

**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Sede Sur

Departamento de Farmacobiología

**Participación diferencial de los canales Ano1 y Best1 en  
modelos de dolor neuropático**

Tesis que presenta

**M. en C. Guadalupe García Pérez**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias  
en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directora de Tesis

**Dra. Janet Murbartián Aguilar**

Ciudad de México

Agosto, 2018



El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Laboratorio 4, bajo la dirección de la Dra. Janet Murbartián Aguilar del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, Sede Sur.

Para la realización de este proyecto de tesis se contó con la beca de doctorado (no. 261810) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).



## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Cinvestav por permitirme realizar mis estudios de posgrado, por los apoyos económicos otorgados para la asistencia a congresos y para concluir satisfactoriamente este trabajo de tesis.

Gracias al Conacyt por la beca otorgada, sin este apoyo hubiera sido muy difícil realizar todo el trabajo de tesis.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Janet Murbartián Aguilar, por permitirme ser parte de su laboratorio y por todo el apoyo brindado para realizar este proyecto de tesis. Gracias por confiar en mí y por sus consejos, espero haber correspondido por todo lo otorgado.

Gracias al comité sinodal integrado por la Dra. Gabriela Rodríguez Manzo, la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. Perla D. Maldonado Jiménez y el Dr. David Centurión Pacheco, que con sus comentarios y sugerencias se logró complementar mejor este proyecto de tesis. Además, gracias por su disposición a ayudarme en cualquier conflicto que tuviera.

Al Dr. Vinicio Granados Soto y a la Dra. Norma Oviedo por su ayuda y consejos para realizar los experimentos.

Al técnico Arturo Franco por ayudarme en el cuidado de los animales y por tener las condiciones óptimas para trabajar en el laboratorio mientras estuvo con nosotros. No sabe cuánto se le extraña.

Gracias a los laboratorios 11, 12, 13 y 16 por la disposición para prestarme sus equipos y material de laboratorio que necesitaba. Sin su ayuda hubiera sido más difícil realizar los experimentos.

Al personal del bioterio por proporcionarme las ratas necesarias para los experimentos.

Al Sr. Andrés de vigilancia por preocuparse por mí todas las noches que salía tarde del laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio 4 que forman o formaron parte de él.

A la Q.F.B. Diana K. López Domínguez por ser mi alumna, por elegirme para realizar su servicio social de licenciatura y por ayudarme durante las cirugías de los animales.

A la Dra. Erika J. Gutiérrez Lara por su disposición incondicional para ayudarme y acompañarme cuando los experimentos no salían. Siempre estaré agradecida por todo lo que has hecho por mí y nunca me arrepentiré de las decisiones que he tomado, todo ha valido la pena por tener una amiga incomparable como tú.

A Laura Monterrosas Cortes por apoyarme en todo, por motivarme cuando los experimentos no salían bien y despertarme a la mañana siguiente para que lo volviera a intentar. Gracias por siempre creer en mí, por cuidarme y alimentarme, por escucharme y por enseñarme a tener una familia diferente. Sin duda eres parte importante de este logro. Los quiero, a ti y a Bryan.

A mi tía Ma. Teresa Pérez Rosas por quererme como una hija, sabes que eres correspondida. Gracias por apoyarme siempre. Este esfuerzo también es por ti.

Finalmente agradezco a mis padres Ma. Guadalupe Pérez Rosas y Félix García Bello por siempre apoyarme y alentarme en todas mis decisiones. Gracias por enseñarme con el ejemplo de que todo trabajo tiene una recompensa, por nunca dejarme sola a pesar de la distancia. No existen palabras ni actos para agradecerles todos los esfuerzos y sacrificios que han hecho por mí. Esto también es por ustedes. Los quiero mucho.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	VI
<b>RESUMEN</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Clasificación de los nociceptores.....	1
1.3 Dolor neuropático.....	3
1.3.1 <i>Mecanismos del dolor neuropático</i> .....	3
1.3.2 <i>Remodelamiento de las fibras nociceptivas en el dolor neuropático</i> .....	7
1.3.3 <i>Contribución de los nervios no lesionados al dolor neuropático</i> .....	9
1.4 Respuestas nociceptivas mediadas por Cl <sup>-</sup> .....	11
1.4.1 <i>Regulación de Cl<sup>-</sup> por los cotransportadores NKCC1 y KCC2</i> .....	11
1.4.2 <i>Reflejos de raíz dorsal</i> .....	13
1.5 Canales de Cl <sup>-</sup> activados por Ca <sup>2+</sup> (CaCC).....	13
1.5.1 <i>Anoctaminas</i> .....	15
1.5.2 <i>Bestrofinas</i> .....	16
1.5.3 <i>Participación de los CaCC en la generación de respuestas nociceptivas</i> .....	17
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	19
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>4. OBJETIVO</b> .....	20
4.1 <i>Objetivos particulares</i> .....	20
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	21

5.1 Animales.....	21
5.2 Ligadura y transección de los nervios espinales (LNE y TNE). ...	21
5.3 Evaluación de la conducta nociceptiva.....	22
5.4 Amplificación y detección del plásmido pCMV6-Best1 .....	22
5.4.1 Transformación de bacterias .....	22
5.4.2 Aislamiento y purificación del plásmido (miniprep o maxiprep).....	23
5.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final .....	23
5.4.4 Digestión del plásmido pCMV6-Best1 por enzimas de restricción .....	24
5.5 Fármacos .....	25
5.6 Administración intratecal .....	25
5.7 Inmunodetección mediante <i>Western blot</i> .....	25
5.7.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	25
5.7.2 <i>Western Blot</i> .....	26
<b>6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>27</b>
6.1 Curso temporal de expresión de proteínas.....	27
6.2 Evaluación del efecto del bloqueo de Ano1 en la alodinia mecánica en ratas neuropáticas.....	27
6.3 Evaluación del efecto del bloqueo de Ano1 sobre la expresión de proteínas.....	28
6.4 Evaluación del efecto de la administración de gabapentina sobre la alodinia mecánica y la expresión de proteínas.....	28
6.5 Inmunodetección de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve .....	29
6.6 Evaluación de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve sobre el desarrollo de la alodinia mecánica .....	30
6.7 Evaluación del bloqueo de Best1 en la alodinia mecánica inducida por la sobreexpresión de Best1 .....	30
6.8 Evaluación de la sobreexpresión de Best1 sobre la expresión de proteínas.....	31



<b>7. RESULTADOS</b> .....	32
7.1 Estandarización de los modelos de LNE y TNE .....	32
7.2 Efecto de la LNE o la TNE sobre la expresión de proteínas .....	32
7.2.1 <i>Efecto de la LNE sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43</i> .....	32
7.2.2 <i>Efecto de la TNE sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43</i> .....	36
7.2.3 <i>Efecto de la LNE o TNE sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en los GRD contralaterales</i> .....	39
7.3 Efecto del bloqueo del canal Ano1 .....	41
7.3.1 <i>Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA en la alodinia mecánica inducida por la LNE o TNE</i> .....	41
7.3.2 <i>Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas con LNE</i> .....	44
7.3.3 <i>Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas con TNE</i> .....	48
7.4 Efecto de la administración de gabapentina en la alodinia mecánica y la expresión de proteínas.....	52
7.5 Efecto de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve .....	54
7.5.1 <i>Amplificación e identificación del plásmido pCMV6-Best1</i> .....	54
7.5.2 <i>Sobreexpresión de Best1 en ratas naïve</i> .....	55
7.5.3 <i>Efecto de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve</i> .....	56
7.6 Efecto del bloqueo del canal Best1 .....	57
7.6.1 <i>Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> en la alodinia mecánica inducida por la sobreexpresión de Best1</i> .....	57
7.6.2 <i>Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas que sobreexpresaron Best1</i> .....	59

7.6.3 Efecto del $\text{CaCC}_{inh-A01}$ sobre la alodinia táctil en ratas neuropáticas.....	61
7.6.4 Efecto del $\text{CaCC}_{inh-A01}$ sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas con LNE .....	62
7.6.5 Efecto del $\text{CaC}_{inh-A01}$ sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas con TNE .....	64
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>68</b>
8.1 Efecto de la LNE o la TNE sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3 y caspasa-3 en los GRD de L5/L6 .....	68
8.2 Efecto de la LNE o TNE sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3 y caspasa-3 en el GRD de L4.....	71
8.3 Efecto de la LNE o TNE sobre la expresión del marcador GAP43 .....	73
8.4 Efecto del bloqueo de Ano1 en la LNE o TNE .....	73
8.5 Efecto de la gabapentina sobre Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la LNE o TNE.....	75
8.6 Efecto de la sobreexpresión de Best1 sobre la alodinia mecánica.....	76
8.7 Efecto del bloqueo de Best1 sobre la LNE y TNE.....	77
<b>9. RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>79</b>
<b>10. CONCLUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>81</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>82</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>13. ANEXOS .....</b>	<b>94</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
[Cl <sup>-</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de cloruro intracelular
A	Adenina
ABC	Área bajo la curva
AMPA	Receptores al ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Monofosfato de adenosín cíclico
Ano(1-10)	Anoctamina (1-10)
Ano1	Anoctamina-1
Ano2	Anoctamina-2
ANOVA	Análisis de varianza
ARN <sub>i</sub>	ARN de interferencia
ATF3	Factor de transcripción 3
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor de crecimiento derivado del cerebro
Best(1-4)	Bestrofina (1-4)
Best1	Bestrofina-1
<i>BEST1</i>	Gen de bestrofina-1
BK	Canal de K <sup>+</sup> dependiente de Ca <sup>2+</sup> de alta conductancia
C	Citosina
CaCC	Canales de cloruro activador por calcio
CaCC <sub>inh-A01</sub>	Bloqueador selectivo de canales CaCC
CaM	Calcio calmodulina
Cav	Canales de calcio dependientes de voltaje
CFTR	Canal de cloruro regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CH	Fibra C térmico-sensible
CLCA	Canal de cloruro “accesory”
CICC	Canales de cloruro dependientes de voltaje
CMH	Fibra C mecanotérmico sensible
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
e.e.	Error estándar
E <sub>Cl</sub>	Potencial de equilibrio de Cl <sup>-</sup>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

G	Guanina
G	Gauge
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor del ácido $\gamma$ -aminobutírico
GAP43	Proteína asociada al crecimiento 43
Glu	Glutamato
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
<i>hBEST</i>	Bestrofina humana
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratecal
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
I <sub>Ca(Cl)</sub>	Corriente de cloruro activada por calcio
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-4	Interleucina-4
kDa	Kilodaltons
kb	Kilobase
KCC2	Cotransportador de K <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> tipo 2
L4	Lumbar 4
L5	Lumbar 5
L6	Lumbar 6
LB	Medio Luria Bertani
LNE	Ligadura de los nervios espinales L5/L6
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minuto
MITF	Factor de transcripción asociado con microftalmia
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MONNA	ácido N-((4-Metoxi)-2-naftil)-5-nitroantranílico
mV	Milivolts
N	Naïve
NaCl	Cloruro de sodio
Nav	Canales de sodio dependientes de voltaje
Nav1.6	Canal de sodio dependiente de voltaje tipo 1.9
Nav1.8	Canal de sodio dependiente de voltaje tipo 1.8
Nav1.9	Canal de sodio dependiente de voltaje tipo 1.9
ng	Nanogramo
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NKCC1	Cotransportador de Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> tipo 1
NMDA	N-metil-D-aspartato

OTX2	Orthodenticle homebox-2, por sus siglas en inglés
<i>P</i>	Probabilidad
PAD	Despolarización de la fibra aferente primaria
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sham
s	segundo
SCN	Sistema nervioso central
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOX9	Factor de transcripción asociado a la diferenciación sexual-9
SP	Sustancia P
STAT6	Transductor de señales y activador de la transcripción 6
T	Timina
T16A <sub>inh-A01</sub>	Bloqueador selectivo del canal Ano1
TM	Transmembranal
TNE	Transección del nervio espinal L5
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris-HCl	Trisaminometano-ácido clorhídrico
TRPA1	Receptor de potencial transitorio anquirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide 1
Ttyh	Canales de cloruro tweety
U	Unidades
V	Vehículo
VRAC	Canal de aniones regulador de volumen
vs	Versus

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
Fig. 1 Clasificación del dolor según su fisiopatología.....	2
Fig. 2 Sensibilización periférica.....	5
Fig. 3 Sensibilización central.....	6
Fig. 4 Proceso de regeneración de los nervios lesionados.....	8
Fig. 5 Lesión del nervio espinal L5 .....	10
Fig. 6 Regulación de las concentraciones de Cl .....	12
Fig. 7 Estructura del canal anoctamina-1 .....	15
Fig. 8 Estructura del canal bestrofina-1 .....	17
Fig. 9 Secuencia del plásmido pCMV6-Best1 .....	24
Fig. 10 Diseño experimental 1.....	27
Fig. 11 Diseño experimental 2.....	28
Fig. 12 Diseño experimental 3.....	28
Fig. 13 Diseño experimental 4.....	29
Fig. 14 Diseño experimental 5.....	30
Fig. 15 Diseño experimental 6.....	30
Fig. 16 Diseño experimental 7.....	31
Fig. 17 Diseño experimental 8.....	31
Fig. 18 Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la LNE o la TNE.....	32
Fig. 19 Curso temporal de expresión de Ano1 y Best1 después de la LNE.....	33
Fig. 20 Curso temporal de expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 después de la LNE.....	35
Fig. 21 Curso temporal de expresión de Ano1 y Best1 después de la TNE.....	36
Fig. 22 Curso temporal de expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 después de la TNE.....	38
Fig. 23 Curso temporal de expresión contralateral de Ano1, ATF3 y caspasa-3 después de la LNE.....	39

Fig. 24	Curso temporal de expresión contralateral de Ano1, ATF3 y caspasa-3 después de la TNE .....	40
Fig. 25	Efecto antialodínico de T16A <sub>inh-A01</sub> o MONNA en la LNE.....	42
Fig. 26	Efecto antialodínico de T16A <sub>inh-A01</sub> o MONNA en la TNE.....	43
Fig. 27	Efecto de T16A <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Ano1 y Best1 en la LNE...	45
Fig. 28	Efecto de T16A <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la LNE.....	46
Fig. 29	Efecto de MONNA sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la LNE.....	47
Fig. 30	Efecto de T16A <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Ano1 y Best1 en la TNE	49
Fig. 31	Efecto de T16A <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la TNE.....	50
Fig. 32	Efecto de MONNA sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la TNE.....	51
Fig. 33	Efecto antialodínico de gabapentina en la LNE y la TNE.....	53
Fig. 34	Efecto de gabapentina sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la LNE o la TNE.....	53
Fig. 35	Identificación del plásmido pCMV6-Best1.....	54
Fig. 36	Determinación de la expresión de Best1 en ratas administradas con pCMV6-Best1.....	55
Fig. 37	Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por el pCMV6-Best1 en ratas naïve .....	56
Fig. 38	Efecto antialodínico de CaCC <sub>inh-A01</sub> en ratas que sobreexpresaron Best1.....	58
Fig. 39	Efecto de CaCC <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1 en ratas que sobreexpresaron Best1.....	59
Fig. 40	Efecto de CaCC <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas que sobreexpresaron Best1.....	60
Fig. 41	Efecto antialodínico de CaCC <sub>inh-A01</sub> en la LNE o la TNE.....	61
Fig. 42	Efecto de CaCC <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1 en la LNE.....	62

Fig. 43	Efecto de CaCC <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la LNE.....	63
Fig. 44	Efecto de CaCC <sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la TNE.....	65
Fig. 45	Participación de los canales Ano1 y Best1 en el dolor neuropático inducido por la LNE y TNE.....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1 Efectos del bloqueo de los canales Ano1 y Best1 en la LNE.....	66
Tabla 2 Efectos del bloqueo de los canales Ano1 y Best1 en la TNE.....	67
Tabla 3 Efectos del bloqueo de los canales Ano1 y Best1 en la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve.....	67



## RESUMEN

Los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (CaCC) anoctamina-1 (Ano1) y bestrofina-1 (Best1) se expresan en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD). Se ha reportado que Ano1 participa en la transducción y transmisión de estímulos nociceptivos, mientras que Best1 aumenta su expresión en la transección de los nervios periféricos y se ha relacionado con procesos de regeneración. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de Ano1 y Best1 en el dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (LNE) o la transección del nervio espinal L5 (TNE). Para ello se determinaron los cambios en la expresión de Ano1 y Best1, así como del marcador de daño (ATF3), de apoptosis (caspasa-3) y de regeneración (GAP43) en los nervios L5 y L6 lesionados y en el nervio L4 no lesionado. La LNE incrementó la expresión de Ano1 tanto en los GRD L5 y L6 como en el GRD L4, mientras que el incremento en la expresión de Best1 fue modesto y transitorio. En cambio, la TNE incrementó la expresión de Best1, pero no de Ano1, en el GRD L5 y L4. La LNE y TNE incrementaron la expresión de ATF3 y caspasa-3 en el GRD L5 y L6, pero no en el GRD L4. Además, la LNE aumentó la expresión de GAP43 en los nervios lesionados y no lesionado. Por otro lado, la administración intratecal (i.t.) repetida (cada 24 h durante 3 días) de los bloqueadores selectivos para Ano1, T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1 µg) y MONNA (1 y 10 µg) atenuó la alodinia mecánica inducida por la LNE. En contraste, los bloqueadores de Ano1 tuvieron menor efecto sobre la alodinia mecánica inducida por la TNE. Más aún, la administración i.t. repetida de T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA disminuyó el incremento en la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en los GRD L5, L6 y L4 inducido por la LNE. El tratamiento repetido con los bloqueadores de Ano1 también disminuyó la expresión de ATF3 y caspasa-3 en ratas con TNE. La administración i.t. repetida de gabapentina (100 µg) redujo el aumento en la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3.

La sobreexpresión de Best1 en ratas intactas produjo alodinia mecánica a partir del día siguiente de la última administración del plásmido. La administración del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 y 10 µg) revirtió la alodinia mecánica en ratas que sobreexpresaron Best1. Asimismo, la administración i.t. de CaCC<sub>inh-A01</sub> disminuyó la alodinia mecánica en ratas con LNE o TNE. De manera interesante, la administración de CaCC<sub>inh-A01</sub> (10 µg) disminuyó la expresión de Best1 y GAP43 en ratas que sobreexpresaron Best1, así como en ratas con TNE. Este tratamiento no afectó la expresión de ATF3 o caspasa-3 en ratas con TNE. La administración i.t. de CaCC<sub>inh-A01</sub> no modificó la expresión de ninguna de las proteínas evaluadas en ratas con LNE. Estos datos sugieren que la regulación de la expresión de Ano1 y Best1 depende del grado de la lesión de los nervios periféricos. El aumento de la expresión de Ano1 es importante para el mantenimiento del dolor neuropático en la LNE, mientras que la

expresión de Best1 podría tener un papel más relevante en respuesta a la transección de los nervios periféricos. Los resultados sugieren que los cambios en la expresión de proteínas en el GRD L4 no lesionado podría contribuir al mantenimiento del dolor neuropático en ratas con LNE y TNE.

## ABSTRACT

Anoctamin-1 (Ano1) and bestrophin-1 (Best1) are calcium-activated chloride channels (CaCC) which are expressed in neurons of the dorsal root ganglion (DRG). Ano1 participates in transduction and transmission of nociceptive stimuli, whereas Best1 increases its expression in the nerve transection and has been related to regeneration processes. The aim of this study was to evaluate the participation of Ano1 and Best1 in the L5/L6 spinal nerve ligation (SNL) or L5 spinal nerve transection (SNT) models. In addition, it was determined if the SNL and the SNT induced changes in the protein expression of neuronal injury marker (ATF3), apoptosis marker (caspase-3) and regeneration marker (GAP43) in DRG obtained from L5/L6 injured and L4 uninjured nerves. SNL increased Ano1 protein expression in L5 and L6 injured and L4 uninjured DRG, whereas Best1 protein expression was modestly and transiently increased. Conversely, SNT up regulated protein expression of Best1, but not Ano1, in L5 and L4 DRG. SNL or SNT increased ATF3 and caspase-3 protein expression in L5 and L6 injured nerves, but not in L4. Meanwhile, nerve injury increased GAP43 expression in injured and uninjured DRG. On the other hand, repeated intrathecal (i.t.) injection (3 days, every 24 h) of Ano1 blockers, T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1-1 µg) or MONNA (1-10 µg), attenuated the mechanical allodynia induced by SNL. In contrast, Ano1 blockers had less effect on SNT-induced mechanical allodynia. Moreover, the repeated injection of T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA, decreased SNL-induced up-regulation of Ano1, ATF3 and caspase-3 in L5, L6 and L4 DRG. These blockers decreased SNT-induced up-regulation of ATF3 and caspase-3. Repeated injection of gabapentin (100 µg) decreased Ano1, ATF3 and caspase-3 protein expression. Overexpression of Best1 in naïve rats produced mechanical allodynia. A single i.t. injection of CaCC<sub>inh-A01</sub> (1-10 µg) reversed the mechanical allodynia in rats overexpressing Best1. Similarly, injection of CaCC<sub>inh-A01</sub> decreased mechanical allodynia in SNL or SNT rats. Moreover, a single injection of CaCC<sub>inh-A01</sub> (10 µg) decreased Best1 overexpression - induced up regulation of Best1 and GAP43 protein expression. Also, SNT up-regulated these proteins. In contrast, CaCC<sub>inh-A01</sub> did not modify the protein expression of any of the proteins evaluated in SNL rats. These data suggest that Ano1 and Best1 up-regulation depends on the degree of peripheral nerve injury. Ano1 up-regulation is important for the maintenance of neuropathic pain induced by SNL, while Best1 expression could have a more relevant role in the transection of peripheral nerves. In addition, changes in protein expression in L4 uninjured nerve could contribute to the maintenance of neuropathic pain in SNL or SNT rats.



# 1. INTRODUCCIÓN

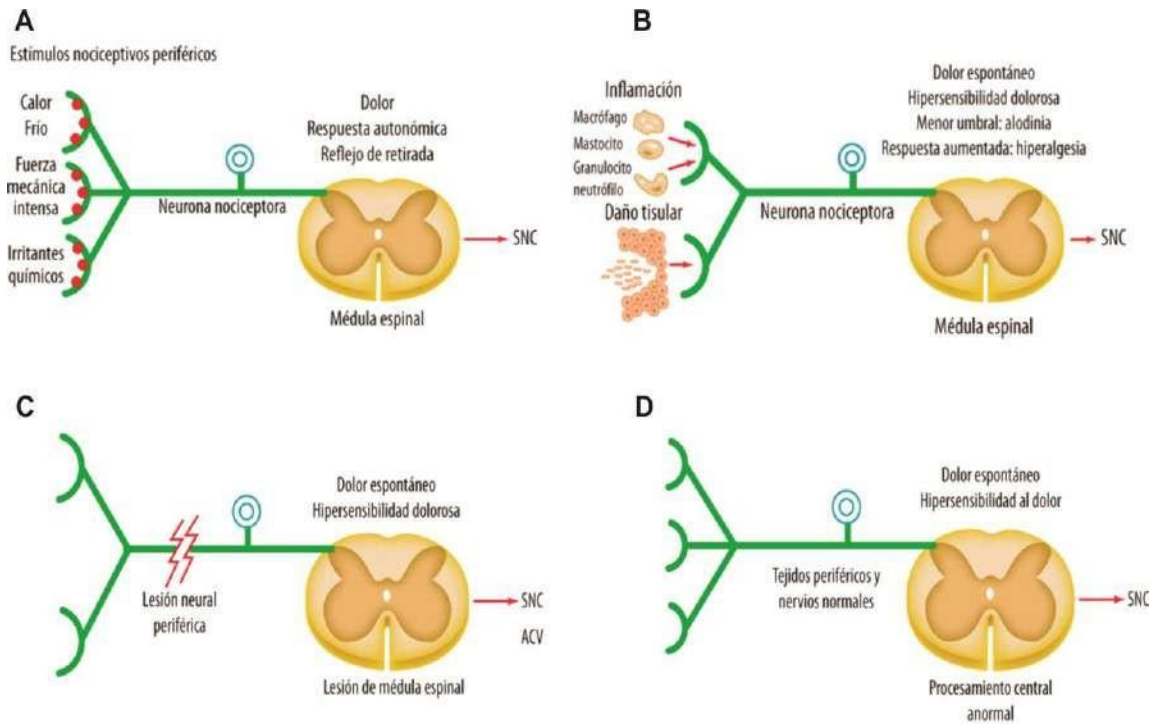
## 1.1 Generalidades

El dolor es una experiencia sensorial subjetiva que resulta de la percepción de un estímulo nocivo e incluye un componente emocional que requiere que el individuo esté consciente para que suceda. Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), el dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño (Merskey y Bogduk, 1994).

El dolor se puede clasificar en nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional de acuerdo con los mecanismos neurobiológicos involucrados (Fig. 1) (Woolf, 2004). El dolor nociceptivo es aquel que se produce por la detección de estímulos potencialmente nocivos y, por lo tanto, funciona como un sistema de defensa al alertar al individuo para mantener su integridad (Fig. 1A). El dolor inflamatorio se presenta cuando existe lesión al tejido y se produce por la liberación de mediadores inflamatorios que activan el sistema inmunológico (Fig. 1B). Este tipo de dolor también funciona como un medio de defensa, ya que ayuda a la recuperación del tejido lesionado al hipersensibilizar tejidos adyacentes y evitar un daño mayor. El dolor neuropático y el dolor funcional son el resultado de una estimulación anormal del sistema nervioso y no tienen una función protectora. El dolor neuropático ocurre ante una lesión del sistema nervioso (Fig. 1C) y el dolor funcional sucede por un procesamiento anormal del sistema nervioso sin que haya algún daño aparente (Fig. 1D) (Woolf, 2010).

## 1.2 Clasificación de los nociceptores

La nocicepción es el proceso por el cual los estímulos nocivos térmicos, químicos o mecánicos de alta intensidad son detectados por fibras aferentes primarias de alto umbral llamadas nociceptores (Basbaum y cols., 2009). Los nociceptores son células pseudounipolares cuyo soma se localiza en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) y envían una prolongación axónica a la periferia que sirve como receptor de estímulos



**Figura 1.** Clasificación del dolor según su fisiopatología. A) Dolor nociceptivo, B) dolor inflamatorio, C) dolor neuropático y C) dolor funcional. Modificado de Woolf, 2010.

nocivos, y otra prolongación axónica central dirigida hacia la asta dorsal de la médula espinal, donde hace sinapsis con interneuronas y motoneuronas que controlan el reflejo de retiro o hacen sinapsis con neuronas de segundo orden que llevan la información a los centros supraespinales (Basbaum y Jessell, 2000).

Las fibras aferentes primarias se clasifican en tres tipos de acuerdo con el grado de mielinización, diámetro y velocidad de conducción. Las fibras A $\beta$  también llamadas mecanorreceptores, son fibras densamente mielinizadas de más de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y con una velocidad de conducción mayor a los 30 m/s (Millan, 1999). Estas fibras decodifican la información mecánica inocua de bajo umbral. Los dos tipos de fibras sensoriales restantes corresponden a los nociceptores, las fibras A $\delta$  y C que tienen axones periféricos con terminaciones libres de mielina (Basbaum y cols., 2009). Las fibras A $\delta$  son fibras medianas poco mielinizadas de 2-6  $\mu\text{m}$  de diámetro y presentan una velocidad de conducción relativamente rápida, entre 5 y 30 m/s. Las fibras A $\delta$  se han dividido en tipo I y II. Las fibras A $\delta$  de tipo I responden a estímulos térmicos de alto umbral (temperaturas mayores de 50°C o por debajo de los 8°C) y a

estímulos mecánicos. Las fibras A $\delta$  de tipo II responden a estímulos térmicos (entre 40 a 45°C) y mecánicos de alto umbral (Giordano, 2005; Basbaum y cols., 2009). Por su parte, la mayoría de la inervación nociceptiva está constituida por las fibras C que son fibras no mielinizadas polimodales, es decir, son activadas por estímulos mecánicos, térmicos y/o químicos. Las fibras C tienen una velocidad de conducción entre 0.5 y 2 m/s y un diámetro de 0.4 a 1.2  $\mu$ m (Millan, 1999; Giordano, 2005). Aunque la mayoría de las fibras C son polimodales, un grupo de fibras C es sensible al calor y fuerza mecánica (CMH), y otro grupo de fibras C responde sólo al calor (CH), pero no a estímulos mecánicos (Basbaum y cols., 2009).

### **1.3 Dolor neuropático**

Según la IASP, el dolor neuropático es el resultado de una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial (Jensen y cols., 2011). Algunos de los cuadros asociados con dolor neuropático son el dolor lumbar con un componente neuropático, la neuropatía diabética, la neuralgia post-herpética, el dolor neuropático como secuela post-quirúrgica, entre otros. Clínicamente, el dolor neuropático se caracteriza por la presencia de dolor espontáneo que puede presentarse en forma pulsátil, con calambres, ardor o escozor debido a descargas de las fibras C sensibilizadas por la lesión. También se presentan anomalías sensoriales como el fenómeno de alodinia, donde estímulos que anteriormente eran inocuos ahora producen dolor, y la hiperalgesia, que consiste en un aumento de la respuesta ante estímulos nocivos y una mayor duración. Esto permite considerar al dolor neuropático como una patología en sí misma (Woolf, 2011).

#### *1.3.1 Mecanismos del dolor neuropático*

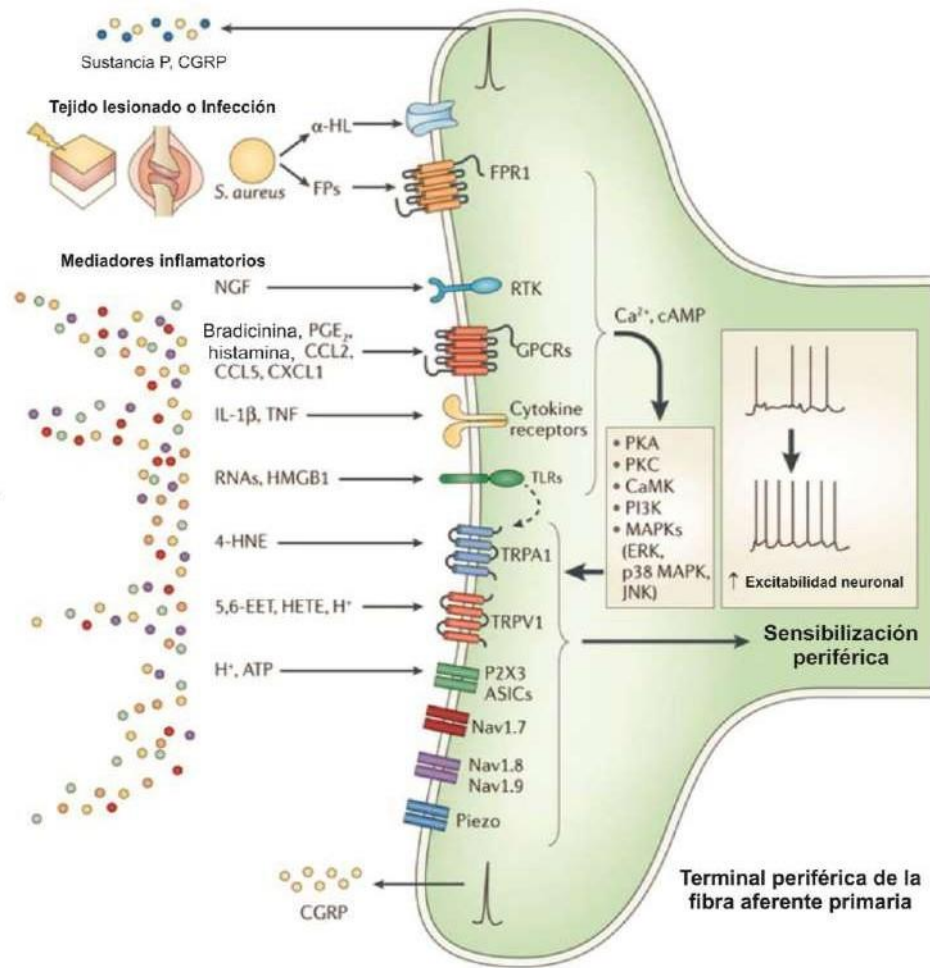
Parte de los mecanismos implicados en el dolor neuropático se explican por el proceso de sensibilización, es decir, por la disminución de los umbrales de activación de las fibras aferentes primarias (sensibilización periférica) y de las neuronas de segundo orden que se localizan en la asta dorsal de la médula espinal (sensibilización central). La activación constante de las fibras aferentes primarias produce un

incremento en la excitabilidad neuronal y en consecuencia disminuye su umbral de activación. Este proceso de sensibilización explica que, ante una estimulación inocua de bajo umbral se genere una respuesta nociceptiva (alodinia) y ante un estímulo de mayor intensidad o de alto umbral, se desencadene una respuesta nociceptiva exagerada (hiperalgesia) (Woolf, 2004; Latremoliere y Woolf, 2009).

En la sensibilización periférica, las células dañadas liberan su contenido intracelular como adenosín trifosfato (ATP), iones  $K^+$  y protones ( $H^+$ ). Por su parte, las células del sistema inmune migran al sitio de la lesión y liberan citocinas proinflamatorias tales como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF) y quimiocinas, entre otras (Fig. 2). Al conjunto de todas estas moléculas liberadas, así como neurotransmisores y neuropéptidos, se les denomina sopa inflamatoria (Basbaum y cols., 2009). Las fibras aferentes primarias expresan receptores de membrana que reconocen una gran diversidad de moléculas de la sopa inflamatoria. La activación de dichos receptores desencadena la producción de segundos mensajeros, que a su vez activan proteínas cinasas que fosforilan canales iónicos, producen cambios en la síntesis y transporte de canales iónicos dependientes de voltaje y de receptores hacia la membrana plasmática (Scholz y Woolf, 2002). Por ejemplo, los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje  $Nav_{1.6}$ ,  $Nav_{1.8}$  y  $Nav_{1.9}$  se redistribuyen y se transportan al sitio de la lesión del nervio (neuroma) (Tseng y cols., 2014). De igual forma, los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje ( $Ca_v$ ) incrementan su expresión en las fibras lesionadas, mientras que los canales de  $K^+$  disminuyen su expresión (Newton y cols., 2001; Navarro y cols., 2007).

Por otro lado, la sensibilización central está mediada principalmente por la activación de receptores glutamatérgicos postsinápticos. Ante la constante estimulación de las fibras aferentes primarias se produce la liberación de glutamato en la terminal central. La activación de receptores ionotrópicos a glutamato, como los receptores al ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y al kainato, despolarizan la neurona postsináptica, lo que provoca la remoción del ión  $Mg^{2+}$  que bloquea al receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), permitiendo la entrada de iones  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  al interior de la neurona. La suma de los potenciales postsinápticos excitadores de bajo umbral inducidos por la activación de los receptores a glutamato activa canales  $Nav$





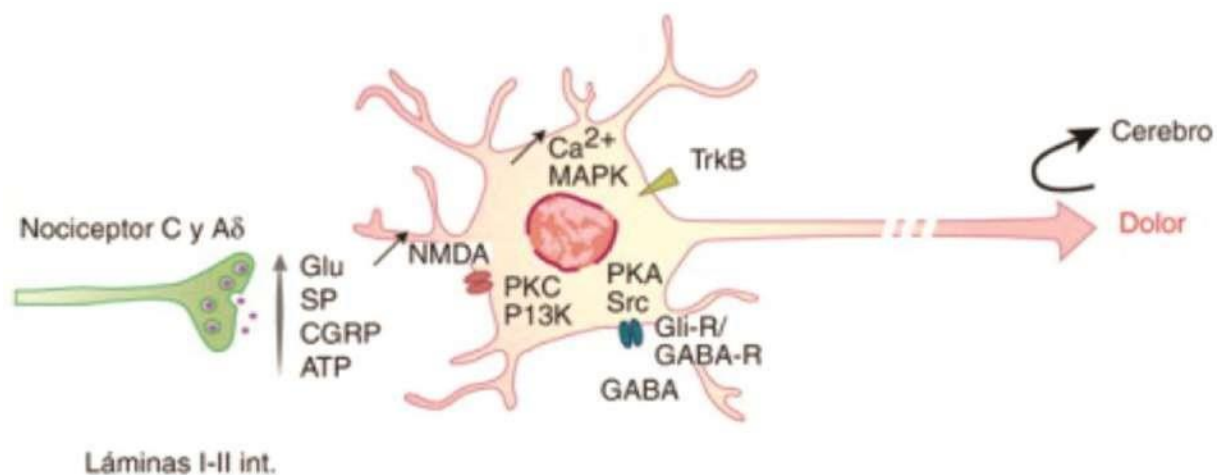
**Figura 2.** Sensibilización periférica. La disminución en el umbral de activación de las fibras nociceptivas se produce por la liberación de mediadores inflamatorios (sopa inflamatoria) de las células neuronales y no neuronales infiltradas en el tejido lesionado. Estos mediadores se unen a sus respectivos receptores de membrana ubicados en la terminación periférica de la fibra aferente primaria. La activación de receptores y canales iónicos incrementa la excitabilidad neuronal y contribuye a sensibilizar la fibra nociceptiva. Modificado de Ji y cols., 2014.

con la consiguiente generación de potenciales de acción (Letremoliere y Woolf, 2009). Más aún, se co-liberan neuropéptidos como la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) de la terminal central que activan a sus respectivos receptores en la neurona postsináptica, los cuales activan a la proteína cinasa A (PKA) y a la proteína cinasa C (PKC) (Basbaum y cols., 2009; Latremoliere y Woolf, 2009). Estos cambios en las propiedades de las neuronas de

la asta dorsal de la médula espinal favorecen la transmisión de las señales nociceptivas, debido al aumento de la actividad eléctrica de las neuronas de segundo orden y de los mismos nociceptores (Fig. 3) (Woolf, 2004).

Otro mecanismo que ocurre durante el dolor neuropático es la activación de diferentes factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados con la muerte celular o que están implicados en la regeneración neuronal (Navarro y cols., 2007). El factor de transcripción 3 (ATF3) aumenta su expresión en respuesta al daño neuronal en varios modelos de dolor neuropático y es ampliamente utilizado como marcador de daño neuronal (Tsuji y cols., 2000; Bráz y Basbaum, 2010). Se ha reportado que el aumento de la expresión de ATF3 promueve la supervivencia celular porque se correlaciona con un incremento en el crecimiento axonal; además, después de la reinervación a nivel periférico la expresión de ATF3 disminuye (Seiffers y cols., 2006).

Por otro lado, las neuronas dañadas incrementan la expresión de proteínas implicadas en los procesos de regeneración que les permiten reparar la lesión y



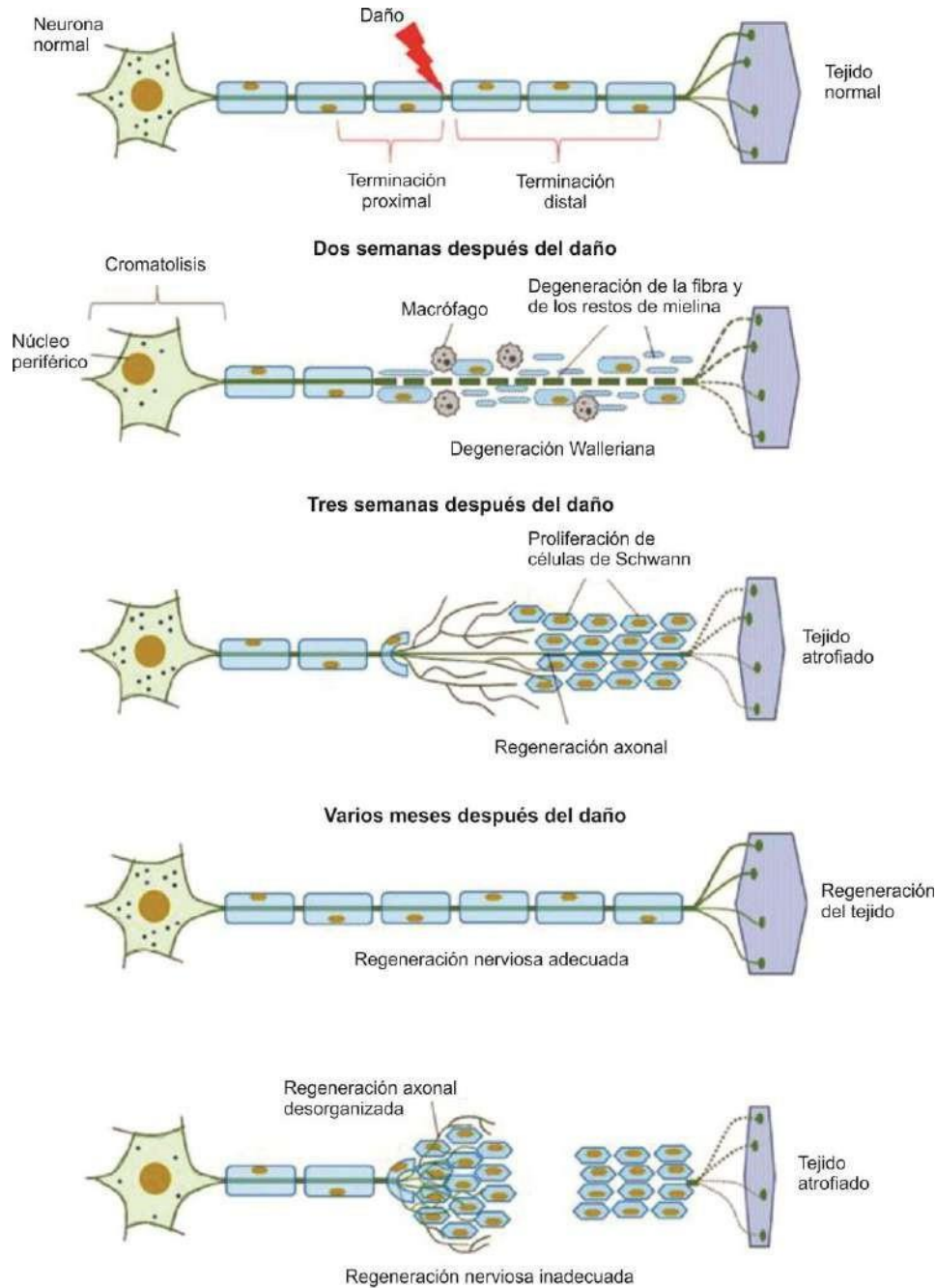
**Figura 3.** Sensibilización central. La liberación de glutamato (Glu) y de los neuropéptidos SP y CGRP de la terminal central de la fibra aferente primaria provocan la activación de sus respectivos receptores, lo que incrementa la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  en las neuronas de segundo orden de la asta dorsal de la médula espinal de las láminas I y II. Este aumento de  $Ca^{2+}$  activa cinasas como la PKC y la PKA que fosforilan a los canales y receptores que contribuyen al incremento de la hiperexcitabilidad y facilitan la transmisión de la información nociceptiva al cerebro. Modificado de Vergne-Salle y cols., 2015.

reinervar el tejido blanco (Woolf y cols., 1992). La proteína 43 asociada al crecimiento (GAP43) se sobreexpresa desde el primer día de una lesión neuronal y se transporta rápidamente al sitio de daño donde promueve el crecimiento del cono axonal (Navarro y cols., 2007). Por otra parte, la liberación de factores neurotróficos, como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), favorece la supervivencia celular, la formación de neuritas y la elongación del axón después del daño al nervio, eventos necesarios para reinervar el tejido diana (Geden y Deshmukh, 2016). Sin embargo, se ha visto que cuando se pierde la señalización adecuada de los factores neurotróficos, tanto el axón como el soma degeneran por un incremento en la expresión de caspasas, específicamente caspasa-3, provocando la muerte neuronal por apoptosis (Simon y cols., 2012).

### *1.3.2 Remodelamiento de las fibras nociceptivas en el dolor neuropático*

Los modelos de dolor neuropático que más se han estudiado en animales son aquellos en los que se produce una ligación o transección completa (axotomía) de los nervios periféricos. Estas lesiones provocan una interrupción inmediata e irreversible de la conducción de potenciales de acción y se desarrolla la degeneración Walleriana que consiste en la degeneración del axón distal a la lesión (Fig. 4) (Allodi y cols., 2012). La degeneración se inicia con una activación y proliferación de las células de Schwann que ayudan a eliminar los restos de mielina del axón dañado. En fases tardías, el reclutamiento de macrófagos al sitio de la lesión también contribuye a la eliminación de restos del axón y de mielina, lo cual es importante para crear un ambiente apto para la regeneración del axón (Chen y cols., 2015).

Con la transección de los nervios periféricos, la disrupción de la membrana celular y la exposición del contenido intracelular al medio extracelular son las primeras señales para la reparación del daño celular (McNeil y Steinhardt, 2003). El incremento en la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induce la activación de cinasas que promueven la fusión de los lípidos en los extremos rotos de la membrana y la activación del citoesqueleto para la formación de un cono de crecimiento neuronal. La reparación de la membrana celular es necesaria para la recuperación de la



**Figura 4.** Proceso de regeneración de los nervios lesionados. La lesión del axón provoca la activación de las células de Schwann y de los macrófagos que inducen la degeneración de la terminación distal del axón y de los restos de la mielina. A este proceso se le denomina degeneración Walleriana. Posteriormente, las células de Schwann se re-ordenan a lo largo del tubo neural para guiar la regeneración del cono axonal. El proceso de regeneración comienza 3 ó 4 semanas después de la lesión. Si la lesión no es tan severa y se conserva el tubo neural, la reparación del axón se lleva a cabo de manera adecuada. En cambio, cuando la lesión es grave y no se conserva el tubo neural, la regeneración del axón es desorganizada y progresa a la deriva, ocasionando una regeneración inadecuada y aberrante. Modificado de Navarro y cols., 2007.

homeostasis iónica y la supervivencia de la neurona. Esta reparación se lleva a cabo en dos etapas, una es a través de la capacidad de los lípidos de la membrana para unir los extremos cortados y la otra es mediante la activación de proteínas de membrana dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como las sinaptotagminas, syntaxinas y sinaptobrevinas, que permiten la fusión de vesículas adyacentes a la lesión para formar un parche de sellado (McNeil y Steinhardt, 2003; He y Jin, 2016).

En ambos modelos, ya sea de ligadura o transección del nervio, el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  promueve la generación de trenes de potenciales de acción de alta frecuencia, seguido de una disminución de la transmisión nociceptiva debido a la falta de inervación sensorial (Ma y cols., 2003; Djouhri y cols., 2012; Gemes y cols., 2013). Se ha reportado que la disminución en la actividad eléctrica de las neuronas promueve un ambiente apto para la regeneración celular (McNeil y Steinhardt, 2003).

### *1.3.3 Contribución de los nervios no lesionados al dolor neuropático*

Para el estudio del dolor neuropático se ha utilizado ampliamente un modelo en ratas que consiste en lesionar el nervio ciático o algunas de sus ramificaciones. El nervio ciático inerva las patas de la rata y éstas son accesibles para la medición de la conducta nociceptiva (Bennet y Xie, 1988; Kim y Chung, 1992; Decostered y Woolf, 2000). En la rata, las raíces nerviosas que emergen de los segmentos lumbares L4 y L5 componen el 98% del nervio ciático, mientras que la raíz dorsal de L6 contribuye muy poco a éste (Rigaud y cols., 2008).

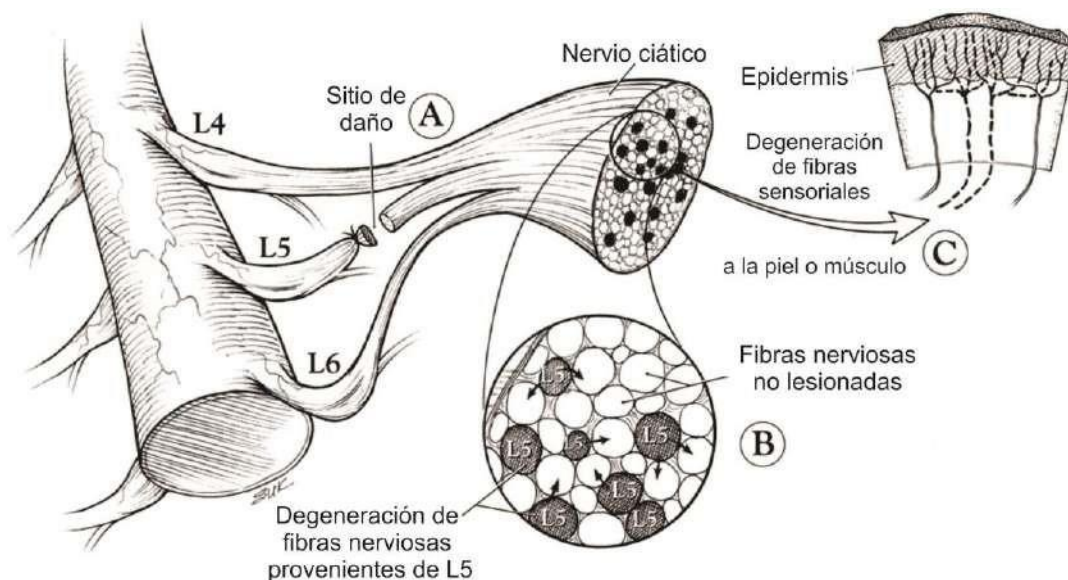
Uno de los modelos animales más utilizados para el estudio del dolor neuropático es la lesión de los nervios espinales L5 y L6, dejando intacto el nervio espinal L4, ya que este último tiene aferencias principalmente motoras más que sensoriales (Kim y Chung, 1992).

En el modelo de dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5/L6 (LNE) se genera un neuroma en el sitio del daño, el cual se caracteriza por presentar un incremento en la expresión de canales iónicos que alteran la excitabilidad neuronal y produce descargas eléctricas ectópicas en las fibras aferentes primarias responsables de la generación del dolor espontáneo,

característico del dolor neuropático (Navarro y cols., 2007). Sin embargo, se ha observado que después de la lesión del nervio L5, el nervio adyacente L4 no lesionado presenta potenciales de acción espontáneos (Djoughri y cols., 2012; Gemes y cols., 2013).

El incremento en la actividad eléctrica del GRD L4 se explica en parte por un aumento en la expresión de canales Nav y Cav, y de receptores de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) y de anquirina 1 (TRPA1), cuya activación puede generar descargas eléctricas espontáneas durante el dolor neuropático (Fukuoka y cols., 2001, 2002, 2012; Djoughri y cols., 2006, 2012). De hecho, se ha propuesto que el nervio espinal L4 presenta una serie de cambios moleculares producidos por la lesión del GRD L5 que inducen la rearborización y que permiten establecer contactos sinápticos que modifican el procesamiento sensorial (Gold, 2000; Wu y cols., 2001; Hu y cols., 2004; Shortland y cols., 2006).

Se ha especulado que la acción de las citocinas proinflamatorias liberadas de los axones degenerados que se encuentran en contacto con los axones no lesionados a nivel del nervio ciático (Fig. 5), o bien, que las citocinas liberadas de las células no



**Figura 5.** Lesión del nervio espinal L5. La ligadura o transección del GRD L5 (A) induce la degeneración del axón periférico en el nervio ciático. La liberación de mediadores proinflamatorios de las fibras lesionadas puede afectar el funcionamiento de las fibras no lesionadas adyacentes (B, C). Tomado de Ringkamp y Meyer, 2005.

neuronales tales como células de Schwann y células del sistema inmune provocan los cambios que se han observado en el nervio L4 no lesionado. Esas citocinas inducen cambios en la expresión génica que modifican el fenotipo de las neuronas no dañadas (Ma y cols., 2003).

## 1.4 Respuestas nociceptivas mediadas por Cl<sup>-</sup>

### 1.4.1 Regulación del Cl<sup>-</sup> por los cotransportadores NKCC1 y KCC2

El cloruro (Cl<sup>-</sup>) es el anión más abundante en el organismo. El transporte de Cl<sup>-</sup> a través de la membrana juega un papel fundamental en la regulación del volumen celular, el transporte transepitelial, la contracción muscular y la excitabilidad neuronal (Verkman y Galletta, 2009).

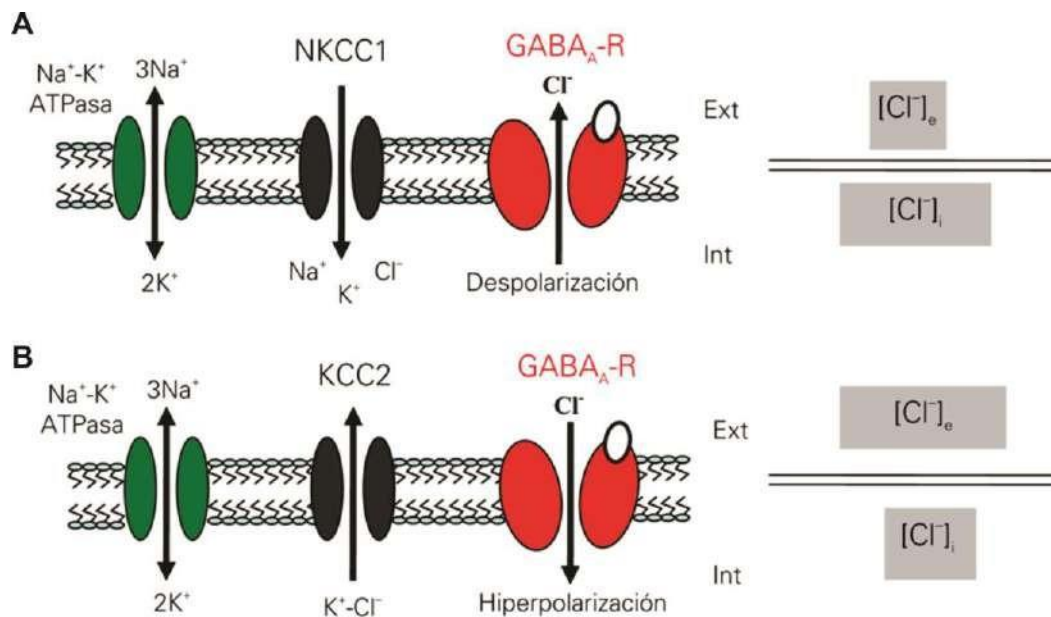
Los cotransportadores catión-cloruro son glucoproteínas que se encargan del transporte del anión a través de la membrana celular. Los cotransportadores de K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> (KCC) y los cotransportadores de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (NKCC) están involucrados en el transporte de Cl<sup>-</sup> en las neuronas, sin ningún efecto sobre el potencial de membrana, debido a que la estequiometría del transporte de los iones es electroneutra.

El cotransportador KCC2 se encarga de disminuir las concentraciones intracelulares de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>; mientras que el cotransportador NKCC1 incrementa las concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. La expresión predominante de alguno de los dos tipos de cotransportadores mencionados genera una determinada concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>). Por lo tanto, la actividad de NKCC1 y KCC2 es importante para determinar el potencial de equilibrio de Cl<sup>-</sup> ( $E_{Cl}$ ) y por consiguiente si la activación de los receptores o canales iónicos permeables a Cl<sup>-</sup>, como por ejemplo el receptor GABA<sub>A</sub>, despolariza o hiperpolariza a la neurona (Price y cols., 2005; Cortes-Romero y cols., 2011).

Durante el desarrollo embrionario, la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central expresan al cotransportador NKCC1, lo que conduce a un incremento de la [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> y, por ello, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> se traduce en una respuesta excitadora (Fig. 6A). Conforme el sistema nervioso madura, la expresión del cotransportador KCC2 se incrementa, la [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> disminuye y el  $E_{Cl}$  está cercano al

potencial de membrana en reposo, el cual es de alrededor de -60 a -80 mV. Por ello la neurotransmisión GABAérgica en el sistema nervioso maduro se torna inhibitoria (Fig. 6B) (Sung y cols., 2000).

Las neuronas del GRD mantienen la expresión del cotransportador NKCC1 desde el desarrollo embrionario hasta la adultez y por consiguiente el  $E_{Cl}$  se ubica entre los -30 a -40 mV y la  $[Cl^-]_i$  es aproximadamente de 30 mM (Kaneko y cols., 2002; Rocha-González y cols., 2008). Bajo estas condiciones, la activación de canales permeables a  $Cl^-$  permite la salida del anión y en consecuencia se produce la despolarización de la membrana plasmática (Kaneko y cols., 2002).



**Figura 6.** Regulación de las concentraciones de  $Cl^-$ . A) El cotransportador NKCC1 introduce un ion  $Cl^-$  a la célula utilizando el gradiente de  $Na^+$  mantenido por la bomba de  $Na^+-K^+-ATPasa$ . Tras la activación del receptor GABA por su ligando, la salida del  $Cl^-$  del canal favorece la despolarización de la membrana. B) Durante el desarrollo embrionario, la alta expresión de KCC2 sustituye a la de NKCC1, por lo que la concentración de cloro extracelular es mayor con respecto al interior de la célula. Bajo estas condiciones, la transmisión GABAérgica cambia de excitatoria a inhibitoria. Tomado de Cortes-Romero y cols., 2011.



#### 1.4.2 Reflejos de raíz dorsal

La estimulación de fibras mecanorreceptoras de bajo umbral activa neuronas de segundo orden en la médula espinal que permiten la percepción de estímulos táctiles. Bajo ciertas condiciones también se pueden activar fibras nociceptivas. La conexión entre neuronas mecanorreceptoras y nociceptivas está dada por interneuronas GABAérgicas que producen una despolarización en la aferente primaria A $\delta$  y C (conocida como PAD, por sus siglas en inglés) (Laird y cols., 2004). En condiciones normales, la PAD produce una inhibición presináptica que se expresa como una disminución de las sensaciones dolorosas. Esta disminución en la excitabilidad se debe a la menor conductancia de los canales Nav resistentes a tetrodotoxina, ya que éstos se inactivan lentamente durante la estimulación sostenida de baja intensidad (Blair y Bean, 2003). Sin embargo, frente a una lesión, los nociceptores que inervan la zona dañada están sensibilizados. Cuando los mecanorreceptores son estimulados y activan a las interneuronas GABAérgicas, los PAD son más intensos, a tal grado que despolarizan al nociceptor generando los reflejos de raíz dorsal (Cervero y Laird, 1996; Laird y cols., 2004). Estos reflejos tienen dos vías de propagarse a través de la fibra aferente primaria, una es de forma antidrómica hacia la periferia y otra ortodrómica que sigue la trayectoria hacia las vías ascendentes, produciendo el fenómeno de alodinia (Willis, 1999; Laird y cols., 2004).

Existen evidencias que apoyan la participación de los receptores GABA<sub>A</sub> en la generación de los PAD; sin embargo, se ha encontrado que los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (CaCC) pueden ser otro mecanismo que participe en este fenómeno excitador (Cho y cols., 2012; Boudes y Scamps, 2012).

#### 1.5 Canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (CaCC)

Los canales de Cl<sup>-</sup> son proteínas de membrana que se encargan del transporte del anión a través de la membrana, dependiendo del potencial de membrana y del gradiente electroquímico de Cl<sup>-</sup>. Estos canales están divididos en cinco grupos con base en el tipo de regulación de su función (Verkman y Galiotta, 2009):

- Canales dependientes de ligando; en éstos se incluyen a los receptores a GABA y a glicina.
- Canales reguladores de volumen, como los canales VRAC (canal de aniones regulador de volumen).
- Canales dependientes de voltaje (CICC).
- Canales activados por fosforilación vía AMPc, como los canales CFTR (reguladores de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística).
- Canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (CaCC)

Los canales CaCC se activan por un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que va de 0.1 a 1  $\mu$ M. El Ca<sup>2+</sup> puede provenir del medio extracelular a través de la apertura de canales iónicos permeables a este catión o bien de su liberación de depósitos intracelulares. La activación de los CaCC por Ca<sup>2+</sup> se da por dos mecanismos, uno resulta de la unión directa del catión a un sitio específico del canal y otro está mediado por la activación de enzimas dependientes de Ca<sup>2+</sup> que fosforilan al canal (Hartzell y cols., 2005). Los canales CaCC resultan importantes desde el punto de vista sensorial, ya que participan en la transducción y transmisión de señales en diversos sistemas sensoriales (Boudes y Scamps, 2012), incluyendo su participación en el procesamiento del dolor inflamatorio y neuropático tanto del canal anoctamina-1 (Ano1) como de bestrofina-1 (Best1) (Cho y cols., 2012; García y cols., 2014; Pineda-Farias y cols., 2015).

A pesar de que los canales CaCC se han caracterizado funcionalmente desde hace tres décadas (Barish, 1983), la identificación molecular de los miembros que pertenecen a esta familia ha sido controvertida. Las bestrofinas fueron los primeros canales CaCC en clasificarse dentro de la familia (Sun y cols., 2002; Tsunenari y cols., 2003). Las bestrofinas se expresan en la mayoría de las células epiteliales de tejidos secretores y en neuronas del GRD.

Las anoctaminas son canales de Cl<sup>-</sup> que también pertenecen a la familia de canales CaCC (Yang y cols., 2008). Éstas se expresan en neuronas del GRD y participan en la transducción sensorial (Cho y cols., 2012). Por último, los canales Tweety (Ttyh) y



El canal Ano1 presenta un sitio de unión en la región amino terminal para la calcio-calmodulina (CaM) llamado CaM-BD1, pero la CaM no es esencial para su activación. El asa intracelular entre los segmentos TM2 y TM3 de Ano1 es el sensor de  $Ca^{2+}$ . Este sitio tiene una secuencia rica en aminoácidos cargados negativamente, como el glutamato, y la delección de residuos en esta secuencia altera su sensibilidad a  $Ca^{2+}$  (Duran y Hartzell, 2011). La región entre los segmentos TM6 y TM7 contiene aminoácidos cargados positivamente que están altamente conservados en la mayoría de las isoformas del canal, por eso se ha determinado que es importante para la formación del poro del canal. La mutación de los aminoácidos que conforman esta región reduce la permeabilidad aniónica del canal (Yang y cols., 2008).

### 1.5.2 Bestrofinas

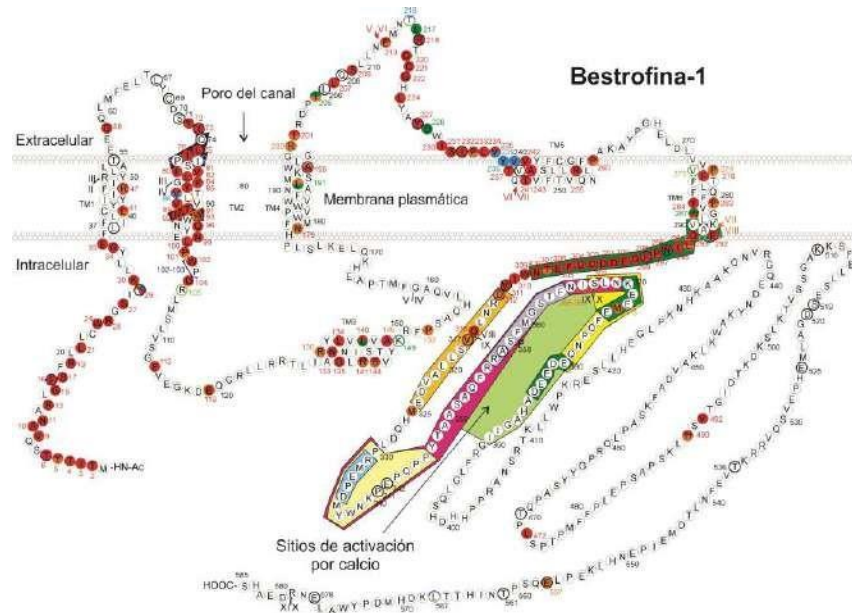
Las bestrofinas son canales de  $Cl^-$  activados por  $Ca^{2+}$  que se descubrieron al hallar el gen causante de la distrofia macular viteliforme de Best (Sun y cols., 2002), una patología que se caracteriza por la pérdida progresiva de la visión, disminución del pico luminoso en el electro-oculograma (el pico refleja la despolarización de la lámina basal del epitelio pigmentario de retina) y cúmulos de lipofucsina en el epitelio pigmentario de la retina y entre los fotorreceptores (Hartzell y cols., 2008).

Hasta ahora se han identificado cuatro genes en humanos (*hBEST1-4*) que codifican para los cuatro miembros de la familia de canales de bestrofina (Best1-4), siendo Best1 y Best2 los más estudiados, ya que los transcritos de los genes *hBest3* y *hBest4* son casi indetectables en la mayoría de los tejidos (Tsunenari y cols., 2003; Hartzell y cols., 2008).

Los canales Best1 poseen 6 segmentos TM (Fig. 8) (Tsunenari y cols., 2003; Milenkovic y cols., 2007). La región TM2 está altamente conservada y es crítica para la función del canal ya que forma el poro del mismo. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la selectividad aniónica está determinada en esta región (Hartzell y cols., 2008).

El canal Best1 se activa por la unión directa de  $Ca^{2+}$  a un sitio localizado en la región C terminal, cuya secuencia de aminoácidos es muy similar al tazón de  $Ca^{2+}$  de los

canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de alta conductancia (BK). También se ha descrito que Best1 se activa al ser fosforilado por la cinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina (CaMkII) (Hartzell y cols., 2008).



**Figura 8.** Estructura del canal bestrofina-1. En la imagen se muestra la secuencia de aminoácidos y los sitios de activación por  $Ca^{2+}$  en la región C-terminal. Modificado de Tsunenari y cols., 2003.

### 1.5.3 Participación de los CaCC en la generación de respuestas nociceptivas

Se ha demostrado que los canales CaCC participan en el procesamiento del dolor. La transección del nervio ciático aumenta la corriente de  $Cl^-$  dependiente de  $Ca^{2+}$  en neuronas del GRD de tamaño mediano y grande, posiblemente por un incremento en el número de canales CaCC expresados en estas neuronas (André y cols., 2003). De hecho, se ha descrito que el canal Best1 se expresa en neuronas mielinizadas del GRD (André y cols., 2003).

También se ha sugerido que el canal Best1 participa en la regeneración neuronal. Estudios del silenciamiento de la expresión del canal Best1 mediante el uso de un ARN de interferencia (ARNi) o la ausencia de este canal en ratones knock-out indican que el canal Best1 tienen un papel importante en la velocidad de crecimiento de las

neuritas en células del GRD en cultivo obtenidas de animales con transección del nervio (Boudes y cols., 2009).

Por otra parte, en el GRD el canal Ano1 se expresa principalmente en neuronas sensoriales de diámetro pequeño. La disminución de la expresión de Ano1 mediante el uso de un ARNi aumenta el tiempo de latencia de retirada de la cola en un modelo de dolor térmico en ratón, lo que se traduce como un efecto antinociceptivo (Cho y cols., 2012).

Por otro lado, el bloqueo de los canales Ano1 y Best1 mediante el uso de un bloqueador selectivo de canales CaCC, el CaCC<sub>inh-A01</sub>, reduce las conductas de alodinia e hiperalgesia inducidas por la inyección de formalina, lo que indica el papel pronociceptivo de los canales CaCC. Aunado a esto, la expresión del canal Ano1 aumenta en el modelo de dolor inflamatorio crónico inducido por la inyección de formalina al 1% en el dorso de la pata, lo que sugiere que Ano1 participa en el mantenimiento de las conductas nociceptivas en el dolor inflamatorio crónico (García y cols., 2014).

En el dolor neuropático inducido por la LNE, la administración intratecal (i.t.) de una sola dosis del bloqueador de los canales CaCC, el CaCC<sub>inh-A01</sub>, y del bloqueador selectivo para el canal Ano1, el T16A<sub>inh-A01</sub>, disminuye la expresión de Ano1 en el GRD y disminuye la conducta de alodinia inducida por la lesión del nervio (Pineda-Farias y cols., 2015).

Por otra parte, se ha descrito que el canal Ano1 contribuye en la excitabilidad de las neuronas del GRD, ya que reduce la reobase o el umbral para inducir el disparo del primer potencial de acción (Lee y cols., 2014). Estos datos muestran un papel importante del canal Ano1 en la transducción de estímulos nocivos.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los canales CaCC se expresan en neuronas del GRD y están implicados en la transducción y transmisión de señales en sistemas sensoriales. Se sabe que el canal Ano1 se relaciona con el procesamiento de estímulos nociceptivos y que su expresión aumenta en procesos dolorosos, tanto de tipo inflamatorio como neuropático. Por otra parte, la corriente mediada por el canal Best1 aumenta en las neuronas de animales con transección del nervio ciático, pero poco se sabe acerca de su participación en el procesamiento del dolor.

A pesar de estas evidencias no se cuenta con un estudio a detalle que determine la participación de los canales Ano1 y Best1 en el dolor neuropático inducido por la ligadura o la transección de los nervios espinales L5/L6. Además, no se sabe si la lesión de los nervios espinales L5 y L6 es capaz de inducir cambios en la expresión de los canales Ano1 y Best1 en el nervio espinal adyacente L4 no lesionado.

El uso de estrategias experimentales que posibiliten bloquear la función del canal Ano1 e incrementar la expresión del canal Best1 permitiría estudiar su participación en diferentes modelos de dolor neuropático como la LNE y la TNE.

## 3. HIPÓTESIS

1. Los canales Ano1 y Best1 tendrán un aumento de su expresión en los GRD L5/L6 lesionados que dependerá del tipo de daño inducido por la ligadura o la transección del nervio.
2. La lesión en el nervio espinal L5 modificará el patrón de expresión de proteínas de los canales Ano1 y Best1 en el nervio espinal L4 no lesionado.

## 4. OBJETIVOS

1. Determinar la participación en la transmisión del dolor de los canales Ano1 y Best1 en los modelos de dolor neuropático de LNE y TNE mediante su evaluación farmacológica y molecular.
2. Evaluar los cambios producidos por la LNE o la TNE en la expresión de los marcadores de daño neuronal (ATF3 y caspasa-3) y de regeneración neuronal (GAP43) en los nervios espinales L5/L6 lesionados, así como en el nervio L4 no lesionado.

### 4.1 Objetivos particulares

- Determinar la expresión de las proteínas Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en neuronas del GRD de animales con LNE o TNE.
- Evaluar el efecto del bloqueo del canal Ano1 sobre el desarrollo de la alodinia mecánica y la expresión de las proteínas Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en los nervios espinales L5/L6 lesionados y en el nervio L4 no lesionado de ratas con LNE o TNE.
- Evaluar el efecto del bloqueo del canal Best1 en el desarrollo de la alodinia mecánica y la expresión de las proteínas Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en los nervios espinales L5/L6 lesionados y en el nervio L4 no lesionado de ratas con LNE o TNE.
- Evaluar los cambios en el umbral de retiro de la pata ante un estímulo mecánico de ratas naïve en las que se sobreexpresó el canal Best1.
- Evaluar el efecto del bloqueo del canal Best1 sobre el desarrollo de la alodinia mecánica y la expresión de las proteínas Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en los nervios espinales L4, L5 y L6 de ratas en las que se sobreexpresó el canal Best1.



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 140-160 g de peso provenientes del bioterio Cinvestav, Sede Sur, acorde con el protocolo no. 0095-14 aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales del Laboratorio (CICUAL). Las ratas fueron alojadas en grupos de 6 por caja, con agua y alimento *ad libitum*, ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con temperatura y humedad controladas. Al término de los experimentos conductuales, los animales fueron sacrificados mediante la inhalación de CO<sub>2</sub>. El manejo de los animales se realizó de acuerdo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio contenidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

### 5.2 Ligadura y transección de los nervios espinales (LNE y TNE)

La cirugía para la ligadura de los nervios espinales se desarrolló de acuerdo con el método descrito por Kim y Chung (1992). Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilazina (50 y 10 mg/Kg respectivamente) por vía i. p. Posteriormente se realizó una incisión en el dorso y se expuso la columna vertebral; se retiró el foramen transverso y se ligaron los nervios L5 y L6 del lado izquierdo con sutura de seda 6-0. Para la transección, se ligó el nervio L5 y se realizó un corte a 3 mm distales a la ligadura (Liu y cols., 2000). Para el grupo de ratas falsamente operadas o sham se realizó la cirugía y los nervios se expusieron, pero no fueron lesionados.

### 5.3 Evaluación de la conducta nociceptiva

Los animales se colocaron en cajas de acrílico con fondo de malla metálica y se permitió su ambientación 30 min previos a la evaluación. Posteriormente, el umbral de retiro de la pata se determinó mediante el método *up and down* (Chaplan y cols., 1994), el cual consiste en utilizar una serie de filamentos de von Frey calibrados para evaluar la sensibilidad mecánica a diferentes grados de presión aplicada con los filamentos. La evaluación se inició con el filamento de 4.31 g y se estimuló durante 10 s la superficie plantar de los animales; el calibre del filamento aumentó o disminuyó según la respuesta del animal. Los patrones de respuesta de cada rata se utilizaron para calcular el 50% de umbral de retiro usando la fórmula siguiente:

$$50\% \text{ umbral (g)} = (10^{[Xf + \kappa\delta]})/10,000$$

Donde:  $X_f$  es el valor del último filamento de von Frey utilizado;  $\kappa$  es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado con base al patrón de respuestas positivas y negativas;  $\delta$  es la diferencia de promedio entre estímulos (Dixon, 1980; Chaplan y cols., 1994).

El 50% del umbral de retiro se define como la intensidad de estímulo que se requiere para provocar una respuesta en el 50% de las aplicaciones para cada animal.

### 5.4 Amplificación y detección del plásmido pCMV6-Best1

#### 5.4.1 Transformación de bacterias

Se utilizó el plásmido pCMV6-Best1 (de 6,531 kb, OriGene), el cual contiene la secuencia que codifica para el canal Best1. Para la amplificación del plásmido pCMV6-Best1 o del plásmido control (vector pcDNA sin la secuencia del canal Best1) se transformaron bacterias de *Escherichia coli* (One Shot TOP10, Invitrogen) por choque térmico. 50  $\mu$ l de bacterias se incubaron con 10 ng del pCMV6-Best1 o del vector control en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó el choque térmico a 42°C por 30 s. Inmediatamente después, las bacterias se colocaron en hielo y se adicionaron 100  $\mu$ l de medio SOC (Invitrogen) precalentado a 42°C. Las bacterias se incubaron a 37°C en agitación constante durante 1h, después se sembraron en

placas de agar con medio Luria Bertani (LB) y kanamicina (25 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se tomaron 2 colonias aisladas de bacterias para crecerlas en medio LB líquido adicionado con kanamicina (25 µg/ml) durante 16 h a 37°C y a 220 rpm para la purificación del plásmido.

#### 5.4.2 Aislamiento y purificación del plásmido (*miniprep* o *maxiprep*)

Para aislar y purificar el pCMV6-Best1 y el plásmido control a partir de bacterias transformadas y crecidas en medio líquido LB se utilizó el método de *miniprep* (QIAprep Spin Miniprep kit, QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez identificadas las colonias de bacterias que contenían el plásmido pCMV6-Best1 y el plásmido control, se utilizó el método de *maxiprep* (Plasmid Maxi kit, QIAGEN) para la obtención del plásmido a gran escala. La concentración del ADN plasmídico y su grado de pureza se determinó por su absorbancia a 260 nm y por el cociente de la absorbancia entre 260/280 nm, respectivamente.

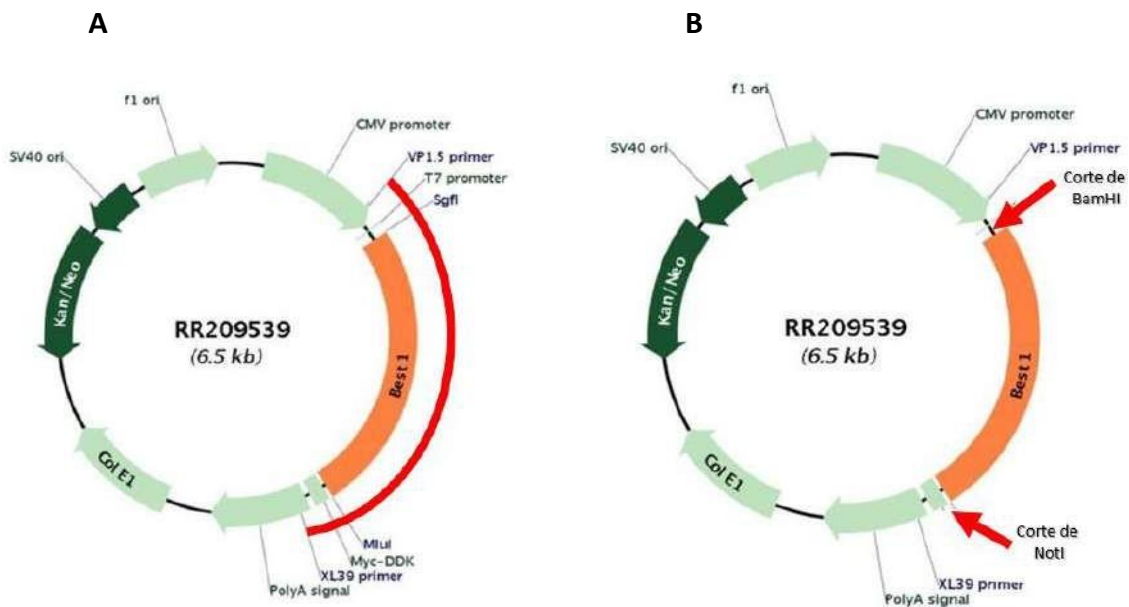
#### 5.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final

Para la identificación del plásmido pCMV6-Best1 se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los *primers* VP1.5 (cadena sentido 5' GGACTTTCCAAAATGTCTG 3') y XL39 (cadena anti-sentido 5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3'), con los cuales se obtuvo un producto de 2,059 pb (Fig. 9A). La mezcla de reacción para la amplificación consistió en 36.5 µl de agua desionizada estéril, 5 µl de 10X DreamTaq Buffer, 5 µl de la mezcla de desoxinucleótidos, 1 µl del primer sentido VP1.5, 1 µl del primer antisentido XL39, 1 µl del plásmido pCMV6-Best1 o agua (control negativo) y 0.5 µl de DreamTaq ADN polimerasa, en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción se colocó en el termociclador (Mastercycler, Eppendorf) y se sometió a un ciclo inicial de 95°C por 3 min. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, 30 s de alineamiento a 55°C y 1 min de extensión a 72°C. Al término de la reacción las muestras se mantuvieron a 4°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La detección de las bandas de ADN se realizó mediante

fluorescencia con bromuro de etidio y las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el equipo Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ System (Bio Rad).

#### 5.4.4 Digestión del plásmido pCMV6-Best1 por enzimas de restricción

El plásmido pCMV6-Best1 se digirió con las enzimas de restricción BamHI y NotI que cortan en los sitios 993 y 2,689 respectivamente, para dar dos fragmentos de 1,695 y de 4,836 pb (Fig. 9B). La reacción de digestión consistió en colocar 500 ng del plásmido pCMV6-Best1, 1.5 µl de albúmina de suero bovino (100X), 1.5 µl de amortiguador 3 (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1mM, pH 7.9), 20 U de BamHI y 10 U de NotI. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 3 h. Al término se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. La detección de las bandas de ADN se realizó mediante fluorescencia con bromuro de etidio y se analizaron las imágenes obtenidas utilizando el equipo Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ System (Bio Rad).



**Figura 9.** Secuencia del plásmido pCMV6-Best1. A) La línea roja indica la secuencia amplificada por PCR de los primers VP1.5 y XL39. B) Las flechas en rojo indican los sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI (sitio 993) y NotI (sitio 2,689).

## 5.5 Fármacos

El bloqueador selectivo de los canales CaCC, el ácido 6-(1,1-dimetiletil)-2-[(2-furanilcarbonil)amino]-4,5,6,7-tetrahidro-benzo[b]tiofeno-3-carboxílico (CaCC<sub>inh-A01</sub>), se obtuvo de Merck Millipore (Billerica, MA, EUA). El bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> (2-[(5-etil-1,6-dihidro-4-metil-6-oxo-2-pirimidinil)tio]-N-[4-(4-metoxifenil)-2-tiazolil]acetamida) se obtuvo de Tocris Bioscience (Avon, Bristol, UK) y el bloqueador MONNA (ácido N-((4-Metoxi)-2-naftil)-5-nitroantranílico) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, Misuri). La gabapentina (ácido 1-(aminometil)-ciclohexanoacético; Merck México, S.A., Naucalpan) fue un obsequio del Dr. Vinicio Granados Soto. El bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%. Los bloqueadores CaCC<sub>inh-A01</sub> y MONNA, así como la gabapentina, se disolvieron en DMSO al 15%.

## 5.6 Administración intratecal

Los animales fueron anestesiados brevemente con isofluorano para realizar la administración intratecal (i.t.) de 10 µl de los fármacos con una aguja de 30G que se introdujo en el foramen vertebral, entre las vértebras L4 y L5.

En el caso de la administración i.t. del plásmido pCMV6-Best1 o del plásmido control, se prepararon 10 µl de una mezcla de 10 µg de plásmido y lipofectamina (Invitrogen) a razón 1:1 y se incubó a 37°C durante 30 min. La administración i.t. del plásmido se realizó de la misma forma descrita previamente.

## 5.7 Inmunodetección mediante *Western blot*

### 5.7.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Los tejidos se homogenizaron en frío con amortiguador de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y Tritón X100 al 1%) que contenía inhibidores de proteasas (aprotinina 2 µg/µl, leupeptina 2 µg/µl, pepstatina 10 µg/µl y PMSF 100 mM). Las muestras se incubaron por 10 min a 4°C y se centrifugaron por 10 min a

17,135 xg para obtener el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (BioRad).

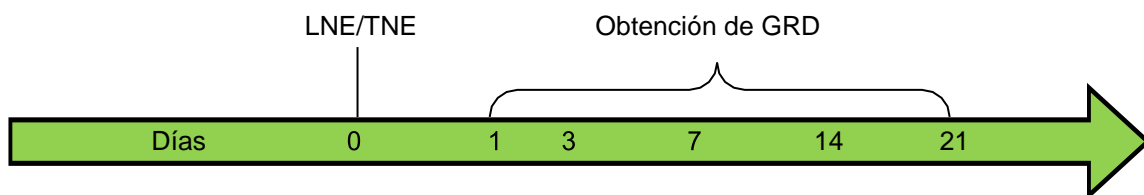
### 5.7.2 Western Blot

Se utilizaron 40 µg de proteína total para realizar la electroforesis en un gel desnaturizante de SDS-poliacrilamida al 12%. Posteriormente se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) la cual se bloqueó con 5% de leche descremada en amortiguador de fosfatos (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) y 0.1% de Tween 20 (PBS-T) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se incubó por 2 h con el anticuerpo primario para Ano1 (1:200; Cat. ACL-011, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), Best1 (1:500; Cat. ABC-001, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), ATF3 (1:300; Cat. cc-188, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), GAP43 (1:2000; Cat. ab16053, Abcam, Cambridge, Massachusetts) o caspasa-3 (1:1000; Cat. 9662, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) en PBS-T. Al término de la incubación, se hicieron tres lavados de 10 min cada uno con leche al 1% en PBS-T. Todos los anticuerpos primarios se obtuvieron en conejo, por lo que el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano (1:3000; Cat. sc-2370, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) se incubó durante 1 h y se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con leche al 1% en PBS-T. La inmunodetección de las proteínas de interés se realizó mediante quimioluminiscencia (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Billerica, MA) y las imágenes obtenidas se analizaron con el equipo C-Digit (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) para cuantificar la densidad óptica de la señal. Como control de carga se utilizó la proteína β-actina obtenida de ratón (1:5000; Cat. MAB1501R, Millipore, Billerica, MA) y el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10000; Cat. 115-035-003, Jackson Immuno Research, West Grove, PA).

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.1 Curso temporal de expresión de proteínas

Para determinar el curso temporal de la expresión de los canales Ano1 y Best1, así como del marcador de daño neuronal ATF3, de apoptosis caspasa-3 y de regeneración GAP43 mediante *Western blot*, se obtuvieron los GRD de los nervios L5/L6 lesionados y del nervio L4 no lesionado los días 1, 3, 7, 14 y 21 posteriores a la LNE o la TNE (Fig. 10). También se obtuvieron los GRD L4 y L5 del lado contralateral a la lesión los días 3, 7 y 14 después de la LNE o la TNE. Cada GRD se obtuvo por separado y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso

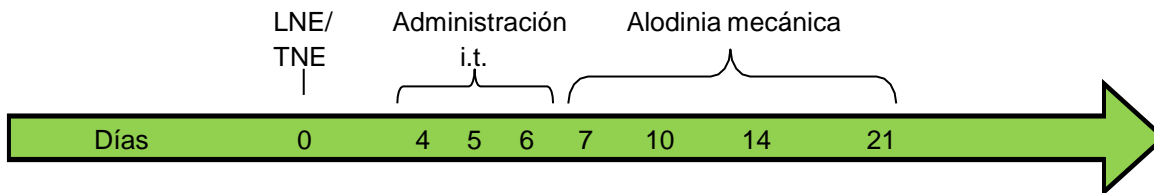


**Figura 10.** Diseño experimental 1. Curso temporal para la obtención de los GRD de ratas con LNE y TNE.

### 6.2 Evaluación del efecto del bloqueo de Ano1 en la alodinia mecánica en ratas neuropáticas

Los bloqueadores de los canales Ano1, T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1, y 1  $\mu\text{g}$ ) o MONNA (1 y 10  $\mu\text{g}$ ), así como el vehículo (DMSO al 1% o 15%), se administraron de manera i.t. a las ratas con LNE o TNE cada 24 h, durante 3 días consecutivos. Posteriormente, la alodinia mecánica se evaluó mediante el método *up and down* a los 7, 10, 14 y 21 días después de la lesión de los nervios espinales (Fig. 11).

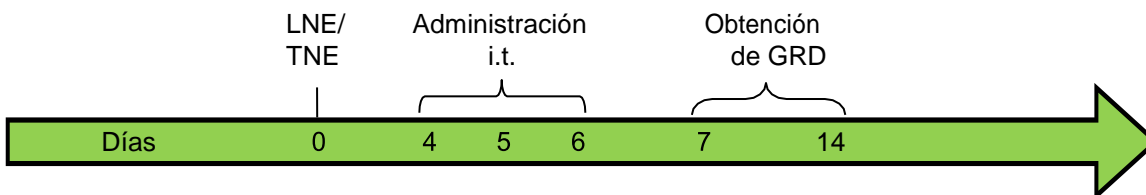
Cabe señalar que la dosis más grande de cada bloqueador se administró a ratas falsamente operadas (sham) bajo el mismo esquema.



**Figura 11.** Diseño experimental 2. Curso temporal del bloqueo farmacológico de Ano1 y de la evaluación de la alodinia mecánica en ratas con LNE o TNE.

### 6.3 Evaluación del efecto del bloqueo de Ano1 sobre la expresión de proteínas

Para determinar el efecto del bloqueo del canal Ano1 sobre la expresión de los canales Ano1 y Best1, así como de los marcadores ATF3, caspasa-3 y GAP43, se realizó la administración i.t. de los bloqueadores T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1 y 1 µg) o MONNA (1 y 10 µg), así como el vehículo (DMSO al 1% o 15%) cada 24 h, durante 3 días consecutivos (Fig. 12). Los GRD L4, L5 y L6 se obtuvieron por separado a los 7 y 14 días posteriores a la LNE o TNE. Las muestras se almacenaron a -70°C para posteriormente determinar la expresión de las proteínas mediante *Western blot*.



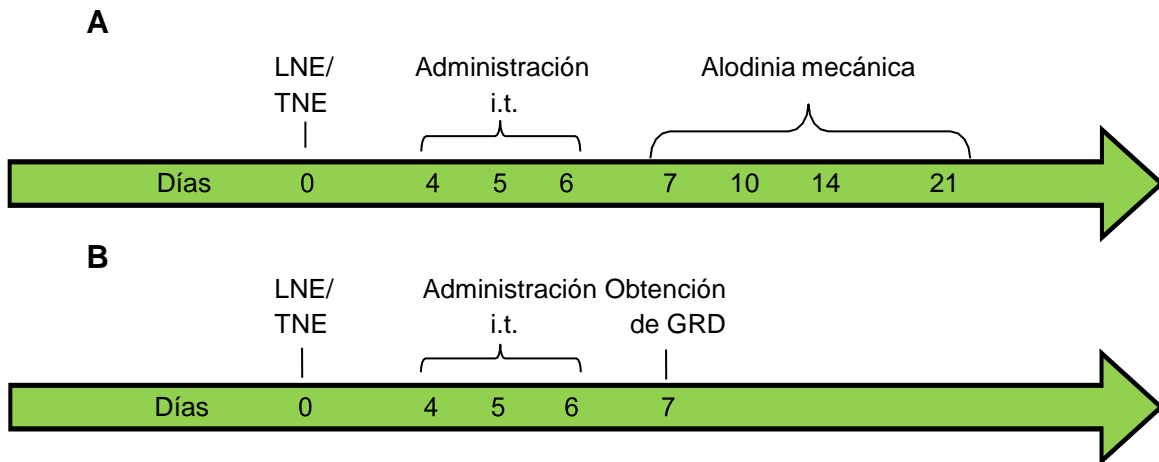
**Figura 12.** Diseño experimental 3. Bloqueo farmacológico de Ano1 sobre la expresión de las proteínas Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP3 en los GRD obtenidos de ratas con LNE o TNE.

### 6.4 Evaluación del efecto de la administración de gabapentina sobre la alodinia mecánica y la expresión de proteínas

A las ratas con LNE o TNE se les administró por vía i.t. 100 µg de gabapentina o el vehículo (DMSO al 15%) cada 24 h, durante 3 días consecutivos (Fig. 13A). Posteriormente, se determinó la presencia de alodinia mecánica mediante el método *up and down* los días 7, 10, 14 y 21 días después de la lesión de los nervios espinales.



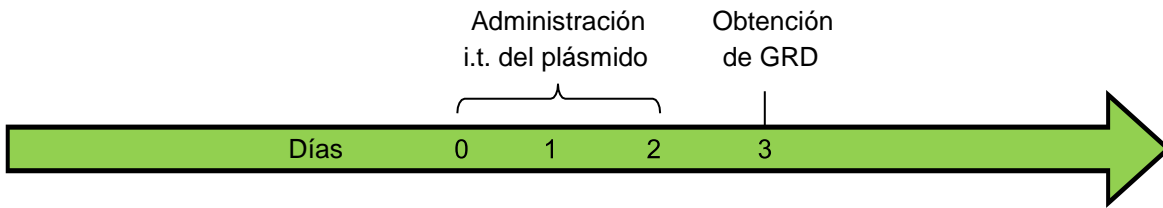
Para determinar el efecto de la administración de gabapentina sobre la expresión del canal Ano1, ATF3 y caspasa-3, se realizó el mismo protocolo de administración (Fig. 13B) y los GRD L4 y L5 se obtuvieron por separado 7 días después de la LNE o TNE. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriormente determinar la expresión de las proteínas por *Western blot*.



**Figura 13.** Diseño experimental 4. A) Curso temporal del efecto farmacológico de la administración de gabapentina sobre la alodinia mecánica en ratas neuropáticas. B) Obtención de los GRD de ratas neuropáticas administradas con gabapentina.

### 6.5 Inmunodetección de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve

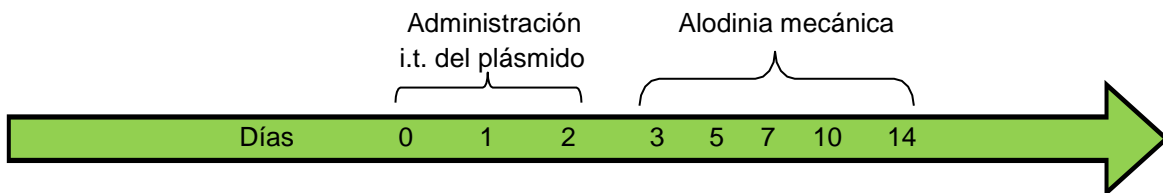
Para determinar si el canal Best1 se sobreexpresaba en los tejidos de nuestro interés, después de la administración del plásmido pCMV6-Best1 en ratas naïve, se realizó la administración i.t. de  $10\ \mu\text{g}$  de pCMV6-Best1 o el vector pcDNA en ratas naïve cada 24 h, durante 3 días consecutivos (Fig. 14). Los GRD L4, L5 y L6, así como la médula espinal dorsal y el nervio ciático se extrajeron 24 h después de la última administración. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para evaluar la expresión de Best1 mediante *Western blot*.



**Figura 14.** Diseño experimental 5. Administración de los plásmidos pCMV6-Best1 o pcDNA en ratas naïve y la obtención de muestras de los GRD.

## 6.6 Evaluación de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve sobre el desarrollo de la alodinia mecánica

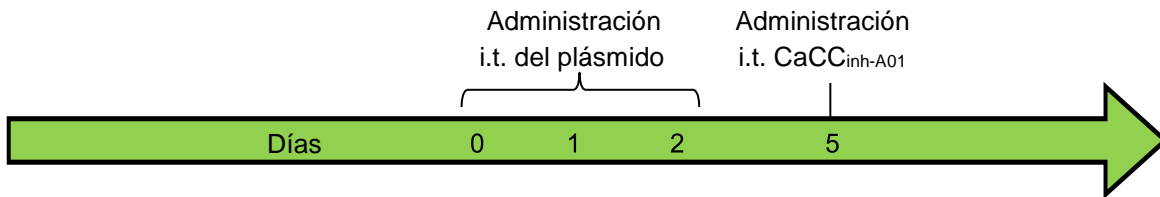
Para determinar el efecto de la sobreexpresión de Best1 sobre el umbral de retiro de la pata ante la estimulación mecánica, los plásmidos pCMV6-Best1 o pcDNA se administraron por vía i.t. (10 µg) cada 24 h, durante 3 días consecutivos. Posteriormente, se evaluó la presencia de alodinia mecánica mediante el método *up and down* a los días 3, 5, 7, 10 y 14 post-tratamiento (Fig. 15).



**Figura 15.** Diseño experimental 6. Curso temporal del efecto de la sobreexpresión de Best1 sobre el umbral de retiro de la pata en ratas naïve.

## 6.7 Evaluación del bloqueo de Best1 sobre la alodinia mecánica inducida por la sobreexpresión de Best1

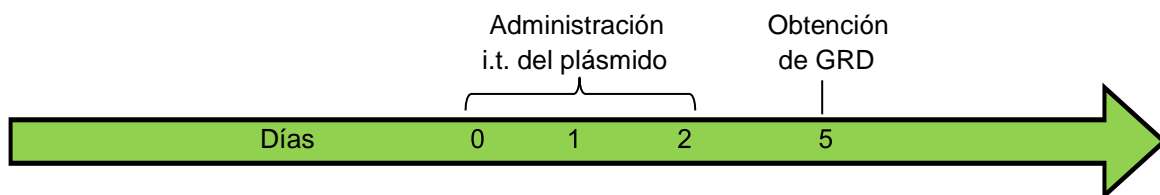
Para evaluar el efecto del bloqueo del canal Best1 sobreexpresado en ratas naïve, 5 días después del inicio de la administración del plásmido pCMV6-Best1 o pcDNA (10 µg i.t. cada 24 h durante 3 días), se administró de manera i.t. el bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> (1 y 10 µg). La presencia de alodinia mecánica se evaluó cada hora, durante 8 h mediante el método *up and down* (Fig. 16).



**Figura 16.** Diseño experimental 7. Sobreexpresión de Best1 en ratas naïve y evaluación del efecto del bloqueo farmacológico de Best1 sobre el desarrollo de la alodinia mecánica.

## 6.8 Evaluación de la sobreexpresión de Best1 sobre la expresión de proteínas

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de Best1 sobre la expresión de las proteínas de ATF3, caspasa-3 y GAP43, se realizó la administración i.t. del pCMV6-Best1 o pcDNA (10 µg) cada 24 h, durante 3 días consecutivos a ratas naïve. Los GRD L4, L5 y L6 se obtuvieron 5 días después del inicio de la administración de los plásmidos (Fig. 17), para el posterior análisis de expresión de proteínas mediante *Western blot*.

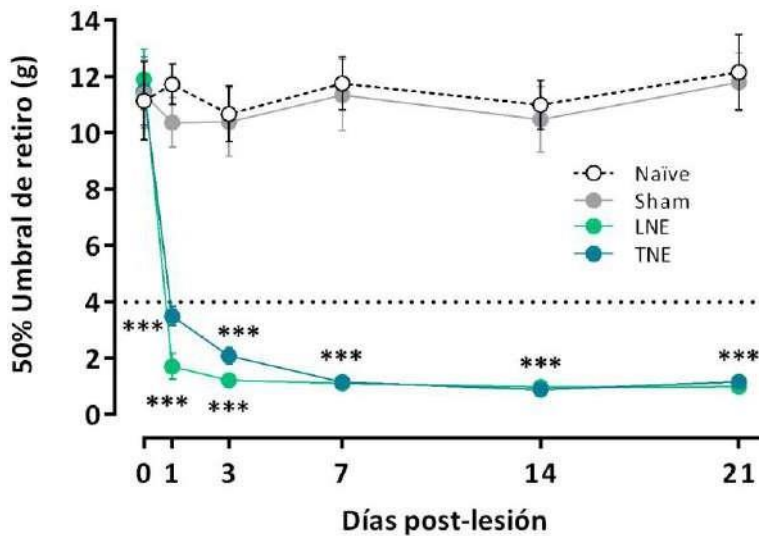


**Figura 17.** Diseño experimental 8. Obtención de los GRD de ratas naïve que sobreexpresaron Best1.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Estandarización de los modelos de LNE y TNE

La LNE y TNE redujeron el umbral de retiro de la pata de la rata por debajo de los 4 g desde el primer día después de la lesión y hasta por 21 días. Esto se interpretó como alodinia mecánica. Por otra parte, el grupo de ratas falsamente operadas (sham) no mostró cambios en el umbral de retiro de la pata comparado con el grupo de ratas naïve (Fig. 18).



**Figura 18.** Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la LNE o la TNE. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) ( $n = 6$ ). Prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls. \*\*\* $P < 0.01$  vs el grupo naïve.

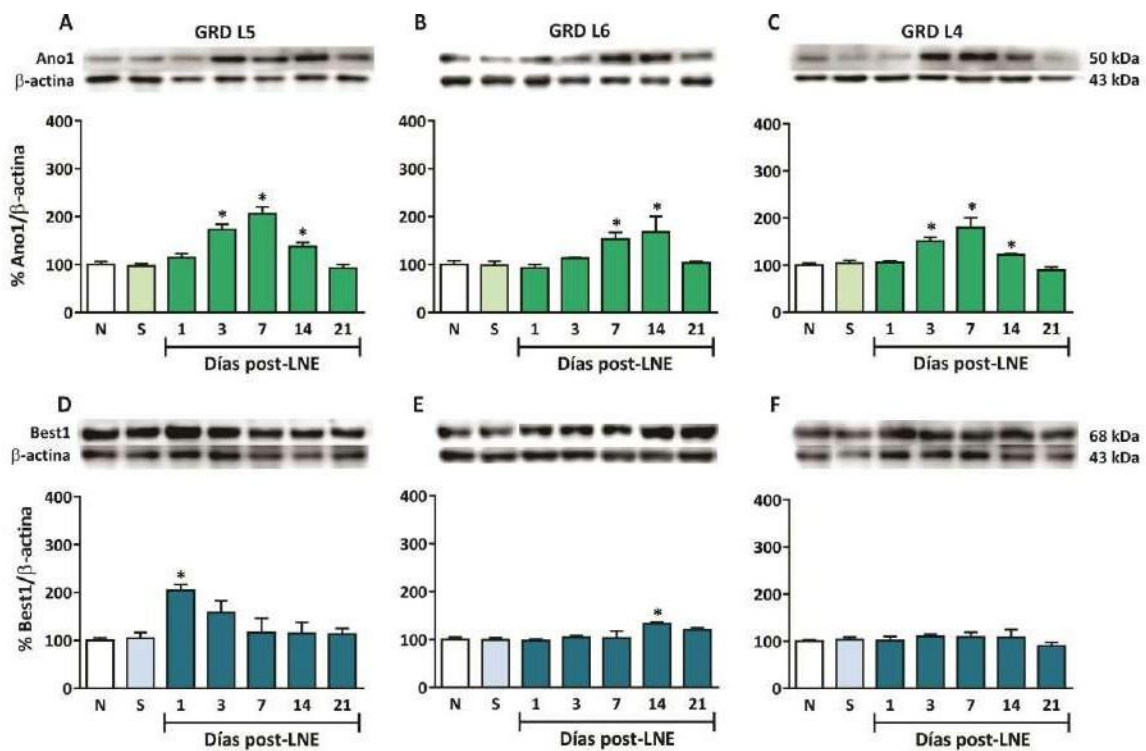
### 7.2 Efecto de la LNE o la TNE sobre la expresión de proteínas

#### 7.2.1 Efecto de la LNE sobre la expresión de *Ano1*, *Best1*, *ATF3*, *caspara-3* y *GAP43*

La LNE aumentó la expresión de *Ano1* en el GRD L5 tres días después de la ligadura y alcanzó un pico máximo de expresión al día 7 (Fig. 19A). La LNE aumentó la expresión de *Ano1* a los 7 y 14 días después de la lesión (Fig. 19B).

Por otra parte, la LNE incrementó la expresión del canal Best1 en el GRD L5 de manera significativa solo el primer día después de la lesión (Fig. 19D). La LNE aumentó la expresión de Best1 en el GRD L6 levemente al día 14 después de la ligadura del nervio (Fig. 19E).

La LNE aumentó la expresión de Ano1 en el GRD L4 al tercer día después de la lesión, con un pico máximo a los 7 días (Fig. 19C). En contraste, la LNE no produjo cambios en la expresión de Best1 en el GRD L4 (Fig. 19F).



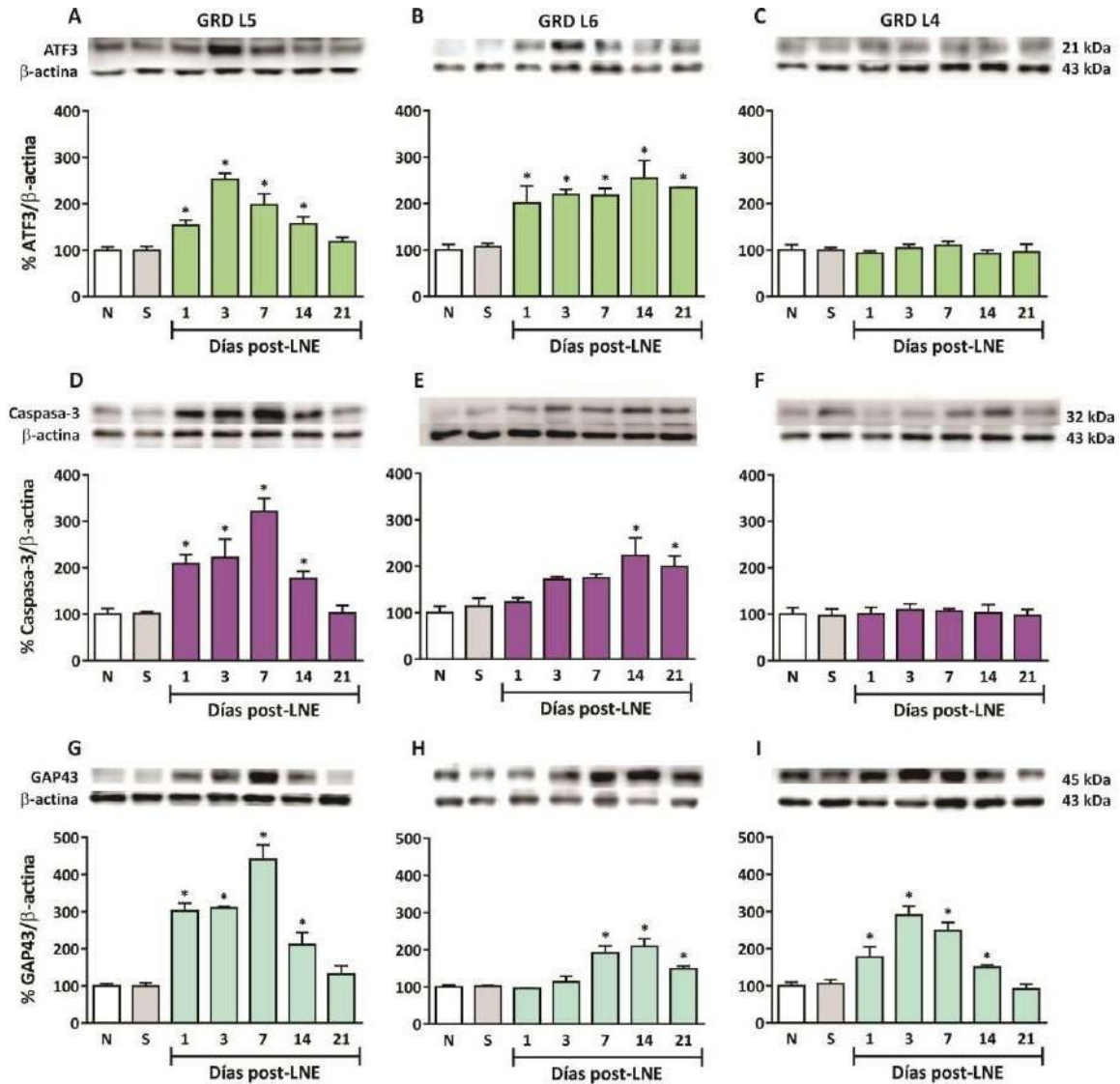
**Figura 19.** Curso temporal de expresión de Ano1 y Best1 después de la LNE. Curso temporal de la expresión de Ano1 (A-C) y Best1 (D-F) en los GRD L5 y L6 lesionados y L4 no lesionado después de la LNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 4$ ). N: naïve, S: sham. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. \* $P < 0.05$  vs el grupo N.

La LNE incrementó la expresión del marcador de daño neuronal ATF3 en el GRD L5 desde el primer día, con un pico máximo al día tres después de la lesión (Fig. 20A). Asimismo, la LNE aumentó la expresión de ATF3 en el GRD L6 desde el día 1 y se mantuvo hasta el día 21 después del daño al nervio (Fig. 20B). De igual manera, la LNE incrementó la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3 en el GRD L5 desde el día 1 hasta el día 14 después de la lesión, con un pico máximo de expresión al día 7 (Fig. 20D). La LNE aumentó la expresión de este marcador los días 14 y 21 después de la ligadura (Fig. 20E).

En cuanto al marcador de regeneración GAP43, la LNE aumentó su expresión en el GRD L5 desde el primer día después de la ligadura con un pico máximo al día 7 y regresó a condiciones basales al día 21 después de la lesión (Fig. 20G). En el GRD L6 la expresión de GAP43 aumentó al día 7 después de la ligadura y se mantuvo hasta el día 21 (Fig. 20H)

La LNE no modificó la expresión de ATF3 y de caspasa-3 en el GRD L4 no lesionado (Fig. 20C y 20F), indicando que el nervio L4 no sufrió daño. En contraste, la LNE aumentó la expresión de GAP43 desde el día 1 hasta el día 14 después de la lesión (Fig. 20I).

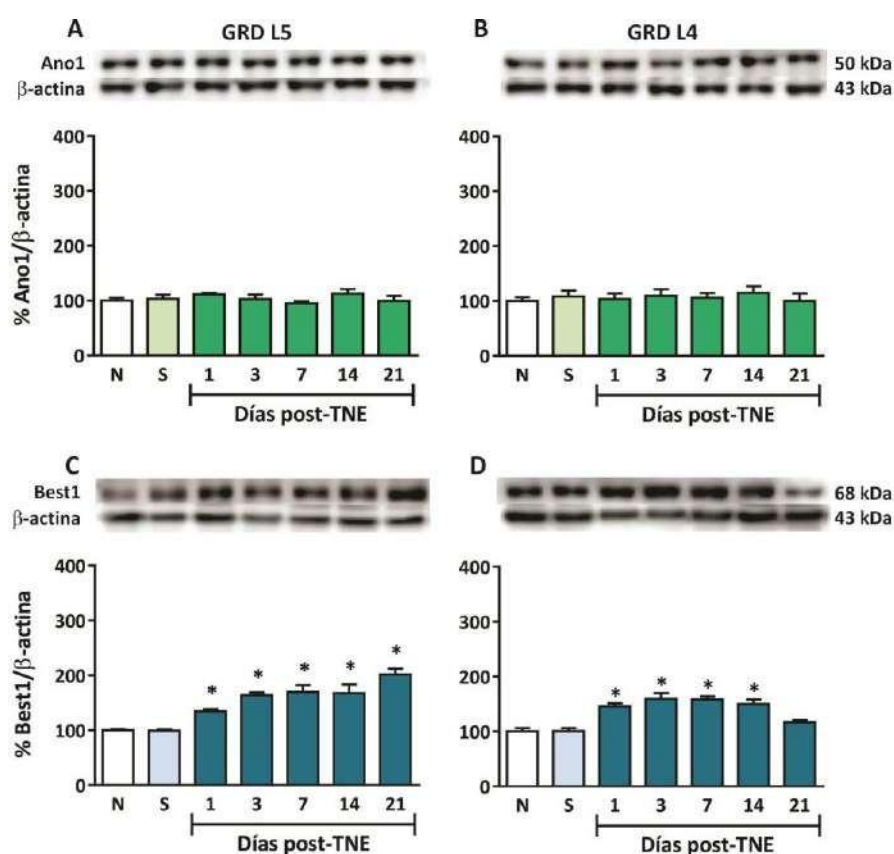
En todos los experimentos realizados no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ninguna de las proteínas analizadas entre el grupo naïve y el grupo sham (Fig. 19 y 20).



**Figura 20.** Curso temporal de expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 después de la LNE. Curso temporal de la expresión de ATF3 (A-C), caspasa-3 (D-F) y GAP43 (G-I) en los GRD L5 y L6 lesionados y L4 no lesionado después de la LNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 4$ ). N: naïve, S: sham. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. \* $P < 0.05$  vs el grupo N.

### 7.2.2 Efecto de la TNE sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43

La TNE no modificó la expresión de Ano1 en el GRD L5 lesionado (Fig. 21A). Sin embargo, en este mismo ganglio la TNE incrementó la expresión de Best1 desde el primer día y hasta el día 21 después de la lesión (Fig. 21C). En el caso del nervio espinal L4 no dañado, la TNE no modificó la expresión de Ano1 (Fig. 21B), pero la expresión de Best1 aumentó desde el primer día y se mantuvo hasta los 14 días después de la lesión (Fig. 21D).



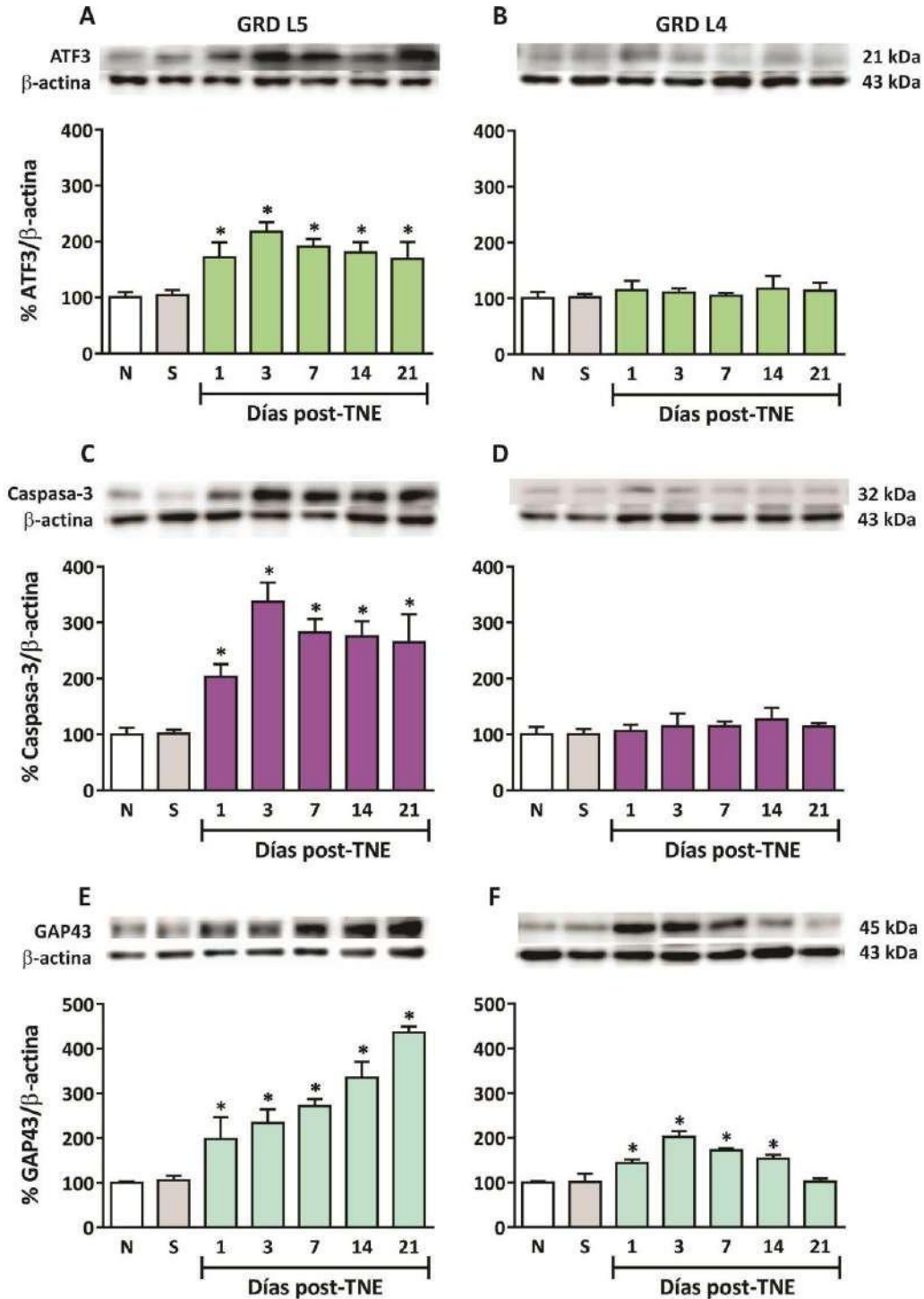
**Figura 21.** Curso temporal de expresión de Ano1 y Best1 después de la TNE. Curso temporal de la expresión de Ano1 (A, B) y Best1 (C, D) en el GRD L5 lesionado y L4 no lesionado después de la TNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 4$ ). N: naïve, S: sham. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. \* $P < 0.05$  vs el grupo N.



Por otra parte, la TNE aumentó la expresión de ATF3 y de caspasa-3 en el GRD L5 lesionado desde el día 1 hasta el día 21 (Fig. 22A y 22C). La TNE incrementó la expresión de GAP43 desde el primer día y alcanzó un pico máximo hasta los 21 días después de la lesión (Fig. 22E).

La TNE no modificó la expresión de ATF3 o de caspasa-3 en el GRD L4 no lesionado (Fig. 22B y 22D), indicando que el nervio L4 no sufrió daño. Sin embargo, la TNE sí aumentó la expresión de GAP43 desde el primer día y se mantuvo hasta los 14 días después de la transección (Fig. 22F). Al igual que en el modelo de LNE, la TNE no modificó la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en el grupo naïve y en el grupo sham (Fig. 21 y 22).

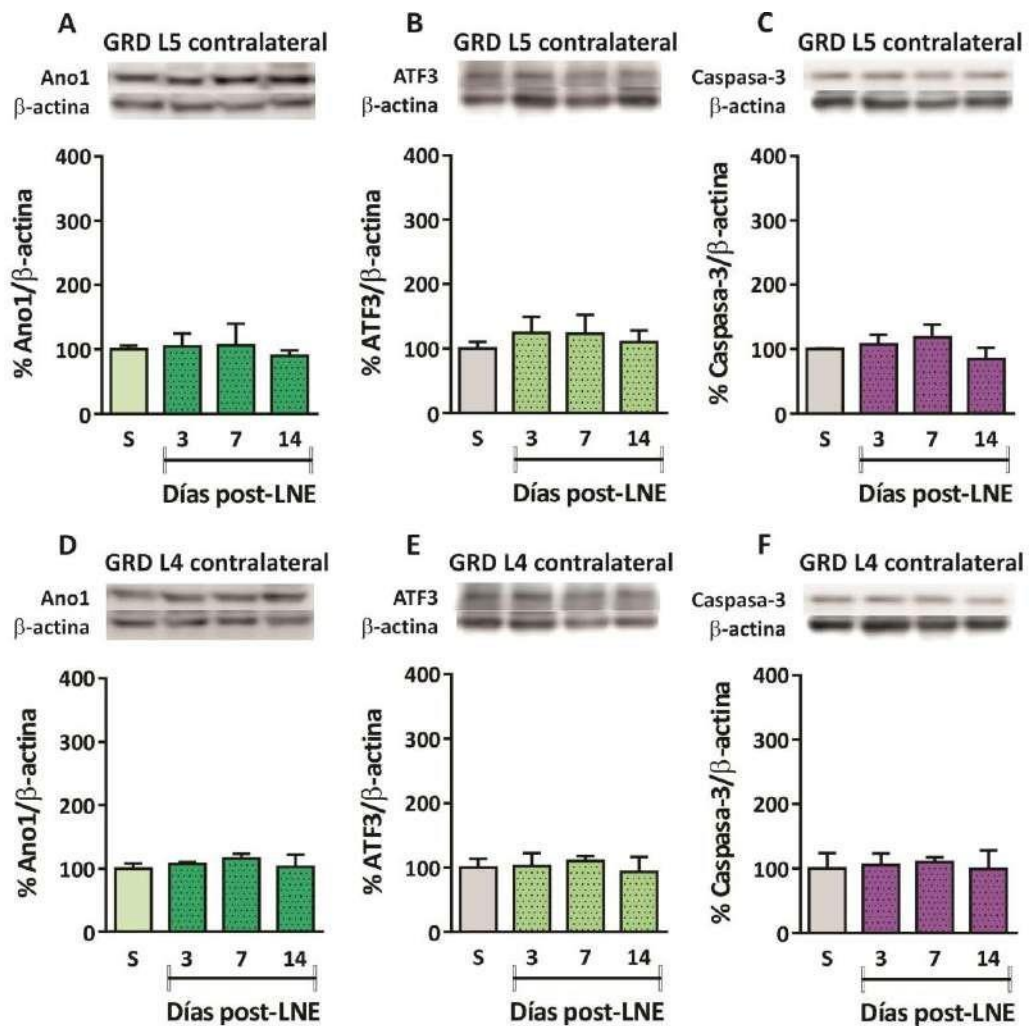
Los datos obtenidos sugieren que la LNE tiene un efecto mayor sobre la expresión del canal Ano1 que sobre Best1, mientras que la TNE ejerce su efecto solo sobre la expresión de Best1 y no de Ano1. En ambos casos el aumento de Ano1 y Best1 no solo se observó en el GRD del nervio lesionado, sino también en el GRD L4 que estaba intacto. Además, es claro que tanto la LNE como la TNE provocan un daño que se ve reflejado en el incremento en la expresión de ATF3 y caspasa-3 en los GRD L5 y L6, mientras que en el GRD L4 no se observó aumento en la expresión de estos marcadores. Respecto al aumento en la expresión de GAP43 tanto en los GRD de los nervios lesionados como en el no lesionado sugiere que esta proteína es importante para la plasticidad del sistema nervioso en respuesta al daño.



**Figura 22.** Curso temporal de expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 después de la TNE. Curso temporal de la expresión de ATF3 (A, B), caspasa-3 (C, D) y GAP43 (E, F) en el GRD L5 lesionado y L4 no lesionado después de la TNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 4$ ). N: naïve, S: sham. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. \* $P < 0.05$  vs el grupo N.

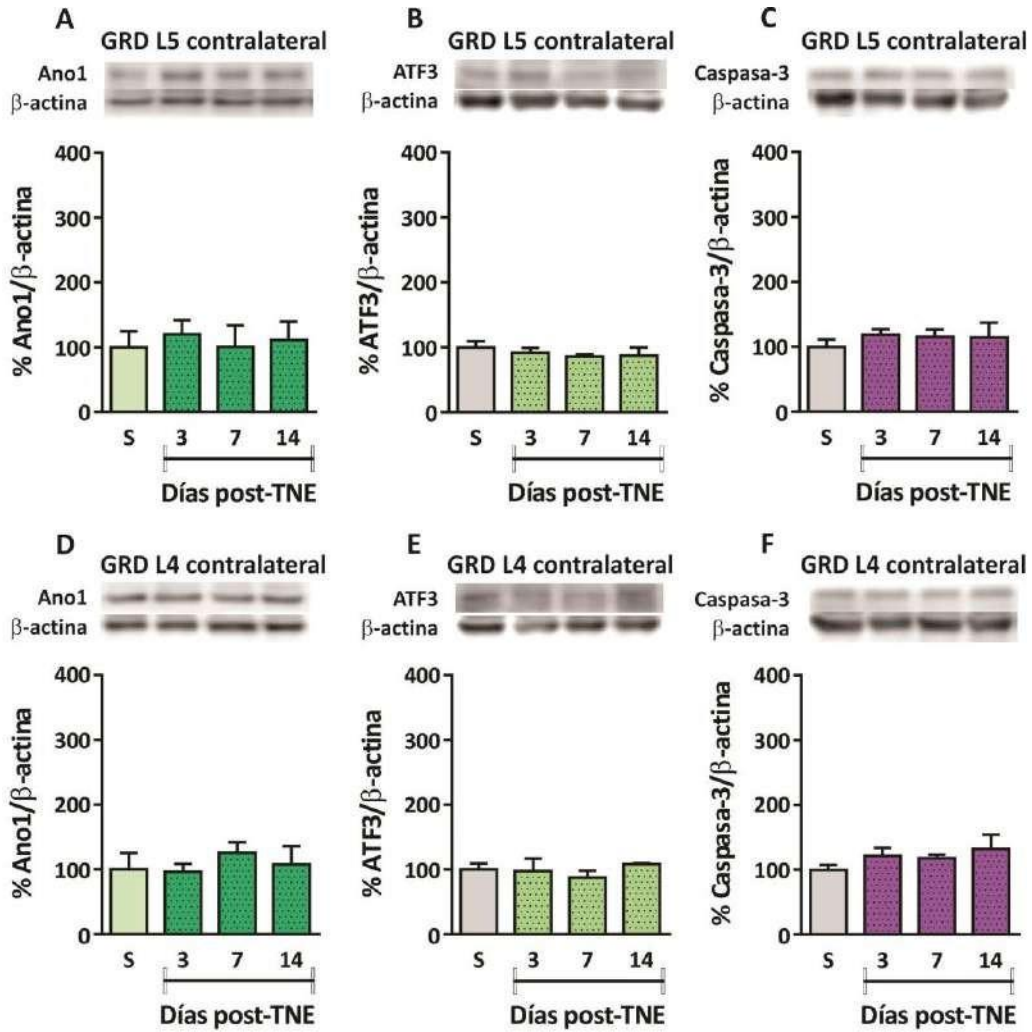
### 7.2.3 Efecto de la LNE o TNE sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en los GRD contralaterales

Los cambios observados en la expresión de las proteínas antes mencionadas se deben a un efecto específico de la LNE o la TNE, ya que la LNE no modificó la expresión del canal Ano1 (Fig. 23A y 23D), ni la expresión de los marcadores de daño ATF3 (Fig. 23B y 23E) y caspasa-3 (Fig. 23C y 23F) en los GRD L5 y L4 del lado contralateral a la lesión comparado con el grupo sham.



**Figura 23.** Curso temporal de expresión contralateral de Ano1, ATF3 y caspasa-3 después de la LNE. Curso temporal de la expresión de Ano1 (A, B), ATF3 (C, D) y caspasa-3 (E, F) en los GRD L5 y L4 contralaterales después de la LNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham. Prueba de ANOVA de una vía, no significativa.

De manera similar, la TNE no tuvo efecto sobre la expresión del canal Ano1, ATF3 y caspasa-3 en los GRD L5 y L4 contralaterales comparado con el grupo control (Fig. 24).



**Figura 24.** Curso temporal de expresión contralateral de Ano1, ATF3 y caspasa-3 después de la TNE. Curso temporal de expresión de Ano1 (A, B), ATF3 (C, D) y caspasa-3 (E, F) en los GRD L5 y L4 contralaterales después de la TNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham. Prueba de ANOVA de una vía, no significativa.

### 7.3 Efecto del bloqueo del canal Ano1

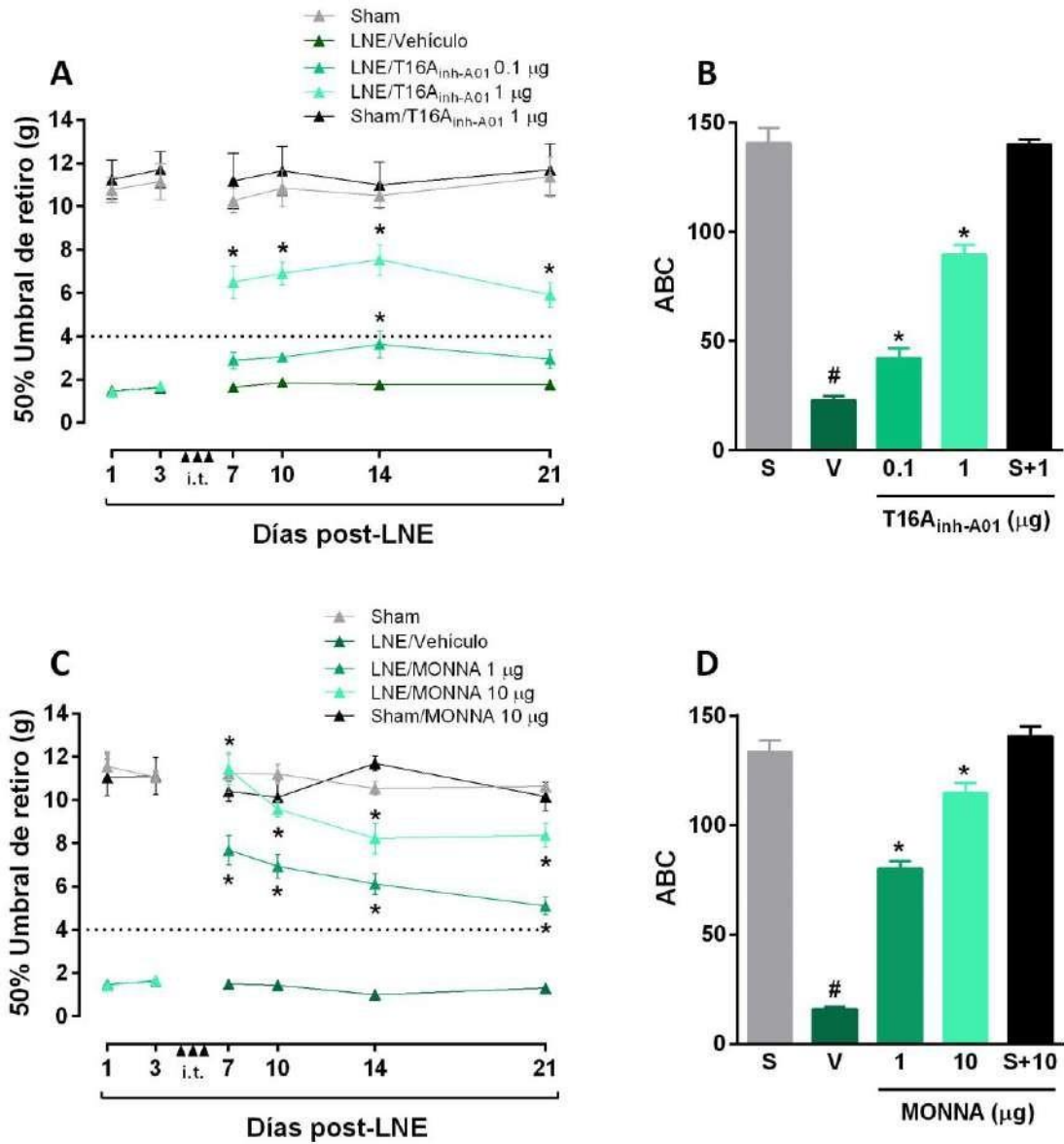
#### 7.3.1. Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA en la alodinia mecánica inducida por la LNE o TNE

La administración i.t. repetida (cada 24 h durante 3 días consecutivos) de 1 µg de T16A<sub>inh-A01</sub>, un bloqueador selectivo del canal Ano1 un bloqueador selectivo del canal Ano1, disminuyó la alodinia mecánica inducida por la LNE desde el día 7 y esa disminución se mantuvo hasta el día 21 después de la lesión (Fig. 25A). La administración repetida de 0.1 µg del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> sólo disminuyó la alodinia de manera significativa el día 14 después de la ligadura (Fig. 25A). Asimismo, la administración i.t. (cada 24 h durante 3 días consecutivos) de 1 y 10 µg de MONNA, bloqueador selectivo de los canales Ano1, disminuyó la alodinia mecánica desde el día 7 y hasta el día 21 después de la LNE (Fig. 25C). El efecto del bloqueo del canal Ano1 por el T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA fue dependiente de la dosis como se observa en los gráficos de área bajo la curva (Fig. 25B y 25D).

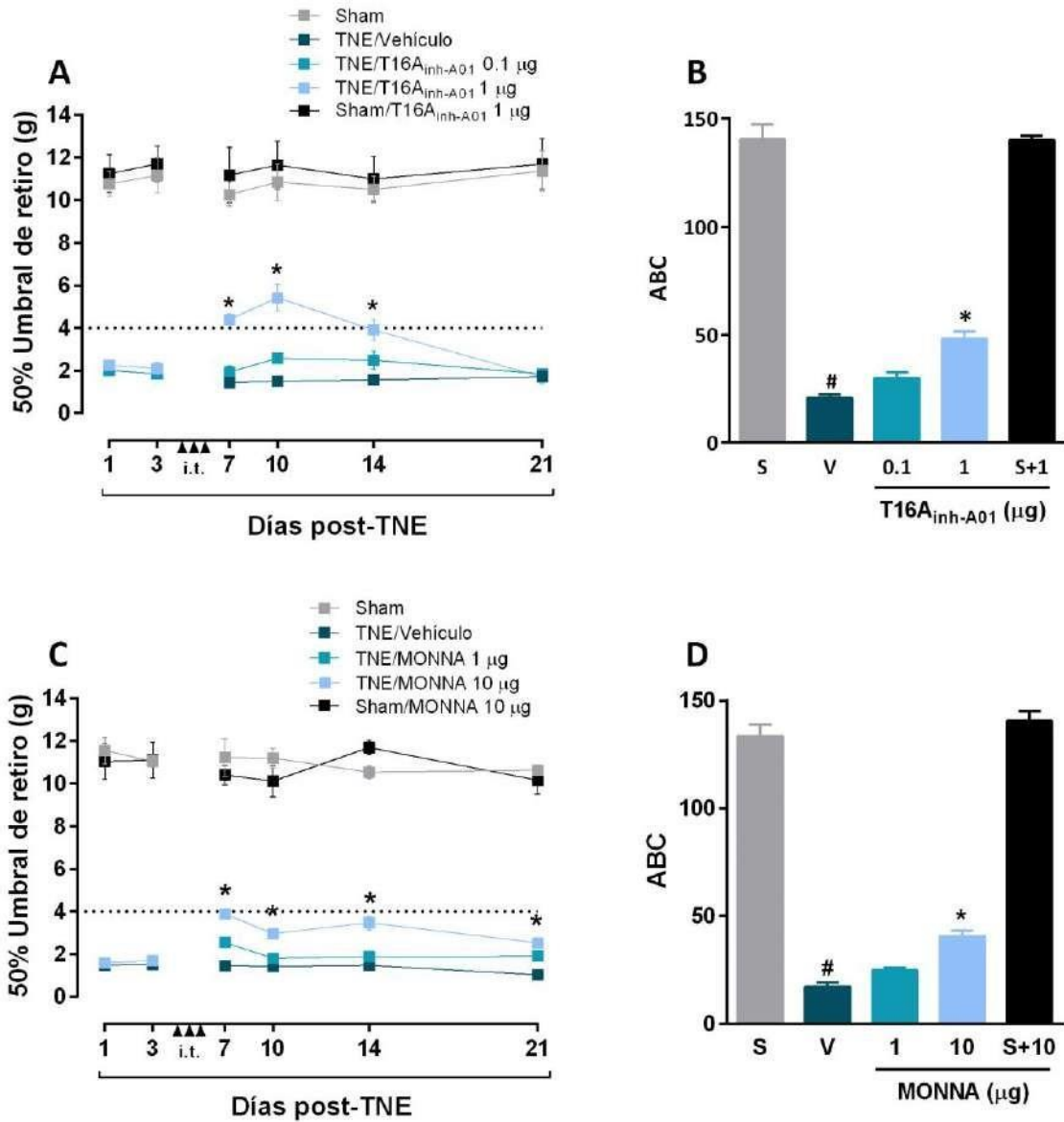
Por otro lado, la administración i.t. repetida de 1 µg de T16A<sub>inh-A01</sub> disminuyó de manera modesta la conducta alodínica inducida por la TNE a los 7, 10 y 14 días después de la lesión (Fig. 26A). Un efecto similar se observó con la administración repetida de 10 µg de MONNA, la cual redujo el umbral de retiro de la pata de manera significativa; sin embargo, las ratas siguieron presentando alodinia táctil (con valores del umbral de retiro por debajo de 4 g) (Fig. 26C).

Cabe señalar que en las ratas falsamente operadas (sham), la administración i.t. de la dosis más alta de T16A<sub>inh-A01</sub> (1 µg) (Fig. 25B y 26B) o de MONNA (10 µg) (Fig. 25D y 26D) no modificó el umbral de retiro de la pata comparado con las ratas sham control. De igual manera la administración del vehículo (DMSO 1% o DMSO 15%) no modificó la alodinia en ratas con LNE o TNE (Fig. 25 y 26).

Estos datos sugieren que el canal Ano1 tiene una mayor contribución en la alodinia táctil inducida por la ligadura que por la transección del nervio espinal L5.



**Figura 25.** Efecto antialodínico de T16A<sub>inh-A01</sub> o MONNA en la LNE. En los paneles A y C se muestra el efecto antialodínico de la administración i.t. repetida de T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA respectivamente en ratas con LNE. Los datos están expresados como el 50% del umbral de retiro de la pata contra el tiempo. Prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba Student-Newman-Keuls. \**P* < 0.05 vs el grupo N. En los paneles B y D se muestra el área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de los fármacos. Los datos se expresan como la media ± e.e. de 6 animales por grupo. S: sham, V: vehículo. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba Student-Newman-Keuls. #*P* < 0.05 vs el grupo S, \**P* < 0.05 vs el grupo V.



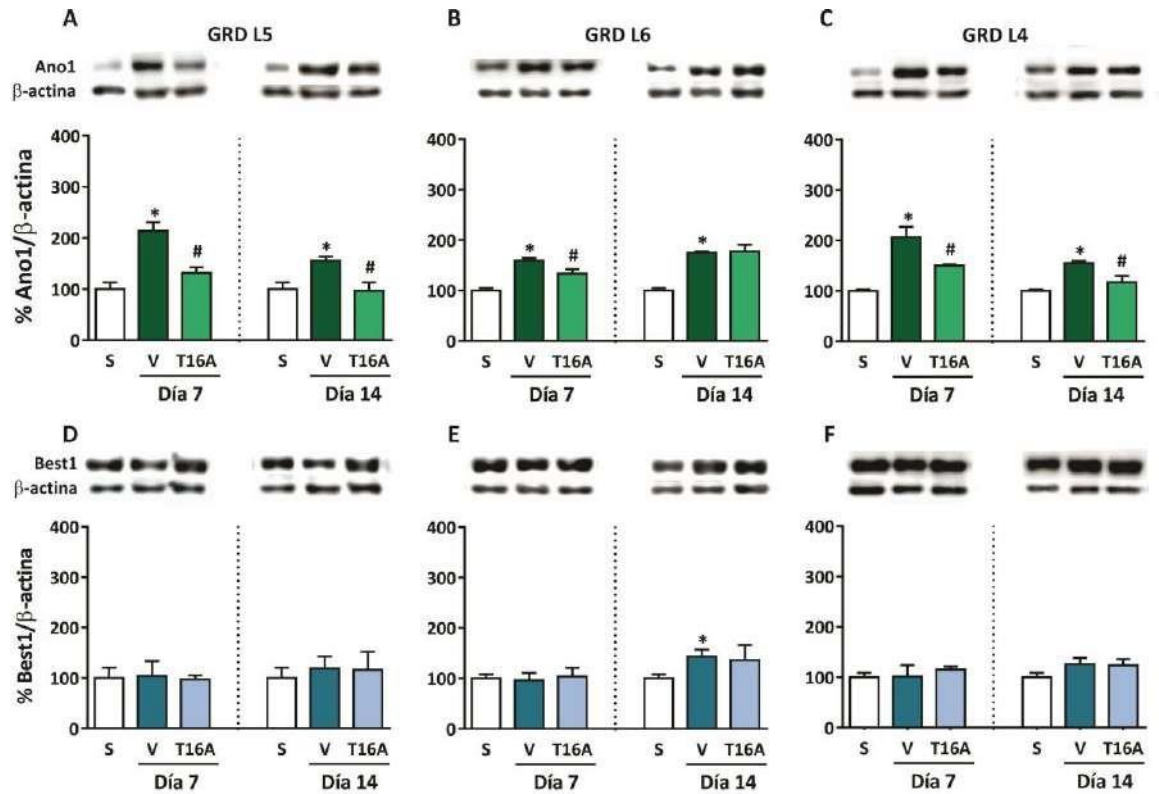
**Figura 26.** Efecto antialodínico de T16A<sub>inh-A01</sub> o MONNA en la TNE. En los paneles A y C se muestra el efecto antialodínico de la administración i.t. repetida de T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA respectivamente en ratas con TNE. Los datos están expresados como el 50% del umbral de retiro de la pata contra el tiempo. Prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba Student-Newman-Keuls. \**P* < 0.05 vs el grupo N. En los paneles B y D se muestra el área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de los fármacos. Los datos se expresan como la media ± e.e. de 6 animales por grupo. S: sham, V: vehículo. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba Student-Newman-Keuls. #*P* < 0.05 vs el grupo S, \**P* < 0.05 vs el grupo V.

### 7.3.2 Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la expresión de *Ano1*, *Best1*, *ATF3*, *caspara-3* y *GAP43* en ratas con LNE

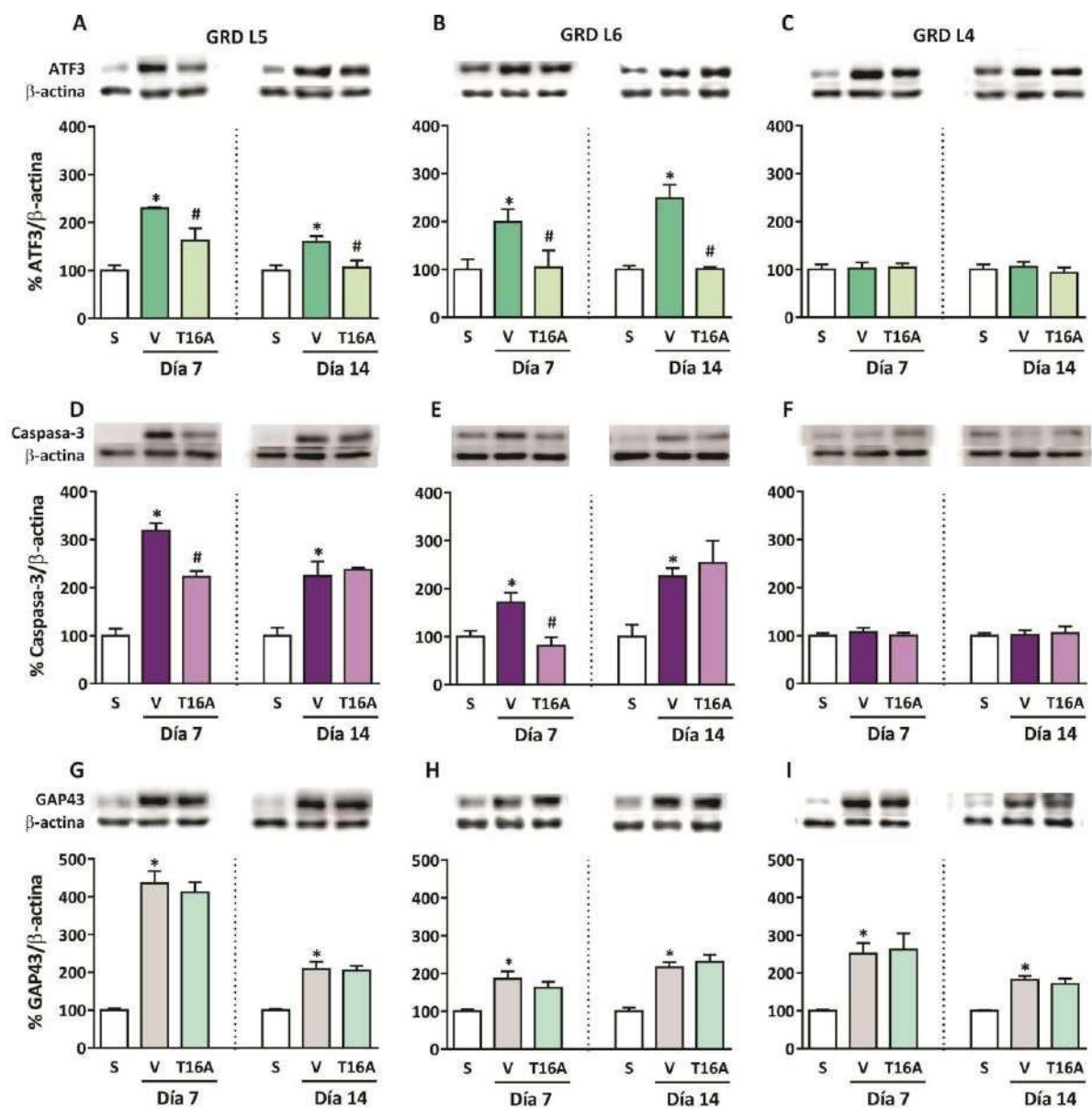
La administración i.t. del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> (1 µg cada 24 h durante 3 días) disminuyó significativamente el aumento en la expresión de *Ano1* inducido por la ligadura en el GRD L5 a los días 7 y 14 después de la lesión, comparado con el grupo administrado con vehículo (Fig. 27A). La administración de T16A<sub>inh-A01</sub> disminuyó el incremento en la expresión de *Ano1* en el GRD L6 inducido por la LNE solo al día 7 después de la ligadura (Fig. 27B). La administración de T16A<sub>inh-A01</sub> disminuyó el aumento en la expresión de *Ano1* en el GRD L4 inducido por la ligadura a los 7 y 14 días después de la lesión comparado con el grupo de LNE administrado con vehículo (Fig. 27C). En contraste, la administración del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> no modificó la expresión de *Best1* en el GRD L5, L6 y L4 en ninguno de los días evaluados después de la LNE (Fig. 27D a 27F).

Por otra parte, la administración repetida de T16A<sub>inh-A01</sub> disminuyó el aumento en la expresión de *ATF3* inducida por la LNE en los GRD L5 y L6 lesionados a los 7 y 14 días después de la ligadura (Fig. 28A y 28B). En contraste, la administración del bloqueador solamente disminuyó de manera significativa el aumento en la expresión de *caspara-3* el día 7 después de la ligadura en los GRD L5 y L6, sin modificar su expresión a los 14 días después de la lesión (Fig. 28D y 28E). La administración del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> no cambió la expresión de *ATF3* y de *caspara-3* en el GRD L4 no lesionado (Fig. 28C y 28F). El T16A<sub>inh-A01</sub> no modificó la expresión de *GAP43* en ninguno de los GRD evaluados comparados contra el grupo administrado con vehículo (Fig. 28G a 28I).





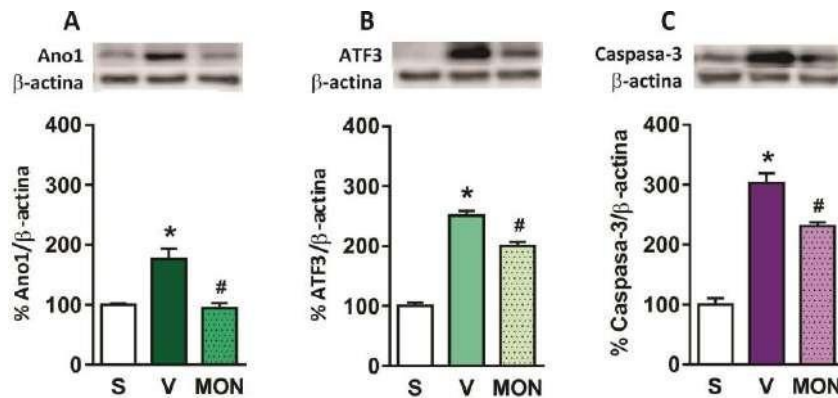
**Figura 27.** Efecto de T16A<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Ano1 y Best1 en la LNE. Efecto de la administración i.t. repetida del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Ano1 (A-C) y Best1 (D-F) en los GRD L5 y L6 lesionados y L4 no lesionado después de la LNE. Los datos se expresan como la media ± e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra β-actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, T16A: T16A<sub>inh-A01</sub>. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo S, # $P < 0.05$  vs el grupo V.



**Figura 28.** Efecto de T16A<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la LNE. Efecto de la administración i.t. repetida del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3 (A-C), caspasa-3 (D-F) y GAP43 (G-I) en los GRD L5 y L6 lesionados y L4 no lesionado después de la LNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, T16A: T16A<sub>inh-A01</sub>. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo S, # $P < 0.05$  vs el grupo V.

Para determinar si los efectos observados con la administración de T16A<sub>inh-A01</sub> en ratas con LNE se deben a su acción sobre el canal Ano1 y no sobre otros blancos, el efecto de MONNA, otro bloqueador altamente selectivo del canal Ano1 (Boedtkjer y cols., 2015) se determinó con el mismo esquema de administración y su efecto se evaluó 7 días después de la LNE (Fig. 29).

La administración i.t. repetida de 10 µg de MONNA disminuyó significativamente el aumento en la expresión de Ano1 (Fig. 29A), ATF3 (Fig. 29B) y caspasa-3 (Fig. 29C) inducida por la LNE en GRD L5 lesionado.



**Figura 29.** Efecto de MONNA sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la LNE. Efecto de la administración i.t. repetida del bloqueador MONNA sobre la expresión de Ano1 (A), ATF3 (B) y caspasa-3 (C) en el GRD L5 lesionado después de la LNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, MON: MONNA. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo S, # $P < 0.05$  vs el grupo V.

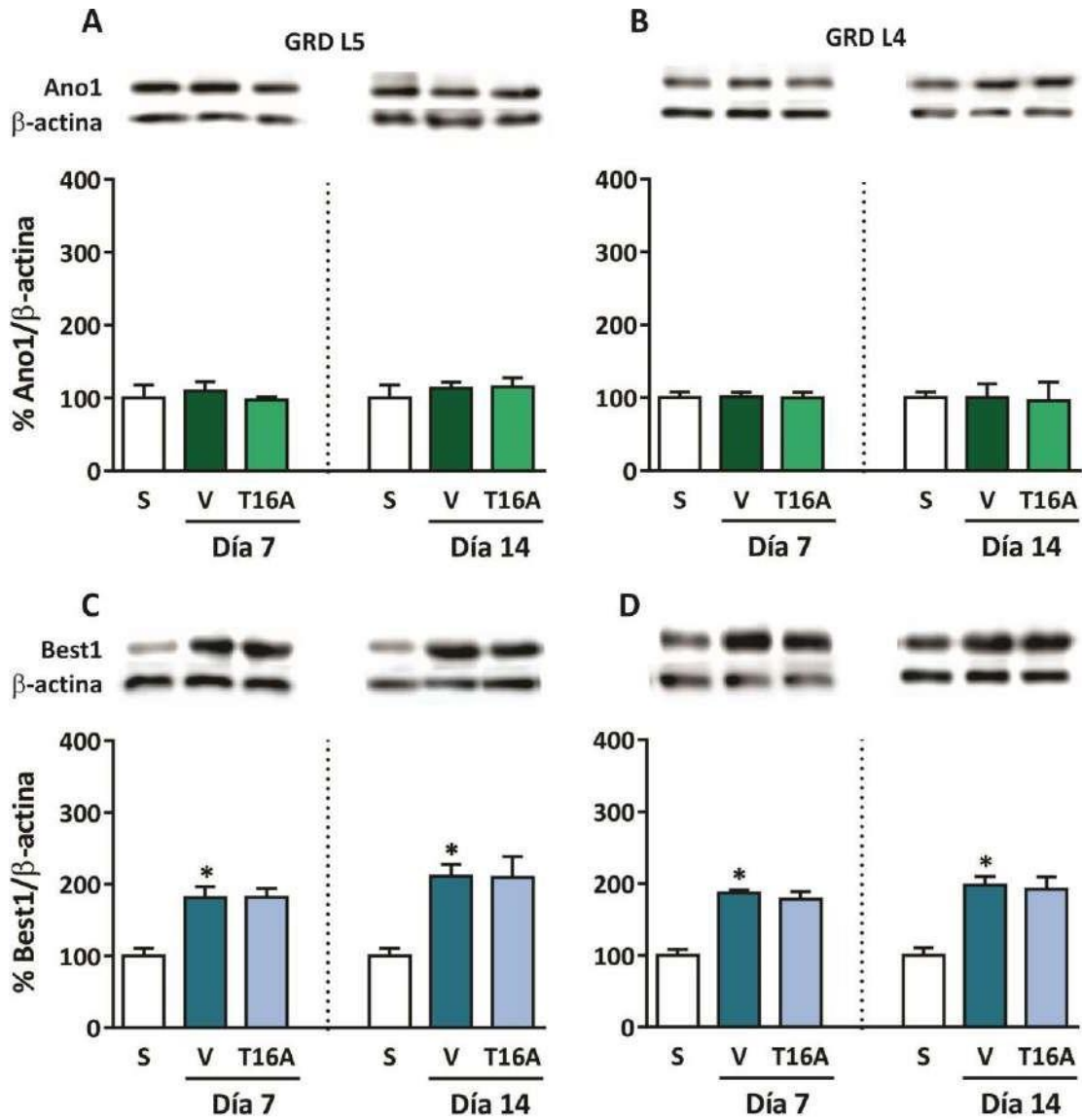
Estos datos indican que el bloqueo del canal Ano1 reduce el aumento de su propia expresión y de los marcadores de daño ATF3 y caspasa-3.

### *7.3.3 Efecto del T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas con TNE*

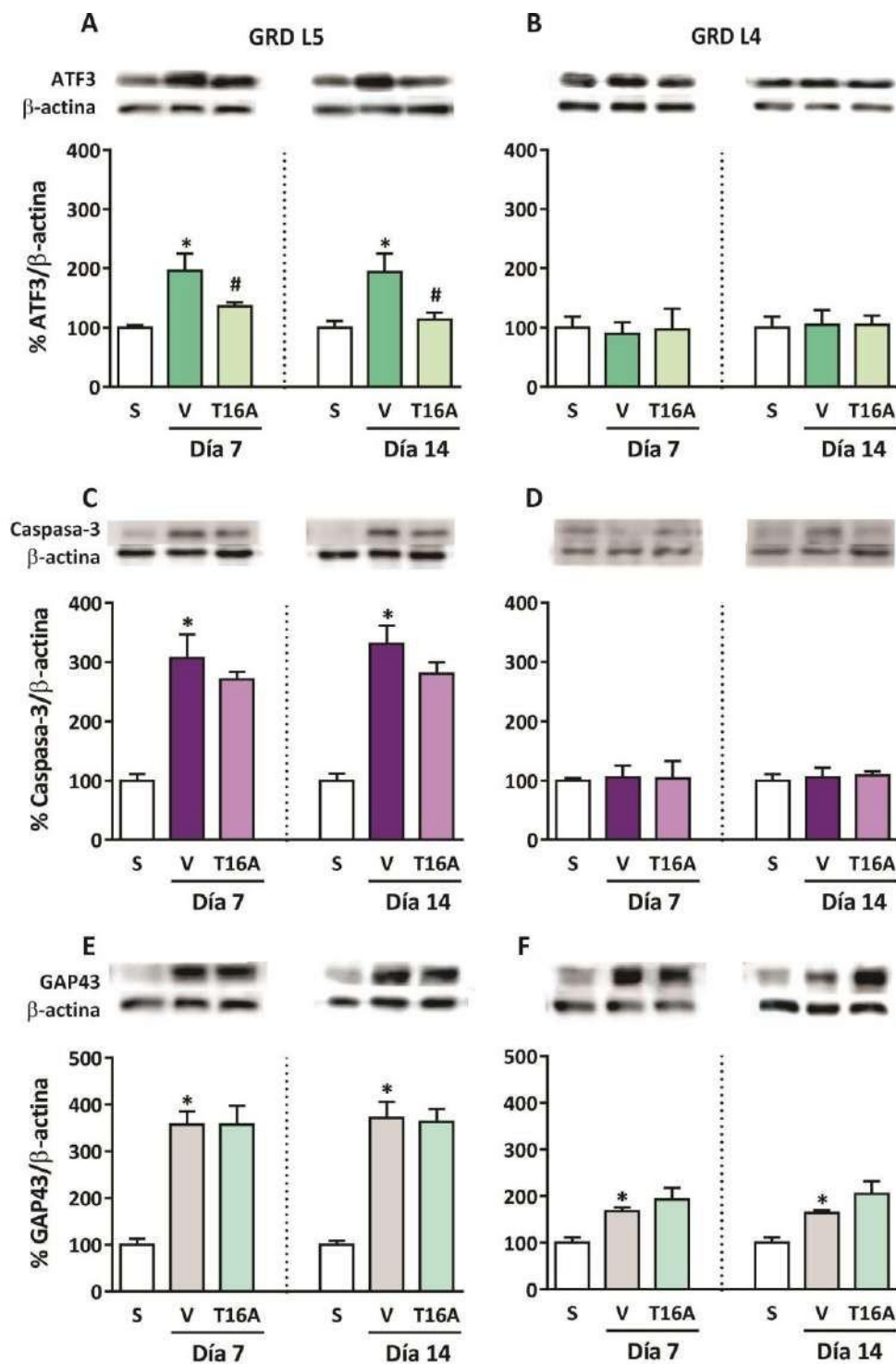
La administración i.t. repetida de 1 µg de T16A<sub>inh-A01</sub> (cada 24 h durante 3 días) no tuvo efecto sobre la expresión de Ano1 en los GRD L5 y L4 (Fig. 30A y 30B). De igual manera, la administración repetida del bloqueador no redujo el aumento en la expresión de Best1 inducida por la TNE en los GRD L5 y L4 comparado con el grupo administrado con vehículo, en ninguno de los días evaluados (Fig. 30C y 30D).

Estos datos sugieren que el aumento en la expresión de Best1 inducida por la TNE es independiente de la acción del canal Ano1.

Por otro lado, la administración repetida del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> disminuyó el aumento en la expresión de ATF3 inducido por la TNE en el GRD L5 lesionado, a los 7 y 14 días después de la transección (Fig. 31A) y no tuvo efecto en la expresión de ATF3 en el GRD L4 no lesionado (Fig. 31B). Además, la administración del T16A<sub>inh-A01</sub> no disminuyó significativamente el aumento en la expresión de caspasa-3 inducida por la TNE en el GRD L5 lesionado en ninguno de los días evaluados y no tuvo efecto en la expresión de caspasa-3 del GRD L4 no lesionado (Fig. 31C y 31D). Por último, el tratamiento con el T16A<sub>inh-A01</sub> no modificó el aumento en la expresión del marcador de regeneración neuronal GAP43 inducida por la TNE en los GRD L5 y L4 después de la lesión (Fig. 31E y 31F).



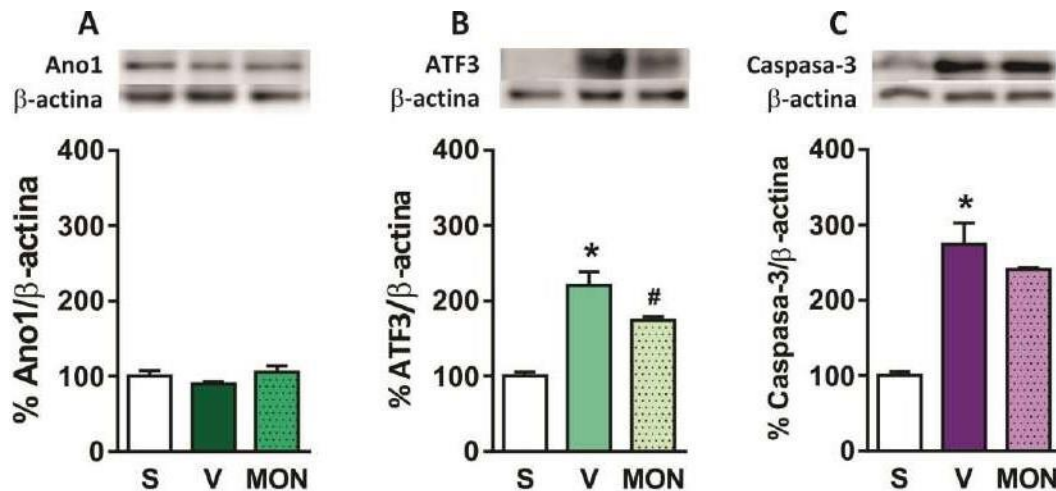
**Figura 30.** Efecto de T16A<sup>inh-A01</sup> sobre la expresión de Ano1 y Best1 en la TNE. Efecto de la administración i.t. repetida del bloqueador T16A<sup>inh-A01</sup> sobre la expresión de Ano1 (A, B) y Best1 (C, D) en los GRD L5 lesionado y L4 no lesionado después de la TNE. Los datos se expresan como la media ± e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra β-actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, T16A: T16A<sup>inh-A01</sup>. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo S.



**Figura 31.** Efecto de T16A<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la TNE. Efecto de la administración i.t. repetida del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3 (A, B), caspasa-3 (C, D) y GAP43 (E, F) en los GRD L5 lesionado y L4 no lesionado después de la TNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n=3$ ). S: sham, V: vehículo, T16A: T16A<sub>inh-A01</sub>. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo S, # $P < 0.05$  vs el grupo V.

Para elucidar si los efectos observados con la administración de T16A<sub>inh-A01</sub> en ratas con TNE se deben a su acción sobre el canal Ano1, se determinó el efecto de la administración i.t. de 10 µg de MONNA, bajo el mismo esquema de administración. El efecto se evaluó 7 días después de la TNE (Fig. 32).

La administración repetida de MONNA no tuvo efecto sobre la expresión de Ano1 en el nervio transectado L5 (Fig. 32A). En contraste, la administración de MONNA disminuyó de manera significativa el aumento en la expresión de ATF3 en el GRD L5 lesionado por la TNE (Fig. 32B), pero no redujo el aumento en la expresión de caspasa-3 inducida por la TNE (Fig. 32C).



**Figura 32.** Efecto de MONNA sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la TNE. Efecto de la administración i.t. repetida del bloqueador MONNA sobre la expresión de Ano1 (A), ATF3 (B) y caspasa-3 (C) en el GRD L5 lesionado después de la TNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, MON: MONNA. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo S, # $P < 0.05$  vs el grupo V.

Los datos obtenidos sugieren que el aumento en la expresión de Best1 es independiente del canal Ano1 y que el bloqueo de Ano1 solo es capaz de reducir el aumento en la expresión de ATF3.

#### **7.4 Efecto de la administración de gabapentina en la alodinia mecánica y la expresión de proteínas**

La administración i.t. de 100 µg de gabapentina (cada 24 h durante 3 días) disminuyó la alodinia mecánica desde el día 7 y hasta el día 21 posteriores a la lesión (Fig. 33A). En el gráfico del ABC (Fig. 33B) se puede observar el efecto antialodínico de la administración repetida de gabapentina comparada contra la administración del vehículo (DMSO al 15%).

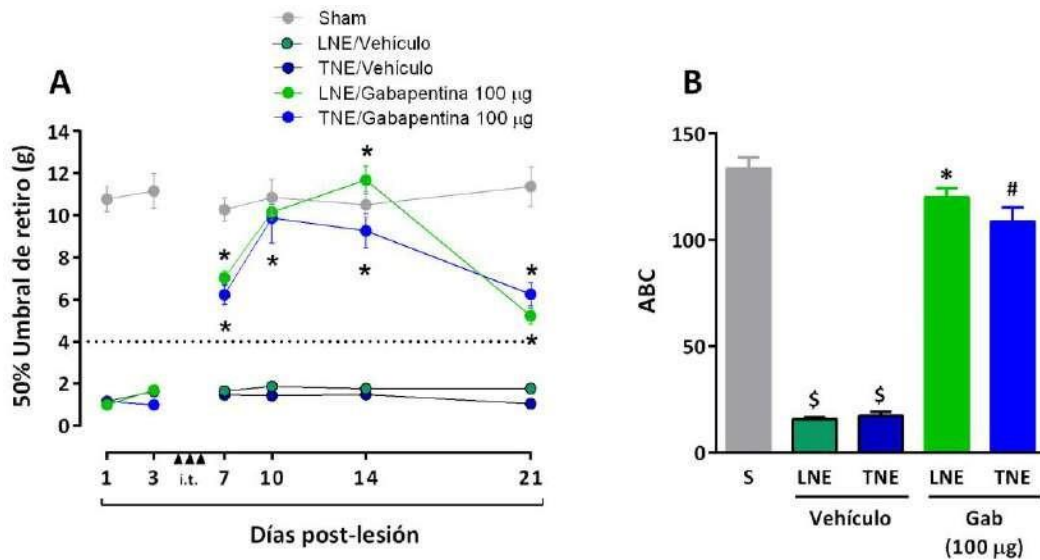
Para elucidar si la administración de gabapentina modificaba la expresión del canal Ano1, así como la expresión de los marcadores de daño ATF3 y caspasa-3 en las ratas con LNE o TNE, se evaluó la expresión de estas proteínas en el GRD L5 siete días después de la lesión. La administración repetida de gabapentina disminuyó significativamente el aumento en la expresión de Ano1 inducido por la LNE en el GRD L5 lesionado (Fig. 34A). Dado que la TNE no produjo cambios en la expresión de Ano1, el tratamiento con gabapentina no tuvo efecto en la expresión de este canal (Fig. 34A).

Por otra parte, el tratamiento con gabapentina disminuyó de manera significativa el aumento de la expresión de ATF3 inducido tanto por la LNE como por la TNE en el GRD L5 lesionado (Fig. 34B).

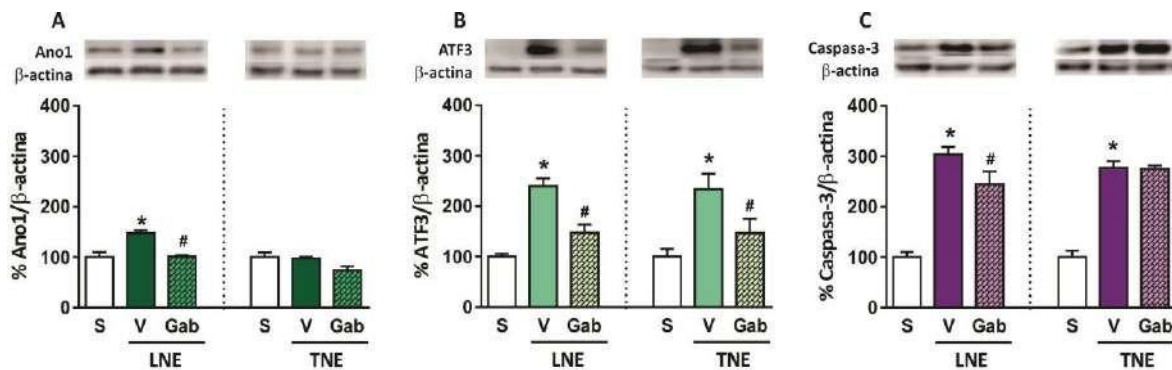
En cuanto a la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3, el tratamiento con gabapentina disminuyó parcialmente el aumento en la expresión de esta proteína inducida por la LNE en el GRD L5 lesionado, pero no tuvo efecto en el incremento de la expresión de caspasa-3 inducido por la TNE, 7 días después de la lesión (Fig. 34C).

Los datos obtenidos sugieren que la reducción en la alodinia táctil inducida por la gabapentina se correlaciona con una disminución en la expresión de Ano1, así como de ATF3 y caspasa-3 en ratas con LNE.





**Figura 33.** Efecto antialodínico de gabapentina en la LNE y la TNE. En el panel A se muestra el curso temporal del efecto de la administración i.t. repetida de gabapentina en ratas con LNE o TNE. Los datos están expresados como el 50% del umbral de retiro de la pata contra el tiempo. ( $n = 6$ ) Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba Student-Newman-Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo LNE/Vehículo, En el panel B se muestra el área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de gabapentina. S: sham, Gab: gabapentina. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba Student-Newman-Keuls. \$ $P < 0.05$  vs el grupo S, \* $P < 0.05$  vs el grupo LNE/Vehículo, # $P < 0.05$  vs el grupo TNE/Vehículo.



**Figura 34.** Efecto de gabapentina sobre la expresión de Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la LNE o la TNE. Efecto de la administración i.t. repetida de gabapentina sobre la expresión de Ano1 (A), ATF3 (B) y caspasa-3 (C) en el GRD L5 lesionado 7 días posteriores a la LNE o la TNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, Gab: gabapentina. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. \* $P < 0.05$  vs el grupo S, # $P < 0.05$  vs el grupo V.

## 7.5 Efecto de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve

### 7.5.1 Amplificación e identificación del plásmido pCMV6-Best1

El plásmido pCMV6-Best1 se amplificó en bacterias y se identificó mediante PCR de punto final. Se obtuvieron dos muestras de plásmido de 2 colonias independientes. El fragmento amplificado por PCR se muestra en los carriles 3 y 4 de la figura 35A, el cual tiene el tamaño del producto esperado de 2,059 pb.

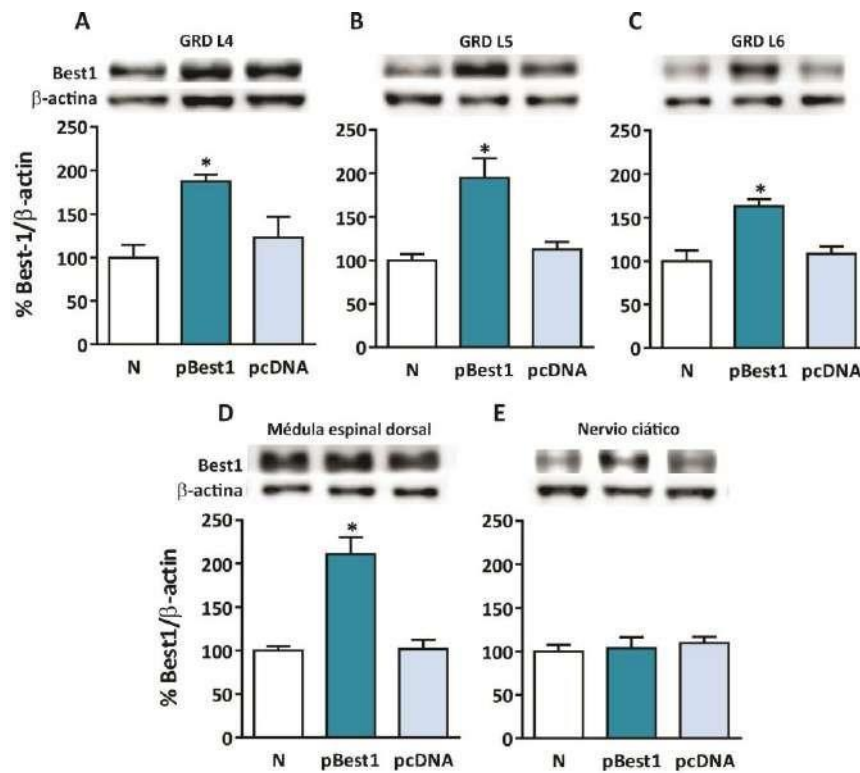
El plásmido pCMV6-Best1 también se identificó mediante su digestión con dos enzimas de restricción, BamHI y NotI. En la Fig. 35B se observan los dos fragmentos del tamaño esperado (uno de 1.5 kb y otro de 5 kb, aproximadamente) que se obtuvieron de la digestión del plásmido original pCMV6-Best1 (carril 2) y del plásmido amplificado (carril 3). No se obtuvo señal cuando no se colocó el plásmido en la reacción (control negativo, carril 4). La concentración del plásmido de Best1 amplificado por *maxiprep* fue de 1.695 µg/µl y la relación de las absorbancias 260/280 fue de 1.97, indicando una pureza óptima del plásmido.



**Figura 35.** Identificación del plásmido pCMV6-Best1. A) Fragmento obtenido por PCR. En el carril 1: marcador de peso molecular (1 kb), carril 2: amplificado del control positivo del plásmido pCMV6-Best1, carriles 3 y 4: amplificado de muestras aleatorias del plásmido obtenido, carril 5: control negativo, carriles 6-8: muestras 2, 3 y 4 sin amplificar. B) Fragmentos obtenidos del plásmido pCMV6-Best1 mediante digestión con enzimas restricción. En el carril 1: marcador de peso molecular (1 kb), carril 2: digestión del control positivo del plásmido Best1, carril 3: digestión del plásmido asilado y purificado y carril 4: control negativo.

### 7.5.2 Sobreexpresión de Best1 en ratas naïve

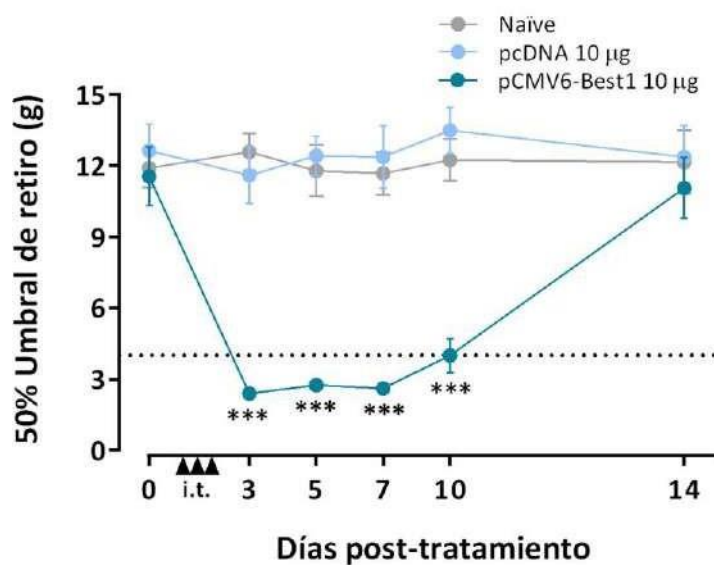
La inyección i.t. repetida de 10 µg (cada 24 h durante 3 días) del plásmido pCMV6-Best1, pero no del plásmido pcDNA, aumentó la expresión de Best1 en los GRD L4, L5 y L6, así como en médula espinal de los animales naïve (Fig. 36A a 36D). Por otra parte, la inyección i.t. del plásmido pCMV6-Best1 no modificó la expresión de Best1 en el nervio ciático (Fig. 36E), lo que sugiere que la administración a nivel lumbar sólo permite la sobreexpresión del plásmido en un área cercana al sitio de inyección.



**Figura 36.** Determinación de la expresión de Best1 en ratas administradas con pCMV6-Best1. Expresión de Best1 en los GRD L4 (A), L5 (B) y L6 (C), médula espinal dorsal (D) y nervio ciático (E) después de la administración i.t. repetida del plásmido pCMV6-Best1 (pBest1). Los datos se expresan como la media ± e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra β-actina ( $n = 3$ ). N: naïve. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. \* $P < 0.05$  vs el grupo N.

### 7.5.3 Efecto de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve

La administración i.t. repetida (10 µg cada 24 h durante 3 días) del plásmido pCMV6-Best1 disminuyó de manera significativa el umbral de retiro de la pata desde el día 3 hasta 10 días después del inicio de la administración del plásmido. (Fig. 37).



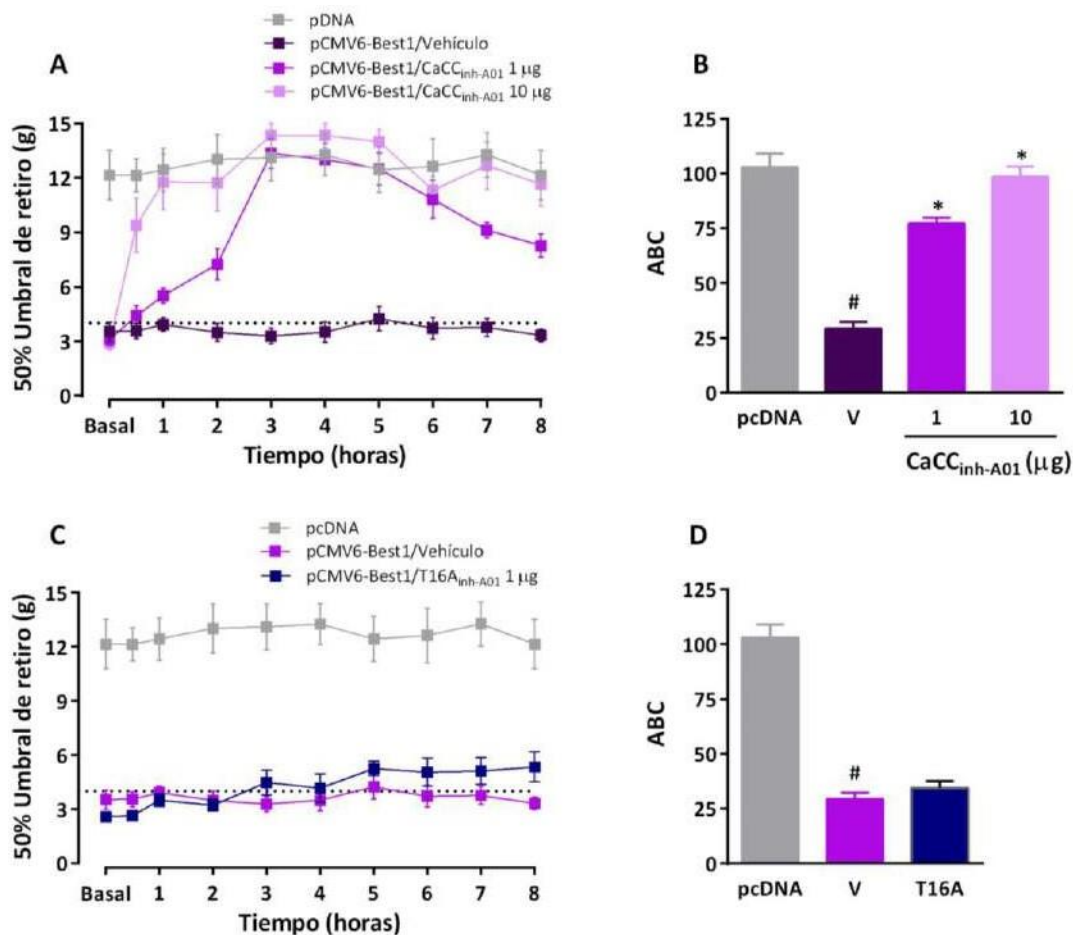
**Figura 37.** Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por el pCMV6-Best1 en ratas naïve. Curso temporal de la alodinia mecánica inducida por la administración i.t. repetida del plásmido pCMV6-Best1. Los puntos representan la media  $\pm$  e.e. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) ( $n = 6$ ). Prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls. \*\*\* $P < 0.01$  vs el grupo naïve.

## 7.6 Efecto del bloqueo del canal Best1

### 7.6.1 Efecto del $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ en la alodinia mecánica inducida por la sobreexpresión de Best1

La administración i.t. de una sola administración de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  (3 días después de la última administración del plásmido) disminuyó de manera dependiente de la dosis (1 y 10  $\mu\text{g}$ ) la alodinia mecánica inducida por la sobreexpresión de Best1 en ratas intactas. El efecto se observó desde la primera hora que se administró el bloqueador y durante las 8 h de evaluación, comparado con el grupo administrado con vehículo (Fig. 38A). Este efecto se observa claramente en la gráfica del área bajo la curva (Fig. 38B).

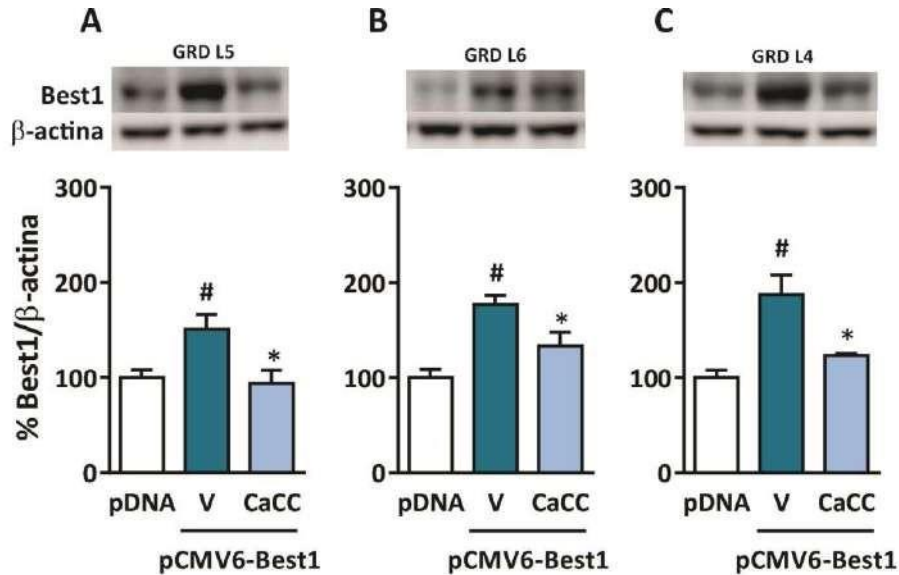
Para descartar la participación del canal Ano1 en la conducta alodínica inducida por la administración repetida del plásmido pCMV6-Best1, se administró de manera i.t. 1  $\mu\text{g}$  del bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub>. La administración del bloqueador de Ano1 no disminuyó la alodinia mecánica en las ratas que sobreexpresaron Best1 (Fig. 38C y 38D). Estos datos confirman que el efecto alodínico observado en ratas que sobreexpresaron Best1 se debe específicamente a la acción del canal Best1.



**Figura 38.** Efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas que sobreexpresaron Best1. En los paneles A y C se muestra el curso temporal del efecto antialodínico de la administración i.t. de los bloqueadores CaCC<sub>inh-A01</sub> y T16A<sub>inh-A01</sub> respectivamente en ratas que sobreexpresaron Best1. Los datos están expresados como el 50% del umbral de retiro de la pata contra el tiempo. En los paneles B y D se muestra el área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico de los fármacos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. de 6 animales por grupo. S: sham, V: vehículo, T16A: T16A<sub>inh-A01</sub>. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba Student-Newman-Keuls. # $P < 0.05$  vs el grupo pcDNA, \* $P < 0.05$  vs el grupo V.

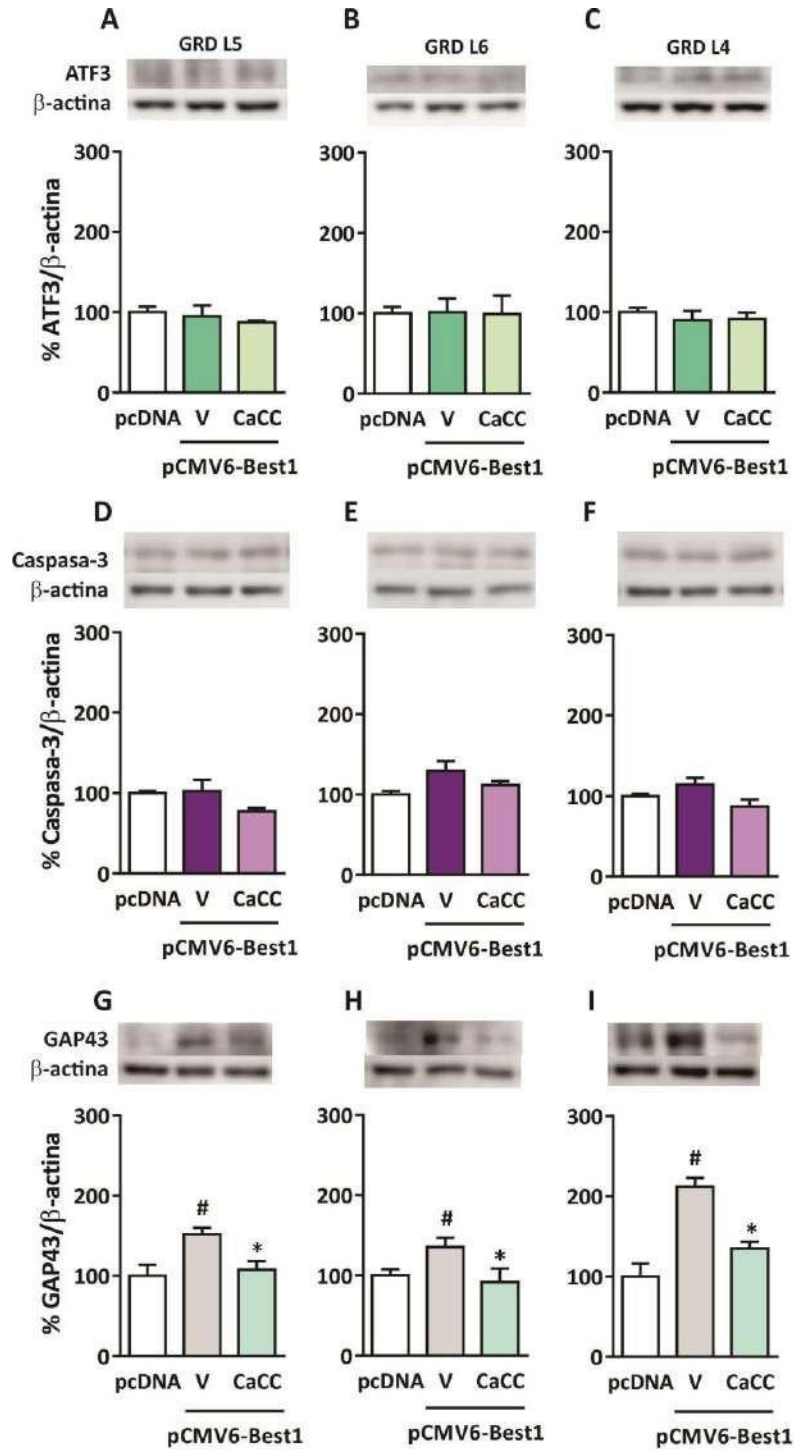
### 7.6.2 Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas que sobreexpresaron Best1

La administración i.t. de una sola dosis de 10 µg de CaCC<sub>inh-A01</sub> disminuyó la expresión de Best1 en los GRD L5, L6 y L4 en ratas que sobreexpresaron el canal Best1 (Fig. 39).



**Figura 39.** Efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1 en ratas que sobreexpresaron Best1. Efecto de la administración i.t. del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1 en los GRD L5 (A), L6 (B) y L4 (C) en ratas que sobreexpresaron Best1. Los datos se expresan como la media ± e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra β-actina ( $n = 3$ ). V: vehículo, CaCC: CaCC<sub>inh-A01</sub>. <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs el grupo pcDNA, <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs el grupo V. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls.

Por otra parte, la sobreexpresión de Best1 no modificó la expresión de los marcadores de daño ATF3 (Fig. 40A a C) y caspasa-3 (Fig. 40D a 41F) en los GRD L5, L6 y L4. De hecho, el tratamiento con el CaCC<sub>inh-A01</sub> no cambió la expresión de estas proteínas (Fig. 40A a 40F). Sin embargo, la sobreexpresión de Best1 incrementó la expresión del marcador de regeneración GAP43 en los GRD L5, L6 y L4 (Fig. 40G a 40I). La administración del CaCC<sub>inh-A01</sub> disminuyó el aumento en la expresión de GAP43 inducida por la sobreexpresión de Best1 en los GRD evaluados (Fig. 40G a 40I) comparado con el grupo de ratas que sobreexpresaron Best1 administrado sólo con vehículo.

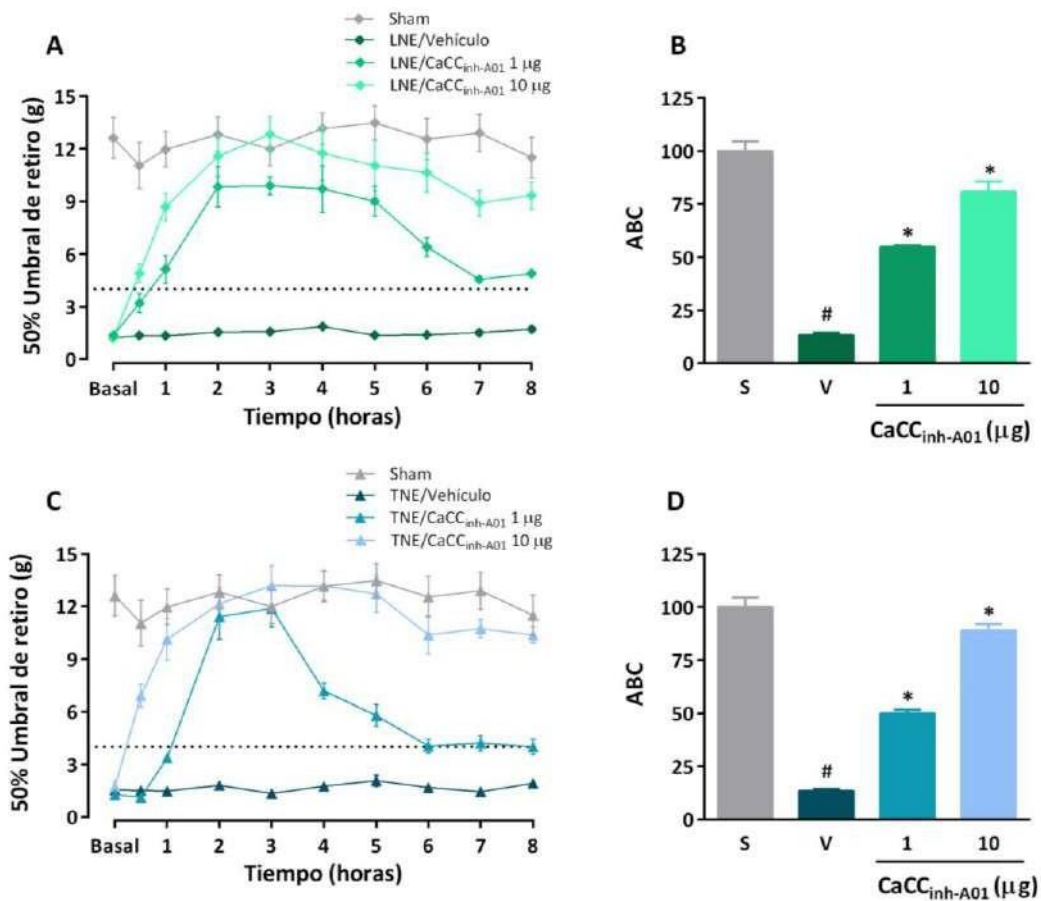


**Figura 40.** Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas que sobreexpresaron Best1. Efecto de la administración i.t. del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3 (A-C), caspasa-3 (D-F) y GAP43 (G-I) en los GRD L5, L6 y L4 en ratas que sobreexpresaron Best1. Los datos se expresan como la media ± e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra β-actina ( $n = 3$ ). V: vehículo, CaCC: CaCC<sub>inh-A01</sub>. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs el grupo pcDNA, <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs el grupo V.



### 7.6.3 Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la alodinia táctil en ratas neuropáticas

La administración de un bolo de 1 y 10  $\mu\text{g}$  del CaCC<sub>inh-A01</sub> disminuyó la alodinia mecánica desde los primeros 30 min hasta la última hora de evaluación en ratas con LNE (Fig. 41A), con un efecto dependiente de la dosis (Fig. 41B). Asimismo, la administración de CaCC<sub>inh-A01</sub> disminuyó la alodinia mecánica de manera dependiente de la dosis en ratas con TNE (Fig.41C y 41D).

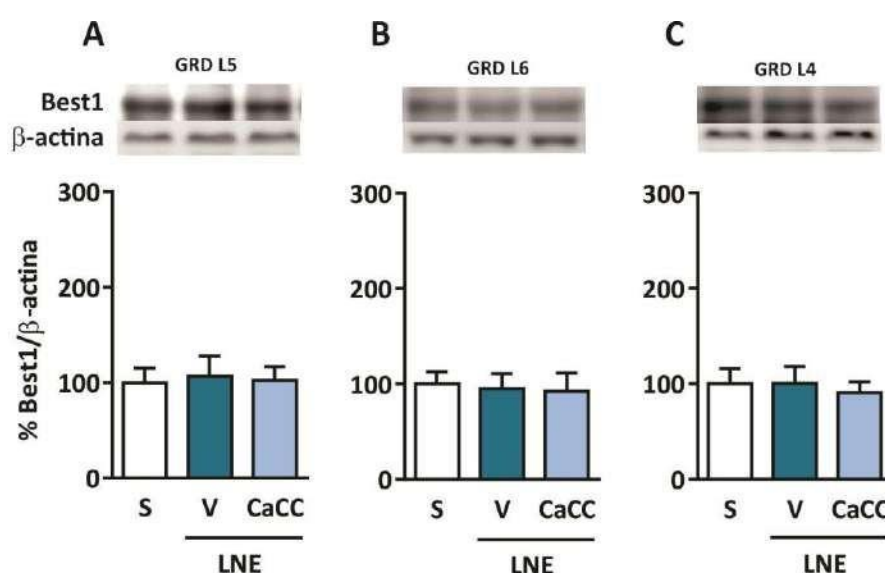


**Figura 41.** Efecto antialodínico de CaCC<sub>inh-A01</sub> en la LNE o la TNE. Efecto antialodínico del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> en ratas con LNE o TNE. En los paneles A y C se muestra el curso temporal, los datos están expresados como el 50% del umbral de retiro de la pata contra el tiempo. En los paneles B y D se muestra el área bajo la curva (ABC) del efecto antialodínico del fármaco. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. de 6 animales por grupo. S: sham, V: vehículo, T16A: T16A<sub>inh-A01</sub>. # $P < 0.05$  vs el grupo S, \* $P < 0.05$  vs el grupo V. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba Student-Newman-Keuls.

#### 7.6.4 Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas con LNE

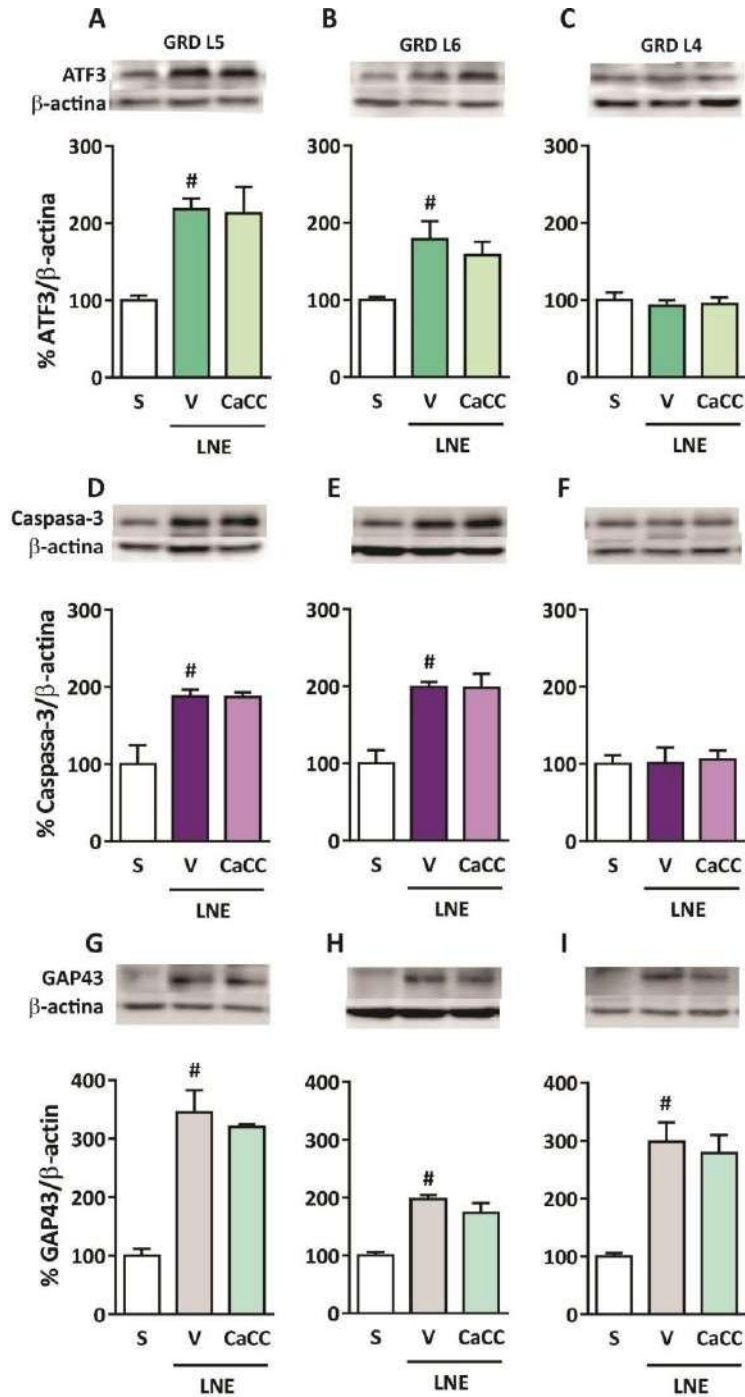
El bloqueo del canal Best1 en ratas con LNE se determinó saber si era capaz de modificar la expresión de los marcadores ATF3, caspasa-3 y GAP43 en los GRD L5, L6 y L4, mediante la administración i.t. de una sola dosis de 10 µg del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub>.

Como se había demostrado previamente en el curso temporal de expresión, no se modificó la expresión del canal Best1 a los 7 días después de la LNE en los GRD L5, L6 lesionados y L4 no lesionado (Fig. 42A a 42C). En estos animales el tratamiento con CaCC<sub>inh-A01</sub> no tuvo ningún efecto (Fig. 42)



**Figura 42.** Efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1 en ratas con LNE. Efecto de la administración i.t. del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1 en los GRD L5 (A), L6 (B) y L4 (C) en ratas con LNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, CaCC: CaCC<sub>inh-A01</sub>. Prueba de ANOVA de una vía, no significativa.

Por otra parte, la administración de CaCC<sub>inh-A01</sub> no tuvo efecto en el aumento en la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 inducido por la LNE en los GRD L5 y L6 (Fig. 43). De igual manera, el CaCC<sub>inh-A01</sub> no tuvo efecto en el aumento de la expresión de GAP43 en el nervio L4 no lesionado inducido por la ligadura (Fig. 43I).



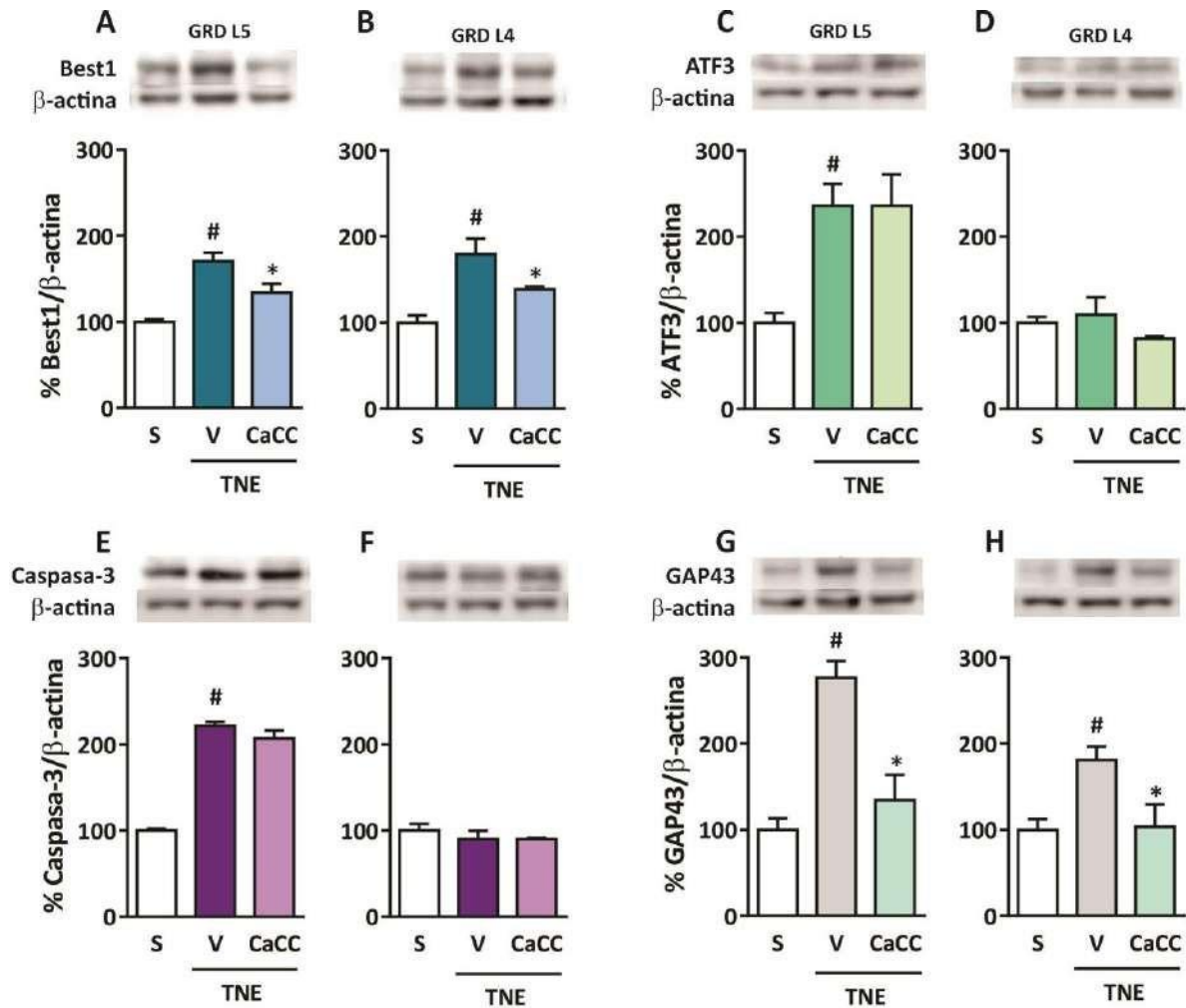
**Figura 43.** Efecto de CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la LNE. Efecto de la administración i.t. del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de ATF3 (A-C), caspasa-3 (D-F) y GAP43 (G-I) en los GRD L5, L6 y L4 en ratas con LNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, CaCC: CaCC<sub>inh-A01</sub>. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. # $P < 0.05$  vs el grupo S.

Estos datos indican que los cambios inducidos por la LNE en la expresión de Ano1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 no dependen de la acción del canal Best1.

#### *7.6.5 Efecto del CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en ratas con TNE*

En el caso de los animales con TNE se observó que la administración i.t. del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> redujo el aumento en la expresión de Best1 (Fig. 44A y 44B) y de GAP43 (Fig. 44G y 44H) inducida por la transección del nervio L5, tanto en el GRD L5 lesionado como en el L4 no lesionado. El bloqueador no tuvo efecto en el aumento de la expresión de ATF3 (Fig. 44C y 44D) y caspasa-3 (Fig. 44E y 44F) observado en el GRD L5 después de la TNE.

Estos resultados indican que el canal Best1 participa en la regulación de su propia expresión, así como en la expresión de GAP43.



**Figura 44.** Efecto de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  sobre la expresión de Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 en la TNE. Efecto de la administración i.t. del bloqueador  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  sobre la expresión de Best1 (A, B), ATF3 (C, D), caspasa-3 (E, F) y GAP43 (G, H) en los GRD L5 lesionado y L4 no lesionado de ratas con TNE. Los datos se expresan como la media  $\pm$  e.e. del porcentaje de expresión normalizado contra  $\beta$ -actina ( $n = 3$ ). S: sham, V: vehículo, CaCC:  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ . Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student Newman Keuls. <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs el grupo S., <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs el grupo V.

En las tablas 1, 2 y 3 se muestran resumidos los efectos de la administración i.t. de los bloqueadores T16A<sub>inh-A01</sub>, MONNA y CaCC<sub>inh-A01</sub> sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3, caspasa-3 y GAP43 inducida por los modelos de dolor neuropático empleados (LNE y TNE) y por la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve.

Tabla 1. Efectos del bloqueo de los canales Ano1 y Best1 en la LNE.

<b>Ligadura de los nervios espinales</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Proteína evaluada</b>	<b>GRD L5 lesionado</b>	<b>GRD L6 lesionado</b>	<b>GRD L4 no lesionado</b>
<b>Sin Tratamiento (Vehículo)</b>	Ano1	↑	↑	↑
	Best1	-	↑ transitorio	-
	ATF3	↑	↑	-
	Caspasa-3	↑↑	↑	-
	GAP43	↑↑	↑	↑
<b>Bloqueo de Ano1 (T16A<sub>inh-A01</sub> o MONNA)</b>	Ano1	↓	↓	↓
	Best1	-	NM	-
	ATF3	↓	↓	-
	Caspasa-3	↓	↓	-
	GAP43	NM	NM	NM
<b>Bloqueo de Best1 (CaCC<sub>inh-A01</sub>)</b>	Ano1	ND	ND	ND
	Best1	-	-	-
	ATF3	NM	NM	-
	Caspasa-3	NM	NM	-
	GAP43	NM	NM	-

(↑) aumento de la expresión, (↓) disminución de la expresión, (-) sin cambios comparado con la expresión basal, (ND) no determinado, (NM) no modificó la expresión inducida por la LNE.

Tabla 2. Efectos del bloqueo de los canales Ano1 y Best1 en la TNE.

<b>Transección del nervio espinal L5</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>Proteína evaluada</b>	<b>GRD L5 lesionado</b>	<b>GRD L4 no lesionado</b>
<b>Sin Tratamiento (Vehículo)</b>	Ano1	-	-
	Best1	↑	↑
	ATF3	↑	-
	Caspasa-3	↑↑	-
	GAP43	↑↑	↑
<b>Bloqueo de Ano1 (T16A<sub>inh-A01</sub> o MONNA)</b>	Ano1	-	-
	Best1	↓	↓
	ATF3	↓	-
	Caspasa-3	↓	-
	GAP43	NM	NM
<b>Bloqueo de Best1 (CaCC<sub>inh-A01</sub>)</b>	Ano1	ND	ND
	Best1	↓	↓
	ATF3	NM	-
	Caspasa-3	NM	-
	GAP43	↓	↓

(↑) aumento de la expresión, (↓) disminución de la expresión, (-) sin cambios comparado con la expresión basal, (ND) no determinado, (NM) no modificó la expresión inducida por la TNE.

Tabla 3. Efectos del bloqueo de los canales Ano1 y Best1 en la sobreexpresión de Best1.

<b>Sobreexpresión de Best1 en ratas naïve</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Proteína evaluada</b>	<b>GRD L5</b>	<b>GRD L6</b>	<b>GRD L4</b>
<b>Sin Tratamiento (Vehículo)</b>	Ano1	ND	ND	ND
	Best1	↑	↑	↑
	ATF3	-	-	-
	Caspasa-3	-	-	-
	GAP43	↑	↑	↑
<b>Bloqueo de Best1 (CaCC<sub>inh-A01</sub>)</b>	Ano1	ND	ND	ND
	Best1	↓	↓	↓
	ATF3	-	-	-
	Caspasa-3	-	-	-
	GAP43	↓	↓	↓

(↑) aumento de la expresión, (↓) disminución de la expresión, (-) sin cambios comparado con la expresión basal, (ND) no determinado.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Efecto de la LNE o la TNE sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3 y caspasa-3 en los GRD L5/L6

La LNE y TNE son modelos de dolor neuropático ampliamente utilizados. De manera similar a lo que previamente se ha reportado (Kim y Chung, 1992; Liu y cols., 2000), en este estudio se observó que la LNE y TNE provocaron una drástica disminución del umbral del retiro de la pata, lo que se traduce como alodinia mecánica. La alodinia se presenta desde el primer día y se mantiene hasta el día 21 después de la lesión.

En este trabajo se evaluó la participación de los canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> Ano1 y Best1, en ambos modelos de dolor neuropático en la rata. La LNE aumentó la expresión del canal Ano1 en los GRD de nervios lesionados L5 y L6 pero su efecto sobre la expresión de Best1 fue modesto y transitorio. Estos resultados concuerdan con el reporte de Pineda-Farias y cols. (2015) en el que se encontró que la LNE aumenta la expresión del ARNm y de la proteína de Ano1 en un conjunto de GRD que comprende de L4 a L6. En este mismo reporte no se encontraron cambios en la expresión del ARNm o de la proteína de Best1 después de la ligadura (Pineda-Farias y cols., 2015). Es posible que el hecho de haber estudiado la expresión de Best1 en un conjunto de GRD enmascarara el efecto ligero de la LNE sobre la expresión de Best1 que nosotros sí observamos al estudiar cada GRD de manera independiente.

Existen varios reportes que demuestran la participación del canal Ano1 en la transducción de estímulos nocivos (Cho y cols., 2012) y en el procesamiento del dolor de tipo inflamatorio (Liu y cols., 2010; García y cols., 2014; Lee y cols., 2014; Takayama y cols., 2015) y neuropático (Lee y cols., 2014; Pineda-Farias y cols., 2015). Sin embargo, no ha quedado clara la participación del canal Best1 en el dolor neuropático inducido por la LNE (Pineda-Farias y cols., 2015).



Por otra parte, la participación de los canales Ano1 y Best1 en el dolor neuropático inducido por la TNE no ha sido reportado. La TNE aumentó la expresión de Best1, pero no la expresión del canal Ano1 en el GRD L5 lesionado. Estos resultados concuerdan con el estudio de Boudes y cols. (2009) donde reportan que en ratones la transección del nervio ciático aumenta el ARNm de Best1, pero no el de Ano1. Se ha descrito que después de la transección del nervio ciático, la corriente de Cl<sup>-</sup> activada por Ca<sup>2+</sup> (I<sub>Cl(Ca)</sub>) aumenta en las neuronas lesionadas, lo que sugiere la participación de algún miembro de los canales CaCC en la transección de los nervios (Sánchez-Vives y Gallego, 1994; Lancaster y cols., 2002; André y cols., 2003). Además, el tratamiento con el ARNi para Best1 inhibe el incremento en la I<sub>Cl(Ca)</sub> en las neuronas aisladas de ratones cuyo nervio ciático fue transectado (Boudes y cols., 2009). Estos datos sugieren que el canal Best1 podría tener una participación más relevante en el dolor inducido por la transección de los nervios espinales

La regulación de la expresión de los canales Ano1 y Best1 no se conoce completamente. Se ha descrito que en la secuencia promotora del gen de Ano1 se localiza un sitio de unión para el transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6, por sus siglas en inglés) que induce la expresión de Ano1 en el músculo gástrico y en el epitelio bronquial (Mazzone y cols., 2015; Qin y cols., 2016). Se ha reportado que la IL-4 se libera de células no neuronales durante el daño al nervio y es capaz de activar a STAT6 a través de la unión con su receptor IL-4R (Kiguchi y cols., 2015); de esta forma podría modularse la expresión del canal Ano1 en el GRD, pero se requiere más evidencia experimental para sustentar esto. En el caso de Best1, el factor de transcripción SOX9 interactúa con los factores de transcripción MITF y OTX2 para unirse al promotor del gen *BEST1* y promover su transcripción en células del epitelio pigmentario de la retina (Esumi y cols., 2009; Masuda y Esumi, 2010). Aunque no se conoce de qué manera se estaría activando SOX9 en el GRD, se sabe que en las células de Schwann aumenta la expresión de SOX9 después de la lesión al nervio (Balakrishnan y cols., 2016); probablemente la íntima interacción de las células de Schwann con las neuronas del GRD lesionado contribuya a modular la expresión de Best1. La lesión por la ligadura o transección de las fibras nerviosas

promueve la activación de vías de señalización que convergen en la fosforilación y activación de múltiples factores de transcripción, los cuales a su vez regulan la expresión de una gran diversidad de canales iónicos y receptores de membrana (Navarro y cols., 2007). A partir de nuestros datos, queda claro que la activación de las vías de señalización que se desencadenan durante la ligadura o la transección de los nervios periféricos no es la misma, sino que difieren según el tipo de daño que se induce. Esto se aprecia aún más al observar que el curso temporal de la expresión del canal Ano1 y Best1 es transitoria en la LNE, pero la expresión de Best1 es sostenida en la TNE. Incluso, la regulación de la expresión de estos canales difiere entre los GRD L5 y L6 lesionados, lo que podría tener un papel relevante en la respuesta celular ante el daño en cada uno de los GRD analizados.

Por otra parte, el aumento en la expresión del factor de transcripción ATF3 se ha utilizado ampliamente como un marcador que pone en evidencia el daño neuronal en varios modelos de dolor neuropático (Tsujino y cols., 2000; Shortland y cols., 2006; Bráz y Basbaum, 2010; Salinas-Abarca y cols., 2017), aunque no se conoce exactamente de qué manera el ATF3 participa en el dolor neuropático. En este sentido, la LNE y la TNE aumentaron la expresión de ATF3 en los GRD lesionados L5 y L6, pero no en el GRD L4 (no lesionado). Reportes previos han demostrado que el incremento de la expresión de ATF3 después de la lesión del nervio podría ser importante para activar los mecanismos de supervivencia y regeneración neuronal (Seijffers y cols., 2006, 2007; Gey y cols., 2016), pero ATF3 no parece tener una participación directa en la modulación de las conductas nociceptivas (Salinas-Abarca y cols., 2018).

La proteína caspasa-3 se activa y aumenta su expresión en procesos de apoptosis y muerte celular, por lo que se ha utilizado como un marcador de daño celular (Joseph y Levine, 2004; Sekiguchi y cols., 2009; Ding y cols., 2017). De manera similar al efecto observado sobre ATF3, la LNE y la TNE aumentaron la expresión de caspasa-3 en los GRD L5 y L6 ligados o L5 transectado, pero no modificaron la expresión de caspasa-3 en el GRD L4 (no lesionado). En este sentido, se puede apreciar que el

aumento en la expresión de ATF3 y caspasa-3 es mayor y sostenida en la TNE comparada con la expresión transitoria de estos marcadores en la LNE. Si se considera que cuanto mayor es la expresión de ATF3 y caspasa-3 mayor es el daño provocado por la lesión, se puede sugerir que la diferencia en la expresión de los canales Ano1 y Best1 depende del grado de la lesión del nervio, por lo que nuestros datos apoyan que la TNE estará causando un daño mayor que la LNE.

## **8.2 Efecto de la LNE o TNE sobre la expresión de Ano1, Best1, ATF3 y caspasa-3 en el GRD L4**

La LNE aumentó la expresión de Ano1 pero no de Best1 en el GRD L4 (no lesionado). En contraste, la TNE aumentó la expresión de Best1 pero no la de Ano1 en el GRD L4, lo que sugiere que la regulación de los canales CaCC, va más allá de sólo incrementar su respuesta al daño. Previamente se ha reportado que en el nervio no lesionado varios receptores, canales iónicos y neuropéptidos aumentan su expresión después de la ligadura del nervio espinal L5. Por ejemplo, el receptor TRPV1 (Fukuoka y cols., 2002), TRPA1 (Katsura y cols., 2006); canales Nav1.3 y Nav1.8 (Fukuoka y cols., 2012), CGRP (Fukuoka y cols., 1998) y BDNF (Fukuoka y cols., 2001). Sin embargo, nuestro estudio es el primer reporte en el cual se describe el aumento de un canal iónico (Best1) en el GRD L4 (no lesionado) después de la transección del L5. Además, en nuestro trabajo queda claro que la LNE incrementa la expresión de Ano1 en el GRD L4, lo cual no pudo observarse en el trabajo reportado por Pineda-Farias y cols. (2015), ya que en ese caso el análisis de la expresión de Ano1 se realizó en una mezcla de GRD L4, L5 y L6.

El aumento en la expresión de las proteínas Ano1 o Best1 en el GRD L4 no se debe a una lesión causada durante el procedimiento quirúrgico, ya que la LNE y TNE no aumentaron la expresión de ATF3 y caspasa-3. Estos datos confirman que el nervio espinal L4 no está dañado y que los cambios observados en la expresión de proteínas del GRD L4 son consecuencia de la lesión provocada en los nervios adyacentes L5 y L6.

El desarrollo del dolor neuropático está asociado al aumento de la excitabilidad de las neuronas lesionadas del nervio espinal L5. Sin embargo, cuando el GRD L5 se remueve por ganglionectomía o se secciona el nervio espinal L5 por rizotomía para excluir su contribución al dolor neuropático, aún hay presencia de hiperalgesia mecánica en ratas (Sheth y cols., 2002). Por eso se ha propuesto que los nervios no dañados adyacentes al nervio lesionado contribuyen al mantenimiento del dolor neuropático. De hecho, se ha reportado que después de la transección de L5 aumenta la excitabilidad de L4 (Djoughri y cols., 2012). Además, el aumento en la expresión de canales iónicos y neuromoduladores excitadores se ha correlacionado con el incremento en la actividad espontánea encontrada en neuronas no lesionadas del GRD L4 (Djoughri y cols., 2012; Gemes y cols., 2013).

El mecanismo por el cual el GRD L4 (no lesionado) cambia la expresión de proteínas y contribuye al dolor neuropático no se sabe con claridad. Se ha propuesto que la liberación de citocinas proinflamatorias durante la degeneración Walleriana del axón lesionado influye en el cambio de fenotipo de las neuronas del GRD del nervio L4 no lesionado (Li y cols., 2000; Sheth y cols., 2002; Ringkamp y Meyer, 2005). Esto se sustenta por el hecho de que la constricción crónica del nervio ciático en ratones C57B1/Wld que no desarrollan degeneración Walleriana produce una menor hiperalgesia térmica y mecánica y una reducida re-arborización de las fibras nerviosas simpáticas, comparado con la hiperalgesia de los ratones silvestres (Ramer y cols., 1997).

Se ha postulado que el nervio L4 no lesionado puede generar nuevas ramificaciones dendríticas que permiten hacer contacto sináptico con el nervio L5 lesionado (Ramer y cols., 1997; Djoughri y cols., 2012; Gemes y cols., 2013). Por esta razón se determinó la expresión de la proteína GAP43, la cual se considera un marcador de procesos de regeneración neuronal (Meiri y cols., 1988; Woolf y cols., 1992; Seiffers y cols., 2006).

### **8.3 Efecto de la LNE o TNE sobre la expresión del marcador GAP43**

La proteína GAP43 participa en la polimerización de los filamentos de actina para la elongación del cono axonal y su actividad se regula al ser fosforilada por la PKC (He y cols., 1997; Dent y cols., 1998). La sobreexpresión de GAP43 favorece el crecimiento de neuritas y del cono axonal de los nervios lesionados (Woolf y cols., 1990; Coggeshall y cols., 1991), por lo que es posible que un aumento en su expresión favorezca la recuperación del daño provocado por la cirugía.

Los datos obtenidos indican que tanto la LNE como la TNE aumentan la expresión de GAP43 en los GRD L5 y L6 lesionado, así como en el GRD L4 no lesionado. A nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta que la lesión de los nervios espinales induce el incremento de GAP43 en el GRD L4 no lesionado. Aunque nuestros resultados no nos permiten determinar cuál es la función que lleva a cabo GAP43 en los GRD de nervios lesionados o intactos, se puede sugerir que la expresión de proteínas relacionadas con la reparación del daño promueve la supervivencia de las neuronas dañadas, como ha sido descrito previamente (Seiffers y cols., 2007). En el caso del nervio no lesionado, GAP43 pudiera favorecer el crecimiento de neuritas e incluso rearborización dendrítica (Woolf y cols., 1990; Coggeshall y cols., 1991), lo que contribuiría al mantenimiento del dolor neuropático. Sin embargo, sería necesario realizar experimentos diseñados para probar estas hipótesis.

### **8.4 Efecto del bloqueo de Ano1 en la LNE o TNE**

Existe evidencia que demuestra que el bloqueo farmacológico o molecular del canal Ano1 reduce la alodinia mecánica y la hiperalgesia térmica en ratas y ratones neuropáticos (Lee y cols., 2014; Pineda-Farías y cols., 2015). Previamente se ha reportado que una sola administración de T16A<sub>inh-A01</sub> reduce la alodinia mecánica hasta por 8 h y que la administración repetida del bloqueador disminuye la expresión de Ano1 en el conjunto de GRD L4 a L6 (Pineda-Farías y cols., 2015). En nuestro

estudio se demostró que la administración i.t. repetida (cada 24 h durante 3 días) de los bloqueadores del canal Ano1, T16A<sub>inh-A01</sub> y MONNA en ratas con LNE es capaz de reducir la alodinia mecánica de manera sostenida hasta por 14 días. Además, la administración repetida de los bloqueadores de Ano1 no solo disminuyó el incremento de la expresión del canal Ano1 inducido por la LNE en los GRD L5 y L6 lesionados, sino también en el GRD L4 no lesionado.

De manera interesante, la administración repetida del T16A<sub>inh-A01</sub> disminuyó ligeramente (hasta por 7 días) la alodinia mecánica inducida por la transección en ratas con TNE. Sin embargo, la administración del bloqueador MONNA no tuvo este efecto. Si bien, se ha reportado que el bloqueador T16A<sub>inh-A01</sub> es selectivo para los canales Ano1 y no se une a otro tipo de canal de Cl<sup>-</sup> (Namkung y cols., 2011; Bradley y cols., 2014), se ha demostrado que dependiendo de la dosis, el T16A<sub>inh-A01</sub> es capaz de inhibir canales Ca<sub>v</sub> en células A7r5 (Boedtkjer y cols., 2015). Esto toma importancia ya que en la TNE se ha reportado un aumento de la expresión de canales Ca<sub>v</sub> (Li y cols., 2004); el bloqueo de estos canales con las dosis que nosotros empleamos de T16A<sub>inh-A01</sub> podría contribuir al efecto antialodínico observado en ratas con TNE y que no se observó con el MONNA, lo que sugiere que los canales Ano1 no participan en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático inducido por la TNE.

Por otro lado, se observó que la administración repetida de T16A<sub>inh-A01</sub> o de MONNA redujo parcialmente el incremento en la expresión de ATF3 inducida por la LNE o la TNE en los GRD lesionados. De manera similar, los bloqueadores de Ano1 atenuaron de manera modesta el aumento de la expresión de caspasa-3, únicamente 7 días después de la LNE, sin modificar el aumento de la expresión inducido por la TNE. El mecanismo por el cual, el bloqueo de Ano1 disminuye la expresión de ATF3 y caspasa-3 se desconoce. Sin embargo, nosotros hipotetizamos que al bloquear el canal Ano1, la hiperexcitabilidad causada por la activación de este canal disminuye (Liu y cols., 2010; Jin y cols., 2013; Lee y cols., 2014; Pineda-Farias y cols., 2015; Takayama y cols., 2015). Al reducir la excitabilidad se reduce también la entrada de

Ca<sup>2+</sup>, lo que puede contribuir a la menor activación de las vías de señalización dependientes de Ca<sup>2+</sup> que induzcan la activación y expresión de ATF3 y caspasa-3. Para demostrar si una reducción en la excitabilidad inducida por la LNE o la TNE puede atenuar el aumento en la expresión de los marcadores de daño (ATF3 y caspasa-3), se realizó la administración de gabapentina, un fármaco ampliamente utilizado para reducir el dolor neuropático (Hunter y cols., 1997).

### **8.5 Efecto de la gabapentina sobre Ano1, ATF3 y caspasa-3 en la LNE o TNE**

La administración repetida de gabapentina (durante 3 días cada 24 h) revirtió la alodinia mecánica inducida tanto por la LNE como por la TNE. La gabapentina es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento del dolor neuropático (Hunter y cols., 1997; Abdi y cols., 1998; Salinas-Abarca y cols., 2017). Se ha propuesto que el mecanismo de acción de la gabapentina es su unión a la subunidad  $\alpha_2\delta$  de los canales Cav (Gee y cols., 1996) y la inhibición de la transmisión glutamatérgica (Suman-Chauhan y cols., 1993). Además, existe evidencia que demuestra que la gabapentina es capaz de suprimir la actividad eléctrica espontánea de las neuronas lesionadas por constricción crónica del nervio ciático, sin modificar la velocidad de conducción de las fibras mecanorreceptoras que detectan estímulos inocuos (Pan y cols., 1999). Recientemente se ha demostrado que la subunidad  $\alpha_2\delta$  interacciona con el receptor NMDA para potenciar la transmisión sináptica excitadora y que la gabapentina inhibe esta interacción disminuyendo la excitabilidad neuronal y, por consiguiente, reduciendo la nocicepción (Chen y cols., 2018).

Los resultados obtenidos indican que la administración i.t. repetida de gabapentina reduce el incremento en la expresión de Ano1 inducida por la LNE, sin afectar la expresión de basal de Ano1 en ratas con TNE. Además, la gabapentina redujo el aumento en la expresión de ATF3 inducido por la LNE y la TNE en el GRD L5 y disminuyó parcialmente el aumento en la expresión de caspasa-3 en el GRD de nervio ligado L5, sin modificar la expresión de esta proteína en el GRD L5 transectado. La diferencia en la capacidad de la gabapentina para atenuar la

expresión de caspasa-3 en la LNE, pero no en la TNE, podría explicarse en parte por la severidad del daño que ocurre en la TNE. Estos datos sugieren que la reducción de la excitabilidad neuronal disminuye la expresión de canales iónicos excitadores como Ano1 y en consecuencia esto atenúa las conductas nociceptivas y el daño neuronal. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para dilucidar estos mecanismos.

## **8.6 Efecto de la sobreexpresión de Best1 sobre la alodinia mecánica**

Para evidenciar el papel del canal Best1 en el procesamiento nociceptivo se sobreexpresó Best1 mediante la administración i.t. repetida del plásmido pCMV6-Best1 en ratas naïve. Las ratas que sobreexpresaron Best1 desarrollaron alodinia mecánica después del inicio de la administración del plásmido y hasta por 10 días. Hasta el momento, no existe en la literatura un reporte previo acerca del efecto pronociceptivo de la sobreexpresión de Best1 en ratas naïve.

La alodinia mecánica inducida por la sobreexpresión de Best1 se debió específicamente a la actividad de Best1, ya que ésta se redujo en presencia del bloqueador no selectivo de los canales CaCC, el CaCC<sub>inh-A01</sub>. Aunque se ha reportado que el CaCC<sub>inh-A01</sub> bloquea tanto al canal Best1 como al canal Ano1 (De la Fuente y cols., 2008; Namkung y cols., 2010; Liu y cols., 2015), la administración de T16A<sub>inh-A01</sub> no revirtió la alodinia mecánica en ratas que sobreexpresaron Best1, sugiriendo que el efecto antialodínico observado con el tratamiento del CaCC<sub>inh-A01</sub> está mediado específicamente por el bloqueo de Best1.

Por otro lado, la sobreexpresión de Best1 no modificó la expresión de los marcadores de daño ATF3 y caspasa-3 en los nervios evaluados, por lo que podemos concluir que la sobreexpresión de Best1 no produce daño neuronal *per se*. En contraste, la sobreexpresión de Best1 aumentó la expresión del marcador de regeneración GAP43 en los GRD L4, L5, y L6 y su expresión disminuyó con la administración del bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub>. Estos datos sugieren que el canal Best1 modula la expresión



de GAP43, pero se requieren más experimentos para elucidar el mecanismo a través del cual se produce esta regulación.

## **8.7 Efecto del bloqueo de Best1 sobre la LNE y TNE**

El bloqueo del canal Best1 por el  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  disminuyó la alodinia mecánica producida por la LNE. Si bien nuestros datos demuestran que la LNE no incrementa la expresión de Best1, no se puede descartar la posibilidad de que el bloqueo de los canales Best1 presentes de manera basal en el GRD sea suficiente para atenuar la alodinia mecánica en ratas con LNE. Estos datos concuerdan con lo reportado por Pineda-Farias y cols. (2015) donde se observa que la administración del  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  disminuye la alodinia mecánica en ratas con LNE y que la administración i.t. repetida del anticuerpo anti-Best1 revierte la alodinia mecánica en ratas con LNE (Pineda-Farias y cols., 2015).

Por otra parte, este es el primer reporte en el que se describe que la alodinia mecánica producida por la TNE se reduce al bloquear al canal Best1 por el  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$ . Nuestros datos indican que en la TNE el canal Best1 tiene un papel relevante, no así el canal Ano1, el cual es importante en la LNE. De hecho, la alodinia mecánica inducida por la TNE sólo se reduce por el inhibidor  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  y no por el  $\text{T16A}_{\text{inh-A01}}$  o MONNA. Aunque se ha reportado que  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  inhibe ambos canales CaCC, también se ha reportado que  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  presenta un efecto mayor sobre Best1 que sobre Ano1 (Boedtkjer y cols., 2015).

Además, nuestros datos muestran que la administración de  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  disminuye el incremento en la expresión de Best1 inducido por la TNE. El mecanismo por el cual el  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  disminuye la expresión de Best1 no se conoce. Sin embargo, se ha descrito que el  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  induce la ubiquitinación de Ano1 lo que favorece su degradación por la vía del proteosoma (Bill y cols., 2014). Además, se ha reportado que el tratamiento con el  $\text{CaCC}_{\text{inh-A01}}$  reduce el incremento de la expresión de Ano1 producido por la administración de formalina al 1% (García y cols., 2014) y por la LNE

(Pineda-Farias y cols., 2015). Es posible que un mecanismo similar al descrito para Ano1 que involucre procesos de ubiquitinación pudiera estar involucrado en la disminución de la expresión de Best1.

Por otro lado, la administración del CaCC<sub>inh-A01</sub> en las ratas con LNE o TNE no disminuyó el incremento de la expresión de ATF3 ni de caspasa-3 inducido por la lesión en los GRD L5 y L6. Probablemente, esto pueda explicarse debido a que con una sola dosis del bloqueador no sea suficiente para atenuar la expresión de los marcadores de daño que el canal Best1 no esté involucrado en los mecanismos que subyacen a la disminución de la expresión de ATF3 y caspasa-3. Por otra parte, el tratamiento con el bloqueador CaCC<sub>inh-A01</sub> no redujo la expresión del marcador de regeneración GAP43 en ratas con LNE, pero sí disminuyó la expresión de este marcador en ratas con TNE. Se ha demostrado que la administración del ARN<sub>i</sub> para Best1, pero no del ARN<sub>i</sub> para Ano1, atenúa la I<sub>Cl(Ca)</sub> en neuronas de ratones con transección del nervio ciático (Boudes y cols., 2009). Más aún, se ha visto que las neuronas de ratones con transección del nervio ciático incrementan la I<sub>Cl(Ca)</sub> y la inhibición de esta corriente disminuye el crecimiento de neuritas (André y cols., 2003). Es por ello que se ha correlacionado el aumento de la I<sub>Cl(Ca)</sub> en las neuronas que muestran crecimiento de neuritas con la expresión de Best1, pero no de Ano1, en la transección del nervio ciático y se ha sugerido que el canal Best1 pudiera participar en procesos de regeneración neuronal.

En conjunto, estos datos sugieren que el canal Best1 tiene un papel pronociceptivo y su expresión tanto en el GRD L5 lesionado como en el L4 no lesionado pudiera estar asociada con los mecanismos de reborización neuronal aberrante que contribuyen al mantenimiento del dolor después de la lesión del nervio.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

- La LNE aumenta la expresión del canal Ano1 en los GRD de los nervios lesionados L5/L6, de esta forma Ano1 participa en la excitabilidad neuronal y en la generación de conductas nociceptivas. Además, la LNE aumenta la expresión de Ano1 en el GRD del nervio L4 no lesionado, lo que podría contribuir al incremento de la actividad espontánea reportada en este GRD cuando los nervios espinales L5 y L6 están lesionados.
- El bloqueo de Ano1 produce un efecto antialodínico de manera sostenida y disminuye el incremento de la expresión de Ano1 inducida por la LNE, lo que sugiere que el bloqueo de Ano1 contribuye en la atenuación de la hiperexcitabilidad neuronal y en consecuencia disminuye las conductas nociceptivas inducidas por la ligadura del nervio.
- El bloqueo de Ano1 atenúa el aumento de la expresión de ATF3 y caspasa-3 inducido por la lesión de los nervios, lo que sugiere que el tratamiento con fármacos que inhiban la actividad eléctrica neuronal pudiera contribuir a la disminución de los mecanismos del daño neuronal.
- La TNE incrementa la expresión del canal Best1 en el GRD lesionado L5, lo que sugiere que este canal puede participar en la excitabilidad neuronal desarrollada en la TNE. Más aún, en el GRD L4 no lesionado incrementa la expresión de Best1, contribuyendo de esta manera a mantener la hiperexcitabilidad neuronal.
- La sobreexpresión de Best1 en los GRD L4, L5 y L6 de ratas naïve produce alodinia mecánica, sugiriendo que Best1 tiene un papel pronociceptivo.
- El bloqueo farmacológico de la sobreexpresión de Best1 produce un efecto antialodínico y disminuye el aumento de la expresión de Best1. Estos datos

sugieren que el canal Best1 pudiera contribuir al mantenimiento del dolor neuropático inducido por la TNE.

- La sobreexpresión de Best1 aumenta la expresión del marcador de regeneración neuronal GAP43 y el bloqueador de los canales CaCC revierte el aumento, lo que sugiere que la expresión de Best1 está implicada en la activación de los mecanismos que conllevan a la reparación del daño neuronal.

## 10. CONCLUSIÓN GENERAL

El canal Ano1 participa principalmente en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático inducido por la LNE, mientras que el canal Best1 tiene un papel más relevante en el dolor neuropático inducido por la TNE. Esto sugiere que la LNE y la TNE desencadenan mecanismos distintos que repercuten en la expresión diferencial de los canales Ano1 y Best1 en los GRD L5 y L6 lesionado y L4 no lesionado, contribuyendo al desarrollo y mantenimiento de dolor neuropático (Fig. 45).

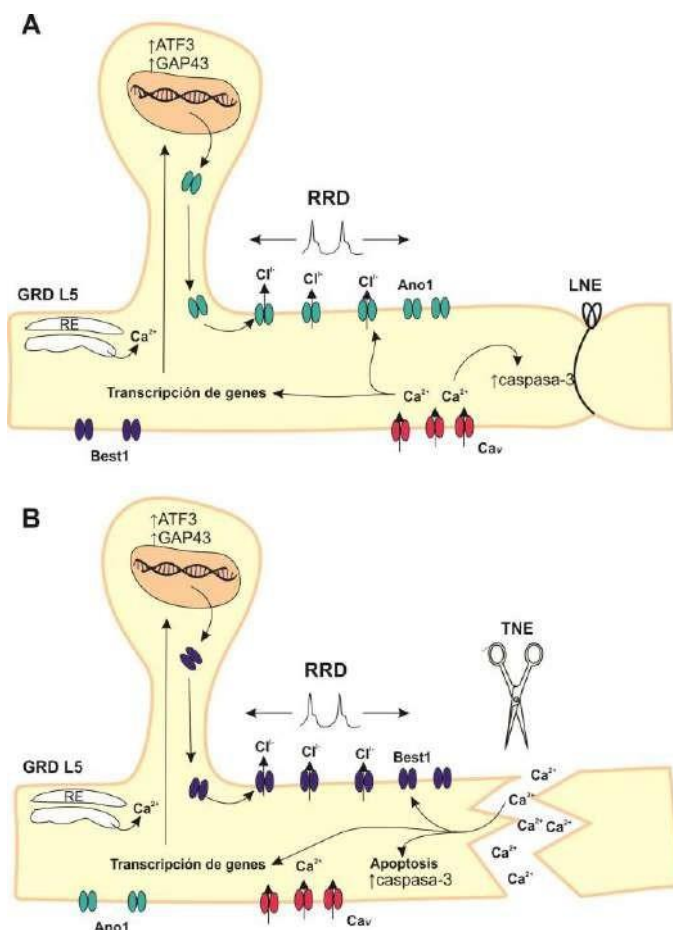


Figura 45. Participación de los canales Ano1 y Best1 en el dolor neuropático inducido por la LNE y TNE. A) La LNE incrementa la expresión de Ano1 en el GRD. El incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  por la apertura de canales  $Ca_v$  o de la liberación del retículo endoplásmico (RE) puede activar factores de la transcripción involucrados en la transcripción del gen de Ano1. En la LNE, la activación de Ano1 incrementa la excitabilidad neuronal y podría generar reflejos de raíz dorsal (RRD). B) La TNE incrementa la expresión de Best1 posiblemente al exponer el contenido intracelular a altas  $[Ca^{2+}]_i$ . La apertura del canal Best1 es importante en la hiperexcitabilidad neuronal observada en la TNE.

## 11. PERSPECTIVAS

1. Determinar mediante inmunocitoquímica si la LNE o la TNE inducen una distribución diferencial en los canales Ano1 y Best1 en el ganglio de la raíz dorsal y en la médula espinal dorsal.
2. Evaluar la participación del canal Best1 en el dolor neuropático inducido por la LNE o la TNE mediante el uso de un ARNi.
3. Evaluar mediante técnicas moleculares y farmacológicas la participación de Best1 en el crecimiento de neuritas en neuronas del ganglio de la raíz dorsal.
4. Evaluar mediante técnicas moleculares la modulación del canal Best1 sobre la expresión de la proteína GAP43.
5. Profundizar en las diferencias de la expresión basal de los canales Ano1 y Best1 en los GRD L4, L5 y L6 y estudiar su contribución en el procesamiento nociceptivo.
6. Estudiar mediante técnicas moleculares los probables mecanismos que contribuyan a la expresión diferencial de los canales Ano1 y Best1 en la ligadura y la transección de los nervios espinales.

## 12. REFERENCIAS

- Abdi S, Lee DH, Chung JM. (1998) The anti-allodynic effects of amitriptyline, gabapentin, and lidocaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg*, 87(6):1360-1366.
- Allodi I, Udina E, Navarro X. (2012) Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*, 98: 16-37.
- André S, Boukhaddaoui H, Campo B, Al-Jumaily M, Mayeux V, Greuet D, Valmier J, Scamps F. (2003) Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol*, 90(6): 3764-3773.
- Balakrishnan A, Stykel MG, Touahri Y, Stratton JA, Biemaskie J, Schuurmans C. (2016) Temporal analysis of gene expression in the murine Schannn cell Lineage and the acutely injured postnatal nerve. *PLoS ONE*, 11(4): e0153256.
- Barish ME. (1983) A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus oocyte*. *J Physiol*, 342: 309-325.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139: 267-284.
- Basbaum AI, Jessel TM. (2000) Perception of pain. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of Neural Science. McGraw-Hill, p: 47-492.
- Bennett GJ, Xie YK. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33: 87-107.
- Bill A, Hall ML, Borawski J, Hodgson C, Jenkins J, Piechon P, Popa O, Rothwell C, Tranter P, Tria S, Wagner T, Whitehead L, Gaither LA. (2014) Small molecule-facilitated degradation of ANO1 protein: a new targeting approach for anticancer therapeutics. *J Biol Chem*, 289(16): 11029-11041.
- Blair NT, Bean BP. (2003) Role of tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current slow inactivation in adaptation of action potential firing in small-diameter dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 23(32): 10338-10350.

- Boedtkjer DM, Kim S, Jensen AB, Matchkov VM, Andersson KE. (2015) New selective inhibitors of calcium-activated chloride channels - T16A<sub>inh</sub>-A01, CaCC<sub>inh</sub>-A01 and MONNA - what do they inhibit? *Br J Pharmacol*, 172(16): 4158-4172.
- Boudes M, Sar C, Menigoz A, Hilaire C, Péquignot MO, Kozlenkov A, Marmorstein A, Carroll P, Valmier J, Scamps F. (2009) *Best1* is a gene regulated by nerve injury and required for Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current expression in axotomized sensory neurons. *J Neurosci*, 29(32): 10063-10071.
- Boudes M, Scamps F. (2012) Calcium-activated chloride current expression in axotomized sensory neurons: what for? *Front Mol Neurosci*, 5: 35.
- Bradley E, Fedigan S, Webb T, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG, Sergeant GP. (2014) Pharmacological characterization of TMEM16A currents. *Channels (Austin)*, 8(4): 308-320.
- Bráz JM, Basbaum AI. (2010) Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain*, 150: 290-301.
- Cervero F, Laird JMA. (1996) Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*, 68: 13-23.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 53(1): 55-63.
- Chen J, Li L, Chen SR, Chen H, Xie JD, Sirrieh RE, MacLean DM, Zhang Y, Zhou MH, Jayaraman V, Pan HL. (2018) The  $\alpha 2\delta$ -1-NMDA receptor complex is critically involved in neuropathic pain development and gabapentin therapeutic actions. *Cell Rep*, 22(9): 2307-2321.
- Chen P, Piao X, Bonaldo P. (2015) Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol*, 130(5): 605-618.
- Cho H, Yang YD, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back SK, Na HS, Harfe BD, Wang F, Raouf R, Wood JN, Oh U. (2012) The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci*, 15(7): 1015-1021.
- Coggeshall RE, Reynolds ML, Woolf CJ. (1991) Distribution of the growth associated protein GAP-43 in the central processes of axotomized primary afferents in the



adult rat spinal cord; presence of growth cone-like structures. *Neurosci Lett*, 131(1): 37-41.

Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies and National Research Council. (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. 8<sup>th</sup> ed. The National Academies Press. Washington, D.C.

Cortes-Romero C, Galindo F, Galicia-Isasmendi S, Flores A. (2011) GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol*, 52: 665-675.

De La Fuente R, Namkung W, Mills A, Verkman AS. (2008) Small-molecule screen identifies inhibitors of a human intestinal calcium-activated chloride channel. *Mol Pharmacol*. 73(3): 758-768.

Decosterd I, Woolf CJ. (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 87: 149-158.

Dent EW, Meiri KF. (1998) Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. *J Neurobiol*, 35(3): 287-299.

Ding R, Sun B, Liu Z, Yao X, Wang H, Shen X, Jiang H, Chen J. (2017) Advanced oxidative protein products cause pain hypersensitivity in rats by inducing dorsal root ganglion neurons apoptosis via NADPH oxidase 4/c-Jun N-terminal kinase pathways. *Front Mol Neurosci*, 10: 195.

Dixon WJ. (1980) Efficient analysis of experimental observation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 20: 441-462.

Djoughri L, Fang X, Koutsikou S, Lawson SN. (2012) Partial nerve injury induces electrophysiological changes in conducting (uninjured) nociceptive and nonnociceptive DRG neurons: Possible relationships to aspects of peripheral neuropathic pain and paresthesias. *Pain*, 153(9): 1824-1836.

Djoughri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN. (2006) Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci*, 26(4): 1281-1292.

Duran C, Hartzell. (2011) Physiological roles and diseases of tmem16/anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin*, 31: 685-692.

- Esumi N, Kachi S, Hackler L Jr, Masuda T, Yang Z, Campochiaro PA, Zack DJ. (2009) BEST1 expression in the retinal pigment epithelium is modulated by OTX family members. *Hum Mol Genet*, 18(1): 128-141.
- Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. (2001) Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J Neurosci*, 21(13): 4891-4900.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K. (1998) Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA<sub>A</sub> receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain*, 78(1): 13-26.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K. (2002) VR1, but not P2X<sub>3</sub>, increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain*, 99(1-2): 111-120.
- Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K. (2012) Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. *Pain*, 153(1): 68-79.
- García G, Martínez-Rojas VA, Rocha-González HI, Granados-Soto V, Murbartián J. (2014) Evidence for the participation of Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels in formalin-induced acute and chronic nociception. *Brain Res*, 1579: 35-44.
- Geden MJ, Deshmukh M. (2016) Axon degeneration: context defines distinct pathways. *Curr Opin Neurobiol*, 39: 108-115.
- Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem*, 271(10): 5768-5776.
- Gemes G, Koopmeiners A, Rigaud M, Lirk P, Sapunar D, Bangaru ML, Vilceanu D, Garrison SR, Ljubkovic M, Mueller SJ, Stucky CL, Hogan QH. (2013) Failure of action potential propagation in sensory neurons: mechanisms and loss of afferent filtering in C-type units after painful nerve injury. *J Physiol*, 591(4): 1111-1131.
- Gey M, Wanner R, Schilling C, Pedro MT, Sinske D, Knöll B. (2016) Atf3 mutant mice show reduced axon regeneration and impaired regeneration-associated gene induction after peripheral nerve injury. *Open Biol*, 6(8): pii: 160091.
- Giordano J. (2005) The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician*, 8: 277-290.

- Gold MS. (2000) Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. *Pain*, 84: 117-120.
- Hartzell C, Putzier I, Arreola J. (2005) Calcium-activated chloride channels. *Ann Rev Physiol*, 67: 22.10-22.40.
- Hartzell C, Qu Z, Yu Z, Xiao Q, Chien LT. (2008) Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to Best disease and other retinopathies. *Physiol Rev*, 88: 639-672.
- He Q, Dent EW, Meiri KF. (1997) Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J Neurosci*, 17(10): 3515-3524.
- He Z, Jin Y. (2016) Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron*, 90: 437-451.
- Hu J, Mata M, Hao S, Zhang G, Fink DJ. (2004) Central sprouting of uninjured small fiber afferents in the adult rat spinal cord following spinal nerve ligation. *Eur J Neurosci*, 20: 1705-1712.
- Hunter JC, Gogas KR, Hedley LR, Jacobson LO, Kassotakis L, Thompson J, Fontana DJ. (1997) The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. *Eur J Pharmacol*, 324(2-3): 153-160.
- Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice ASC, Treede RD. (2011) A new definition of neuropathic pain. *Pain*, 152(10): 2204-2205.
- Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. (2014) Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*, 13: 533-548.
- Jin X, Shah S, Du X, Zhang H, Gamper N. (2013) Activation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel ANO1 by localized Ca<sup>2+</sup> signals. *J Physiol*, 594(1): 19-30.
- Joseph EK, Levine JD. (2004) Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Eur J Neurosci*, 20(11): 2896-2902.
- Kaneko H, Putzier I, Frings S, Gensch T. (2002) Determination of intracellular chloride concentration in dorsal root ganglion neurons by fluorescent lifetime imaging. En: Fuller CM. Calcium-activated chloride channels. *Curr Top Membr*, 53: 167- 189.
- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Sakagami M, Noguchi K. (2006) Antisense knock down of TRPA1,

but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol*, 200(1): 112-123.

Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S. (2015) Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain*, 156: 684-693.

Kim SH, Chung JM. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50(3): 355-363.

Laird JMA, García-Nicas E, Delpirec EJ, Cervero F. (2004) Presynaptic inhibition and spinal pain processing in mice: a possible role of the NKCC1 cation-chloride co-transporter in hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 361: 200-203.

Lancaster E, Oh EJ, Gover T, Weinreich D. (2002) Calcium and calcium-activated currents in vagotomized rat primary vagal afferent neurons. *J Physiol*, 540(Pt 2): 543-56.

Latremoliere A, Woolf CJ. (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, 10(9): 895-926.

Leblanc N, Forrest AS, Ayon RJ, Wiwchar M, Angermann JE, Pritchard HA, Singer CA, Valencik ML, Britton F, Greenwood IA. (2015) Molecular and functional significance of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle. *Pulm Circ*, 5(2): 244-268.

Lee B, Cho H, Jung J, Yang YD, Yang DJ, Oh U. (2014) Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol Pain*, 10(1): 5.

Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD. (2004). Spinal dorsal horn calcium channel  $\alpha 2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J. Neurosci.* 24, 8494-8499.

Li Y, Dorsi MJ, Meyer RA, Belzberg AJ. (2000) Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain*, 85(3): 493-502.

Liu B1, Linley JE, Du X, Zhang X, Ooi L, Zhang H, Gamper N. (2010) The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K<sup>+</sup> channels and activation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *J Clin Invest*, 120(4): 1240-1252.

- Liu CN, Wall PD, Ben-Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M. (2000) Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain*, 85: 503-521.
- Liu Y, Zhang H, Huang D, Qi J, Xu J, Gao H, Du X, Gamper N, Zhang H. (2015) Characterization of the effects of Cl<sup>-</sup> channel modulators on TMEM16A and bestrophin-1 Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> channels. *Pflugers Arch*, 467(7): 1417-1430.
- Ma C, Shu Y, Zheng Z, Chen Y, Yao H, Greenquist KW, White FA, LaMotte RH. (2003) Similar electrophysiological changes in axotomized and neighboring intact dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol*, 89(3): 1588-1602.
- Masuda T, Esumi N. (2010) SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem*, 285(35): 26933-26944.
- Mazzone A, Gibbons SJ, Bernard CE, Newsheen S, Middha S, Almada LL, Ordog T, Kendrick ML, Reid Lombardo KM, Shen KR, Galletta LJ, Fernandez-Zapico ME, Farrugia G. (2015) Identification and characterization of a novel promoter for the human ANO1 gene regulated by the transcription factor signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *FASEB J*, 29(1): 152-163.
- McNeil PL, Steinhardt RA. (2003) Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19: 697-731.
- Meiri KF, Willard M, Johnson MI. (1988) Distribution and phosphorylation of the growth-associated protein GAP-43 in regenerating sympathetic neurons in culture. *J Neurosci*, 8(7): 2571-2581.
- Merskey H, Bogduk N. (1994) Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. In: Classification of chronic pain. 2a. ed. IASP Press, Seattle, p: 209-214.
- Milenkovic VM, Rivera A, Horling F, Weber BHF. (2007) Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 282: 1313-1321.
- Millan MJ. (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57: 1-64.
- Namkung W, Phuan PW, Verkman AS. (2011) TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 286(3): 2365-2374.

- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*, 82(4):163-201.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson, SN, (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 2\delta$ -1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Mol Brain Res*, 95: 1-8.
- Pan HL, Eisenach JC, Chen SR. (1999) Gabapentin suppresses ectopic nerve discharges and reverses allodynia in neuropathic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 288(3): 1026-1030.
- Pineda-Farias JB, Barragán-Iglesias P, Loeza-Alcocer E, Torres-López JE, Rocha-González HI, Pérez-Severiano F, Delgado-Lezama R, Granados-Soto V. (2015) Role of anoctamin-1 and bestrophin-1 in spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats. *Mol Pain*, 11: 41.
- Price TJ, Cervero F, De Koninck Y. (2005) Role of cation-chloride cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem*, 5(6): 547-555.
- Qin Y, Jiang Y, Sheikh AS, Shen S, Liu J, Jiang D. (2016) Interleukin-13 stimulates MUC5AC expression via a STAT6-TMEM16A-ERK1/2 pathway in human airway epithelial cells. *Int Immunopharmacol*, 40: 106-114.
- Ramer MS, French GD, Bisby MA. (1997) Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain*, 72(1-2): 71-78.
- Rigaud M, Gemes G, Barabas ME, Chernoff DI, Abram SE, Stucky CL, Hogan QH. (2008) Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: implications for studies of neuropathic pain. *Pain*, 136(1-2): 188-201.
- Ringkamp M, Meyer RA. (2005) Injured versus uninjured afferents: Who is to blame for neuropathic pain? *Anesthesiology*. 103(2): 221-223.
- Rocha-González HI, Mao S, Álvarez-Leefmans FJ. (2008) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: thermodynamic and kinetic aspects. *J Neurophysiol*, 100: 169-184.
- Salinas-Abarca AB, Avila-Rojas SH, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Granados-Soto V. (2017) Formalin injection produces long-lasting hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 797: 83-93.

- Salinas-Abarca AB, Velazquez-Lagunas I, Franco-Enzástiga Ú, Torres-López JE, Rocha-González HI, Granados-Soto V. (2018) ATF2, but not ATF3, participates in the maintenance of nerve injury-induced tactile allodynia and thermal hyperalgesia. *Mol Pain*, 14: 1744806918787427.
- Sánchez-Vives MV, Gallego R. (1994) Calcium-dependent chloride current induced by axotomy in rat sympathetic neurons. *J Physiol*, 475(3): 391-400.
- Scholz J, Woolf C. (2002) Can we conquer pain? *Nature*, 5: 1062-1067.
- Seiffers R, Allchorne AJ, Woolf CJ. (2006) The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*, 32(1-2): 143-154.
- Seiffers R, Mills CD, Woolf CJ. (2007) ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*, 27(30): 7911-7920.
- Sekiguchi M, Sekiguchi Y, Konno S, Kobayashi H, Homma Y, Kikuchi S. (2009) Comparison of neuropathic pain and neuronal apoptosis following nerve root or spinal nerve compression. *Eur Spine J*, 18(12): 1978-1985.
- Sheth RN, Dorsi MJ, Li Y, Murinson BB, Belzberg AJ, Griffin JW, Meyer RA. (2002) Mechanical hyperalgesia after an L5 ventral rhizotomy or an L5 ganglionectomy in the rat. *Pain*, 96(1-2): 63-72.
- Shortland PJ, Baytug B, Krzyzanowska A, McMahon SB, Priestley JV, Averill S. (2006) ATF3 expression in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve transection. *Eur J Neurosci*, 23(2): 365-373.
- Simon DJ, Weimer RM, McLaughlin T, Kallop D, Stanger K, Yang J, O'Leary DDM, Hannoush RN, Tessier-Lavign M.A (2012) Caspase cascade regulating developmental axon degeneration. *J Neurosci*, 32(49): 17540-17553.
- Suman-Chauhan N, Webdale L, Hill DR, Woodruff GN. (1993) Characterisation of [<sup>3</sup>H] gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. *Eur J Pharmacol*, 244(3): 293-301.
- Sun H., Tsunenari T, Yau KW, Nathans. (2002) The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *PNAS*, 99(6): 4008-4013.
- Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, Delpire E. (2000) Abnormal GABA<sub>A</sub> receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci*, 20(20): 7531-7538.

- Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. (2015) Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 112(16): 5213-5218.
- Tseng TJ, Hsieh YL, Ko MH, Hsieh ST. (2014) Redistribution of voltage-gated sodium channels after nerve decompression contributes to relieve neuropathic pain in chronic constriction injury. *Brain Res*, 1589: 15-25.
- Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K. (2000) Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol Cell Neurosci*, 15(2): 170-182.
- Tsunenari T, Sun H, Williams J, Cahill H, Smallwood P, Yau KW, Nathans J. (2003) Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels. *J Biol Chem*, 278(42): 41114-41125.
- Vergne-Salle P, Beaulieu P, Coutaux A, Sichère P, Perrot S, Bertin P. (2015) Aspectos fisiopatológicos del dolor en reumatología. EMC-Aparato Locomotor, Vol. 48(1): 1-8.
- Verkman AS, Galiotta LJV. (2009) Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 8(2): 153-171.
- Whitlock JM, Hartzell HC. (2017) Anoctamins/TMEM16 proteins: chloride channels flirting with lipids and extracellular vesicles. *Annu Rev Physiol*, 79: 119-114.
- Willis WD. (1999) Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res*, 124(4): 395-421.
- Woolf CJ, Reynolds ML, Molander C, O'Brien C, Lindsay RM, Benowitz LI. (1990) The growth-associated protein GAP-43 appears in dorsal root ganglion cells and in the dorsal horn of the rat spinal cord following peripheral nerve injury. *Neurosci*, 34(2): 465-478.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, 355(6355): 75-78.
- Woolf CJ. (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med*, 140: 441-451.
- Woolf CJ. (2010) What is this thing called pain? *J Clin Invest*, 120(11): 3742-3744.



Woolf CJ. (2011) Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3 Suppl): S2-S15.

Wu G, Ringkamp M, Hartke TV, Murinson BB, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA. (2001) Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci*, 21: RC140.

Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y. (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*, 455: 1210-1216.

### 13. ANEXOS

- A partir de los resultados de esta tesis se publicó el siguiente artículo:

García G, Martínez-Rojas VA, Oviedo N, Murbartían J. (2018) Blockade of anoctamin-1 in injured and uninjured nerves reduces neuropathic pain. *Brain Research*, 1696:38-48.

- Resultados parciales de este trabajo de tesis se han presentado en:

Society for Neuroscience 47th Annual Meeting.

García G, Noriega-Navarro R, Muñoz-Castillo PA, Murbartían J. Pronociceptive effect of calcium-activated chloride channel Bestrophin-1. Noviembre 11-15, 2017. Washington D.C., EUA. Presentación póster.

Society for Neuroscience 46th Annual Meeting

Murbartían J. García G. Expression of bestrophin-1 in dorsal root ganglion neurons after nerve injury in the rat. Noviembre 12-16, 2016. San Diego, California, EUA. Presentación póster.

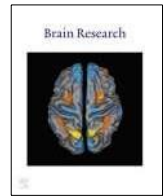
International Association for the Study of Pain 16th World Congress on Pain

García G, Murbartían J. Expression of anoctamin-1 channel in L4, L5 and L6 dorsal root ganglions after spinal nerve ligation in rats. Septiembre 26-30, 2016. Yokohama, Japón. Presentación póster.

- Parte de este trabajo se presentará en:

Society for Neuroscience 48th Annual Meeting

García G, Martínez-Rojas VA, Gutiérrez-Lara EJ, Murbartían J. Decreased protein expression of anoctamin-1 contributes to reduce neuropathic pain induced by spinal nerve ligation. Noviembre 3-7, 2018. San Diego, California, EUA. Presentación póster.



## Research report

## Blockade of anoctamin-1 in injured and uninjured nerves reduces neuropathic pain

Guadalupe García <sup>a</sup>, Vladimir A. Martínez-Rojas <sup>a</sup>, Norma Oviedo <sup>b</sup>, Janet Murbartían <sup>a,†</sup><sup>a</sup> Departamento de Farmacobiología, Cinvestav, Sede Sur. Ciudad de México, Mexico<sup>b</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Centro Médico Nacional, La Raza, IMSS. Ciudad de México, Mexico

## article info

## Article history:

Received 9 September 2017

Received in revised form 12 April 2018

Accepted 1 June 2018

Available online 2 June 2018

## Keywords:

Anoctamin-1  
MONNANeuropathic pain  
T16A<sub>inh-A01</sub>

## abstract

The aim of this study was to determine the participation of anoctamin-1 in 2 models of neuropathic pain in rats (L5/L6 spinal nerve ligation [SNL] and L5 spinal nerve transection [SNT]). SNL and SNT diminished withdrawal threshold in rats. Moreover, SNL up-regulated anoctamin-1 protein expression in injured L5 and uninjured L4 DRG whereas that it enhanced activating transcription factor 3 (ATF-3) and caspase-3 expression only in injured L5 DRG. In marked contrast, SNT enhanced ATF-3 and caspase-3, but not anoctamin-1, expression in injured L5 DRG but it did not modify anoctamin-1, ATF-3 nor caspase-3 expression in uninjured L4 DRG. Accordingly, repeated (3 times) intrathecal injection of the

anoctamin-1 blocker T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1–1 mg) or MONNA (1–10 mg) partially reverted SNL-induced mechan-

ical allodynia in a dose-dependent manner. In contrast, anoctamin-1 blockers only produced a modest effect in SNT-induced mechanical allodynia. Interestingly, intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> (1 mg) or MONNA (10 mg) prevented SNL-induced up-regulation of anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 in injured L5 DRG. Repeated intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA also reduced SNT-induced up-regulation of ATF-3 in injured L5 DRG. In contrast, T16A<sub>inh-A01</sub> and MONNA did not affect SNT-induced up-regulation of caspase-3 expression in L5 DRG. Likewise, gabapentin (100 mg) diminished SNL-induced up-regulation of anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 expression in injured L5 DRG. These data suggest that spinal anoctamin-1 in injured and uninjured DRG participates in the maintenance of neuro-pathic pain in rats. Our data also indicate that expression of anoctamin-1 in DRG is differentially regulated depending on the neuropathic pain model.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Neuropathic pain is defined as pain caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system (Jensen et al., 2011). After injury, the nervous system responds inappropriately to innocuous and noxious stimulation through multiple mechanisms involving several structures of the nervous system. Symptoms of neuropathic pain include spontaneous pain, allodynia (pain sensitivity to normally innocuous stimuli) and hyperalgesia (increased pain perception of noxious stimuli), among others. Neuropathic pain affects 7–8% of the general population (Bouhassira and Attal, 2016). Treatments for neuropathic pain are non-specific and often ineffective (Finnerup et al., 2015). Thus, there is a need for improved and customized treatments for this condition.

L5/L6 spinal nerve ligation (SNL) induces changes in the excitability of injured L5 spinal nerve by increasing spontaneous

ectopic discharge (Han et al., 2000; Liu et al., 2000). Ectopic discharge results from changes in the expression of ionic channels and receptors in the injured dorsal root ganglia (DRG) neurons (Fukuoka et al., 1998, 2015; Kim et al., 2003). Moreover, it is known that uninjured L4 spinal nerve shows spontaneous excitability after injury to L5 or L5/L6 spinal nerves (Gold, 2000; Wu et al., 2001; Hu et al., 2004; Djouhri et al., 2006, 2012). This excitability has been attributed to changes in sodium channels, GABA<sub>A</sub> receptors, TRPV1, among others (Fukuoka et al., 2001, 2002, 2012; Djouhri et al., 2006). The role of anoctamin-1 in uninjured L4 DRG is unclear.

Anoctamins are calcium-activated chloride channels (CaCC) with ubiquitous expression (Caputo et al., 2008; Yang et al., 2008). Anoctamins participate in fluid secretion, smooth muscle contraction, tumorigenesis and nociception (Oh and Jung, 2016). Anoctamin-1 is present in sensory neurons (Liu et al., 2010; Cho et al., 2012; Lee et al., 2014; Pineda-Farias et al., 2015) and their activation induces a chloride efflux (Mayer, 1985; Bader et al., 1987). Thus, activation of anoctamin-1 could induce depolarization

† Corresponding author.

E-mail address: [jmurbartian@cinvestav.mx](mailto:jmurbartian@cinvestav.mx) (J. Murbartían).

of primary afferent fibers and might be a key factor in the generation of nociception. Previous studies have shown that anoctamin-1 augments excitability and contributes to depolarization of DRG neurons (Liu et al., 2010; Cho et al., 2012) suggesting the participation of CaCCs in neuropathic pain. In line with this, there is evidence that anoctamin-1 ablation or pharmacological blockade reduces nociceptive behavior in mice and rats with neuropathic pain (Lee et al., 2014; Pineda-Farias et al., 2015). However, so far there is not a systematic evaluation about the role of anoctamin-1 in injured L5 and uninjured L4 DRG of rats with SNL or spinal nerve transection (SNT). The aim of this study was to determine the expression of anoctamin-1, as well as that of ATF-3 (a nerve injury marker; Tsujino et al., 2000; Shortland et al., 2006; Bráz and Basbaum, 2010) and caspase-3 (an apoptosis marker; Jänicke et al., 1998; Sekiguchi et al., 2009), in injured L5 and uninjured L4 DRG obtained from rats subjected to SNL or SNT. We also assessed the effect of the specific anoctamin-1 blockers T16A<sub>inh-A01</sub> and MONNA in SNL- and SNT-induced tactile allodynia and anoctamin-1 protein expression.

## 2. Results

### 2.1. Nerve injury induces tactile allodynia

L5/L6 SNL or L5 SNT significantly ( $P < 0.001$ ) reduced the 50% withdrawal threshold, as compared to the naïve or sham-operated rats, to values lower than 4 g indicating the presence of tactile allodynia (Fig. 1). Both models produced a similar profile of tactile allodynia in the ipsilateral paw of all rats submitted to the surgery.

### 2.2. Expression of anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3

We identified a single specific band for anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 of about 50, 21 and 32 kDa, respectively. We did not observe immunoreactive bands for these proteins when the primary antibodies were pre-adsorbed with the corresponding antigenic peptides or when primary antibodies were omitted (data not shown). Western blot analysis demonstrated the presence of anoctamin-1, as well as that of ATF-3 and caspase-3, in L5 and L4 DRG of naïve and sham-operated rats (Figs. 2 and 3). SNL enhanced

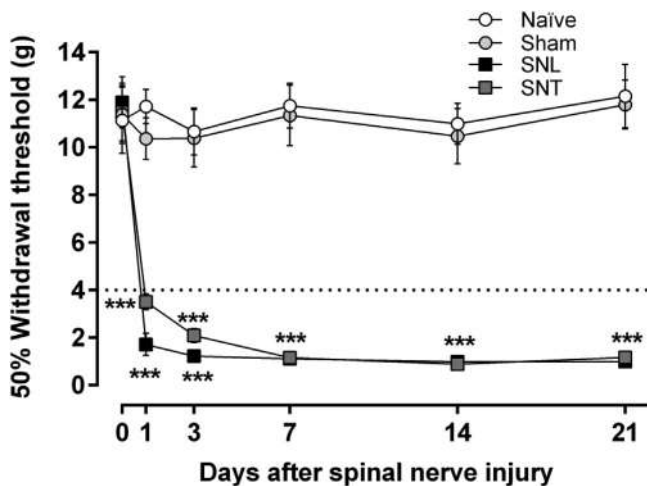


Fig. 1. Time course of withdrawal threshold in rats subjected to L5/L6 spinal nerve ligation (SNL) and L5 spinal nerve transection (SNT). Data are expressed as the mean of 6 rats  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $P < 0.001$ , significantly different from the naïve and sham group by two-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls

test.

anoctamin-1 protein expression in ipsilateral injured L5 DRG and uninjured L4 DRG reaching the maximal expression about 7 days after injury ( $P < 0.05$ , Fig. 2A and B). In contrast, SNL increased ATF-3 ( $P < 0.05$ , Fig. 2C) and caspase-3 ( $P < 0.05$ , Fig. 2E) in ipsilateral injured L5 DRG, but not in ipsilateral uninjured L4 DRG (Fig. 2D and F), reaching the maximal expression 3 and 7 days, respectively, after nerve injury. Anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 expression returned to baseline levels 21 days after SNL. In contrast, SNL did not modify anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 in the contralateral L5 and L4 DRG (Fig. 4).

SNT did not modify the expression of anoctamin-1 in the ipsilateral L5 and L4 DRG, compared to naïve or sham-operated rats (Fig. 3A and B). Notoriously, SNT increased ATF-3 ( $P < 0.05$ , Fig. 3C) and caspase-3 ( $P < 0.05$ , Fig. 3E) protein expression in the ipsilateral injured L5 DRG from 1 to 21 days after nerve injury reaching the maximal expression of both proteins at 3 days. In marked contrast, SNT did not affect protein expression of ATF-3 (Fig. 3D) and caspase-3 (Fig. 3F) in the ipsilateral uninjured L4 DRG. In sharp contrast, SNT did not modify anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 in the contralateral L5 and L4 DRG (Fig. 4).

### 2.3. Antiallodynic effect of the anoctamin-1 blockers T16A<sub>inh-A01</sub> and MONNA

Repeated (daily for 3 days, starting on day 4 after nerve injury) intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1–1 mg) or MONNA (1–10 mg), but not vehicle (1% or 15% DMSO), reverted SNL-induced tactile ( $P < 0.05$ ) in a dose-dependent manner. Interestingly, the effect antiallodynic effect of anoctamin-1 blockers lasted for 14 days after treatment (Fig. 5A and C). In contrast, repeated intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA modestly reverted tactile allodynia induced by SNT ( $P < 0.05$ ) in a dose-dependent fashion. The slight antiallodynic effect of T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA only lasted for 7 days (Fig. 5B and D). At the greatest doses tested, treatment with T16A<sub>inh-A01</sub> (1 mg) or MONNA (10 mg) did not affect baseline threshold in sham-operated rats (data not shown).

### 2.4. T16A<sub>inh-A01</sub> and MONNA reduce anoctamin-1 protein expression

Besides its effect on tactile allodynia, repeated (daily for 3 days, starting on day 4 after nerve injury) intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> (1 mg) reduced SNL-induced up-regulation of anoctamin-1 protein expression in injured L5 and uninjured L4 DRG (Fig. 6A and D). Likewise, this treatment diminished SNL-induced up-regulation of ATF-3 and caspase-3 protein expression in injured L5 DRG (Fig. 6B and C). T16A<sub>inh-A01</sub> (1 mg) did not affect ATF-3 and caspase-3 protein expression in uninjured L4 DRG (Fig. 6E and F).

On the other hand, repeated intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> (1 mg) did not affect anoctamin-1 protein expression in injured L5 and uninjured L4 DRG in rats with SNT (Fig. 6A and D). In contrast, this treatment reduced SNT-induced up-regulation of ATF-3 protein expression in injured L5 DRG (Fig. 6B). T16A<sub>inh-A01</sub> (1 mg) was not able to modify SNT-induced up-regulation of caspase-3 protein expression in injured L5 DRG (Fig. 6C). T16A<sub>inh-A01</sub> (1 mg) did not affect ATF-3 and caspase-3 protein expression in uninjured L4 DRG (Fig. 6E and F).

In order to further confirm the effect of T16A<sub>inh-A01</sub> on anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 protein expression, a more selective anoctamin-1 blocker was used. Repeated (daily for 3 days, starting on day 4 after nerve injury) intrathecal injection of MONNA (10 mg) reduced SNL-induced up-regulation of anoctamin-1 (Fig. 7A), ATF-3 (Fig. 7B) and caspase-3 (Fig. 7C) protein expression in injured L5 DRG. This treatment also diminished SNT-induced up-regulation of ATF-3 (Fig. 7B) but not caspase-3

(Fig. 7C) protein expression in injured L5 DRG. Finally, repeated

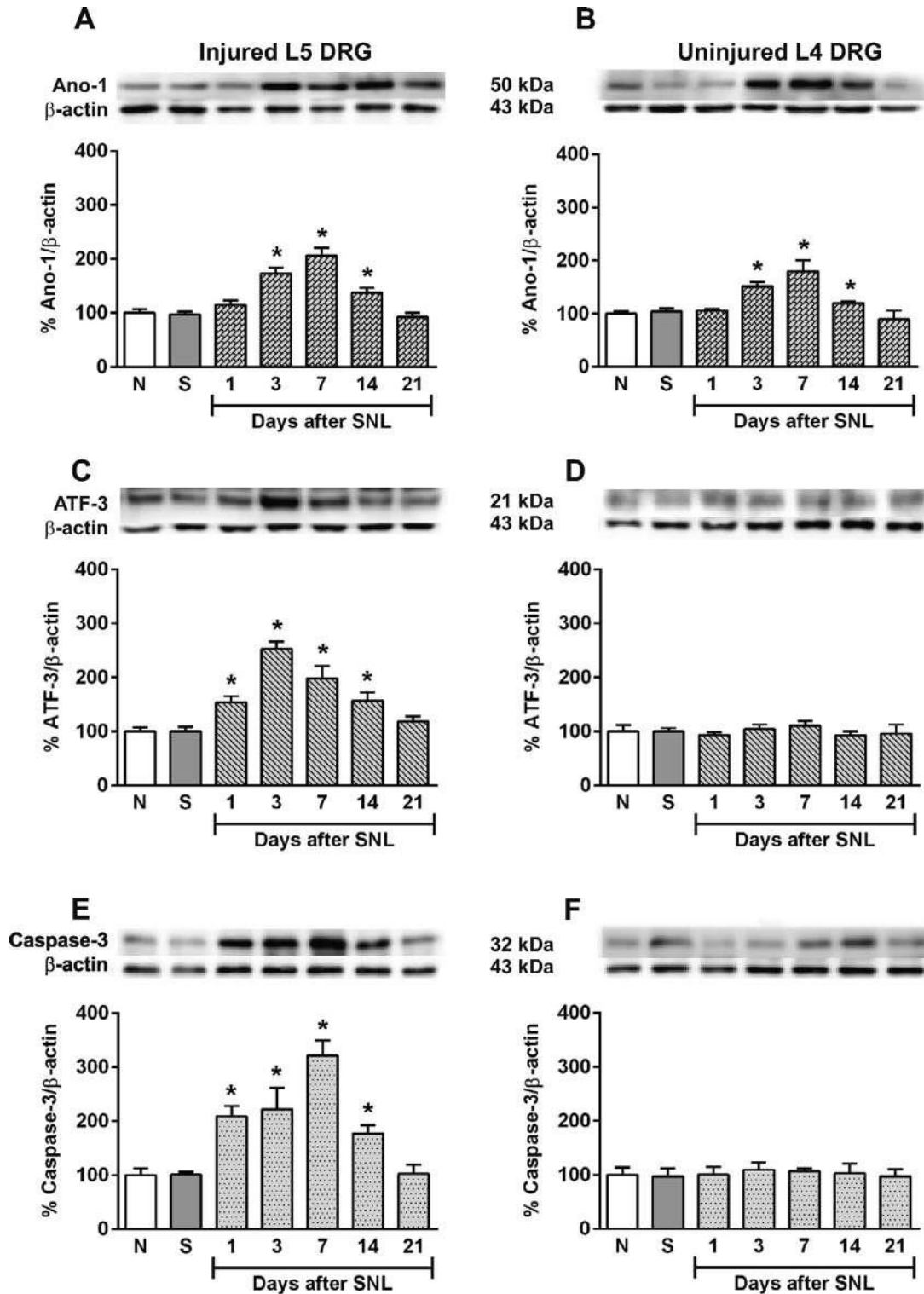


Fig. 2. Time course of the protein expression of anoctamin-1 (Ano-1, panel A and B), ATF-3 (panel C and D) and caspase-3 (panel E and F) from ipsilateral injured L5 (left panels) and uninjured L4 (right panels) DRG obtained from rats subjected to L5/L6 ligation (SNL). Insets show representative blots obtained with anoctamin-1, ATF-3, caspase-3 and  $\beta$ -actin primary antibodies. Data are expressed as the percentage of expression against  $\beta$ -actin. Bars are the mean  $\pm$  S.E.M. of at least 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05 vs naïve (N) or sham (S), by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test.

(daily for 3 days, starting on day 4 after nerve injury) intrathecal injection of gabapentin (100 mg) also reduced SNL-induced up-regulation of anoctamin-1 (Fig. 7D), ATF-3 (Fig. 7E) and caspase-3 (Fig. 7F) expression in injured L5 DRG. Gabapentin treatment

diminished SNT-induced up-regulation of ATF-3 (Fig. 7E) but not caspase-3 (Fig. 7F) protein expression in injured L5 DRG. Of note, this gabapentin treatment was able to reduce tactile allodynia in both models (data not shown).

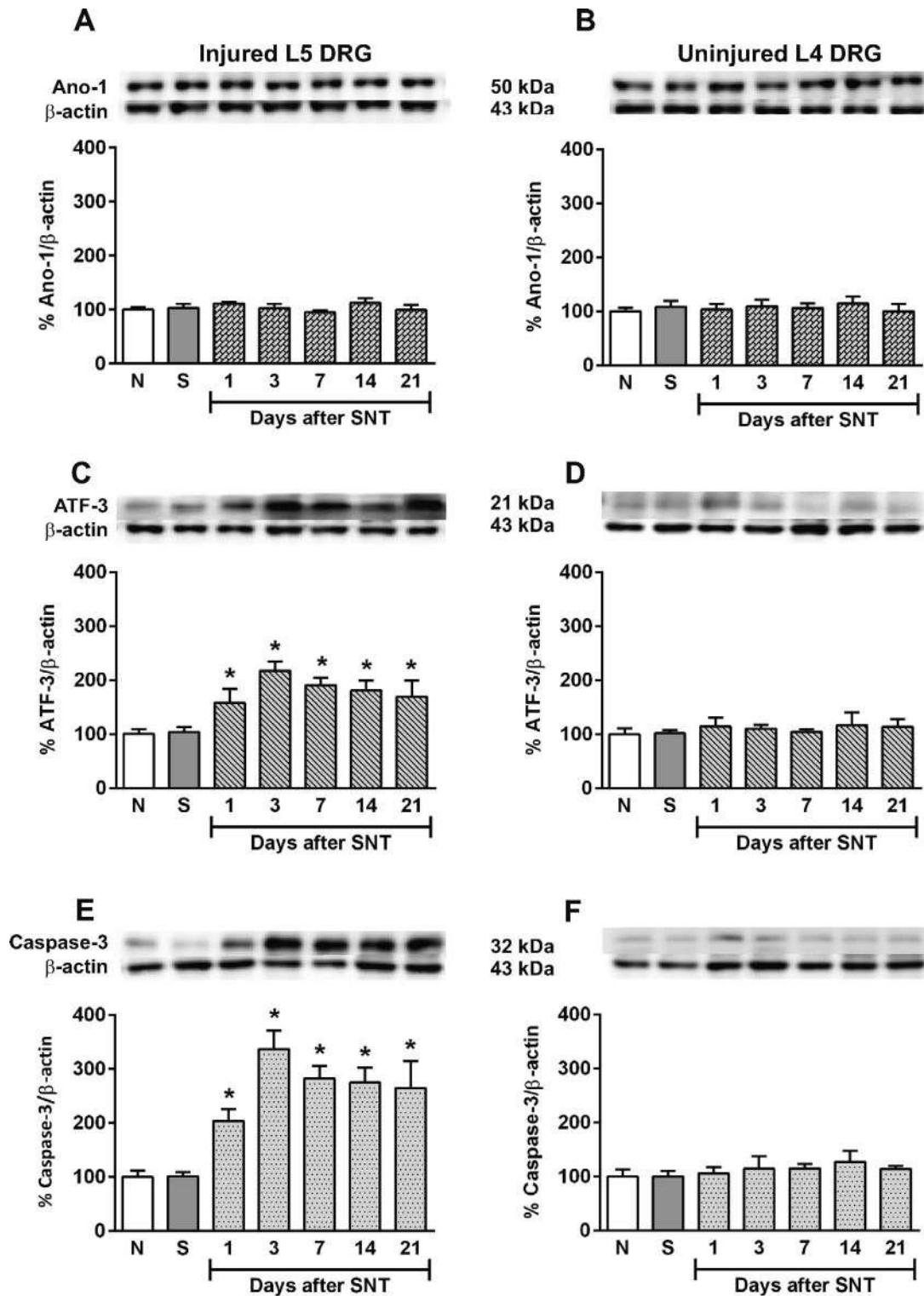


Fig. 3. Time course of the protein expression of anoctamin-1 (Ano-1, panel A and B), ATF-3 (panel C and D) and caspase-3 (panel E and F) from ipsilateral injured L5 (left panels) and uninjured L4 (right panels) DRG obtained from rats subjected to L5 spinal nerve transection (SNT). Insets show representative blots obtained with anoctamin-1, ATF-3, caspase-3 and  $\beta$ -actin primary antibodies. Data are expressed as the percentage of expression against  $\beta$ -actin. Bars are the mean  $\pm$  S.E.M. of at least 4 independent experiments. \* $P < 0.05$  vs naïve (N) or sham (S), by one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test.

### 3. Discussion

In this work we have shown that SNL or SNT induces tactile allodynia in rats. Moreover, SNL up-regulated anoctamin-1 protein expression in the ipsilateral, but not contralateral, injured L5 and

uninjured L4 DRG. Our data agree with previous observations demonstrating that SNL enhances anoctamin-1 protein expression in pooled DRG (Pineda-Farias et al., 2015). However, our study extends these results by demonstrating the expression of anoctamin-1 in individual injured DRG. This enhanced expression

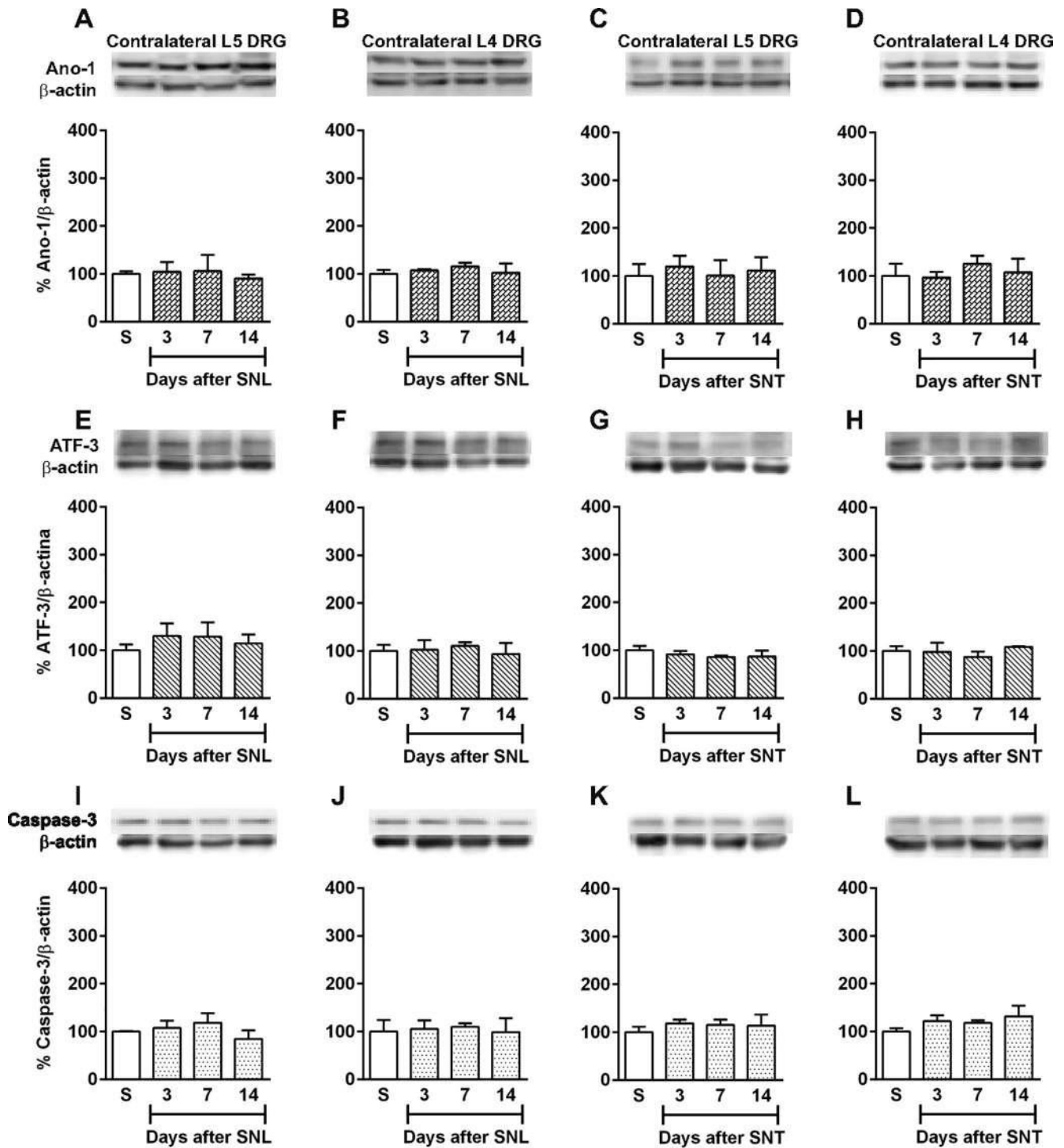


Fig. 4. Time course of the protein expression of anoctamin-1 (Ano-1, panels A–D), ATF-3 (panels E–H) and caspase-3 (panels I–L) from contralateral injured L5 (panels A, C, E, G, I and K) and uninjured L4 (panels B, D, F, H, J and L) DRG obtained from rats subjected to L5/L6 ligation (SNL) or L5 spinal nerve transection (SNT). Insets show representative blots obtained with anoctamin-1, ATF-3, caspase-3 and  $\beta$ -actin primary antibodies. Data are expressed as the percentage of expression against  $\beta$ -actin. Bars are the mean  $\pm$  S.E.M. of at least 3 independent experiments. Sham (S).

of anoctamin-1 could lead to depolarization of L5 DRG neurons (Cho et al., 2012; Pineda-Farias et al., 2015). Furthermore, our results are the first to demonstrate the regulation of this channel in uninjured DRG. SNL-induced up-regulation of anoctamin-1 expression in the ipsilateral L4 DRG could contribute to the spontaneous excitability and pain sensitization reported for uninjured spinal nerves (Djouhri et al., 2006; Fukuoka et al., 2001, 2002, 2012). Nerve damage produces central sensitization that in turn

activates different channels leading to the increase of intracellular  $Ca^{2+}$  levels (Latremoliere and Woolf, 2009). This response is sufficient to activate anoctamin-1 producing chloride efflux and depolarization, which would lead to neuropathic pain. A previous study has shown that axotomy does not affect anoctamin-1 mRNA expression 5 days after nerve injury (Boudes et al., 2009). Our data agree with this study, as we found that SNT did not modify anoctamin-1 protein expression in injured L5 and uninjured L4

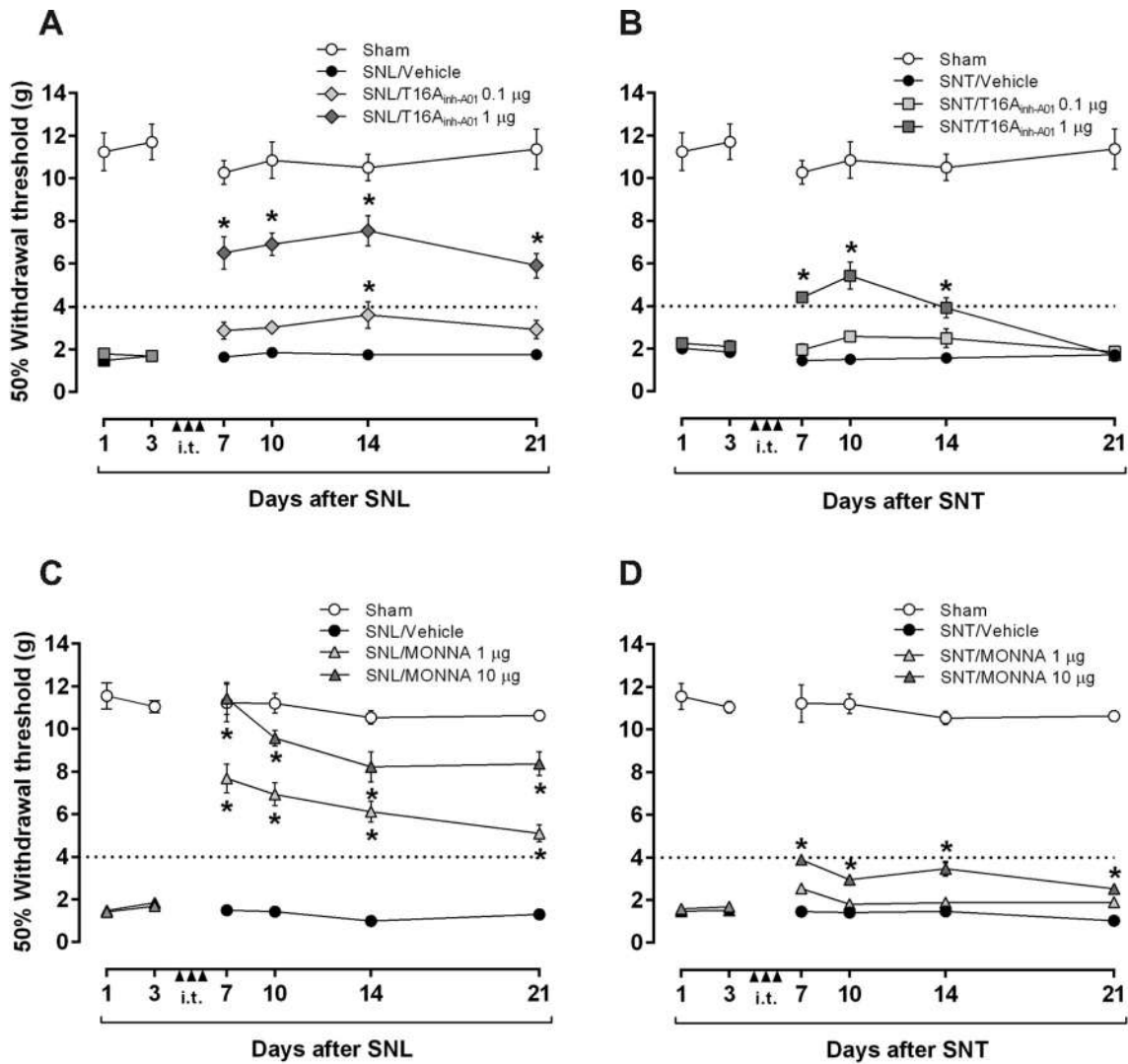


Fig. 5. Effect of the repeated (daily for 3 days, starting 4 days after nerve injury) intrathecal treatment with the selective anoctamin-1 blocker T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1–1 mg) or MONNA (1–10 mg) in rats subjected to spinal nerve ligation (SNL, panels A and C) or spinal nerve transection (SNT, panels B and D). Data are the mean of 6 rats  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  significantly different from the vehicle group, by two-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test.

DRG at several times (1, 3, 7 and 14 days) after nerve injury demonstrating that this channel is not regulated by SNT. In contrast, axotomy leads to the up-regulation of other Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel, bestrophin-1 (Boudes et al., 2009). Differences in anoctamin-1 protein expression could be due to the type of injury or neuropathic pain model used. Besides its effect on anoctamin-1 expression, SNL enhanced transiently the nerve injury marker ATF-3 (Tsujino et al., 2000; Shortland et al., 2006; Bráz and Basbaum, 2010; Salinas-Abarca et al., 2017) and apoptosis marker caspase-3 (Joseph and Levine, 2004; Sekiguchi et al., 2009; Ding et al., 2017) in injured, but not uninjured, DRG. In contrast, SNT increased steadily ATF-3 and caspase-3 protein expression in injured DRG. Interestingly, the time course of the protein expression of these two markers depended on the severity of nerve injury, suggesting that SNT leads to more damage than SNL.

The mechanisms that lead to anoctamin-1 up-regulation by nerve injury are unknown. There is evidence that the promoter region of anoctamin-1 contains putative binding sites for transcription factors including signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) in gastric muscle and epithelial cells (Mazzone et al., 2015; Qin et al., 2016). In addition, interleukin 13 up-regulates anoctamin-1 expression by a STAT6-based transcriptional mechanism

in epithelial cells (Qin et al., 2016). However, this mechanism has not been explored in DRG neurons. Thus, further experiments are needed to elucidate this point.

There is evidence that blockade of anoctamin-1 reduces tactile allodynia and thermal hyperalgesia in neuropathic rats and mice (Lee et al., 2014; Pineda-Farias et al., 2015). Accordingly, we found that repeated intrathecal injection with anoctamin-1 blockers T16A<sub>inh-A01</sub> (Namkung et al., 2011; Bradley et al., 2014) and MONNA (Oh et al., 2013; Boedtker et al., 2015) reverted SNL-induced tactile allodynia in rats. These treatments produced a sustained antiallodynic effect for 14 days. Effects were longer than that induced by a bolus injection of T16A<sub>inh-A01</sub> (Pineda-Farias et al., 2015). Surprisingly, repeated treatment with T16A<sub>inh-A01</sub> also reduced, although a lesser extent, tactile allodynia induced by SNT. This effect, however, was shorter (7 days) than that produced by T16A<sub>inh-A01</sub> in the SNL model (14 days). Since SNT does not lead to an increase of anoctamin-1 expression in DRG, the antiallodynic effect of T16A<sub>inh-A01</sub> in this model could result from other mechanisms, different to the blockade of anoctamin-1. In support of this idea, there is evidence that T16A<sub>inh-A01</sub> inhibits voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in A7r5 cells in a concentration-dependent manner (Boedtker et al., 2015). In line with this, the selective anoctamin-1



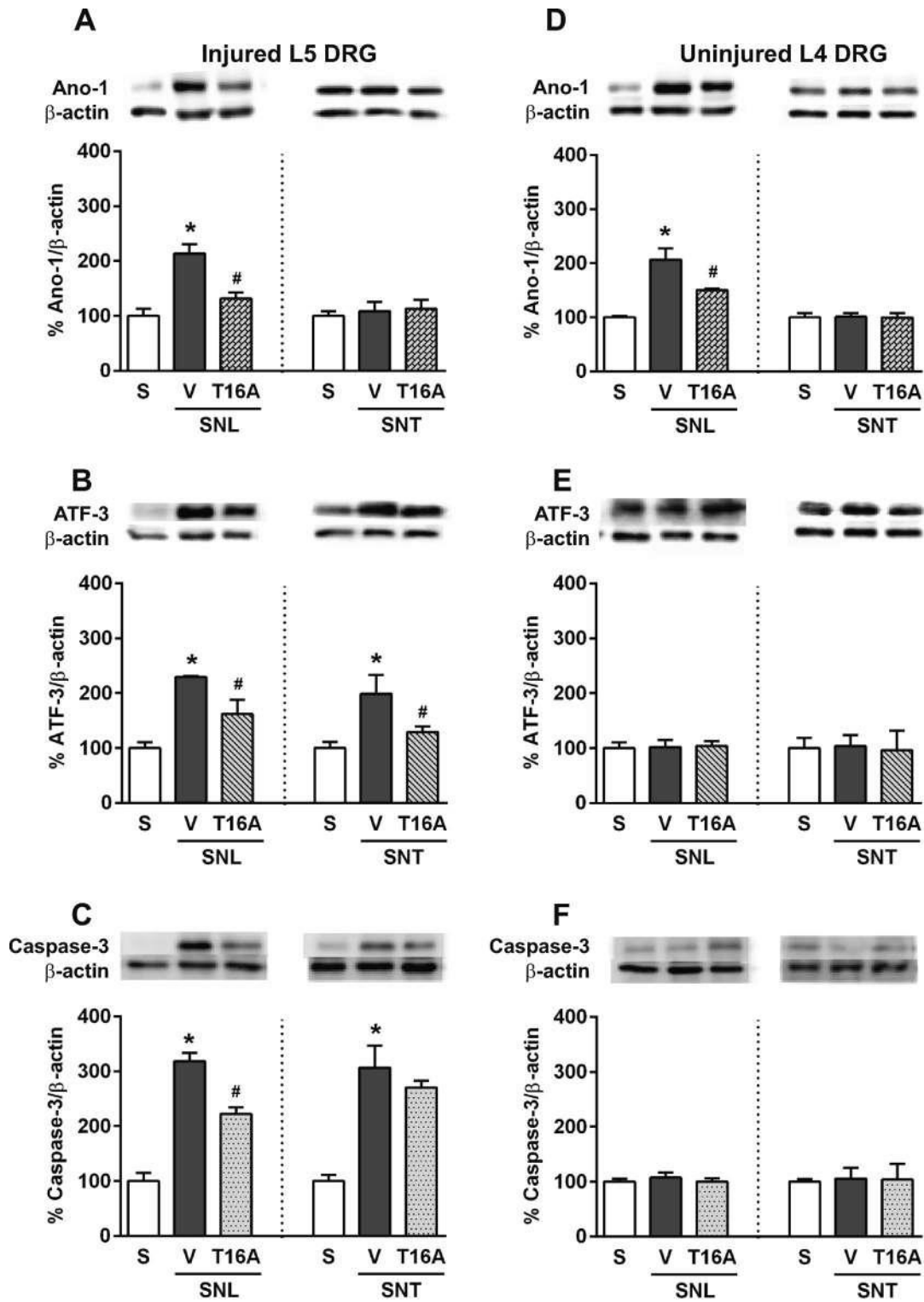


Fig. 6. Effect of the repeated (daily for 3 days, starting 4 days after nerve injury) intrathecal treatment with the anoctamin-1 blocker T16A<sub>inh-A01</sub> (T16A, 1 mg) on nerve injury-induced up-regulation of anoctamin-1 (Ano-1, panel A and D), ATF-3 (panel B and E) and caspase-3 (panel C and F) protein expression in injured L5 (panels A, B and C) and uninjured L4 (panels D, E and F) DRG of rats subjected to SNL or SNT. Inset show representative blots obtained with Ano-1, ATF-3, caspase-3 and  $\beta$ -actin primary antibodies. Data are expressed as the percentage of expression against  $\beta$ -actin. Bars are the mean of 3 independent experiments  $\pm$  S.E.M. \* $P$  < 0.05 vs sham group (S), # $P$  < 0.05 vs vehicle group (V), by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test.

blocker MONNA (Oh et al., 2013) produced a lower effect than that induced by T16A<sub>inh-A01</sub> in this model.

Repeated intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA reduced SNL-induced up-regulation of anoctamin-1 on injured L5 and uninjured L4 DRG. Our data agree with a previous study

showing that T16A<sub>inh-A01</sub> reduces tactile allodynia as well as SNL-induced up-regulation of anoctamin-1 in pooled DRG (Pineda-Farias et al., 2015). Of note, repeated intrathecal injection of T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA also reduced SNL-induced up-regulation of ATF-3 and caspase-3 expression in injured L5 DRG. In contrast,

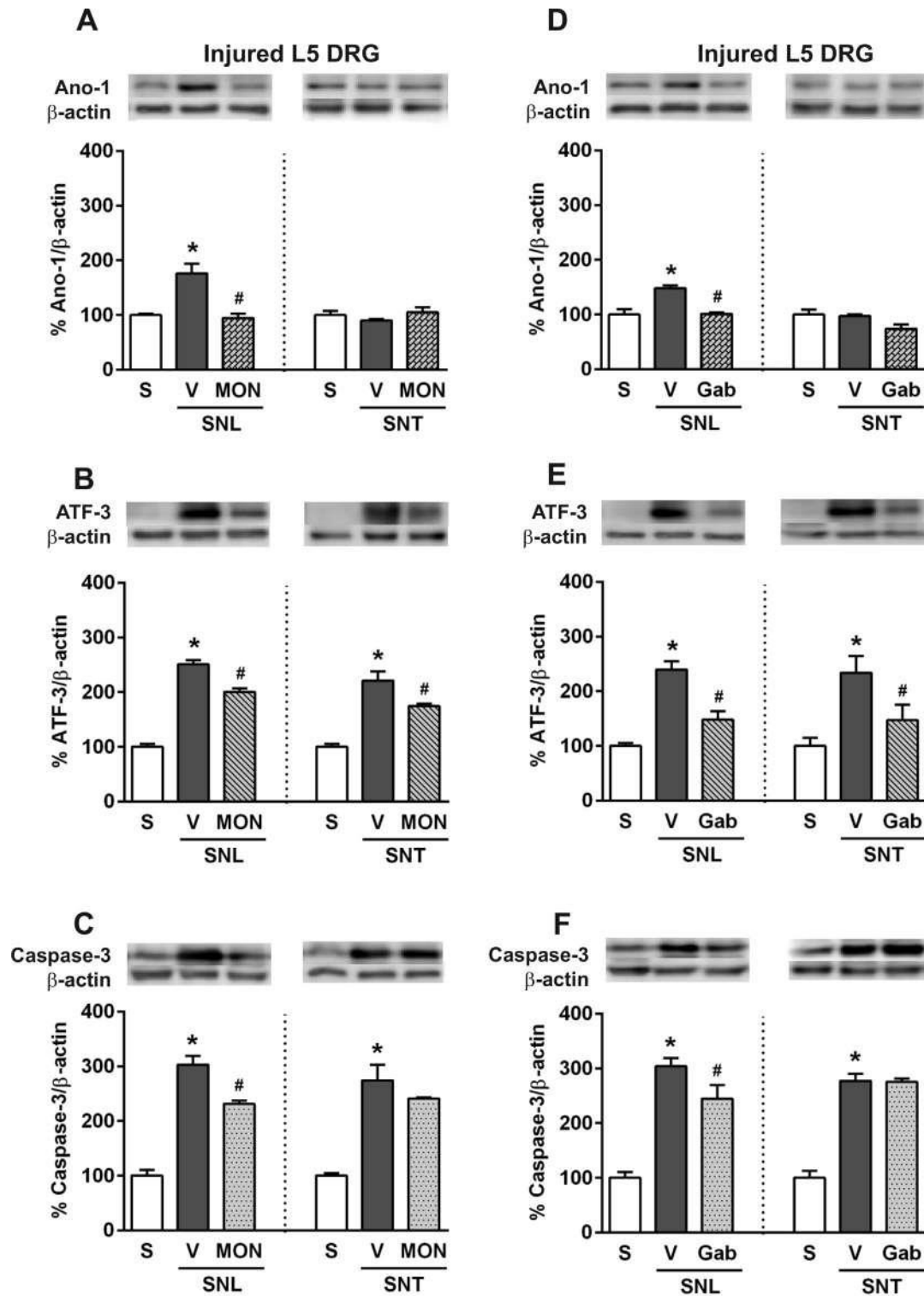


Fig. 7. Effect of the repeated (daily for 3 days, starting 4 days after nerve injury) intrathecal treatment with the anoctamin-1 blocker MONNA (MON, 10 mg) on nerve injury-induced up-regulation of anoctamin-1 (Ano-1, panel A), ATF-3 (panel B) and caspase-3 (panel C) protein expression in injured L5 DRG of rats subjected to SNL or SNT. Effect of the repeated (daily for 3 days, starting 4 days after nerve injury) intrathecal treatment with gabapentin (Gab, 100 mg) on nerve injury-induced up-regulation of anoctamin-1 (Ano-1, panel D), ATF-3 (panel E) and caspase-3 (panel E) protein expression in injured L5 DRG of rats subjected to SNL or SNT. Inset show representative blots obtained with Ano-1, ATF-3, caspase-3 and  $\beta$ -actin primary antibodies. Data are expressed as the percentage of expression against  $\beta$ -actin. Bars are the mean of 3 independent experiments  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs sham group (S), # $P < 0.05$  vs vehicle group (V), by one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test.

T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA were not able to reduce SNT-induced up-regulation of caspase-3 expression in injured L5 DRG. The mechanisms underlying these observations are unknown. It is likely that anoctamin-1 blockers may decrease these proteins by diminishing

the hyperexcitability induced by anoctamin-1 (Liu et al., 2010; Jin et al., 2013; Lee et al., 2014; Pineda-Farias et al., 2015; Takayama et al., 2015). In support of this idea, gabapentin was able to diminish nerve injury-induced tactile allodynia as well as up-regulation

of anoctamin-1, ATF-3 and caspase-3 in both models (SNL and SNT). However, on the basis of the present experiments, we cannot discard other mechanisms, which are out of the scope of this study. The lack of efficacy of T16A<sub>inh-A01</sub> or MONNA to modulate SNT-induced up-regulation of caspase-3 could be attributed to the severity of nerve injury (axotomy).

In conclusion, this study showed that SNL produces tactile allodynia and up-regulation of anoctamin-1 expression in injured and uninjured DRG whereas that SNT induces tactile allodynia without changes in anoctamin-1 expression. Accordingly, SNL induced a transient increase of ATF-3 (nerve injury marker) and caspase-3 (apoptosis marker) in the injured DRG while SNT produced a sustained increase of these markers in the injured DRG. Selective anoctamin-1 blockade reduced tactile allodynia as well as SNL-induced up-regulation of anoctamin-1 in injured and uninjured DRG. In contrast, anoctamin-1 blockade slightly reduced tactile allodynia in rats with SNT. These data suggest that anoctamin-1 expressed in injured L5 and uninjured L4 participates mainly in the maintenance of neuropathic pain induced by SNL.

#### 4. Experimental procedure

##### 4.1. Animals

Female Wistar rats of 130–150 g of weight (6–7 weeks) from our own breeding facilities were used in this study. Female rats were used based on the fact that previous studies from our group have found no differences in tactile allodynia between female and male rats (Caram-Salas et al., 2007). Animals were housed in cages on a standard 12/12 h light/dark cycle and had free access to food and water before experiments. Rats were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber at the end of experiments. All experiments followed the Guidelines on Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals (Zimmermann, 1983) and US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Moreover, local Ethics Committee approved the study (Protocol 0092-14, Cinvestav, Mexico City, Mexico). Efforts were made to minimize the number of animals used.

##### 4.2. Nerve injury-induced neuropathic pain models and measurement of tactile allodynia

Neuropathic pain was induced by L5/L6 SNL or L5 SNT. Briefly, rats were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg, i. p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.). After surgical preparation and exposure of the dorsal vertebral column, the left L5 and L6 spinal nerves were exposed and tightly ligated (SNL) with 6–0 silk suture distal to the DRG (Kim and Chung, 1992). For SNT, only the left L5 spinal nerve was tightly ligated with 6–0 silk and transected 3 mm distal to ligation (Liu et al., 2000). For sham-operated rats, nerves were exposed but not injured. Rats exhibiting motor deficiency such as paw dragging were discarded from the study.

Tactile allodynia in both models was determined according to a previously reported method (Chaplan et al., 1994). After surgery, animals were placed in cages with a mesh grid floor and allowed to acclimate for a minimum of 30 min before performing the experiment. Von Frey filaments (Stoelting Co, Wood Dale, IL) were used to determine the 50% paw withdrawal threshold using the up-down method (Dixon, 1980). A series of filaments, starting with one that had a buckling weight of 2 g, was applied in consecutive sequence to the plantar surface of the left hind paw rat with a pressure causing the filament to buckle. Lifting of the paw indicated a positive response and prompted the use of the next weaker filament, whereas absence of paw withdrawal after 5 sec indicated a negative response and prompted the use of the next heavier fila-

ment in a series. This paradigm continued until four more measurements were made after the initial change of the behavioral response or until five consecutive negative (assigned a score of 15 g) or four consecutive positive (assigned a score of 0.25 g) responses occurred. The resulting scores were used to compute the 50% withdrawal threshold by using the formula: 50% g threshold =  $10^{(Xf + J^d)/10,000}$ , where Xf = value (in log units) of the final von Frey filament used, J = the value from table published by Dixon (1980) for the pattern of positive and/or negative responses, and d = the mean difference (in log units) between stimulus strengths. Allodynia was considered to be present when paw withdrawal thresholds were <4 g.

##### 4.3. Western blotting

For western blot analysis the rats were killed by decapitation and ipsilateral individual dorsal root ganglia (L4 DRG or L5 DRG) were harvested. DRG were homogenized in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, 100 μM PMSF, 2 μg/mL aprotinin, 2 μg/mL leupeptin and 2 μg/mL pepstatin A). Homogenates were centrifuged at 4 °C for 10 min at 14,000 rpm, and the supernatant fraction was used to measure protein concentration by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA). Total protein (40 μg) was resolved by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked during 1 h at room temperature with 5% non-fat milk in phosphate buffered saline at pH 7.4 containing (in mM) (137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and 0.1% Tween 20. Then, they were incubated at 4 °C overnight with rabbit anti-anoctamin-1 (1:200, Cat. ACL-011, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), rabbit anti-ATF-3 (1:300, Cat. sc-188, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), rabbit anti-caspase-3 (1:1000, Cat. 9662, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit 1:3000, Cat. sc-2370, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX or anti-mouse 1:10,000, Cat. 115-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) were applied for detecting the primary antibody signal using a chemiluminescence detection system according to the manufacturer's instructions (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore, Billerica, MA). After anoctamin-1, ATF-3 or caspase-3 detection, membranes were blocked and incubated with a mouse monoclonal antibody directed against β-actin (1:10,000, Cat. MAB1501R, Millipore, Billerica, MA), which was used as a load control to normalize protein expression levels. Scanning of the immunoblots was performed and the bands were quantified by densitometry using a C-digit blot scanner for image acquisition and analysis (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

##### 4.4. Drugs

The specific anoctamin-1 inhibitor 2-[(5-ethyl-1,6-dihydro-4-methyl-6-oxo-2-pyrimidinyl)thio]-N-[4-(4-methoxyphenyl)-2-thiazolyl]acetamide (T16A<sub>inh-A01</sub>, Namkung et al., 2011; Bradley et al., 2014) was purchased from Tocris Bioscience (Avonmouth, Bristol). The selective anoctamin-1 blocker (Oh et al., 2013; Boedtkjer et al., 2015) N-((4-methoxy)-2-naphthyl)-5-nitroanthranilic acid (MONNA) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). T16A<sub>inh-A01</sub> and MONNA were dissolved in 1% and 15% dimethyl sulfoxide (DMSO).

##### 4.5. Experimental design

In order to determine the time course of tactile allodynia in both models, rats were submitted to nerve injury and assessed for tactile allodynia at 1, 3, 7, 14 and 21 days after SNL or SNT.

In order to investigate the expression of anoctamin-1, ATF-3 (nerve injury marker) and caspase-3 (apoptosis marker) in ipsilateral and contralateral injured L5 DRG and uninjured L4 DRG in both neuropathic pain models, rats were submitted to SNL or SNT and sacrificed to get individual L5 and L4 DRG at 1, 3, 7, 14 and 21 days.

In order to determine the role of anoctamin-1 in nerve injury-induced neuropathic pain, rats were treated with T16A<sub>inh-A01</sub> (0.1–1 μg, i.t.), MONNA (1–10 μg, i.t.) or vehicle (1% or 15% DMSO, i.t.) daily for 3 days, starting on day 4 after nerve injury (SNL or SNT). Then, tactile allodynia was assessed from 7 to 21 days after injury. Time selection was based on the fact that SNL produced the greatest enhancement of anoctamin-1 expression 7 days after nerve injury.

As SNL increased anoctamin-1 expression in DRG about 7 days after injury, we next determined anoctamin-1, ATF3 and caspase-3 protein expression in presence and absence of T16A<sub>inh-A01</sub> and MONNA. For this, rats were treated with T16A<sub>inh-A01</sub> (1 μg, i.t.) and MONNA (10 μg, i.t.) daily for 3 days starting on day 4 after nerve injury. Samples of individual DRG were obtained from these rats 1 day after the last injection (day 7 after nerve injury). As an additional control, we used gabapentin (100 μg, i.t.) at the same times.

#### 4.6. Analysis and statistics

Behavioral results are presented as the mean of 6 rats ± S.E.M. Data are expressed as the 50% withdrawal threshold as a function of time. An increase of the 50% withdrawal threshold was considered as antiallodynic effect.

For protein expression, all results are reported as the mean relative intensity ± S.E.M. of 3 independent pooled samples of individual DRG. Each pool sample consisted of 2 rats.

Differences between groups were determined by one- or two-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

#### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

This work is part of the Ph.D. dissertation of Guadalupe García. Guadalupe García and Vladimir A. Martínez-Rojas are Conacyt fellows (fellowship 261810 and 261132, respectively). Authors are grateful with Dr. Emilio J. Galván and Dr. Vinicio Granados-Soto for providing the caspase-3 and anoctamin-1 antibodies, respectively. We are grateful with Dr. Vinicio Granados-Soto for revising the manuscript.

#### References

- Bader, C.R., Bertrand, D., Schlichter, R., 1987. Calcium-activated chloride current in cultured sensory and parasympathetic quail neurones. *J. Physiol.* 394, 125–148.
- Boedtker, D.M., Kim, S., Jensen, A.B., Matchkov, V.M., Andersson, K.E., 2015. New selective inhibitors of calcium-activated chloride channels - T16A<sub>inh-A01</sub>, CaCC<sub>inh-A01</sub> and MONNA - what do they inhibit? *Br. J. Pharmacol.* 172, 4158–4172.
- Boudes, M., Sar, C., Menigoz, A., Hilaire, C., Péquignot, M.O., Kozlenkov, A., Marmorstein, A., Carroll, P., Valmier, J., Scamps, F., 2009. Best1 is a gene regulated by nerve injury and required for Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current expression in axotomized sensory neurons. *J. Neurosci.* 29, 10063–10071.
- Bouhassira, D., Attal, N., 2016. Translational neuropathic pain research: a clinical perspective. *Neuroscience* 338, 27–35.
- Bradley, E., Fedigan, S., Webb, T., Hollywood, M.A., Thornbury, K.D., McHale, N.G., Sergeant, G.P., 2014. Pharmacological characterization of TMEM16A currents. *Channels (Austin)* 8, 308–320.
- Bráz, J.M., Basbaum, A.I., 2010. Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. *Pain* 150, 290–330.
- Caputo, A., Caci, E., Ferrara, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., Galiotta, L.J., 2008. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590–594.
- Caram-Salas, N.L., Reyes-García, G., Bartoszyk, G.D., Araiza-Saldaña, C.I., Ambriz-Tututi, M., Rocha-González, H.I., Arreola-Espino, R., Cruz, S.L., Granados-Soto, V., 2007. Subcutaneous, intrathecal and periaqueuductal grey administration of asimadoline and ICI-204448 reduces tactile allodynia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 573, 75–83.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.
- Cho, H., Yang, Y.D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S.K., Na, H.S., Harfe, B.D., Wang, F., Raouf, R., Wood, J.N., Oh, U., 2012. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 1015–1021.
- Ding, R., Sun, B., Liu, Z., Yao, X., Wang, H., Shen, X., Jiang, H., Chen, J., 2017. Advanced oxidative protein products cause pain hypersensitivity in rats by inducing dorsal root ganglion neurons apoptosis via NADPH oxidase 4/c-Jun N-terminal kinase pathways. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 195.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441–462.
- Djoughri, L., Fang, X., Koutsikou, S., Lawson, S.N., 2012. Partial nerve injury induces electrophysiological changes in conducting (uninjured) nociceptive and nonnociceptive DRG neurons: Possible relationships to aspects of peripheral neuropathic pain and paresthesias. *Pain* 153, 1824–1836.
- Djoughri, L., Koutsikou, S., Fang, X., McMullan, S., Lawson, S.N., 2006. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J. Neurosci.* 26, 1281–1292.
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Kamerman, P.R., Lund, K., Moore, A., Raja, S.N., Rice, A.S., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B.H., Wallace, M., 2015. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 14, 162–173.
- Fukuoka, T., Kondo, E., Dai, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K., 2001. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J. Neurosci.* 21, 4891–4900.
- Fukuoka, T., Miyoshi, K., Noguchi, K., 2015. De novo expression of Nav1.7 in injured putative proprioceptive afferents: multiple tetrodotoxin-sensitive sodium channels are retained in the rat dorsal root after nerve ligation. *Neuroscience* 284, 693–706.
- Fukuoka, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Miki, K., Tachibana, T., Noguchi, K., 1998. Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA<sub>A</sub> receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain* 78, 13–26.
- Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tachibana, T., Dai, Y., Yamanaka, H., Noguchi, K., 2002. VRI, but not P2X<sub>3</sub>, increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain* 99, 111–120.
- Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Okubo, M., Miyoshi, K., Dai, Y., Noguchi, K., 2012. Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. *Pain* 153, 68–79.
- Gold, M.S., 2000. Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. *Pain* 84, 117–120.
- Han, H.C., Lee, D.H., Chung, J.M., 2000. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain* 84, 253–261.
- Hu, J., Mata, M., Hao, S., Zhang, G., Fink, D.J., 2004. Central sprouting of uninjured small fiber afferents in the adult rat spinal cord following spinal nerve ligation. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1705–1712.
- Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G., 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 9357–9360.
- Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S., Treede, R.D., 2011. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 2204–2205.
- Jin, X., Shah, S., Liu, Y., Zhang, H., Lees, M., Fu, Z., Lippiat, J.D., Beech, D.J., Sivaprasadarao, A., Baldwin, S.A., Zhang, H., Gamper, N., 2013. Activation of the Cl<sup>-</sup> channel ANO1 by localized calcium signals in nociceptive sensory neurons requires coupling with the IP<sub>3</sub> receptor. *Sci. Signal* 6, 290.
- Joseph, E.K., Levine, J.D., 2004. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2896–2902.
- Kim, C., Chung, J.M., Chung, K., 2003. Changes in the gene expression of six subtypes of P2X receptors in rat dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. *Neurosci. Lett.* 337, 81–84.
- Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50, 355–363.
- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain* 10, 895–926.
- Lee, B., Cho, H., Jung, J., Yang, Y.D., Yang, D.J., Oh, U., 2014. Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol. Pain* 10, 5.
- Liu, B., Linley, J.E., Du, X., Zhang, X., Ooi, L., Zhang, H., Gamper, N., 2010. The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K<sup>+</sup> channels and activation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *J. Clin. Invest.* 120, 1240–1252.
- Liu, C.N., Wall, P.D., Ben-Dor, E., Michaelis, M., Amir, R., Devor, M., 2000. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 85, 503–521.

- Mayer, M.L., 1985. A calcium-activated chloride current generates the after-depolarization of rat sensory neurones in culture. *J. Physiol.* 364, 217–239.
- Mazzone, A., Gibbons, S.J., Bernard, C.E., Nowsheen, S., Middha, S., Almada, L.L., Ordog, T., Kendrick, M.L., Reid Lombardo, K.M., Shen, K.R., Galletta, L.J.V., Fernandez-Zapico, M.E., Farrugia, G., 2015. Identification and characterization of a novel promoter for the human ANO1 gene regulated by the transcription factor signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6). *FASEB J.* 29, 152–163.
- Namkung, W., Yao, Z., Finkbeiner, W.E., Verkman, A.S., 2011. Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction. *FASEB J.* 25, 4048–4062.
- Oh, S.J., Hwang, S.J., Jung, J., Yu, K., Kim, J., Choi, J.Y., Hartzell, H.C., Roh, E.J., Lee, C.J., 2013. MONNA, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1. *Mol. Pharmacol.* 84, 726–735.
- Oh, U., Jung, J., 2016. Cellular functions of TMEM16/anoctamin. *Pflugers Arch.* 468, 443–453.
- Pineda-Farias, J.B., Barragán-Iglesias, P., Loeza-Alcocer, E., Torres-López, J.E., Rocha-González, H.I., Pérez-Severiano, F., Delgado-Lezama, R., Granados-Soto, V., 2015. Role of anoctamin-1 and bestrophin-1 in spinal nerve ligation-induced neuropathic pain in rats. *Mol. Pain* 11, 41.
- Qin, Y., Jiang, Y., Sheikh, A.S., Shen, S., Liu, J., Jiang, D., 2016. Interleukin-13 stimulates MUC5AC expression via a STAT6-TMEM16A-ERK1/2 pathway in human airway epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* 40, 106–114.
- Salinas-Abarca, A.B., Avila-Rojas, S.H., Barragán-Iglesias, P., Pineda-Farias, J.B., Granados-Soto, V., 2017. Formalin injection produces long-lasting hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 279, 83–93.
- Sekiguchi, M., Sekiguchi, Y., Konno, S., Kobayashi, H., Homma, Y., Kikuchi, S., 2009. Comparison of neuropathic pain and neuronal apoptosis following nerve root or spinal nerve compression. *Eur. Spine J.* 18, 1978–1985.
- Shortland, P.J., Baytug, B., Krzyzanowska, A., McMahon, S.B., Priestley, J.V., Averill, S., 2006. ATF3 expression in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve transection. *Eur. J. Neurosci.* 23, 365–373.
- Takayama, Y., Uta, D., Furue, H., Tominaga, M., 2015. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 5213–5218.
- Tsujino, H., Kondo, E., Fukuoka, T., Dai, Y., Tokunaga, A., Miki, K., Yonenobu, K., Ochi, T., Noguchi, K., 2000. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Mol. Cell Neurosci.* 15, 170–182.
- Wu, G., Ringkamp, M., Hartke, T.V., Murinson, B.B., Campbell, J.N., Griffin, J.W., Meyer, R.A., 2001. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J. Neurosci.* 21, RC140.
- Yang, Y.D., Cho, H., Koo, J.Y., Tak, M.H., Cho, Y., Shim, W.S., Park, S.P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.M., Raouf, R., Shin, Y.K., Oh, U., 2008. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210–1215.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.