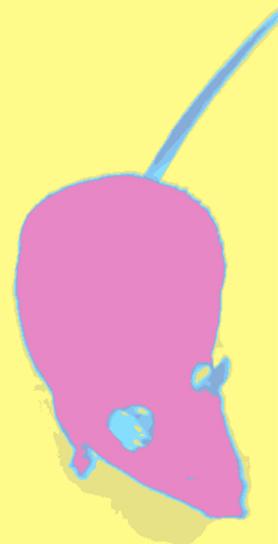
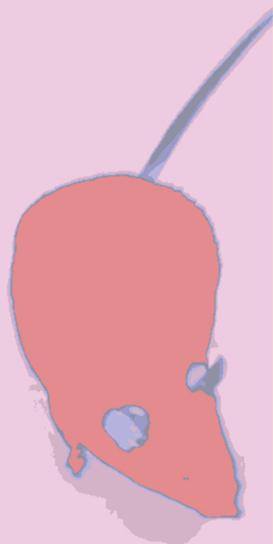




VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

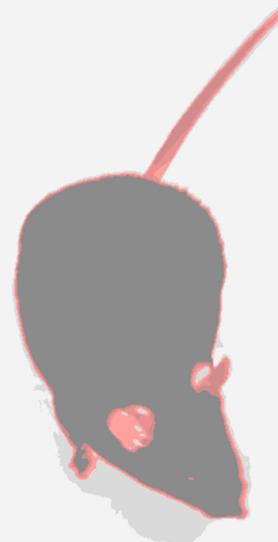
TESIS DOCTORAL



PAPEL DE ARMS/KIDINS220 EN LA GENERACIÓN Y MODULACIÓN DEL DOLOR

Ana Julia
Sánchez Sánchez

Salamanca 2021



Juan Carlos Arévalo
C/ Pintor Fernando Gallego, 1
Instituto de Neurociencias de Castilla y León
37007 Salamanca, España

Tel: +34 923 294500 Ext. 1871
e-mail: arevalojc@usal.es

D. Juan Carlos Arévalo Martín, profesor titular del Departamento de Biología Celular y Patología, y miembro del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, certifica que:

Dña. Ana Julia Sánchez Sánchez, graduada en Ciencias Biomédicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge su Tesis Doctoral: *Papel de ARMS/Kidins220 en la generación y modulación del dolor*.

Que ha revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo y da su conformidad para su presentación y defensa públicas.

Para que así conste y surtan los efectos oportunos, firma el presente certificado en Salamanca, a 26 de mayo de dos mil veintiuno.

Fdo. D. Juan Carlos Arévalo Martín

Introducción

1 El concepto de dolor y su clasificación

El dolor es un mecanismo de alarma ante situaciones que pueden comprometer la integridad de alguno de los tejidos de un organismo. Tiene, por tanto, una función fisiológica esencial en la supervivencia de los seres vivos.

Si leemos la definición otorgada por la Real Academia Española, ésta nos determina que es una “sensación molesta y aflictiva de una parte del cuerpo por causa interior o exterior”, junto a la cual aparece una segunda que dice que es un “sentimiento de pena y congoja”. La primera acepción, por consiguiente, se centra más en la parte física, mientras que la segunda involucra también a la psique. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor o IASP, por sus siglas en inglés, tiene en cuenta esta doble vertiente especificando que el dolor es “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada o similar a la asociada con daño tisular real o potencial” (*IASP Terminology*).

El concepto **dolor** es muy intrincado y para facilitar la comprensión del mismo, a lo largo de la literatura, aparecen diferentes clasificaciones. Si atendemos a su duración, podemos clasificarlo en agudo o crónico. El dolor **agudo** es la respuesta fisiológica normal y predecible a un estímulo nocivo (doloroso). Está claramente localizado y su intensidad se correlaciona con el estímulo. Su duración es limitada y remite cuando la lesión desaparece o se cura. Es, por tanto, necesario para dar información sobre el entorno y es indispensable para nuestra supervivencia. Por otro lado, generalmente, se considera que el dolor es **crónico** si persiste después de que se haya curado el daño tisular y no tenga una función biológica (Ignacio Velázquez Rivera (Grünenthal)). A diferencia del dolor agudo, el dolor crónico ha perdido su papel protector, y es una enfermedad en sí mismo.

Otra manera muy extendida de clasificarlo es atendiendo a su etiología. Así, podemos hablar de dolor **nociceptivo** cuando el origen de éste es un estímulo exterior que activa los **nociceptores**. Éstos son neuronas que inervan, con sus terminales nerviosos libres, los diferentes tejidos y cuyo soma se encuentra en los ganglios raquídeos o DRGs (por sus siglas en inglés, *Dorsal Root Ganglia*). A su vez, el dolor nociceptivo puede dividirse en visceral, si es originado en los órganos internos, o somático si el estímulo proviene de la dermis (superficial) o de músculos, fascias, tendones y huesos (profundo) (*Clasificación Del Dolor*, 2019). Por otro

lado, existe el dolor **neuropático**, cuyo origen es una lesión en el sistema somatosensorial, tanto en las fibras del sistema nervioso periférico (SNP) como en el sistema nervioso central (SNC) (Colloca et al., 2017). Las causas del origen de éste son múltiples y variadas, desde enfermedades neurodegenerativas, daños en la médula espinal, tratamientos quimioterapéuticos o la diabetes mellitus, entre otras.

En resumen, el dolor agudo es un mecanismo fisiológico que nos alerta de un daño real o probable, teniendo así un efecto positivo en el organismo. Sin embargo, el dolor crónico ha perdido toda capacidad de alarma y se vuelve una patología en sí misma, teniendo consecuencias negativas tanto para la persona como para la sociedad en la que vive. Concretamente, en España hay un 18% de la población que padece dolor crónico, y de entre los cuales, el 12% reporta sufrir dolor crónico de tipo moderado a intenso. Esto supone al estado un gasto anual de aproximadamente 15 000 millones de euros, el equivalente al 2,5% del producto interior bruto (Caramés-Álvarez & Navarro-Ribero, 2016). Por tanto, es esencial conocer los mecanismos implicados en la modulación del dolor ya que es necesario encontrar tratamientos analgésicos efectivos.

2 El dolor a lo largo de la historia

La búsqueda de la mitigación del dolor surge en las primeras civilizaciones de las que existen datos que demuestran el uso de plantas medicinales, como el opio, para inducir analgesia. Sin embargo, no fue hasta el siglo I D.C. cuando surge el concepto del cerebro como centro de las emociones y de las sensaciones, gracias a Galeno (130-210 D.C.) y, posteriormente, a la hipótesis de Avicena (980-1037 D.C.), quien propone que el dolor es una sensación independiente del tacto. Tuvieron que pasar varios siglos hasta que surgieran nuevas teorías, siendo Descartes (S.XVII), en su obra *Tratado del hombre*, quien propone un dualismo en la percepción del dolor. Este dualismo cartesiano hipotetiza que el dolor tiene un componente dual: puede ser iniciado por un daño tanto físico como psicológico (Trachsel & Cascella, 2020). Además, Descartes habla de que el sistema nervioso está formado por unos filamentos que, al contacto con un estímulo doloroso asociado al tacto, como el calor del fuego, son estirados cual “cuerda conectada al badajo de una campana”, para tirar, a su vez, del otro extremo donde se encontraría la glándula pineal. El movimiento de tirar de esa glándula pineal provocaría, según su hipótesis, la liberación de “los espíritus animales” que retornarían por los hilillos hasta

terminar en el músculo para moverlo y generar un reflejo de retirada (Francisco Pizarro, 2014). Esta explicación del filósofo francés, a pesar de que hoy en día sabemos que no es cierta, es de utilidad al anatomista Charles Bell para, junto a la hipótesis de Avicena, asentar las bases de lo que posteriormente sería la **Teoría de la Especificidad**. Bell, en 1811, describe que los nervios que salen de la parte ventral y de la dorsal de la médula espinal tienen funciones diferentes, siendo los nervios ventrales los encargados de la contracción muscular, pero sin tener muy clara la función de los nervios dorsales (Bell, 1868). Es en 1822, cuando el fisiólogo François Magendie habla de una función sensorial de la raíz dorsal tras cortar los nervios dorsales de un animal que era capaz de moverse, pero era insensible al dolor (revisado en Ochs, 1976). Utilizando los conocimientos aportados por Bell y Magendie, Johannes P. Müller desarrolla la Teoría de la energía específica de los nervios (1840), donde postula la especificidad de cada nervio de detectar y llevar la información de un solo tipo de modalidad sensorial (Müller, 1840). Esta teoría, no del todo correcta y muy criticada por muchos, le sirve, junto a los trabajos anteriores e hipótesis de fisiólogos contemporáneos, a Maximilian von Frey para postular que existen diferentes modalidades somatosensoriales específicas como son la sensación al frío, al calor, al tacto e introducir el dolor como una modalidad más (revisado en Norrsell et al., 1999). Sin embargo, es Sir Charles Sherrington (1900) quien, al observar que el dolor se originaba tras un daño tisular, introduce el concepto de **nociceptor** como receptor específico del dolor y postula que es independiente de los receptores dedicados a otras modalidades sensoriales (C. Sherrington, 1900; Woodworth & Sherrington, 1904). En resumen, todas estas hipótesis, emergentes en el s. XIX y principios del XX, convergen para formular la **Teoría de la especificidad** donde cada modalidad sensorial (calor, frío, tacto y dolor) cuenta con su receptor específico.



Fig. 1 1:

Ilustración adaptada de *Tratado del hombre* de René Descartes.

Descartes es el primero en dar una interpretación neurofisiológica del dolor nociceptivo, donde el estímulo nocivo (A), es captado por unos filamentos (B) que tiran de una cuerda que tira de la glándula pineal (c), alojada en el cráneo.

En contraposición a ésta, surge la **Teoría de la intensidad**, propuesta por el neurólogo Wilhem Erb en 1874, y que describe que existe un umbral en todo receptor que, tras

sobrepasarlo independientemente del tipo de estímulo aplicado, éste se percibe como doloroso (Erb, 1874). Sin embargo, ensayos en los que se registra la actividad eléctrica de fibras que son activadas con diferentes estímulos llevan a John Paul Nafe a proponer la **Teoría de los patrones** (1929). Este psicólogo estadounidense interpreta que todas las fibras que inervan los tejidos somáticos son iguales y que su respuesta varía en función de los diferentes perfiles de estimulación. De tal forma, el dolor es producto de un patrón específico de estimulación intensa (Nafe, 1929).

En 1965, se publica un trabajo de Ronald Melzack y Patrick Wall en el que se introduce una nueva teoría denominada **Teoría de la compuerta** (Melzack & Wall, 1965). Melzack y Wall se basan en la observación de que, cuando uno sufre un golpe (estímulo doloroso) el hecho de frotarse esa zona (estímulo mecánico) provoca una inhibición parcial del dolor. Ellos proponen que hay una serie de compuertas, a nivel de la médula espinal, que actúan permitiendo o inhibiendo el paso de la información dolorosa que va por las fibras aferentes que inervan las diferentes partes somáticas hasta el asta dorsal de la médula espinal. Así, las células transmisoras del impulso nervioso nociceptivo llevarían la información hacia el cerebro, siempre y cuando las neuronas inhibitorias (interneuronas) permitieran el paso de la misma. Esta teoría, a pesar de proporcionar una visión más completa de la red neuronal relativa a la nocicepción, rechaza la especificidad de los receptores y fibras nerviosas en cuanto a la modalidad sensitiva.

A finales del S.XX, los estudios de Edward R. Perl se vuelven a basar en la teoría de la especificidad y demuestran que los nociceptores están inervados por fibras diferentes dependiendo del tipo de estímulo que recogen. Además, éstos son muy fiables a la hora de discriminar entre estímulos nocivos e inoocuos, siendo una capacidad inexistente entre las fibras de los mecanorreceptores de bajo umbral o de los termorreceptores (revisado en Perl, 2007). Por tanto, ya a principios del S. XXI se asume la existencia de diferentes nociceptores considerados como una clase de neuronas sensitivas primarias. Además, también son ampliamente aceptadas otras contribuciones clave de las otras teorías, como puede ser la participación de interneuronas que modulan la transmisión sináptica del dolor o la implicación de áreas superiores cerebrales en la percepción del dolor. Por tanto, desde la cartesiana hasta la teoría de la compuerta, se ha aportado numerosa información para poder entender cómo funciona la modulación del dolor. A pesar de ello, no se conocen todos los mecanismos implicados en este fenómeno ya que, a nivel molecular, hay multitud de vías implicadas en la nocicepción y en el dolor.

3 La nocicepción y las vías de conducción

Como se ha explicado en el apartado anterior, fue Charles Sherrington quien, a principios del S.XX, habló por primera vez de nociceptores refiriéndose a ellos como terminales nerviosos libres capaces de detectar el estímulo producido por un daño tisular (Sherrington, 1903). Conforme han avanzado los estudios en el campo del dolor, también se ha refinado el concepto de nociceptor. Así, la IASP lo define como “un receptor sensorial de alto umbral del sistema somatosensorial periférico que es capaz de transducir y codificar estímulos nocivos.”

La **nocicepción** es un mecanismo esencial de alarma frente a situaciones potencialmente peligrosas para el organismo, por lo que los receptores que se activan poseen un umbral. De esta manera, no pueden ser estimulados por señales inocuas, pero sí lo suficientemente bajas para que sean activados antes de que se produzca un daño real. Hay que tener en cuenta que este umbral puede verse modificado en algunas ocasiones debido a la plasticidad que presenta el sistema nervioso, pudiendo desencadenar situaciones en las que se perciba dolor sin haber una situación que realmente suponga un peligro para el organismo.

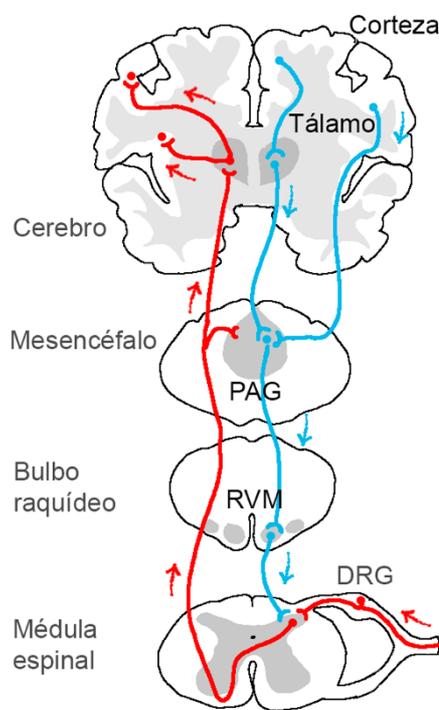
Los mecanismos moleculares implicados en la iniciación del dolor nociceptivo son numerosos y específicos. No hay que olvidar que son los terminales nerviosos libres de las neuronas sensitivas de los ganglios raquídeos los que captan los estímulos nociceptivos. Estas neuronas son consideradas, en sí mismas, nociceptores y se encuentran especializadas para atender a estímulos específicos. Esto es debido a que cuentan con distintos canales que responden específicamente frente a diferentes situaciones como el frío (TRPM8), el calor nocivo (TRPVs), pH (TRPV1, TRPA1, ASIC), o estímulos mecánicos (PIEZO). En el caso de que se produzca un daño tisular, diferentes factores son liberados para activar los mecanismos inflamatorios. Estos factores, que forman la denominada “sopa inflamatoria”, suelen ser moléculas solubles con capacidad de unirse específicamente a sus receptores. Entre ellos se encuentran endotelina, prostaglandinas, interleucinas, bradiquinina, serotonina, histamina, ATP, protones, el factor de necrosis tumoral alfa, y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Cuando estos compuestos (ligandos) se unen a sus receptores, activan una serie de vías de señalización que causan una respuesta en la célula sensorial primaria -primera estación neuronal- provocando la secreción de otras moléculas a nivel del asta dorsal de la médula espinal donde se produce la sinapsis con una segunda neurona. Esta segunda estación proyecta, tras atravesar la línea media

y cruzar al lado contralateral, la información nociceptiva al encéfalo donde será procesada y, en el caso de que se haga consciente, percibirse como dolor.

Las **fibras** de las neuronas aferentes sensoriales corresponden a las fibras de tipo A δ y C, descritas por Erlanger, Gasser y Bishop en los años 20 (Erlanger & Gasser, 1924). Las primeras - A δ - son conocidas por ser las correspondientes a los termo- y mecanorreceptores y que hacen sinapsis en las láminas I y V de la médula espinal. De las fibras mielinizadas, son las que tienen un menor diámetro, aunque tienen una velocidad de conducción relativamente rápida (Heinbecker et al., 1933). Por otro lado, las de tipo C son amielínicas y, por tanto, de conducción más lenta. Generalmente son polimodales porque llevan estímulos nociceptivos de carácter térmico, mecánico y químico, y terminan en las láminas I y II de la médula espinal (Dubin & Patapoutian, 2010).

Fig. 1 2:
Esquema de las vías ascendentes (rojo) y descendentes (azul) del dolor nociceptivo.

DRG: ganglio raquídeo
RVM: núcleo ventromedial
PAG: sustancia gris periacueductal



Las neuronas de la médula espinal, donde hacen sinapsis tanto las fibras A δ como las C, proyectan la información al tálamo y a la corteza sensorial por el tracto espinotalámico lateral. Hay, además, algunas proyecciones colaterales que conectan con la formación reticular (haz espinorreticular) a nivel de bulbo, puente y sustancia periacueductal para luego llegar a núcleos inespecíficos del tálamo. Esta vía se considera que es la que mayor implicación tiene en la connotación afectiva del dolor (Perena et al., 2000; Torregrosa Zuñiga, 2018). Hemos de tener en cuenta también, que existen agrupaciones neuronales –sustancia gris periacueductal (PAG) y el núcleo ventromedial de la médula espinal (RVM)– que se encargan de integrar la

información recibida desde los centros superiores como son el hipotálamo, la amígdala y el lóbulo frontal con la recibida del asta dorsal de la médula espinal. Estos centros son esenciales para la modulación de las vías **descendentes** nociceptivas, ya que su función es inhibir la vía ascendente produciendo analgesia. En estas vías descendentes cobran un papel muy relevante los mediadores norepinefrina y serotonina, así como todo el sistema de endocannabinoides (revisado en Yam et al., 2018).

Finalmente, estudios recientes han roto con el dogma de que el dolor solamente es iniciado por neuronas. En estos se propone que un subtipo de células de Schwann cutáneas son también capaces de detectar estímulos nociceptivos (Abdo et al., 2019). Esto revela la importancia de seguir investigando en este ámbito, ya que quedan muchos mecanismos por revelar.

4 Las neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas son unos **factores de crecimiento** presentes tanto en el SNC como en el SNP. El primer miembro identificado en la familia de las neurotrofinas fue el NGF y, hasta treinta años después, no se identificó un segundo miembro: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Barde et al., 1982). Gracias al estudio de las secuencias proteicas de ambas neurotrofinas, se descubrieron otros miembros, siendo, en vertebrados, la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (Berkemeier et al., 1991; Hohn et al., 1990; Ip et al., 1992; Jones & Reichardt, 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990). Las neurotrofinas, al igual que otros factores solubles, son primero sintetizadas como pre-pro-neurotrofinas en el retículo endoplasmático rugoso que luego son convertidas en pro-neurotrofinas y empaquetadas (M. Rafieva & V. Gasanov, 2015; Matsumoto et al., 2008). Posteriormente, son procesadas en las mismas vesículas donde han sido empaquetadas, por unas proteasas denominadas convertasas que escinden el pro-péptido de lo que finalmente será la neurotrofina madura. Es, finalmente, en la red trans-Golgi donde se clasifican según el tipo de secreción que se vaya a llevar a cabo. Por un lado, existe una continua liberación de factores neurotróficos, denominada la vía constitutiva, correspondiente a los empaquetados en gránulos de pequeño tamaño (50-100 nm) y que es independiente de calcio. Mientras que en la vía de **secreción regulada** están implicadas vesículas de un tamaño mayor (100-300 nm), que se fusionan con la membrana citoplasmática únicamente de una manera calcio-dependiente en presencia de un estímulo (Brigadski & Leßmann, 2020; Leßmann & Brigadski, 2009). Este

segundo tipo de secreción suele ser de carácter exclusivo neuronal y neuroendocrino, siendo de gran importancia en el contexto de la secreción de BDNF en la plasticidad neuronal (Goodman et al., 1996; Mowla et al., 1999). Sin embargo, en el caso de esta neurotrofina existe cierta controversia en cuanto a la localización de la maduración, ya que algunos estudios indican que el BDNF maduro se procesa de manera extracelular a partir del pro-BDNF secretado sobre el que actúan proteasas extracelulares, como plasmina o metaloproteasas, obteniendo BDNF y el pro-péptido (Jung et al., 2005; Yang et al., 2009).

NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 regulan, durante el desarrollo, la proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal (Chao, 2003; Huang & Reichardt, 2003). Asimismo, están involucradas en la plasticidad sináptica y la memoria y, por tanto, pueden estar implicadas en trastornos del sistema nervioso como depresión, esquizofrenia y alteraciones del comportamiento, así como en enfermedades neurodegenerativas incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Huntington, y Parkinson (Allen & Dawbarn, 2006; Duman, 2004). Las neurotrofinas ejercen su función a través de dos tipos de receptores. Por un lado, encontramos la familia de receptores Trk, (*Tropomyosin-related kinase*) y, por otro, el receptor p75NTR (*p75 neurotrophin receptor*).

La familia de los receptores Trk, que incluye **TrkA**, **TrkB** y **TrkC**, son receptores transmembranales con un dominio tirosina quinasa en su parte citoplasmática. La parte extracelular cuenta con dos regiones de abundantes cisteínas separadas por tres motivos ricos en leucinas, seguidas de dos dominios del tipo inmunoglobulina C2. Son estos dominios extracelulares los que los distingue de otras familias de receptores tirosina quinasa. Además, se han encontrado formas truncadas de TrkB y TrkC que carecen de dominio tirosina quinasa citoplasmático (Shelton et al., 1995; Stoilov et al., 2002). Los receptores Trk cuentan con afinidad específica para cada neurotrofina, de tal manera que NGF se une específicamente a TrkA (Dionisio Martin-Zanca et al., 1986a; Dionisio Martin-Zanca et al., 1986b), BDNF y NT-4/5 se unen a TrkB (Huang & Reichardt, 2003; Leibrock et al., 1989; Patapoutian & Reichardt, 2001), y NT-3 a TrkC (Lamballe et al., 1991). La unión de homodímeros de neurotrofinas a estos receptores provoca la dimerización de éstos y, como consecuencia, una transfosforilación de los residuos de tirosina que se encuentran en el dominio citoplasmático. Las tirosinas fosforiladas actúan como puntos de unión para intermediarios de cascadas señalizadoras intracelulares, lo que hace que se activen tanto proteínas G (Ras, Rap-1 y la familia de las Cdc-42-Rac-Rho), como vías reguladas por MAP quinasas, PI3-quinasa y fosfolipasa-C- γ (PLC- γ)

(Huang & Reichardt, 2003). La señalización a través de estos receptores regula la supervivencia y proliferación celular, el crecimiento axonal y dendrítico,

y la expresión y actividad de proteínas funcionales importantes como pueden ser canales iónicos y receptores de neurotransmisores.

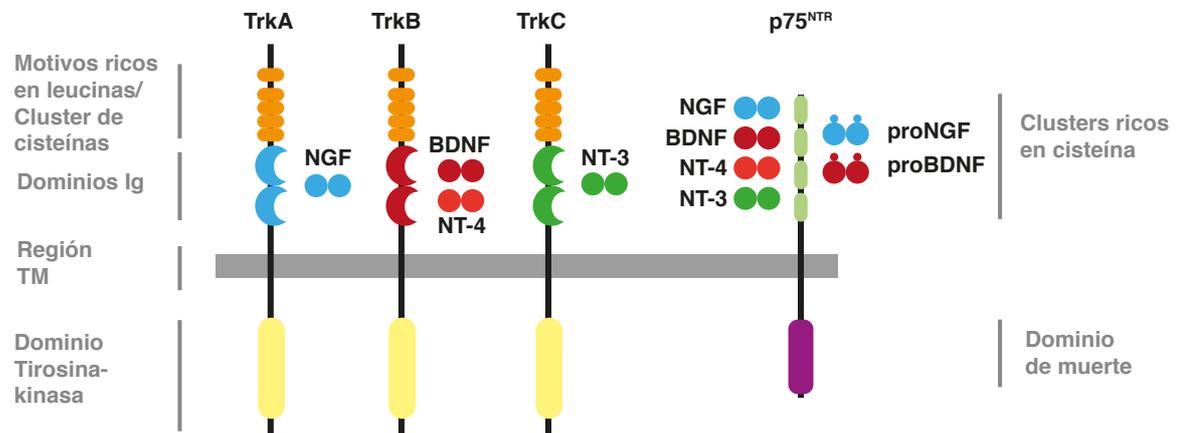


Fig. 1 3:

Los receptores de neurotrofinas y sus correspondientes ligandos

También, las neurotrofinas maduras se unen al receptor **p75^{NTR}**, aunque con menor afinidad que a los receptores TrkA, mientras que las formas inmaduras de éstas se unen exclusivamente a p75^{NTR}. Este receptor pertenece a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF; *tumour necrosis factor*) y contiene, al igual que otros miembros de la súper familia de TNF, un dominio de muerte celular citoplasmático que, en unión a ligando, activa vías de apoptosis celular (Lin et al., 2015).

Tal vez, el aspecto más fascinante de la señalización mediada por los receptores Trk sea su interacción con la señalización promovida por el receptor de pan-neurotrofinas p75^{NTR}. Se ha visto que cuando se co-expresan p75^{NTR} y TrkA, éstos interaccionan y que el NGF tiene una mayor tendencia a unirse al heterodímero que cuando se encuentra presente de manera individual el receptor TrkA (Hempstead et al., 1991). Estudios recientes sugieren que el receptor p75^{NTR} provocaría que la cara activa de TrkA estuviera expuesta incrementando la afinidad del ligando por el receptor (Franco et al., 2019). Así, p75^{NTR} activa un conjunto de cascadas de señalización diferentes dentro de las células, que algunas veces son sinérgicos y otras antagónicos a aquellas vías activadas por Trk.

4.1 NGF

El factor de crecimiento nervioso o NGF –por sus siglas en inglés, *Nerve Growth Factor*– es uno de los factores solubles que forman parte de la “sopa inflamatoria” que hemos nombrado con anterioridad. Fue en los años 50 cuando Rita Levi-Montalcini y Viktor Hamburger identifican esta molécula gracias a los estudios desarrollados en ganglios raquídeos de embriones de pollo. A raíz de éstos, observan que, los ganglios cultivados en presencia de explantes de sarcoma, generan proyecciones nerviosas (Levi-Montalcini & Hamburger, 1953). Posteriormente, junto a Stanley Cohen, son capaces de aislar dicha molécula a la que denominan NGF (Cohen et al., 1954). La implicación de éste como factor de crecimiento imprescindible en el desarrollo del sistema nervioso periférico de los vertebrados es ampliamente estudiado durante los años 90 (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994), además de su papel como mediador nociceptivo en la edad adulta (Lewin & Mendell, 1993).

Las evidencias de la participación de NGF en la nocicepción son numerosas. Por ejemplo, la administración repetida de anticuerpos contra NGF en ratas recién nacidas, durante las cinco primeras semanas de vida, elimina la respuesta de las fibras A δ mecano-nociceptivas (Ritter et al., 1991). Además, la implicación del NGF en humanos también ha sido abordada desde diferentes perspectivas. Así, la inyección intradérmica de NGF en personas sanas genera un dolor localizado acompañado de hiperalgesia debido a la activación de las vías nociceptivas (Petty et al., 1994). Por otro lado, mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica para el receptor de NGF –TrkA–, generan un síndrome llamado insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis (CIPA; *Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis*), en el que los pacientes carecen de sensibilidad a estímulos nociceptivos (Indo et al., 1996). Esta patología pertenece a un grupo de trastornos neurológicos periféricos denominado neuropatías autonómicas y sensitivas hereditarias (**HSAN**; *Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathies*), en los que hay descritos hasta 8 tipos (Cheng et al., 2014).

HSAN IV es la ya mencionada CIPA. Los pacientes no solo presentan una pérdida profunda de la sensibilidad dolorosa, sino que también padecen anhidrosis y retraso mental (Rosemberg et al., 1994). A consecuencia de esa pérdida de sensibilidad tienen tendencia autolesionarse y mutilarse. Por otro lado, la HSAN V es producida por la mutación 661C>T en el gen *NGFB*, que origina una pérdida de función por el cambio de aminoácido R221W en la proteína NGF madura. La consecuencia de esta modificación en individuos homocigóticos es

un trastorno de insensibilidad al dolor pero sin alteraciones en la capacidad cognitiva, a diferencia de lo que ocurre en el HSAN IV (Einarsdottir et al., 2004). Además, otras dos mutaciones en la secuencia génica, V232fs y R121W, han sido identificadas en personas con déficits nociceptivos. Sin embargo, presentan un fenotipo más similar a la HSAN IV que a la V, ya que padecen retraso mental, por lo que surgen dudas a la hora de clasificarlas (revisado en Testa et al., 2021).

Finalmente, la farmacología también ha demostrado la importancia del NGF en el dolor. A principios de los 2000, Rinat Neuroscience, ahora parte de Pfizer, desarrolla un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso en el que se comprobó su efectividad analgésica en pacientes de dolor crónico debido a osteoartritis de rodilla (Lane et al., 2010). Sin embargo, la rápida progresión de la osteoartritis en determinados pacientes y la aparición de otros efectos indeseables, han hecho que el fármaco no haya obtenido aún la aprobación para comercializarse (Birbara et al., 2018). Todos estos conocimientos evidencian la importancia del NGF en la señalización dolorosa y, por tanto, es esencial conocer los mecanismos relacionados con la señalización de NGF en el dolor para encontrar futuras dianas terapéuticas.

4.2 BDNF

De las cuatro neurotrofinas, BDNF es el miembro más predominante en el SNC, aunque su función no es tanto promover la supervivencia neuronal sino regular la **actividad sináptica** de determinadas regiones, así como mantener la morfología neuronal (Li et al., 2012; Sasi et al., 2017). Sin embargo, la producción y secreción de este factor no es exclusivo del linaje neuronal en el sistema nervioso, sino que también la microglía es capaz de expresarlo (Trang et al., 2009). En el suero de humanos, además, podemos encontrar grandes cantidades de BDNF producidas por plaquetas y megacariocitos. Sin embargo, en ratones es prácticamente indetectable (Chacón-Fernández et al., 2016). Las alteraciones en la producción y secreción de BDNF a nivel encefálico se han relacionado con problemas de memoria y plasticidad cerebral – ya que tiene un papel fundamental en la potenciación a largo plazo en el hipocampo (LTP; *Long Term Potentiation*) (Korte et al., 1995). Asimismo, se ha visto que el BDNF podría estar también involucrado en trastornos neurodegenerativos como en la enfermedad de Alzheimer o en la de Huntington (Gauthier et al., 2004) y en trastornos afectivos (Crowley et al., 1994).

Por otro lado, la señalización mediada por BDNF/TrkB se ha visto que juega un papel crítico en la sensibilización producida en respuesta a la inflamación (Kerr et al., 1999; Mannion

et al., 1999). La sensibilización de la vía nociceptiva consiste en un incremento en la función de las neuronas y de los circuitos de dicha vía como consecuencia de una mayor excitabilidad y/o una reducción de los componentes inhibitorios (Latremoliere & Woolf, 2009). Esto resulta en una hipersensibilidad a estímulos que no deberían ser nocivos –**alodinia**– o que a determinada intensidad no deberían ser dolorosos –**hiperalgesia**–. Uno de los mecanismos responsables de dicha sensibilización implica al NGF como iniciador, ya que en situaciones de daño tisular se produce un aumento de expresión y secreción del mismo por parte de las células mediadoras de la inflamación. Esta neurotrofina, a través de la activación de sus receptores en las células sensoriales primarias, induce la síntesis *de novo* de BDNF y, además, promueve su secreción en las sinapsis con las neuronas de segundo orden del asta dorsal de la médula espinal que resulta en la activación de los receptores TrkB (Cho et al., 1997; Lever et al., 2001; Michael et al., 1997).

Varios estudios realizados en explantes de DRGs y médula espinal han puesto en evidencia el papel de BDNF en el dolor al bloquear su efecto con fragmentos trkB-IgG (Kerr et al., 1999; Thompson et al., 1999). Del mismo modo, se ha visto que la inyección intratecal de BDNF a nivel espinal en ratones, induce hiperalgesia térmica, mientras que la disminución de BDNF mediante oligonucleótidos anti-sentido administrados en la médula espinal produce hiposensibilidad a estímulos térmicos (Groth & Aanonsen, 2002). Además, en animales en los que se ha eliminado de manera tamoxifeno-dependiente exclusivamente en neuronas sensoriales, que expresan el canal Nav1.8, se ha visto que hay una alteración en la respuesta nociceptiva frente a algunos estímulos térmicos e inflamatorios (Zhao et al., 2006). Todos estos estudios demuestran, por tanto, un papel relevante del BDNF de las neuronas sensoriales como mediador en el dolor inflamatorio. Sin embargo, existe un fenotipo dimórfico respecto a la respuesta nociceptiva inducida por BDNF, aunque se le atribuye generalmente un papel en el que interviene la microglía (Mapplebeck et al., 2016).

5 La proteína adaptadora ARMS/Kidins220

Hasta ahora, hemos visto que las neurotrofinas juegan un papel fundamental en el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Así, la desregulación de la activación de las vías mediadas por la señalización pertinente de los receptores Trk trae consigo un desequilibrio que puede desembocar en patologías. Por tanto, esta vía, como muchas otras, requiere de proteínas adaptadoras para que, tras la unión de las neurotrofinas con sus receptores, se dé una correcta

dimerización y fosforilación de éstos últimos, desencadenando la activación de otras proteínas aguas abajo. Una de estas proteínas identificadas en la señalización mediada por Trks es la proteína ARMS/Kidins220 (*Ankyrin-Repeat Rich Membrane Spanning/kinase D-interacting substrate 220 KDa*). Inicialmente este adaptador fue descrito como un sustrato de la proteína quinasa D (Iglesias et al., 2000) y como una proteína que interactuaba con p75NTR y Trk de manera simultánea (Kong et al., 2001). ARMS es una proteína de 220KDa, con cuatro dominios transmembranales, siendo el cuarto el que interactúa con el dominio transmembrana de TrkA (Arévalo et al., 2004). Es capaz de formar, además, un complejo con este receptor y p75NTR (Arévalo et al., 2004; Chang et al., 2004), siendo la interacción con este último producida entre la cola C-terminal de ARMS, concretamente en el dominio de unión PDZ, y la región citoplasmática de p75NTR. Este dominio de unión PDZ también interactúa con receptores de efrinas (Chang et al., 2004; Kong et al., 2001). Tanto la cola C-terminal como la N-terminal se orientan hacia el citosol, interactuando con una plétora de proteínas gracias a los diferentes dominios que posee. En concreto, la región N-terminal contiene once dominios de anquirina que son reconocidos por la proteína Trio, un intercambiador de nucleótidos de guanina para las GTPasas de la familia de Rho (Neubrand et al., 2010). En las regiones yuxtamembrana podemos encontrar dos motivos *Walker* que forman un dominio *P-loop* al que se le ha dotado de propiedades de fosfatasa (Higgins et al., 1988). En la cola C-terminal encontramos una zona de poli-prolinas a la cual se le une otra proteína adaptadora, CrkL, que se ha visto que es necesaria para la activación sostenida de la vía de las MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Arévalo et al., 2006). También encontramos un motivo de unión SAM (*Sterile Alpha Motif*) que se ha visto involucrado en interacciones tanto intra- como intermoleculares. Cuenta, además, con una zona KIM (*Kinesin-Light Chain Interacting Motif*), que une el complejo motor de kinesina-1 (Bracale et al., 2007). Finalmente, se ha descrito que hay otros receptores, como los receptores de glutamato y de VEGF, que también interactúan con ARMS (Arévalo et al., 2010; Cesca et al., 2012).

Las aproximaciones para el análisis de la funcionalidad de ARMS *in vivo* se han realizado mediante el estudio de animales transgénicos. Es importante recalcar que se han generado dos líneas independientes de ratones *knock-out* para la proteína ARMS. El primer modelo descrito fue obtenido por el grupo de Moses Chao en 2009 (Wu et al., 2009). Los ratones homocigotos (*ARMS^{-/-}*) sufrían una letalidad embrionaria muy temprana, sin embargo, los heterocigotos (*ARMS^{+/-}*), que presentan una reducción del 30-40% de la proteína ARMS, llegan a término y con un desarrollo del sistema nervioso normal. Sin embargo, cuando alcanzan la edad adulta su arborización neuronal y capacidad sináptica está mermada, lo que constituye un buen modelo

para estudiar los efectos de la disminución de dicha proteína en el sistema nervioso. Tres años después, el grupo de Schiavo, obtuvo un ratón *knock-out* de ARMS que, a pesar de estar en homocigosis, no padece la letalidad embrionaria tan temprana del primer modelo, aunque los embriones que llegan a los últimos estadios sí sufren una elevada muerte neuronal y fallos en la respuesta a estímulos neurotróficos (Cesca et al., 2011, 2012a).

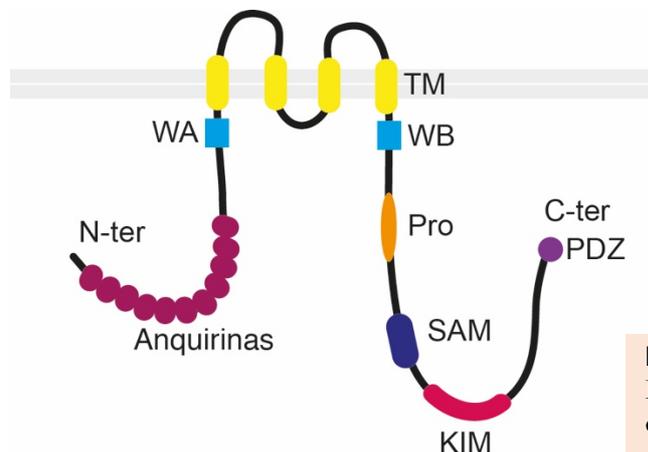


Fig. 1 4:
Esquema de ARMS/Kidins220
con sus dominios correspondientes.

El modelo de heterocigotos $ARMS^{+/-}$ ha permitido estudiar la contribución de ARMS en la potenciación a largo plazo (LTP; *Long Term Potentiation*). Se ha observado que, en preparaciones de rodajas de hipocampo de estos ratones, existe una transmisión basal sináptica incrementada a la que presentan los animales silvestres. Como ya hemos dicho, ARMS interacciona con receptores de glutamato y, posiblemente, la ausencia de ARMS estaría afectando a la subunidad A1 de los receptores de glutamato de tipo AMPA (GluA1), ya que se describe que ARMS regula la fosforilación y la localización de este receptor (Arévalo et al., 2010). Además, también se ha visto una asociación de ARMS con subunidades de los receptores NMDA glutamatérgicos (López-Menéndez et al., 2009), los cuales juegan un papel muy importante también en la inducción de la LTP. Sin embargo, quedan preguntas sin resolver en tanto en cuanto la implicación específica de ARMS en la LTP, aunque algunos estudios sugieren que podría estar actuando sobre la vía BDNF/TrkB, la cual se sabe que tiene un papel muy relevante en este fenómeno de potenciación (Bolton et al., 2000). En estudios recientes en nuestro laboratorio, hemos demostrado la implicación de ARMS en la secreción regulada frente a diferentes estímulos (López-Benito et al., 2016, 2018). En concreto, hemos descrito que, tanto en cultivos primarios de neuronas de DRGs como en rodajas de ratones, una reducción en los niveles de ARMS potencia la secreción de BDNF en respuesta a NGF, NT-3 y NT-4/5 (López-Benito et al., 2018).

Finalmente son de gran relevancia estudios recientes en los que se describen que mutaciones en la proteína ARMS pueden dar lugar a diferentes patologías del sistema nervioso,

como en el síndrome de paraplejia espástica, trastornos intelectuales, nistagmo y obesidad (SINO) (Lam et al., 2020). Además, ARMS podría estar involucrado en enfermedades neurodegenerativas como es la corea de Huntington o la enfermedad de Alzheimer (López-Benito et al., 2018; López-menéndez et al., 2013; Sebastián-Serrano et al., 2020).

6 Los receptores TRP

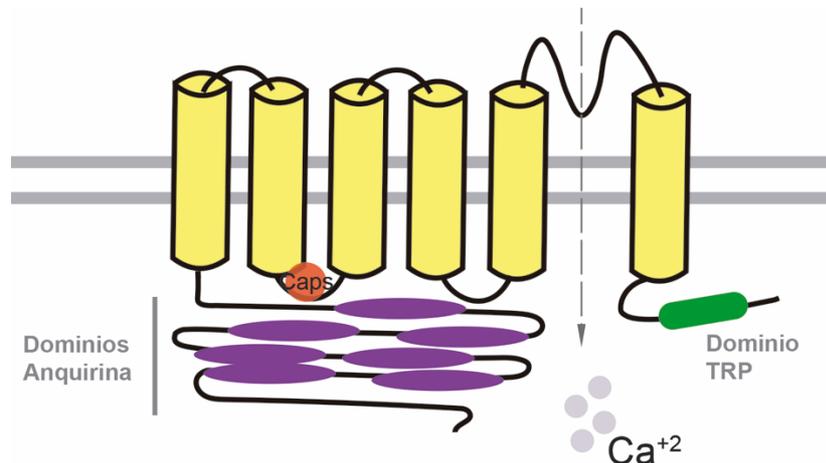
Uno de los retos más importantes en el estudio de la patofisiología del dolor fue la identificación de proteínas encargadas de detectar los estímulos dañinos, es decir, los **nociceptores**. El descubrimiento del canal catiónico TRP en *Drosophila* como transductor en los fotorreceptores de ésta (Minke, 1977), y la posterior identificación de su homólogo en mamíferos (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995), abrieron la veda en el estudio de la funcionalidad de esta familia de proteínas como receptores nociceptivos. La familia de estos receptores de potencial transitorio o TRPs (*transient receptor potencial*) está compuesta por un grupo de canales iónicos localizados en las membranas celulares, tanto en la plasmática, como en la de diferentes orgánulos. Participan en la homeostasis intracelular del calcio, aunque no es el único catión al que son permeables (Jardín et al., 2017). Consta de varios miembros que, en mamíferos, se pueden dividir en seis subfamilias según la homología que existe entre ellos: canónica o clásica (TRPC), vanilloide (TRPV1), anquirina (TRPA1), melastatina (TRPM8), policistina (TRPP), y mucolipina (TRPML) (revisado en Moran, 2018).

Algunos de los miembros de estas familias, como TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 y TRPM3, tienen la capacidad de ser activados por altas **temperaturas** dependiendo del rango de éstas. **TRPV1**, el primer elemento identificado de esta súper familia, ha sido ampliamente estudiado tanto estructural como funcionalmente. Consta de cuatro subunidades proteicas idénticas formando un canal permeable a cationes (Cao et al., 2013), y de un bolsillo hidrofóbico citoplasmático que es dominio de unión a diferentes compuestos vanilloides, capaces de traspasar la barrera plasmática, como la **capsaicina** o la anandamida. Esto provoca un cambio conformacional en el canal, permitiendo la entrada de cationes al interior celular. Además, TRPV1 puede activarse por cambios en la temperatura ($>43^{\circ}\text{C}$) y pH. La actividad de este canal polimodal puede verse incrementada por diversos mediadores inflamatorios como son la bradiquinina, el ATP y el NGF. Por ejemplo, en el caso de este último, se ha visto que la activación de TrkA por unión a NGF activa la vía de las PI3K que a su vez activa a Src para

fosforilar al TRPV1, que se encuentra localizado en vesículas, en la tirosina Y200 promoviendo su inserción en la membrana citosólica (Zhang et al., 2005). TrkA, además activa PLC γ , que a su vez activa PKC ϵ , donde converge también la acción de las bradiquinas, para fosforilar diferentes serinas del canal TRPV1 (Cesare et al., 1999). Estas fosforilaciones modularían la sensibilización de este canal, provocando un aumento de la actividad de éste en situaciones de inflamación, traducándose en hiperalgesia térmica (Amaya et al., 2004).

Fig. 1 5:

Ilustración esquemática del canal TRPV1, donde se indica el lugar de unión para la molécula capsaicina (Caps).



Otro canal capaz de detectar temperaturas elevadas es el canal quemo- y termorreceptor **TRPM3** que, al igual que TRPV1, se expresa en los ganglios raquídeos y en el nervio trigémino (Vriens et al., 2011). Por otro lado, **TRPM8** es otro miembro de la familia, cuya activación es causada por temperaturas bajas y cuyo agonista clásico es el mentol y que se ha implicado en neuropatías que cursan con hipersensibilidad al frío (revisado en Almaraz et al., 2014). En cuanto al canal **TRPA1**, se le han atribuido diferentes papeles en cuanto a la mecanotransducción, nocicepción mecánica y en la nocicepción térmica aguda (revisado en Viana, 2016). En esta última función encontramos resultados contradictorios. Clásicamente se ha considerado que TRPA1 era un transductor de la sensibilidad al frío nocivo (Story et al., 2003); sin embargo, en estudios posteriores en ratones *knock-out* de TRPA1 se ha observado que este modelo animal tiene menos algesia al calor nocivo (Hoffmann et al., 2013). Además, los ensayos más recientes en animales triples KO *Trpv1^{-/-}Trpm3^{-/-}Trpa1^{-/-}* demostraron que la función de esos tres canales es redundante y que los tres participan de forma conjunta en la sensibilidad al calor (Vandewauw et al., 2018). A pesar de esa dicotomía en cuanto a la temperatura por la que se activa el canal TRPA1, sí que se han definido diferentes ligandos y estímulos que lo activan. Entre ellos encontramos diferentes sustancias irritantes naturales como son el alil isotiocianato (AITC), que se encuentra en el aceite de mostaza y en el wasabi, la alicina del ajo y compuestos electrófilos industriales. Además, TRPA1 también es un sensor de

señales de estrés oxidativo celular e inflamación, jugando un papel importante en la respuesta a daño tisular (revisado en Viana, 2016).

Por tanto, los canales TRP juegan un papel fundamental en la nocicepción frente a diferentes estímulos. Además, muchos de ellos están siendo estudiados como posibles mecanismos de aparición de dolor crónico y/o neuropático, convirtiéndose en potenciales dianas terapéuticas frente al dolor patológico (Hung & Tan, 2018).

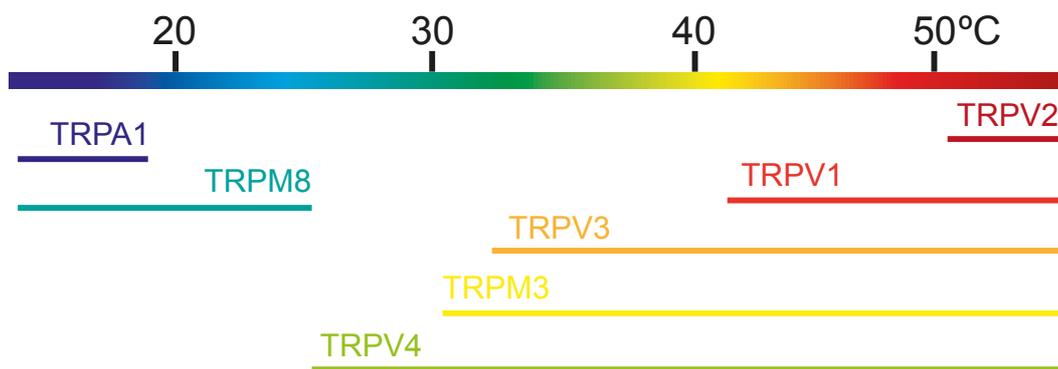


Fig. I 6:

Rangos de activación por temperatura de algunos de los principales canales TRP.

Hipótesis y objetivos



El dolor es un mecanismo fisiológico que actúa como alarma para protegernos de un daño en nuestro organismo. Sin embargo, cuando el dolor se alarga más allá de la lesión, ya sea potencial o real, pierde esa característica protectora en el individuo convirtiéndose en una patología. Esto es perjudicial tanto para la persona como para la sociedad en la que vive, ya que el deterioro emocional y las consecuencias económicas y sociales derivadas del dolor crónico son muy importantes. Hoy en día se conocen un gran número de receptores, sustancias endógenas secretables (ATP, bradiquina, serotonina, NGF, etc) y ligandos externos, que son capaces de activar las vías nociceptivas. Sin embargo, los mecanismos subyacentes de modulación son, en muchos casos, una incógnita. Es esencial conocer los procesos que regulan el dolor y la nocicepción para identificar dianas terapéuticas. De esta forma, se podrán obtener fármacos más eficaces y/o con menos efectos secundarios que los que actualmente se utilizan en clínica.

La relevancia de la vía NGF/TrkA, como una vía clave en la iniciación del dolor, se ha puesto de manifiesto en distintos estudios. Ejemplos relevantes de esto son la inducción de hiperalgesia por inyección intradérmica de NGF en humanos (Pincelli et al., 1997) o los datos obtenidos de análisis genéticos de pacientes con HSAN IV y V, que han identificado mutaciones en *TRKA* y *NGF* como responsables de la insensibilidad al dolor que caracteriza estos síndromes (Bickel et al., 2002; Einarsdottir et al., 2004; Low et al., 1978). Además, el modelo de ratón TrkAP782S, donde se ha mutado el gen *trkA* para originar un cambio de aminoácido en la proteína, tiene como consecuencia una hiperactivación del receptor TrkA, que se traduce en hipersensibilidad al dolor térmico e inflamatorio (Yu et al., 2011, 2014). Además, otro modelo de ratón con una mutación que altera la ubiquitinación del receptor y, por tanto, su internalización, también muestra un fenotipo similar (Kiris et al., 2014). De este modo, NGF es una de las potenciales dianas para el tratamiento del dolor y contra el que ya se han generado anticuerpos monoclonales como terapia analgésica. En los ensayos clínicos llevados a cabo, se ha observado una disminución del dolor en pacientes con osteoartritis de rodilla tratados con estos anticuerpos (Lane et al., 2010), aunque todavía no han sido aprobados debido a la aparición de efectos secundarios. Si bien es cierto que los mecanismos promovidos por la señalización mediada por TrkA en la supervivencia y diferenciación neuronal han sido ampliamente analizados, poco se conoce sobre aquellos implicados en la nocicepción. Por ejemplo, el papel de ARMS/Kidins220 como proteína adaptadora fundamental para la correcta señalización de

los receptores Trk en el desarrollo dendrítico y plasticidad cerebral está bien establecido (Chen et al., 2012; Neubrand et al., 2012). Sin embargo, todavía no existen estudios sobre la posible implicación de ARMS en el dolor por lo que creímos que sería interesante estudiar esta proteína dentro del contexto de la nocicepción. Así, nos planteamos dos objetivos fundamentales en este trabajo de Tesis doctoral:

- i) Estudiar el posible papel de la proteína ARMS/Kidins220 en la nocicepción mediada por el eje NGF/TrkA mediante la generación de un ratón *knock-down* (ARMS KD) para ARMS/Kidins220, exclusivamente en neuronas que expresan el receptor TrkA.
- ii) Identificar los mecanismos en los que ARMS está implicado en la nocicepción mediada por las células que expresan TrkA.

A lo largo de la realización de esta tesis surgieron dos observaciones clave que fueron muy importantes para poder ayudar a ampliar nuestra hipótesis y objetivos. El primero fue un trabajo realizado por nuestro laboratorio donde describimos que la reducción de la proteína ARMS favorece la secreción regulada de BDNF mediada por neurotrofinas (López-Benito, 2018). El segundo, fue la observación de la interacción de ARMS con el canal TRPV1, que es clave en la nocicepción mediada por calor e inflamación, tanto en nuestro laboratorio como en el trabajo publicado por Peter y colaboradores (Peter, 2017) Todo esto hizo que nos propusiéramos otros dos nuevos objetivos:

- iii) Analizar, mediante una aproximación genética, el posible papel de BDNF en el fenotipo observado en el animal ARMS KD.
- iv) Establecer la conexión entre ARMS y TRPV1 en la nocicepción.

Abreviaciones

A

ARMS/Kidins220:	<i>Ankyrin Repeat-Rich Membrane-Spanning Protein / Kinase D-Interacting Substrate of 220 KDa.</i>
BDNF:	<i>Brain-Derived Nerotrophic Factor.</i> ESP: Factor neurotrófico derivado del cerebro
CIPA:	<i>Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis.</i> ESP: Insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis.
DRG:	<i>Dorsal Root Ganglion.</i> ESP: ganglio raquídeo.
GFP:	<i>Green Fluorescent Protein.</i> ESP: Proteína verde fluorescente.
HEK293:	<i>Human Embryonic Kidney cells 293.</i>
HSAN:	<i>Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy.</i> ESP: Neuropatía sensitiva autonómica hereditaria.
IASP:	<i>International Association for the Study of Pain.</i> ESP: Asociación internacional para el estudio del dolor.
KD:	<i>Knock-Down.</i>
KO:	<i>Knock-Out.</i>
SNP:	Sistema nervioso periférico.
SNC:	Sistema nervioso central.
LTP:	<i>Long Term Potentiation.</i> ESP: Potenciación a largo plazo.
NGF:	<i>Nerve Growth Factor.</i> ESP: Factor de crecimiento nervioso.
NT-3:	Neurotrofina 3.
NT-4/5:	Neurotrofina 4/5.
pb:	pares de bases.
shRNA:	<i>short hairpin RiboNucleic Acid.</i> ESP: ácido ribonucleico en horquilla.
SINO:	<i>Spastic Paraplegia, Intellectual disability, Nystagmus and Obesity syndrome.</i> ESP: Síndrome de paraplejía espástica, discapacidad intelectual, nistagmo y obesidad.
TNF:	<i>Tumour Necrosis Factor.</i> ESP: Factor necrosis tumoral.

- TRPA1:** *Transient Receptor Potential Ankyrin 1*. ESP: Receptor de potencial transitorio anquirina 1.
- TRPM3:** *Transient Receptor Potential Melastatin 3*. ESP: Receptor de potencial transitorio melastatina 3.
- TRPM8:** *Transient Receptor Potential Melastatin 8*. ESP: Receptor de potencial transitorio melastatina 8.
- Trk:** *Tropomyosin receptor kinase*.
- TRPV1:** *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*. ESP: Receptor de potencial transitorio vanilloide 1.

Agradecimientos

Gracias

Este trabajo se gestó a partir de septiembre de 2015. Hasta el día de hoy. Pero todo empezó un poquito antes. Digamos que en 2013. En ese año tomé contacto con la neurociencia, gracias a Joaquim y a Disha, para luego aterrizar donde Juan Carlos. Y sí, han sido casi seis años de trabajo predoctoral, pero más de siete con las neurotrofinas. Por eso les agradezco inmensamente a los tres, ese empujón que necesitaba.

Este logro no es solo mío, desde luego. Sin Juan Carlos hubiera sido impensable. Porque siempre tiene la puerta abierta. Obviamente, ha habido momentos de tensión y momentos de risas, pero, sobre todo, momentos de estrujarnos el cerebro mutuamente para poder llegar a hipótesis, más o menos plausibles, de el porqué de los resultados. Así que gracias, de corazón.

Gracias...

A Cristina, siempre dispuesta a trabajar conmigo. Creo que eres mi hada madrina, porque es imposible que sin magia hagas todo tan bien. A mis compañeros que están y a los que ya se han ido. Son muchos años, y si me dejo a alguno, jamás me lo perdonaría. Así que no os nombro porque ya sabéis quien sois. Pero especial mención a Laura Calvo, por arrancarme en el mundo del comportamiento animal y enseñarme a escuchar a los ratones y a ser escuchada.

A Silvia, que sigues, como buena amiga, dándome consejos incansables y apoyo Zen.

A Laura y Daniel, por aguantar mis chistes malos, mis días no tan buenos y permitirme quejarme. A Andrés, por escucharme, entenderme y aguantarme. A Jorge, por su paz, maestría y buen temperamento, y que, junto al resto del grupo de Conchi, me acogió desde el primer día en el laboratorio 3.

A Bea, Estela, Guillén, Rosa y Núria: me dais una bocanada de aire fresco, y me permitís que me queje todo lo quejable. Para luego hacerme olvidar todo y sentir que la vida fluye.

Al INA, y en especial a Félix, por mostrarme otro Instituto de Neurociencias diferente, otra ciencia, otro modo de vida. Dos semanas que fueron breves pero intensas, donde encontré personas maravillosas y un modo de trabajar totalmente distinto.

A mamá y papá, porque TODO.

A Isaac. Aunque seamos como el gato y el ratón, sé que puedo contar contigo.

A Mely. Creo que gracias a ti tengo un poco de vena artística. Y ese poco me lo ha puesto un poco más fácil en el doctorado. Me enseñaste a mirar las cosas con otra perspectiva y a fijarme en los detalles, esencial para la ciencia.

And finally to you, Gagan. For your insatiable patience, your care and love in the most difficult moments. For your unconditional faith in me and pushing me, literally, to move forward. Because you make everything worthy.

Este trabajo se terminó a fecha veintiséis de mayo de dos mil veintiuno, en el
Instituto de Neurociencias de Castilla y León,
Salamanca