto específico denominado 48/80. Esto sugiere que los mastocitos son necesarios para permitir que el NGF tenga un efecto completo sobre los terminales nociceptivos (Lewin et al., 1994; Rueff y Mendell, 1996). Por lo tanto, decidimos analizar las características y la dinámica de los mastocitos presentes en muestras de piel de animales *Mmp24*^{-/-} y *Mmp24*^{+/+} y su interacción con los terminales nerviosos nociceptivos.

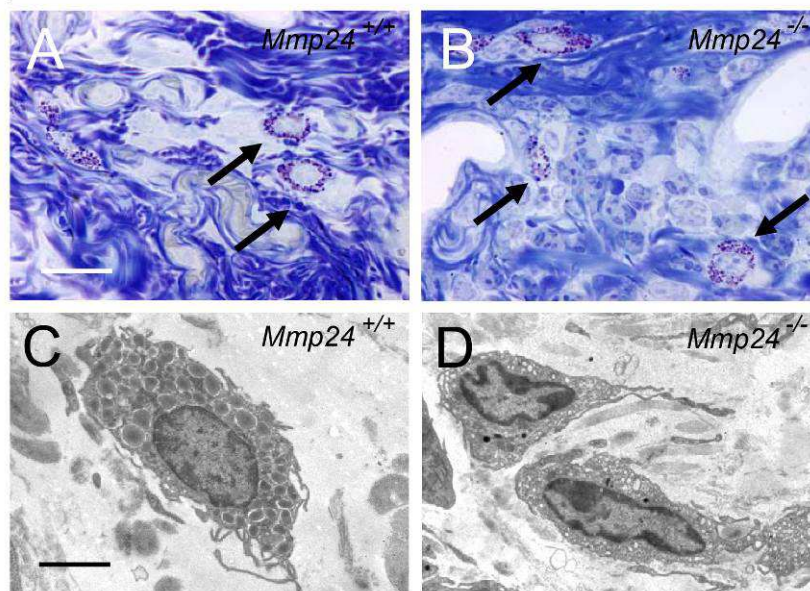
3.1. MT5-MMP está implicada en la regulación del proceso de “de-granulación” de los mastocitos

Para determinar un posible fenotipo histológico en los animales mutantes, comparamos la piel de las almohadillas plantares de animales *Mmp24^{-/-}* y *Mmp24^{+/+}* mediante observación de cortes de 2 μm de tejido previamente incluido en resina epoxi y posteriormente teñido con azul de toluidina (Figura 32A y B); de esta manera, la metacromasia propia de los mastocitos nos permitió observar en el microscopio óptico que, aparentemente, no existían diferencias en el número de células cebadas teñidas con el colorante entre las muestras de ratones de cepa salvaje y las de ratones mutantes a pesar de la presencia de un mayor número de fibras nerviosas peptidérgicas (Figura 32 A y B). A continuación seleccionamos cortes y regiones equivalentes entre ambos genotipos y obtuvimos cortes ultrafinos de 60 nm a partir de los cortes semifinos de 2 μm de grosor para poder observar la ultraestructura de la piel en el microscopio electrónico de transmisión (Figura 32C y D). Esto nos reveló que, en realidad, existía una mayor cantidad de mastocitos en la piel mutante que no podríamos haber observado en el microscopio óptico mediante la tinción metacromática ya que las células habían iniciado o culminado su proceso de “de-granulación” (Figura 32C y D). Por lo tanto podemos concluir que la dermis de los ratones *Mmp24^{-/-}* posee una superpoblación de mastocitos mutantes que se encuentran irregularmente “de-granulados”.

Ya que la degranulación de los mastocitos puede ser inducida de forma experimental mediante la aplicación tópica de capsaicina sobre preparaciones de mesenterio *in vivo*, tal como se describe en el trabajo de Ito et al. en el año 2007, decidimos emplear esta aproximación para analizar la capacidad de degranulación de los mastocitos en ratones *Mmp24^{-/-}*, de forma funcional y fisiológica (Figura 32E y F). Este experimento fue realizado aplicando capsaicina a 5 μM o suero salino sobre los mesenterios expuestos de animales adultos *Mmp24^{-/-}* y *Mmp24^{+/+}* anestesiados. A continuación los animales fueron sacrificados para proceder a la extracción, fijación y tinción metacromática de los mesenterios con violeta de cresilo, y finalmente se analizó el número total de mastocitos y el de mastocitos “de-granulados” con y sin tratamiento con capsaicina en ambos genotipos. En condiciones basales, observamos que el número total de mastocitos era similar en los ratones *Mmp24^{-/-}* y *Mmp24^{+/+}* pero, sorprendentemente, el porcentaje de células cebadas “de-granuladas” era muy superior en los ratones mutantes en comparación con los ratones de la cepa salvaje ($62.1 \pm 4.0\%$ vs $17.4 \pm 0.7\%$, respectivamente, $n = 3$ animales por genotipo, $P < 0.001$; (figura 32E y F). Tras la administración exógena de capsaicina, los mastocitos de los animales *Mmp24^{+/+}* respondieron de la manera esperada ya que, tal y como se había descrito previamente (Ito et al., 2007), el porcentaje de “de-granulación” aumentó aproximadamente en un 50% (27.2 ± 2.6 , $n = 3$; $P < 0.05$; Figura 33). Sin embargo, en los animales *Mmp24^{-/-}* no observamos ningún incremento en el porcentaje de “de-granulación” de las células cebadas tras el tratamiento con capsaicina (52.5 ± 1.7 , $n = 3$; $P < 0.07$; datos no mostrados en la figura 32). Estos datos sugirieron que las alteraciones en la “de-granulación” basal de los mastocitos mutantes podrían ser la causa que

impide la acción exógena de la capsaicina sobre los mismos, ya que los niveles de “degranulación” basal de los ratones mutantes son *per se* muy superiores a los observados en los ratones *Mmp24^{+/+}* tratados con capsaicina.

Mastocitos cutáneos



Mastocitos mesentéricos

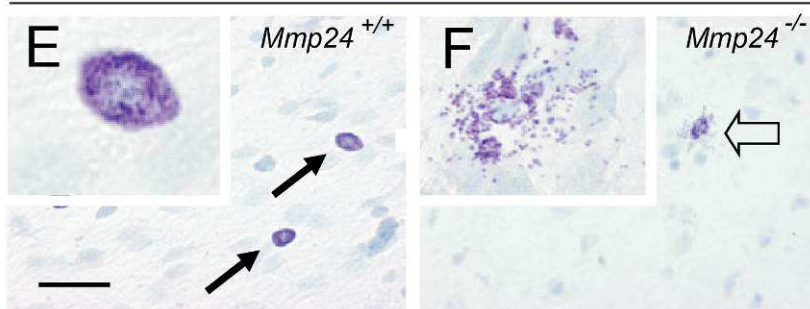


Figura 32. Alteración de las respuestas a capsaicina y degranulación de mastocitos en ratones deficientes en *Mmp24*.

A, B) Secciones de resina de 1 micra de grosor de la dermis de ratones adultos *Mmp24^{+/+}* y *Mmp24^{-/-}*, teñidas con azul de toluidina en las que se pueden distinguir varios mastocitos por su tinción metacromática granular de color púrpura (flechas). Micrografías electrónicas (C, D) de mastocitos en la dermis de ratones adultos *Mmp24^{+/+}* y *Mmp24^{-/-}*. Nótese la presencia normal de los gránulos característicos en el citoplasma del mastocito del tipo salvaje, frente a los gránulos vacíos en las células mutantes. Estos mastocitos degranulados se observaron frecuentemente en las muestras mutantes. (E, F) Preparaciones de mesenterio completo de ratones adultos *Mmp24^{+/+}* y *Mmp24^{-/-}*, teñido con azul de toluidina, en el que varios mastocitos normales (flechas) y mastocitos degranulados (flecha vacía) se pueden diferenciar por su tinción granular púrpura metacromática (flechas). En campos de mayor aumento (E, F) se pueden observar en las inserciones de los mastocitos desgranulados, más frecuentes en los ratones mutantes.

3.2. Obtención de mastocitos maduros a partir de cultivos de médula ósea (BMMCs)

Para estudiar la interacción entre las neuronas sensoriales y los mastocitos de animales *Mmp24^{-/-}* y *Mmp24^{+/+}*, decidimos diseñar un método experimental que nos permitiera aislar y cultivar *in vitro* estos dos tipos celulares; de esta forma podríamos observar e interferir en el mecanismo mediante el cual se regula su relación célula-célula y estudiar el efecto de la mutación en los propios mastocitos. Para ello, establecimos cultivos de mastocitos maduros derivados de cultivos de células inmaduras procedentes de la médula ósea. El objetivo era seleccionar y permitir la maduración *in vitro* del linaje mieloide de la progenie hematopoyética.

Tras extraer y limpiar el fémur de los ratones procedimos al vaciado de la cavidad medular mediante la inyección a presión de medio de cultivo atemperado a través de la misma; de esta forma se consigue la extracción casi total de las células de la médula ósea. A continuación, las cultivamos a una densidad de 4×10^5 células/ml sin necesidad de usar ningún tipo de sustrato de adhesión ya que una fracción de las células es capaz de adherirse espontáneamente al frasco de cultivo mientras que otra fracción se mantiene en suspensión. Ambas fracciones tienen capacidad proliferativa pero es esta última fracción la que se sub-cultiva cada 3-4 días en presencia de IL-3, ya que estudios previos demuestran que es ésta la población que permite la obtención de un cultivo de mastocitos enriquecido en un 98%, tras un periodo de 4 semanas de diferenciación *in vitro* (Jeffrey et al., 2006). Transcurrido este periodo, y una vez establecido el cultivo de BMMCs (mastocitos derivados de la médula ósea; del inglés *bone marrow mast cell*), se mantuvo como máximo hasta las 9 semanas *in vitro* pasando las células cada 3 días para renovar su medio de cultivo. La identidad de las células se caracterizó mediante criterios morfológicos, citoquímicos y ultraestructurales. Su morfología general se observó mediante tinciones de violeta de cresilo que permitían detectar, a su vez, la metacromasia propia de estos tipos celulares. Además, realizamos comprobaciones citoquímicas para la detección y evaluación del grado de maduración de los BMMCs mediante complejos de avidina marcada como la Cy3-streptoavidina (ver Figura 33B), ya que se ha demostrado que las células cebadas se pueden detectar gracias a que sus gránulos contienen biotina. Por último, recogimos las células cultivadas y las procesamos para su análisis en microscopía electrónica, lo que nos permitió el estudio de su ultraestructura y la confirmación de que prácticamente la totalidad de las células del cultivo poseían todas las características propias de los mastocitos maduros.

3.3. Estudio de las interacciones celulares entre mastocitos y neuronas sensoriales

Nuestros resultados sugerían que las interacciones entre las neuritas y las células inmunes son funcionalmente anormales en la piel de los ratones mutantes *Mmp24^{-/-}*. Para estudiar las posibles interacciones de los mastocitos y las neuronas sensoriales, así como analizar los efectos de la mutación en *Mmp24* en las propias células cebadas, empleamos los cultivos de BMMCs de ambos genotipos para compararlos y observar las diferencias en su fenotipo. En primer lugar comprobamos que los BMMCs maduros expresaban la proteína MT5-MMP y para

ello realizamos una doble tinción fluorescente con anticuerpos anti-MT5-MMP que fueron detectados con inmunofluorescencia y con estreptoavidina conjugada con un fluoróforo distinto. Observamos que los BMMCs son inmunopositivos para MT5-MMP pero que no todos ellos presentan el mismo nivel de expresión (Figura 33A). En cultivos aislados de BMMCs comprobamos, mediante la tinción metacromática de los orgánulos de los mastocitos, que el porcentaje de “de-granulación” era similar en cultivos salvajes ($16.3 \pm 2.5 \%$, $n = 3$ cultivos a partir de animales independientes) y en cultivos mutantes ($19.5 \pm 3.5 \%$, $n = 2$), lo que indicaba que la falta de MT5-MMP no afecta de forma directa la “de-granulación” basal de los mastocitos. Por lo tanto, y a pesar de la presencia de MT5-MMP en las células cebadas, todos estos resultados juntos sugieren que el fenotipo de “de-granulación” observado en los animales mutantes es debido a alteraciones en las interacciones entre los mastocitos y las neuronas sensoriales y no a un proceso autónomo-celular de los propios mastocitos.

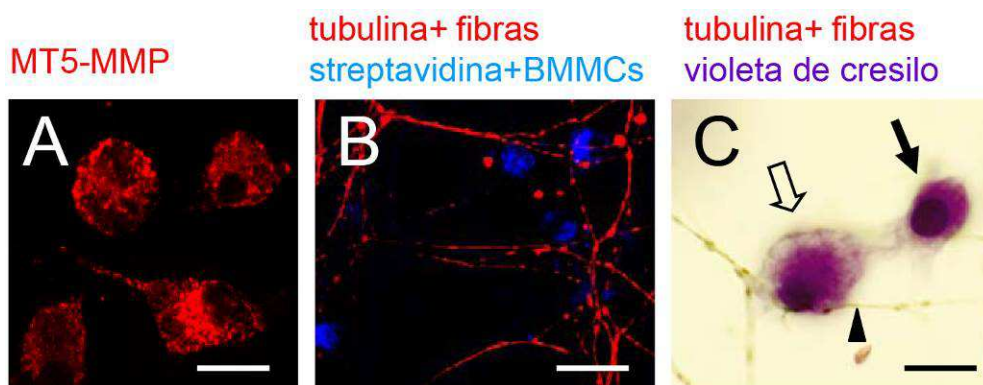


Figura 33. Expresión in vitro de MT5-MMP en DRGs y BMMCs.

(A) BMMCs diferenciado in vitro muestra inmunoreactividad para la tinción MT5-MMP (rojo). (B) Los co-cultivos de neuronas aisladas de DRGs y BMMCs de ratones adultos, de tipo salvaje, marcadas con anticuerpos contra el marcador neuronal tubulina (rojo) y con estreptoavidina (azul) que une específicamente gránulos de los mastocitos, utilizando técnicas fluorescentes. (C) Los co-cultivos de neuronas aisladas de DRGs y BMMCs de ratones adultos de tipo salvaje inmunoteñida para tubulina, utilizando peroxidasa (marrón) y contrastados con violeta de cresilo que permite la distinción metacromática de los gránulos de los mastocitos y su degranulación. Cabe destacar las neuritas tubulina + (cabeza de flecha) que entran en estrecho contacto con los mastocitos. Los puntos con flecha negra en un mastocito no-desgranulado, homogéneamente púrpura, mientras que la flecha vacía indica un mastocito degranulado con los gránulos blancos característicos, próximos a la superficie celular. Barras de escala: A, C, $10 \mu\text{m}$; B, $20 \mu\text{m}$

Llegados a estas conclusiones decidimos analizar en profundidad estas interacciones neuro-inmunes mediante el co-cultivo de ambos tipos celulares procedentes de animales *Mmp24^{-/-}* y *Mmp24^{+/+}* (Figura 34). Para ello, desarrollamos dos tipos de experimentos *in vitro*. En el primero, números equivalentes de BMMCs diferenciados y maduros de cada genotipo fueron añadidos a cultivos de explantes de DRGs procedentes de ratones *Mmp24^{-/-}* y *Mmp24^{+/+}* adultos, que habían sido mantenidos *in vitro* durante 5 días para permitir la suficiente elongación y ramificación de sus neuritas. Cuatro co-cultivos independientes de cada combinación de genotipos fueron fijados para su posterior análisis tras tres días de interacción entre los diferentes tipos celulares. Los mastocitos fueron detectados mediante su marcaje con estreptoavidina conjugada con Cy3 y las neuronas sensoriales mediante anticuerpos específicos que reconocían la tubulina neuronal, lo que nos permitía observar todo el árbol neurítico de cada explante en fluorescencia (datos no mostrados). Los resultados mostraron que muchos más mastocitos de ambos genotipos se encontraban más adyacentes a las neuritas mutantes

Resultados

que a las de la cepa salvaje. Sorprendentemente, aquellos co-cultivos formados por BMMCs y explantes de DRGs ambos *Mmp24*^{-/-}, presentaban densidades de células marcadas con streptoavidina mucho mayores que aquellos co-cultivos en los que interaccionaban BMMCs salvajes con DRGs mutantes. Esta observación, que evidencia que el fenotipo mutante neuro-inmune es mucho más intenso cuando la interacción se produce entre mastocitos y neuronas sensoriales que carecen ambas de la proteína MT5-MMP, sugiere que la metaloproteasa es responsable de la regulación de este proceso.

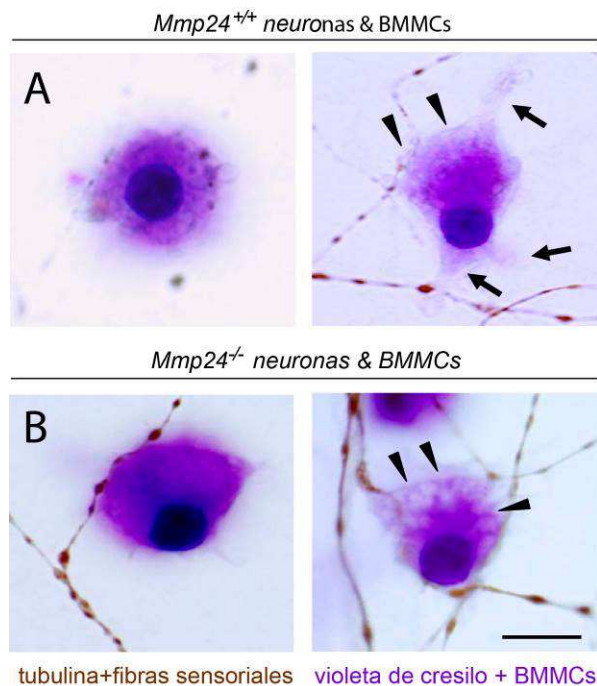


Figura 34. Contactos físicos alterados entre los mastocitos mutantes de *Mmp24*.

Micrografías representativas de cocultivos de BMMCs y neuronas disociadas de DRGs adultos, en combinaciones *Mmp24*^{+/+}/*Mmp24*^{-/-} (A) y *Mmp24*^{-/-}/*Mmp24*^{-/-} (B). Las fibras sensoriales se marcaron con anticuerpos para la tubulina neuronal usando métodos de detección a base de peroxidasa, y los mastocitos se tiñeron con violeta de cresilo. Se puede observar que las fibras mutantes tienen varicosidades más grandes y están más estrechamente unidas a los mastocitos. En los co-cultivos en los que ambos elementos son de tipo salvaje, estos están generalmente más separados y los mastocitos extienden procesos que parecen acercarse a las fibras (flechas). Los paneles de la derecha representan BMMCs maduros no degranulados y los paneles de la izquierda, muestran BMMCs maduros degranulados (las puntas de flecha apuntan a gránulos vacíos). Barra de escala: 10µm.

En el segundo tipo de experimentos cultivamos BMMCs sobre neuronas sensoriales disociadas procedentes de DRGs adultos, que habían sido previamente mantenidas *in vitro* durante 5 días para permitir, al igual que en los experimentos de los explantes, la elongación y ramificación de su árbol neurítico (Figura 34). Los co-cultivos se fijaron tras 3 días de incubación, fueron marcados mediante inmunocitoquímica con anticuerpos contra la proteína neuronal tubulina, usando un método de detección basado en la reacción enzimática de la peroxidasa, y posteriormente teñidos con violeta de cresilo para poder así identificar los BMMCs y su grado de "de-granulación". Tras el análisis, los resultados mostraban que, en los co-cultivos donde interaccionaban BMMCs *Mmp24*^{+/+} y neuronas *Mmp24*^{+/+} (Figura 34A), las células inmunes parecían extender procesos hacia las fibras sensoriales, aparentemente buscando un contacto, pero la mayoría de las fibras se encontraban alejadas de los mastocitos. Sin embargo, en el caso de los co-cultivos en los que interaccionaban mastocitos y neuronas sensoriales mutantes, las fibras siempre se aproximaban más y parecían entrar en contacto con las células cebadas (Figura 34B).

Tras observar este comportamiento en las fibras mutantes nos propusimos evaluar si estos cambios morfológicos eran funcionalmente relevantes o no. Para ello, estudiamos la “de-granulación” de los BMMCs co-cultivándolos con las neuronas sensoriales disociadas en todas las combinaciones posibles de genotipos y en diferentes condiciones (Figura 34; Tabla 5). En los co-cultivos de neuronas y BMMCs *Mmp24^{+/+}* el porcentaje de mastocitos “de-granulados” era muy bajo (Tabla 5) y prácticamente idéntico al que obtuvimos en los cultivos independientes de BMMCs de cepa salvaje o mutante (ver datos previos) pero, al tratar los co-cultivos 1 hora con capsaicina 1 μ M, la mayoría de los mastocitos se “de-granularon”. Sin embargo, en el caso de los co-cultivos de BMMCs y neuronas *Mmp24^{-/-}*, el porcentaje de mastocitos “de-granulados” alcanzaba directamente el 70% en ausencia de capsaicina exógena (Tabla 5) y, tras el tratamiento con capsaicina, no obteníamos ningún aumento en la tasa de “de-granulación” de los mismos. Estos resultados son similares a los que obtenidos en el estudio *in vivo* de los mesenterios de los ratones mutantes y, por lo tanto, indican que las interacciones neuro-inmunes que se producen en los ratones *Mmp24^{-/-}* dan lugar a respuestas irregulares en la “de-granulación” de los mastocitos. Una posible explicación para justificar estos resultados también podría ser que MT5-MMP fuera capaz de regular de forma directa o indirecta al receptor vaniloide de la capsaicina TRPV1 pero tal como hemos descrito anteriormente (Figura 29), estudiamos los niveles de expresión del mismo en las neuronas sensoriales de los DRGs y en los BMMCs de ambos genotipos y no observamos ninguna diferencia significativa. Curiosamente, en los co-cultivos en los que cualquiera de los dos, bien los BMMCs o bien las neuronas sensoriales, eran mutantes, la interacción provocaba un fenotipo intermedio (Tabla 5), lo que sugería que la mutación afecta a la interacción entre ambos tipos celulares. Además en estos casos intermedios, el tratamiento con capsaicina aumentaba al 70% el porcentaje de mastocitos degranulados igual que en el caso de los co-cultivos *Mmp24^{+/+}/Mmp24^{+/+}*.

Co-cultivo		Tratamiento		
Neuronas DRG	BMMC	vehículo	capsaicina	NGF
<i>Mmp24^{+/+}</i>	<i>Mmp24^{+/+}</i>	15.8 \pm 1.0	56.5 \pm 7.3	61.1 \pm 8.9
<i>Mmp24^{+/+}</i>	<i>Mmp24^{-/-}</i>	31.3 \pm 2.7	47.9 \pm 6.2	50.9 \pm 13.4
<i>Mmp24^{-/-}</i>	<i>Mmp24^{+/+}</i>	44.7 \pm 4.9	68.2 \pm 1.7	65.2 \pm 5.1
<i>Mmp24^{-/-}</i>	<i>Mmp24^{-/-}</i>	76.0 \pm 3.7	80.1 \pm 5.0	60.7 \pm 3.1
n		4	4	3

Tabla 5 Porcentaje de mastocitos degranulados (BMMCs) en co-cultivos de neuronas disociadas de DRGs adultos y BMMCs, de diferentes genotipos y con diferentes tratamientos.

Capsaicina: 1 μ M. NGF: 100 ng/ml. “n”: número de experimentos independientes (cultivos de animales diferentes) por genotipo.

Todos los resultados obtenidos en los experimentos de los co-cultivos neuro-inmunes demuestran que, tanto las interacciones morfológicas como las interacciones funcionales que tienen lugar de forma espontánea entre mastocitos y fibras sensoriales de los DRGs *in vitro*, se encuentran alteradas en ausencia de la proteína MT5-MMP, un hecho que podemos correlacionar con los datos obtenidos en el estudio *in vivo* de los mesenterios intactos.

Basándonos en los resultados previos del laboratorio del Dr. López-Otín, en colaboración con el laboratorio de farmacología del Dr. Luis Menéndez, que demostraban mediante ensayos de comportamiento que la ausencia de MT5-MMP también alteraba la respuesta hiperalgésica térmica mediada por NGF (Lewin et al., 1994; Rueff y Mendell, 1996), intentamos analizar si existía una relación entre este fenotipo comportamental de los ratones *Mmp24^{-/-}* ante la presencia de moléculas mediadoras en el proceso hiperalgésico y el fenotipo neuro-inmune *in vitro*. Para ello procedimos a tratar los co-cultivos con NGF y, al igual que con el tratamiento con capsaicina, observamos que el NGF era capaz de incrementar el porcentaje de mastocitos “de-granulados” en el caso de los co-cultivos de cepa salvaje pero no en el caso de los mutantes (Tabla 5). Esto indica que la pérdida de respuesta hiperalgésica postinflamatoria *in vivo* en los ratones *Mmp24^{-/-}*, puede explicarse por una posible incapacidad de los mastocitos de liberar moléculas mediadoras necesarias para la sensibilización de las fibras nerviosas.

A continuación quisimos comprobar si realmente los cambios en el fenotipo de “de-granulación” de los ratones mutantes se debían a la aparente alteración en los contactos físicos entre neuronas sensoriales y mastocitos. Para ello, llevamos a cabo experimentos en los que co-cultivamos en un mismo pocillo neuronas sensoriales de los DRGs *Mmp24^{-/-}* y mastocitos *Mmp24^{-/-}* pero separados físicamente mediante el inserto en el pocillo de una cámara dispuesta de una membrana porosa (*transwell*) que permitía el cultivo de las neuronas en la cámara y de los mastocitos en el pocillo de la placa, de manera que era posible el intercambio de moléculas secretadas al medio pero no la interacción física entre las células de los dos compartimientos. En estas condiciones, no se observaron diferencias en el porcentaje de mastocitos “de-granulados” entre co-cultivos *Mmp24^{-/-}/Mmp24^{-/-}* y co-cultivos *Mmp24^{+/+}/Mmp24^{+/+}* o sus combinaciones (70 células degranuladas de 182 células totales en co-cultivos de neuronas *Mmp24^{+/+}/BMMCs Mmp24^{+/+}*; 79 de 177 células totales en co-cultivos de neuronas *Mmp24^{-/-}/BMMCs Mmp24^{-/-}*; 70 de 171 células totales en co-cultivos de neuronas *Mmp24^{-/-}/BMMCs Mmp24^{+/+}*; 80 de 198 células totales en co-cultivos de neuronas *Mmp24^{+/+}/BMMCs Mmp24^{-/-}*), indicativo de que la alteración del contacto físico neuro-inmune en los ratones mutantes, es la causa de la respuesta ectópica de los mastocitos. Todos estos resultados demuestran que las interacciones morfológicas entre mastocitos y fibras sensoriales están alteradas en ausencia de la proteína MT5-MMP, dando lugar a respuestas fisiológicas irregulares

3.4. Implicación de la N-cadherina en la interacción mastocito-neurona sensorial

Nuestros datos previos mostraban que las neuronas sensoriales que carecen de MT5-MMP presentan alteraciones en su crecimiento neurítico caracterizadas por una mayor

ramificación en la piel y una interacción irregular con los mastocitos cutáneos. Para poder profundizar en el mecanismo mediante el cual MT5-MMP regula la interacción entre las células inmunes y las neuronas sensoriales y, por lo tanto, el dolor inflamatorio, nos propusimos estudiar las posibles acciones de esta metaloproteasa en la regulación de la adhesión celular. Ya habíamos mostrado como las neuronas mutantes parecían tener muchos más focos en los que la N-cadherina parecía acumularse, niveles más altos de la forma completa de N-cadherina en la membrana citoplasmática y niveles de β -catenina aumentados (ver datos anteriores en el apartado 2.5). Por otra parte, la N-cadherina se expresa también en los mastocitos y su tráfico a los sitios de la membrana en interacción con las neuritas parece ser inducido por las propias neuritas (Suzuki et al., 2004), lo que sugiere una implicación de esta molécula de adhesión en el establecimiento de la denominada “sinapsis neuro-inmune”

En el caso de los mastocitos, comprobamos aquellos que expresaban MT5-MMP también expresaban N-cadherina y, en el análisis de co-localización inmunocitoquímica, ambas moléculas mostraron tener distribuciones similares. Y esta observación fue similar en los dos tipos celulares, tanto neuronas como BMMCs (Figura 35A). La marca visible de MT5-MMP resultó ser especialmente punteada sobre todo en los BMMCs lo que sugería una posible distribución vesicular que coincidía con las descripciones anteriores de la distribución de N-cadherina en los mastocitos (Suzuki et al., 2004). Curiosamente, pudimos observar que, en los sitios de contacto entre neuritas y BMMCs, los marcajes para N-cadherina y MT5-MMP eran aparentemente mucho más intensos y homogéneos en los mutantes (Figura 35A). Al igual que en las neuronas, la falta de MT5-MMP en BMMCs también dio lugar a un procesamiento anormal de la N-cadherina y en consecuencia en un aumento de los niveles de beta-catenina, como se muestra por *western blot* (Figura 31B).

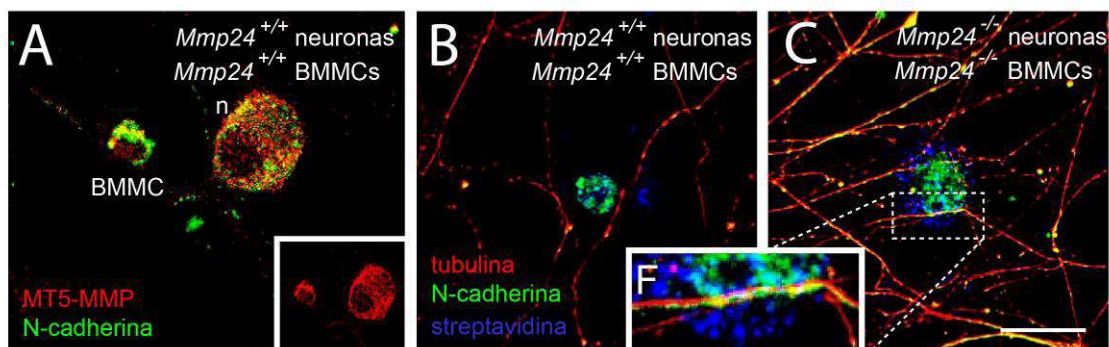


Figura 35. Papel de N-cadherina y MT5-MMP en la interacción funcional entre neuronas de los DRGs y los BMMCs.

(A) Co-cultivo de BMMCs y neuronas de los DRGs de tipo salvaje, marcadas con anticuerpos para MT5-MMP (rojo) y de N-cadherina (verde). Téngase en cuenta que tanto neuronas (n) como mastocitos (BMMC) expresan ambas moléculas. Co-cultivos de neuronas de los DRGs de tipo salvaje (B y C) y BMMCs de tipo salvaje (B) y mutante (C) marcadas con anticuerpos para tubulina neuronal (rojo), N-cadherina (verde) y con estreptavidina conjugada con Cy3 (azul). Obsérvese que la N-cadherina se acumula en los sitios de contacto entre neuritas y células inmunes y que estas interacciones aparecen más frecuentemente en co-cultivos mutantes. Barras de escala: A-C 15 μ m.

Para comprobar si la N-cadherina y MT5-MMP desempeñaban un papel en la interacción funcional entre neuronas y células cebadas tratamos co-cultivos de neuronas y BMMCs de diferentes genotipos con anticuerpos anti-N-cadherina con el objetivo de bloquear su función, o

Resultados

con IgGs no relevantes como control, y a continuación analizamos los fenotipos de tasa de “de-granulación” de los BMMCs usando una tinción de violeta de cresilo. De acuerdo con los experimentos anteriores que muestran que la “de-granulación” requiere el contacto directo entre las células nerviosas e inmunes (Suzuki et al., 2004), nuestros resultados indicaron que la “de-granulación” normal requiere la interacción célula-célula mediada por la N-cadherina, entre los mastocitos y las neuritas, ya que no era posible provocar la “de-granulación” inducida por la capsaicina en los co-cultivos *Mmp24^{+/+}/Mmp24^{+/+}* tratados con anticuerpos bloqueantes anti-N-cadherina (Tabla 6). Sin embargo, y de forma sorprendente, en los co-cultivos *Mmp24^{-/-}/Mmp24^{-/-}* la adición de anticuerpos anti-N-cadherina, pero no de una IgG control, fue capaz de rescatar el fenotipo mutante de “de-granulación” en los mastocitos (Tabla 6). Por lo tanto, de estos datos podemos concluir que la N-cadherina modula la sinapsis neuro-inmune y que la regulación de esta molécula de adhesión celular por MT5-MMP resulta esencial para el funcionamiento normal de esta interacción y de las respuestas al dolor inflamatorio.

Co-cultivos		Tratamiento			
Neuronas DRG	BMMC	IgGs	IgGs + caps.	anti-N-Cdh	anti-N-Cdh + caps.
<i>Mmp24^{+/+}</i>	<i>Mmp24^{+/+}</i>	24.4 ± 0.9	57.7 ± 2.4	16.7 ± 3.4	22.2 ± 4.9
<i>Mmp24^{-/-}</i>	<i>Mmp24^{-/-}</i>	59.8 ± 7.3	68.9 ± 9.8	22.8 ± 4.7	24.7 ± 0.2
	n	2	2	2	2

Tabla 6 Porcentaje de mastocitos degranulados (BMMCs) en experimentos de bloqueo de función de N-cadherin en co-cultivos de neuronas disociadas de DRGs adultos y BMMCs de diferentes genotipos.

Capsaicina (caps.): 1 μ M. IgGs no-relevantes de ratón (Sigma): 40 μ g/ml. IgGs de ratón anti-N-Cdh (anti-N-cadherina, clon GC4; Sigma): 40 μ g/ml. “n”: número de experimentos independientes (cultivos a partir de diferentes animales) por genotipo.

Discusión

En el presente trabajo de tesis doctoral hemos querido investigar aspectos de la regulación de las neuronas sensoriales periféricas que participan en la detección del dolor y, para ello, hemos estudiado la contribución de la neurotrofina BDNF y de la metaloproteasa MT-5 al desarrollo y mantenimiento de esta población sensorial de indudable interés biomédico. Los aspectos más destacables de los hallazgos pueden resumirse en: 1) hemos identificado por primera vez la dependencia trófica postnatal de neuronas nociceptivas de la neurotrofina BDNF, 2) la implicación de una metaloproteasa en la fisiología del dolor a través de acciones específicas en el crecimiento de las fibras nociceptivas y en su interacción con mastocitos de la piel. Ambos resultados son novedosos y contribuyen a una mejor comprensión de la percepción del dolor a nivel periférico.

Las neurotrofinas son moléculas cuya función canónica es su implicación en la supervivencia neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso, aunque esta familia de factores tróficos regula otros muchos aspectos del desarrollo y de la función neuronal, como la diferenciación, el crecimiento axónico o la plasticidad sináptica (Reichardt y Fariñas, 1997). Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas a lo largo de los últimos 50 años utilizando modelos genéticos de ganancia y pérdida de función, de manera que muchos de sus aspectos biológicos y de su modo de acción se conocen en profundidad. Particularmente, las cepas de ratones mutantes nulos para las diferentes neurotrofinas y sus receptores tirosina kinasa han permitido describir y caracterizar con exhaustividad su implicación en la supervivencia de las neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico. Sin embargo, caracterizaciones de estas cepas en distintos laboratorios han dado lugar, en algunas ocasiones, a resultados discrepantes. Esto ha conducido a que, por ejemplo, en el caso de BDNF o su receptor tirosina kinasa TrkB, que se expresan ampliamente durante el desarrollo embrionario y postnatal, no se conozcan bien las poblaciones de neuronas sensoriales que dependen de esta vía de señalización para su supervivencia.

La investigación bibliográfica de las descripciones previas que existen sobre otras cepas de ratones mutantes nulos de BDNF o su receptor TrkB, generadas en diferentes laboratorios, muestran que los trabajos son relativamente confusos y variables en cuanto a sus resultados. Sí parece claro que la supervivencia de las neuronas sensoriales de los ganglios exclusivamente viscerales, como el nodoso y el petroso, depende de la señalización de BDNF y de la neurotrofina 4/5 a través de su receptor TrkB. En los ratones mutantes nulos que carecen de la forma catalítica del receptor TrkB y en los dobles mutantes nulos de BDNF y NT-4/5, las neuronas del complejo ganglionar nodoso-petroso no sobreviven (Conover et al., 1995; Erickson et al., 1996; Silos-Santiago et al., 1997; Brady et al., 1999; Erickson et al., 2001). Sin embargo, estudios similares realizados en los DRGs, ofrecen resultados contradictorios. Los estudios iniciales indicaron una reducción del 30-35% de las neuronas sensoriales de los DRGs en animales mutantes nulos tanto para TrkB como para BDNF a los

Discusión

15 días de edad (Klein et al., 1993; Jones et al., 1994; Ernfors et al., 1994), y ninguna pérdida neuronal en los DRGs de animales perinatales mutantes nulos para NT-4/5 (Liu et al., 1995; Conmover et al., 1995). Sin embargo, un estudio posterior en otra cepa generada independientemente sugería que BDNF el participaría en la regulación de la sensibilidad pero no de la supervivencia de los aferentes a la piel pilosa, ya que los autores no observaban deficiencias en el número de fibras a la piel en animales nulos para BDNF postnatales (Carroll et al., 1998). El posible momento en el que se producirían los déficits también fue objeto de controversia. El déficit neuronal en animales mutantes nulos de TrkB parecía producirse durante el periodo postnatal (Silos-Santiago et al., 1997), pero se describieron déficits en el periodo prenatal (Minichello et al., 1995, Liebl et al., 2000).

Curiosamente, análisis más recientes de la inervación periférica muestran pérdidas parciales de los aferentes sensoriales cutáneos en ausencia de la señalización de BDNF mediada por TrkB. Los animales postnatales mutantes nulos de BDNF y de TrkB carecen de corpúsculos de Meisner (González-Martínez et al., 2004; 2005) y de una fracción de corpúsculos de Paccini (Sedy et al., 2004). El análisis de los receptores en el ligamento periodontal, el paladar, o las vibrisas del ratón también ha indicado que las los corpúsculos de Ruffini y los de Meissner no se diferencian en ausencia de BDNF o TrkB (Fundin et al., 1997; Ichikawa et al., 2000; Alkhamrah et al., 2003). Debido a que los receptores sensoriales periféricos parecen depender de la inervación aferente sensorial para su diferenciación (véase Zelená, 1994, para una revisión) estos estudios sugieren que la falta de BDNF puede dar lugar a déficit en el número de neuronas sensoriales mecanoceptivas. Sin embargo, a pesar de esta situación, la cuestión de la dependencia sensorial de neuronas sensoriales de los DRG de BDNF ha quedado sin revisar.

En el presente trabajo de tesis doctoral hemos identificado a BDNF como una molécula esencial para la supervivencia de las neuronas nociceptivas cutáneas y hemos demostrado que el requerimiento de BDNF aparece inmediatamente después del nacimiento del animal y se mantiene durante su primera semana de vida, un periodo durante el cual se produce la regulación a la baja de la expresión del receptor TrkA. Neuronas que expresan el neuropéptido CGRP y/o que presentan sitios de unión para la lectina IB4, sobreviven *in vitro* en presencia de BDNF. La carencia de BDNF *in vivo*, produce la pérdida de aferentes sensoriales con fibras tipo C, una reducción general de la densidad de terminales libres que inervan tanto la piel glabra como la pilosa, una reducción de la inervación en el asta dorsal de la médula espinal y también la pérdida de neuronas CGRP+ e IB4+ en los ganglios lumbares de la raíz dorsal. Además, nuestros resultados sugieren que el BDNF requerido para la supervivencia de las neuronas sensoriales nociceptivas, es producido por los propios ganglios de la raíz dorsal de forma autocrina/paracrina.

En nuestro estudio de los animales mutantes nulos de BDNF observamos que la pérdida de neuronas sensoriales de los DRG se produce exclusivamente durante el periodo postnatal, a pesar de la expresión del receptor TrkB en las neuronas de los DRGs durante el

desarrollo embrionario (Ernfors et al., 1992; Schecterson et al., 1992; Mu et al., 1993; Fariñas et al., 1998). Los resultados son más consistentes con la dependencia trófica de las neuronas observada en cultivo. La supervivencia *in vitro* de las neuronas sensoriales neonatales depende muy poco de BDNF; sin embargo, esta dependencia aumenta progresivamente con la edad postnatal (ver también Baudet et al., 2000). Todo esto nos indica que es muy probable que la ventana temporal en la que BDNF afecta a la supervivencia de los aferentes nerviosos de las poblaciones de nociceptores y mecanorreceptores se limite al desarrollo postnatal. La expresión de TrkB durante el desarrollo de los ganglios podría estar relacionada con la señalización por NT-3 (Fariñas et al., 1998).

Debido a que los ratones mutantes BDNF generalmente mueren durante las primeras horas de vida postnatal, y sólo unos pocos sobreviven hasta P15-P21, no pudimos analizar si se pierden más neuronas en ausencia sostenida de BDNF hasta la edad adulta. El fenotipo de los ratones mutantes nulos heterocigotos para BDNF mostró una reducción del 25% en el número de neuronas nociceptivas, un déficit que en los ensayos de comportamiento dio lugar a alteraciones en la respuesta fisiológica a estímulos dolorosos. Pérdidas parciales de neuronas sensoriales en ratones heterocigotos mutantes nulos para ciertas neurotrofinas ya han sido descritas previamente. Los ratones mutantes nulos para NT-3 muestran una ausencia total de husos neuromusculares, que no se desarrollan en ausencia de las neuronas propioceptivas que los inervan y que dependen de NT-3 para su supervivencia prenatal, mientras que los heterocigotos para esta mutación tienen tan sólo el 50% del complemento normal de husos neuromusculares (Fariñas et al., 1994; Ernfors et al., 1994b; Tessarollo et al., 1994; Tojo et al., 1995). Estos fenotipos parciales han sido interpretados como una demostración de que las neurotrofinas son factores limitantes en condiciones normales (Fariñas y Reichardt, 1997). El fenotipo nociceptivo de los ratones mutantes heterocigotos para BDNF, consistente en una reducción del 25%, sugiere que efectivamente sólo el 50% de las neuronas nociceptivas, que es la pérdida observada en los mutantes nulos, son dependientes de BDNF. Esto también sugeriría que BDNF no es necesario para la supervivencia de los nociceptores después de las dos primeras semanas de vida, cuando ya se observa la pérdida del 50%.

Algunas neuronas dependen exclusivamente de una sola neurotrofina, como por ejemplo, las neuronas propioceptivas de gran diámetro que parecen expresar exclusivamente el receptor TrkC durante el desarrollo (Mu, et al., 1993) y que sólo requieren NT-3 para sobrevivir (Klein et al., 1994; Fariñas et al., 1994; Ernfors et al., 1994; Tessarollo et al., 1994; Tojo et al., 1995). En cambio, los nociceptores parecen depender de la acción secuencial de más de un factor neurotrófico. Durante la embriogénesis del ratón, todas las neuronas de tamaño pequeño de los DRGs expresan el receptor para NGF, TrkA, y requieren de esta neurotrofina para su supervivencia; de hecho, los ratones recién nacidos con deficiencia en cualquiera de las dos moléculas pierden por completo esta población neuronal, que representa alrededor del 80% de todas las neuronas de los DRGs (Ruit et al, 1992; Crowley, et al., 1994; Smeyne et al., 1994; Silos-Santiago et al., 1995; White et al., 1996; Rice et al., 1998). Es

Discusión

probable que estas neuronas dependientes de NGF también dependan inicialmente de NT-3, ya que en los ratones deficientes en NT-3 manifiestan una pérdida de alrededor del 70% de la población total de neuronas sensoriales en estadios muy tempranos de formación de los ganglios, lo que incluye necesariamente a neuronas del dolor (Fariñas et al., 1996). El requerimiento de NT-3 parece estar mediado también por TrkA, porque los ratones mutantes nulos de TrkC únicamente pierden la población de las neuronas propioceptivas que constituyen menos del 20% de todas las neuronas en los DRGs (Klein et al., 1994; Fariñas et al. 1994, 1996).

Después del nacimiento, TrkA todavía está presente en las neuronas sensoriales peptidérgicas que expresan CGRP y SP y, por lo tanto, estas neuronas siguen siendo dependientes de NGF después del nacimiento. Sin embargo, en las neuronas IB4-positivas TrkA se regula a la baja después del nacimiento y se comienza a expresar el receptor de GDNF, c-ret (Silos-Santiago et al., 1995; Molliver et al., 1997; Bennett et al., 1998). Este patrón de expresión condujo a la idea de que los nociceptores IB4 positivos cambian su dependencia trófica del NGF al GDNF de forma progresiva durante el periodo postnatal (Silos-Santiago et al., 1995; Molliver et al., 1997; Bennett et al., 1998). Se ha demostrado que la expresión de c-ret y la supervivencia neuronal producida en respuesta a GDNF aumentan después del nacimiento y que, en P15, más del 50% de las neuronas de los DRG puede mantenerse *in vitro* únicamente en presencia de GDNF (Molliver et al., 1997). Otros estudios posteriores mostraron que GDNF, sin embargo, no es muy eficaz como factor de supervivencia para las neuronas sensoriales de los DRGs embrionarias y/o neonatales (Matheson et al., 1997; Baudet et al., 2000) y que los ratones deficientes en GDNF pierden menos del 25% de todas las neuronas de DRG prenatalmente (Moore et al., 1996), un déficit que parece incluir preferentemente a neuronas pequeño tamaño, como se muestra mediante el análisis de la distribución de los tamaños de las células (Baudet et al., 2000). Más recientemente, la caracterización de una cepa de ratones en la que se había inactivado c-Ret de forma condicional, demostró que el GDNF no es esencial para la supervivencia de las neuronas IB4 positivas (Fundin et al., 1999, Luo et al., 2007). Estos últimos datos indican que, aunque las neuronas nociceptivas expresan receptor c-ret y pueden responder a GDNF, este factor neurotrófico no es esencial para la supervivencia de estos aferentes sensoriales. En la piel de ratones neonatales la expresión de GDNF es baja o parece limitarse a estructuras muy específicas (Golden et al., 1999; Fundin et al., 1999; Botchkareva et al., 2000) pero esta expresión adquiere más relevancia, incluso que la de BDNF o NGF, durante el desarrollo postnatal. En estudios previos se ha demostrado que GDNF también regula la fisiología de los nociceptores y los patrones de inervación en los animales adultos (Amaya et al., 2004; Malin et al., 2006; Albers et al., 2006). Además, se ha comprobado que la administración exógena de GDNF puede prevenir los cambios en la velocidad de conducción de las fibras IB4 positivas inducidos por axotomía y así como promover el crecimiento de las neuritas *in vitro* en cultivo de explantes de DRGs (Bennett et al., 1998; Leclere et al., 1998). Por lo tanto, el GDNF desempeña un papel importante en la fisiología de los nociceptores c-ret positivos pero no es esencial para su supervivencia. Por el

contrario, nuestros resultados demuestran que BDNF sí juega un papel esencial en la supervivencia de los nociceptores inmediatamente después del nacimiento e implican directamente a BDNF como una molécula importante en el desarrollo nociceptivo.

La dependencia temporal de BDNF coincide con un periodo en el cual los nociceptores están cambiando la expresión de sus receptores para factores neurotróficos y cuando en los territorios diana se están produciendo cambios en la expresión de los factores para dichos receptores. Nuestros datos obtenidos a partir de los cultivos celulares indican que muchas neuronas sensoriales de los DRGs que dependen de NGF durante este periodo, expresan TrkB y c-Ret y, por consiguiente, pueden también mantenerse *in vitro* en presencia de los factores tróficos BDNF o GDNF. El déficit neuronal que hemos encontrado en los ratones mutantes nulos para BDNF indica que el factor relevante para la supervivencia *in vivo* realmente es BDNF. Por lo tanto, ya que BDNF mantiene a una población de células que también pueden sobrevivir en presencia de NGF y GDNF, podemos deducir que la pérdida de neuronas observada *in vivo* probablemente es debida a la expresión diferencial de estos factores tróficos durante el período inicial del desarrollo postnatal. De esta manera, la dinámica de expresión de los diferentes factores neurotróficos durante el desarrollo postnatal de la piel podría explicar las pérdidas específicas en poblaciones neuronales sensoriales a pesar de la presencia del receptor correspondiente, tal como ocurre durante el desarrollo del oído interno (Fariñas et al., 2001).

Analizando los DRGs por PCR cuantitativa, se observa una fuerte expresión de BDNF durante primeros días después del parto. En trabajos previos se ha demostrado que la expresión de BDNF en las neuronas nociceptoras TrkA-positivas está regulada mediante la acción del NGF producido en los tejidos periféricos, como sucede en los casos de inflamación (Wetmore y Olson, 1995; Barakat-Walter et al., 1996; Apfel et al., 1996; Michael et al., 1997). Por otra parte, también se ha demostrado que el BDNF producido y liberado por las propias neuronas en los DRG adultos parece mantener la supervivencia de las neuronas sensoriales mediante un mecanismo autocrino (Wright et al., 1992; Acheson et al., 1995). Todos nuestros datos son coherentes con un modelo en el que el NGF puede regular la expresión de BDNF y TrkB, de forma que el BDNF derivado del ganglio sensorial garantiza la supervivencia de las neuronas nociceptivas. Curiosamente, los resultados obtenidos de la sobre-expresión de BDNF en la piel muestran un aumento en la inervación de los folículos pilosos, los corpúsculos de Meissner y las células de Merkel sin cambios en el número de neuronas sensoriales en los DRG (LeMaster et al., 1999), lo que sugiere que la sobreexpresión cutánea de BDNF no produce en el rescate de las neuronas de los DRG después del nacimiento. Las neurotrofinas han demostrado ejercer acciones diferentes cuando actúan sobre las terminaciones nerviosas o sobre los cuerpos celulares (Howe y Mobley et al., 2005). Estudios adicionales serán necesarios para determinar si el BDNF promueve la supervivencia y regula el crecimiento de las neuritas actuando en compartimentos celulares diferentes.

Discusión

La administración exógena de BDNF en el cerebro ha demostrado tener un efecto anti-nociceptivo, tanto después de tratamientos crónicos (Siuciak et al, 1994; Siuciak et al, 1995) como en agudos (Cirulli et al., 2000). Se ha propuesto que esta reducción de la sensibilidad al dolor es una respuesta del sistema nervioso central, provocada por una modulación de las acciones de la serotonina y varios neuropéptidos, como la SP y el neuropéptido Y, por el BDNF (Siuciak et al., 1994; 1995). El efecto anti-nociceptivo de BDNF puede ser antagonizado por la naloxona, sugiriendo la participación adicional de los sistemas vinculados a opioides, en la analgesia producida por infusiones de BDNF en el mesencéfalo (Siuciak et al., 1994). Sin embargo, en contraste con el efecto anti-nociceptivo observado tras la administración exógena de BDNF, tanto nuestros experimentos como otros previos (MacQueen et al., 2001) han demostrado que los ratones heterocigotos mutantes nulos para BDNF presentan hipoalgesia térmica en la prueba de placa caliente en condiciones basales.

El hecho de que tanto los niveles bajos de BDNF en el desarrollo como los niveles altos durante la edad adulta puedan resultar en un efecto hipoalgésico debe ser estudiado con más detalle. Además de las diferencias existentes entre especies (en los experimentos de respuesta a la placa térmica con animales heterocigotos deficientes en BDNF se emplearon ratones como modelo experimental, mientras que en los experimentos de infusión de BDNF en adultos de emplearon ratas) y de la posibilidad de que en los citados experimentos intervinieran variables no controladas que puedan modular la analgesia inducida por estrés (Wilson y Mogil, 2001), es indudable que el hecho de que exista una pérdida postnatal de aferentes cutáneos nociceptivos también podría explicar el aumento de la latencia en la percepción de la nocicepción térmica en ratones deficientes en BDNF.

La dependencia neurotrófica en las poblaciones de neuronas periféricas ha sido investigada exhaustivamente. Sorprendentemente, el fenotipo nociceptivo de la cepa de ratones deficientes en BDNF había sido difícil de describir y demostrar a pesar de los análisis previos. Aquí se demuestra que BDNF es esencial para la supervivencia de una fracción de nociceptores durante el periodo perinatal, justo cuando éstos están perdiendo su dependencia de NGF. Estos resultados deben tenerse en cuenta al interpretar las consecuencias de los reducidos niveles de BDNF en la fisiología del dolor.

Durante las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios que han demostrado de forma cada vez más evidente, que las MMPs cumplen un papel fundamental en los procesos de remodelación fisiológica que tienen lugar durante el desarrollo del sistema nervioso y en los procesos de remodelación tras lesión neural (Yong et al., 2005). Estos nuevos datos hacen hincapié sobre todo, en lo distintas y opuestas que pueden ser las actividades que desempeñan los diferentes miembros de la familia de las MMPs en estos procesos y también en la importancia de determinar las funciones *in vivo* más esenciales de cada enzima. En el trabajo desarrollado en esta tesis doctoral demostramos que los ratones deficientes en MT5-MMP exhiben un fenotipo nociceptivo complejo caracterizado por una mayor sensibilidad a estímulos nociceptivos térmicos acompañados de una pérdida profunda de la hiperalgesia

inflamatoria térmica después de la inyección de carragenina en la pata. En los ratones *Mmp24^{-/-}* las neuronas de los DRGs que expresan el neuropéptido CGRP muestran conos de crecimiento complejos, con múltiples filopodios y sus axones son más ramificados *in vitro* e hiperinervan el tejido cutáneo cuando son co-cultivadas con explantes de piel o *in vivo*. Todos estos resultados demuestran que la ausencia de MT5-MMP en las neuronas sensoriales nociceptivas peptidérgicas altera el crecimiento neurítico como consecuencia de un proceso autónomo-celular. Además, la MT5-MMP también juega un papel en las interacciones célula-célula entre neuritas nociceptivas y mastocitos. Hemos observado un aumento en el contacto físico entre neuritas sensoriales *Mmp24^{-/-}* y los mastocitos y esta interacción anormal se correlaciona con una mayor proporción de mastocitos prematuramente degranulados tanto *in vivo* como *in vitro*. Nuestros estudios bioquímicos en ambos tipos celulares demuestran que en ausencia de MT-5-MMP se produce una distribución y procesamiento anormales de la N-cadherina que tiene consecuencias en el comportamiento de los mastocitos, lo que sugiere que los cambios en este sustrato de MT5-MMP es capaz de mediar las interacciones entre los aferentes primarios sensoriales y los mastocitos de la piel, dando lugar a respuestas comportamentales específicas del dolor.

Los resultados obtenidos de los estudios de comportamiento demuestran que la ausencia de MT5-MMP produce una mayor sensibilidad a estímulos nociceptivos térmicos. Ya que cada neurona sensorial inerva un área cutánea mucho mayor que las de fenotipo salvaje, podemos especular que una mayor arborización en los terminales axónicos de las neuronas sensoriales de ratones *Mmp24^{-/-}* podría desencadenar más despolarizaciones individuales originadas en las múltiples ramas del axón principal, en comparación con la cepa salvaje, que llegarían finalmente a generar una mayor propagación de los impulsos nerviosos (Weidner et al., 2003). Sin embargo, los registros de fibra única en las fibras nerviosas sensoriales de ratones *Mmp24^{-/-}* no mostraron diferencias significativas en las respuestas a estímulos nociceptivos térmicos de calor de forma repetida (experimentos realizados por el laboratorio del Dr. Carlos Belmonte en el INA-UMH; ver Rodríguez-Folgueras et al., 2009). Una interpretación alternativa podría ser que existiera un mayor número de neuronas sensoriales en los ratones mutantes que aumentara la afluencia sensorial final que llega a las neuronas de segundo orden en el sistema nervioso central. Sin embargo, los recuentos del número de neuronas sensoriales no revelaron diferencias entre genotipos ni *in vivo* ni *in vitro* en presencia de NGF. Por tanto, la explicación más plausible para la percepción incrementada del dolor es que se estimulen más neuronas sensoriales con cada estímulo al existir una mayor profusión de fibras nociceptivas en la piel.

Una cepa similar ya había sido generada con anterioridad y en ella se habían descrito alteraciones en dolor neuropático (Komori et al., 2004). Sin embargo, nosotros no hemos podido demostrar en nuestra cepa *Mmp24^{-/-}* la ausencia de la alodinia mecánica causada por una lesión del nervio ciático (datos no mostrados) como se había publicado anteriormente en la cepa de ratones deficientes en MT5-MMP (Komori et al., 2004). En dicho trabajo se sugiere que la ausencia de la alodinia mecánica en esta cepa mutante es consecuencia de la

Discusión

incapacidad de las propias fibras mecánicas A β de expandirse por las capas superficiales del asta dorsal de la médula espinal. En nuestra cepa tampoco hemos observado este defecto en las fibras mecánicas. Estas diferencias pueden deberse a las diferentes estrategias empleadas para la delección de *Mmp24* o a las características y el fondo genético de los ratones empleados en ambos estudios.

Hemos demostrado que prácticamente todas las neuronas que expresan MT5-MMP en los DRGs son CGRP + y que, por el contrario, MT5-MMP no se expresa en las neuronas IB4+. Curiosamente, no todos las neuronas CGRP+ de los DRGs expresan la proteína MT5-MMP y, por tanto, esta metaloproteinasa podría considerarse un posible marcador de una subpoblación específica de nociceptores peptidérgicos. Las poblaciones de nociceptores CGRP+ e IB4+ difieren en sus dependencias tróficas, en las moléculas neuroactivas que liberan o en sus patrones de proyección central. Por otra parte, es generalmente aceptado que tanto las neuronas peptidérgicas como las no peptidérgicas responden a diferentes estímulos nociceptivos, siendo la población de neuronas peptidérgicas la que se encuentra principalmente implicada en el incremento fisiológico de la capacidad de respuesta al dolor consecuente a los procesos inflamatorios (Hunt y Mantyh, 2001). De acuerdo con la expresión de la proteína MT5-MMP en las neuronas peptidérgicas, nuestro análisis del comportamiento de los ratones mutantes se centró en el estudio de la respuesta dolorosa inflamatoria.

Curiosamente, cuando realizamos experimentos en los que se inyectó carragenina en la pata trasera del ratón observamos que se producía una pérdida de respuesta al dolor térmico en los animales mutantes, dato que resultó bastante sorprendente teniendo en cuenta nuestros estudios previos de percepción dolorosa basal. Para explorar si el fenotipo de hiperalgesia en esta cepa de ratones mutantes era debida a la ausencia en particular de alguno de los mediadores conocidos de dolor inflamatorio, se evaluó el efecto hiperalgésico de una serie de factores que se liberan durante el proceso de inflamación (Cunha et al., 2005; Marchand et al., 2005). Nuestros resultados demostraron que sólo la administración de IL-6 o PGE₂ produce hiperalgesia en *Mmp24*^{-/-} ratones, mientras que TNF- α , IL-1 β y NGF no tienen ningún efecto, lo que sugiere que estas proteínas actúan a través de una vía inflamatoria que se altera en los ratones mutantes carentes de MT5-MMP. Ya que la acción de estos factores durante el proceso inflamatorio puede estar organizada como una cascada de amplificación en la que NGF sería la última de proteínas efectoras (Woolf et al., 1997), hemos centrado nuestra investigación en algunas de las características particulares de la hiperalgesia inflamatoria inducida por NGF. Los niveles del factor neurotrófico NGF aumentan en la piel durante el proceso inflamatorio en respuesta a la presencia y acción del TNF α y a la IL-1 β (Weskamp y Otten, 1987; Woolf et al., 1997) y desempeñan un papel importante en la hiperalgesia inflamatoria aguda mediante mecanismos periféricos (Shu y Mendell, 1999). Aunque el NGF es capaz de sensibilizar las fibras nociceptivas directamente, los enfoques farmacológicos han indicado que los mastocitos son mediadores necesarios en la hiperalgesia producida por NGF, mediante la liberación de varias moléculas neuroactivas (como la serotonina, histamina y el propio NGF), en respuesta a la estimulación con NGF (León et al., 1994; Lewin et al., 1994; Tal y Liberman, 1997; Woolf et al., 1996). En nuestro trabajo hemos observado un aumento

anormal de mastocitos degranulados en condiciones basales, en muestras de ratones *Mmp24^{-/-}*. Mediante nuestro estudio demostramos que esta degranulación basal anormal impide una degranulación inducida, ya sea por capsaicina o por NGF, y estos resultados correlacionan con la falta de hiperalgesia tras la administración de NGF en vivo. Por lo tanto, nuestros resultados están de acuerdo con la idea de que la liberación de moléculas neuroactivas por los mastocitos es algo esencial para el proceso de sensibilización de la fibra nerviosa que desencadena la hiperalgesia inflamatoria (Shu y Mendell, 1999).

De acuerdo con los resultados descritos por Suzuki & col. en el 2004, nuestros resultados muestran como la degranulación de los mastocitos requiere de una interacción física de las células inmunes con axones de las neuronas sensoriales. También hemos demostrado que la proteína MT5-MMP regula esta interacción mediante un mecanismo que implica a la N-cadherina, una molécula de adhesión célula-célula. Muchos trabajos han descrito como las cadherinas median procesos de reconocimiento y adhesión celular en muchos tipos celulares y en particular, se ha estudiado que la distribución subcelular de la N-cadherina en los mastocitos cambia en respuesta al contacto con neuritas y que la N-cadherina se concentra en los puntos de contacto celular regulando las interacciones sinápticas entre el nervio y el mastocito (Suzuki et al., 2004). Por otro lado, se había demostrado en células heterólogas que la N-cadherina es sustrato de la actividad proteolítica de MT5-MMP y que esta actividad libera el dominio extracelular de interacción homofílica y genera diversos fragmentos intracelulares (Monea et al., 2006). En este trabajo de tesis hemos probado que la N-cadherina es un sustrato de MT5-MMP en células implicadas en la percepción y fisiología del dolor, neuronas sensoriales y mastocitos de la piel. Por otra parte, la constatación de que el bloqueo de la N-cadherina mediante anticuerpos específicos rescata la interacción anormal entre mastocitos y neuronas mutantes apoya la hipótesis de que el fenotipo del ratón *Mmp24^{-/-}* es consecuencia de una actividad alterada de la N-cadherina en ambos tipos de células.

Es posible que los cambios en la adhesión celular sean también responsables del fenotipo de hiperinervación cutánea. A pesar de que se ha demostrado que un aumento en la expresión de factores tróficos son capaces de producir un incremento en el número de neuronas sensoriales y sus ramificaciones en los territorios de destino, como se observa en los ratones transgénicos que sobre expresan NGF bajo el promotor de la queratina 14 (Stucky et al., 1999), no hemos detectado diferencias en los niveles de expresión de NGF en muestras de piel entre genotipos. La neuritogénesis es un proceso muy dinámico que conlleva constantes extensiones y retracciones del cono axónico de las neuronas y se sabe que la N-cadherina juega un papel muy importante en la estabilización de las ramificaciones de las neuritas (Ye y Jan, 2005). Se ha demostrado que la sobreexpresión de la N-cadherina y β -catenina en las neuronas del hipocampo aumenta su arborización dendrítica (Yu y Malenka, 2003) y las neuronas sensoriales de los DRGs mutantes para *Mmp24* presentan niveles muy altos de beta-catenina. Nuestros resultados también indican que la proteína MT5-MMP actúa de manera autónoma-celular para regular el crecimiento la ramificación neurítica de neuronas aisladas cultivadas sobre diferentes moléculas de la matriz extracelular. Aunque la N-cadherina es una molécula homofílica de adhesión célula-célula, se ha mostrado que en otros tipos celulares la unión del colágeno a integrinas puede regular el procesamiento de ectodominios de cadherinas mediante metaloproteinasas y facilitar migración (Lee et al., 2007; Symowicz et al., 2007). Por lo tanto,

Discusión

los cambios en el procesamiento y distribución de la N-cadherina así como el aumento en los niveles de β -catenina, observados en los cultivos mutantes de DRGs y BMMCs, pueden ser mecanismos que justifiquen tanto el fenotipo de crecimiento neurítico como el de la interacción neural-mastocitaria.

En conclusión, nuestros resultados proporcionan la primera evidencia causal de que la ausencia de una metaloproteinasa en particular produce un fenotipo de hiperinervación cutánea y una alteración morfológica y funcional de las interacciones neuro-inmune que tienen consecuencias complejas en las respuestas nociceptivas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Muchos trabajos han aportado evidencias acerca de la importancia de la familia de enzimas proteolíticas MMP en la patología del sistema nervioso central y periférico. Asimismo, el incremento en la expresión y la contribución de estas enzimas en detrimento de una serie de patologías como la disfunción de la barrera sangre-cerebro, desmielinización, neuroinflamación, lesión de la médula espinal, la esclerosis múltiple o accidente cerebrovascular hemorrágico ha sugerido el uso de inhibidores de metaloproteasas para el tratamiento de enfermedades neurológicas (Hu et al., 2007; Yong et al., 2005). Más allá de estas propuestas anteriores, y en base a los resultados presentados aquí, llegamos a la conclusión de que algunas metaloproteinasas específicas también pueden constituir nuevas dianas relevantes para el control del dolor. Los datos además destacan la relevancia de la interacción neuro-inmune en el análisis de la fisiología del dolor (Scholz y Wolf, 2007). Por último, también proponemos que los ratones deficientes en *Mmp24* puede representar un modelo genético útil para el análisis de los mecanismos subyacentes al desarrollo de estados crónicos de dolor clínico.

Nuestros resultados sugieren que los mecanismos periféricos son muy relevantes en la fisiología del dolor y que alteraciones en las vías nociceptivas pueden ser debidas a problemas en el desarrollo de las neuronas sensoriales implicadas o a sus interacciones con elementos de los territorios diana que inervan.

1. La expresión de BDNF es necesaria para la supervivencia durante el desarrollo postnatal de los diferentes mecanorreceptores cutáneos inervados por aferentes mielínicos, tales como los corpúsculos de Meissner, los complejos piloneurales o los complejos de células de Merkel.
2. La ausencia de BDNF produce la pérdida de aferentes sensoriales con fibras tipo C, una reducción general de la densidad de terminales libres que inervan tanto la piel glabra como la pilosa, una reducción de la inervación en el asta dorsal de la médula espinal y también la pérdida de neuronas CGRP+ e IB4+ en los ganglios lumbares de la raíz dorsal.
3. La ventana temporal en la que BDNF afecta a la supervivencia de los aferentes nerviosos de las poblaciones de nociceptores y mecanorreceptores se limita al periodo postnatal.
4. BDNF es una molécula esencial para la supervivencia de las neuronas nociceptivas cutáneas durante su primera semana de vida, justo cuando éstos están perdiendo su dependencia neurotrófica de NGF. Durante este periodo se reduce la expresión del receptor TrkA y las neuronas que expresan el neuropéptido CGRP y/o que presentan sitios de unión para la lectina IB4, sobreviven in vitro en presencia de BDNF.
5. BDNF mantiene a una población de células que también pueden sobrevivir en presencia de NGF y GDNF, mediante la expresión diferencial de factores tróficos en una ventana espacio/temporal. El BDNF requerido para la supervivencia de las neuronas sensoriales nociceptivas, es producido por los propios ganglios de la raíz dorsal de forma autocrina/paracrina.
6. La proteína MT5-MMP es esencial para determinar el tamaño del campo receptivo de las neuronas nociceptivas cutáneas y la ausencia de la proteína en las neuronas sensoriales nociceptivas peptidérgicas altera el crecimiento neurítico como consecuencia de un proceso autónomo-celular.
7. MT5-MMP juega un papel fundamental en las interacciones célula-célula entre neuritas nociceptivas y mastocitos. En ausencia de MT-5-MMP se produce una distribución y procesamiento anormales de la N-cadherina alterando el comportamiento de los mastocitos.
8. MT5-MMP es capaz de mediar las interacciones entre los aferentes primarios sensoriales y los mastocitos de la piel, dando lugar a respuestas comportamentales específicas del dolor.

- Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A. *et al.* (1995) A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* **374**: 450-453.
- Agrawal, A. K., Jelen, M., Grzebieniak, Z., Zukrowski, P., Rudnicki, J., and Nienartowicz, E. (2008) Androgen receptors as a prognostic and predictive factor in breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* **46**: 269-276.
- Agrawal, A. K., Jelen, M., Rudnicki, J., Grzebieniak, Z., Zukrowski, P., and Nienartowicz, E. (2008) Molecular markers (c-erbB-2, p53) in breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* **46**: 449-455.
- Altar, C. A. and DiStefano, P. S. (1998) Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci* **21**: 433-437.
- Apte, S. S., Fukai, N., Beier, D. R., and Olsen, B. R. (1997) The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis. *J Biol Chem* **272**: 25511-25517.
- Artuc, M., Grutzkau, A., Luger, T., and Henz, B. M. (1999) Expression of MC1- and MC5-receptors on the human mast cell line HMC-1. *Ann N Y Acad Sci* **885**: 364-367.
- Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U. M., Grutzkau, A., and Henz, B. M. (1999) Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* **8**: 1-16.
- Bahjaoui-Bouhaddi, M., Padilla, F., Nicolet, M., Cifuentes-Diaz, C., Fellmann, D., and Mege, R. M. (1997) Localized deposition of M-cadherin in the glomeruli of the granular layer during the postnatal development of mouse cerebellum. *J Comp Neurol* **378**: 180-195.
- Bandtlow, C. E. and Schwab, M. E. (2000) NI-35/250/nogo-a: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia* **29**: 175-181.
- Bandtlow, C. E. and Zimmermann, D. R. (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* **80**: 1267-1290.
- Bao, W., Zheng, J., Wu, X.F., Cao, J.G., Yang, Z.J., Ren, N., Tang, Y., Gao, Y., Huang, J.P., and Zhou, L.W. (2010). Short axis contact in the chaining of ellipsoidal particles of polar molecule dominated electrorheological fluid. *J. Phys. Condens. Matter* **22**, 324105.
- Barde, Y. A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* **1**: 549-553.
- Bar-Or, A., Nuttall, R. K., Duddy, M., Alter, A., Kim, H. J., Ifergan, I. *et al.* (2003) Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* **126**: 2738-2749.

- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von, Z. M. *et al.* (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci* **3**: 1291-1300.
- Beattie, E. C., Howe, C. L., Wilde, A., Brodsky, F. M., and Mobley, W. C. (2000) NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* **20**: 7325-7333.
- Benedetti, M., Levi, A., and Chao, M. V. (1993) Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7859-7863.
- Bentley, C. A. and Lee, K. F. (2000) p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci* **20**: 7706-7715.
- Bernik, T. R., Friedman, S. G., Ochani, M., DiRaimo, R., Ulloa, L., Yang, H. *et al.* (2002) Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med* **195**: 781-788.
- Bi, X., Lynch, G., Zhou, J., and Gall, C. M. (2001) Polarized distribution of alpha5 integrin in dendrites of hippocampal and cortical neurons. *J Comp Neurol* **435**: 184-193.
- Bi, X., Yong, A. P., Zhou, J., Ribak, C. E., and Lynch, G. (2001) Rapid induction of intraneuronal neurofibrillary tangles in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8832-8837.
- Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y. A. (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors Trk and p75NTR. *EMBO J* **18**: 616-622.
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E. T. *et al.* (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* **297**: 1525-1531.
- Birkedal-Hansen, H. (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* **64**: 474-484.
- Birkedal-Hansen, H. (1995) Matrix metalloproteinases. *Adv Dent Res* **9**: 16.
- Birkedal-Hansen, H. (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 728-735.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Boddien, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. *et al.* (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**: 197-250.
- Bishop, J. F., Mueller, G. P., and Mouradian, M. M. (1994) Alternate 5' exons in the rat brain-derived neurotrophic factor gene: differential patterns of expression across brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* **26**: 225-232.

- Bixby, J. L. and Bookman, R. J. (1996) Intracellular mechanisms of axon growth induction by CAMs and integrins: some unresolved issues. *Perspect Dev Neurobiol* **4**: 147-156.
- Bixby, J. L., Grunwald, G. B., and Bookman, R. J. (1994) Ca²⁺ influx and neurite growth in response to purified N-cadherin and laminin. *J Cell Biol* **127**: 1461-1475.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F. *et al.* (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**: 729-733.
- Blum, R., Kafitz, K. W., and Konnerth, A. (2002) Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature* **419**: 687-693.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., and Greenberg, M. E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**: 1358-1362.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Nardi, D., Zhang, M., Yang, H., Ombrellino, M. *et al.* (2000) Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci* **85**: 141-147.
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R. *et al.* (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* **405**: 458-462.
- Bothwell, M. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* **18**: 223-253.
- Boucher, T. J. and McMahon, S. B. (2001) Neurotrophic factors and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* **1**: 66-72.
- Bowden, J. J., Garland, A. M., Baluk, P., Lefevre, P., Grady, E. F., Vigna, S. R. *et al.* (1994) Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8964-8968.
- Brain, S. D. and Williams, T. J. (1988) Neuropharmacology of peptides in skin. *Semin Dermatol* **7**: 278-283.
- Brain, S. D. and Williams, T. J. (1988) Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Nature* **335**: 73-75.
- Brennan, C., Rivas-Plata, K., and Landis, S. C. (1999) The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nat Neurosci* **2**: 699-705.
- Brew, K., Dinakarbandian, D., and Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 267-283.
- Brogden, K. A., Guthmiller, J. M., Salzet, M., and Zasloff, M. (2005) The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* **6**: 558-564.

- Brown, P. D., Kleiner, D. E., Unsworth, E. J., and Stetler-Stevenson, W. G. (1993) Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int* **43**: 163-170.
- Browner, M. F., Smith, W. W., and Castelhana, A. L. (1995) Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases. *Biochemistry* **34**: 6602-6610.
- Bruce, A. B. (1910) the mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor1. *Science* **32**: 627-628.
- Bruce, H. A. (1910) IV. Chloroma of the Jaws 4. *Ann Surg* **51**: 52-64.
- Bruce, I. (1910) Discussion on Pericarditis with Effusion, as determined by Operation or Post-mortem Examination 3. *Proc R Soc Med* **3**: 93-94.
- Bruce, L. C. (1910) Remarks on the effect of bacterial vaccines on nutrition 2. *Br Med J* **1**: 430-432.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S. *et al.* (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.
- Buchman, V. L., Sporn, M., and Davies, A. M. (1994) Role of transforming growth factor-beta isoforms in regulating the expression of nerve growth factor and neurotrophin-3 mRNA levels in embryonic cutaneous cells at different stages of development. *Development* **120**: 1621-1629.
- Buck, S. H. and Burks, T. F. (1986) The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol Rev* **38**: 179-226.
- Burgoyne, R. D. and Cambray-Deakin, M. A. (1988) The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res* **472**: 77-101.
- Burmeister, D. W., Rivas, R. J., and Goldberg, D. J. (1991) Substrate-bound factors stimulate engorgement of growth cone lamellipodia during neurite elongation. *Cell Motil Cytoskeleton* **19**: 255-268.
- Butte, M. J., Hwang, P. K., Mobley, W. C., and Fletterick, R. J. (1998) Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors. *Biochemistry* **37**: 16846-16852.
- Calverley, D.C., Phang, T.L., Choudhury, Q.G., Gao, B., Oton, A.B., Weyant, M.J., and Geraci, M.W. (2010). Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer. *Clin. Transl. Sci.* **3**, 227-232.
- Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N., and Thoenen, H. (2001) Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways. *EMBO J* **20**: 1640-1650.
- Carroll, P., Lewin, G. R., Koltzenburg, M., Toyka, K. V., and Thoenen, H. (1998) A role for BDNF in mechanosensation. *Nat Neurosci* **1**: 42-46.

- Caterson, B., Flannery, C. R., Hughes, C. E., and Little, C. B. (2000) Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* **19**: 333-344.
- Caulfield, J. P., Lewis, R. A., Hein, A., and Austen, K. F. (1980) Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J Cell Biol* **85**: 299-312.
- Cervero, F. (1995) Visceral pain: mechanisms of peripheral and central sensitization 3. *Ann Med* **27**: 235-239.
- Chamak, B. and Prochiantz, A. (1989) [Axons, dendrites and adhesion]. *C R Acad Sci III* **308**: 353-358.
- Chamak, B. and Prochiantz, A. (1989) Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. *Development* **106**: 483-491.
- Chambers, A. F. and Matrisian, L. M. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1260-1270.
- Chang, S. C., Tucker, T., Thorogood, N. P., and Brown, C. J. (2006) Mechanisms of X-chromosome inactivation 1. *Front Biosci* **11**: 852-866.
- Chao, M. V. (2003) Dependence receptors: what is the mechanism? *Sci STKE* **2003**: E38.
- Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**: 299-309.
- Chao, M. V. (2003) Retrograde transport redux. *Neuron* **39**: 1-2.
- Chen, C. C., Grimbaldston, M. A., Tsai, M., Weissman, I. L., and Galli, S. J. (2005) Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11408-11413.
- Ching, C.B., Wood, H.M., Ross, J.H., Gao, T., and Angermeier, K.W. (2011). The Cleveland Clinic experience with adult hypospadias patients undergoing repair: their presentation and a new classification system. *BJU. Int.* **107**, 1142-1146.
- Chun, J.Y., Tummala, R., Nadiminty, N., Lou, W., Liu, C., Yang, J., Evans, C.P., Zhou, Q., and Gao, A.C. (2010). Andrographolide, an herbal medicine, inhibits interleukin-6 expression and suppresses prostate cancer cell growth. *Genes Cancer* **1**, 868-876.
- Clary, D. O. and Reichardt, L. F. (1994) An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11133-11137.
- Clary, D. O., Weskamp, G., Austin, L. R., and Reichardt, L. F. (1994) TrkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor. *Mol Biol Cell* **5**: 549-563.

- Coderre, T. J. and Melzack, R. (1991) Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci Lett* **131**: 71-74.
- Coderre, T. J., Basbaum, A. I., Helms, C., and Levine, J. D. (1991) High-dose epinephrine acts at alpha 2-adrenoceptors to suppress experimental arthritis. *Brain Res* **544**: 325-328.
- Coderre, T. J., Chan, A. K., Helms, C., Basbaum, A. I., and Levine, J. D. (1991) Increasing sympathetic nerve terminal-dependent plasma extravasation correlates with decreased arthritic joint injury in rats. *Neuroscience* **40**: 185-189.
- Cohen, S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**: 302-311.
- Cohen, S. and Levi-Montalcini, R. (1956). A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A* **42**: 571-574.
- Coppola, V., Barrick, C. A., Bobisse, S., Rodriguez-Galan, M. C., Pivetta, M., Reynolds, D. *et al.* (2006) The scaffold protein Cybr is required for cytokine-modulated trafficking of leukocytes in vivo 1. *Mol Cell Biol* **26**: 5249-5258.
- Coppola, V., Barrick, C. A., Southon, E. A., Celeste, A., Wang, K., Chen, B. *et al.* (2004) Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities 2. *Development* **131**: 5185-5195.
- Corbit, K. C., Foster, D. A., and Rosner, M. R. (1999) Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* **19**: 4209-4218.
- Curtis, R., Adryan, K. M., Stark, J. L., Park, J. S., Compton, D. L., Weskamp, G. *et al.* (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* **14**: 1201-1211.
- Dai, H., Liu, F., Gao, Q., Fu, T., and Kou, X. (2011). A highly selective fluorescent sensor for mercury ion (II) based on azathia-crown ether possessing a dansyl moiety. *Luminescence*. **26**, 523-530.
- Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* **13**: 2905-2927.
- Daumke, O., Gao, S., von der, M. A., Haller, O., and Kochs, G. (2010). Structure of the MxA stalk elucidates the assembly of ring-like units of an antiviral module. *Small GTPases*. **1**, 62-64.
- Davies, A. M. (1993) Promoting motor neuron survival. *Curr Biol* **3**: 879-881.
- Davies, A. M., Horton, A., Burton, L. E., Schmelzer, C., Vandlen, R., and Rosenthal, A. (1993) Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *J Neurosci* **13**: 4961-4967.

- Davies, A. M., Lee, K. F., and Jaenisch, R. (1993) p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* **11**: 565-574.
- Deeb,D., Gao,X., Arbab,A.S., Barton,K., Dulchavsky,S.A., and Gautam,S.C. (2010). CDDO-Me: A Novel Synthetic Triterpenoid for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Cancers. (Basel)* **2**, 1779-1793.
- Dickson, B. J. (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**: 1959-1964.
- Dickson, B. J. and Senti, K. A. (2002) Axon guidance: growth cones make an unexpected turn. *Curr Biol* **12**: R218-R220.
- Donovan, M. J., Lin, M. I., Wiegand, P., Ringstedt, T., Kraemer, R., Hahn, R. *et al.* (2000) Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* **127**: 4531-4540.
- Du, J., Feng, L., Yang, F., and Lu, B. (2000) Activity- and Ca(2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons. *J Cell Biol* **150**: 1423-1434.
- Du,J., Zheng,J., Li,Y., Li,J., Ji,G., Dong,G., Yang,Z., Wang,W., and Gao,Z. (2010). Laparoscopy-assisted total gastrectomy with extended lymph node resection for advanced gastric cancer--reports of 82 cases. *Hepatogastroenterology* **57**, 1589-1594.
- Edelman, G. M. and Chuong, C. M. (1982) Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 7036-7040.
- Edelman, G. M. and Jones, F. S. (1998) Gene regulation of cell adhesion: a key step in neural morphogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* **26**: 337-352.
- Eide, F. F., Vining, E. R., Eide, B. L., Zang, K., Wang, X. Y., and Reichardt, L. F. (1996) Naturally occurring truncated TrkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* **16**: 3123-3129.
- Elenkov, I. J., Chrousos, G. P., and Wilder, R. L. (2000) Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* **917**: 94-105.
- Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., and Vizi, E. S. (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* **52**: 595-638.
- Enerback, L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**: 303-312.
- Enerback, L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 3. Reactivity towards compound 48/80. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**: 313-322.
- Enerback, L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 4. Monoamine storing capacity. *Acta Pathol Microbiol Scand* **67**: 365-379.

- Enerback, L. (1966) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**: 289-302.
- Engelhardt, J. I., Soos, J., Obal, I., Vigh, L., and Siklos, L. (2005) Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. *Acta Neurol Scand* **112**: 126-133.
- Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J., and Jaenisch, R. (1994) Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* **77**: 503-512.
- Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., and Persson, H. (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* **5**: 511-526.
- Esch, T., Lemmon, V., and Banker, G. (1999) Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**: 6417-6426.
- Esch, T., Lemmon, V., and Banker, G. (2000) Differential effects of NgCAM and N-cadherin on the development of axons and dendrites by cultured hippocampal neurons. *J Neurocytol* **29**: 215-223.
- Eskandari, F. and Sternberg, E. M. (2002) Neural-immune interactions in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* **966**: 20-27.
- Eskandari, F., Webster, J. I., and Sternberg, E. M. (2003) Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* **5**: 251-265.
- Esposito, D., Patel, P., Stephens, R. M., Perez, P., Chao, M. V., Kaplan, D. R. *et al.* (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* **276**: 32687-32695.
- Ethell, I. M. and Ethell, D. W. (2007) Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* **85**: 2813-2823.
- Evanko, S. P., Tammi, M. I., Tammi, R. H., and Wight, T. N. (2007) Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev* **59**: 1351-1365.
- Faivre-Sarrailh, C. and Rougon, G. (1993) Are the glypiated adhesion molecules preferentially targeted to the axonal compartment? *Mol Neurobiol* **7**: 49-60.
- Faivre-Sarrailh, C., Falk, J., Pollerberg, E., Schachner, M., and Rougon, G. (1999) NrCAM, cerebellar granule cell receptor for the neuronal adhesion molecule F3, displays an actin-dependent mobility in growth cones. *J Cell Sci* **112 Pt 18**: 3015-3027.
- Faivre-Sarrailh, C., Lena, J. Y., Had, L., Vignes, M., and Lindberg, U. (1993) Location of profilin at presynaptic sites in the cerebellar cortex; implication for the regulation of the actin-polymerization state during axonal elongation and synaptogenesis. *J Neurocytol* **22**: 1060-1072.

- Fambrough, D. and Goodman, C. S. (1996) The *Drosophila* beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell* **87**: 1049-1058.
- Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G. M., and Goodman, C. S. (1996) The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13233-13238.
- Fan, Y.J., Ye, Y.B., Gao, W., Zhang, F., and Zhang, Y.X. (2010). [Study on the seasonal variations of the active components in *Acer truncatum* leaves and the inhibitory ability on fatty acid synthase]. *Zhong. Yao Cai.* **33**, 1740-1742.
- Fang, P., Gao, Q., Liu, W.J., Qi, X.X., Li, G.B., Zhang, J., Li, Z.H., Sun, J.L., Sun, J.H., and Gao, Y.M. (2010). Survival and differentiation of neuroepithelial stem cells on chitosan bicomponent fibers. *Chin J. Physiol* **53**, 208-214.
- Farhadi, H. F., Mowla, S. J., Petrecca, K., Morris, S. J., Seidah, N. G., and Murphy, R. A. (2000) Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **20**: 4059-4068.
- Fariñas, I., Jones, K. R., Backus, C., Wang, X. Y., and Reichardt, L. F. (1994) Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* **369**: 658-661.
- Fariñas, I., Wilkinson, G. A., Backus, C., Reichardt, L. F., and Patapoutian, A. (1998) Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo. *Neuron* **21**: 325-334.
- Fariñas, I., Yoshida, C. K., Backus, C., and Reichardt, L. F. (1996) Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* **17**: 1065-1078.
- Felten, D. L. and Felten, S. Y. (1987) Immune interactions with specific neural structures. *Brain Behav Immun* **1**: 279-283.
- Felten, D. L., Ackerman, K. D., Wiegand, S. J., and Felten, S. Y. (1987) Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *J Neurosci Res* **18**: 28-21.
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Bellinger, D. L., Carlson, S. L., Ackerman, K. D., Madden, K. S. *et al.* (1987) Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* **100**: 225-260.
- Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., and Livnat, S. (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* **135**: 755s-765s.
- Fitzgerald, M. (1983) Capsaicin and sensory neurones--a review. *Pain* **15**: 109-130.
- Flannery, C. R. (2006) MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Front Biosci* **11**: 544-569.

Bibliografía

- Flannery, C. R. (2006) Usurped SLRPs: novel arthritis biomarkers exposed by catabolism of small leucine-rich proteoglycans? *Arthritis Res Ther* **8**: 106.
- Frade, J. M. and Barde, Y. A. (1998) Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* **20**: 35-41.
- Frade, J. M. and Barde, Y. A. (1998) Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* **20**: 137-145.
- Fritzschnig, B., Fariñas, I., and Reichardt, L. F. (1997) Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion 1. *J Neurosci* **17**: 6213-6225.
- Galko, M. J. and Tessier-Lavigne, M. (2000) Biochemical characterization of netrin-synergizing activity. *J Biol Chem* **275**: 7832-7838.
- Galko, M. J. and Tessier-Lavigne, M. (2000) Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* **289**: 1365-1367.
- Galli, S. J., Grimaldeston, M., and Tsai, M. (2008) Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **8**: 478-486.
- Galli, S. J., Iemura, A., Garlick, D. S., Gamba-Vitalo, C., Zsebo, K. M., and Andrews, R. G. (1993) Reversible expansion of primate mast cell populations in vivo by stem cell factor. *J Clin Invest* **91**: 148-152.
- Galli, S. J., Tsai, M., and Wershil, B. K. (1993) The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am J Pathol* **142**: 965-974.
- Galtrey, C. M. and Fawcett, J. W. (2007) Characterization of tests of functional recovery after median and ulnar nerve injury and repair in the rat forelimb. *J Peripher Nerv Syst* **12**: 11-27.
- Galtrey, C. M. and Fawcett, J. W. (2007) The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* **54**: 1-18.
- Gao, X., Zhang, H., Steinberg, G., and Zhao, H. (2010). The Akt pathway is involved in rapid ischemic tolerance in focal ischemia in Rats. *Transl. Stroke Res.* **1**, 202-209.
- Garner, A. S., Menegay, H. J., Boeshore, K. L., Xie, X. Y., Voci, J. M., Johnson, J. E. *et al.* (1996) Expression of TrkB receptor isoforms in the developing avian visual system. *J Neurosci* **16**: 1740-1752.
- Goda, Y. (2002) Cadherins communicate structural plasticity of presynaptic and postsynaptic terminals. *Neuron* **35**: 1-3.
- Goltz, M., Broll, H., Mankertz, A., Weigelt, W., Ludwig, H., Buhk, H. J. *et al.* (1994) Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses 1. *Virus Genes* **9**: 53-59.

- Gonthier, B., Nasarre, C., Roth, L., Perraut, M., Thomasset, N., Roussel, G. *et al.* (2007) Functional interaction between matrix metalloproteinase-3 and semaphorin-3C during cortical axonal growth and guidance. *Cereb Cortex* **17**: 1712-1721.
- Green, P. G., Luo, J., Hammond, E. R., and Levine, J. D. (1993) Trypsin enhances sympathetic neuron-dependent plasma extravasation in the rat knee joint. *Neurosci Lett* **158**: 117-119.
- Green, P. G., Luo, J., Heller, P. H., and Levine, J. D. (1993) Neurogenic and non-neurogenic mechanisms of plasma extravasation in the rat. *Neuroscience* **52**: 735-743.
- Greene, J., Wang, M., Liu, Y. E., Raymond, L. A., Rosen, C., and Shi, Y. E. (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* **271**: 30375-30380.
- Grewal, J. S., Mukhin, Y. V., Garnovskaya, M. N., Raymond, J. R., and Greene, E. L. (1999) Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF- β 1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol* **276**: F922-F930.
- Grewal, S. S., York, R. D., and Stork, P. J. (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **9**: 544-553.
- Guiton, M., Gunn-Moore, F. J., and Tavare, J. M. (1995) Critical role for the phosphorylation of tyrosines 674 and 675 in signalling by the Trk tyrosine kinase. *Biochem Soc Trans* **23**: 176S.
- Guiton, M., Gunn-Moore, F. J., Glass, D. J., Geis, D. R., Yancopoulos, G. D., and Tavare, J. M. (1995) Naturally occurring tyrosine kinase inserts block high affinity binding of phospholipase C gamma and Shc to TrkC and neurotrophin-3 signaling. *J Biol Chem* **270**: 20384-20390.
- Guo, Y., Yue, Q., and Gao, B. (2010). Probing the molecular mechanism of C.I. Acid red 73 binding to human serum albumin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 45-51.
- Gurish, M. F., Tao, H., Abonia, J. P., Arya, A., Friend, D. S., Parker, C. M. *et al.* (2001) Intestinal mast cell progenitors require CD49 β 7 (alpha4 β 7 integrin) for tissue-specific homing. *J Exp Med* **194**: 1243-1252.
- Haas, T. L., Davis, S. J., and Madri, J. A. (1998) Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **273**: 3604-3610.
- Hallbook, F. (1999) Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* **9**: 616-621.
- Hallbook, F., Ibanez, C. F., and Persson, H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* **6**: 845-858.
- Harvima, I. T., Horsmanheimo, L., Naukkarinen, A., and Horsmanheimo, M. (1994) Mast cell proteinases and cytokines in skin inflammation. *Arch Dermatol Res* **287**: 61-67.

Bibliografía

- Hayashita-Kinoh, H., Kinoh, H., Okada, A., Komori, K., Itoh, Y., Chiba, T. *et al.* (2001) Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth 1. *Cell Growth Differ* **12**: 573-580.
- Heerssen, H. M. and Segal, R. A. (2002) Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction 1. *Trends Neurosci* **25**: 160-165.
- Hetman, M. and Xia, Z. (2000) Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins 2. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **60**: 531-545.
- Hetman, M., Cavanaugh, J. E., Kimelman, D., and Xia, Z. (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal 5. *J Neurosci* **20**: 2567-2574.
- Heymach, J. V., Jr., Kruttgen, A., Suter, U., and Shooter, E. M. (1996) The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells 1. *J Biol Chem* **271**: 25430-25437.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y. A. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family 13. *Nature* **344**: 339-341.
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., Emlet, D. R., Dieterich, R., and Wong, A. J. (1997) Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12419-12424.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A. *et al.* (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover 3. *Cell* **99**: 81-92.
- Holzer, P. (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides /21. *Neuroscience* **24**: 739-768.
- Holzer, P. (1991) Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions 28. *Adv Exp Med Biol* **298**: 3-16.
- Holzer, P. (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons 15. *Pharmacol Rev* **43**: 143-201.
- Holzer, P. and Lippe, I. T. (1988) Stimulation of afferent nerve endings by intragastric capsaicin protects against ethanol-induced damage of gastric mucosa 1. *Neuroscience* **27**: 981-987.
- Horigome, K., Pryor, J. C., Bullock, E. D., and Johnson, E. M., Jr. (1993) Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation 4. *J Biol Chem* **268**: 14881-14887.
- Hu, X. X., Goldmuntz, E. A., and Brosnan, C. F. (1991) The effect of norepinephrine on endotoxin-mediated macrophage activation 1. *J Neuroimmunol* **31**: 35-42.

- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function 1. *Annu Rev Neurosci* **24**: 677-736.
- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction 2. *Annu Rev Biochem* **72**: 609-642.
- Huang, Q., Gao, S. B., Zhang, Z. M., Lin, H. J., Pan, G. T., Yang, K. C., and Rong, T. Z. (2010). [Construction of root library by SSH and preliminary analysis of genes responsible for phosphorus deficiency in maize]. *Genetika* **46**, 1619-1625.
- Hunt, S. P. and Mantyh, P. W. (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* **2**: 83-91.
- Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Hynes, R. O. (1992) Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr Opin Genet Dev* **2**: 621-624.
- Hynes, R. O. (2002) A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis 18. *Nat Med* **8**: 918-921.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines 17. *Cell* **110**: 673-687.
- Hynes, R. O. and Lander, A. D. (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* **68**: 303-322.
- Hynes, R. O., George, E. L., Georges, E. N., Guan, J. L., Rayburn, H., and Yang, J. T. (1992) Toward a genetic analysis of cell-matrix adhesion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**: 249-258.
- Hynes, R. O., Lively, J. C., McCarty, J. H., Taverna, D., Francis, S. E., Hodivala-Dilke, K. *et al.* (2002) The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis 3. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**: 143-153.
- Hynes, R. O., Sauer, R. T., and Sharp, P. A. (1992) The whitehead institute and mit. *Science* **256**: 719.
- Ip, N. Y., Ibanez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R. *et al.* (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3060-3064.
- Ito, A., Jippo, T., Wakayama, T., Morii, E., Koma, Y., Onda, H. *et al.* (2003) SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF 2. *Blood* **101**: 2601-2608.
- Itoh, Y., Kajita, M., Kinoh, H., Mori, H., Okada, A., and Seiki, M. (1999) Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase 1. *J Biol Chem* **274**: 34260-34266.

- Jancso, N., Jancso-Gabor, A., and Szolcsanyi, J. (1967) Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin 1. *Br J Pharmacol Chemother* **31**: 138-151.
- Jaworski, D. M. (2000) Developmental regulation of membrane type-5 matrix metalloproteinase (MT5-MMP) expression in the rat nervous system 1. *Brain Res* **860**: 174-177.
- Jiang,X., Li,H., Luo,Q., and Gao,J.H. (2011). Modeling MR signal change induced by oxygen effect in neural tissue preparations of various geometries. *Magn Reson. Med.* **65**, 1358-1364.
- Jiang,Y., Gao,F., Xu,X., Ye,K., and Zhou,G. (2011). Changes in the composition of the bacterial flora on tray-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE and real-time PCR. *J. Food Sci.* **76**, M27-M33.
- Jones, K. R. and Reichardt, L. F. (1990) Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8060-8064.
- Jones, K. R., Fariñas, I., Backus, C., and Reichardt, L. F. (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* **76**: 989-999.
- Jonsson-Rylander, A. C., Nilsson, T., Fritsche-Danielson, R., Hammarstrom, A., Behrendt, M., Andersson, J. O. *et al.* (2005) Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 180-185.
- Kaczmarek, L., Lapinska-Dzwonek, J., and Szymczak, S. (2002) Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? 8. *EMBO J* **21**: 6643-6648.
- Kaczmarek, L., Luniewski, W., Zagrodzki, B., Godlewska, J., Osiadacz, J., Wietrzyk, J. *et al.* (2002) Synthesis of 6-substituted 6H-indolo[2,3-b]quinolines as novel cytotoxic agents and topoisomerase II inhibitors. *Acta Pol Pharm* **59**: 199-207.
- Kajita, M., Kinoh, H., Ito, N., Takamura, A., Itoh, Y., Okada, A. *et al.* (1999) Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts 2. *FEBS Lett* **457**: 353-356.
- Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system 2. *Curr Opin Neurobiol* **10**: 381-391.
- Kayagaki, N. and Yagita, H. (1996) [Metalloproteinase-mediated release of human fas ligand] 3. *Nihon Rinsho* **54**: 1747-1752.
- Kermani, P., Rafii, D., Jin, D. K., Whitlock, P., Schaffer, W., Chiang, A. *et al.* (2005) Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors 2. *J Clin Invest* **115**: 653-663.

- Khom, S., Baburin, I., Timin, E. N., Hohaus, A., Sieghart, W., and Hering, S. (2006) Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits 9. *Mol Pharmacol* **69**: 640-649.
- Khom, S., Baburin, I., Timin, E., Hohaus, A., Trauner, G., Kopp, B. *et al.* (2007) Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity 8. *Neuropharmacology* **53**: 178-187.
- Khom, S., Strommer, B., Ramharter, J., Schwarz, T., Schwarzer, C., Erker, T. *et al.* (2010) Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization 4. *Br J Pharmacol* **161**: 65-78.
- Kinoh, H., Sato, H., Tsunozuka, Y., Takino, T., Kawashima, A., Okada, Y. *et al.* (1996) MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis 2. *J Cell Sci* **109 (Pt 5)**: 953-959.
- Kirstein, M. and Fariñas, I. (2002) Sensing life: regulation of sensory neuron survival by neurotrophins 3. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1787-1802.
- Kitamura, Y. (2005) [Recent progress of mast cell research] 5. *Arerugi* **54**: 45-47.
- Kitamura, Y. (2005) MITF and SgIGSF: an essential transcription factor and its target adhesion molecule for development and survival of mast cells 1. *Novartis Found Symp* **271**: 4-11.
- Kitamura, Y. and Ito, A. (2005) Mast cell-committed progenitors 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11129-11130.
- Kitamura, Y., Yokoyama, M., Matsuda, H., Ohno, T., and Mori, K. J. (1981) Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes 1. *Nature* **291**: 159-160.
- Klein, R. (1994) Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J* **8**: 738-744.
- Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S. *et al.* (1994) Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene TrkC eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature* **368**: 249-251.
- Kohm, A. P., Tang2 Y, Sanders, V. M., and Jones3 SB (2000) Activation of antigen-specific CD4+ Th2 cells and B cells in vivo increases norepinephrine release in the spleen and bone marrow 1. *J Immunol* **165**: 725-733.
- Koibuchi, N., Fukuda, H., and Chin, W. W. (1999) Promoter-specific regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene by thyroid hormone in the developing rat cerebellum 1. *Endocrinology* **140**: 3955-3961.
- Koibuchi, N., Liu, Y., Fukuda, H., Takeshita, A., Yen, P. M., and Chin, W. W. (1999) ROR alpha augments thyroid hormone receptor-mediated transcriptional activation 4. *Endocrinology* **140**: 1356-1364.
- Kojima, S., Itoh, Y., Matsumoto, S., Masuho, Y., and Seiki, M. (2000) Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP 2. *FEBS Lett* **480**: 142-146.

Bibliografía

- Kolbeck, R., Jungbluth, S., and Barde, Y. A. (1994) Characterisation of neurotrophin dimers and monomers 1. *Eur J Biochem* **225**: 995-1003.
- Komori, K., Nonaka, T., Okada, A., Kinoh, H., Hayashita-Kinoh, H., Yoshida, N. *et al.* (2004) Absence of mechanical allodynia and Abeta-fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. *FEBS Lett* **557**: 125-128.
- Kultti, A., Rilla, K., Tiihonen, R., Spicer, A. P., Tammi, R. H., and Tammi, M. I. (2006) Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions 1. *J Biol Chem* **281**: 15821-15828.
- Kuo, C.H., Gao, K., Clifford, A., Shannon, K., and Clark, J. (2011). Orbital exenterations: an 18-year experience from a single head and neck unit. *ANZ. J. Surg.* **81**, 326-330.
- Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Kanbe, T., Maruyama, T., Ghosh, H. P. *et al.* (2001) TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer 21. *Nat Genet* **27**: 427-430.
- Lafont, F., Rouget, M., Triller, A., Prochiantz, A., and Rousset, A. (1992) In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. *Development* **114**: 17-29.
- Lai, K. O., Fu, W. Y., Ip, F. C., and Ip, N. Y. (1998) Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp 1. *Mol Cell Neurosci* **11**: 64-76.
- Laird, J. M., de la Rubia, P. G., and Cervero, F. (1995) Excitability changes of somatic and viscerosomatic nociceptive reflexes in the decerebrate-spinal rabbit: role of NMDA receptors. *J Physiol* **489 (Pt 2)**: 545-555.
- Landolt, R. M., Vaughan, L., Winterhalter, K. H., and Zimmermann, D. R. (1995) Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth 5. *Development* **121**: 2303-2312.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A., and Gilroy, D. W. (2002) Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation 5. *Nat Rev Immunol* **2**: 787-795.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., and Hempstead, B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins 1. *Science* **294**: 1945-1948.
- Leighton, P. A., Mitchell, K. J., Goodrich, L. V., Lu, X., Pinson, K., Scherz, P. *et al.* (2001) Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice 1. *Nature* **410**: 174-179.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor: thirty-five years later 2. *Biosci Rep* **7**: 681-699.
- Levi-Montalcini, R. and Cohen, S. (1956). In vitro and in vivo effects of a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom. *Proc Natl Acad Sci U S A* **42**: 695-699.
- Levine, J. D., Dardick, S. J., Basbaum, A. I., and Scipio, E. (1985) Reflex neurogenic inflammation. I. Contribution of the peripheral nervous system to spatially remote inflammatory responses that follow injury 2. *J Neurosci* **5**: 1380-1386.

- Levy, D., Burstein, R., Kainz, V., Jakubowski, M., and Strassman, A. M. (2007) Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache 3. *Pain* **130**: 166-176.
- Lewin, G. R. and Barde, Y. A. (1996) Physiology of the neurotrophins 2. *Annu Rev Neurosci* **19**: 289-317.
- Lewin, G. R. and Mendell, L. M. (1994) Regulation of cutaneous C-fiber heat nociceptors by nerve growth factor in the developing rat 3. *J Neurophysiol* **71**: 941-949.
- Lewin, G. R., Rueff, A., and Mendell, L. M. (1994) Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia 1. *Eur J Neurosci* **6**: 1903-1912.
- Li, L., He, Q., and Gao, Y. S. (2010). [Phosphodiesterase regulation of cardiovascular functions]. *Sheng Li Ke. Xue. Jin. Zhan.* **41**, 100-106.
- Li, L., Yue, Z., Lu, H., Zhang, Y., Liu, C., Gao, S., and Yue, W. (2010). [The expression of EMS1 and DcR3 protein in laryngeal carcinoma and the relation between EMS1 and DcR3]. *Lin. Chung Er. Bi Yan. Hou Tou. Jing. Wai Ke. Za Zhi.* **24**, 1126-8, 1141.
- Li, S., Cui, L., Zhao, J., Dai, P., Zong, S., Zuo, W., Chen, C., Jin, H., Gao, H., and Liu, Q. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in female sterility patients in China. *J. Parasitol.* **97**, 529-530.
- Li, Z., Ni, J., Fang, G., Gao, Y., and Wei, J. (2010). [Effect of baicalin on pharmacokinetics of chlorogenic acid in rabbits]. *Zhongguo Zhong. Yao Za Zhi.* **35**, 3291-3293.
- Li, Z. C., Li, H. J., Dai, L. L., Gao, Y. Q., Cai, W. P., Li, H. Y., Huang, X. J., Zhang, T., and Wu, H. (2010). Liver injury in HIV-1-infected patients receiving non-nucleosides reverse transcriptase inhibitors-based antiretroviral therapy. *Chin Med. J. (Engl.)* **123**, 3587-3590.
- Liebl, D. J., Klesse, L. J., Tessarollo, L., Wohlman, T., and Parada, L. F. (2000) Loss of brain-derived neurotrophic factor-dependent neural crest-derived sensory neurons in neurotrophin-4 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2297-2302.
- Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G., and Ibanez, C. F. (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor 3. *EMBO J* **16**: 4999-5005.
- Lin, S., Lian, Q., and Pang, M. (2000) [Exploration on parameters of TCM syndrome in acute cerebral infarction through investigating active factors of vascular endothelium cells] 3. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* **20**: 911-914.
- Liotta, L. A., Goldfarb, R. H., Brundage, R., Siegal, G. P., Terranova, V., and Garbisa, S. (1981) Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane 2. *Cancer Res* **41**: 4629-4636.
- Lipton, J. M. and Catania, A. (1997) Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH 1. *Immunol Today* **18**: 140-145.

Bibliografía

- Liu,W., Huang,D., Liu,K., Hu,S., Yu,J., Gao,G., and Song,S. (2010). Discovery, identification and comparative analysis of non-specific lipid transfer protein (nsLtp) family in Solanaceae. *Genomics Proteomics. Bioinformatics.* **8**, 229-237.
- Llano, E., Pendas, A. M., Freije, J. P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G. *et al.* (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors 1. *Cancer Res* **59**: 2570-2576.
- Lopez-Otin, C. and Bond, J. S. (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease1. *J Biol Chem* **283**: 30433-30437.
- Lorentz, A., Schwengberg, S., Sellge, G., Manns, M. P., and Bischoff, S. C. (2000) Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4 1. *J Immunol* **164**: 43-48.
- Luckenbill-Edds, L. (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth 1. *Brain Res Brain Res Rev* **23**: 1-27.
- Maeda, N. and Noda, M. (1996) 6B4 proteoglycan/phosphacan is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons. *Development* **122**: 647-658.
- Maggi, C. A. (1995) Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves 20. *Prog Neurobiol* **45**: 1-98.
- Maggi, C. A. (1995) The mammalian tachykinin receptors 9. *Gen Pharmacol* **26**: 911-944.
- Maggi, C. A., Giachetti, A., Dey, R. D., and Said, S. I. (1995) Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins 15. *Physiol Rev* **75**: 277-322.
- Maggi, C. A., Santicoli, P., and Giuliani, S. (1995) Role of cyclic AMP and protein kinase A in K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the guinea-pig ureter 6. *J Auton Pharmacol* **15**: 403-419.
- Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M. V., and Hempstead, B. L. (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140Trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors 1. *J Biol Chem* **269**: 6884-6891.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S. N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha 8. *Nature* **381**: 77-80.
- Malaviya, R., Morrison, A. R., and Pentland, A. P. (1996) Histamine in human epidermal cells is induced by ultraviolet light injury 11. *J Invest Dermatol* **106**: 785-789.
- Malaviya, R., Twesten, N. J., Ross, E. A., Abraham, S. N., and Pfeifer, J. D. (1996) Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells 13. *J Immunol* **156**: 1490-1496.
- Margolis, R. K., Rauch, U., Maurel, P., and Margolis, R. U. (1996) Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans 4. *Perspect Dev Neurobiol* **3**: 273-290.

- Marshall, J. S. and Bienenstock, J. (1994) The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. *Curr Opin Immunol* **6**: 853-859.
- Massaad, C. A., Safieh-Garabedian, B., Poole, S., Atweh, S. F., Jabbur, S. J., and Saade, N. E. (2004) Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats 5. *J Neuroimmunol* **153**: 171-182.
- Massova, I. and Mobashery, S. (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases 4. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1-17.
- Massova, I., Kotra, L. P., and Mobashery, S. (1998) Structural insight into the binding motifs for the calcium ion and the non-catalytic zinc in matrix metalloproteases 2. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 853-858.
- Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R., and Mobashery, S. (1998) Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification 3. *FASEB J* **12**: 1075-1095.
- Massova, I., Martin, P., Bulychev, A., Kocz, R., Doyle, M., Edwards, B. F. *et al.* (1998) Templates for design of inhibitors for serine proteases: application of the program DOCK to the discovery of novel inhibitors for thrombin 1. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 2463-2466.
- Matthews, R. T., Gary, S. C., Zerillo, C., Pratta, M., Solomon, K., Arner, E. C. *et al.* (2000) Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member 1. *J Biol Chem* **275**: 22695-22703.
- Mazurek, N., Weskamp, G., Erne, P., and Otten, U. (1986) Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels 1. *FEBS Lett* **198**: 315-320.
- McFarlane, S. (2003) Metalloproteases: carving out a role in axon guidance 4. *Neuron* **37**: 559-562.
- McKay, N. G., Hunter, D. J., Haites, N. E., and Power, D. A. (1994) Regulation of alternative splicing of the fibronectin III CS domain by cytokines 3. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 1005-1011.
- McMahon, S. B., Armanini, M. P., Ling, L. H., and Phillips, H. S. (1994) Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets 1. *Neuron* **12**: 1161-1171.
- Meakin, S. O. and Shooter, E. M. (1992) The nerve growth factor family of receptors 1. *Trends Neurosci* **15**: 323-331.
- Meakin, S. O., Gryz, E. A., and MacDonald, J. I. (1997) A kinase insert isoform of rat TrkA supports nerve growth factor-dependent cell survival but not neurite outgrowth 1. *J Neurochem* **69**: 954-967.

Bibliografía

- Meakin, S. O., Suter, U., Drinkwater, C. C., Welcher, A. A., and Shooter, E. M. (1992) The rat Trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2374-2378.
- Merighi, A. (2002) Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS 1. *Prog Neurobiol* **66**: 161-190.
- Metcalfe, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A. (1997) Mast cells 2. *Physiol Rev* **77**: 1033-1079.
- Michele, D. E. and Campbell, K. P. (2003) Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function 26. *J Biol Chem* **278**: 15457-15460.
- Middleton, G., Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E. *et al.* (2000) Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons 2. *J Cell Biol* **148**: 325-332.
- Minichiello, L., Piehl, F., Vazquez, E., Schimmang, T., Hokfelt, T., Represa, J. *et al.* (1995) Differential effects of combined Trk receptor mutations on dorsal root ganglion and inner ear sensory neurons. *Development* **121**: 4067-4075.
- Miranti, C. K. (2002) Application of cell adhesion to study signaling networks 1. *Methods Cell Biol* **69**: 359-383.
- Miranti, C. K. and Brugge, J. S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction 2. *Nat Cell Biol* **4**: E83-E90.
- Molliver, D. C. and Snider, W. D. (1997) Nerve growth factor receptor TrkA is down-regulated during postnatal development by a subset of dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol* **381**: 428-438.
- Molliver, D. C., Wright, D. E., Leitner, M. L., Parsadanian, A. S., Doster, K., Wen, D. *et al.* (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* **19**: 849-861.
- Monea, S., Jordan, B. A., Srivastava, S., DeSouza, S., and Ziff, E. B. (2006) Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins. *J Neurosci* **26**: 2300-2312.
- Mowla, S. J., Pareek, S., Farhadi, H. F., Petrecca, K., Fawcett, J. P., Seidah, N. G. *et al.* (1999) Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons 2. *J Neurosci* **19**: 2069-2080.
- Mu, X., Silos-Santiago, I., Carroll, S. L., and Snider, W. D. (1993) Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci* **13**: 4029-4041.
- Muir, D. (1994) Metalloproteinase-dependent neurite outgrowth within a synthetic extracellular matrix is induced by nerve growth factor 2. *Exp Cell Res* **210**: 243-252.
- Nagase, H. (1994) Matrix metalloproteinases. A mini-review 39. *Contrib Nephrol* **107**: 85-93.

- Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases 5. *J Biol Chem* **274**: 21491-21494.
- Nagase, H., Fields, C. G., and Fields, G. B. (1994) Design and characterization of a fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin 1 (matrix metalloproteinase-3) 13. *J Biol Chem* **269**: 20952-20957.
- Nagase, H., Itoh, Y., and Binner, S. (1994) Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms 8. *Ann N Y Acad Sci* **732**: 294-302.
- Naukkarinen, A., Harvima, I. T., Aalto, M. L., and Horsmanheimo, M. (1994) Mast cell tryptase and chymase are potential regulators of neurogenic inflammation in psoriatic skin 8. *Int J Dermatol* **33**: 361-366.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., and Matrisian, L. M. (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications 1. *J Clin Oncol* **18**: 1135-1149.
- Niederost, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E., and Bandtlow, C. E. (1999) Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans 1. *J Neurosci* **19**: 8979-8989.
- Niu, M., Du, M., Gao, Z., Yang, C., Lu, X., Qiao, R., and Gao, M. (2010). Monodispersed magnetic polystyrene beads with excellent colloidal stability and strong magnetic response. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 1805-1810.
- Nosaka, Y., Arai, A., Miyasaka, N., and Miura, O. (1999) CrkL mediates Ras-dependent activation of the Raf/ERK pathway through the guanine nucleotide exchange factor C3G in hematopoietic cells stimulated with erythropoietin or interleukin-3 8. *J Biol Chem* **274**: 30154-30162.
- Nurse, C.A. and Diamond, J. (1984). A fluorescent microscopic study of the development of rat touch domes and their Merkel cells. *Neuroscience* **11**, 509-520.
- Oakley, R.A. and Tosney, K.W. (1991). Peanut agglutinin and chondroitin-6-sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo. *Dev. Biol.* **147**, 187-206.
- O'Connor, T.P., Saucier, J.M., Daniluk, D., Stillman, B.A., Krah, R., Rikihisa, Y., Xiong, Q., Yabsley, M.J., Adams, D.S., Diniz, P.P., Breitschwerdt, E.B., Gaunt, S.D., and Chandrashekar, R. (2010). Evaluation of peptide- and recombinant protein-based assays for detection of anti-Ehrlichia ewingii antibodies in experimentally and naturally infected dogs. [corrected]. *Am. J. Vet. Res.* **71**, 1195-1200.
- Okada, A., Saez, S., Misumi, Y., and Basset, P. (1997) Rat stromelysin 3: cDNA cloning from healing skin wound, activation by furin and expression in rat tissues 8. *Gene* **185**: 187-193.
- Okada, A., Tomasetto, C., Lutz, Y., Bellocq, J. P., Rio, M. C., and Basset, P. (1997) Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A 6. *J Cell Biol* **137**: 67-77.

Bibliografía

- Okamura, A.M., Simone, C., and O'Leary, M.D. (2004). Force modeling for needle insertion into soft tissue. *IEEE Trans. Biomed. Eng* **51**, 1707-1716.
- Ottaway, C. A. (1991) Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa 1. *Gastroenterol Clin North Am* **20**: 511-529.
- Overall, C. M. (2002) Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites 6. *Mol Biotechnol* **22**: 51-86.
- Overall, C. M. and Lopez-Otin, C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era 7. *Nat Rev Cancer* **2**: 657-672.
- Overall, C. M., McQuibban, G. A., and Clark-Lewis, I. (2002) Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics 3. *Biol Chem* **383**: 1059-1066.
- Page-McCaw, A. (2008) Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates 2. *Semin Cell Dev Biol* **19**: 14-23.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., and Werb, Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling 3. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 221-233.
- Pang, P. T. and Lu, B. (2004) Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF 1. *Ageing Res Rev* **3**: 407-430.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S. *et al.* (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity 2. *Science* **306**: 487-491.
- Pang, M., Gao, C.L., Wu, Z.X., Lv, N., Wang, Z.L., Tang, X.X., and Qu, P. (2010). Apoptosis induced by yessotoxins in Hela human cervical cancer cells in vitro. *Mol. Med. Rep.* **3**, 629-634.
- Pasche, F., Merot, Y., Carraux, P., and Saurat, J.H. (1990). Relationship between Merkel cells and nerve endings during embryogenesis in the mouse epidermis. *J. Invest Dermatol.* **95**, 247-251.
- Patapoutian, A. and Reichardt, L. F. (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action 1. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 272-280.
- Patapoutian, A., Backus, C., Kispert, A., and Reichardt, L. F. (1999) Regulation of neurotrophin-3 expression by epithelial-mesenchymal interactions: the role of Wnt factors 1. *Science* **283**: 1180-1183.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 529-539.
- Pavloff, N., Rivard, D., Masson, S., Shen, S. H., and Mes-Masson, A. M. (1992) Sequence analysis of the large and small subunits of human ribonucleotide reductase 2. *DNA Seq* **2**: 227-234.

- Pavloff, N., Staskus, P. W., Kishnani, N. S., and Hawkes, S. P. (1992) A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family 1. *J Biol Chem* **267**: 17321-17326.
- Payan, D. G. (1989) Neuropeptides and inflammation: the role of substance P 26. *Annu Rev Med* **40**: 341-352.
- Payan, D. G. (1989) Substance P: a modulator of neuroendocrine-immune function 18. *Hosp Pract (Off Ed)* **24**: 67-80.
- Pearce, F. L. (1982) Calcium and histamine secretion from mast cells 11. *Prog Med Chem* **19**: 59-109.
- Pearce, F. L. (1982) Functional heterogeneity of mast cells from different species and tissues 2. *Klin Wochenschr* **60**: 954-957.
- Pearce, F. L. and Clements, J. (1982) Effect of disodium cromoglycate and cyclic AMP-active drugs on cytotoxic histamine release from rat mast cells 3. *Biochem Pharmacol* **31**: 2247-2250.
- Pearce, F. L. and Messis, P. D. (1982) Phosphatidic acid induces histamine secretion from rat peritoneal mast cells 14. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **68**: 93-95.
- Pearce, F. L. and Thompson, H. L. (1986) Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor 1. *J Physiol* **372**: 379-393.
- Pearce, F. L., Befus, A. D., and Bienenstock, J. (1982) Isolation and properties of mast cells from the small bowel lamina propria of the rat 10. *Agents Actions* **12**: 183-185.
- Pearce, F. L., Befus, A. D., Gauldie, J., and Bienenstock, J. (1982) Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells 6. *J Immunol* **128**: 2481-2486.
- Pedotti, R., De Voss, J. J., Steinman, L., and Galli, S. J. (2003) Involvement of both 'allergic' and 'autoimmune' mechanisms in EAE, MS and other autoimmune diseases 10. *Trends Immunol* **24**: 479-484.
- Pedotti, R., DeVoss, J. J., Youssef, S., Mitchell, D., Wedemeyer, J., Madanat, R. *et al.* (2003) Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination 20. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1867-1872.
- Pedotti, R., Sanna, M., Tsai, M., DeVoss, J., Steinman, L., McDevitt, H. *et al.* (2003) Severe anaphylactic reactions to glutamic acid decarboxylase (GAD) self peptides in NOD mice that spontaneously develop autoimmune type 1 diabetes mellitus 17. *BMC Immunol* **4**: 2.
- Pedraza, C. E., Podlesniy, P., Vidal, N., Arevalo, J. C., Lee, R., Hempstead, B. *et al.* (2005) Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR 17. *Am J Pathol* **166**: 533-543.

- Pei, D. (1999) Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage 2. *Cell Res* **9**: 291-303.
- Pinkstaff, J. K., Lynch, G., and Gall, C. M. (1998) Localization and seizure-regulation of integrin beta 1 mRNA in adult rat brain 4. *Brain Res Mol Brain Res* **55**: 265-276.
- Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L., and Edwards, D. R. (2005) The ADAMTS metalloproteinases 17. *Biochem J* **386**: 15-27.
- Powell, I. F., Li, T., Jack, H. M., and Ellis, T. M. (1998) Construction and expression of a soluble form of human CD30 ligand with functional activity 3. *J Leukoc Biol* **63**: 752-757.
- Powell, S. K., Williams, C. C., Nomizu, M., Yamada, Y., and Kleinman, H. K. (1998) Laminin-like proteins are differentially regulated during cerebellar development and stimulate granule cell neurite outgrowth in vitro 1. *J Neurosci Res* **54**: 233-247.
- Preece, G., Murphy, G., and Ager, A. (1996) Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes 8. *J Biol Chem* **271**: 11634-11640.
- Prochiantz, A. (1995) Neuronal polarity: giving neurons heads and tails 2. *Neuron* **15**: 743-746.
- Prochiantz, A. and Theodore, L. (1995) Nuclear/growth factors 6. *Bioessays* **17**: 39-44.
- Puente, J., Salas, M. A., Canon, C., Miranda, D., Wolf, M. E., and Mosnaim, A. D. (1996) Activation of protein tyrosine kinase: a possible requirement for fixed-bacteria and lipopolysaccharide-induced increase in human natural killer cell activity. *Int J Clin Pharmacol Ther* **34**: 212-218.
- Puente, X. S., Pendas, A. M., Llano, E., Velasco, G., and Lopez-Otin, C. (1996) Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* **56**: 944-949.
- Quian, X. L., Decker, S. J., and Greene, M. I. (1992) p185c-neu and epidermal growth factor receptor associate into a structure composed of activated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1330-1334.
- Ranum, L.P., Daughters, R.S., Tuttle, D.L., Gao, W., Ikeda, Y., Moseley, M.L., Ebner, T., and Swanson, M.S. (2010). Double the trouble: bidirectional expression of the SCA8 CAG/CTG expansion mutation - evidence for RNA and protein gain of function effects. *Rinsho Shinkeigaku* **50**, 982-983.
- Rastegar, F., Shenaq, D., Huang, J., Zhang, W., Zhang, B.Q., He, B.C., Chen, L., Zuo, G.W., Luo, Q., Shi, Q., Wagner, E.R., Huang, E., Gao, Y., Gao, J.L., Kim, S.H., Zhou, J.Z., Bi, Y., Su, Y., Zhu, G., Luo, J., Luo, X., Qin, J., Reid, R.R., Luu, H.H., Haydon, R.C., Deng, Z.L., and He, T.C. (2010). Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J. Stem Cells* **2**, 67-80.
- Rauch, U. (2004) Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain 1. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2031-2045.

- Rauch, U., Hirakawa, S., Oohashi, T., Kappler, J., and Roos, G. (2004) Cartilage link protein interacts with neurocan, which shows hyaluronan binding characteristics different from CD44 and TSG-6 3. *Matrix Biol* **22**: 629-639.
- Reichard, J. F. and Petersen, D. R. (2006) Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular-regulated kinase in hepatic stellate cell antioxidant response and myofibroblastic transdifferentiation 30. *Arch Biochem Biophys* **446**: 111-118.
- Reichard, J. F., Dalton, T. P., Shertzer, H. G., and Puga, A. (2005) Induction of oxidative stress responses by dioxin and other ligands of the aryl hydrocarbon receptor 1. *Dose Response* **3**: 306-331.
- Reichard, J. F., Schnekenburger, M., and Puga, A. (2007) Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation 8. *Biochem Biophys Res Commun* **352**: 188-192.
- Reichardt, L. F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways 12. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**: 1545-1564.
- Renehan, W.E. and Munger, B.L. (1990). The development of Meissner corpuscles in primate digital skin. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *51*, 35-44.
- Riccio, A., Aaltonen, L. A., Godwin, A. K., Loukola, A., Percesepe, A., Salovaara, R. *et al.* (1999) The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability 6. *Nat Genet* **23**: 266-268.
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C. M., Blendy, J. A., and Ginty, D. D. (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons 1. *Science* **286**: 2358-2361.
- Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G.B., Cornel, E., Lilienbaum, A., and Holt, C.E. (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* *17*, 837-848.
- Rilla, K., Tiihonen, R., Kultti, A., Tammi, M., and Tammi, R. (2008) Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasma membrane protrusions 3. *J Histochem Cytochem* **56**: 901-910.
- Robinson, R. C., Radziejewski, C., Stuart, D. I., and Jones, E. Y. (1995) Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer 2. *Biochemistry* **34**: 4139-4146.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C., Graubert, M., and Iruela-Arispe, M. L. (2000) Endothelial cell dysfunction following prolonged activation of progesterone receptor 1. *Hum Reprod* **15 Suppl 3**: 39-47.
- Rodriguez-Manzaneque, J. C., Milchanowski, A. B., Dufour, E. K., Leduc, R., and Iruela-Arispe, M. L. (2000) Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms 2. *J Biol Chem* **275**: 33471-33479.
- Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., and Barde, Y. A. (1990) Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor /1. *Neuron* **4**: 487-492.

- Rohrbough, J., Grotewiel, M. S., Davis, R. L., and Broadie, K. (2000) Integrin-mediated regulation of synaptic morphology, transmission, and plasticity 1. *J Neurosci* **20**: 6868-6878.
- Rudick, C. N., Bryce, P. J., Guichelaar, L. A., Berry, R. E., and Klumpp, D. J. (2008) Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain 11. *PLoS One* **3**: e2096.
- Rudick, C. N., Schaeffer, A. J., and Thumbikat, P. (2008) Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain 14. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**: R1268-R1275.
- Rueff, A. and Mendell, L.M. (1996). Nerve growth factor NT-5 induce increased thermal sensitivity of cutaneous nociceptors in vitro. *J. Neurophysiol.* **76**, 3593-3596.
- Rueff, A., Dawson, A.J., and Mendell, L.M. (1996). Characteristics of nerve growth factor induced hyperalgesia in adult rats: dependence on enhanced bradykinin-1 receptor activity but not neurokinin-1 receptor activation. *Pain* **66**, 359-372.
- Ruoslahti, E. (1997) Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy 9. *Kidney Int* **51**: 1413-1417.
- Ruoslahti, E. (1997) Stretching is good for a cell 8. *Science* **276**: 1345-1346.
- Ruoslahti, E. and Engvall, E. (1997) Integrins and vascular extracellular matrix assembly 1. *J Clin Invest* **100**: S53-S56.
- Ruoslahti, E. and Vaheri, A. (1997) Cell-to-cell contact and extracellular matrix 2. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 605-607.
- Saade, N. E., Baliki, M., El-Khoury, C., Hawwa, N., Atweh, S. F., Apkarian, A. V. *et al.* (2002) The role of the dorsal columns in neuropathic behavior: evidence for plasticity and non-specificity 7. *Neuroscience* **115**: 403-413.
- Saade, N. E., Massaad, C. A., Ochoa-Chaar, C. I., Jabbur, S. J., Safieh-Garabedian, B., and Atweh, S. F. (2002) Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats 4. *J Physiol* **545**: 241-253.
- Saffell, J.L., Williams, E.J., Mason, I.J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1997). Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* **18**, 231-242.
- Sah, D.W., Ossipo, M.H., and Porreca, F. (2003). Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 460-472.
- Sah, J.F., Balasubramanian, S., Eckert, R.L., and Rorke, E.A. (2004). Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J. Biol. Chem.* **279**, 12755-12762.
- Sakurai, H., Bush, K. T., and Nigam, S. K. (2001) Identification of pleiotrophin as a mesenchymal factor involved in ureteric bud branching morphogenesis 311. *Development* **128**: 3283-3293.

- Sandy, J. D. (2001) Proteoglycan core proteins and catabolic fragments present in tissues and fluids 10. *Methods Mol Biol* **171**: 335-345.
- Sandy, J. D. and Verscharen, C. (2001) Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo 7. *Biochem J* **358**: 615-626.
- Sandy, J. D., Westling, J., Kenagy, R. D., Iruela-Arispe, M. L., Verscharen, C., Rodriguez-Mazaneque, J. C. *et al.* (2001) Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4 19. *J Biol Chem* **276**: 13372-13378.
- Sandy, J. R., Irvine, G. H., and Leach, A. (2001) Update on orthognathic surgery 4. *Dent Update* **28**: 337-5.
- Sandy, J. R., Williams, A. C., Bearn, D., Mildinhal, S., Murphy, T., Sell, D. *et al.* (2001) Cleft lip and palate care in the United Kingdom--the Clinical Standards Advisory Group (CSAG) Study. Part 1: background and methodology 24. *Cleft Palate Craniofac J* **38**: 20-23.
- Sanes, J. R. (1989) Analysing cell lineage with a recombinant retrovirus 9. *Trends Neurosci* **12**: 21-28.
- Sanes, J. R. (1989) Extracellular matrix molecules that influence neural development 8. *Annu Rev Neurosci* **12**: 491-516.
- Saragovi, H. U., Bhandoola, A., Moreau, J. L., Lavine, N., Gagnon, M., Lemercier, M. M. *et al.* (1998) Functional and physical association of a cell surface phospholipid and interleukin-2 receptor p55(alpha) subunits 2. *Biochim Biophys Acta* **1414**: 51-64.
- Saragovi, H. U., Rebai, N., Roux, E., Gagnon, M., Zhang, X., Robaire, B. *et al.* (1998) Signal transduction and antiproliferative function of the mammalian receptor for type 3 retrovirus 5. *Curr Top Microbiol Immunol* **233**: 155-166.
- Saragovi, H. U., Zheng, W., Maliartchouk, S., DiGuglielmo, G. M., Mawal, Y. R., Kamen, A. *et al.* (1998) A TrkA-selective, fast internalizing nerve growth factor-antibody complex induces trophic but not neurotogenic signals 1. *J Biol Chem* **273**: 34933-34940.
- Saxod, R. (1996). Ontogeny of the cutaneous sensory organs. *Microsc. Res. Tech.* **34**, 313-333.
- Saxod, R., Pays, L., and Hemming, F. J. (1996). [Development of the cutaneous nervous system]. *Pathol. Biol. (Paris)* **44**, 838-848.
- Schechterson, L. C. and Bothwell, M. (1992) Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron* **9**: 449-463.
- Schechterson, L. C. and Bothwell, M. (1992). Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron* **9**, 449-463.

Bibliografía

- Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S., Jr. (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids 1. *Science* **270**: 283-286.
- Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., and Baldwin, A. S., Jr. (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors 2. *Mol Cell Biol* **15**: 943-953.
- Schimmelpfeng, K., Gogel, S., and Klambt, C. (2001) The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration 1. *Mech Dev* **106**: 25-36.
- Schmalfeldt, M., Bandtlow, C. E., Dours-Zimmermann, M. T., Winterhalter, K. H., and Zimmermann, D. R. (2000) Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth 2. *J Cell Sci* **113 (Pt 5)**: 807-816.
- Scholz, J. and Woolf, C. J. (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* **10**: 1361-1368.
- Schonthal, A., Gebel, S., Stein, B., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1988) Nuclear oncoproteins determine the genetic program in response to external stimuli 3. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **53 Pt 2**: 779-787.
- Schonthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J., and Ponta, H. (1988) Requirement for FOS gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters 2. *Cell* **54**: 325-334.
- Schwartz, L. B. (1994) Mast cells: function and contents 12. *Curr Opin Immunol* **6**: 91-97.
- Schwartz, L. B. (1994) Tryptase: a clinical indicator of mast cell-dependent events 10. *Allergy Proc* **15**: 119-123.
- Schwartz, L. B. (1994) Tryptase: a mast cell serine protease 14. *Methods Enzymol* **244**: 88-100.
- Schwartz, L. B. and Kepley, C. (1994) Development of markers for human basophils and mast cells 1. *J Allergy Clin Immunol* **94**: 1231-1240.
- Schwartz, L. B., Bradford, T. R., Rouse, C., Irani, A. M., Rasp, G., Van der Zwan, J. K. *et al.* (1994) Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis 9. *J Clin Immunol* **14**: 190-204.
- Scott, S. Sensory neurons: Diversity, development and Plasticity. New York: Oxford University Press. 1992. Ref Type: In Press
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Chretien, M., and Murphy, R. A. (1996) Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases 13. *FEBS Lett* **379**: 247-250.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B. *et al.* (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases 11. *Biochem J* **314 (Pt 3)**: 951-960.

- Seidah, N. G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M. *et al.* (1996) cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3388-3393.
- Seiki, M. (1999) Membrane-type matrix metalloproteinases 21. *APMIS* **107**: 137-143.
- Sekine-Aizawa, Y., Hama, E., Watanabe, K., Tsubuki, S., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y. *et al.* (2001) Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum 3. *Eur J Neurosci* **13**: 935-948.
- Selby, M. J., Edwards, R., Sharp, F., and Rutter, W. J. (1987) Mouse nerve growth factor gene: structure and expression 1. *Mol Cell Biol* **7**: 3057-3064.
- Shanahan, F., Denburg, J. A., Fox, J., Bienenstock, J., and Befus, D. (1985) Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release 13. *J Immunol* **135**: 1331-1337.
- Shelton, D. L., McMahon, S. B., Winslow, J. W., and Qao, W. Q. (1995) Neurotrophins and neurotrophin antagonists as potential therapeutics. *Restor Neurol Neurosci* **8**: 99-100.
- Shelton, D. L., Sutherland, J., Gripp, J., Camerato, T., Armanini, M. P., Phillips, H. S. *et al.* (1995) Human Trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins 70. *J Neurosci* **15**: 477-491.
- Shindler, K. S., Yunker, A. M., Cahn, R., Zha, J., Korsmeyer, S. J., and Roth, K. A. (1998) Trophic support promotes survival of bcl-x-deficient telencephalic cells in vitro 1. *Cell Death Differ* **5**: 901-910.
- Shingai, T., Ikeda, W., Kakunaga, S., Morimoto, K., Takekuni, K., Itoh, S. *et al.* (2003) Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SglIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells 5. *J Biol Chem* **278**: 35421-35427.
- Shu, X. and Mendell, L. M. (1999). Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neurosci. Lett.* **274**, 159-162.
- Shu, X. Q. and Mendell, L. M. (1999). Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 7693-7696.
- Silos-Santiago, I., Greenlund, L. J., Johnson, E. M., Jr., and Snider, W. D. (1995) Molecular genetics of neuronal survival. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 42-49.
- Silos-Santiago, I., Jeng, B., and Snider, W. D. (1995) Sensory afferents show appropriate somatotopy at the earliest stage of projection to dorsal horn. *Neuroreport* **6**: 861-865.
- Silos-Santiago, I., Molliver, D. C., Ozaki, S., Smeyne, R. J., Fagan, A. M., Barbacid, M. *et al.* (1995) Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice. *J Neurosci* **15**: 5929-5942.

Bibliografía

- Smeyne, R. J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L. K., Bryant, S., Lewin, A. *et al.* (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**: 246-249.
- Smith, E.J., Allantaz, F., Bennett, L., Zhang, D., Gao, X., Wood, G., Kastner, D.L., Punaro, M., Aksentijevich, I., Pascual, V., and Wise, C.A. (2010). Clinical, Molecular, and Genetic Characteristics of PAPA Syndrome: A Review. *Curr. Genomics* **11**, 519-527.
- Snow, D. M., Steindler, D. A., and Silver, J. (1990) Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier 1. *Dev Biol* **138**: 359-376.
- Song, C., Gu, X., Feng, C., Wang, Y., Gao, Y., Hu, X., and Li, N. (2011). Evaluation of SNPs in the chicken HMGA2 gene as markers for body weight gain. *Anim Genet.* **42**, 333-336.
- Stead, R. H., Tomioka, M., Quinonez, G., Simon, G. T., Felten, S. Y., and Bienenstock, J. (1987) Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2975-2979.
- Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S. H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H. S. *et al.* (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* **6**: 151-158.
- Sternberg, E. M. (1997) Neural-immune interactions in health and disease 2. *J Clin Invest* **100**: 2641-2647.
- Stewart, M.J., Emery, D.L., McClure, S.J., and Bendixsen, T. (1996). The effects of four neuropeptides on the degranulation of mucosal mast cells from sheep. *Immunol. Cell Biol.* **74**, 255-257.
- Straub, R. H. (2004) Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen 1. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 640-646.
- Straub, R. H., Dorner, M., Riedel, J., Kubitzka, M., Van, R. N., Lang, B. *et al.* (1998) Tonic neurogenic inhibition of interleukin-6 secretion from murine spleen caused by opioidergic transmission. *Am J Physiol* **274**: R997-1003.
- Strohmaier, C., Carter, B. D., Urfer, R., Barde, Y. A., and Dechant, G. (1996) A splice variant of the neurotrophin receptor TrkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor 7. *EMBO J* **15**: 3332-3337.
- Stucky, C.L. and Lewin, G.R. (1999). Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J. Neurosci.* **19**, 6497-6505.
- Stucky, C.L., Koltzenburg, M., Schneider, M., Engle, M.G., Albers, K.M., and Davis, B.M. (1999). Overexpression of nerve growth factor in skin selectively affects the survival and functional properties of nociceptors. *J. Neurosci.* **19**, 8509-8516.

- Suzuki, A., Suzuki, R., Furuno, T., Teshima, R., and Nakanishi, M. (2004) N-cadherin plays a role in the synapse-like structures between mast cells and neurites. *Biol Pharm Bull* **27**: 1891-1894.
- Suzuki, M., Raab, G., Moses, M. A., Fernandez, C. A., and Klagsbrun, M. (1997) Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site 1. *J Biol Chem* **272**: 31730-31737.
- Suzuki, R., Furuno, T., Okamoto, K., Teshima, R., and Nakanishi, M. (2007) ATP plays a role in neurite stimulation with activated mast cells 1. *J Neuroimmunol* **192**: 49-56.
- Suzuki, R., Furuno, T., Teshima, R., and Nakanishi, M. (2001) Bi-directional relationship of in vitro mast cell-nerve communication observed by confocal laser scanning microscopy 6. *Biol Pharm Bull* **24**: 291-294.
- Szolcsanyi, J., Nagy, J., and Petho, G. (1993) Effect of CP-96,345 a non-peptide substance P antagonist, capsaicin, resiniferatoxin and ruthenium red on nociception 1. *Regul Pept* **46**: 437-439.
- Tal, M. and Liberman, R. (1997). Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw. *Neurosci. Lett.* **221**, 129-132.
- Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G. R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L. *et al.* (2000) Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity 2. *Neuron* **25**: 93-107.
- Tang, Z.H., Liu, K.Y., Mei, J., and Gao, X.Z. (2010). [In vitro anti-Trichomonas vaginalis effects of a mixture of dihydroartemisinin and metronidazole]. *Zhongguo Ji. Sheng Chong. Xue. Yu Ji. Sheng Chong. Bing. Za Zhi.* **28**, 416-421.
- Tao, X., West, A. E., Chen, W. G., Corfas, G., and Greenberg, M. E. (2002) A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF 1. *Neuron* **33**: 383-395.
- Tegoshi, T., Nishida, M., Ishiwata, K., Kobayashi, T., Uchiyama, F., Nabeshima, K. *et al.* (2000) E-cadherin and cadherin-associated cytoplasmic proteins are expressed in murine mast cells 1. *Lab Invest* **80**: 1571-1581.
- Tessarollo, L., Vogel, K. S., Palko, M. E., Reid, S. W., and Parada, L. F. (1994) Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11844-11848.
- Theoharides, T. C., Bondy, P. K., Tsakalos, N. D., and Askenase, P. W. (1982) Differential release of serotonin and histamine from mast cells 3. *Nature* **297**: 229-231.
- Thoenen, H. and Barde, Y. A. (1980) Physiology of nerve growth factor 2. *Physiol Rev* **60**: 1284-1335.
- Thoumine, O. (2008). Interplay between adhesion turnover and cytoskeleton dynamics in the control of growth cone migration. *Cell Adh. Migr.* **2**, 263-267.

Bibliografía

- Thoumine,O., Ewers,H., Heine,M., Groc,L., Frischknecht,R., Giannone,G., Poujol,C., Legros,P., Lounis,B., Cognet,L., and Choquet,D. (2008). Probing the dynamics of protein-protein interactions at neuronal contacts by optical imaging. *Chem. Rev.* **108**, 1565-1587.
- Togashi,H., Abe,K., Mizoguchi,A., Takaoka,K., Chisaka,O., and Takeichi,M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* **35**, 77-89.
- Tojo, H., Kaisho, Y., Nakata, M., Matsuoka, K., Kitagawa, M., Abe, T. *et al.* (1995) Targeted disruption of the neurotrophin-3 gene with lacZ induces loss of TrkC-positive neurons in sensory ganglia but not in spinal cords. *Brain Res* **669**: 163-175.
- Tojo, H., Nishida, M., Matsuoka, K., Igarashi, K., and Shiho, O. (1995) Establishment of a novel embryonic stem cell line by a modified procedure. *Cytotechnology* **19**: 161-165.
- Tojo, H., Takami, K., Kaisho, Y., Nakata, M., Abe, T., Shiho, O. *et al.* (1995) Neurotrophin-3 is expressed in the posterior lobe of mouse cerebellum, but does not affect the cerebellar development. *Neurosci Lett* **192**: 169-172.
- Tong,W., Zhu,Y., Wang,Z., Gao,C., and Mohwald,H. (2010). Micelles-encapsulated microcapsules for sequential loading of hydrophobic and water-soluble drugs. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 1015-1019.
- Toran-Allerand, C. D. (1996) Mechanisms of estrogen action during neural development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors? 3. *J Steroid Biochem Mol Biol* **56**: 169-178.
- Toran-Allerand, C. D. (1996) The estrogen/neurotrophin connection during neural development: is co-localization of estrogen receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant? 2. *Dev Neurosci* **18**: 36-48.
- Tosney, K. W. (1991) Cells and cell-interactions that guide motor axons in the developing chick embryo 4. *Bioessays* **13**: 17-23.
- Tracey, K. J. (2007) Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway 6. *J Clin Invest* **117**: 289-296.
- Turk, B. E., Huang, L. L., Piro, E. T., and Cantley, L. C. (2001) Determination of protease cleavage site motifs using mixture-based oriented peptide libraries 1. *Nat Biotechnol* **19**: 661-667.
- Ultsch, M. H., Wiesmann, C., Simmons, L. C., Henrich, J., Yang, M., Reilly, D. *et al.* (1999) Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC 5. *J Mol Biol* **290**: 149-159.
- Utton, M. A., Eickholt, B., Howell, F. V., Wallis, J., and Doherty, P. (2001) Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor dependent neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluster in cells 2. *J Neurochem* **76**: 1421-1430.
- Utton, M. A., Gibb, G. M., Burdett, I. D., Anderton, B. H., and Vandecastelaere, A. (2001) Functional differences of tau isoforms containing 3 or 4 C-terminal repeat regions and the influence of oxidative stress 1. *J Biol Chem* **276**: 34288-34297.

- Vaillant, A. R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (1999) Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival 25. *J Cell Biol* **146**: 955-966.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-219.
- Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A. A., Alvarez, S., Nakano, A. *et al.* (2000) Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors 1. *Cancer Res* **60**: 877-882.
- Vu, T. H. and Werb, Z. (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* **14**: 2123-2133.
- Wang, L., Antonini, J. M., Rojanasakul, Y., Castranova, V., Scabilloni, J. F., and Mercer, R. R. (2003) Potential role of apoptotic macrophages in pulmonary inflammation and fibrosis 9. *J Cell Physiol* **194**: 215-224.
- Wang, X., Yi, J., Lei, J., and Pei, D. (1999) Expression, purification and characterization of recombinant mouse MT5-MMP protein products 1. *FEBS Lett* **462**: 261-266.
- Wang, Y., Johnson, A. R., Ye, Q. Z., and Dyer, R. D. (1999) Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain 4. *J Biol Chem* **274**: 33043-33049.
- Wang, B., Ma, R., Liu, G., Liu, X., Gao, Y., Shen, J., An, Y., and Shi, L. (2010). Effect of Coordination on the Glucose-Responsiveness of PEG-b-(PAA-co-PAAPBA) Micelles. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 1628-1634.
- Wang, L., Zhao, X., Gao, K., Lao, J., and Gu, Y. D. (2011). Reinnervation of the thenar muscle after repair of total brachial plexus avulsion injury with contralateral C7 root transfer: report of five cases. *Microsurgery* **31**, 323-326.
- Wang, Y. P., Xu, M., and Gao, W. (2010). [Advances in study of biomarkers of myocardial fibrosis]. *Sheng Li Ke. Xue. Jin. Zhan.* **41**, 461-463.
- Watkins, L. R. and Maier, S. F. (1999) Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7710-7713.
- Webber, C. A., Hocking, J. C., Yong, V. W., Stange, C. L., and McFarlane, S. (2002) Metalloproteases and guidance of retinal axons in the developing visual system 20. *J Neurosci* **22**: 8091-8100.
- Weidner, C., Schmidt, R., Schmelz, M., Torebjork, H. E., and Handwerker, H. O. (2003). Action potential conduction in the terminal arborisation of nociceptive C-fibre afferents. *J. Physiol* **547**, 931-940.
- Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology 2. *Cell* **91**: 439-442.

Bibliografía

- Westling, J., Gottschall, P. E., Thompson, V. P., Cockburn, A., Perides, G., Zimmermann, D. R. *et al.* (2004) ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein9. *Biochem J* **377**: 787-795.
- White, F. A., Silos-Santiago, I., Molliver, D. C., Nishimura, M., Phillips, H., Barbacid, M. *et al.* (1996) Synchronous onset of NGF and TrkA survival dependence in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci* **16**: 4662-4672.
- Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A., and Goldberg, G. I. (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages1. *J Biol Chem* **264**: 17213-17221.
- Woessner, J. F., Jr. (1998) Role of matrix proteases in processing enamel proteins 3. *Connect Tissue Res* **39**: 69-73.
- Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Eberhardt, B., Platzer, C., Schoning, B. *et al.* (1998) Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury1. *Nat Med* **4**: 808-813.
- Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Schoning, B., Glockner, F., Docke, W. D. *et al.* (1998) Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation2. *J Neuroimmunol* **84**: 164-171.
- Wooten, M. W. (1999) Function for NF- κ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C δ . *J Neurosci Res* **58**: 607-611.
- Wooten, M. W., Seibenhener, M. L., Zhou, G., Vandenplas, M. L., and Tan, T. H. (1999) Overexpression of atypical PKC in PC12 cells enhances NGF-responsiveness and survival through an NF- κ B dependent pathway13. *Cell Death Differ* **6**: 753-764.
- Wulfhekel, W. and Gao, C. L. (2010). Investigation of non-collinear spin states with scanning tunneling microscopy. *J. Phys. Condens. Matter* **22**, 084021.
- Xiao, H. Y., Gao, F., and Weber, W. J. (2010). Threshold displacement energies and defect formation energies in Y2Ti2O7. *J. Phys. Condens. Matter* **22**, 415801.
- Xie, X., Wang, H. T., Li, C. L., Gao, X. H., Ding, J. L., Zhao, H. H., and Lu, Y. L. (2010). Ginsenoside Rb1 protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury. *Mol. Med. Rep.* **3**, 635-639.
- Xu, M., Gao, J., Du, Y. Q., Gao, D. J., Zhang, Y. Q., Li, Z. S., Zhang, Y. L., Gong, Y. F., and Xu, P. (2010). Reduction of pancreatic cancer cell viability and induction of apoptosis mediated by siRNA targeting DNMT1 through suppression of total DNA methyltransferase activity. *Mol. Med. Rep.* **3**, 699-704.
- Xu, W. N., Gao, X. X., Guo, X. L., Chen, Y. C., Zhang, W. M., and Luo, Y. S. (2010). [Study on volatile components from peel of *Aquilaria sinensis* and the anti-tumor activity]. *Zhong. Yao Cai.* **33**, 1736-1740.

- Yagi, T. and Takeichi, M. (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity1. *Genes Dev* **14**: 1169-1180.
- Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M., Yamasaki, M., and Yamaguchi, Y. (1995) cDNA cloning and the identification of an aggrecanase-like cleavage site in rat brevican1. *Biochem Biophys Res Commun* **216**: 957-963.
- Yamaguchi, Y. (2000) Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix2. *Cell Mol Life Sci* **57**: 276-289.
- Yanagida, H., Tanaka, J., and Maruo, S. (1999) Immunocytochemical localization of a cell adhesion molecule, integrin alpha5beta1, in nerve growth cones1. *J Orthop Sci* **4**: 353-360.
- Yee, C. L., Jones, K. R., and Finger, T. E. (2003) Brain-derived neurotrophic factor is present in adult mouse taste cells with synapses1. *J Comp Neurol* **459**: 15-24.
- Yoneda, A. and Couchman, J. R. (2003) Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans6. *Matrix Biol* **22**: 25-33.
- Yong, V. W. (2005) Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* **6**: 931-944.
- Yong, V. W., Power, C., Forsyth, P., and Edwards, D. R. (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system7. *Nat Rev Neurosci* **2**: 502-511.
- York, R. D., Molliver, D. C., Grewal, S. S., Stenberg, P. E., McCleskey, E. W., and Stork, P. J. (2000) Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap117. *Mol Cell Biol* **20**: 8069-8083.
- Yu, H. Y., Guo, Y. H., and Gao, W. (2010). [Mitochondrial fusion protein Mfn2 and cardiovascular diseases]. *Sheng Li Ke. Xue. Jin. Zhan.* **41**, 11-16.
- Yuan, J. and Yankner, B. A. (2000) Apoptosis in the nervous system6. *Nature* **407**: 802-809.
- Zakharenko, S. S., Patterson, S. L., Dragatsis, I., Zeitlin, S. O., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. *et al.* (2003) Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses1. *Neuron* **39**: 975-990.
- Zeng, X., Overmeyer, J. H., and Maltese, W. A. (2006) Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking7. *J Cell Sci* **119**: 259-270.
- Zhang, C., Yuan, X., Mao, W., Yue, L., Kong, X., Gao, Y., Luo, L., and Yin, Z. (2010). Inhibition of cadmium-induced apoptosis by glutathione S-transferase P1 via mitogen-activated protein kinases and mitochondrial pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **30**, 202-208.
- Zhou, L., Dosanjh, A., Chen, H., and Karasek, M. (2000) Divergent effects of extracellular oxygen on the growth, morphology, and function of human skin microvascular endothelial cells10. *J Cell Physiol* **182**: 134-140.

Bibliografía

- Zigheboim, I., Reinhart, A. J., Gao, F., Schmidt, A. P., Mutch, D. G., Thaker, P. H., and Goodfellow, P. J. (2011). DICER1 expression and outcomes in endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Cancer* **117**, 1446-1453.
- Zucker, S., Pei, D., Cao, J., and Lopez-Otin, C. (2003) Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP)3. *Curr Top Dev Biol* **54**: 1-74.
- Zuo, J., Ferguson, T. A., Hernandez, Y. J., Stetler-Stevenson, W. G., and Muir, D. (1998) Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan3. *J Neurosci* **18**: 5203-5211.
- Zuo, J., Hernandez, Y. J., and Muir, D. (1998) Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury7. *J Neurobiol* **34**: 41-54.
- Zuo, J., Neubauer, D., Dyess, K., Ferguson, T. A., and Muir, D. (1998) Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue1. *Exp Neurol* **154**: 654-662.
- Zuo, Z., Dean, N. M., and Honkanen, R. E. (1998) Serine/threonine protein phosphatase type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of p21(WAF1/Cip1) and mediate growth arrest4. *J Biol Chem* **273**: 12250-12258.
- Zurn, A. D. and Bandtlow, C. E. (2006) Regeneration failure in the CNs: cellular and molecular mechanisms4. *Adv Exp Med Biol* **557**: 54-76.

