



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

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Acople funcional entre el intercambiador NHE1 y el canal TRPA1
en el dolor inflamatorio**

Tesis que presenta

M. en C. Vladimir Alex Martínez Rojas

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN
NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL**

Directora de la Tesis:

Dra. Janet Murbartián Aguilar

El presente trabajo se realizó en los laboratorios 4 y 2 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, así como en el laboratorio de Fisiología Celular de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. La dirección de esta tesis estuvo a cargo de la doctora Janet Murbartián Aguilar.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo del Conacyt mediante la beca de doctorado No. 261132.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado los medios para que esta tesis llegue a un buen término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis agradecimientos.

Agradezco de manera especial y sincera a la **Dra. Janet Murbartián Aguilar** por confiar en el proyecto, por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis. Al **Dr. Vinicio Granados Soto**, gracias por el apoyo y compromiso.

A los doctores: **Ubaldo García Hernández, Francisco Mercado Aca, Norma Leticia Gómez Viquez y Emilio Galván Espinosa**, gracias por sus comentarios y sugerencias al proyecto. Gracias por abrirme las puertas de sus laboratorios. Sobre todo, gracias por las horas compartidas durante los experimentos.

A mis compañeros y amigos:

-En el departamento de farmacobiología del Cinvestav

Al laboratorio 4: Guadalupe, Geovanna, Erika, Roxana, Angélica y Andrea.

Al laboratorio 2: Maritza y Mariana.

A Josué, Osmar, Belén, Úrsula, Alfredo, Alberto, Guadalupe V., Monserrat, Patrick, Sabino.

A la M. en BEI. María del Pilar Quinteros Carrillo por su apoyo y asistencia en la búsqueda de material bibliográfico.

Agradezco a todo el personal que labora en el Departamento de Farmacobiología por contribuir al buen funcionamiento.

-En el Instituto Nacional de Psiquiatría

Al laboratorio de fisiología celular: Pedro, Angélica, Jonathan y Brenda.

-En el departamento de fisiología, biofísica y neurociencias del Cinvestav

A Miguel, Rossana y Francisco.

DEDICATORIAS

Las palabras no podrán describir los aspectos fundamentales que su presencia representa en mi vida.

A ustedes les dedico el producto de más de cuatro años de trabajo.

Amélie y Alexa

Charly

Adaly

Adán

Guadalupe

José Luis

En especial a mis hijas:

El desarrollo de nuevo conocimiento en la ciencia pierde sentido si no se comparte, si no sirve para ayudar.

De forma análoga, la vida toma sentido verdadero cuando estamos dispuestos a compartir y ayudar.

Yo las voy a guiar en este camino en el que se nos permitió coincidir.

Yo las voy a cuidar, enseñar y proteger.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
I. RESUMEN	iv
II. ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Fisiología de la nocicepción.....	1
1.2 Dolor inflamatorio.....	3
1.3 Detección de la acidez por neuronas sensoriales	6
1.4 Corrientes reguladas por H ⁺ en neuronas sensoriales.....	7
1.5 Homeostasis del pH intracelular en las neuronas.....	8
1.5.1 Intercambiador de aniones Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	10
1.5.2 Intercambiador de Na ⁺ /H ⁺	11
1.6 Receptor de potencial transitorio subtipo anquirina 1	14
1.6.1 Expresión del canal TRPA1	14
1.6.2 Características moleculares y biofísicas del canal TRPA1	15
1.6.3 El canal TRPA1 como integrador de estímulos exógenos y endógenos	19
1.6.4 Participación del canal TRPA1 en el dolor inflamatorio	23
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Animales de experimentación	28
5.2 Fármacos	28
5.3 Cultivo primario de neuronas del GRD aisladas de rata adulta	29
5.4 Medición del pH _i mediante microfluorimetría	29
5.5 Medición de la [Ca ²⁺] _i mediante microfluorimetría	31

5.6 Registros electrofisiológicos de neuronas del GRD aisladas de rata adulta	31
5.7 Inmunohistoquímica de neuronas del GRD	32
5.8 Pruebas conductuales	34
5.9 Diseño experimental para la evaluación de las conductas nociceptivas	34
5.10 <i>Western blot</i>	38
5.11 Análisis de datos y estadística.....	39
6. RESULTADOS	41
6.1 Cultivo primario de neuronas del GRD aisladas de rata adulta	41
6.2 Efecto de la zoniporida en el pH_i	42
6.3 Efecto de la zoniporida y el AITC en la $[Ca^{2+}]_i$	44
6.4 Efecto de la zoniporida en la desensibilización del TRPA1	46
6.5 Inmunolocalización de NHE1 y TRPA1	49
6.6 Efecto del A-967079 en el modelo de dolor inflamatorio agudo inducido por formalina	51
6.7 Efecto del A-967079 en el desarrollo del dolor inflamatorio crónico inducido por formalina	52
6.8 Efecto del A-967079 en el mantenimiento del dolor inflamatorio crónico inducido por formalina	54
6.9 Efecto de la inyección de formalina al 1% en la expresión de la proteína de TRPA1.....	56
6.10 Efecto de la zoniporida en la pronocicepción inducida por AITC	57
6.11 Efecto de la zoniporida en la pronocicepción inducida por CFA	59
7. DISCUSIÓN.....	61
7.1 Regulación de la interacción entre NHE1-TRPA1 <i>in vitro</i>	61
7.1.1 Cultivo primario de neuronas del GRD aisladas de rata adulta	61
7.1.2 Efecto de la zoniporida en el pH_i	61
7.1.3 Efecto de la zoniporida en la $[Ca^{2+}]_i$	62
7.1.4 Efecto de la zoniporida en la desensibilización de TRPA1	63
7.2 Regulación de la interacción entre NHE1-TRPA1 <i>in vivo</i>	64
7.2.1 Efecto de A-967079 en el modelo de dolor inflamatorio agudo y crónico inducido por formalina	64

7.2.2 Efecto de la zoniporida en la pronocicepción inducida por AITC y CFA	67
7.2.3 Expresión de NHE1 y TRPA1 en GRD.....	67
7.2.4 Localización del NHE1 y el canal TRPA1 en GRD.....	68
8. CONCLUSIONES	70
9. PERSPECTIVAS	71
10. REFERENCIAS.....	72
11. ANEXOS	91

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius	[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio intracelular
15d-PGJ ₂	15-desoxi-delta- ^{12,14} -prostaglandina J ₂	Ca ²⁺ /CaMK II	Proteína cinasa II dependiente de Ca ²⁺ -calmodulina
4-HNE	4-hidroxinonenal	Cat	Catálogo
4-ONE	4-oxononenal	Ca _v	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
A-967079	1E,3E-1-(4-fluorofenil)-2-metil-1-penteno-3-ona oxima	CFA	Adyuvante completo de Freund
AA	Ácido araquidónico	CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
AE3	Intercambiador de aniones isoforma 3	CHEM	Chembridge-5861526
AITC	Alil isotiocianato	CICUAL	Comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	CNN	Cinamaldehído
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico	C _m	Capacitancia específica de la membrana
ANOVA	Análisis de varianza	CO ₂	Dióxido de carbono
ANKTM1	Proteína tipo anquirina 1 con dominios transmembranales	COX	Ciclooxygenasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	DIDS	Estilbeno 4,4'-diisotiociano-2,2'-disulfónico
ASICs	Canales iónicos sensibles a ácido	DMEM	Medio Dulbecco modificado del medio basal Eagles
ASIC3	Canal iónico sensible a ácido subtipo 3	DMSO	Dimetilsulfóxido
ATP	Adenosina trifosfato	EIPA	5'-(N-etil-N-isopropil)amilorida
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)-carboxifluoresceína acetometil ester	F	Formalina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	g	Gramos
Ca ²⁺	Calcio	GABA	Ácido γ-amino butírico

GAT-3	Transportador de GABA 3	mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía	Min	Minutos
GN	Ganglio nodoso	ml	Mililitros
GRD	Ganglio de la raíz dorsal	mN	Milinetons
GT	Ganglio trigeminal	mV	Milivolts
H ⁺	Hidrón	Na ⁺	Sodio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	Na _v	Canales de Na ⁺ dependientes de voltaje
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato	nm	Nanometros
HEK	Células embrionarias de riñon humano	NGF	Factor de crecimiento neuronal
IC ₅₀	Concentración inhibidora media máxima	NHE	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺
i.t.	Intratecal	NHE1	Intercambiador Na ⁺ /H ⁺ isoforma 1
IL	Ipsilateral	NK ₁	Receptor de sustancia P
IL-1	Interleucina 1	NMDA	N-metil-D-aspartato
IL-1β	Interleucina 1β	nM	Nanomolar
IL-6	Interleucina 6	NOS	Sintasa del óxido nítrico
K ⁺	Potasio	O ₃	Ozono
K ₂ P	Canales de K ⁺	ON	Óxido nítrico
K _{ir}	Canales de K ⁺ rectificadores entrantes	P2X3	Receptor purinérgico activado por ATP subtipo 3
Kg	Kilogramos	PGE ₂	Prostaglandina E ₂
L4	Lumbar 4	pH	Potencial de hidrógeno
L6	Lumbar 6	PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
LIF	Factor inhibidor de la migración de leucocitos	PKA	Proteína cinasa A
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos	PKC	Proteína cinasa C
ME	Médula espinal	pF	Picofaradio
mg	Miligramos	PMCA	ATPasa de la membrana plasmática
Mg ²⁺	Magnesio	PVDF	Polifluoruro de vinilideno

s.c.	Subcutánea	μl	Microlitros
SDS	Dodecil sulfato de sodio	μM	Micromolar
SITS	Estilbeno 4-acetamida-4'-isotiociano-2,2'-disulfónico		
Slc4	Superfamilia de transportadores de bicarbonato		
SNK	Student Newman-Keuls		
SEE	Solución extracelular estándar		
SP	Sustancia P		
THC	Tetrahidrocanabinol		
TNF α	Factor de necrosis tumoral α		
TrkA	Receptor tirosina cinasa A del factor de crecimiento nervioso		
TrkB	Receptor tirosina cinasa B del factor neurotrófico derivado del cerebro		
TRP	Receptor de potencial transitorio		
TRPA1	Receptor de potencial transitorio subtipo anquirina 1		
TRPM8	Receptor de potencial transitorio subtipo melastatina 8		
TRPP3	Receptor de potencial transitorio subtipo policistina 3		
TRPV1	Receptor de potencial transitorio subtipo vaniloide 1		
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica		
μm	Micrómetros		

I. RESUMEN

La regulación del pH intracelular (pH_i) en las neuronas es un proceso fisiológico fundamental. Las enzimas, canales iónicos y diversas macromoléculas modifican su función por los cambios en el pH_i , alterando la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal. Se ha reportado que la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ 1 (NHE1) incrementa la excitabilidad de las neuronas nociceptivas e intensifica las conductas nociceptivas agudas y crónicas inducidas por formalina. Por otra parte, el TRPA1 es un canal iónico activado por diversos estímulos, entre ellos el pH_i alcalino o ácido. Debido a que las neuronas nociceptivas expresan estas proteínas, es posible que los efectos inducidos por la inhibición del NHE1 sean a través de la actividad del canal TRPA1. El objetivo de este estudio fue determinar si la acidificación intracelular inducida por la inhibición de NHE1 favorece la activación del canal TRPA1 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) y en ratas con dolor inflamatorio. La inhibición del NHE1 con zoniporida disminuyó el pH_i en las neuronas del GRD aisladas de rata adulta. Por otra parte, la zoniporida aumentó la concentración intracelular de Ca^{2+} en neuronas que responden a la estimulación con alil-isotiocianato (AITC), activador del canal TRPA1. La inhibición de NHE1 no modificó las corrientes de membrana en las neuronas del GRD. Sin embargo, la zoniporida disminuyó el grado de desensibilización del TRPA1 que se observó ante la estimulación repetida del canal con AITC. Además, algunas neuronas del GRD presentaron inmunoreactividad para ambas proteínas, NHE1 y TRPA1. A nivel conductual, la administración periférica local o intratecal de A-967079, bloqueador del canal TRPA1, atenuó las conductas nociceptivas agudas y crónicas inducidas por la administración de formalina al 1% en ratas. Además, la formalina aumentó la expresión de la proteína del canal TRPA1 en los GRD, así como en la médula espinal (L4-L6). Por otra parte, la zoniporida aumentó las conductas nociceptivas espontáneas y evocadas inducidas por la administración de AITC al 2% o del coadyuvante completo de Freund (CFA) en las ratas, dicho efecto se revirtió mediante el pre-tratamiento con A-967079. En conjunto, los resultados sugieren que el intercambiador NHE1 y el canal TRPA1 se acoplan funcionalmente en los nociceptores y que la acidificación intracelular regula la transmisión de la información nociceptiva a través del canal TRPA1.

II. ABSTRACT

The regulation of the intracellular pH (pH_i) in neurons is an elemental physiological process. Changes in pH_i affect the function of enzymes, ion channels and other macromolecules, altering synaptic transmission and neuronal excitability. It has been reported that inhibition of the Na⁺/H⁺ 1 exchanger (NHE1) increases discharge activity in nociceptors and intensifies formalin-induced acute and chronic nociceptive behaviors. Besides, TRPA1 is an ion channel activated by several stimuli, among them, alkaline or acidic pH_i. Since the nociceptors express both proteins, pH_i-regulation by NHE1 could contribute to modulate the nociceptive transmission through TRPA1-activity. The aim of this study was to determine if intracellular acidification induced by NHE1 inhibition increase TRPA1 channel-activation in dorsal root ganglion (DRG) neurons and in rats with inflammatory pain. Zoniporide induced an intracellular acidification in DRG neurons isolated from adult rats. Moreover, zoniporide enhanced the intracellular concentration of Ca²⁺ in allyl-isothiocyanate (AITC) responsive-neurons, a TRPA1 channel activator. Inhibition of NHE1 did not alter the membrane currents in isolated DRG neurons. In contrast, zoniporide decreased the desensitization of TRPA1 current observed by repetitive stimulation of the neurons with AITC. Furthermore, some DRG neurons were double positive for NHE1 and TRPA1 immuno-fluorescence signal. At the behavioral level, peripheral or intrathecal administration of A-967079, a TRPA1 channel blocker, reduced formalin-induced acute and chronic nociceptive behaviors in rats. Moreover, formalin-induced inflammatory process up-regulated TRPA1 expression in DRG as well as in spinal cord (L4-L6). In addition, local peripheral administration of zoniporide increased AITC- and complete Freund's adjuvant (CFA)-induced nociceptive behaviors in the rats. Furthermore, the pronociceptive effect of zoniporide was reverted by the pre-treatment with A-967079. Overall, data suggest that there is a functional coupling between NHE1 and TRPA1 channel in nociceptors and that intracellular acidity regulates the transmission of nociceptive information through the TRPA1 channel.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fisiología de la nocicepción

Las fibras aferentes primarias, denominadas nociceptores, detectan estímulos dolorosos de tipo térmico, mecánico y químico mediante receptores expresados en sus terminales nerviosas. Los nociceptores son neuronas que tienen sus somas en los ganglios sensoriales como el ganglio de la raíz dorsal (GRD), el ganglio trigeminal (GT) o el ganglio nodoso (GN). La característica principal de los nociceptores es su capacidad para diferenciar entre los estímulos inocuos y aquellos que son potencialmente nocivos (Woolf y Ma, 2007). El procesamiento nociceptivo comprende cuatro procesos: transducción, propagación, transmisión y percepción (Figura 1) (Julius y Basbaum, 2001).

1. Transducción. Las terminales nerviosas periféricas de los nociceptores convierten los estímulos nocivos en señales eléctricas.
2. Propagación. Los axones conducen las señales eléctricas a lo largo de las neuronas.
3. Transmisión. Las neuronas pre- sinápticas transfieren la información nociceptiva a las neuronas post-sinápticas en el asta dorsal de la médula espinal. La señal nociceptiva puede modificarse (inhibición/amplificación).
4. Percepción. Los impulsos nociceptivos se integran con factores cognitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor.

De acuerdo con sus características fisioanatómicas, los nociceptores se clasifican en fibras A β , fibras A δ y fibras C (Figura 2) (Basbaum et al., 2009):

- Fibras A β . Este tipo de fibras tienen un axón mielinizado, con un diámetro aproximado de 10 μ m y conducen potenciales de acción (PA) a una velocidad de 30-120 m/s. En condiciones normales participan como mecanorreceptores de bajo umbral en la percepción táctil, pero ante un proceso inflamatorio modifican su fenotipo, el cual adquiere características de una fibra tipo A δ de alto umbral.

- Fibras A δ . Son fibras ligeramente mielinizadas con un diámetro de 2-6 μm y una velocidad de conducción de 6-30 m/s. Se distinguen dos sub-poblaciones que se diferencian en su sensibilidad al calor nocivo, así como en su sensibilidad ante estímulos mecánicos:

- Fibras A δ tipo I. Se activan a temperaturas mayores a 52°C, responden a estímulos mecánicos de alta intensidad y son insensibles a capsaicina, un agonista de los receptores de potencial transitorio subtipo vaniloide 1 (TRPV1).

- Fibras A δ tipo II. Se activan a temperaturas cercanas a 43°C; presentan un umbral más bajo ante estímulos mecánicos y son sensibles a capsaicina.

- Fibras C. Son fibras sensoriales desmielinizadas de diámetro pequeño (0.4-1.2 μm) con velocidades de conducción inferiores a 1.5 m/s; éstas responden a una gran variedad de estímulos nocivos mecánicos, térmicos y químicos, por lo que se les denomina nociceptores polimodales. Estas fibras se clasifican en dos subpoblaciones dependiendo de la presencia de neuropéptidos, de su regulación por factores de crecimiento y de su patrón de inervación en el asta dorsal de la médula espinal:

- Fibras C peptidérgicas. Presentan péptidos que se liberan en respuesta a estímulos térmicos nocivos e inflamación, como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P (SP). Este tipo de neuronas expresan al receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF) denominado TrkA.

- Fibras C no peptidérgicas. Son de respuesta más lenta y expresan al receptor purinérgico activado por adenosina trifosfato (ATP) subtipo 3 (P2X3); además, presentan un sitio de unión para isolectina B4 (IB4) y expresan al receptor del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

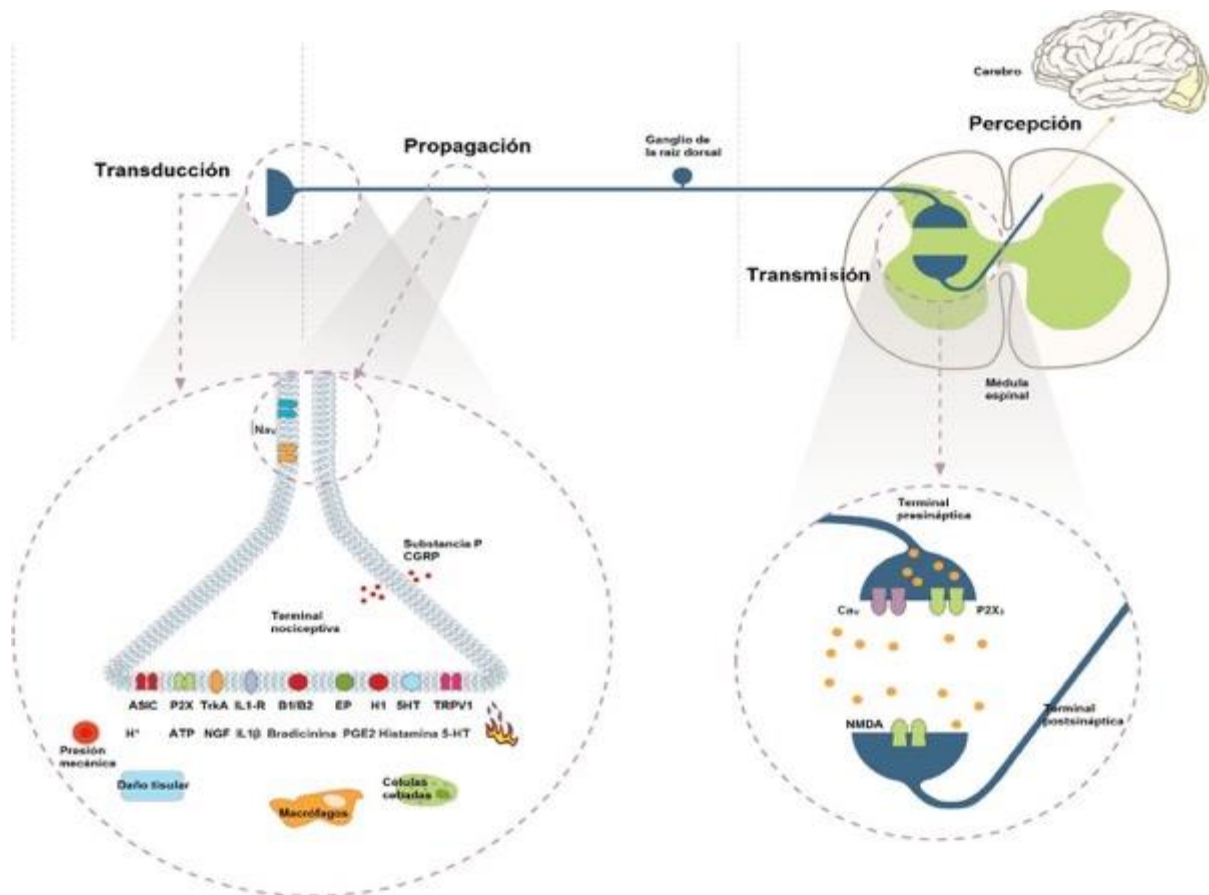


Figura 1. Mecanismos de la transmisión nociceptiva. Los nociceptores responden a estímulos mediante la activación de receptores expresados en la terminal periférica, los cuales transducen la señal en potenciales de acción que se propagan hasta la médula espinal, donde se transmiten a neuronas de segundo orden encargadas de proyectar la información nociceptiva a centros supraespinales en donde se integra la percepción del dolor. Modificado de Gohar, 2012.

1.2 Dolor inflamatorio

El dolor se puede clasificar como dolor agudo o crónico. El dolor agudo es un mecanismo que le sirve al organismo como advertencia ante una amenaza que atente su integridad. El dolor crónico se considera patológico y suele clasificarse de acuerdo al estímulo que lo desencadena como dolor inflamatorio y dolor neuropático. El dolor de tipo inflamatorio se genera cuando la integridad del tejido se daña; esto sucede cuando existen incisiones en la piel, quemaduras, frío extremo, fracturas, procesos autoinmunes, presión extrema o infecciones. Durante el proceso inflamatorio que acompaña al daño tisular, los nociceptores y las células no neuronales (las células cebadas, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales,

linfocitos, células satelitales, queratinocitos y fibroblastos) localizadas en el sitio de la lesión liberan al medio extracelular múltiples moléculas y factores endógenos, denominados en conjunto como mediadores pro-inflamatorios.

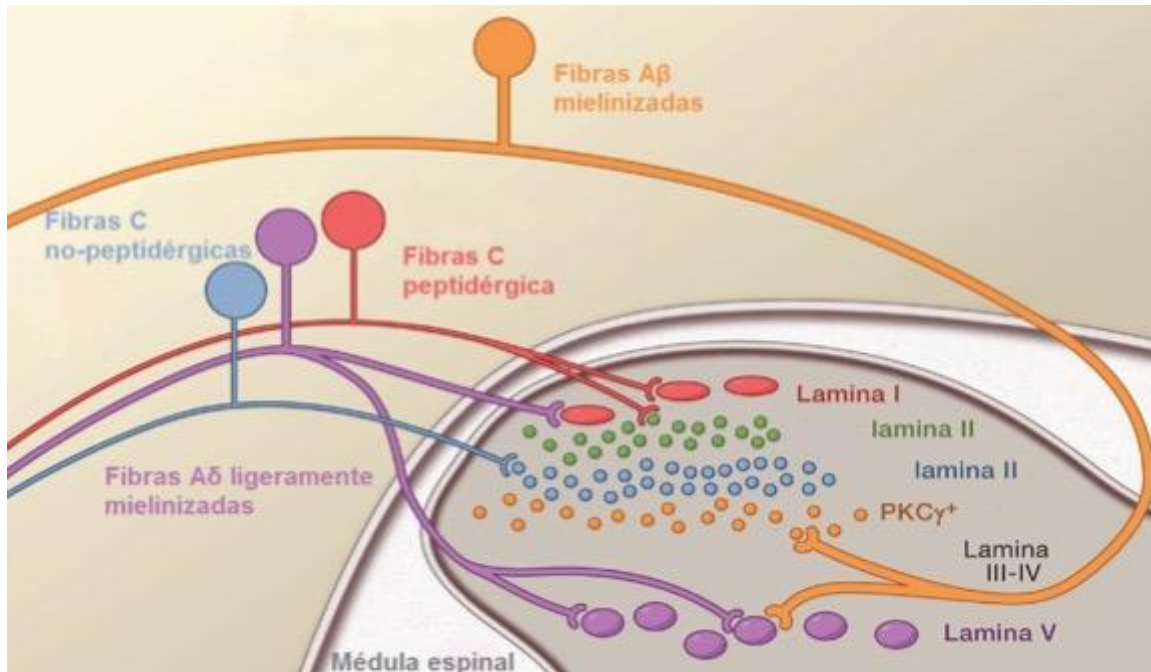


Figura 2. Conexiones entre fibras aferentes primarias y la médula espinal. Las fibras C peptidérgicas (rojo) y fibras A δ (morado) hacen sinapsis con neuronas de proyección e interneuronas (rojo) localizadas en la lámina I (verde) y la lámina II en la médula espinal. Las fibras no peptidérgicas (azul) conectan con interneuronas (azul) en la parte interna de la lámina II. En contraste, los estímulos inocuos transmitidos por fibras A β (naranja) hacen sinapsis con neuronas en la parte medial ventral de la lámina interna II, que expresan a la isoforma gamma de la proteína cinasa C (PKC γ). Un segundo grupo de neuronas de proyección en la lámina V (morado) recibe estimulaciones convergentes de fibras A δ y A β . Modificado de Basbaum et al., 2009.

Estos factores también referidos como la “sopa inflamatoria”, representan una gama amplia de moléculas de señalización que incluyen neurotransmisores peptídicos como la SP, el CGRP, la bradicinina (BK), el NGF y la neurocinina A (NKA); lípidos como las prostaglandinas (PGE), los tromboxanos, los leucotrienos y los endocannabinoides. Además de neurotrofinas, citocinas y quimiocinas, así como proteasas extracelulares, histamina, ATP e hidrogeniones (H⁺) (Costigan y Woolf, 2000).

Los nociceptores expresan en su membrana plasmática canales iónicos y receptores capaces de reconocer y responder a cada uno de los agentes pro-inflamatorios o pro-

algésicos; esta interacción produce la activación de cascadas de señalización que incrementan la generación de PA a través de la fosforilación de receptores y canales iónicos, un fenómeno denominado sensibilización periférica (Figura 3).

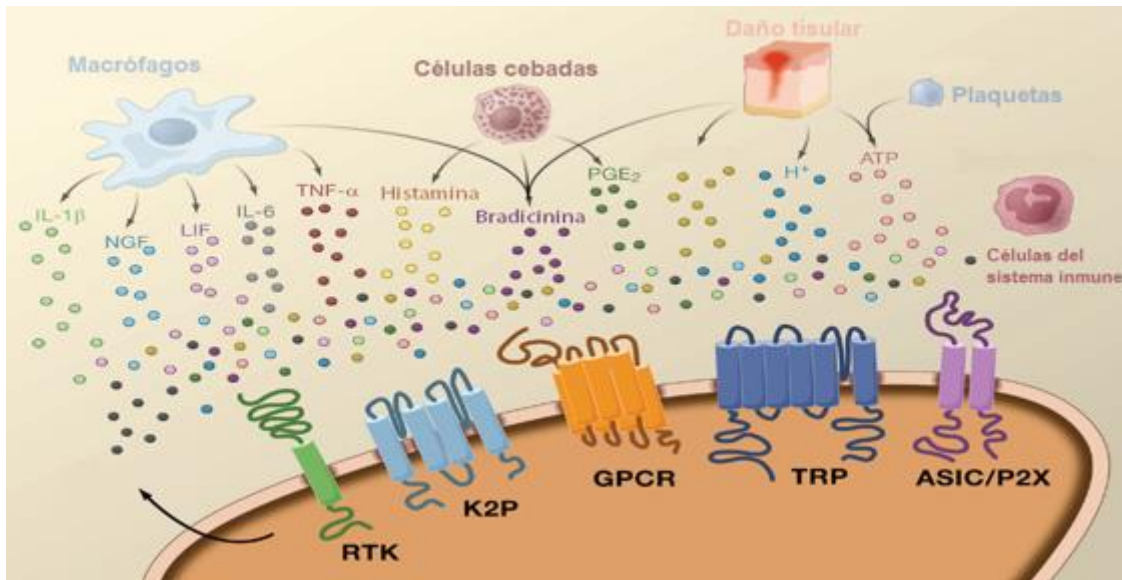


Figura 3. Modulación del dolor inflamatorio. Durante la inflamación, células residentes y del sistema inmune secretan mediadores inflamatorios que actúan en los nociceptores. La interacción de estas moléculas con sus receptores específicos produce la activación de cascadas de señalización que conducen a la fosforilación de canales iónicos, incrementando la generación de potenciales de acción. RTK, receptores tirosina-cinasa; K2P, canales de potasio con 2 dominios de poro; GPCR, receptores acoplados a proteínas-G; TRP, receptores de potencial transitorio; ASIC, canales iónicos sensibles a ácido; P2X, receptores ionotrópicos purinérgicos. Modificado de Basbaum et al., 2009.

Por otra parte, la señal nociceptiva se amplifica a nivel del sistema nervioso central en un fenómeno conocido como sensibilización central, el cual se produce cuando los nociceptores liberan SP, glutamato y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Estos ligandos promueven la activación de sus receptores, como el receptor a neurocinina (NK1), los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1, mGluR5), el receptor a glutamato de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), el receptor a glutamato de tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y el receptor tirosina cinasa B del BDNF (TrkB), que se expresan en las neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal. La activación de dichos receptores produce un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) como resultado del influjo extracelular y de la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares (Basbaum et al., 2009).

El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la activación de cascadas de segundos mensajeros activan diversas enzimas como la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), así como la sintasa de óxido nítrico (NOS) y la ciclooxigenasa (COX), entre otras. Las proteínas cinasas fosforilan receptores y canales iónicos de la membrana plasmática favoreciendo su activación. Por otra parte, la NOS y la COX sintetizan al óxido nítrico (NO) y la PGE, respectivamente; moléculas que difunden a las neuronas pre- y post-sinápticas incrementando la señal nociceptiva. En conjunto, los cambios moleculares que ocurren a nivel de los nociceptores disminuyen su umbral de activación, incrementan su respuesta ante estímulos nociceptivos y amplifican los campos receptivos de los mismos. A nivel de las neuronas post-sinápticas se favorece el incremento en la frecuencia de descarga espontánea (Costigan y Woolf, 2000). Por lo tanto, la sensibilización de los nociceptores y de las neuronas de segundo orden generan estados de hipersensibilidad en los que un estímulo inocuo generará una sensación dolorosa y un estímulo nocivo se percibirá con mayor intensidad, derivando en fenómenos denominados como alodinia e hiperalgesia, respectivamente (Basbaum et al., 2009).

1.3 Detección de la acidez por neuronas sensoriales

Uno de los principios básicos de la homeostasis celular es la regulación del balance ácido-base y el mantenimiento del pH extracelular en un rango estrecho cercano a 7.4. Sin embargo, el exceso en la ingesta de ácido, el aumento de la secreción gástrica de ácido, la acidosis metabólica, la acidosis generada por isquemia, la inflamación y la actividad neuronal excesiva modifican este balance (Deval et al., 2010). Existen mecanismos celulares de regulación ácido-base y sistemas de monitoreo que detectan estímulos ácidos nocivos, cuya activación inicia una reacción de emergencia apropiada que limita cualquier daño tisular que pueda presentarse. Las neuronas aferentes primarias y las células receptoras en las papilas gustativas son los sensores de acidez extracelular más importantes del organismo (Holzer, 2009).

Se ha reportado que la acidez extracelular produce dolor. En 1993 Steen y Reeh demostraron que la inyección intramuscular de soluciones ácidas produce dolor en humanos (Steen y Reeh, 1993). Análogamente, cuando existe dolor de tipo inflamatorio se produce un aumento significativo en la concentración de H^+ dentro de un rango micromolar en el espacio intersticial del sitio de la lesión (Reeh y Steen, 1996). La disminución del pH extracelular, es una característica fisiopatológica común en diversos estados inflamatorios como hematomas relacionados con fracturas, isquemias cardíacas y la contracción exhaustiva del músculo esquelético (Jones et al., 2004).

1.4 Corrientes reguladas por H^+ en neuronas sensoriales

El primer estudio en el que se demostró la presencia de corrientes catiónicas activadas por H^+ extracelulares en las neuronas del GRD fue el de Krishtal y Pidoplichko (1980). En ese trabajo se reportó que la mayoría de las neuronas del GRD presentan una corriente entrante de rápida inactivación impulsada por Na^+ , con una sensibilidad alta a H^+ , un umbral de activación a un pH de 7.0 y una activación máxima cercana a pH 6.0 (Krishtal y Pidoplichko, 1980; 1981). Posteriormente, se describió que las neuronas del GRD sensibles a la capsaicina presentan una corriente iónica sostenida de inactivación lenta cuando las células se exponen a una solución extracelular con un pH menor a 6.2 (Bevan y Yeats, 1991).

El canal TRPV1 (Caterina et al., 1997) y los canales iónicos sensibles a ácido (ASIC) (Waldmann et al., 1997) han sido estudiados ampliamente como sensores moleculares para los H^+ extracelulares debido a su gran sensibilidad ante cambios mínimos en el pH. Sin embargo, evidencia creciente indica que otros canales contribuyen a la sensibilización por ácido de las neuronas aferentes, por ejemplo: los canales TRPV4, TRPC4-5 y TRPP2, el receptor purinérgico P2X, los canales de K^+ con dos dominios de poro ($K2P$), canales de K^+ rectificadores entrantes (K_{ir}), canales de K^+ dependientes de voltaje, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, canales regulados por nucleótidos cíclicos y activados por hiperpolarización, canales de Cl^- y los receptores

acoplados a proteínas G activados por H⁺ (Holzer, 2009). Particularmente los canales TRPV1 y ASIC1a, además de responder a la acidez tisular por activación directa de los H⁺ extracelulares (Caterina et al., 1997; Lingueglia, 2007), estos canales permiten la entrada de los H⁺, lo cual disminuye transitoriamente el pH intracelular (pH_i), acidificando el citosol de las células que los expresan (Gilbertson et al., 1992; Hellwig et al., 2004; Chen y Grunder, 2007).

1.5 Homeostasis del pH intracelular en las neuronas

Los cambios en el pH extra e intracelular afectan diversos procesos fisiológicos en el sistema nervioso central como son la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica, la recaptura de neurotransmisores y la comunicación a través de las uniones comunicantes (Ruffin et al., 2014).

La acidificación intracelular modifica el estado de protonación de las proteínas, afectando su función (Xu et al., 1996). Entre estas proteínas destacan enzimas, canales iónicos y transportadores de membrana (Fujita et al., 2008). Ejemplos de proteínas sensibles al pH_i son los receptores a rianodina, la Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y del retículo endoplasmático (Lytton et al., 1992), los canales de K⁺ (Schneider et al., 1993; Grafe et al., 1994; Maingret et al., 1999), las conexinas (Gonzalez-Nieto et al., 2008) y las enzimas remodeladoras de actina (Frantz et al., 2008). Por lo tanto, los cambios en el pH_i regulan la actividad celular de forma importante y tienen un efecto sobre la excitabilidad neuronal (Steen et al., 1999; Sinning et al., 2011).

El equilibrio en el pH_i depende del balance entre la velocidad de acumulación de ácido (J_L, índice de entrada/generación de ácido o índice de salida/consumo de álcali) y la velocidad de extracción de ácido (J_E, índice de salida/consumo de ácido o el índice de entrada/generación de álcali). El estado estacionario se alcanza cuando la J_E=J_L (intersección de las líneas negra y roja en la Figura 4).

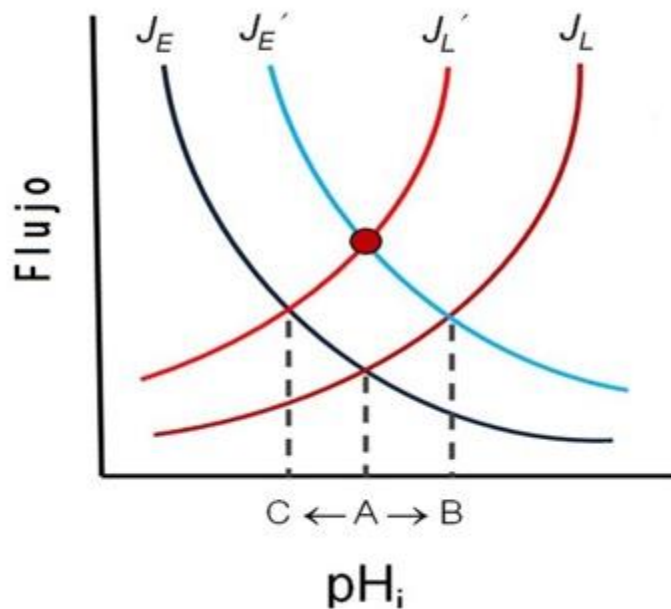


Figura 4. Equilibrio homeostático del pH_i . El estado estacionario del pH_i depende del balance entre la velocidad de extracción (J_E) y de acumulación (J_L) de ácido. El equilibrio ácido-base se alcanza cuando $J_E = J_L$ (intersección de las líneas negra y roja: punto A). Si la J_E incrementa (J_E'), el equilibrio del pH_i se desparejará a valores más alcalinos (intersección de las líneas azul y roja: punto B). Si la J_L aumenta (J_L'), el equilibrio del pH_i se desparejará a valores más ácidos (intersección de las líneas naranja y negra: punto C). Si el incremento en la J_E es igual al incremento en la J_L ($J_E' = J_L'$) no se genera un cambio neto en el pH_i (círculo rojo). Modificado de Ruffin et al., 2014.

La acidificación intracelular en las neuronas se debe predominantemente a la acumulación de los H^+ generados por el metabolismo aeróbico (producción de CO_2 por la fosforilación oxidativa) y anaeróbico (síntesis de ATP con la producción subsecuente de lactato) durante el disparo neuronal (Chesler, 2003) y por la extracción de HCO_3^- de las células, mediante intercambiadores de aniones. A su vez, algunos procesos celulares modifican el pH_i . En este sentido, el incremento en la producción de ATP tiene un impacto en el pH_i (Casey et al., 2010) y se ha determinado que la liberación de neurotransmisores en las neuronas genera una acidificación intracelular (Wu et al., 1999; Hellwig et al., 2004). Así mismo, se ha descrito que la actividad neuronal disminuye de manera transitoria de 0.2 - 0.3 unidades de pH en el citosol de estas células (Werth et al., 1994; Hwang et al., 2011).

El pH_i de las neuronas del GRD está en constante equilibrio dinámico. Algunos estudios han determinado que el pH_i de estas células se encuentra entre 7.14 y 7.35

(Thomas et al., 2003; Hwang et al., 2011). La acidificación extracelular que aparece durante el proceso inflamatorio disminuye el pH intracelular mediante el transporte de los H⁺ a través de intercambiadores, transportadores o canales iónicos (Roos y Boron, 1981; Moody, 1984).

La concentración de los H⁺ en el sistema nervioso se controla mediante diversos mecanismos que son comunes en todos los tejidos de mamíferos (Obara et al., 2008). La extracción de los H⁺ restablece el equilibrio del pH_i posterior a la acumulación de los cationes generados por la actividad neuronal intensa (Chesler y Kaila, 1992). Los mecanismos principales responsables de la regulación del pH_i en las neuronas sensoriales son los intercambiadores Na⁺/H⁺ (NHE) y los intercambiadores de aniones (Cl⁻/ HCO₃⁻) (AE), los cuales modulan el equilibrio entre la tasa de acumulación y extracción de ácido en la células (Figura 5, Donowitz et al., 2013; Ruffin et al., 2014).

1.5.1 Intercambiador de aniones Cl⁻/HCO₃⁻

En las neuronas, el mecanismo principal de acumulación de los H⁺ que contribuye a la J_L es el intercambiador AE3. El AE3 pertenece a la superfamilia de transportadores de bicarbonato (Slc4). En mamíferos, el gen *Slc4a3* codifica dos productos alternativos: bAE3 (abundante en el sistema nervioso) y cAE3 (abundante en el tejido cardiaco) (Sterling y Casey, 1999). La cadena polipeptídica del AE3 tiene un patrón estructural común de tres dominios, un dominio amino terminal citoplasmático de 400-700 aminoácidos (aa) seguido de un dominio transmembranal de aproximadamente 500 aa y un dominio carboxilo terminal citoplasmático de 30-100 aa (Alper et al., 2002).

El AE3 realiza el intercambio electroneutro de un ion de Cl⁻ extracelular por un ion de HCO₃⁻ intracelular. El AE3 es el principal intercambiador que contribuye a la acumulación de los H⁺ en las neuronas, ya que su actividad disminuye el pH_i e incrementa la concentración de Cl⁻. Evidencia de ello es que las células COS que expresan de manera heteróloga al intercambiador AE3 tienen un pH_i menor, comparado con células control que no expresan el intercambiador (Kopito et al., 1989).

Además, en presencia de DIDS (inhibidor del intercambiador AE3) o mediante la eliminación del Cl^- en el medio extracelular, las neuronas hipocampales aisladas de embriones de ratón muestran una alcalinización intracelular (Svichar et al., 2009). Asimismo, se ha reportado que la actividad del AE3 induce la acidificación intracelular en motoneuronas, progenitores neuronales, neuronas olfatorias y en neuronas del GRD (Gallagher et al., 1983; Nickell et al., 2007; González-Islas et al., 2009; Sun et al., 2012). Estas evidencias confirman el papel del intercambiador AE3 en la regulación del pH_i .

En cuanto al papel del AE3 en el procesamiento nociceptivo, en el modelo de formalina¹ se reportó que la proteína del AE3 incrementa su expresión en los GRD de ratas en los días 1 y 6 posteriores a la inyección (Barragán-Iglesias et al., 2014). En este mismo estudio se observó que la inhibición farmacológica del intercambiador AE3 con DIDS y SITS (inhibidores no específicos del AE3) disminuye las conductas nociceptivas agudas y de largo plazo inducidas por la administración de formalina (Barragán-Iglesias et al., 2014). Por otra parte, se reportó que la inhibición del intercambiador AE3 con DIDS reduce la excitabilidad de las neuronas del GRD (Hwang et al., 2011). El mecanismo por el cual el AE3 ejerce su efecto pronociceptivo no se conoce del todo; sin embargo, este efecto se ha asociado al incremento de las concentraciones intracelulares de Cl^- de las neuronas, lo cual favorece la generación de los reflejos de raíz dorsal (Gallagher et al., 1983), aunque otros mecanismos pueden estar involucrados.

1.5.2 Intercambiador de Na^+/H^+

La extracción de los H^+ en las neuronas está mediada por el intercambiador Na^+/H^+ o Slc9a , que promueve el movimiento electroneutro de un ion H^+ intracelular por un ion de Na^+ extracelular. La funcionalidad del intercambiador se identificó en 1977 y se

¹ Modelo de dolor inflamatorio en el que la administración subcutánea (s.c.) de formaldehído en el dorso de la pata trasera produce conductas nociceptivas espontáneas (lámidas y sacudidas de la pata) y evocadas (retiro de la pata ante la estimulación mecánica o térmica) en los roedores (Dubuisson y Dennis; 1977; Fu et al., 2001).

clonó en 1989 (Aickin y Tomas., 1977; Sardet et al., 1989). En la actualidad se ha reportado que existen 10 isoformas (NHE1-10) con papeles fisiológicos diferentes que dependen de su localización celular. Las isoformas NHE 6-9 se expresan principalmente en organelos intracelulares; mientras que las isoformas NHE 1-5 se expresan en la membrana plasmática (Orlowski et al., 1992; Zachos et al., 2005). El intercambiador NHE1 es la isoforma que se expresa de forma más abundante y ubicada en las células de mamífero, incluyendo a las células del sistema nervioso.

El intercambiador NHE1 tiene 815 aa separados en dos dominios, un dominio amino terminal en donde se cataliza el transporte iónico y un dominio carboxilo terminal que regula la actividad del transporte (Lee et al., 2013). La función principal del NHE1 es la regulación del pH_i; sin embargo, también se ha descrito su papel en la diferenciación celular, la proliferación, la regulación del volumen, la organización del citoesqueleto y la migración celular (Liu et al., 2015). Además, la disfunción del NHE1 se ha relacionado con trastornos como la epilepsia, el cáncer y la demencia asociada al virus de inmunodeficiencia humana (Orlowski et al., 2004; Obara et al., 2008).

Respecto a la participación de los intercambiadores NHE en la transmisión nociceptiva. Se demostró que la inhibición farmacológica de los NHE provoca un aumento en la frecuencia de disparo de PA en neuronas del GRD (Steen et al., 1999). A nivel conductual, la inhibición de los intercambiadores NHE produce un aumento de las conductas nociceptivas en tres modelos de dolor inflamatorio agudo (serotonina, capsaicina y formalina) (Rocha-González et al., 2009). Además, se ha determinado la participación de la isoforma NHE1 en las conductas nociceptivas de largo plazo (Castañeda-Corral et al., 2012). En ese trabajo se describió que la administración periférica de zoniporida (un inhibidor selectivo del NHE1) produce un aumento de las conductas de alodinia e hiperalgesia evocadas por la inyección de formalina al 0.5 %. Asimismo, la expresión de la proteína del NHE1 disminuyó en el GRD y la médula espinal dorsal de ratas con dolor inflamatorio crónico inducido formalina al 0.5 % (Castañeda-Corral et al., 2012).

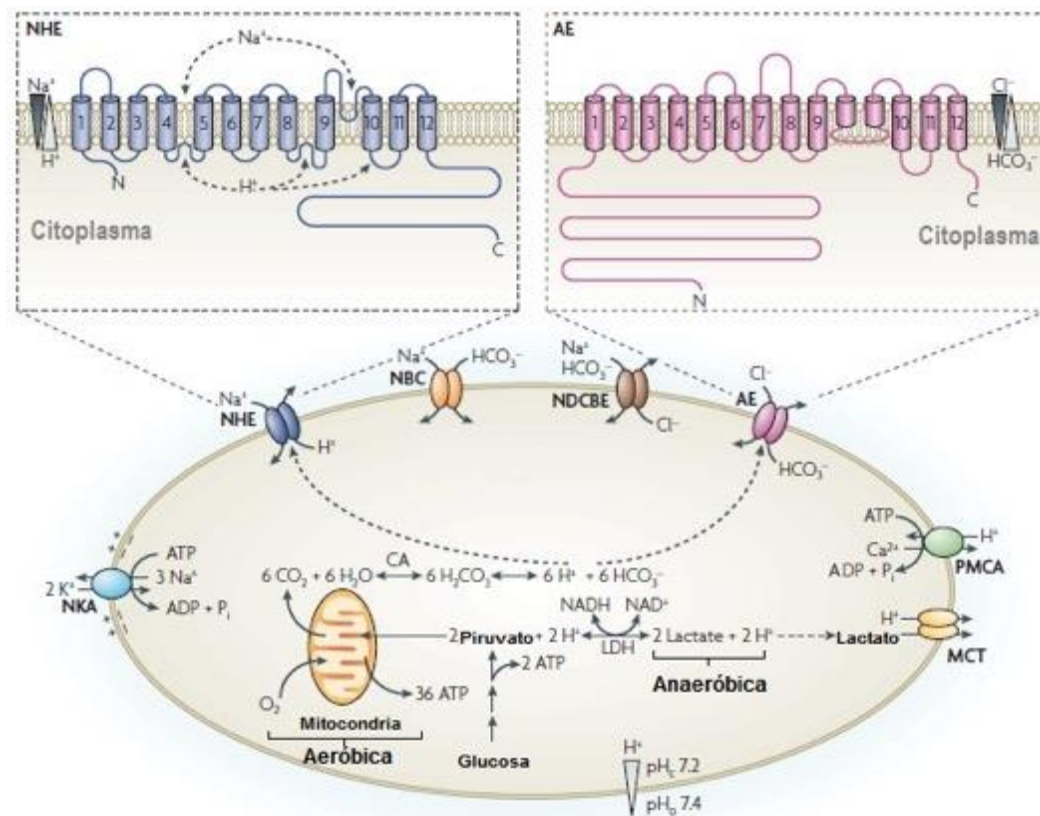


Figura 5. Regulación del pH citoplasmático en las neuronas. El pH_i tiende a acidificarse debido a la actividad de diversas vías metabólicas como la producción de ATP que genera lactato (componente anaeróbico en la figura) y la fosforilación oxidativa que produce CO_2 (componente aeróbico en la figura). Las proteínas principales que regulan el pH_i son los intercambiadores NHE1 y AE3. En los recuadros se representa la topología transmembranal propuesta para NHE1 y AE3. Modificado de Casey et al., 2010. CA, anhidrasa carbónica; LDH, lactato deshidrogenasa; pH_i intracelular; pH_o extracelular.

Como se revisó anteriormente, la acidosis metabólica, la permeabilidad de los H^+ a través de los canales TRPV1 y ASIC1a, la disminución de los mecanismos de extracción y el aumento de los mecanismos de acumulación de los H^+ en las neuronas, contribuyen a la disminución del pH_i durante el proceso inflamatorio de largo plazo. Las evidencias sugieren que la acidificación intracelular de las neuronas sensoriales juega un papel fundamental en la inducción de la transmisión nociceptiva. Sin embargo, aún se desconoce la identidad molecular de los canales iónicos o receptores responsables del aumento en la excitabilidad de los nociceptores en respuesta a esta acidificación intracelular.

El canal de potasio TREK-1 es un canal de K⁺ con dos dominios de poro que se activa por una disminución en el pH_i (Honoré et al., 2007). Se ha reportado que TREK-1 tiene una histidina en la posición 328 (H328) responsable de la interacción del canal con los H⁺. La unión de los H⁺ a este sitio incrementa la actividad del canal y reduce la excitabilidad neuronal al favorecer la hiperpolarización de la membrana (Ghatak y Sikdar, 2016); por lo tanto, TREK-1 no parece ser un candidato adecuado para explicar el aumento de la excitabilidad neuronal durante la acidificación intracelular. Por otra parte, Wang y colaboradores demostraron que el receptor de potencial transitorio subtipo anquirina 1 (TRPA1) es un canal iónico que se activa intracelularmente por la interacción directa con los H⁺ (Wang et al., 2011). La activación del canal TRPA1 podría ser el mecanismo a través del cual la acidificación intracelular aumenta la excitabilidad de las neuronas nociceptivas, debido a que su actividad produce la despolarización de la membrana plasmática.

1.6 Receptor de potencial transitorio subtipo anquirina 1

El TRPA1 pertenece a la superfamilia de canales TRP que consiste de 28 miembros diferentes de canales iónicos divididos en seis grupos, de los cuales TRPA1 constituye el único miembro del subgrupo en mamíferos (Nilius et al., 2012). La proteína del canal TRPA1, originalmente denominada ANKTM1 (*ankyrin-like with transmembrane domains protein 1*) se identificó en fibroblastos pulmonares humanos (Jaquemar et al., 1999).

1.6.1 Expresión del canal TRPA1

El TRPA1 se expresa ampliamente en el sistema nervioso y diversos tejidos. Se ha reportado que el canal TRPA1 se expresa en células del oído interno (Corey et al., 2004; Nagata et al., 2005), en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (Smith et al., 2004), en neuronas mientéricas (Anand et al., 2008), así como en los astrocitos en donde la actividad del canal TRPA1 tiene un papel importante en la homeostasis del Ca²⁺ y en la regulación del transportador de GABA, GAT-3 (Tong et al., 2012).

En tejidos periféricos el TRPA1 se expresa en células enterocromafines (Nozawa et al., 2009), en células epiteliales que cubren el tracto urinario, el endotelio vascular y en células subepiteliales de la próstata (Gratzke et al., 2009). Dentro del pulmón, el canal TRPA1 se expresa en fibroblastos, en células epiteliales alveolares y en células del músculo liso (Nassini et al., 2012). En la piel, el TRPA1 se expresa en melanocitos, queratinocitos y fibroblastos (Anand et al., 2008). Los islotes beta del páncreas expresan al canal TRPA1, en donde su actividad favorece la liberación de insulina (Cao et al., 2012).

En el sistema sensorial, el canal TRPA1 se expresa en neuronas del GRD, GN y GT (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005). Particularmente, en los nociceptores de diámetro pequeño y mediano (Nagata et al., 2005). La fracción de neuronas del GRD que expresan TRPA1 va de 3.6 a 56.5 %; esta variabilidad se asocia al tipo de técnicas empleadas para la identificación del ARNm o de la proteína del TRPA1 (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005; Bautista et al., 2006; Kwan 2006). En un estudio posterior se reportó que el 80% de las neuronas de diámetro pequeño (<27 μm) IB4 positivas expresan funcionalmente al TRPA1 en el GRD (Barabas et al., 2012). Por otra parte, las neuronas del GRD que expresan al canal TRPA1 también co-expresan el canal TRPV1 (Bautista et al., 2006; Anand et al., 2008). De hecho, los ratones a los cuales se les hizo la ablación de las terminales centrales de las neuronas del GRD mediante la inyección intratecal de capsaicina, no presentan las conductas nociceptivas inducidas por alil-isotiocianato (AITC), un activador del canal TRPA1 (Shields et al., 2010). Así mismo, las neuronas del GRD que expresan al TRPA1 también expresan CGRP, SP y al receptor de bradicinina (Jordt et al., 2004; Obata et al., 2005; Bautista et al., 2006).

1.6.2 Características moleculares y biofísicas del canal TRPA1

El gen *trpa1* codifica para una proteína de 1,119 aa en humanos y 1,125 aa en rata (120 kDa). De forma similar a otros miembros de la familia de canales TRP, el TRPA1 es una proteína tetramérica en la que cada subunidad presenta seis segmentos

transmembranales (S1-6), con un dominio localizado entre S5 y S6 que forma el poro a través del cual se da la permeabilidad y selectividad iónica (Figura 6).

De forma particular, el canal TRPA1 presenta un dominio de ~18 anquirinas (33 aa cada una) en la región amino terminal, las cuales están involucradas en las interacciones proteína-proteína y en el tránsito del canal hacia la membrana plasmática (Figura 6). Además, en esta misma región existen residuos de cisteínas y lisinas responsables de la activación del canal TRPA1 por compuestos electrófilos (Wang et al., 2012).

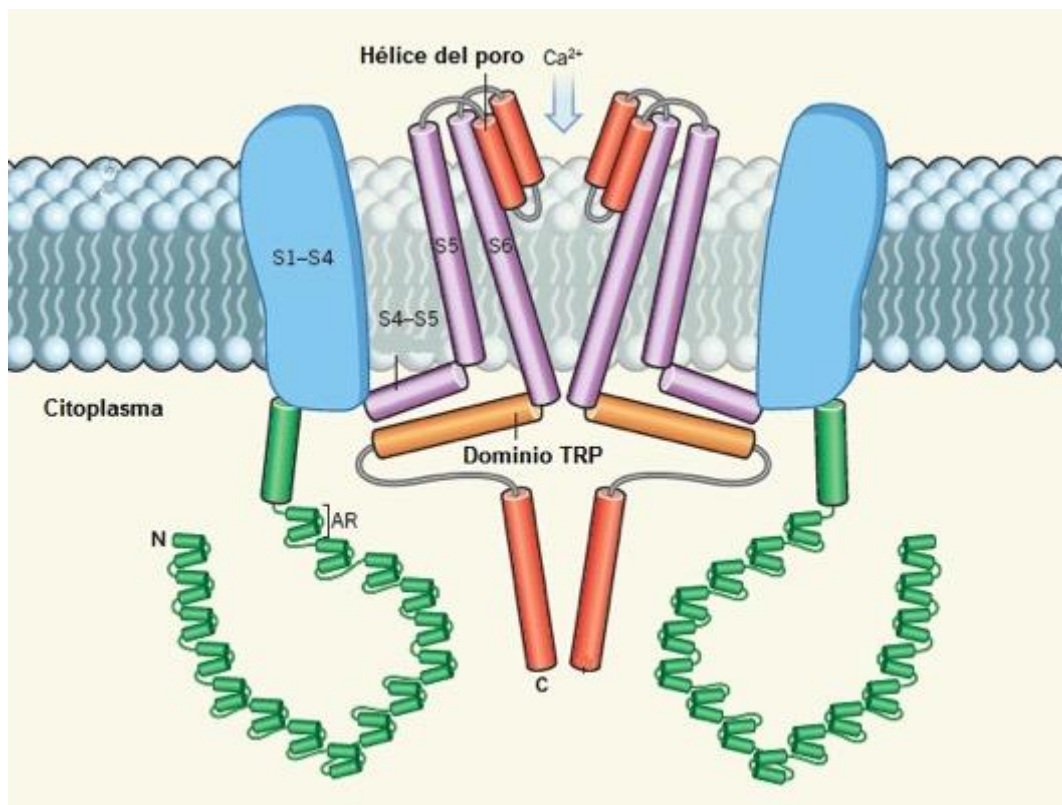


Figura 6. Estructura del canal TRPA1. Representación esquemática de las características principales del canal iónico TRPA1. En la imagen se representan dos subunidades de cuatro que conforman al canal TRPA1, cada subunidad presenta seis segmentos transmembranales (S1-S6). La región que forma el poro del canal se encuentran entre los segmentos S5 y S6. En la región amino-terminal (N) existen 16 anquirinas repetidas; mientras que en la región carboxilo-terminal (C) se encuentra el dominio TRP y una secuencia de aminoácidos estructurados en alfa hélice. Modificado de: Clapham, 2015.

El TRPA1 es un canal catiónico no-selectivo permeable a los iones Ca^{2+} y Na^+ ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$: 5.7). Comparado con otros canales de la familia TRP, el canal TRPA1 presenta una permeabilidad alta a Ca^{2+} (~70 pS). Los cálculos realizados en función de su permeabilidad relativa determinan que el poro del canal tiene un diámetro aproximado de 11 Å, en donde el residuo Asp918 determina la alta selectividad del TRPA1 por los iones de Ca^{2+} (Nilius et al., 2012). La activación de TRPA1 favorece la despolarización de la membrana e inicia cascadas de señalización intracelulares dependientes de Ca^{2+} en las células que lo expresan (Nilius et al., 2011).

Por otra parte, el Ca^{2+} regula la actividad del TRPA1. Se ha descrito que el TRPA1 se activa con concentraciones bajas de Ca^{2+} (fenómeno denominado sensibilización). Sin embargo, una vez abierto el TRPA1 se cierra rápidamente si existe un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a este proceso se le llama desensibilización (Zurborg et al., 2007; Doerner et al., 2007; Wang et al., 2008; Hasan et al. 2017). La desensibilización del TRPA1 se lleva a cabo por diversos mecanismos, como la internalización del canal tras la activación repetida del TRPA1 por AITC, la depleción del PIP_2 de la membrana y por la unión del Ca^{2+} a la calmodulina asociada a la región carboxilo terminal del canal (Akopian et al., 2007; Nilius et al., 2008; Kim et al., 2009; Hasan et al., 2017).

Se ha descrito que la estimulación repetida del TRPA1 por AITC desensibiliza al canal (desensibilización homóloga), lo que provoca una reducción en la amplitud de la corriente evocada por AITC (Figura 7) (Akopian et al., 2007; Salas et al., 2009). Existe además, una desensibilización heteróloga del TRPA1 inducida por la acción del canal TRPV1 (Ruparel et al., 2008). En este sentido, se ha documentado que el pre-tratamiento con capsaicina produce una desensibilización de las respuestas a AITC (Reeh et al., 1986; Patacchini et al., 1990; Heyer et al., 1991; Brand y Jacquot, 2002; Simons et al., 2004; Jaquot et al., 2005). El mecanismo propuesto para la desensibilización heteróloga en neuronas sensoriales está mediado por la depleción del PIP_2 de la membrana inducido por el TRPV1 y no por la internalización de TRPA1; de hecho, la co-expresión del TRPV1 y TRPA1 previene la internalización de este último (Akopian et al., 2007 Yoshida et al., 2011). Se ha propuesto que la

desensibilización funcional del canal TRPA1 a las respuestas inducidas por AITC es la consecuencia de una desensibilización aguda (una reducción de la respuesta durante la aplicación continua del fármaco) y/o de una desensibilización prolongada (una respuesta disminuida después del pre-tratamiento con AITC) de las neuronas sensoriales (Akopian et al., 2007).

El aumento en la excitabilidad de los nociceptores en modelos de dolor inflamatorio favorece el desarrollo de hiperalgesia. Este fenómeno se ha asociado a la sensibilización del canal TRPA1 (da Costa et al., 2010). En contraste, la desensibilización del TRPA1 es un mecanismo importante que disminuye la transmisión de la información nociceptiva en las fibras aferentes primarias (Zhang et al., 2014). En este sentido, se reportó recientemente que la desensibilización del canal TRPA1 con capsazepina y AITC es una estrategia funcional para atenuar el dolor inflamatorio generado en un modelo de colitis experimental (Kistner et al., 2016).

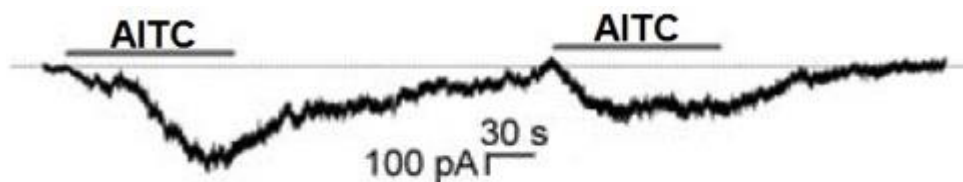


Figura 7. Desensibilización de las corrientes evocadas por AITC en el canal TRPA1. Registro electrofisiológico en neuronas sensoriales del GT en la configuración de parche perforado. Desensibilización de la corriente evocada por la aplicación de AITC (100 μ M aplicado por 1 minuto), el intervalo entre cada aplicación es de 3 minutos. Las barras horizontales representan el tiempo de aplicación del AITC. Modificado de: Akopian et al., 2007.

1.6.3 El canal TRPA1 como integrador de estímulos exógenos y endógenos

El canal TRPA1 se activa por la temperatura cercana a los 17°C, valor muy próximo al umbral del frío nocivo para humanos (15°C) (Story et al., 2003). El AITC, presente en la mostaza, el wasabi y el rábano, se reportó como el primer ligando que produce la activación del TRPA1 (Jordt et al., 2004). Posteriormente, diversas moléculas como el cinamaldehído (canela), alicina (ajo y cebolla), salicilato de metilo (aceite de gaulteria), gingerol (jengibre), eugenol (clavo), carvacrol (orégano), timol (tomillo y orégano), tetrahidrocannabinol (THC), nicotina y mentol se identificaron como activadores de este canal iónico (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2005, 2006; Andrade et al., 2012).

Por otra parte, se ha encontrado que xenobióticos como el clotrimazol (Meseguer et al., 2008), clorpromazina (Hill y Schaefer, 2007), clioquinol (Andersson et al., 2009), isoflurano (Matta et al., 2008), auranofina (Hatano et al., 2013) y 1,4-dihidropiridinas (Fajardo et al., 2008) activan al canal. La lidocaína produce la desensibilización del canal (Docherty et al., 2013), mientras que el adamantil (análogo del paracetamol) bloquea al canal (Fresno et al., 2014).

El TRPA1 también es un sensor de moléculas irritantes presentes en el medio ambiente como la acroleína, acetaldehído, aldehídos insaturados, hipoclorito (OCl^-), H_2O_2 , O_3 , CO_2 , formol y la luz ultravioleta (Andrade et al., 2012). Por otra parte, existen evidencias que demuestran la activación del TRPA1 por moléculas endógenas derivadas del metabolismo aeróbico, de la oxidación de lípidos, de la formación de peróxidos y del estrés oxidativo (Figura 8). En este contexto, un producto de la oxidación de la glucosa como el CO_2 , indirectamente activa al canal TRPA1 debido a su capacidad de liberar H^+ cuando es hidratado a ácido carbónico (Wang et al., 2010).

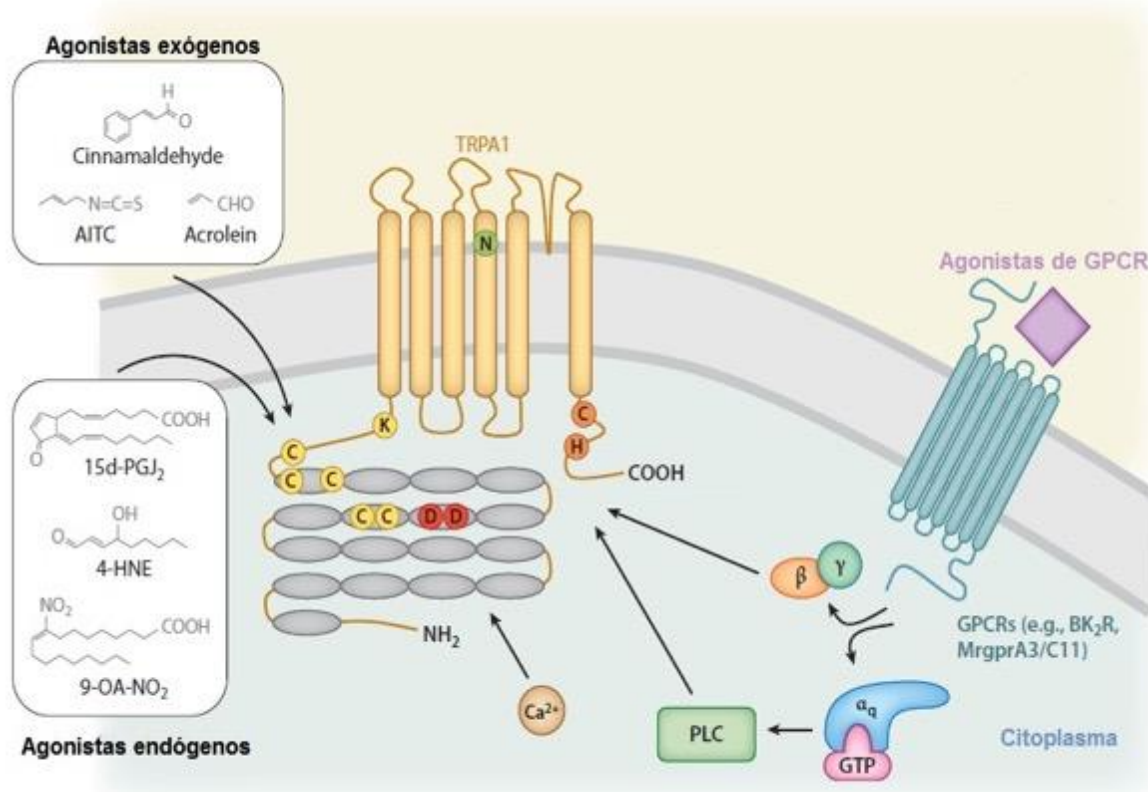


Figura 8. Mecanismos de activación del canal TRPA1. Los activadores endógenos y exógenos producen una modificación covalente de las cisteínas (C, amarillo) en el N-terminal que promueve la apertura del canal. La activación de algunos receptores acoplados a proteínas G (GPCR) modulan la actividad del TRPA1. Además, el canal tiene sitios de regulación como: dominios de anquirina (gris), dominios de unión a Ca²⁺ (D, rojo), la mutación que genera el síndrome de dolor episódico familiar (N, verde) y un sitio de unión a Zn²⁺ (C-H, anaranjado). Modificado de: Bautista et al., 2013.

Otro activador potente del canal TRPA1 es la 15-desoxi-delta-^{12,14}-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂), la cual se sintetiza mediante la COX después de una señal inflamatoria (Taylor-Clark et al., 2008). Además, las moléculas generadas durante el aumento en el estado oxidativo de la célula (causado por el desbalance entre la producción y la neutralización de compuestos oxidativos) como el 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), el 4-oxononenal (4-ONE), peroxinitritos, ácido nitrooleico, directamente activan al canal a través de la oxidación de grupos tioles (Tabla 1).

Tabla 1. Moduladores endógenos y exógenos involucrados en la activación, bloqueo y sensibilización/desensibilización del canal TRPA1.

Factor	Molécula	Vía de activación
Activadores exógenos	Temperatura fría (17°C), AITC ^a , CNN ^b , alicina, eugenol, THC ^c , acroleína, formaldehído, icilina, mentol, salicilato de metilo, nicotina, clotrimazol, cloroquina, BAM8-22 ^d , AEW ^e , H ₂ O ₂ , O ₃ , CO ₂ , luz ultravioleta, clotrimazol, clorpromazina, clioquinol, isoflurano, auronafina.	Corriente entrante, elevación de la [Ca ²⁺] _i , liberación de neuropéptidos, liberación de mediadores inflamatorios.
Activadores endógenos	ERO ^f , NO ^g , PGA2 ^h , 15dPGJ2 ⁱ , Δ12-PGJ2 ^j , 4-HNE ^k , 4-ONE ^l , DAG ^m .	Corriente entrante, elevación de la [Ca ²⁺] _i , liberación de neuropéptidos, liberación de mediadores inflamatorios.
Activadores indirectos / Sensibilización	Bradicinina, NGF ⁿ , BDNF ^o , proteasas, TSLP ^p , TRPV1 ^q , [Ca ²⁺] _i baja, CPZ ^r , nocistatina, carvacrol.	BK2R ^t , RTK ^u , PAR-2/4 ^v , dominio de unión a Ca ²⁺ , TSLPR ^w , interacción física.
Inhibidores / Desensibilización	PIP ₂ ^s , TRPV1, [Ca ²⁺] _i elevada, ácido nitrooleico, resolvina D2, glutamato, lidocaína, adamantil.	Unión directa a TRPA1, interacción física, dominio de unión a Ca ²⁺ , mGluR8x.

Abreviaturas: ^a alilisotiocianato, ^b cinamaldehído, ^c tetrahidrocanabinol, ^d médula adrenal bovina 8-22, ^e acetona, éter y agua, ^f especies reactivas de oxígeno, ^g óxido nítrico, ^h prostaglandina A2, ⁱ 15-desoxi-delta 12,14-prostaglandina J₂, ^j Δ12-prostaglandina J₂, ^k 4-hidroxinonenal, ^l 4-oxo-2-nonenal, ^m diacilglicerol, ⁿ factor de crecimiento neuronal, ^o factor neurotrófico derivado del cerebro, ^p linfopoyetina estromal tímica, ^q receptor de potencial transitorio vaniloide 1, ^r capsazepina, ^s fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, ^t receptor de bradicinina B2, ^u receptor tirosina cinasa, ^v receptor activado por proteasas 2 y 4, ^w receptor de linfopoyetina estromal tímica, ^x receptor metabotrópico de glutamato 8. Modificado de Gouin et al., 2017.

La interacción entre el canal TRPA1 y este tipo de compuestos reactivos es muy importante para que la célula pueda detectar el daño al tejido, en particular durante procesos inflamatorios. Se ha demostrado que el canal TRPA1 en humanos se activa directamente por el aumento en la concentración extracelular de H^+ (pH 6.0-7.0); sin embargo, esta interacción no existe en los canales TRPA1 de roedores y del mono Rhesus (de la Roche et al., 2013). En cuanto a la modulación del TRPA1 por los cambios en el pH_i , se demostró que este canal aumenta su actividad ante estados de alcalinización intracelular (Fujita et al., 2008). Por otra parte, la acidificación intracelular inducida por la aplicación de un ácido débil, como el ácido acético, genera un aumento en la actividad del canal expresado de manera heteróloga en células HEK293 (Figura 9) (Wang et al., 2011).

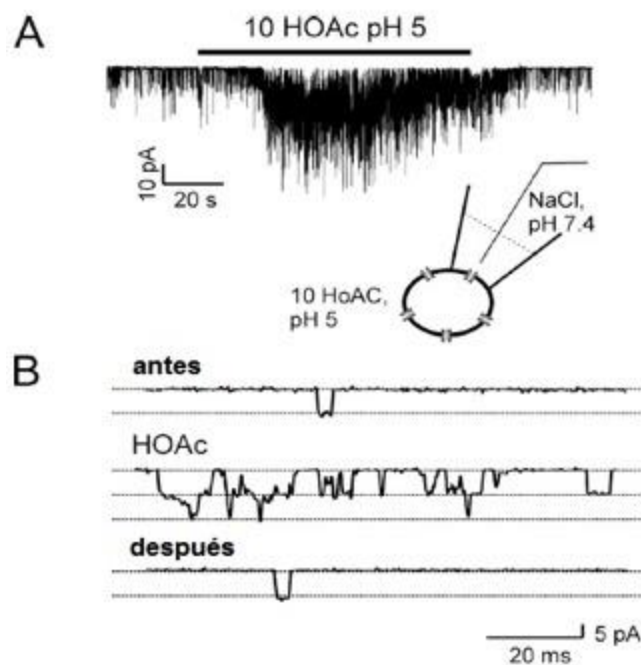


Figura 9. La acidificación intracelular activa al canal TRPA1. A) Actividad del canal TRPA1 determinada mediante *patch clamp* en la configuración de *cell-attached* ($V_m = -80$ mV) en células HEK293. Las respuestas se indujeron a través de aplicación de una solución de ácido acético (10 mM, pH 5.0) en la solución de registro extracelular. B) Registro de canal unitario para la actividad del TRPA1 antes, durante y después de la aplicación de ácido acético. Modificado de: Wang et al., 2011.

Debido a las características mencionadas anteriormente, se sugiere que el TRPA1 actúa en las neuronas nociceptivas como un integrador molecular de diversos estímulos para modular la percepción de estímulos físicos y químicos, la inflamación neurogénica, el estrés oxidativo y el dolor (Bautista et al., 2006). La participación del TRPA1 en diversas patologías hace de este canal un blanco terapéutico potencial para el que se han desarrollado bloqueadores específicos (Tabla 2).

Tabla 2. CI_{50} de diferentes bloqueadores del canal TRPA1.

Bloqueador	CI_{50}	Referencia
Chembridge-5861528 (CHEM)	14.3 μ M, humano	Wei et al., 2009.
AP18	3.1 μ M, humano	Petrus et al., 2007
	4.5 μ M, ratón	
HC-030031	6.2 μ M, ratón	McNamara et al., 2007
A-967079	67 nM, humano	McGaraughty et al., 2010
	289 nM, rata	Gauvin et al., 2009

1.6.4 Participación del canal TRPA1 en el dolor inflamatorio

La estimulación de las fibras sensoriales que inervan el tracto respiratorio induce la liberación de neuropéptidos inflamatorios (SP, CGRP y NKA) que promueven broncoconstricción, vasodilatación y el reclutamiento de células del sistema inmune (Richardson y Vasko, 2002). Estas fibras sensoriales expresan de manera abundante al canal TRPA1, al cual se le ha asociado con el mantenimiento de condiciones inflamatorias crónicas como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la fibrosis cística (Nagata et al., 2005; Nassenstein et al., 2008).

Por otra parte, la participación del canal TRPA1 en el dolor inflamatorio del tracto gastrointestinal se ha determinado en el modelo de colitis experimental inducida por la administración de ácido trinitrobenceno-sulfónico en ratas. Las respuestas motoras viscerales evocadas por la distensión colorectal mecánica dependen de la activación de TRPA1, debido a que estas respuestas disminuyen con la administración de TCS-

5861528, un bloqueador del TRPA1 (Vermeulen et al., 2013). Además, en este modelo se ha caracterizado que la hipersensibilidad mecánica está asociada a un incremento de *c-fos* (marcador de actividad neuronal) y al incremento del ARNm del TRPA1 en neuronas del GRD que inervan el colon (Yang et al., 2008; Cattaruzza et al., 2010). De forma similar, se ha descrito la importancia del TRPA1 en el desarrollo del dolor inflamatorio en un modelo experimental de pancreatitis (Schwartz et al., 2013).

El prurito es un proceso fisiológico asociado a la inflamación neurogénica que aparece por diversas condiciones como: la picadura de insectos, la dermatitis atópica o la psoriasis. Se ha descrito que la histamina y su receptor en las fibras C, así como la activación indirecta del canal TRPV1 regulan esta respuesta (Shim et al., 2007). No obstante, también se ha reportado que el canal TRPA1 participa en el desarrollo de prurito mediante un mecanismo independiente de histamina. En este caso la activación del TRPA1 es necesaria para que la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), una citosina liberada desde las células epiteliales y cebadas, ejerza su efecto pruritogénico (Wilson et al., 2011).

Se ha reportado que los agonistas de TRPA1 generan inflamación, hipersensibilidad de las vías respiratorias, dolor agudo e hiperalgesia (Bessac et al., 2008). Los ratones *knock out* para el gen del canal TRPA1 muestran una marcada reducción de las conductas nociceptivas agudas en respuesta a la administración de compuestos empleados para generar dolor inflamatorio como: formalina (concentraciones bajas), 4-HNE, prostaglandinas, H₂O₂ y bradicinina (Obata et al., 2005; Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006; Macpherson et al., 2007; McNamara et al., 2007; Trevisani et al., 2007; Andersson et al., 2008).

La delección de los canales TRPA1 disminuye el curso temporal de la hipersensibilidad de largo plazo (crónica) inducida por el coadyuvante completo de Freund (CFA) y por iodoacetato (Garrison y Stucky, 2014; Moilanen et al., 2015; Horvath et al., 2016). De forma interesante, distintos grupos de investigación han demostrado que además de disminuir el dolor asociado a la inflamación, la delección de los canales TRPA1 también

reduce la inflamación *per se* (Moilanen et al., 2015; Horvath et al., 2016), lo que da soporte al papel que tiene el TRPA1 en el desarrollo de la inflamación neurogénica. Complementario a las evidencias previas, se ha observado que el tratamiento con un oligonucleótido antisentido para los canales TRPA1 atenúa la hiperalgesia al frío en ratas con dolor de tipo inflamatorio y neuropático (Katsura et al., 2006).

El TRPA1 participa en el desarrollo de la hipersensibilidad que ocurre en el dolor inflamatorio. Así, la inyección de CFA, carragenina o iodoacetato en los roedores, produce una reducción del umbral de respuestas de retiro de la pata ante la estimulación térmica y mecánica; la administración de bloqueadores del canal TRPA1 disminuye estas respuestas (McGaraughty et al., 2010; Okun et al., 2012; Bonet et al., 2013; Asgar et al., 2015). De forma particular, la administración intratecal de CHEM (bloqueador del TRPA1) disminuye la hipersensibilidad mecánica inducida por la inyección de formalina (Wei et al., 2011). Debido a las condiciones asociadas al procesamiento del dolor inflamatorio de largo plazo como la acidificación intracelular, las propiedades moleculares del TRPA1 convierten a este canal en una proteína clave para la modulación de la transmisión nociceptiva.

2. JUSTIFICACIÓN

Los nociceptores son neuronas que detectan y transducen diversos estímulos físicos y químicos; entre estos estímulos, la acidosis tisular es una característica común de todos los procesos de dolor que cursan por un proceso inflamatorio. La regulación del balance ácido-base y el mantenimiento del pH en un rango estrecho cercano a 7.4 es uno de los principios básicos de la homeostasis celular. Sin embargo, ante una disminución del pH extracelular, los H^+ pueden amplificar la señal nociceptiva mediante la activación de los canales TRPV1 y ASICs. Se ha demostrado que los H^+ además de activar estos canales, difunden a través de ellos disminuyendo el pH_i . De forma que, el efecto excitador producido por el incremento en la concentración de H^+ sobre los nociceptores también depende de la acidificación intracelular generada por la entrada de los H^+ al interior de la célula. Se ha reportado que los intercambiadores NHE1 participan de forma activa en el transporte de los H^+ al exterior celular y que su bloqueo farmacológico genera un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas del GRD y en las conductas nociceptivas en modelos de dolor inflamatorio en ratas; asimismo, durante el dolor inflamatorio crónico los nociceptores tienen una reducción en la expresión de NHE1, lo cual contribuye a la acidificación intracelular. El TRPA1 es un canal catiónico que se expresa en los nociceptores y se activa intracelularmente por los H^+ . La actividad del TRPA1 genera corrientes entrantes de Ca^{2+} que despolarizan la membrana; por lo tanto, la regulación de la actividad de TRPA1 es importante para la transmisión de las señales nociceptivas. Hasta ahora no existe evidencia que sustente la participación del TRPA1 en los nociceptores bajo condiciones de acidosis intracelular, lo cual es un mecanismo fundamental para esclarecer el procesamiento nociceptivo que subyace al dolor inflamatorio crónico.

3. HIPÓTESIS

La acidificación intracelular inducida por el bloqueo del intercambiador NHE1, favorece el aumento de la actividad del canal TRPA1 en neuronas del GRD y en ratas que cursan por un estado de inflamación crónica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la interacción funcional entre el transportador NHE1 y el canal TRPA1 en neuronas del GRD y en ratas con dolor inflamatorio.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar, mediante microfluorometría, el efecto de la inhibición del NHE1 en los cambios en el pH y la concentración de Ca^{2+} intracelular en las neuronas del GRD.
- Determinar, mediante la técnica de *patch-clamp*, el efecto de la inhibición del NHE1 en las corrientes iónicas del canal TRPA1 en neuronas del GRD.
- Determinar, mediante inmunohistoquímica, la expresión del canal TRPA1 y del intercambiador NHE1 en el GRD de la rata.
- Determinar, mediante técnicas farmacológicas, el efecto del bloqueo de los canales TRPA1 y la inhibición del NHE1 en las conductas de nociceptivas inducidas por formalina, CFA y AITC en ratas.
- Determinar, mediante *western blot*, la expresión de los canales TRPA1 durante el proceso inflamatorio de largo plazo inducido por formalina al 1 %.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar de 9 a 10 semanas de edad (P63- P70) mantenidas bajo condiciones controladas de aire, temperatura, humedad relativa y ciclos de luz-oscuridad 12:12 h provenientes del bioterio del Cinvestav (Unidad Coapa). Las ratas se mantuvieron con acceso libre al agua y alimento. El cuidado y manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Los protocolos de evaluación de la conducta nociceptiva se realizaron de acuerdo a las guías sobre aspectos éticos para la investigación del dolor experimental en animales (Zimmermann, 1983). El protocolo para el uso y cuidado de los animales fue aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Cinvestav (CICUAL, # 009214).

5.2 Fármacos

La formalina al 1 % se preparó en agua o en buffer de fosfatos a partir de la solución de formaldehído al 37 % (cat. 2106-05, Merck-México, Naucalpan, Edo. de México), el cual se considera como una solución al 100 %. El CFA (cat. F-5881, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) es una emulsión de fragmentos de *Mycobacterium tuberculosis*, parafina líquida y monooleato de manida, que se administró sin diluir. El AITC (Cat. 377430, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) se preparó al 2 % en DMSO al 0.1 %. La zoniporida (clorhidrato de [1-(quinoli-5-il)-5-ciclopropil-1H-pirazol-4-carbonil] guanidina) (Cat. 2727, Tocris, Avonmouth, Bristol) se diluyó en agua. El A-967079 (1E,3E-1-(4-fluorofenil)-2-metil-1-penteno-3-ona oxima) (Cat. 4716, Tocris, Avonmouth, Bristol) se diluyó en DMSO al 0.1 %. El A-967079, bloqueador del TRPA1, se seleccionó en función de la concentración inhibidora media máxima (CI₅₀) (Tabla 2).

5.3 Cultivo primario de neuronas del GRD aisladas de rata adulta

Los cultivos primarios de neuronas disociadas del GRD se obtuvieron de ratas adultas. Los animales se sacrificaron por decapitación y los GRD (L4-6) de ambos lados de la columna vertebral se disectaron cuidadosamente y se colectaron en medio de cultivo DMEM (Cat. 31600-034, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Posteriormente, los ganglios se transfirieron a un tubo con 1.5 mg/ml de papaína (Cat. P4762, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) y 1.5 mg/ml de colagenasa tipo 1A (Cat. C9891, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) disueltas en DMEM, durante 35 min a 37°C. Después de la digestión enzimática, la solución se reemplazó con medio DMEM fresco y el tejido se disgregó mecánicamente mediante pipetas de vidrio siliconizadas y de diámetro reducido hasta obtener una suspensión. Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm, el sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en medio DMEM. El procedimiento desde la centrifugación hasta la resuspensión se realizó en dos ocasiones más.

El botón celular se resuspendió en medio DMEM suplementado al 2% con B-27 (Cat. 00800-85 SA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y al 1 % con antibiótico/antimicótico (Cat. 15140-122, Thermo Fisher, Scientific, Waltham, MA). Las células se filtraron a través de una malla de 40 µm (Cat. CLS 431750, Sigma-Aldrich, San Luis, MO). De la suspensión celular obtenida, se colocó un volumen de 100 µl en cámaras de cultivo pre-tratadas con poli-L-lisina (10 µg/ml, Cat. P9404, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) y laminina (10 µg/ml, Cat. L2020, Sigma-Aldrich, San Luis, MO). Las células se mantuvieron en la incubadora (37°C y 5 % de CO₂) durante un periodo de 16-20 h antes de comenzar los experimentos para permitir su adherencia.

5.4 Medición del pH_i mediante microfluorometría

Las neuronas del GRD en cultivo y mantenidas en la cámara de registro se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con el indicador fluorescente sensible a los H⁺, BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(-6)-carboxifluoresceína) en su forma acetometil éster (Cat. B1170, Thermo Fisher, Scientific, Waltham, MA), a una concentración de

2.5 μM en solución extracelular estándar (SEE), compuesta (en mM) por: 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 glucosa, 10 HEPES, pH 7.4 ajustado con NaOH. La osmolaridad de la SEE se ajustó con sacarosa para obtener valores de 300 mOsm/l (Xu y Huang, 2002). El exceso de indicador se eliminó mediante tres lavados consecutivos con SEE.

El registro de los cambios en el cociente de fluorescencia se midió a dos longitudes de onda: 440 y 495 nm, y se adquirieron a una frecuencia de 5 puntos por segundo. En todos los registros, las lecturas de los valores basales se registraron durante 30 segundos. El valor de pH_i se calculó a partir de los cocientes de fluorescencia del BCECF obtenidos de la curva de calibración con la solución (en mM): KCl 130, NaCl 20, CaCl_2 1, MgCl_2 1, HEPES 5 (ajustada a los valores de pH 5, 6, 7, 8 y 9) y 10 μM de nigericina. La zoniporida y el AITC se aplicaron mediante un sistema de perfusión local a través de pipetas de vidrio colocadas cerca de cada célula con la ayuda de micromanipuladores. La presión y duración de los pulsos se controló con una picobomba.

5.5 Medición de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante microfluorimetría

El cambio transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en las neuronas del GRD se determinó con el fluoróforo de Ca^{2+} de alta afinidad Fura-2. Las células, mantenidas en la cámara de registro, se incubaron con 5 μM de Fura-2 AM (la forma acetometil éster de Fura, Cat. F1221, Thermo Fisher, Scientific, Waltham, MA) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con SEE. El registro de los cambios en el cociente de fluorescencia se midió a dos longitudes de onda: 350 y 380 nm (Grynkiewicz et al., 1985), y se adquirió a una frecuencia de 5 puntos por segundo. En todos los registros, los valores basales se obtuvieron durante 30 segundos. Los fármacos se aplicaron con un sistema de perfusión local a través de pipetas de vidrio, de acuerdo al diseño experimental mostrado en la Figura 10.

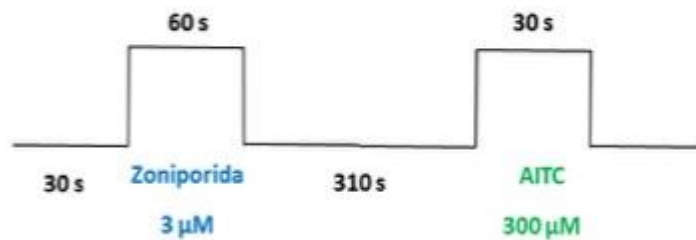


Figura 10. Diseño experimental de los registros de microfluorimetría para la determinación de los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas disociadas del GRD.

5.6 Registros electrofisiológicos de neuronas del GRD aisladas de rata adulta

Los registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas del canal TRPA1 se determinaron mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa. Los electrodos se fabricaron a partir de micropipetas de borosilicato utilizando un estirador horizontal automático de pipetas (P-97 Sutter Instrument, Novato CA). La resistencia de los electrodos fue de 2-4 M Ω . Las células se registraron en un sistema con perfusión continua de SEE (500 $\mu l/min$). Las pipetas se llenaron con solución interna de registro (en mM): 140 KCl, 0.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 EGTA, 5 HEPES, 2 ATP-Mg²⁺. Para realizar los experimentos se seleccionaron aquellas células que

presentaron una capacitancia menor a 25 pF. Durante el registro, la señal se amplificó (PC 505B, Warner Instrument, Hamden, CT), digitalizó (Digidata 1440A, Molecular Devices, San Jose, CA) y almacenó en una computadora. Los registros se obtuvieron en la modalidad de fijación de voltaje a un potencial de mantenimiento de -60 mV. El AITC (300 μ M) se aplicó durante 30 segundos y la zoniporida (3 μ M) se aplicó durante 2 min a través de un microperfusor (Perfusion Fast-Step SF-77B, Harvard Apparatus, Hollistone, MT), con un diseño experimental que se muestra en la Figura 11. La magnitud de la corriente evocada por AITC se determinó como la amplitud de la corriente al pico en todos los experimentos.

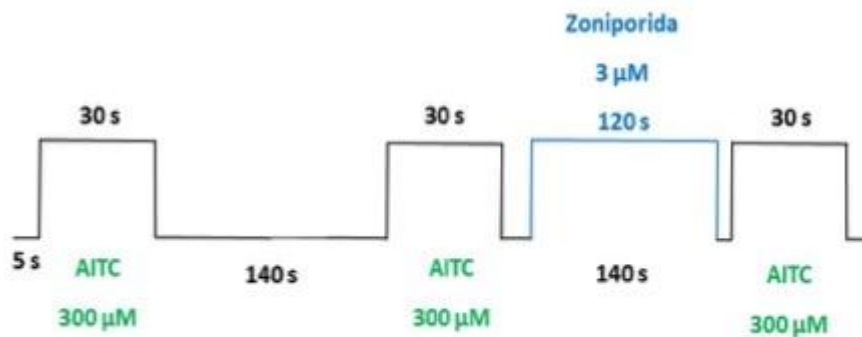


Figura 11. Diseño experimental de los registros electrofisiológicos para la determinación de las corrientes evocadas por la estimulación del TRPA1 en neuronas dissociadas del GRD.

5.7 Inmunohistoquímica de neuronas del GRD

Las ratas se sacrificaron con CO₂ y se perfundieron intra-aórticamente con 300 ml de líquido cefalorraquídeo artificial, (en mM: NaCl 125, KCl 2.5, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 2, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.25, glucosa 25, pH 7.4) a una velocidad de flujo de 18-25 ml/min. Después, los animales se decapitaron para extraer los GRD. Posteriormente, los GRD se colocaron en paraformaldehído al 4 % disuelto en buffer de fosfatos salinos (PBS, 0.15 M, pH 7.4) y se post-fijaron por 60 minutos, se lavaron con PBS y se crioprotegieron con sacarosa al 30 % en PBS por 72 h. Finalmente, se cubrieron con OCT (Tissue-Teck, Cat.4583, Torrance, CA), se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C. Los GRD se cortaron en secciones longitudinales (14 μ m) con un crióstato y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados. Se utilizó una pluma hidrofóbica (Super Pap-Pen, Cat. H2802, EBSscience, East Granby, CT) para dibujar

un anillo en la periferia de las secciones y posteriormente se dejaron secar durante toda la noche. Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces por 10 min en cada ocasión con buffer de tris salino (TBS) + Tritón X-100, seguido de 2 lavados de 5 min cada uno con una solución de borohidruro de sodio al 0.5 % (NaBH_4 , Cat. 102894, MP Biomedicals, Santa Ana CA). Para prevenir uniones inespecíficas de los anticuerpos, las secciones se incubaron durante 1 h con solución de bloqueo (suero normal de burro al 4 % y Tritón X-100 al 0.2 %, en TBS). La dilución de los anticuerpos primarios se realizó en la solución de bloqueo y se incubaron toda la noche a 4°C.

La inmunodetección del canal TRPA1 y del intercambiador NHE1 en los GRD se realizó mediante el uso de los anticuerpos primarios anti-TRPA1 (rabbit 1:6000, Cat. ab68847, Abcam, Cambridge, RU) y anti-NHE1 (mouse 1:3000, Cat. sc-136239, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Al día siguiente, se realizaron 3 lavados por 10 min cada uno con TBS + 0.2 % de Tritón X-100. Después, se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a los fluoróforos Cy3 (anti-rabbit 1:1000, Cat. 711-166-152, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y/o Cy2 (anti-mouse 1:1000, Cat. 715-225-150, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de este periodo, las secciones se lavaron en 3 ocasiones más y se dejaron secar por 30 min para finalmente teñir los núcleos con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Cat. D3541 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Al portaobjetos se le colocó Vectashield (Cat. H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se protegió con un cubreobjetos. El análisis de la inmunofluorescencia de las secciones de los GRD se realizó con un microscopio confocal (Zeiss, Irvine, CA). Se utilizó el software Zen lite (Zeiss, Irvine, CA) para capturar las imágenes manteniendo los ajustes de exposición e intensidad de la lámpara de fluorescencia.

5.8 Pruebas conductuales

Para evaluar la participación del canal TRPA1 y su interacción con el intercambiador NHE1 en el procesamiento nociceptivo se realizaron las pruebas de formalina, AITC y CFA en las ratas. Las conductas nociceptivas agudas se indujeron mediante la administración de 50 µl de AITC al 2 % o formalina al 1 % por vía subcutánea (s.c.) en el dorso de la pata posterior derecha de la rata. Las conductas nociceptivas a largo plazo se indujeron mediante la administración de formalina al 1 % (50 µl) o 25 µl de CFA (s.c.) en el dorso de la pata posterior derecha de la rata. Las conductas nociceptivas evocadas por la administración de AITC se evaluaron a los 5 y 60 min, respectivamente (Govea y Carlton, 2016). Las conductas nociceptivas evocadas por formalina aparecen durante la primera hora posterior a la administración (Dubuisson y Dennis, 1977); mientras que las conductas de alodinia e hiperalgesia mecánicas secundarias inducidas por formalina al 1 % aparecen desde el día uno posterior a la inyección y permanecen por al menos 12 días (Fu et al., 2001). La alodinia táctil inducida por CFA se puede observar en el intervalo de 6 horas (Machelska et al., 2003) y hasta 18 días (Jiang et al., 2015). Las conductas nociceptivas de largo plazo inducidas por formalina se evaluaron 6 días después de la inyección (Ambriz y cols., 2009); mientras que la alodinia táctil inducida por CFA se evaluó al día 7 (Bravo-Hernández et al., 2015).

5.9 Diseño experimental para la evaluación de las conductas nociceptivas

La conducta nociceptiva aguda inducida por la inyección de formalina al 1 % se determinó mediante la cuantificación del número de sacudidas de la pata inyectada por un minuto cada 5 minutos, durante 60 minutos que dura la prueba (Dubuisson y Dennis, 1977). La evaluación de las conductas de alodinia e hiperalgesia mecánicas secundarias inducidas por formalina al 1 % se llevó a cabo mediante el método del número de respuestas de retiro de la pata en respuesta a la estimulación mecánica con los filamentos de von Frey (un filamento que al doblarse aplica una presión constante de 1 g para evaluar la alodinia y un filamento que al doblarse aplica una presión constante de 26 g para evaluar la hiperalgesia; Fu et al., 2001) (Figura 12).

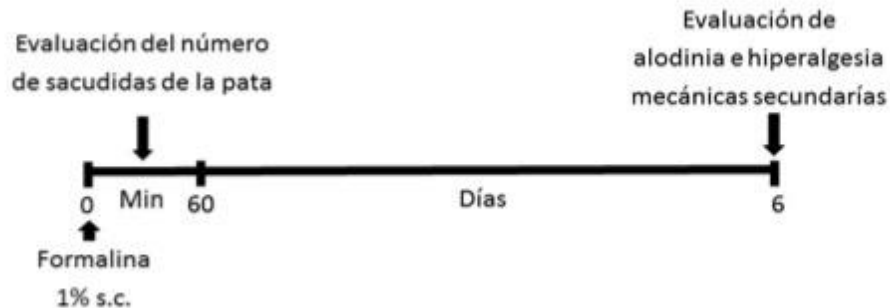


Figura 12. Diseño experimental para la evaluación de las conductas nociceptivas agudas y crónicas inducidas por formalina en ratas.

Con el objetivo de evaluar si los canales TRPA1 participan en el desarrollo de la alodinia e hiperalgnesia de largo plazo inducidas por formalina, se llevó a cabo un protocolo de pre-tratamiento en donde el bloqueador A-967079 se administró en el dorso de la pata posterior derecha (s.c., 50 μ l) y transcurridos 10 minutos, se administró formalina (s.c., 50 μ l) en la misma pata en la que se administró el bloqueador. Las conductas nociceptivas se evaluaron al día 6 posterior a la inyección de formalina (Figura 13).

Para evaluar si los canales TRPA1 participan en el mantenimiento de los fenómenos nociceptivos de largo plazo se empleó el protocolo de post-tratamiento en el cual se administró formalina al 1 % en la pata posterior derecha y seis días después se evaluaron las conductas de alodinia e hiperalgnesia. Posteriormente, se administró el bloqueador A-967079 (s.c.) a la concentración más efectiva observada en el protocolo de pre-tratamiento y las conductas nociceptivas mencionadas anteriormente se evaluaron una hora después de la administración del bloqueador (Figura 13).

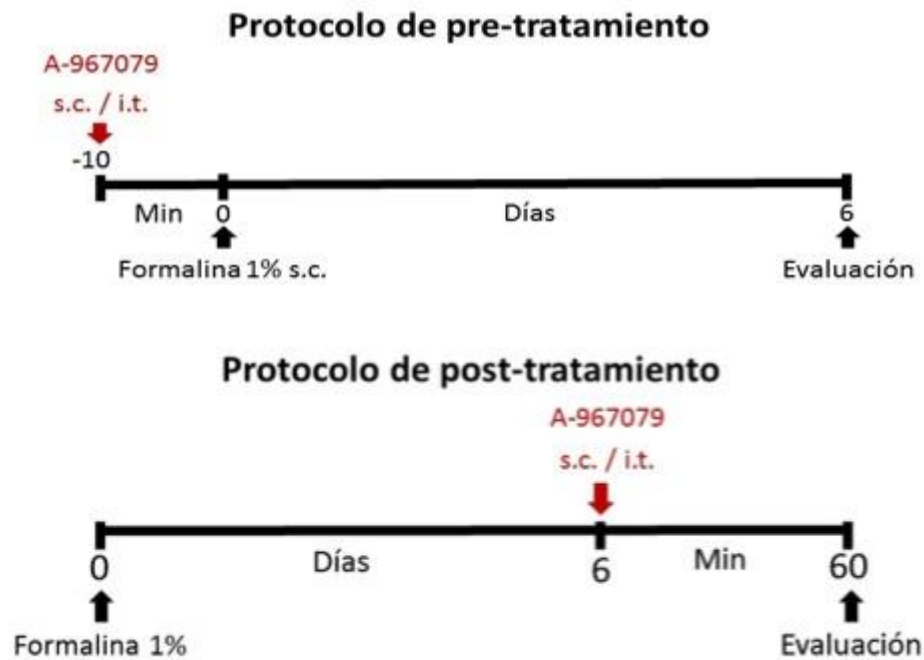


Figura 13. Diseño experimental para la determinación del papel de TRPA1 en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia e hiperalgesia mecánicas inducidas por formalina en ratas.

La conducta nociceptiva espontánea inducida por AITC al 2 % se evaluó mediante la cuantificación del número de sacudidas de la pata inyectada durante los primeros 5 minutos, posteriores a la inyección de AITC. La hipersensibilidad, evocada por la estimulación mecánica, inducida por AITC se determinó mediante la evaluación de la alodinia táctil con el método de arriba-abajo (*up-down*) (Dixon, 1980; Chaplan et al., 1994). En el paradigma arriba-abajo la prueba se inició con el filamento de 1 g, con incrementos logarítmicos de rigidez o dureza de los filamentos. En función de la respuesta positiva o negativa ante la aplicación de los filamentos en la superficie plantar de la rata, se disminuyó o se incrementó la fuerza aplicada con los filamentos (0.016–60 g), respectivamente. La evaluación de la alodinia táctil se determinó 60 minutos después de la inyección de AITC al 2 %. Para determinar la interacción entre el NHE1 y el TRPA1 se realizó un protocolo de pre-tratamiento en el que se administró A-967079 (-20 min) y zonisporida (-10 min) de forma previa a la administración de AITC (Figura 14).

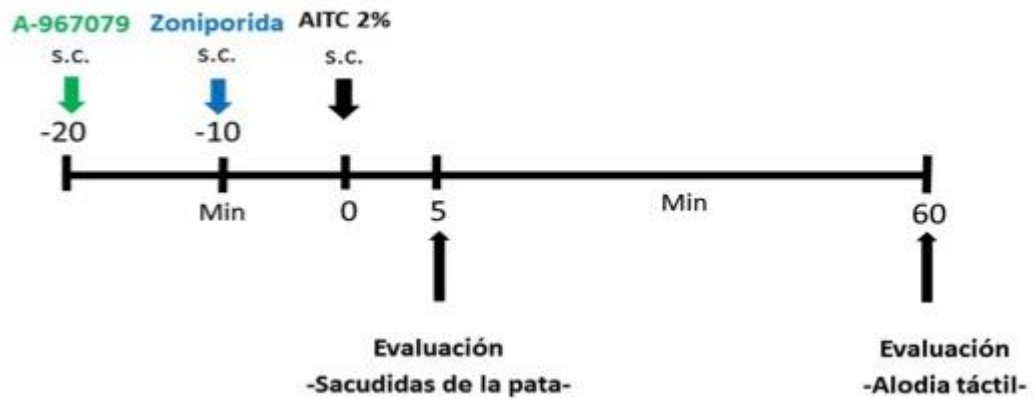


Figura 14. Diseño experimental para la determinar la interacción entre NHE1 y TRPA1 en las conductas nociceptivas inducidas por AITC al 2% en ratas.

La hipersensibilidad mecánica inducida por CFA (25 μ l, s.c.) se determinó mediante la evaluación de la alodinia táctil con el método de *up-down*. Para determinar la interacción entre el intercambiador NHE1 y el canal TRPA1 se realizó un protocolo de pre-tratamiento en el que se administró A-967079 (-20 min) y zoniporida (-10 min) de forma previa a la administración de CFA, la alodinia táctil se evaluó a los días 1, 3, 7 y 14 posteriores a la inyección de CFA (Figura 15).

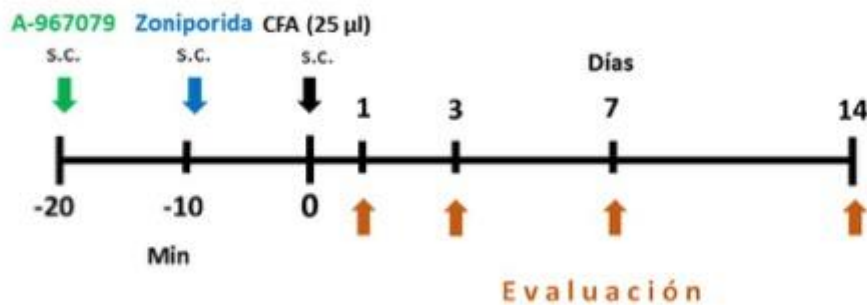


Figura 15. Diseño experimental para la determinar la interacción entre NHE1 y TRPA1 en las conductas nociceptivas inducidas por CFA en ratas.

5.10 Western blot

Las ratas naïve y las ratas inyectadas con formalina al 1 % se sacrificaron por decapitación, se extrajo la médula espinal dorsal y los GRD (L4-L6) a los tiempos mostrados en el diseño experimental (Figura 16). Los tejidos se homogenizaron mecánicamente en 200 µl de buffer de lisis (en mM: 150 NaCl, 50 Tris-Base, 5 EDTA, 0.1 fluoruro de fenilmetilsulfonio, 0.01 pepstatina A, 0.01 leupeptina y 0.01 de aprotinina) durante 5 min a 4 °C. Las muestras se centrifugaron y se obtuvo la fracción del sobrenadante de cada una de ellas. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). 50 µg de proteína total se separaron mediante un gel desnaturante de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), posteriormente las proteínas se electro-transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó con PBS-tween20 al 0.1 % (PBS-T) en leche descremada y sin grasa al 5 % durante toda la noche.

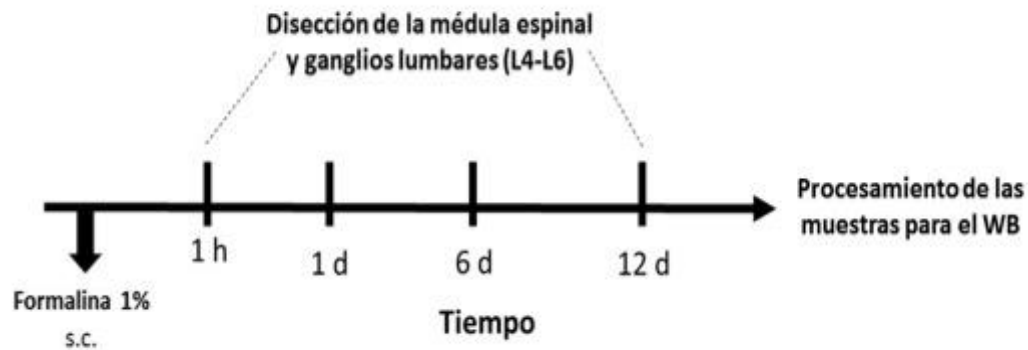


Figura 16. Diseño experimental para la determinar la expresión del TRPA1 durante el proceso inflamatorio inducido por formalina.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario contra TRPA1 a una dilución de 1:2000 durante toda la noche y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa del rábano (HRP) (anti-rabbit 1:4000, Cat. sc-2370, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) y nuevamente se realizaron tres lavados con PBS-T. Las membranas utilizadas para

la detección de TRPA1 también se emplearon para detectar la señal de actina (1:5000, Cat. MAB1501R, Millipore Temecula, CA) con su respectivo anticuerpo secundario (anti-mouse 1:10000, Cat. 62-6520 Zymed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Las bandas específicas se detectaron mediante el sistema de quimioluminiscencia (Immobilon Western, Cat. WBKLS0500, Millipore Billerica, MA). La intensidad de la inmunoreactividad se analizó mediante el *software* LI-COR (Bioscience, Lincoln, NE). La intensidad relativa de la inmunoreactividad a TRPA1 se normalizó respecto a la señal de actina.

5.11 Análisis de datos y estadística

Para las determinaciones pH_i y $[Ca^{2+}]_i$, los valores de fluorescencia máxima obtenidos en los cursos temporales de los registros de microfluorimetría, se promediaron en un intervalo de 10 segundos. Los datos se expresaron como pH_i para el BCECF y como $[Ca^{2+}]_i$ para el Fura-2.

En los estudios electrofisiológicos la magnitud de la corriente se cuantificó mediante la amplitud de la corriente al pico (promediada en un intervalo de 500 ms) y se expresó como densidad de corriente mediante la determinación de la capacitancia de la membrana (C_m) de cada neurona registrada.

Los resultados generados de la evaluación de las conductas nociceptivas se expresan como el número de sacudidas, número de respuestas de retiro o como el umbral de retiro de la pata en cada grupo experimental de 6 animales.

La expresión de la proteína de TRPA1 se representa como la intensidad relativa de la digitalización de la señal de los *blots*, obtenida de muestras del GRD y médula espinal de 4 animales independientes por grupo.

Todos los resultados obtenidos se expresan como el promedio \pm el error estándar (e.e.). La diferencia entre más de dos grupos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías. Si el ANOVA demostraba una interacción

significativa entre las variables se realizó un análisis pos hoc a través de una comparación múltiple con la prueba de Student Newman-Keuls (SNK). Para analizar los datos se empleó el software estadístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Una $P < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo primario de neuronas del GRD aisladas de rata adulta

Las neuronas aisladas del GRD de ratas adultas constituyen el sistema celular en el cual se realizaron los estudios de microfluorimetría y *patch-clamp*. Estos estudios requieren viabilidad y estabilidad celular para determinar los diferentes parámetros (pH_i , $[Ca^{2+}]_i$ y corrientes de membrana). En este sentido, se estandarizó el cultivo de neuronas del GRD obtenido de ratas adultas. Estudios previos han correlacionado la velocidad de conducción con el tamaño del soma (Passmore, 2005; Barabas et al., 2008); por lo tanto, se seleccionaron células con un diámetro de soma $< 30 \mu m$, que corresponden a las neuronas nociceptivas. Además, se consideró que las células eran viables e incluidas en el análisis si se mostraban esféricas/ovoides, sin la presencia de vesículas y refringentes (Figura 17).

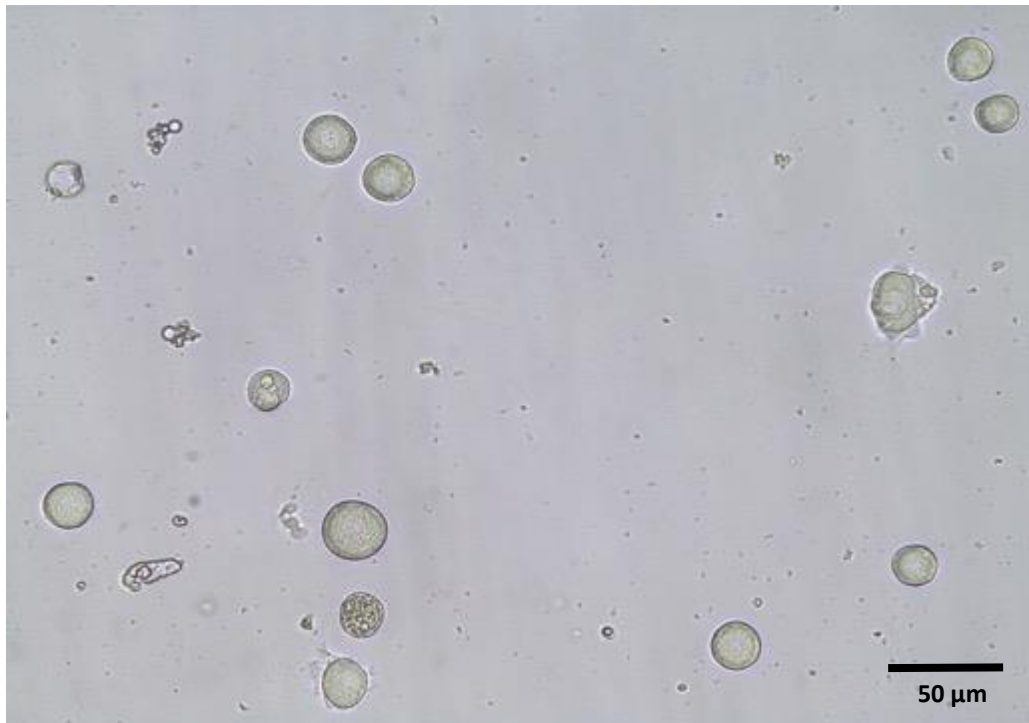


Figura 17. Fotomicrografía representativa de neuronas disociadas del GRD de rata adulta. La imagen en campo claro muestra el tamaño y la forma de las neuronas. Fotografía obtenida con una magnificación de 10X.

6.2 Efecto de la zoniporida en el pH_i

Para determinar los cambios en el pH_i en las neuronas disociadas del GRD de ratas naïve adultas, se realizó una curva de calibración (Thomas et al., 1979). Los valores de calibración fueron sustituidos en la fórmula $\text{pH}_i = \text{pKa} - \text{Log} \left(\frac{R_{\text{min}} - R}{R - R_{\text{max}}} \right)$ (James-Kracke et al., 1992) y arrojaron valores de R_{min} y R_{max} de 0.0947 y 0.4093, respectivamente (Figura 18). El valor de pKa (6.98), se obtuvo de la hoja técnica del proveedor de BCECF.

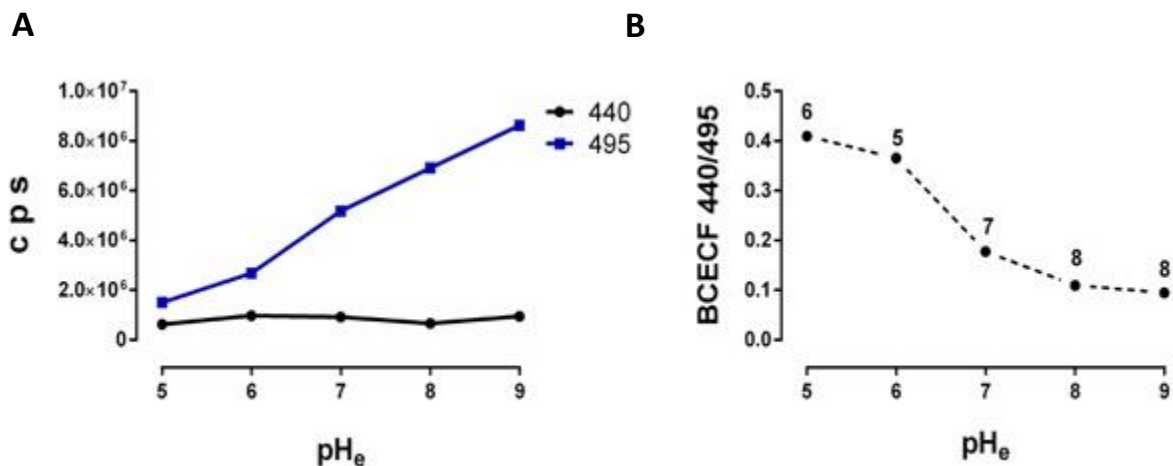


Figura 18. Curva de calibración del pH_i determinados por el cociente de fluorescencia de BCECF. A) Intensidad de fluorescencia medida a las longitudes de onda de 440 y 495 nm. B) Cocientes de fluorescencia expresados como función del pH_e. Los trazos corresponden al promedio de los valores obtenidos para cada célula y el error estándar. En la parte superior de cada punto en el gráfico se representa el número de neuronas registradas. cps, cuentas por segundo. pH_e, pH extracelular.

Para determinar si la inhibición del intercambiador NHE1 modifica los valores basales del pH_i de las neuronas del GRD, se probaron concentraciones diferentes de zoniporida, un inhibidor del NHE1. Como se observa en la figura 19A, la aplicación de zoniporida (1 – 10 μM) durante 1 minuto disminuyó los valores del pH_i. El efecto de la zoniporida en el pH_i de las neuronas del GRD dependió de la concentración. En particular, 3 y 10 μM redujeron el pH_i (p < 0.05) (Figura 19B). Estos datos sugieren que la inhibición farmacológica del intercambiador NHE1 genera una acidificación intracelular en las neuronas del GRD.

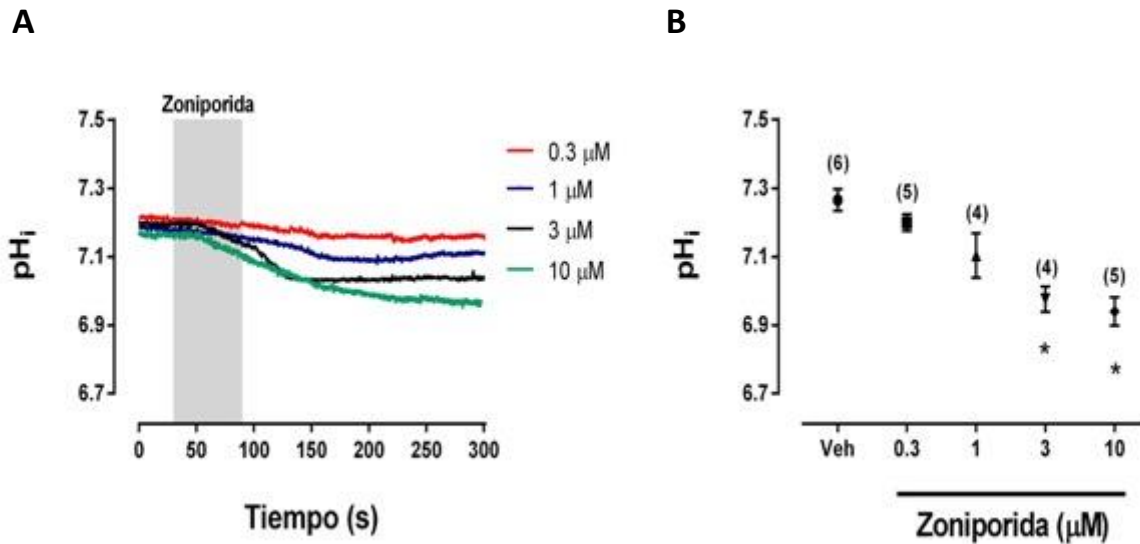


Figura 19. Acidificación intracelular inducida por zonisamida en neuronas del GRD aisladas de ratas adultas. A) Curso temporal de la aplicación de diferentes concentraciones de zonisamida durante 60 segundos (s). B) Curva concentración-respuesta del efecto de diferentes concentraciones de zonisamida en el pH_i de neuronas del GRD. En la parte superior de cada punto en el gráfico se muestra el número de neuronas registradas. * P < 0.05 vs Vehículo (Veh) por ANOVA de una vía seguida de SNK.

Se ha reportado que la activación de los canales TRPV1 y ASIC1a genera una acidificación intracelular debido a que los H⁺ permean a través de estos canales (Hellwig et al., 2004; Chen y Grunder, 2007). Para determinar si la actividad del canal TRPA1 modifica el pH_i de las neuronas del GRD, se aplicó AITC (activador del canal TRPA1) a una concentración de 300 μM durante 30 segundos. La fluorescencia se registró durante un periodo de 3 minutos. Como se observa en la figura 20, bajo estas condiciones, ninguna de las células registradas (n=8) presentó un cambio en los valores del pH_i ante la aplicación de AITC. Estos resultados sugieren que la activación del canal TRPA1 por AITC no promueve la acidificación intracelular.

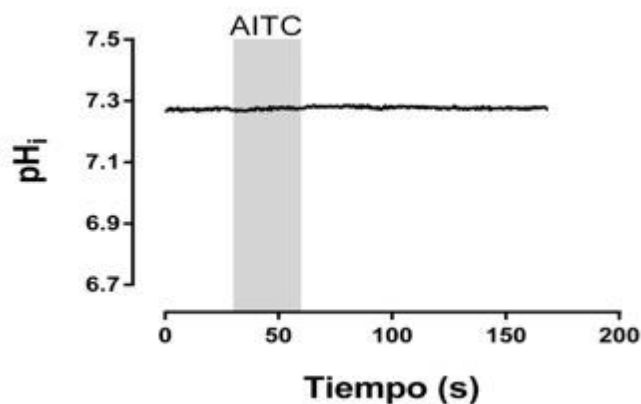


Figura 20. Efecto de la aplicación de AITC sobre el pH_i en neuronas del GRD. Curso temporal de la aplicación de AITC ($300 \mu\text{M}$) durante 30 segundos (s). $n=8$.

6.3 Efecto de la zoniporida y el AITC en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Con el objetivo de identificar si la inhibición del intercambiador NHE1 podría modular la actividad del canal TRPA1, se determinó el efecto de la aplicación de zoniporida y AITC sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las neuronas del GRD aisladas de ratas adultas. Las células se estimularon con concentraciones diferentes de AITC (10, 30, 100 y $300 \mu\text{M}$) y zoniporida (0.3, 1, 3 y $10 \mu\text{M}$). Cada neurona recibió una sola concentración de los fármacos empleados y al finalizar cada experimento se aplicó KCl (50 mM) a las células para evaluar su viabilidad.

La estimulación del canal TRPA1 o la inhibición del intercambiador NHE1 en las neuronas del GRD aumentó de manera transitoria la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 21A/B). Este efecto dependió de la concentración de AITC y zoniporida (Figura 21C/D). En experimentos posteriores, la concentración de $300 \mu\text{M}$ de AITC se seleccionó para caracterizar a las neuronas que expresan funcionalmente al TRPA1. Es importante señalar que en todas las evaluaciones las respuestas se consideraron como positivas si el incremento en el cociente 350/380 era mayor al 15% de los niveles basales durante la aplicación de los fármacos (Govea y Carlton, 2016). La aplicación del vehículo no generó ningún cambio en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indicando que el incremento en la concentración de Ca^{2+}

se debe a la acción de los fármacos y no es un producto de la estimulación mecánica por la aplicación de los compuestos sobre las células (Figura 21C/D).

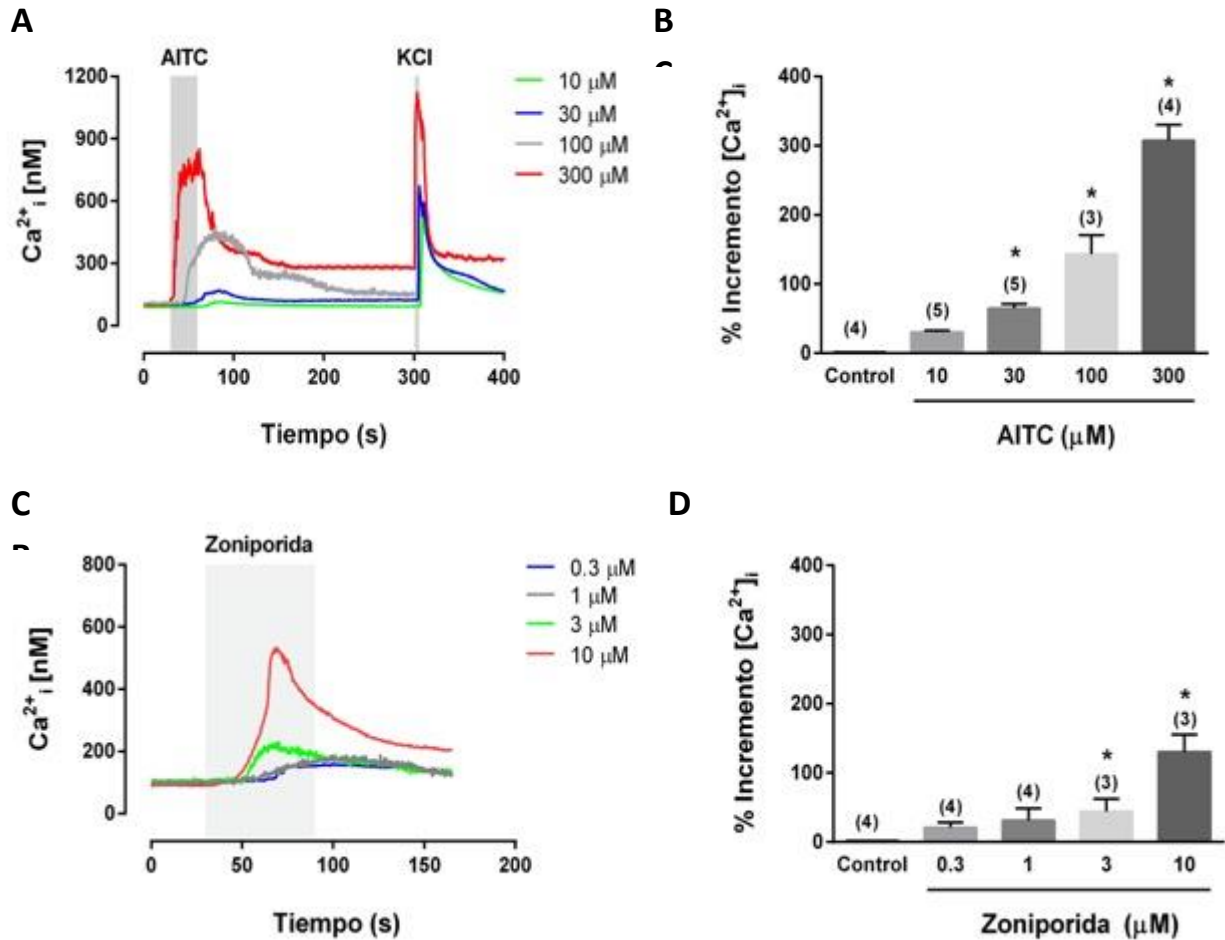


Figura 21. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas del GRD. A/C. Curso temporal de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la aplicación de AITC y zoniporida, respectivamente. B/D. Efecto de las diferentes concentraciones empleadas de AITC o zoniporida en la $[Ca^{2+}]_i$ de neuronas aisladas del GRD de rata adulta. * $P < 0.05$ vs Control por ANOVA de una vía seguida de SNK.

Para determinar si el NHE1 y el canal TRPA1 se expresaban funcionalmente en el mismo tipo de neuronas, se evaluaron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ ante la aplicación de zoniporida (3 μM) y AITC (300 μM). La estimulación con ambos compuestos en las mismas neuronas generó un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de una magnitud similar a la observada en la aplicación individual, indicando la presencia funcional de ambas proteínas (NHE1-TRPA1) en neuronas del GRD de rata adulta (Figura 22).

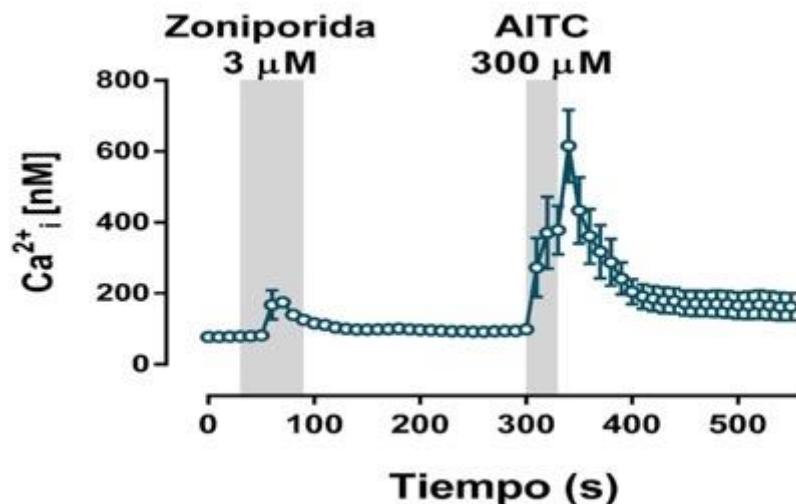


Figura 22. Curso temporal de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ generados por la aplicación de zoniporida ($3 \mu M$) en neuronas que responden a AITC ($300 \mu M$). $n=4$.

6.4 Efecto de la zoniporida en la desensibilización del TRPA1

Previamente se ha descrito que las corrientes entrantes evocadas por AITC, un activador selectivo del canal TRPA1, desensibilizan ante la aplicación repetida de este compuesto en neuronas del GRD, bajo un mecanismo denominado desensibilización homóloga (Yoshida et al., 2011).

En experimentos control (Figura 23A), la aplicación repetida de AITC ($300 \mu M$) disminuyó la densidad (pA/pF) de corriente (I_{AITC}) del canal TRPA1 en neuronas del GRD aisladas de ratas naïve adultas, entendiéndose como una desensibilización del canal (Figura 23B). La reducción en la amplitud de la corriente no se debió a una pérdida de la viabilidad de las células, ya que la aplicación de capsaicina ($1 \mu M$) en estas mismas neuronas produjo una corriente entrante dada por la activación de los canales TRPV1 expresados en dichas neuronas del GRD (Figura 23A).

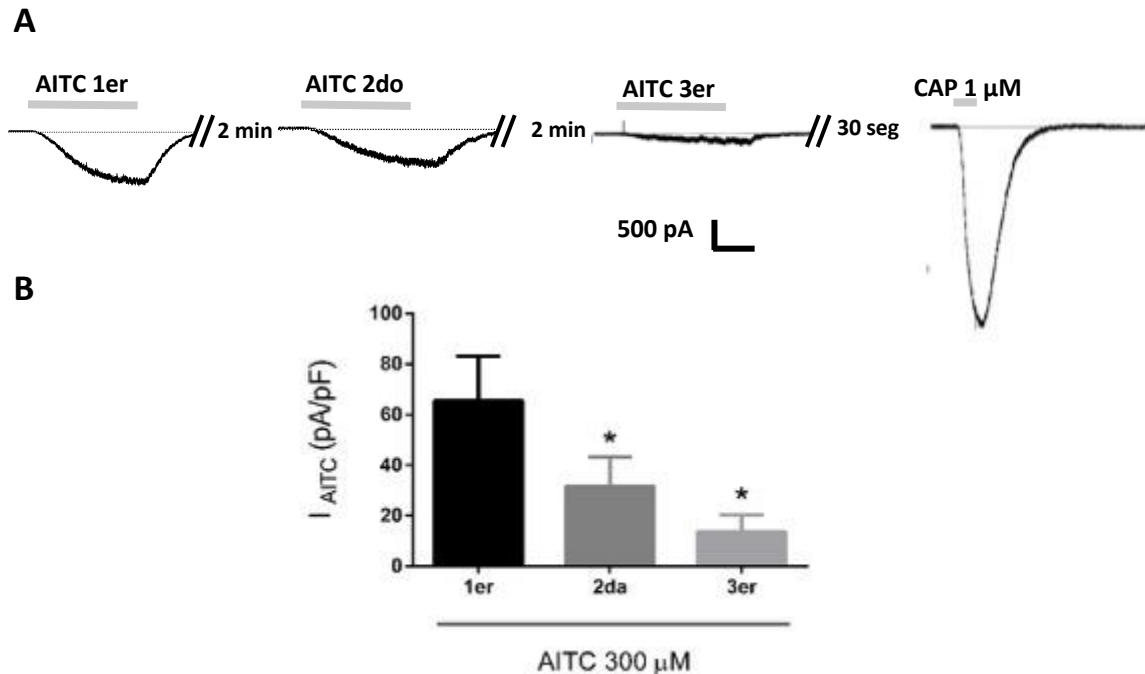


Figura 23. Corrientes iónicas evocadas por la activación del canal TRPA1 en neuronas del GRD de rata adulta. A) Registros representativos de las corrientes catiónicas entrantes inducidas por la aplicación de AITC (300 μM/30 seg). B) Desensibilización de TRPA1 inducida por la aplicación repetida de AITC. V_m= -60 mV. n= 10 células. * P<0.05 vs 1^{er} aplicación por ANOVA de una vía seguida de SNK.

Para determinar la interacción funcional entre el intercambiador NHE1 y el canal TRPA1, se evaluó el efecto de la zoniporida sobre las corrientes iónicas del TRPA1 producidas por la aplicación repetida de AITC. De manera similar al experimento previamente descrito, la amplitud de la corriente producida por un segundo pulso de AITC (300 μM) fue menor que la observada en la primera aplicación de AITC (Fig 24A). Sin embargo, ante una tercera aplicación de AITC después de que las neuronas se incubaron con 3 μM de zoniporida durante 2 minutos, la corriente producida por AITC no desensibilizó como sucedió en neuronas control (Figura 24B). Cabe señalar que la aplicación de zoniporida en las neuronas del GRD no tuvo efecto sobre las corrientes de membrana (Figura 24A).

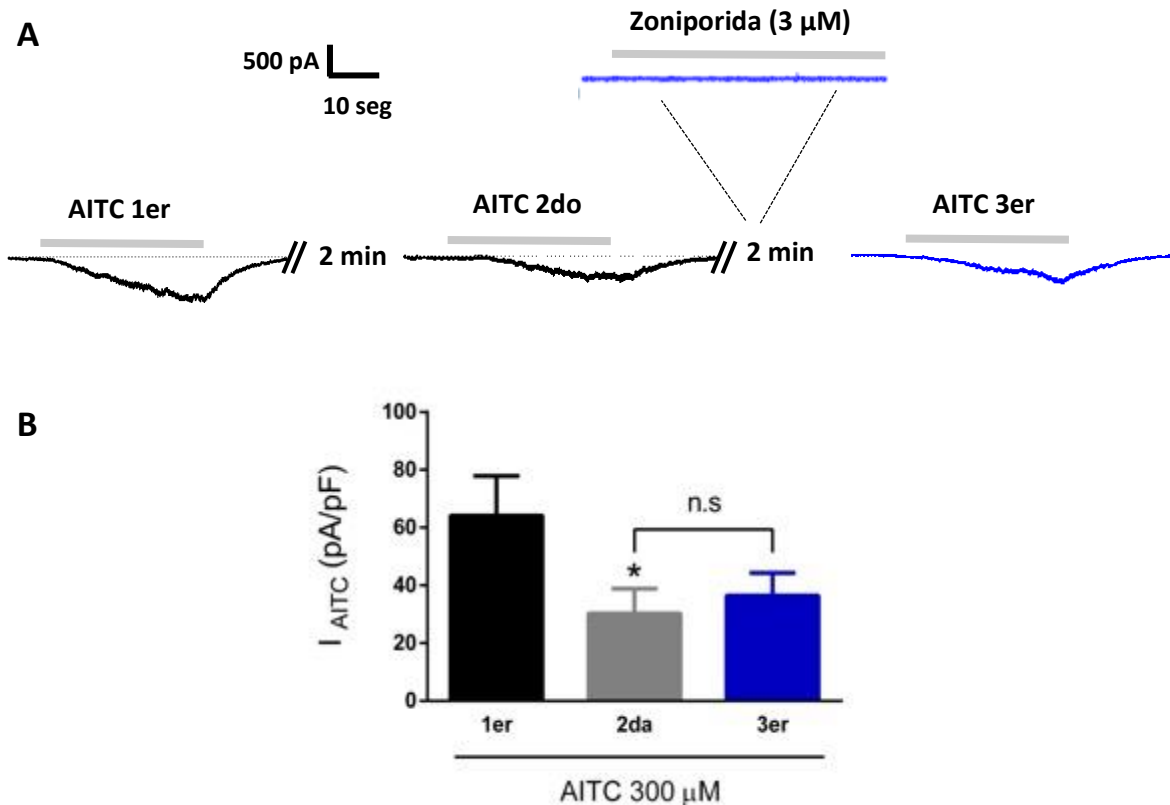


Figura 24. Efecto de la zonisporida sobre la corriente evocada por AITC en las neuronas del GRD de rata adulta. A) Registros representativos del efecto de la inhibición del NHE1 en las corrientes del TRPA1 inducida por AITC. B) Efecto de la aplicación de zonisporida sobre la desensibilización del canal TRPA1 inducida por la estimulación repetida con AITC. $V_m = -60$ mV. $n = 8$ células. $*P < 0.05$ vs 2^{da} aplicación por ANOVA de una vía seguida de SNK.

Con el objetivo de mostrar de una forma clara el efecto de la zonisporida sobre las corrientes de TRPA1 evocadas por AITC, las respuestas obtenidas en la segunda y tercera aplicación de AITC se normalizaron con respecto a la amplitud de la corriente máxima obtenida durante la primera aplicación de AITC. Como se observa en la Figura 25, la aplicación de zonisporida evita la desensibilización de la corriente del canal TRPA1 inducida por la tercera aplicación de AITC. Estos datos sugieren que la inhibición del intercambiador NHE1 tiene un efecto sobre las propiedades biofísicas que regulan la actividad del canal TRPA1 en neuronas del GRD aisladas de rata adulta.

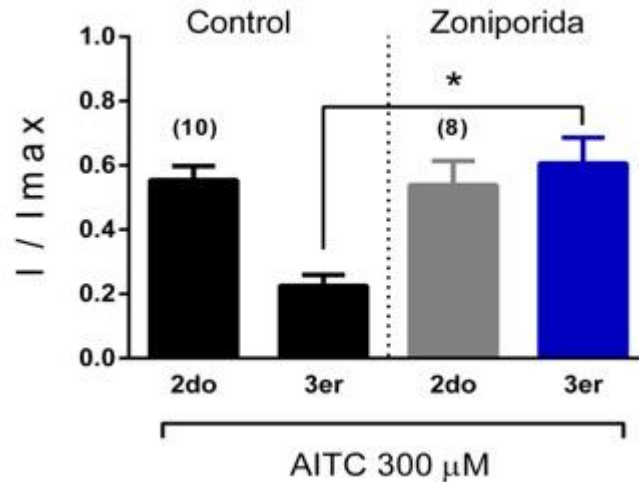


Figura 25. Efecto de la inhibición del NHE1 en la desensibilización de las corrientes de TRPA1. Normalización de las corrientes obtenidas en la segunda y tercera aplicación de AITC respecto la amplitud de la corriente máxima generada durante la primera aplicación de AITC. * $P < 0.05$ vs 3^{er} aplicación por ANOVA de una vía seguida de SNK.

6.5 Inmunolocalización de NHE1 y TRPA1

Los resultados obtenidos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y de las corrientes iónicas evocadas por AITC sugieren una interacción funcional entre el intercambiador NHE1 y el canal TRPA1 en neuronas del GRD. En estudios previos se ha reportado la expresión de ambas proteínas en las neuronas del GRD. Con la finalidad de determinar si existen neuronas que expresan NHE1-TRPA1 se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para determinar una posible co-localización entre NHE1 y TRPA1 en neuronas del GRD en ratas naïve adultas.

Los resultados obtenidos mostraron que las neuronas del GRD de diámetro pequeño y mediano expresan de forma basal al intercambiador NHE1 y al canal TRPA1 a nivel de la membrana celular y del citoplasma (Figura 26A); datos que concuerdan con lo reportado en la literatura (Castañeda-Corral et al., 2011; Barabas et al., 2012). De las neuronas TRPA1 positivas, el 33.35 % de ellas también fueron positivas para el NHE1 (Figura 26B). Por otra parte, las inmunofluorescencias revelaron que las células satelitales tienen una marcada reactividad para el intercambiador NHE1 (Figura 26A). Los resultados de las inmunofluorescencias apoyan la hipótesis de la posible

interacción funcional entre el NHE1 y el TRPA1 que se pone de manifiesto en las observaciones de los ensayos de microfluorimetría y electrofisiología.

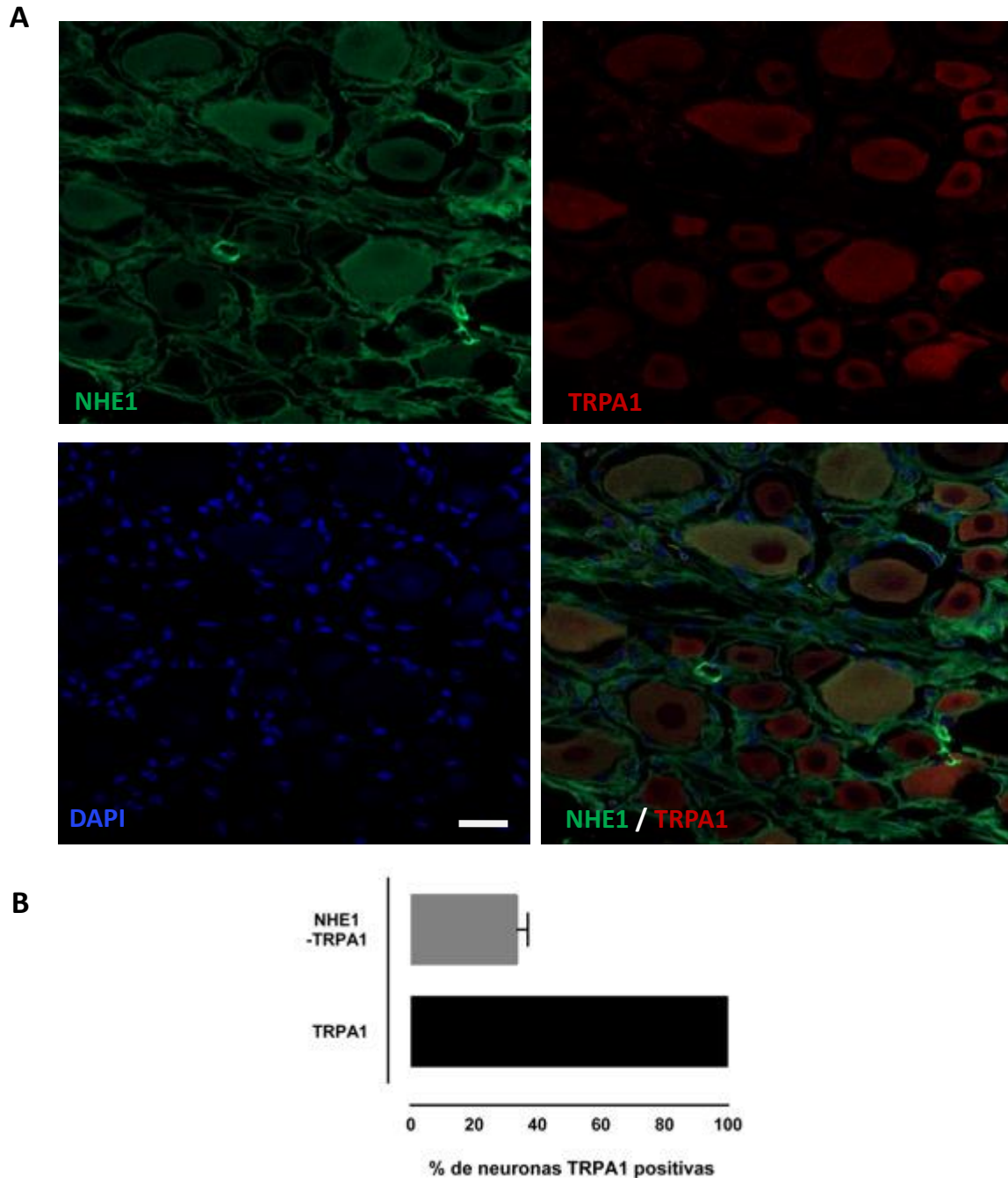


Figura 26. Inmunodetección del intercambiador NHE1 y del canal TRPA1 en neuronas del GRD. A) Las fotomicrografías muestran datos representativos de la expresión de NHE1 (verde) y TRPA1 (rojo). En azul se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI. B) Distribución del NHE1 en neuronas del GRD positivas a TRPA1. Escala 25 μ m. n=2.

6.6 Efecto del A-967079 en el modelo de dolor inflamatorio agudo inducido por formalina

Previamente se ha descrito el papel del NHE1 en el dolor inflamatorio inducido por formalina (Castañeda-Corral et al., 2011; 2012). Sin embargo, el papel del canal TRPA1 en este modelo de dolor inflamatorio no se ha establecido; por lo tanto, se caracterizó el efecto del bloqueo farmacológico del canal TRPA1 en las conductas nociceptivas de corto y largo plazo inducidas por formalina. La inyección de formalina al 1 % generó una conducta bifásica que consistió en sacudidas en la pata inyectada durante 1 h (nocicepción aguda) (Figura 27A/C).

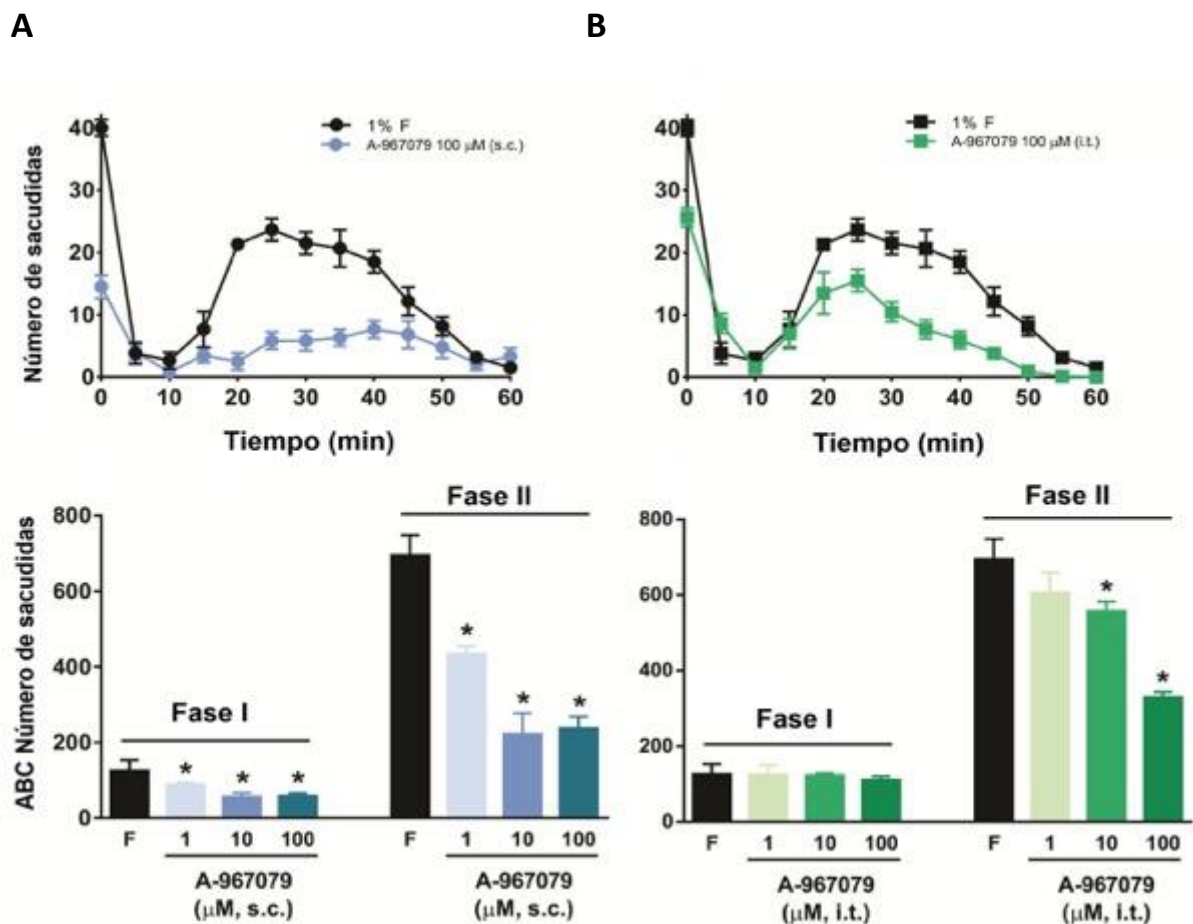


Figura 27. Cursos temporales del efecto anti-nociceptivo del pre-tratamiento periférico (A) y espinal (B) con A-967079. Representaciones gráficas del ABC calculadas a partir de los cursos temporales obtenidos de las conductas de sacudidas. Los datos de ABC se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media de al menos 6 animales por grupo experimental. * $P < 0.05$ vs F por ANOVA de una vía seguida de SNK. ABC, área bajo la curva; F, formalina 1 %; s.c., subcutánea; i.t., intratecal.

El pre-tratamiento (-10 min) periférico local con el bloqueador del canal TRPA1 (A-967079) disminuyó las conductas nociceptivas de la fase I y II en la prueba de formalina (Figura 27A/C); mientras que el pre-tratamiento espinal con A-967079 solo tuvo el efecto antinociceptivo durante la fase II (Figura 27B/D). Estos resultados confirman que el canal TRPA1 tiene un papel importante en la generación de los efectos pronociceptivos de la formalina.

6.7 Efecto del A-967079 en el desarrollo del dolor inflamatorio crónico inducido por formalina

Además de generar respuestas nociceptivas agudas, la formalina también es capaz de producir respuestas nociceptivas crónicas. La inyección subcutánea de formalina al 1 %, pero no del vehículo (DMSO 0.1 %) favoreció el desarrollo de conductas de alodinia e hiperalgesia mecánicas desde el día uno posterior a la inyección de formalina hasta por lo menos el día doce (Figura 28). Estas conductas se caracterizaron por un incremento en el umbral de respuesta de retiro de la pata ante la estimulación mecánica con los filamentos de von Frey.

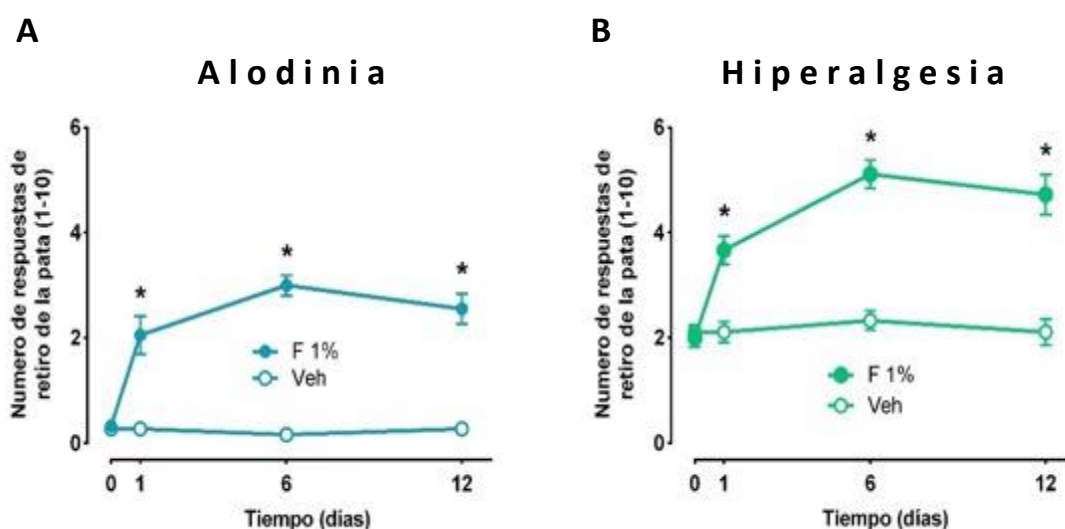


Figura 28. Curso temporal del desarrollo de alodinia (A) e hiperalgesia (B) mecánicas inducidas por formalina al 1 %. Los datos se expresan como el promedio del número de retiros de la pata por cada 10 estimulaciones con los filamentos de von Frey luego de la administración del vehículo o formalina al 1 %, n = 6. * P<0.05 vs Veh por ANOVA de dos vías seguida de SNK. Veh, vehículo; F 1%, formalina al 1 %.

En cuanto a la participación del canal TRPA1 en el procesamiento del dolor inflamatorio crónico. El pre-tratamiento (-10 min) periférico con A-967079, atenuó el desarrollo de alodinia (Figura 29A) e hiperalgesia (Figura 29B) mecánicas inducidas por formalina. Este efecto fue estadísticamente significativo con la concentración de 100 μ M de A-967079. La administración periférica de A-967079 (100 μ M) en la pata contralateral (no inyectada) no modificó la hipersensibilidad mecánica inducida por formalina, sugiriendo que el efecto antinociceptivo del A-967079 se debe al bloqueo de los canales TRPA1 expresados en la periferia. Por otra parte, el pre-tratamiento (-10 min) espinal (i.t) con A-967079 previno parcialmente el desarrollo de las conductas nociceptivas de largo plazo (Figura 29C/D). En conjunto, estos datos sugieren que los canales TRPA1 periféricos y espinales participan en el desarrollo de la alodinia e hiperalgesia mecánicas secundarias inducidas por formalina al 1 %.

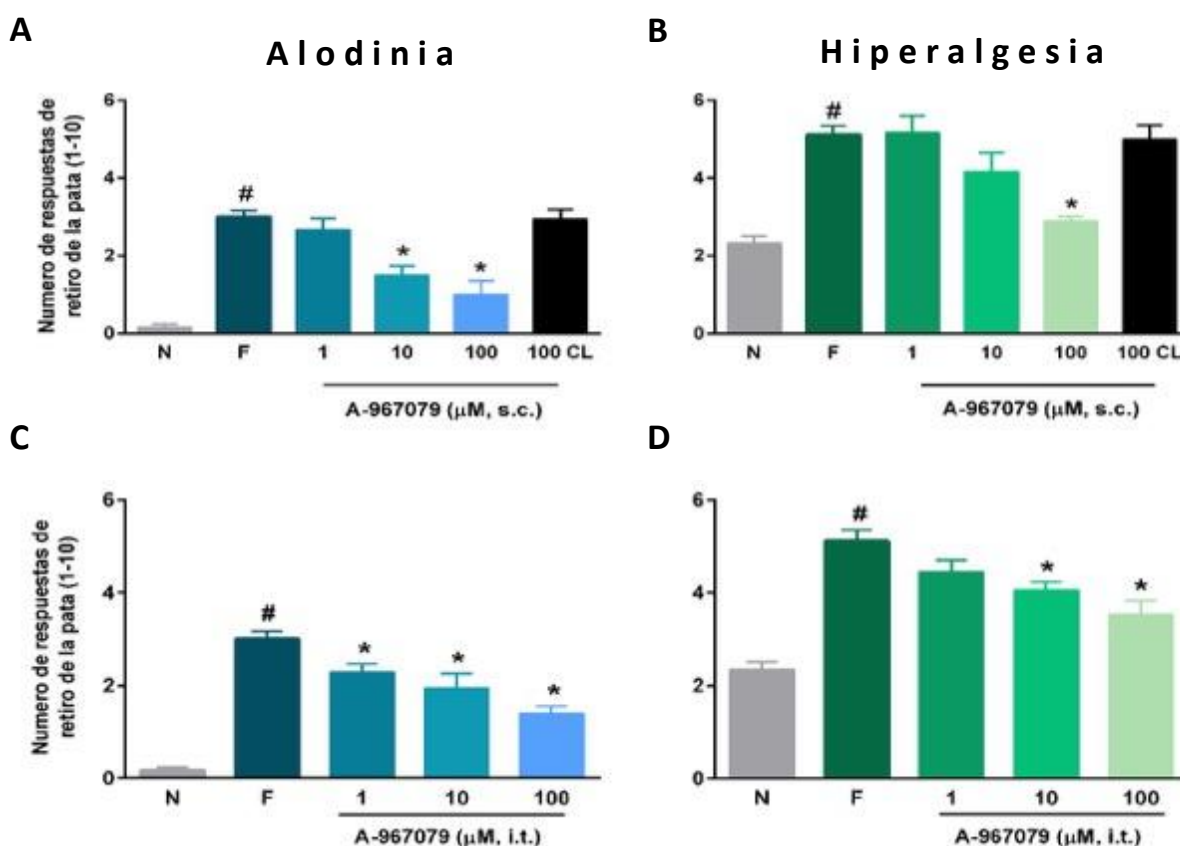


Figura 29. Efecto del pre-tratamiento periférico local (A/B) y espinal (C/D) con A-967079. Las barras muestran la media \pm el error estándar del número de respuestas de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey para determinar la alodinia (A/C) e hiperalgesia (B/D). $n = 6$. # $P < 0.05$ vs N y * $P < 0.05$ vs F, por ANOVA de una vía seguida de SNK. N, ratas naïve; F, ratas con inyección de formalina al 1 %; s.c., subcutánea; i.t., intratecal.

6.8 Efecto del A-967079 en el mantenimiento del dolor inflamatorio crónico inducido por formalina

Para determinar si el canal TRPA1 participa en el mantenimiento de las conductas de largo plazo inducidas por formalina, se evaluó mediante un protocolo de post-tratamiento (6 días después de haberse administrado formalina al 1 %) el efecto del bloqueo del TRPA1. El post-tratamiento periférico local (Figura 30A/B) y espinal (Figura 30C/D) con A-967079 a las mismas dosis empleadas en el protocolo de pre-tratamiento revirtió la alodinia y la hiperalgesia mecánicas (evaluadas 1 h después de la administración del A-967079) inducidas por la inyección de formalina. Estos datos sugieren que los canales TRPA1 periféricos y espinales participan en el mantenimiento de las conductas nociceptivas de largo plazo inducidas por formalina al 1 %.

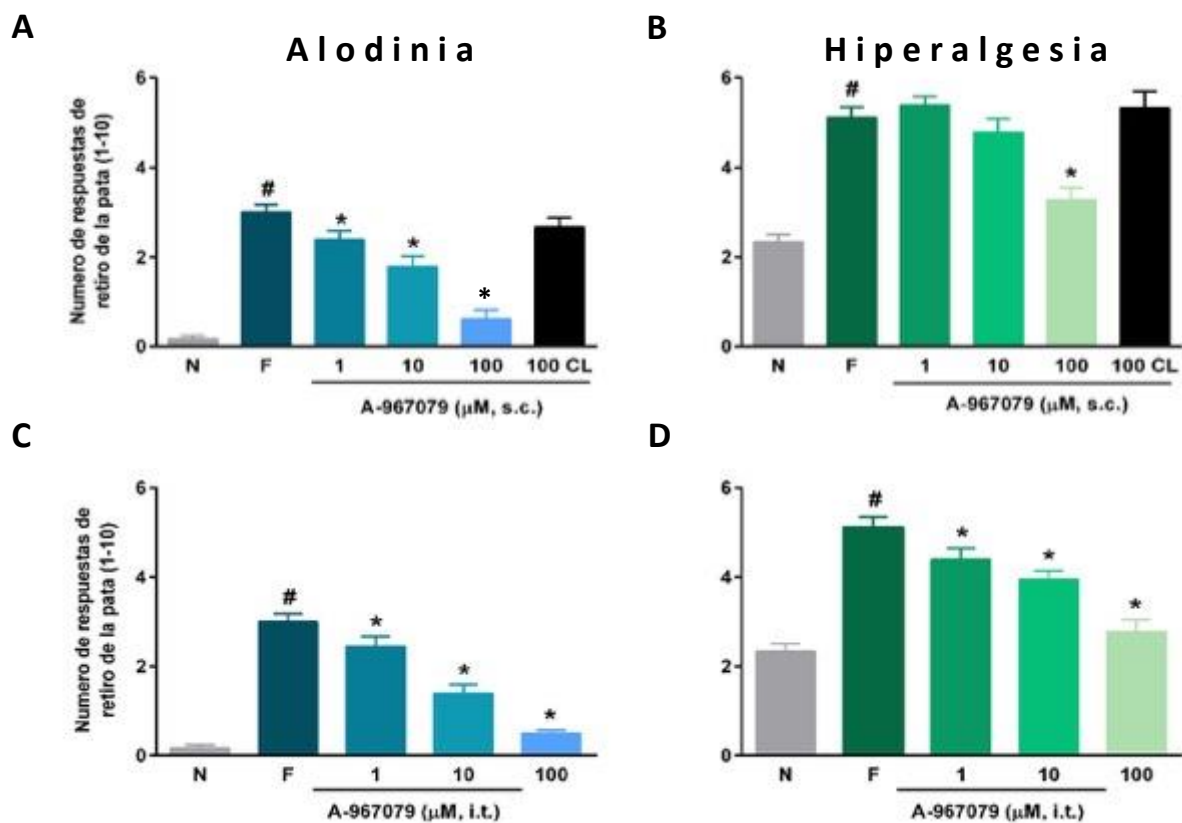


Figura 30. Efecto del post-tratamiento periférico local (A/B) y espinal (C/D) con A-967079. Las barras muestran la media \pm el error estándar del número de respuestas de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey para determinar la alodinia (A/C) e hiperalgesia (B/D). $n = 6$. # $P < 0.05$ vs N y * $P < 0.05$ vs F, por ANOVA de una vía seguida de SNK. N, ratas naïve; F, ratas con inyección de formalina al 1 %; s.c., subcutánea; i.t., intratecal.

Debido a que la solución de formalina al 1% tiene un pH ácido (pH: 5.3), fue necesario determinar el efecto de la concentración de los H⁺ sobre la nocicepción producida por formalina al 1 % ya que se ha descrito que la acidificación extracelular produce un aumento de la transmisión nociceptiva a través de la activación de TRPV1 y ASICs (Caterina et al., 1997; Waldmann et al., 1997). Para ello, se ajustó el pH de la solución de formalina con PBS a un pH de 7.4. Los resultados obtenidos muestran que las conductas nociceptivas de largo plazo fueron menores comparadas con aquellas observadas con la formalina al 1% sin ajustar el pH (Figura 31). Para evaluar la participación del canal TRPA1 en el efecto nociceptivo evocado por la administración de formalina al 1% a pH 7.4. El A-967079 (100 μM) se administró en la pata posterior derecha y diez minutos después se administró, en el mismo sitio, la solución de formalina al 1 % en PBS. Como se observa en la figura 31, el A-967079 previnó las conductas de alodinia e hiperalgesia mecánicas secundarias a valores cercanos a los observados en ratas naïve. Estos datos sugieren que el canal TRPA1 genera los efectos de la formalina para inducir las conductas nociceptivas de largo plazo.

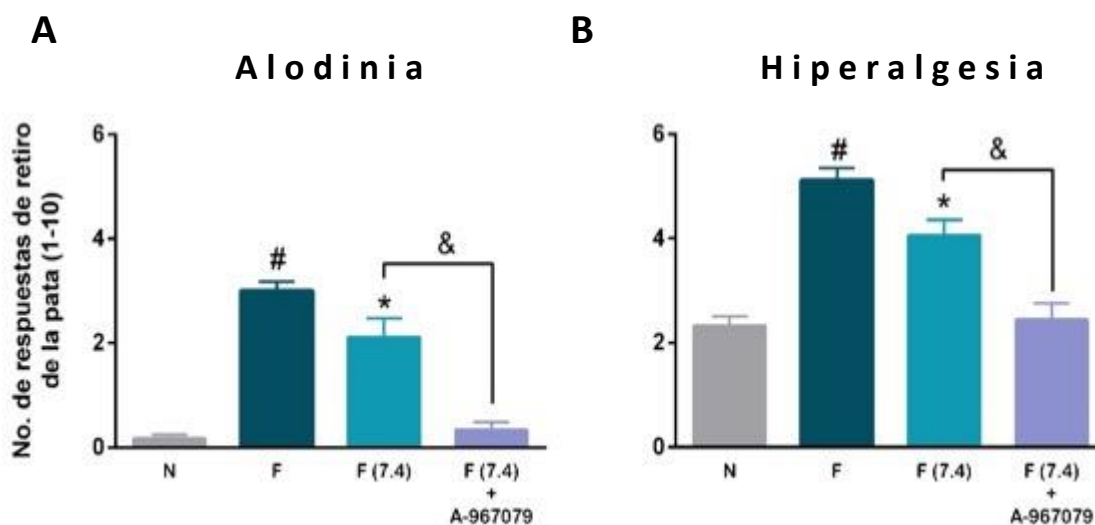


Figura 31. Efecto de la concentración de los H⁺ sobre las conductas nociceptivas inducidas por la formalina al 1 %. Las barras muestran la media ± el error estándar del número de respuestas de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey para determinar la alodinia (A) e hiperalgesia (B). n = 6. # P<0.05 vs N y * P<0.05 vs F, por ANOVA de una vía seguida de SNK. N, ratas naïve. F, ratas con la inyección de formalina al 1 %. PBS, ratas con la inyección de formalina al 1 % en PBS (pH 7.4). A-967079/PBS, ratas con la inyección de formalina al 1 % en PBS y con 100 μM de A-967079.

Con el objetivo de evaluar el efecto *per-se* del bloqueador del canal TRPA1 sobre la respuesta basal en las ratas ante la estimulación táctil, se administró la concentración de 100 μ M de A-967079 en el dorso de la pata posterior derecha (50 μ l, s.c.) o en la médula espinal (10 μ l, i.t.) de ratas naïve y posteriormente se llevó a cabo la estimulación mecánica con los filamentos de von Frey (Figura 32). Los datos obtenidos indican que el bloqueo del canal TRPA1 a nivel periférico o espinal en ratas naïve no modificó la naturaleza de la respuesta basal en estas ratas. Con estos resultados se confirma que el canal TRPA1 solo participa en la mecanotransducción bajo condiciones de inflamación crónica que favorecen su sensibilización.

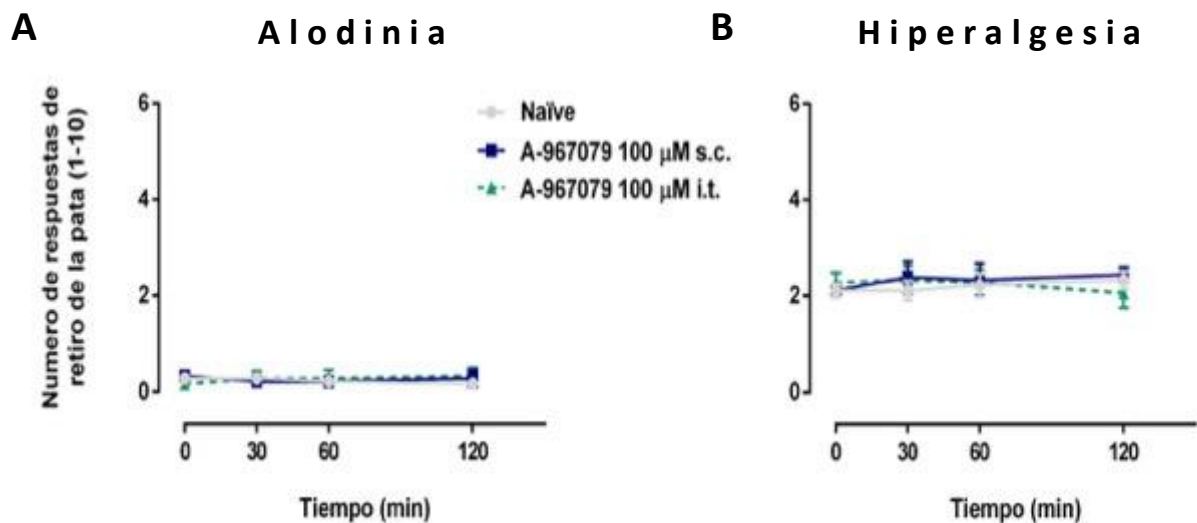


Figura 32. Efecto de la administración periférica local y espinal con A-967079 (100 μ M) en las conductas de alodinia (A) e hiperalgesia (B) de ratas naïve evaluada a diferentes tiempos. n=6. N, ratas naïve. s.c., subcutáneo. i.t., intratecal.

6.9 Efecto de la inyección de formalina al 1% en la expresión de la proteína de TRPA1

Los resultados obtenidos mediante la inmunodetección de la proteína de TRPA1 por medio de *western blot* confirman la expresión de este canal en el GRD y la médula espinal dorsal ipsilateral (L4-L6) (Figura 33A/B). La administración periférica de formalina al 1 % aumentó de manera significativa la expresión del canal TRPA1 en

neuronas del GRD de ratas 6 días después de haber generado un estímulo inflamatorio, comparado con ratas *naïve* ($P < 0.05$). Por otra parte, este fenómeno de modulación de la expresión del canal TRPA1 se observó en la médula espinal al día uno posterior a la inyección de formalina al 1 % (Figura 33B). Los datos sugieren que el proceso inflamatorio de largo plazo generado por la administración de formalina al 1 % incrementa la expresión del canal TRPA1 en los GRD y en la médula espinal.

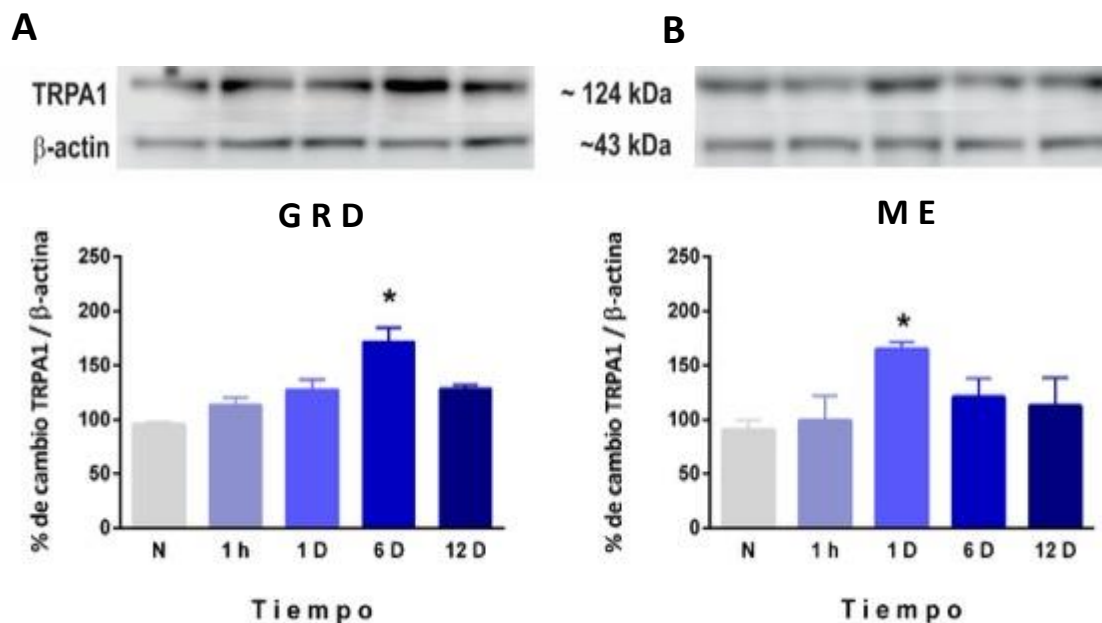


Figura 33. Expresión del canal TRPA1 en neuronas del GRD y la ME ipsilateral. Cambios en la expresión de la proteína TRPA1 en neuronas del GRD (A) y de la ME (B) de ratas *naïve* y ratas con 1 hora (1 h), 1 día (1D), 6 días (6 D) y 12 días (12 D) después de la administración de formalina al 1 %. En la parte superior se muestran *blots* representativos, en la parte inferior se muestra la cuantificación de la señal obtenida mediante la intensidad relativa para TRPA1 y β-actina. Los datos representan el promedio de tres experimentos realizados de manera independiente. $n=3$ * $P < 0.05$ vs N, por ANOVA de una vía seguida de SNK. GRD, ganglio de la raíz dorsal; ME, médula espinal; N, *naïve*.

6.10 Efecto de la zoniporida en la pronocicepción inducida por AITC

Para determinar si la interacción funcional entre NHE1-TRPA1 se encuentra presente en periodos tempranos del proceso inflamatorio, se evaluó el efecto de la zoniporida en el desarrollo de las conductas nociceptivas agudas (evocadas y espontáneas) inducidas por la administración de AITC. La inyección de AITC al 2 % (50 μ l, s.c.) en el dorso de la pata trasera de la rata generó la aparición de la conducta espontánea

de sacudida de la pata, con un efecto máximo a los 5 minutos posteriores a la administración de AITC. El pre-tratamiento (-10 min) con zoniporida favoreció el aumento en el número de sacudidas de la pata, mientras que el pre-tratamiento (-20 min) con A-967079, disminuyó el efecto pronociceptivo de la zoniporida en la nocicepción aguda inducida por AITC (Figura 32A). Por otra parte, la inyección de AITC al 2 % generó una hipersensibilidad ante la estimulación mecánica en la pata de las ratas. La inyección periférica de zoniporida (-10 min) favoreció la hipersensibilidad mecánica, la cual se revirtió por el pre-tratamiento (-20 min) con A-967079 (Figura 34B). En conjunto, estos datos sugieren que el efecto pronociceptivo agudo de la administración de zoniporida está mediado por la activación del canal TRPA1.

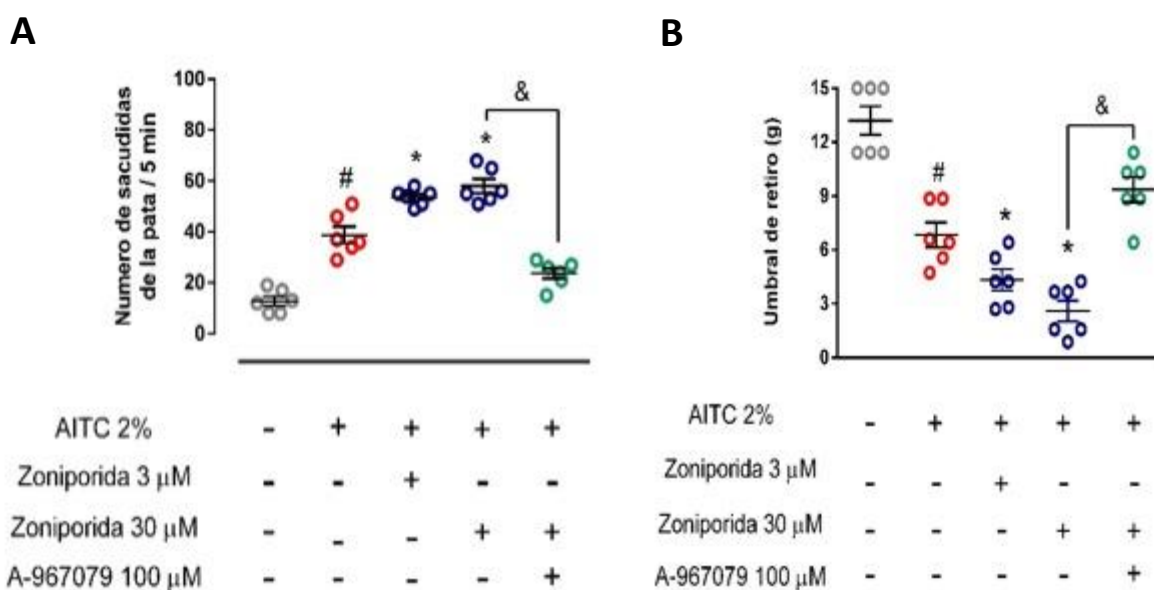


Figura 34. Efecto de A-967079 en las conductas nociceptivas agudas inducidas por AITC. Efecto de la inhibición del NHE1 y la activación del TRPA1 en la conducta nociceptiva espontánea de sacudidas de la pata (A) y en la conducta nociceptiva evocada por la estimulación mecánica (B). Los datos están expresados como el umbral de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey. N, ratas naïve sin tratamiento. F, ratas administradas con formalina al 1%. n = 6 # P<0.05 vs vehículo (gris), * P<0.05 vs AITC 2 % y & P<0.05 vs Zoniporida (30 μ M) por ANOVA de una vía seguida de SNK.

6.11 Efecto de la zoniporida en la pronocicepción inducida por CFA

Las respuestas pronociceptivas agudas y crónicas inducidas por la inyección de formalina depende de la activación del canal TRPA1 por un electrófilo como el formaldehído (McNamara et al., 2007). Debido a este hecho, se exploró la modulación de la interacción NHE1-TRPA1 en otro modelo de dolor inflamatorio. Así, el proceso inflamatorio inducido por CFA se regula mediante otros blancos moleculares, diferentes a los de la formalina (Wiedemann et al., 1991). A través de esta estrategia, se evaluó el papel del canal TRPA1 y del intercambiador NHE1 en la hipersensibilidad mecánica de largo plazo inducida por CFA.

La administración periférica local de CFA produjo una hipersensibilidad ante la estimulación mecánica (Figura 35A). El pre-tratamiento con zoniporida (10 min antes), favoreció el aumento de la hipersensibilidad mecánica inducida por CFA a través del tiempo de evaluación. Sin embargo, cuando se administró el bloqueador del canal TRPA1 (100 μ M) de manera previa (20 min antes) a la inyección de zoniporida y CFA, el efecto pronociceptivo de la zoniporida fue revertido (Figura 35A). Este fenómeno es más evidente cuando se determinan los umbrales de retiro en el séptimo día de evaluación (Figura 35B). Estos datos sugieren que el efecto pronociceptivo de la zoniporida es mediado por la activación de los canales TRPA1.

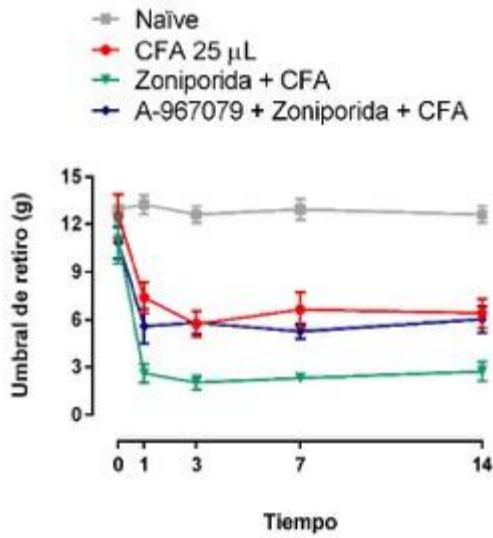
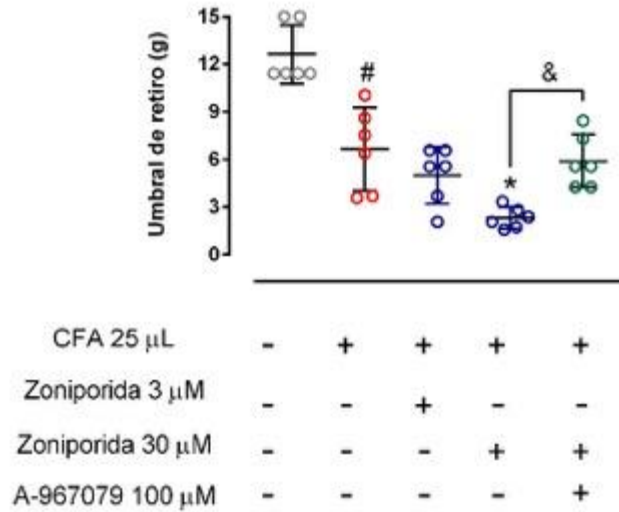
A**B**

Figura 35. Efecto de A-967079 en la alodinia táctil de largo plazo inducida por CFA. A) Curso temporal de las respuestas nociceptivas evocadas por CFA. B) Respuestas evocadas al día 7 posterior a la inyección de CFA. Los datos se expresan como el umbral de retiro de la pata ante la aplicación de los filamentos de von Frey. N, ratas naïve CFA, ratas con la inyección de CFA (25 μ L). n = 6 # P<0.05 vs vehículo (gris), # P<0.05 vs CFA y & P<0.05 vs Zoniporida (30 μ M) por ANOVA de una vía seguida de SNK.

7. DISCUSIÓN

7.1 Regulación de la interacción entre NHE1-TRPA1 *in vitro*

7.1.1 Cultivo primario de neuronas del GRD aisladas de rata adulta

El presente estudio se realizó en neuronas disociadas del GRD de ratas con 9 a 10 semanas de edad, tiempo al cual se considera que el sistema nervioso alcanza la madurez. En este sentido, el estudio de la regulación del canal TRPA1 en neuronas del GRD se ha realizado en este rango de edad (Yoshida et al., 2011; Govea et al., 2016). En contraste, en otros trabajos han utilizado cultivos primarios de neuronas del GRD de ratas con dos semanas de edad. Existe evidencia de que a esa edad ya hay una expresión estable de los canales TRP (Hjerling-Leffler et al., 2007). Sin embargo, la edad podría tener una relevancia fundamental al generar conclusiones sobre los mecanismos asociados a estos canales, ya que la respuesta nociceptiva inducida por la administración de AITC (activador del canal TRPA1) es de menor grado en los animales adultos comparado con los de 2 semanas (Fitzgerald y Gibson, 1984; Garrison y Stucky, 2014). Además, durante la estandarización del cultivo celular encontramos que el tiempo óptimo para realizar los experimentos de microfluorimetría y electrofisiología con las neuronas del GRD de ratas adultas era entre 16 y 20 h después de la siembra de las células. Estos tiempos coinciden con los reportados por otros grupos (Barabas et al., 2012; Song y Gao, 2018).

7.1.2 Efecto de la zoniporida en el pH_i

La inhibición farmacológica del NHE1 por zoniporida produjo acidificación intracelular en las neuronas del GRD de tamaño pequeño (Figura 19). Estos datos sugieren que el NHE1 regula la homeostasis del pH en las neuronas nociceptivas. Esto concuerda con la evidencia de que el NHE1, entre otras proteínas, regula el balance ácido-base en las neuronas (Chesler, 2003). Sin embargo, a nuestro conocimiento, este es el primer estudio que demuestra que la inhibición del intercambiador NHE1 en neuronas del GRD de ratas adultas produce acidificación intracelular. El aumento de la concentración intracelular de los H⁺ podría explicar el aumento de la excitabilidad neuronal y de las conductas nociceptivas observadas al inhibir NHE1 (Steen et al.,

1999; Castañeda-Corral et al., 2011; 2012). Se ha demostrado que la acidificación intracelular inducida por la aplicación de ácidos orgánicos débiles (acetato y propionato) aumenta la frecuencia de los potenciales sinápticos espontáneos a través de la activación de receptores NMDA en la preparación nervio-músculo de embriones de *Xenopus* (Chen et al., 1998). Estos resultados sugieren que la acidificación intracelular promueve la excitabilidad neuronal y apoyan nuestra hipótesis. En contraste con nuestros resultados, se ha demostrado que la zoniporida y la dimetilamilorida reducen la excitabilidad de las neuronas del GRD aisladas de ratas adultas (Liu y Somps, 2008). No obstante, este efecto podría deberse a que las concentraciones utilizadas de estos compuestos fueron altas (10 y 100 μM) y promovieron la inactivación de los canales Nav . En otro estudio, la administración de EIPA disminuyó la excitabilidad de neuronas del GRD (Hwang et al., 2011). Dado que el EIPA no es un inhibidor selectivo del NHE1, estos resultados se podrían atribuir a su efecto sobre los canales ASIC (Leng et al., 2016). Asimismo, se ha reportado que la disminución del pH_i (7.3 a 7) reduce la corriente de los canales de Ca^{2+} tipo N en neuronas aisladas del GRD de pollos neonatos (Kiss y Korn, 1999). De la misma manera, la acidificación intracelular atenúa la corriente de Ca^{2+} inducida por capsaicina en el canal TRPV1 en neuronas aisladas del GRD de rata (Chung et al., 2011). En ambos casos, la acidificación intracelular podría disminuir la excitabilidad neuronal. Sin embargo, es poco probable que la acidificación intracelular inducida por zoniporida en neuronas del GRD aisladas de ratas adultas tenga su efecto sobre los canales de calcio tipo N, ya que se ha reportado que la subunidad $\alpha 1$ (formadora del poro) y las subunidades accesorias $\beta 1$ y $\beta 3$ de estos canales tienen una baja expresión en neuronas del GRD de rata adulta (Zhu y Oxford, 2011).

7.1.3 Efecto de la zoniporida en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

La zoniporida, además de disminuir el pH_i , también aumentó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en neuronas aisladas del GRD de ratas adultas. Estos resultados sugieren que la acidificación intracelular induce la apertura de canales iónicos que conducen Ca^{2+} . Uno de estos canales podría ser el TRPA1. Para que este fenómeno se diera es necesario una

interacción directa entre los H⁺ y el canal TRPA1. En apoyo a esta propuesta, se ha descrito que los ácidos débiles activan directamente al canal TRPA1 de una manera dependiente de la acidificación intracelular y esa respuesta se abate considerablemente en ratones que no expresan al canal TRPA1 (Wang et al., 2011). A la fecha se desconoce el sitio de unión de los hidrogeniones al canal TRPA1. Sin embargo, la activación del TRPA1 por acidificación también podría ser una consecuencia del aumento de Ca²⁺ inducido por zoniporida, además de la interacción directa de los H⁺ sobre el canal TRPA1. En apoyo de esta idea, se ha descrito que el aumento de la [Ca²⁺]_i incrementa la conductancia del canal TRPA1 (Zurborg et al., 2007; Doerner et al., 2007). Sin embargo, independientemente del mecanismo que se esté dando, el resultado parece ser la activación del canal TRPA1.

7.1.4 Efecto de la zoniporida en la desensibilización de TRPA1

La aplicación repetida de AITC en neuronas del GRD aisladas de ratas adultas produce desensibilización de la corriente del canal TRPA1. Este fenómeno se ha descrito en neuronas del sistema sensorial de humanos y roedores (Reeh et al., 1986; Patacchini et al., 1990; Heyer et al., 1991; Brand y Jacquot, 2002; Simons et al., 2004). Se cree que el mecanismo de desensibilización involucra la internalización del canal TRPA1 (desensibilización homóloga, Akopian et al., 2007). Además, se ha descrito que la desensibilización del TRPA1 no solo se observa con AITC, sino que también se desarrolla con AITC en presencia de capsaicina (desensibilización heteróloga) (Patacchini et al., 1990; Jacquot et al., 2005). El mecanismo por el cual TRPV1 induce la desensibilización heteróloga es mediante un aumento en la [Ca²⁺]_i y la depleción de PIP₂ de la membrana. De hecho, la presencia del canal TRPV1 previene la internalización del canal TRPA1 (Akopian et al., 2007). En nuestro estudio se observó que la inhibición del NHE1 por zoniporida redujo la desensibilización de TRPA1 inducida por la aplicación repetida de AITC. El mecanismo por el cual la zoniporida ejerce su acción sobre la corriente evocada por AITC no está claro. Especulando, la acidificación intracelular inducida por zoniporida podría inhibir la internalización del canal evitando la desensibilización. En apoyo a esta idea, se sabe que el tránsito

vesicular constitutivo y regulado controla la expresión de los canales TRP en la membrana (Ambudkar, 2007).

En conjunto, nuestros datos indican que la inhibición de NHE1 por zoniporida conduce a la acidificación intracelular. El aumento en la concentración de los H^+ activaría al canal TRPA1 en las neuronas del GRD y evitaría la desensibilización homóloga provocada por AITC (Figura 36). Por lo tanto, estos datos sugieren que existe un acople funcional entre el NHE1 y TRPA1 en nociceptores.

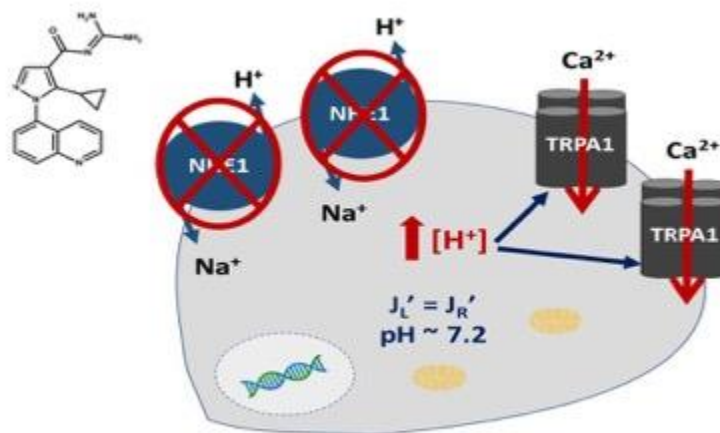


Figura 36. La zoniporida promueve una acidificación intracelular al romper el equilibrio entre la velocidad de acumulación y extracción ($J_L = J_R$) en las neuronas del GRD. El incremento en la concentración de los H^+ activaría al canal TRPA1 lo cual promueve el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$.

7.2 Regulación de la interacción entre NHE1-TRPA1 *in vivo*

7.2.1 Efecto de A-967079 en el modelo de dolor inflamatorio agudo y crónico inducido por formalina

En este estudio, encontramos que la administración periférica local o intratecal con A-967079, bloqueador del canal TRPA1, previene la nocicepción aguda y la hipersensibilidad de largo plazo inducida por formalina en ratas. Dado que el A-967079 es un bloqueador selectivo del TRPA1 (Chen et al., 2011), nuestros datos sugieren

que los canales TRPA1 expresados tanto en la periferia como a nivel espinal participan en la nocicepción aguda, así como en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia e hiperalgia de largo plazo inducidas por formalina. Nuestros resultados coinciden con observaciones previas que demuestran que el TRPA1 participa en la nocicepción aguda inducida por formalina (McNamara et al., 2007; Wei et al., 2011). Sin embargo, a nuestro conocimiento, este es el primer reporte que demuestra que el A-967079 tiene un efecto anti-alodínico y anti-hiperalgésico en la hipersensibilidad mecánica de largo plazo inducida por formalina. Nuestro estudio concuerda con reportes previos en los que se demuestra que el CHEM, un bloqueador del TRPA1, disminuye la hipersensibilidad mecánica secundaria inducida por formalina a las 24 h (Wei et al., 2011), sugiriendo que el TRPA1 es importante para el desarrollo de los efectos agudos y crónicos inducidos por formalina.

Previamente se reportó que la administración de los activadores del TRPA1 (CNN, AITC y formalina) en la pata de las ratas produce una sensibilización mecánica (McNamara et al., 2007; Petrus et al., 2007; Eid et al., 2007; Dunham et al., 2008). Además, la inyección de formalina produce sensibilización periférica y central. En el primer caso, se sabe que la formalina favorece la liberación de serotonina (5-HT), histamina, IL-1 β y TNF α a nivel periférico, los cuales activan a sus receptores para producir nocicepción o sensibilización (Parada et al., 2001; Nakajima et al., 2009).

Con respecto a los efectos centrales, la inyección de formalina induce la liberación de glutamato, prostaglandinas y 5-HT en el asta dorsal de la médula espinal (Malmberg et al., 1995; Wei et al., 2010); así como la activación de la microglia que promueve la liberación de óxido nítrico, NGF y citocinas (IL-1 β y TNF α) (Watkins et al., 1997; Fu et al., 2000; 2009). Estas moléculas promueven la sensibilización central y la nocicepción mediante la unión a sus receptores específicos. Por lo tanto, el efecto anti-alodínico y anti-hiperalgésico del A-967079 podría atribuirse al bloqueo de los canales TRPA1 localizados en las neuronas aferentes primarias y en la médula espinal. Esto podría reducir la liberación de diversas sustancias pro-nociceptivas y activación de la microglia, disminuyendo la sensibilización periférica y central. En apoyo a esta

información, el A-967079 (bloqueador del canal TRPA1) reduce los reflejos de raíz dorsal, la conducción antidrómica y el flujo sanguíneo cutáneo, lo cual conduce a una reducción de la liberación de SP y CGRP en las terminales periféricas y centrales de los nociceptores (Wei et al., 2010; Chen et al., 2011; Weller et al., 2011; Wei et al., 2013). Además, la activación del TRPA1 incrementa la transmisión de los potenciales post-sinápticos excitadores en las neuronas de la sustancia gelatinosa (Kosugi et al., 2007; Wrigley et al., 2009), lo cual disminuye el umbral de activación e incrementa la actividad de las neuronas aferentes (Dunham et al., 2008). De esta forma, la administración de A-967079 podría bloquear la transmisión sináptica excitadora y mecanismos asociados a la facilitación descendente del dolor (Wei et al., 2011). En conjunto, estas acciones podrían reducir la excitabilidad pre- y post-sináptica de las neuronas aferentes.

La administración periférica o intratecal de A-967079 produce una reducción parcial de la alodinia e hiperalgesia mecánica secundaria en el modelo de formalina. El efecto moderado sugiere que otros mecanismos, además de la activación de TRPA1, están involucrados en el desarrollo y mantenimiento de la alodinia e hiperalgesia secundarias. En este sentido, se ha demostrado que los H⁺ contribuyen al desarrollo de la alodinia e hiperalgesia secundarias inducidas por formalina (Castañeda-Corral et al., 2012). Así, la inyección de formalina al 1 % (pH 5.4), podría estimular a los canales ASICs y TRPV1 (Leffler et al., 2006). Con el objetivo de descartar la participación de los H⁺, diseñamos un experimento en el que el pH de la solución de formalina (1 %) se fijó a un valor de 7.4. La inyección de formalina a un pH de 7.4 produjo alodinia e hiperalgesia de menor magnitud que la inyección de formalina sin el control de pH. En concordancia con nuestro resultado, la administración de formalina al 0.5 % a un pH de 7.4 produce conductas nociceptivas de grado menor comparadas con aquellas conductas inducidas por la inyección de formalina (0.5 %) sin el ajuste del pH (Castañeda-Corral et al., 2012). En esta condición (formalina al 1 % a un pH de 7.4), la administración periférica local de A-967079 bloquea completamente el desarrollo de la alodinia e hiperalgesia mecánicas secundarias inducidas por formalina en las ratas.

Por lo tanto, cuando existe un control del pH en la solución de formalina, el canal TRPA1 es el único blanco responsable del efecto pro-nociceptivo de la formalina.

Por último, la administración de A-967079 no modificó la percepción mecánica en ratas naïve. Este resultado concuerda con un reporte en el cual se describió que el canal TRPA1 no participa en la mecanopercepción de bajo umbral, determinado mediante el registro electrofisiológico de las fibras aferentes primarias (Kerstein et al., 2009).

7.2.2 Efecto de la zoniporida en la pronocicepción inducida por AITC y CFA

La administración de zoniporida aumentó las conductas nociceptivas evocadas por AITC o CFA. Este resultado es similar al obtenido *in vitro*, donde la zoniporida aumenta la corriente de Ca²⁺ inducida por AITC. Además, aquí demostramos *in vivo* que el A-967079 revierte el efecto inducido por la zoniporida sobre la actividad del AITC o CFA lo que confirma que la acidificación intracelular efectivamente activa al canal TRPA1 (ver arriba). Esto sugeriría que el aumento de la excitabilidad de las neuronas del GRD inducida por zoniporida en animales administrados con AITC o CFA, se debe a la interacción funcional entre el NHE1 y el canal TRPA1. Dado que el efecto de formalina se debe a la activación del canal TRPA1, es muy probable que esta misma interacción explique el aumento de la nocicepción inducida por formalina en presencia de zoniporida (Castañeda-Corral et al., 2012). Esto sugiere que la acidificación intracelular podría favorecer la actividad del canal TRPA1 en sitios claves para el procesamiento de la información nociceptiva en estados patológicos como el dolor crónico. A nuestro conocimiento este es el primer reporte que demuestra la interacción funcional entre el NHE1 y el canal TRPA1 *in vitro* e *in vivo*.

7.2.3 Expresión de NHE1 y TRPA1 en GRD

La inyección de formalina aumentó la expresión de la proteína del TRPA1 en los GRD y la médula espinal, sitios relacionados con el procesamiento nociceptivo. A nuestro conocimiento, este estudio es el primero en reportar que la formalina aumenta la expresión de la proteína del canal TRPA1 en el GRD y médula espinal. Estos resultados coinciden con otros estudios que reportan que el CFA, NGF, la colitis y el

daño a los nervios incrementa el ARNm y la proteína del canal TRPA1 en ratas y ratones (Obata et al., 2005; Diogenes et al., 2007; Frederick et al., 2007; Dunham et al., 2008; Yang et al., 2008; da Costa et al., 2010). Por lo tanto, el incremento en la expresión del TRPA1 podría favorecer las conductas nociceptivas de largo plazo inducidas por formalina. Además, la acidificación intracelular inducida por el proceso inflamatorio contribuiría aún más al aumento de la excitabilidad de las neuronas nociceptivas y a la nocicepción.

7.2.4 Localización del NHE1 y el canal TRPA1 en GRD

El NHE1 y el canal TRPA1 se encontraron en neuronas de diámetro pequeño y mediano del GRD. Además, la inmunoreactividad para ambas proteínas co-localizó en esas mismas neuronas. Estos resultados apoyan los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Además, el NHE1 se encontró principalmente en las células gliales satelitales alrededor de las neuronas del GRD. No obstante, los experimentos de electrofisiología sugieren que el efecto de la zoniporida en las corrientes iónicas del canal TRPA1 se debe a una interacción NHE1-TRPA1 a nivel neuronal, ya que los registros de las corrientes iónicas se determinaron en células con un potencial de membrana en reposo (V_m) de -50 a -60 mV (típico de las neuronas del GRD). En contraste, el valor de V_m de las células satelitales es de -80 mV (Cherkas et al., 2004).

De forma global, los mecanismos asociados al desarrollo y mantenimiento del dolor inflamatorio crónico disminuyen la expresión de NHE1 (Castañeda-Corral et al., 2012) y aumentan la expresión del intercambiador AE3 (Barragán-Iglesias et al., 2014) favoreciendo la acidificación intracelular. Además, en este estudio demostramos que la formalina aumenta la expresión del canal TRPA1. Por lo tanto, estas condiciones facilitarían el acople funcional entre el NHE1 y el canal TRPA1 en las neuronas sensoriales nociceptivas durante el dolor inflamatorio crónico (Figura 37).

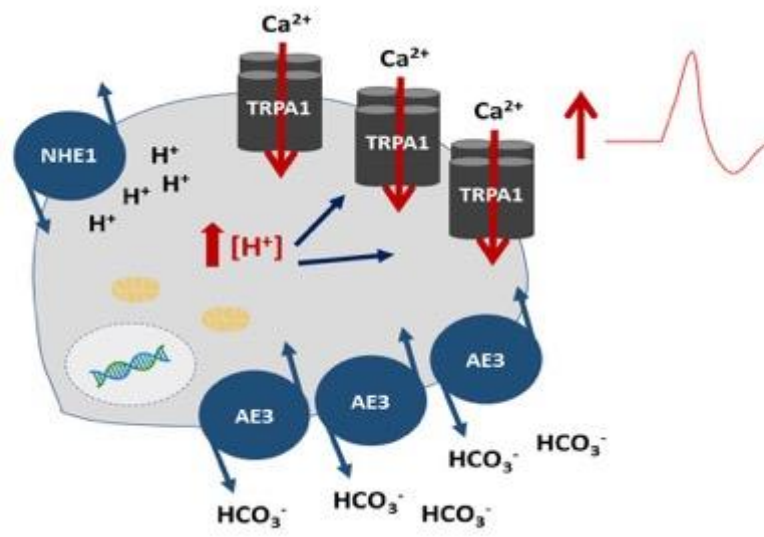


Figura 37. El dolor inflamatorio crónico disminuye la expresión de NHE1 y aumenta la expresión de AE3, lo que favorece la acumulación intracelular de los H⁺. Bajo las mismas condiciones, la expresión del canal TRPA1 aumenta, por lo cual la acidosis intracelular favorecería la transmisión nociceptiva mediante la actividad del canal TRPA1.

8. CONCLUSIONES

- La inhibición del intercambiador NHE1 por zoniporida disminuye el pH intracelular en neuronas del GRD aisladas de rata adulta.
- La co-expresión de las proteínas NHE1 y TRPA1, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por zoniporida en neuronas que responden a la aplicación de AITC y la reducción de la desensibilización de la corriente iónica del canal TRPA1 en presencia de zoniporida, sugieren que existe un acople funcional de TRPA1-NHE1 en neuronas del GRD.
- Los canales TRPA1 expresados a nivel periférico y espinal participan la nocicepción aguda, así como en el desarrollo y mantenimiento de las conductas nociceptivas de largo plazo inducidas por la administración de formalina. Además, el proceso inflamatorio de largo plazo inducido por formalina al 1%, aumenta la expresión de los canales TRPA1 en los GRD y la porción dorsal de la médula espinal en la rata.
- La zoniporida (inhibidor de NHE1) aumenta las respuestas nociceptivas inducidas AITC y CFA en la rata. Dicho efecto se reduce en presencia del A-967079 (bloqueador del canal TRPA1). Estos datos sugieren que el efecto pronociceptivo evocado al inhibir al NHE1, podría aumentar la acidosis intracelular y con ello favorecer la activación del canal TRPA1.

Los datos obtenidos en la presente tesis mediante técnicas espectrofluorimétricas, electrofisiológicas, moleculares y conductuales sugieren que el canal iónico TRPA1 y el intercambiador NHE1 son proteínas que se acoplan funcionalmente para favorecer la transmisión nociceptiva en las neuronas del GRD en procesos de dolor inflamatorio.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar, mediante estudios de mutagénesis dirigida, si las cisteínas 422 y 622 son fundamentales para la activación del canal TRPA1 por los H⁺.
- Caracterizar biofísicamente la cinética de activación del canal TRPA1 evocada por la acidificación intracelular.
- Evaluar la interacción física entre NHE1-TRPA mediante inmunoprecipitación en neuronas del GRD aisladas de rata adulta.
- Identificar la actividad funcional de la interacción NHE1-TRPA1 en neuronas del GRD aisladas de ratas con dolor inflamatorio.

10. REFERENCIAS

1. Aickin C, Tomas R. 1977. An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *Journal of Physiology* 273:295-316.
2. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. 2007. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *Journal of Physiology* 583:175-93.
3. Alper SL, Chernova MN, Stewart AK. 2002. How pH regulates a pH regulator: a regulatory hot spot in the N-terminal cytoplasmic domain of the AE2 anion exchanger. *Cell Biochemistry and Biophysics* 36:123-136.
4. Ambriz-Tututi M, Rocha-González HI, Castañeda-Corral G, Araiza-Saldaña CI, Caram-Salas NL, Cruz SL, Granados-Soto V. 2009. Role of opioid receptors in the reduction of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in rats. *European Journal Pharmacology* 619:25-32.
5. Ambudkar IS. 2007. Trafficking of TRP channels: determinants of channel function. *Handbook Experimental Pharmacology* 89:541-557.
6. Anand U, Otto WR, Facer P, Zebda N, Selmer I, GunthorpeMJ, Chessell IP, Sinisi M, Birch R, Anand P. 2008. TRPA1 receptor localization in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons. *Neuroscience Letters* 438:221-227.
7. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. 2008. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *Journal of Neuroscience* 28:2485-94.
8. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. 2009. Clioquinol and pyriethione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn^{2+} . *Proceedings of the National Academy of Science USA* 106:8374-79.
9. Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. 2012. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacology and Therapeutics* 133: 189-204.
10. Asgar J, Zhang Y, Saloman JL, Wang S, Chung MK, Ro JY. 2015. The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats. *Neuroscience* 310:206-15.

11. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-57.
12. Barabas ME, Kossyrevva EA, Stucky CL. 2012. TRPA1 is functionally expressed primarily by IB4-binding, non-peptidergic mouse and rat sensory neurons. *PLoS One* 7(10).
13. Barragán-Iglesias P, Rocha-González HI, Pineda-Farias JB, Murbartián J, Godínez-Chaparro B, Reinach PS, Cunha TM, Cunha FQ, Granados-Soto V. 2014. Inhibition of peripheral anion exchanger 3 decreases formalin-induced pain. *European Journal of Pharmacology* 738:91-100.
14. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-84.
15. Baumann TK, Chaudhary P, Martenson ME. 2004. Background potassium channel block and TRPV1 activation contribute to proton depolarization of sensory neurons from humans with neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience* (5):1343-51.
16. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:12248-52.
17. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents *Cell* 124:1269-82.
18. Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. 2013. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annual Review of Physiology* 75:181-200.
19. Bevan S, Yeats J. 1991. Protons activate a cation conductance in a subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology* 433:145-61.
20. Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. 2008. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *Journal of Clinical Investigation* 118(5):1899-910.

21. Bonet IJM, Fischer L, Parada CA, Tambeli CH. 2013. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 65:206-12.
22. Brand G, Jacquot L. 2002. Sensitization and desensitization to allyl isothiocyanate (mustard oil) in the nasal cavity. *Chemical Senses* 27, 593-98.
23. Bravo-Hernández M, Corleto JA, Barragán-Iglesias P, González-Ramírez R, Pineda-Farias JB, Felix R, Calcutt NA, Delgado-Lezama R, Marsala M, Granados-Soto V. 2015. The $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors contribute to chronic pain. *Pain* 157 (3):613-26.
24. Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, Premkumar LS. 2012. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One* 7:e38005.
25. Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11:50-61.
26. Castañeda-Corral G, Rocha-González HI, Godínez-Chaparro B, Jiménez-Andrade JM, Granados-Soto V. 2011. Role of the spinal Na^+/H^+ exchanger in formalin-induced nociception. *Neuroscience Letters* 501(1):4-9.
27. Castañeda-Corral G, Rocha-González HI, Araiza-Saldaña CI, Vidal-Cantú GC, Miguel Jiménez-Andrade J, Murbartían J, Granados-Soto V. 2012. Blockade of peripheral and spinal Na^+/H^+ exchanger increases formalin-induced long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia in rats. *Brain Research* 1475:19-30.
28. Cattaruzza F, Spreadbury I, Miranda-Morales M, Grady EF, Vanner S, Bunnett NW. 2010. Transient receptor potential ankyrin-1 has a major role in mediating visceral pain in mice. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* 298:G81-91.
29. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-24.
30. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 53:55-63.

31. Chen J, Joshi SK, DiDomenico S, Perner RJ, Mikusa JP, Gauvin DM, Segreti JA, Han P, Zhang XF, Niforatos W, Bianchi BR, Baker SJ, Zhong C, Simler GH, McDonald HA, Schmidt RG, McGaraughty SP, Chu KL, Faltynek CR, Kort ME, Reilly RM, Kym PR. 2011. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain* 152:1165-72.
32. Chen X, Grunder S. 2007. Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel ASIC1a. *Journal of Physiology* 579: 657-70.
33. Chen YH, Wu ML, Fu WM. 1998. Regulation of presynaptic NMDA responses by external and intracellular pH changes at developing neuromuscular synapses. *Journal of Neuroscience* 18(8):2982-90.
34. Cherkas PS, Huang TY, Pannicke T, et al. 2004. The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. *Pain* 110:290-98.
35. Chesler M, Kaila K. 1992. Modulation of pH by neuronal activity. *Trends in Neuroscience* 15:396-402.
36. Chesler, M. 2003. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiology Reviews* 83:1183-221.
37. Chung S, Kim YH, Koh JY, Nam TS, Ahn DS. 2011. Intracellular acidification evoked by moderate extracellular acidosis attenuates transient receptor potential V1 (TRPV1) channel activity in rat dorsal root ganglion neurons. *Experimental Physiology* 96 12:1270-81.
38. Clapham DE. 2015. Structural biology: Pain-sensing TRPA1 channel resolved. *Nature* 520(7548):439-41.
39. Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. 2004. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432:723-30.
40. Costigan M, Woolf CJ. 2000. Pain: molecular mechanisms. *Journal of Pain* 1:35-44.
41. Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M. 1986. Data for biochemical research. 3rd edition. Oxford University Press. New York, USA. 496 pp.

42. da Costa DSM, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. 2010. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain* 148:431-37.
43. de la Roche J, Eberhardt MJ, Klinger AB, Stanslowsky N, Wegner F, Koppert W, Reeh PW, Lampert A, Fischer MJ, Leffler A. 2013. The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6. *Journal Biological Chemistry* 288:20280-92.
44. Deval E, Gasull X, Noël J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E. 2010. Acid-sensing ion channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. *Pharmacology and Therapeutics* 128:549-58.
45. Dixon WJ. 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 20:441-62.
46. Diogenes A, Akopian AN, Hargreaves KM. 2007. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. *Journal of Dental Research* 86(6):550-55.
47. Docherty RJ, Ginsberg L, Jadoon S, Orrell RW, Bhattacharjee A. 2013. TRPA1 insensitivity of human sural nerve axons after exposure to lidocaine. *Pain* 154:1569-74.
48. Doerner JF, Gisselmann, G, Hatt, H, Wetzel CH. 2007. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *Journal of Biological Chemistry* 282:13180-89.
49. Donowitz M, MingTse C, Fuster D. 2013. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. *Molecular Aspects in Medicine* 34:236-51.
50. Dubuisson D, Dennis SG. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesis effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4:161-74.
51. Dunham JP, Kelly S, Donaldson LF. 2008. Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptors in the rat. *European Journal of Neuroscience* 27(12):3151-60.

52. Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong K-C, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO. 2008. HC- 030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Molecular Pain* 4:48.
53. Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. 2008. TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)* 2:429-38.
54. Fitzgerald M, Gibson S. 1984. The postnatal physiological and neurochemical development of peripheral sensory C fibres. *Neuroscience* 3:933-44.
55. Frantz C, Barreiro G, Dominguez L, Chen X, Eddy R, Condeelis J, Kelly MJ, Jacobson MP, Barber DL. 2008. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *Journal of Cellular Biology* 183:865-79.
56. Frederick J, Buck ME, Matson DJ, Cortright DN. 2007. Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochemistry Biophysics Research Communication* 358(4):1058-64.
57. Fresno N, Pérez-Fernández R, Goicoechea C, Alkorta I, Fernández-Carvajal A, de la Torre-Martínez R, Quirce S, Ferrer-Montiel A, Martín MI, Goya P, Elguero J. 2014. Adamantyl analogues of paracetamol as potent analgesic drugs via inhibition of TRPA1. *PLoS One* 1;9:e113841.
58. Frey Law LA, Sluka KA, McMullen T, Lee J, Arendt-Nielsen L, Graven-Nielsen T. 2008. Acidic buffer induced muscle pain evokes referred pain and mechanical hyperalgesia in humans. *Pain* 140:254-64.
59. Fu KY, Light AR, Maixner W. 2000. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience* 101(4):1127-35.
60. Fu KY, Light AR, Maixner W. 2001. Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. *Journal of Pain* 2:2-11.
61. Fu KY, Tan YH, Sung B, Mao J. 2009. Peripheral formalin injection induces unique spinal cord microglial phenotypic changes. *Neuroscience Letters* 449(3):234-39.

62. Fujita F, Uchida K, Moriyama T, Shima A, Shibasaki K, Inada H, Sokabe T, Tominaga M. 2008. Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *Journal of Clinical Investigation* 118(12):4049-57.
63. Gallagher JP, Higashi H, Nakamura J, Shinnick-Gallagher P. 1983. The effects of temperature, pH and Cl⁻ pump inhibitors on GABA responses recorded from cat dorsal root ganglia. *Brain Research* 267:249-59.
64. Garrison SR, Stucky CL. 2014. Contribution of transient receptor potential ankyrin 1 to chronic pain in aged mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 66:2380-90.
65. Gauvin D, Mikusa J, Baker S, Zhong C, Simler G, Zhang X, Bianchi B, DiDomenico S, Perner RJ, Reilly R, Kort M, Jacobson P, Honore P, Chen J, Joshi S, Kym P. 2009. A-967079, a potent and selective TRPA1 antagonist, is efficacious in rat preclinical pain models. *Society for Neuroscience Abstracts* 761.3.
66. Ghatak S, Sikdar SK. 2016. Lactate modulates the intracellular pH sensitivity of human TREK1 channels. *Pflügers Archiv* 468(5):825-36.
67. Gilbertson TA, Avenet P, Kinnamon SC, Roper SD. 1992. Proton currents through amiloride-sensitive Na⁺ channels in hamster taste cells. Role in acid transduction. *The Journal of General Physiology* 100:803-24.
68. Gohar O. 2012. Contribution of ion channels in pain sensation. *Modulator* 19:9-13.
69. González-Islas, Chub C, Wenner N, P. 2009. NKCC1 and AE3 appear to accumulate chloride in embryonic motoneurons. *Journal of Neurophysiology* 101:507-18.
70. González-Nieto D, Gómez-Hernandez JM, Larrosa B, Gutierrez C, Muñoz MD, Fasciani I, O'Brien J, Zappala A, Cicirata F, Barrio LC. 2008. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proceedings of Natural Academy of Science USA* 105:17169-74.
71. Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, Le Gall-Ianotto C, Sakka M, Buhé V, Plée-Gautier E, Carré JL, Lefeuvre L, Misery L, Le Garrec R. 2017. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* 8(9):644-61.

72. Govea RM, Zhou S, Carlton SM. 2016. Group III mGluR8 negatively modulates TRPA1. *Neuroscience* 334:134-47.
73. Gover TD, Moreira TH, Kao JP, Weinreich D. 2007. Calcium homeostasis in trigeminal ganglion cell bodies. *Cell Calcium* 41(4):389-96.
74. Grafe P, Bostock H, Schneider U. 1994. The effects of hyperglycaemic hypoxia on rectification in rat dorsal root axons. *Journal of Physiology* 480 (Pt 2) 297-307.
75. Gratzke C, Streng T, Waldkirch E, Sigl K, Stief C, Andersson KE, Hedlund P. 2009. Transient receptor potential A1 (TRPA1) activity in the human urethra-evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region. *European Urology* 55:696-704.
76. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺-permeable, nonselective cation channel in smooth muscle cells. *Journal of General Physiology*. 104:375-94.
77. Hasan R, Leeson AT, Jaggar JH, Zhang X. 2017. Calmodulin is responsible for Ca²⁺-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Science Reports* 7:45098.
78. Hatano N, Suzuki H, Muraki Y, Muraki K. 2013. Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the antirheumatic drug auranofin. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 304:354-61.
79. Hjerling-Leffler J, Alqatari M, Ernfors P, Koltzenburg M. 2007. Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *Journal of Neuroscience* 27:2435-43.
80. Heyer G, Hornstein OP, Handwerker HO. 1991. Reactions to intradermally injected substance P and topically applied mustard oil in atopic dermatitis patients. *Acta Dermato Venereologica* 71, 291-95.
81. Hellwig N, Plant TD, Janson W, Schafer M, SchultzG, Schaefer M. 2004. TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *Journal of Biological Chemistry* 279:34553-61.
82. Hill K, Schaefer M. 2007. TRPA1 is differentially modulated by the amphipathic molecules trinitrophenol and chlorpromazine. *Journal of Biological Chemistry* 282:7145-53.

83. Holzer P. 2009. Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology* 194:283-332.
84. Honoré E. 2007. The neuronal background K₂P channels: focus on TREK1. *Nature Review in Neuroscience* 8(4):251-61.
85. Horvath A, Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély E, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. 2016. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Research and Therapy* 18:6.
86. Hwang SM, Koo NY, Jin M, Davies AJ, Chun GS, Choi SY, Kim JS, Park K. 2011. Intracellular acidification is associated with changes in free cytosolic calcium and inhibition of action potentials in rat trigeminal ganglion. *Journal of Biological Chemistry* 286:1719-29.
87. James-Kracke MR. 1992. Quick and accurate method to convert BCECF fluorescence to pHi: calibration in three different types of cell preparations. *Journal of Cellular Physiology* 151:596-603.
88. Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. 1999. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 274:7325-33.
89. Jacquot L, Monnin J, Lucarz A, Brand G. 2005. Trigeminal sensitization and desensitization in the nasal cavity: a study of cross interactions. *Rhinology* 43, 93-98.
90. Jiang YL, He XF, Shen YF, Yin XH, DU JY, Liang YI, Fang JQ. 2015. Analgesic roles of peripheral intrinsic met-enkephalin and dynorphin A in long-lasting inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Experimental Therapeutics Medicine* 9:2344-48.
91. Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB. 2004. Acid-induced pain and its modulation in humans. *Journal of Neuroscience* 24:10974-79.
92. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D. 2004. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260-65.

93. Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-10.
94. 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. *Experimental Neurology* 200:112-23.
95. Kerstein PC, del Camino D, Moran MM, Stucky CL. 2009. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Molecular Pain* 5:19.
96. Kim D, Cavanaugh E, Simkin D. 2009. Inhibition of Transient Receptor Potential A1 by Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *American Journal of Physiological Cell Physiology* 295:C92-99.
97. Kiss L, Korn SJ. 1999. Modulation of N-type Ca²⁺ channels by intracellular pH in chick sensory neurons. *Journal of Neurophysiology* 81(4):1839-47.
98. Kistner K, Siklosi N, Babes A, Khalil M, Selescu T, Zimmermann K, Wirtz S, Becker C, Neurath MF, Reeh PW, Engel MA. 2016. Systemic desensitization through TRPA1 channels by capsazepine and mustard oil- a novel strategy against inflammation and pain. *Scientific Reports* 6:28621.
99. Koivisto A, Chapman H, Jalava N, Korjamo T, Saarnilehto M, Lindstedt K, Pertovaara A. 2014. TRPA1: A Transducer and Amplifier of Pain and Inflammation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 114:50-55.
100. Kopito RR, Lee BS, Simmons DM, Lindsey AE, Morgans CW, Schneider K. 1989. Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* 59:927-37.
101. Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E. 2007. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* 27:4443-51.
102. Krishtal OA, Pidoplichko VI. 1981. Receptor for protons in the membrane of sensory neurons. *Brain Research* 214:150-54.
103. Krishtal OA, Pidoplichko VI. 1980. A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* 12:2325-27.

104. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. 2006. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50:277-89.
105. Leng TD, Si HF, Li J, Yang T, Zhu M, Wang B, Simon RP, Xiong ZG. 2016. Amiloride analogs as ASIC1a inhibitors. *CNS Neuroscience Therapy* 22(6):468-76.
106. Lingueglia E. 2007. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *The Journal of Biological Chemistry* 282:17325-29.
107. Liu Y, Basu A, Li X, Fliegel L. 2015. Topological analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848: 2385-93.
108. Lee B, Sykes B, Fliegel L. 2013. Structural and functional insights into the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger. *Journal of Molecular Cell of Cardiology* 61:60-67.
109. Liu CN, Soms CJ. 2008. Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitors reduce neuronal excitability and alter Na⁺ channel inactivation properties in rat primary sensory neurons. *Toxicological Science* 103(2):346-53.
110. Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry* 267:14483-89.
111. Machelska H, Schopohl JK, Mousa SA, Labuz D, Schäfer M, Stein C. 2003. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *Journal of Neuroimmunology* 141:30-39.
112. Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. 2007. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445:541-45.
113. Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E. 1999. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 274:26691-96.
114. Malmberg AB, Yaksh TL. 1995. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *Journal of Neuroscience* 15(4):2768-76.
115. Maruyama T, Iizuka H, Shiba T, Matsuda T, Kurohane K, Imai Y. 2007. Influence of local treatments with capsaicin or allyl isothiocyanate in the sensitization phase of

- a fluorescein isothiocyanate-induced contact sensitivity model. *International Archives of Allergy and Immunology* 143:144-54.
116. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. 2008. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105:8784-89.
 117. McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, DiDomenico S, Kort ME, Kym PR. 2010. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Molecular Pain* 6:14.
 118. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104:13525-30.
 119. Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodriguez T, Viana F, Nilius B, Voets T. 2008. Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *Journal of Neuroscience* 28:576-86.
 120. Moilanen LJ, Hamalainen M, Ilmarinen P, Nieminen RM. 2015. Monosodium iodoacetate-induced inflammation and joint pain are reduced in TRPA1 deficient mice-potential role of TRPA1 in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 2017-26.
 121. Moody W. 1984. Effects of intracellular H⁺ on the electrical properties of excitable cells. *Annual Review in Neuroscience* 7:257-78.
 122. Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. 2005. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *Journal of Neuroscience* 25:4052-61.
 123. Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. 2009. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *European Journal of Pain* 13(5):441-47.
 124. Nassenstein C, Kwong K, Taylor-Clark T, Kollarik M, Macglashan DM. 2008. Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *Journal of Physiology* 586:1595-604.

125. Nassini R, Pedretti P, Moretto N, Fusi C, Carnini C, Facchinetti F, Viscomi AR, Pisano AR, Stokesberry S, Brunmark C, Svitacheva N, McGarvey L, Patacchini R, Damholt AB, Geppetti P, Materazzi S. 2012. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One* 7:e42454.
126. Nickell WT, Kleene NK, Kleene SJ. 2007. Mechanisms of neuronal chloride accumulation in intact mouse olfactory epithelium. *Journal of Physiology* 583:1005-20.
127. Nilius B, Owsianik G, Voets T. 2008. Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. *EMBO Journal* 21:2809-16.
128. Nilius B, Prenen J, Owsianik G. 2011. Irritating channels: the case of TRPA1. *Journal of Physiology* 589:1543-49.
129. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. 2012. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflügers Archives: European Journal of Physiology* 464:425-58.
130. Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H. 2009. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:3408-13.
131. Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K. 2005. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *Journal of Clinical Investigation* 115:2393-2401.
132. Obara M, Szeliga M, Albrecht J. 2008. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochemistry International* 52:905-19.
133. Okun A, Liu P, Davis P, Ren J, Remeniuk B. 2012. Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. *Pain* 153:924-33.
134. Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE. 1992. Molecular cloning of putative members of the Na⁺/H⁺ exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence,

- and mRNA tissue expression of the rat Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *Journal of Biological Chemistry* 267:9331-9339.
135. Orłowski J, Grinstein S. 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflügers Archiv* 447:549-65.
 136. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 102(4):937-44.
 137. Passmore M. 2005. Dorsal root ganglion neurons in culture: A model system for identifying novel analgesic targets? *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51, 201.
 138. Patacchini R, Maggi CA, Meli A. 1990. Capsaicin-like activity of some natural pungent substances on peripheral endings of visceral primary afferents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacological* 342:72-77.
 139. Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. 2007. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Molecular Pain* 3:40.
 140. Rocha-González HI, Castañeda-Corral G, Araiza-Saldaña CI, Ambriz-Tututi M, Caram-Salas NL, Torres-López JE, Murbartián J, Granados-Soto V. 2009. Identification of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 in dorsal root ganglion and spinal cord: its possible role in inflammatory nociception. *Neuroscience* 160:156-64.
 141. Roos A, Boron WF. 1981. Intracellular pH. *Physiology Reviews* 61:296-434.
 142. Reeh PW, Kocher L, Jung S. 1986. Does neurogenic inflammation alter the sensitivity of unmyelinated nociceptors in the rat? *Brain Research* 384, 42-50.
 143. Reeh PW, Steen KH. 1996. Tissue acidosis in nociception and pain. *Progress in Brain Research* 113:143-51.
 144. Richardson JD, Vasko MR. 2002. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 302:839-45.
 145. Ruffin VA, Salameh AI, Boron WF, Parker MD. 2014. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Frontiers in Physiology* 5:43.

146. Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM. 2008. Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. *Pain* 135:271-79.
147. Salas MM, Hargreaves KM, Akopian AN. 2009. TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. *European Journal of Neuroscience* 29:1568-78.
148. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. 1989. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* 56:271-80.
149. Schneider U, Quasthoff S, Mitrovic N, Grafe P. 1993. Hyperglycaemic hypoxia alters after-potential and fast K⁺ conductance of rat axons by cytoplasmic acidification. *Journal of Physiology* 465:679-97.
150. Schwartz ES, La JH, Scheff NN, Davis BM, Albers KM, Gebhart GF. 2013. TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis. *Journal of Neuroscience* 33(13):5603-11.
151. Shields SD, Cavanaugh DJ, Lee H, Anderson DJ, Basbaum AI. 2010. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain* 151(2):422-9.
152. Shim WS, Tak MH, Lee MH, Kim M, Koo JY. 2007. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *Journal of Neuroscience* 27:2331-37.
153. Simons CT, Sudo S, Sudo M, Carstens E. 2004. Mustard oil has differential effects on the response of trigeminal caudalis neurons to heat and acidity. *Pain* 110:64-71.
154. Smith MP, Beacham D, Ensor E, Koltzenburg M. 2004. Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. *Neuroreport* 15:1399-1403.
155. Sinning A, Liebmann L, Kougioumtzes A, Westermann M, Bruehl C, Hubner CA. 2011. Synaptic glutamate release is modulated by the Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ formula exchanger Slc4a8. *Journal of Neuroscience* 31:7300-11.
156. Sluka KA, Kalra A, Moore SA. 2001. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24(1):37-46.

157. Song Y, Zhang M, Tao X, Xu Z, Zheng Y, Zhu M, Zhang L, Qiao J, Gao L. 2018. Difference of acute dissociation and 1-day culture on the electrophysiological properties of rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Physiology and Biochemistry* 19:1-15.
158. Steen KH, Reeh PW. 1993. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neuroscience Letters* 154:113-16.
159. Steen KH, Wegner H, Reeh PW. 1999. The pH response of rat cutaneous nociceptors correlates with extracellular $[Na^+]$ and is increased under amiloride. *European Journal of Neuroscience* 11:2783-92.
160. Sterling D, Casey JR. 1999. Transport activity of AE3 chloride/bicarbonate anion-exchange proteins and their regulation by intracellular pH. *Biochemistry* 344:(Pt 1) 221-29.
161. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik, TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-29.
162. Sun L, Yu Z, Eang W, Liu X. 2012. Both NKCC1 and anion exchangers contribute to chloride accumulation in postnatal forebrain neuronal progenitors. *European Journal of Neuroscience* 35:661-72.
163. Svichar N, Waheed A, Sly WS, Hennings JC, Hübner CA, Chesler M. 2009. Carbonic anhydrases CA4 and CA14 both enhance AE3-mediated Cl^- - HCO_3^- exchange in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 29:3252-58.
164. Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglashan DW Jr, Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA. 2008. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Molecular Pharmacology* 73(2):274-81.
165. Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E. 1979. Intracellular pH measurement in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18:2210-18.

166. Thomas RC, Pagnotta SE, Nistri A. 2003. Whole-cell recording of intracellular pH with silanized and oiled patch-type single or double-barreled microelectrodes. *Pflugers Archives* 447:259-65.
167. Tong X, Shigetomi E, Looger LL, Khakh BS. 2013. Genetically encoded calcium indicators and astrocyte calcium microdomains. *Neuroscientist* 19(3):274-91.
168. Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, De Siena G, Fusi C, Fortes Rossato M, Coppi E, Marone IM, Ferreira J, Geppetti P, Nassini R. 2016. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 139(Pt 5):1361-77.
169. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P. 2007. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proceedings National Academic of Science USA* 104:13519-24.
170. Uta D, Furue H, Pickering AE, Harunor Rashid M, Mizuguchi-Takase H, Katafuchi T, Imoto K, Yoshimura M. 2010. TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 31:1960-73.
171. Vermeulen W, De Man JG, De Schepper HU, Bult H, Moreels TG, Pelckmans PA, De Winter BY. 2013. Role of TRPV1 and TRPA1 in visceral hypersensitivity to colorectal distension during experimental colitis in rats. *European Journal of Pharmacology* 698(1-3):404-12.
172. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. 1997. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry* 272:20975-78.
173. Wang L, Cvetkov T, Chance M, Moiseenkova-Bell V. 2012. Identification of in vivo disulfide conformation of the TRPA1 ion channel. *Journal of Biological Chemistry* 287:6169-76.
174. Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER. 2008. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *Journal of Biological Chemistry* 283:32691-703.

175. Wang YY, Chang RB, Liman ER. 2010. TRPA1 is a component of the nociceptive response to CO₂. *Journal of Neuroscience* 30:12958-63.
176. Wang YY, Chang RB, Allgood SD, Silver WL, Liman ER. 2011. A TRPA1-dependent mechanism for the pungent sensation of weak acids. *Journal of General Physiology* 137:493-505.
177. Wei H, Hämäläinen MM, Saarnilehto M, Koivisto A, Pertovaara A. 2009. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. *Anesthesiology* 111:147-54.
178. Wei H, Koivisto A, Saarnilehto M, Chapman H, Kuokkanen K, Hao B, Huang JL, Wang YX, Pertovaara A. 2011. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat. *Pain* 152:582-91.
179. Werth JL, Thayer SA. 1994. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* 14:348-56.
180. Wiedemann F, Link R, Pumpe K, Jacobshagen U, Schaefer HE, Wiesmüller KH, Hummel RP, Jung G, Bessler W, Böltz T. 1991. Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P3C) conjugates. *Journal of Pathology* 164(3):265-71.
181. Wilson SR, Gerhold KA, Bifulck-Fisher A, Liu Q, Patel KN. 2011. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nature Neuroscience* 14:595-602.
182. Woolf CJ, Ma Q. 2007. Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron* 55:353-64.
183. Wrigley PJ, Jeong HJ, Vaughan CW. 2009. Primary afferents with TRPM8 and TRPA1 profiles target distinct subpopulations of rat superficial dorsal horn neurones. *British Journal of Pharmacology* 157:371-80.
184. Wu ML, Chen JH, Chen YJ, Chu KC. 1999. Novel role of the Ca²⁺-ATPase in NMDA-induced intracellular acidification. *American Journal of Physiology* 277(Pt 1):717-27.
185. Xu GY, Huang LY. 2002. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* 22:93-102.

186. Xu L, Mann G, Meissner G. 1996. Regulation of cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circulation Research* 79:1100-09.
187. Yang J, Li Y, Zuo X, Zhen Y, Yu Y, Gao L. 2008. Transient receptor potential ankyrin-1 participates in visceral hyperalgesia following experimental colitis. *Neuroscience Letters* 440:237-41.
188. Yoshida K, Kobayashi L, Yu S, Wang R, Koichi N, Dai Y. 2011. Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin. *Molecular Pain* 7:41.
189. Zachos NC, Tse M, Donowitz M. 2005. Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annual Review of Physiology* 67:411-43.
190. Zhang X, Koronowski KB, Li L, Freeman BA, Woodcock S, de Groat WC. 2014. Nitro-oleic acid desensitizes TRPA1 and TRPV1 agonist responses in adult rat DRG neurons. *Experimental Neurology* 251:12-21.
191. Zhu W, Oxford G. 2011. Differential gene expression of neonatal and adult DRG neurons correlates with the differential sensitization of TRPV1 responses to nerve growth factor. *Neuroscience Letters* 500(3):192-96.
192. Zimmermann M. 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-10.
193. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. 2007. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nature Neuroscience* 10:277-79.

11. ANEXOS

Los resultados parciales de este proyecto se presentaron en los siguientes congresos:

Martínez-Rojas VA, Murbartián J. Role of TRPA1 channel in formalin-induced chronic nociception. 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington, DC., E.U.A. Noviembre 11-15, 2017.

Martínez-Rojas VA, Gómez-Víques NL, Mercado F, Murbartián J. Functional coupling between NHE1 exchanger and TRPA1 channel in nociceptive neurons. Thematic Meeting: Emerging Concepts in Ion Channel Biophysics. Biophysical Society. Mexico City, México. Octubre 10-13, 2017.

Martínez-Rojas VA, Noriega-Navarro RI, Murbartián J. Participación del canal iónico TRPA1 en el dolor inflamatorio crónico inducido por formalina. LIX congreso nacional de la sociedad mexicana de ciencias fisiológicas. Campeche, Campeche. Agosto 14-18, 2016.

De este proyecto se publicó el siguiente artículo científico:

Martínez-Rojas VA, Noriega-Navarro R, Guzmán-Priego CG, Torres-López JE, Granados-Soto V, Murbartián J. 2018. Peripheral and spinal TRPA1 channels contribute to formalin-induced long-lasting mechanical hypersensitivity. *Journal of Pain Research* 11:51-60.

Peripheral and spinal TRPA1 channels contribute to formalin-induced long-lasting mechanical hypersensitivity

Vladimir A Martínez-Rojas¹
Guadalupe García¹
Roxana Noriega-Navarro¹
Crystell G Guzmán-Priego²
Jorge E Torres-López^{2,3}
Vinicio Granados-Soto⁴
Janet Murbartían¹

¹Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Unidad Coapa, Ciudad de México, ²Laboratorio Mecanismos del Dolor, Centro de Investigación, División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, ³Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, Villahermosa, Tabasco, ⁴Neurobiology of Pain Laboratory, Departamento de Farmacobiología, Cinvestav, Unidad Coapa, Ciudad de México, México

Background: Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a non-selective cation channel expressed by a subset of nociceptive neurons that acts as a multimodal receptor. Its activity contributes to modulate nociceptive transmission in acute inflammatory pain. However, the role of this channel in chronic pain has been less studied. The purpose of this study was to investigate the local peripheral and spinal participation of TRPA1 channels in formalin-induced long-lasting hypersensitivity.

Materials and methods: Formalin (1%)-induced chronic hypersensitivity was determined by the application of von Frey filaments to ipsilateral and contralateral paws and through pharmacological testing using a selective TRPA1 blocker (A-967079). TRPA1 expression in the dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord was analyzed by Western blotting.

Results: Formalin (1%) injection produced acute flinching behavior (1 h) as well as secondary allodynia and hyperalgesia (12 days). Local peripheral pretreatment (10 min before) or posttreatment (6 days later) with A-967079 (1–100 μ M) partially prevented and reversed, respectively, in a dose-dependent manner, long-lasting secondary mechanical allodynia and hyperalgesia evoked by 1% formalin. Likewise, intrathecal pretreatment or posttreatment with A-967079 partially prevented and reversed, respectively, formalin-induced long-lasting hypersensitivity. A-967079 (100 μ M) completely abolished the pro-nociceptive effect of formalin (adjusted to pH 7.4). Finally, formalin injection increased TRPA1 protein expression in the DRG and spinal cord.

Conclusion: Results indicate that TRPA1 expressed in the DRG and spinal cord plays a relevant role in formalin-induced long-lasting secondary nociceptive hypersensitivity.

Keywords: allodynia, chronic pain, formalin, hyperalgesia, TRPA1

Introduction

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a polymodal cation channel that is highly expressed in nociceptors, where it functions to detect several pro-nociceptive molecules involved in pain and pruritus.^{1–4} However, TRPA1 is also expressed in non-neuronal cells such as keratinocytes,⁵ megakaryocytes,⁶ or enterochromaffin cells.⁷ With regard to pain, this channel has been found in the dorsal root ganglion (DRG), trigeminal ganglion, and spinal cord.^{1,8–13} Activation of TRPA1 leads to activation of sensory neurons, release of inflammatory neuropeptides, and pain hypersensitivity.^{4,14}

Several studies have reported that TRPA1 participates in inflammatory^{15–23} and neuropathic^{16,24–28} pain models. It has been reported that the TRPA1 channel blocker Chembridge-5861526 (CHEM), given intrathecally, diminishes formalin-induced secondary mechanical hypersensitivity¹⁸ suggesting that TRPA1 channels play an important role in the acute and short-lasting effects of formalin. The role of this channel

Correspondence: Janet Murbartían
Departamento de Farmacobiología,
Cinvestav, Unidad Coapa, Calzada de los
Tenorios 235, Colonia Granjas Coapa,
14330 Ciudad de México, México
Email jmurbartian@gmail.com

in the development of long-lasting secondary mechanical allodynia and hyperalgesia induced by formalin remains unknown. Accordingly, we hypothesized that local peripheral and spinal TRPA1 underlies formalin-induced acute nociception and long-lasting secondary hyperalgesia and allodynia. Therefore, the purpose of this study was to investigate the participation of peripheral and spinal TRPA1 channels in the development and maintenance of formalin-induced acute nociception and long-lasting secondary mechanical allodynia and hyperalgesia in rats. Moreover, we analyzed TRPA1 protein expression in sites relevant to the nociceptive processing (DRG and spinal cord) in naïve and formalin-treated rats.

Materials and methods

Subjects

Experiments were carried out in female Wistar rats (180–200 g) of 8 to 10 weeks old at the beginning of experiments. At the time of the experiment, animals were 1 week old or older. Animals were housed in a room on a 12-h light/dark cycle and had free access to food and drinking water before the experiments. Experiments were conducted in accordance with the Guidelines of Ethical Standards for Investigation of Experimental Pain in Animals.²⁹ In addition, the Institutional Animal Care and Use Committee approved our study (Cinvestav, Protocol 0092-14). All tests were undertaken during the light phase. The number of experimental animals was kept to a minimum.

Reagents

Formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was freshly prepared and dissolved in 0.9% NaCl (sterile saline) in most of the experiments. In one experiment, formalin was dissolved in phosphate-buffered saline (pH 7.4). Then, (1E,3E)-1-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-1-penten-3-one oxime (A-967079, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to make a stock solution and kept at -20°C until the day of the experiment. The final concentration of DMSO was less than 1% (v/v). For local peripheral administration, drugs were given in a volume of 50 μL into the formalin-treated paw. For intrathecal (i.t.) administration, drugs were administered in a volume of 10 μL (into the subarachnoid space) through lumbar puncture.

Induction and assessment of acute nociception and long-lasting secondary mechanical allodynia and hyperalgesia

Rats ($n=6$ per group) were briefly immobilized in a manner that allowed access to the right hind limb. Then, animals

received a subcutaneous injection of 1% formalin (50 μL) into the dorsal surface on the right hind paw (ipsilateral) with a 30-gauge needle. Acute nociception was assessed using the formalin test.³⁰ Rats were placed in open acrylic observation chambers for 30 min to allow them to acclimate to their surroundings; then, they were removed for formalin administration. Mirrors were placed in each chamber to enable unhindered observation. Nociceptive behavior was quantified as the number of flinches of the injected paw during 1-min periods every 5 min, for up to 60 min after injection.³⁰ Flinching was characterized as rapid and brief withdrawal, or as flexing of the injected paw. Formalin-induced flinching behavior was biphasic. The initial acute phase (Phase 1, 0–10 min) was followed by a relatively short quiescent period, which was then followed by a prolonged tonic response (Phase 2, 15–60 min). After acute nociceptive evaluation, animals were maintained for the next 12 days.

The hypersensitivity induced by formalin was tested at baseline and also 1, 3, 6, and 12 days after injection. However, for subsequent experiments, the sixth day was chosen to evaluate nociceptive behaviors as, at this time, nociceptive behaviors are already established.^{31,32} To evaluate the evoked nociceptive behaviors, rats were placed into testing cages on a wire-mesh bottom and allowed to acclimate for 30 min. Rats were stimulated 10 times with two von Frey filaments (Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA) to the base of the third toe on the plantar surface of both paws. Three trials were carried out to determine the paw response frequency. A force of 10 mN (1 g) does not activate cutaneous nociceptors in naïve rats, as it does not lead to paw withdrawal. Thus, a response to this filament is an indication of allodynia. Likewise, a force of 250 mN (26 g) is considered a noxious stimulus.³³ An increased response to this filament indicates hyperalgesia. Rats were killed in a CO_2 chamber at the end of the experiment.

Western blot analysis

Western blot analysis was used to determine the expression of TRPA1 in ipsilateral DRG and the dorsal spinal cord. For this, naïve and formalin-treated rats ($n=3$ per group) were killed by decapitation. DRGs (L4–L6), corresponding to the afferent pathway from the hind paw, and the dorsal spinal cord (L4–L6 segment) were carefully removed and processed as previously described.³⁴ Tissues from individual animals were homogenized in ice-cold lysis buffer (in mM: 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 5 EDTA), pH 7.4 for 30 min at 4°C . The protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM), aprotinin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), leupeptin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pepstatin A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),

and the surfactant 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to the lysis buffer immediately prior to use. The homogenate was then centrifuged (Eppendorf, Hamburg) at 14,000 rpm for 10 min to remove cellular debris. The resultant supernatant was used to measure protein concentration by using Bradford's method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Fifty micrograms of total protein were separated by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were blocked in 5% non-fat milk in PBS at pH 7.4 (in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, and 2 KH₂PO₄) with 0.05% Tween-20 for 1 h. After that, they were washed and incubated overnight at 4°C in 5% non-fat dry milk/PBS containing rabbit anti-TRPA1 antibody (1:2,000, Cat. No. 68847, Abcam, Cambridge, MA, USA). Membranes were incubated for 1 h at room temperature in 1% non-fat milk/PBS containing the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (bovine anti-rabbit 1:3000, Cat. No. sc-2370, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA or goat anti-mouse 1:10,000, Cat. No. 115-035-003, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). Protein signal detection was achieved with the ECL chemiluminescence system (Millipore, Billerica, MA, USA). The next day, blots were incubated with a monoclonal antibody directed against β -actin (1:5,000, Cat. No. MAB1501R, Millipore, Billerica, MA, USA), which was used as internal control to normalize TRPA1 protein expression level. Bands were analyzed with Image Studio Ver. 4.0 (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

Experimental design

To determine whether blockade of TRPA1 channels at the peripheral or spinal level modifies formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia, we used the highly selective TRPA1 blocker A-967079 (IC₅₀: 289 nM).²⁴ Dose selection was based on previous studies^{17,24} and pilot experiments in our laboratory. Formalin (1%) was selected because, at this concentration, formalin activates C fibers wherein TRPA1 is mainly expressed.^{3,35}

In order to assess the participation of local peripheral and spinal TRPA1 channels in the development of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia, rats received a subcutaneous (s.c.) injection into the dorsal surface of the right hind paw (50 μ L) or an i.t. injection (10 μ L) of vehicle (1% DMSO) or increasing doses of A-967079 (1–100 μ M) 10 min before 1% formalin injection into the right (ipsilateral) paw. Allodynia and hyperalgesia were evaluated 6 days later in both paws. To determine whether A-967079 acted locally,

the maximal dose of A-967079 used (100 μ M) was injected into the left (contralateral) paw 10 min before a 1% formalin injection into the right paw, and the effect on nociceptive behavior was assessed in both paws.

In order to determine the participation of local peripheral and spinal TRPA1 channels in the maintenance of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia, rats received a s.c. injection into the dorsal surface of the right hind paw (50 μ L) or an i.t. injection (10 μ L) of vehicle (1% DMSO) or increasing doses of A-967079 (1–100 μ M) 6 days after 1% formalin injection into the right (ipsilateral) paw. Animals were tested before drug administration to register a baseline of nociceptive behaviors. Allodynia and hyperalgesia were evaluated 1 h after drug administration because, at this time, we observed the maximal antinociceptive response.

In order to discharge the effects of hydrogen ions (H⁺) in the development of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia, rats received a local peripheral pretreatment with vehicle (1% DMSO) or A-967079 (100 μ M) 10 min before the administration of 1% formalin pH 7.4, instead of regular formalin (without controlling the pH).

In order to assess the role of TRPA1 channels in sites related to nociceptive processing induced by formalin, we determined the expression of this channel at the ipsilateral DRG and dorsal spinal cord at 1 h as well as on days 1, 6, and 12 after the 1% formalin injection.

Data and statistical analysis

Behavioral data are expressed as mean \pm SEM of the hind paw withdrawal response of six rats for each group. Protein expression data are the mean \pm SEM of three independent experiments.

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test; *p*-values less than 0.05 were considered significant. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Acute and secondary allodynia and hyperalgesia induced by formalin

Formalin administration into the dorsal surface of the right hind paw resulted in acute nociception (spontaneous flinching) lasting approximately 1 h (data not shown) as well as secondary mechanical allodynia and hyperalgesia lasting from 1 to 12 days in the injected (ipsilateral; Figure 1A and C) and in the uninjured (contralateral; Figure 1B and D) hind paw. This was observed as a bilateral increase in the paw withdrawal responses to application of von Frey filaments, which was

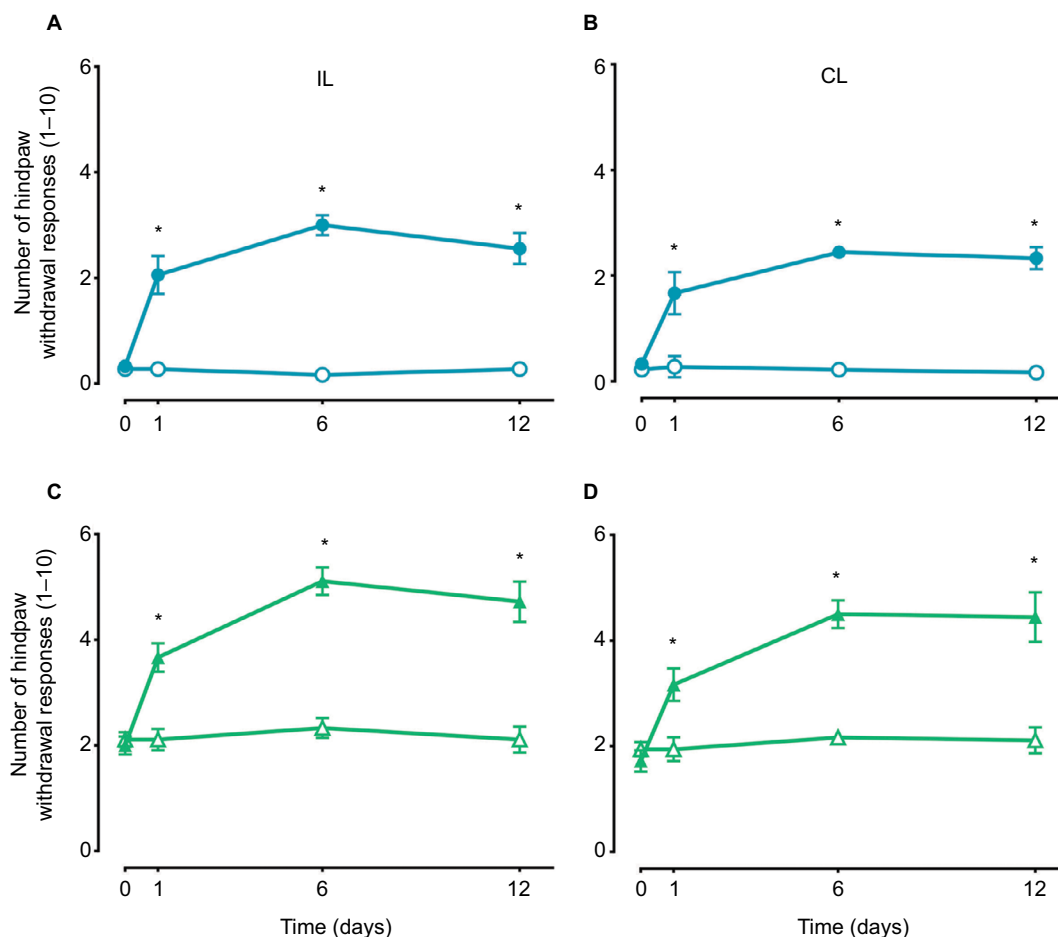


Figure 1 The time course of the mean number of paw withdrawal responses ($n=6 \pm \text{SEM}$) to 10 applications of von Frey filaments of two different bending forces 10 (circles, **A** and **B**) and 250 mN (triangles, **C** and **D**) following subcutaneous administration of 1% formalin (1% F).

Note: $p < 0.05$ by two-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test.

Abbreviations: IL, ipsilateral; CL, contralateral; ANOVA, analysis of variance.

significant 1 day after formalin administration and lasted for at least 12 days ($p < 0.05$). For experiments with the TRPA1 channel blocker, the sixth day was chosen to evaluate nociceptive behaviors as previously reported.³⁶ In addition, effects in the contralateral paw were omitted for the sake of clarity.

Effects of A-967079 on formalin-induced acute and long-lasting hypersensitivity

Local peripheral and i.t. pretreatment (10 min before) with A-967079 (1–100 μM) partially prevented formalin-induced acute (1 h) nociceptive flinching during phases 1 and 2 ($p < 0.05$, Figure 2). Moreover, local peripheral ($p < 0.05$, Figure 3) or spinal ($p < 0.05$, Figure 4) pre- or posttreatment (6 days later) with A-967079 (1–100 μM) partially prevented and reversed, respectively, 1% formalin-induced secondary mechanical allodynia and hyperalgesia in ipsilateral and contralateral paws. Of note, local peripheral administration of A-967079 (100 μM) into the contralateral paw did not affect formalin-induced hypersensitivity, indicating that the

antinociceptive effect of A-967079 is mediated by the blockade of TRPA1 located in the periphery (Figure 3).

Formalin (adjusted to pH 7.4) injection produced lesser nociceptive behaviors than formalin dissolved in saline. Interestingly, local peripheral pretreatment with A-967079 (100 μM) completely prevented formalin (pH 7.4)-induced long-lasting allodynia and hyperalgesia ($p < 0.05$, Figure 5).

Effect of formalin on TRPA1 expression in DRG and spinal cord

Western blot analysis identified a 123-kDa band corresponding to the molecular weight expected for TRPA1 in the ipsilateral DRG and dorsal spinal cord of naïve and formalin-treated rats (Figure 6). Moreover, formalin (1%) injection increased TRPA1 protein expression on days 6 and 1 after injection in the ipsilateral DRG ($p < 0.05$, Figure 6A) and dorsal spinal cord ($p < 0.05$, Figure 6B). No change in TRPA1 protein expression was detected in the contralateral DRG or dorsal horn (data not shown).

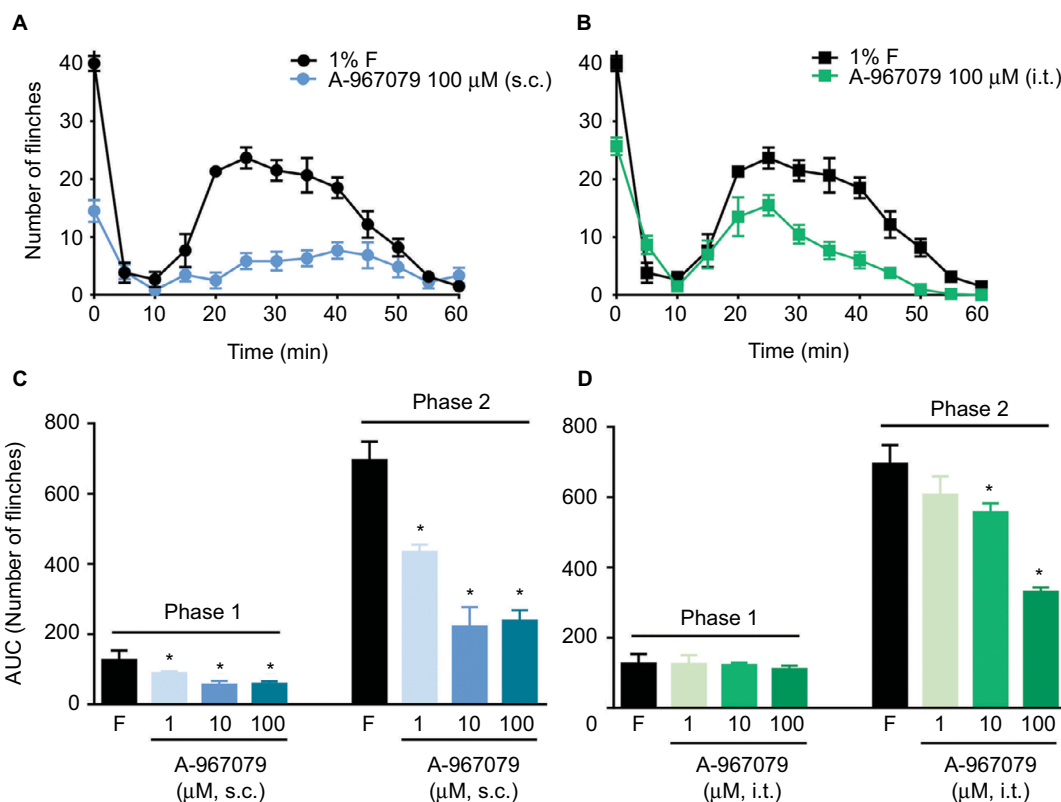


Figure 2 Antinociceptive effect of the local peripheral (s.c.; **A** and **C**) and intrathecal (i.t.; **B** and **D**) pretreatment with A-967079 (1–100 μM) in rats subjected to the 1% formalin test.

Notes: (**A** and **B**) The time course observed during phases 1 and 2 of the formalin test after administration of 100 μM of A-967079 into the dorsal part of the paw (**A**) or i.t. (**B**) 10 min before formalin injection. **C** and **D** show the data on the area under the curve for the phases 1 and 2 for local peripheral and intrathecal administration, respectively. Data are mean ($n=6 \pm \text{SEM}$). In plots **C** and **D**, * $p < 0.05$, significantly different from the formalin (F) group, by one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. **Abbreviation:** ANOVA, analysis of variance.

Discussion

In this study, we found that either local peripheral or i.t. administration of the TRPA1 channel blocker A-967079 prevented acute nociception in the formalin test. Furthermore, this drug prevented and reversed formalin-induced long-lasting hypersensitivity in rats. As formalin is a TRPA1 channel agonist³⁵ and A-967079 is a highly selective TRPA1 channel blocker,²⁴ our data suggest that peripheral and spinal TRPA1 channels participate in acute nociception as well as in the development and maintenance of long-lasting secondary allodynia and hyperalgesia induced by formalin. These data suggest that acute nociception and secondary allodynia and hyperalgesia depend on TRPA1 channel-induced persistent small afferent input as well as a sensitized dorsal horn. Our results agree with previous observations demonstrating that TRPA1, indeed, participate in formalin-induced acute nociception.^{18,35} Moreover, the fact that acute nociception induced by the selective TRPA1-channel agonist allyl isothiocyanate (AITC) is prevented by A-967079 further supports that TRPA1 plays an important role in formalin-induced acute nociception.²⁴ However, to our knowledge, this is the first

report about the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effect of A-967079 in formalin-induced long-lasting nociceptive hypersensitivity. Our study agrees with a previous report showing that the TRPA1-channel blocker CHEM diminishes formalin-induced secondary mechanical hypersensitivity (24 h),¹⁸ suggesting that TRPA1 channels play an important role in the short- (1 day) and long-lasting (6–12 days) effects of formalin. Moreover, our data concord with those showing that i.t. injection of the TRPA1-channel blocker HC-030031 reduces long-lasting (28 days) mechanical and cold allodynia induced by complete Freund's adjuvant (CFA) in mice.¹¹ The fact that A-967079 blocks AITC-induced acute nociceptive behaviors in vivo,²⁴ further suggest that TRPA1 channels are important for the development and maintenance of nociceptive hypersensitivity induced by formalin. Moreover, our data agree with several studies reporting that other TRPA1 antagonists (HC030031, CHEM) or genetic deletion of *Trpa1* reduces nociceptive hypersensitivity induced by colorectal distension, pancreatitis, colitis, osteoarthritis, REM-sleep deprivation, skin incision, intraplantar capsaicin, carrageenan, and peripheral nerve injury.^{15–24,28,37,38} Thus, our

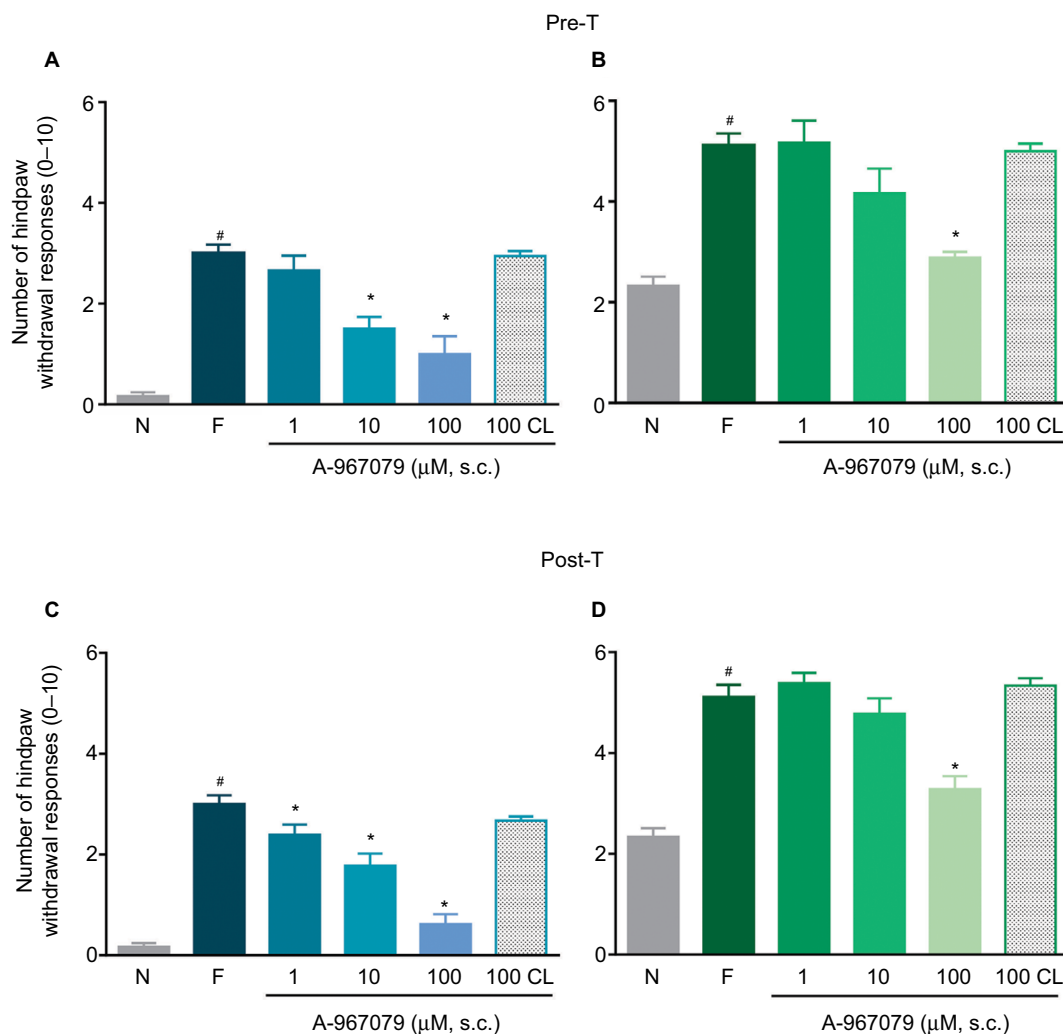


Figure 3 Antinociceptive effect of the local peripheral (s.c.) pretreatment (**A** and **B**) or posttreatment (**C** and **D**) with A-967079 (1–100 μ M) on formalin-induced secondary mechanical allodynia (**A** and **C**) and hyperalgesia (**B** and **D**) in rats.

Notes: Data are expressed as the mean ($n=6 \pm$ SEM) paw withdrawal responses to the application of von Frey filaments (10 and 250 mN) to the plantar surface of rat paws before (naive, N) and after 1% formalin (F). In all cases, [#] $p < 0.05$ versus N group; ^{*} $p < 0.05$ versus F group, by one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test.

Abbreviations: pre-T; pretreatment; post-T, posttreatment; ANOVA, analysis of variance; CL, contralateral.

results extend these observations by showing that blockade of TRPA1 channels has important consequences on the development and maintenance of formalin-induced nociceptive hypersensitivity. Some studies have reported that oral administration of A-967079 does not diminish mechanical allodynia induced by CFA, chronic constriction injury, or spinal nerve ligation models.²⁴ It is likely that this discrepancy is due to the low amount of compound that reaches local peripheral or spinal sites after oral administration. In support of this, i.e. administration of CHEM or HC-030031 reduces tactile allodynia in neuropathic rats.^{26,27}

It has been established that activation of TRPA1 channels by its agonists (cinnamaldehyde, AITC, and formalin) in the paw produces mechanical sensitization in rats.^{15,16,35,39} Forma-

lin injection induces peripheral and central sensitization. In the first case, there is evidence that formalin injection leads to serotonin (5-HT), histamine, IL-1 β , and TNF α release at the periphery, which in turn activate their receptors to produce direct nociception or sensitization.^{40–42} With regard to central effects, formalin injection starts a cascade of events including release of glutamate, prostaglandins, and 5-HT at the dorsal horn spinal cord^{43,44} and activation of microglia which, in turn, releases nitric oxide, nerve growth factor, cytokines (IL-1 β and TNF α), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF).^{31,45,46} Acting at their receptors, these molecules promote central sensitization and nociception. Thus, the local peripheral anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of A-967079 could be due, in the first instance, to the

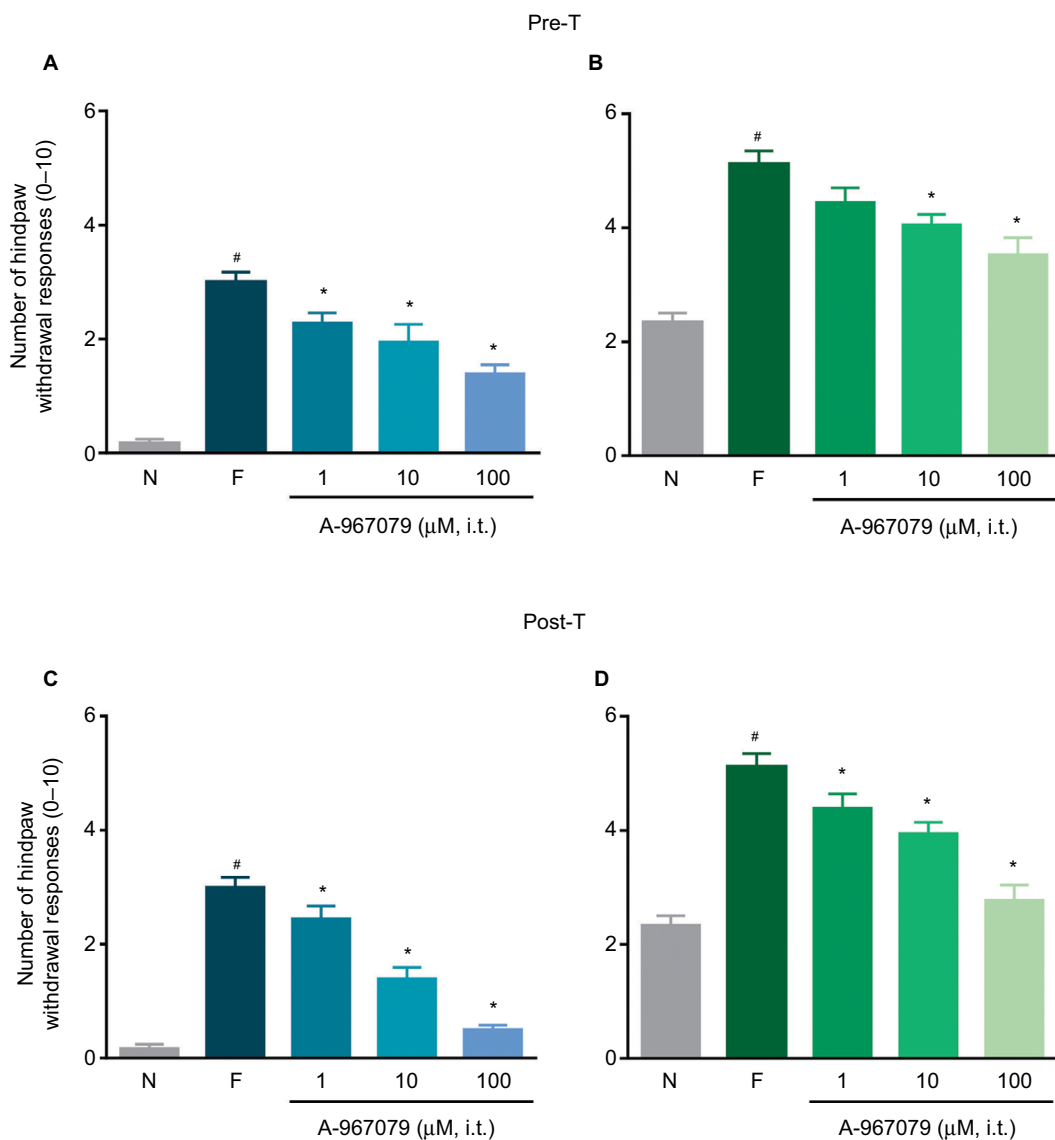


Figure 4 Antinociceptive effect of the intrathecal (i.t.) pretreatment (**A** and **B**) or posttreatment (**C** and **D**) with A-967079 (1–100 μM) on formalin-induced secondary mechanical allodynia (**A** and **C**) and hyperalgesia (**B** and **D**) in rats.

Notes: Data are expressed as the mean ($n=6 \pm \text{SEM}$) paw withdrawal responses to the application of von Frey filaments (10 and 250 mN) to the plantar surface of rat paws before (naïve, N) and after 1% formalin (F). In all cases $\#p < 0.05$ versus N group; $*p < 0.05$ versus F group, by one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. **Abbreviations:** pre-T, pretreatment; post-T, posttreatment; ANOVA, analysis of variance.

blockade of TRPA1 channels located on peripheral endings of primary afferent neurons. This will reduce the release of several pro-nociceptive substances, avoiding peripheral sensitization. On the other hand, A-967079 – given into the spinal cord – may reduce formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia by diminishing release of pro-nociceptive molecules as well as activation of microglia. In addition, i.t. A-967079 could reduce dorsal root reflexes or direct antidromic activation and cutaneous blood flow leading to a reduction in substance P and calcitonin gene-related peptide release in peripheral and central terminals of primary afferent neurons.^{24,25,47,48} Moreover, activation of

spinal TRPA1 channels leads to an increase of the excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons,^{49,50} which in turn reduces activation thresholds and enhances afferent activity.³⁹ Thus, i.t. A-967079 could block this excitatory synaptic transmission and some consequences of the descending pain facilitation.¹⁸ All of these actions would reduce the pre- and postsynaptic excitability of afferent and convergent pain-relay neurons.

Local peripheral or i.t. administration of A-967079 produced a partial reversal of secondary allodynia and hyperalgesia in the formalin model. This result may suggest that other mechanisms, besides activation of TRPA1 chan-

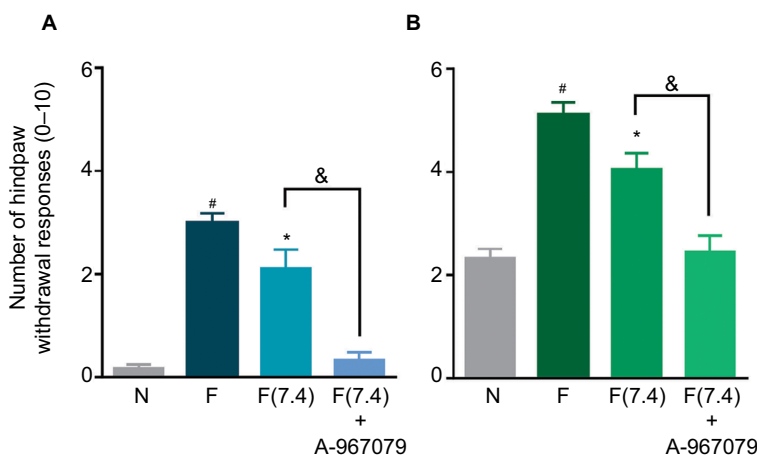


Figure 5 The antinociceptive effect of the local peripheral pretreatment with A-967079 (100 μ M) on 1% formalin (pH 7.4)-induced secondary mechanical allodynia (A) and hyperalgesia (B) in rats.

Notes: Data are expressed as the mean ($n=6 \pm$ SEM) paw withdrawal responses to the application of von Frey filaments (10 and 250 mN) to the plantar surface of rat paws before (naive, N) and after 1% formalin without control of pH [F] or 1% formalin at pH 7.4 [F(7.4)]. In all cases, $^{\#}p < 0.05$ versus N group; $^*p < 0.05$ versus F group; $^{\&}p < 0.05$ versus F(7.4) group, by one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test.

Abbreviation: ANOVA, analysis of variance.

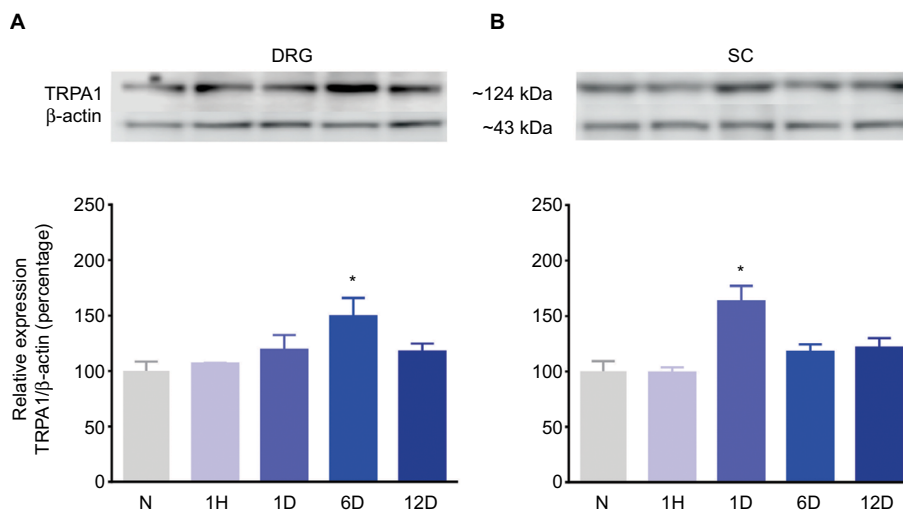


Figure 6 Effect of 1% formalin on the TRPA1 protein expression levels in the ipsilateral DRGs (A) and dorsal SC (L4–L6) (B) from rats.

Notes: Insets show representative blots obtained with TRPA1 and β -actin primary antibodies. The specific signal for TRPA1 was quantified and plotted as the percentage of expression against β -actin ($n=3 \pm$ SEM). $^*p < 0.05$ compared to the naive group, by one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test.

Abbreviations: N, naive; 1H, 1 hour; 1D, 1 day; 6D, 6 days; 12D, 12 days; ANOVA, analysis of variance; DRG, dorsal root ganglion; SC, spinal cord.

nels, are involved in the development and maintenance of secondary allodynia and hyperalgesia. Former studies have established that activation of acid-sensing ion channels (ASICs) and TRPV1 is a common feature in inflammatory pain in which pH is not controlled.^{51,52} Furthermore, we have demonstrated that hydrogen ions (H^+) indeed contribute to the development of secondary allodynia and hyperalgesia induced by formalin.⁵³ Thus, injection of formalin without pH control would stimulate several targets, including ASICs, TRPV1,⁵⁴ and TRPA1³⁵ channels. In order to discharge the participation of H^+ and activation of TRPV1 and ASICs, we designed an experiment controlling the pH of formalin to 7.4. We observed that 1% formalin at pH 7.4 produced

lower levels of secondary allodynia and hyperalgesia than 1% formalin (without pH control). This result agrees with a previous observation showing that 0.5% formalin at pH 7.4 induced lower nociceptive behaviors than either 0.5% formalin at pH 5.8 or non-pH-adjusted formalin.⁵³ In this condition (1% formalin at pH 7.4), local peripheral administration of A-967079 completely abolished development of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in rats. Thus, it seems that under controlled conditions of pH, the only target responsible of the nociceptive hypersensitivity is TRPA1 channel.

In line with the behavioral results, Western blot data revealed that formalin injection increases TRPA1 protein

expression in the ipsilateral DRG and dorsal region of the spinal cord. Thus, our data indicate that this channel is located in sites related to the peripheral and spinal processing of pain. Our data are the first to demonstrate that formalin enhances TRPA1 protein expression in the DRG and spinal cord. These results concord with those from other studies demonstrating that CFA, colitis, and nerve injury enhances TRPA1 protein and mRNA expression in the DRG of rats and mice.^{1,8,11,39,55–58}

Conclusion

Formalin produces long-lasting nociceptive hypersensitivity, which is sensitive to TRPA1 blockade. Data suggest that the peripheral and spinal TRPA1 channel located in the DRG and spinal cord is important for the development and maintenance of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. This channel could be a target to develop useful drugs to treat long-lasting nociceptive hypersensitivity.

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. dissertation of Vladimir A Martínez-Rojas. Vladimir A Martínez-Rojas (fellowship 261132) and Guadalupe García (fellowship 261810) are Conacyt fellows. Roxana Noriega-Navarro received a post-doctoral fellowship from Conacyt. Partially supported by UJAT (grant OP/PFCE-2016-27MSU0018V-07-01).

Author contributions

JM and VAM-R conceived, designed, and conducted the experiments. VAM-R, RN-N, CGG-P, and GG conducted the experiments. JM, JET-L, and VG-S supervised the experiments and analyzed data. All authors contributed toward data analysis, drafting, and critically revising the paper, gave final approval of the version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003;112(6):819–829.
2. Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci*. 2005;25(16):4052–4061.
3. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 2006;124(6):1269–1282.
4. Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M. TRPA1: a gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:181–200.
5. Atoyán R, Shander D, Botchkareva NV. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol*. 2009;129(9):2312–2315.
6. Albarrán L, Lopez JJ, Dionisio N, Smani T, Salido GM, Rosado JA. Transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) modulates store-operated Ca²⁺ entry by regulation of STIM1–Orai1 association. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3025–3034.
7. Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, et al. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3408–3413.
8. Obata K, Katsura H, Mizushima T, et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2393–2401.
9. Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol*. 2005;493(4):596–606.
10. Anand U, Otto WR, Facer P, et al. TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons. *Neurosci Lett*. 2008;438(2):221–227.
11. da Costa DS, Meotti FC, Andrade EL, Leal PC, Motta EM, Calixto JB. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*. 2010;148(3):431–437.
12. Kim YS, Son JY, Kim TH, et al. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol*. 2010;518(5):687–698.
13. Huang D, Li S, Dhaka A, Story GM, Cao YQ. Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Mol Pain*. 2012;8:66.
14. Horváth Á, Tékus V, Boros M, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res Ther*. 2016;18:6.
15. Petrus M, Peier AM, Bandell M, et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain*. 2007;3:40.
16. Eid SR, Crown ED, Moore EL, et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*. 2008;4:48.
17. McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, Didomenico S, Kort ME, Kym PR. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain*. 2010;6:14.
18. Wei H, Koivisto A, Saarnilehto M, et al. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel contributes to central pain hypersensitivity in various pathophysiological conditions in the rat. *Pain*. 2011;152(3):582–591.
19. Wei H, Karimaa M, Korjamo T, Koivisto A, Pertovaara A. Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel contributes to guarding pain and mechanical hypersensitivity in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*. 2012;117(1):137–148.
20. Vermeulen W, De Man JG, De Schepper HU, et al. Role of TRPV1 and TRPA1 in visceral hypersensitivity to colorectal distension during experimental colitis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1–3):404–412.
21. Bonet JJ, Fischer L, Parada CA, Tambeli CH. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology*. 2013;65:206–212.
22. Schwartz ES, La JH, Scheff NN, Davis BM, Albers KM, Gebhart GF. TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis. *J Neurosci*. 2013;33(13):5603–5611.
23. Asgar J, Zhang Y, Saloman JL, Wang S, Chung MK, Ro JY. The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats. *Neuroscience*. 2015;310:206–215.

24. Chen J, Joshi SK, DiDomenico S, et al. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain*. 2011;152(5):1165–1172.
25. Wei H, Saarnilehto M, Falck L, et al. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel induces mechanical hypersensitivity, increases cutaneous blood flow, and mediates the pronociceptive action of dynorphin A. *J Physiol Pharmacol*. 2013;64(3):331–340.
26. Zhang W, Liu Y, Zhao X, Gu X, Ma Z. The effect of intrathecal administration TRPA1 antagonists in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg*. 2014;119(1):179–185.
27. Miyakawa T, Terashima Y, Takebayashi T, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 in spinal cord dorsal horn is involved in neuropathic pain in nerve root constriction rats. *Mol Pain*. 2014;10:58.
28. Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain*. 2016 139(Pt 5):1361–1377.
29. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109–110.
30. Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;104(1):35–44.
31. Fu KY, Light AR, Maixner W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience*. 2000;101(4):1127–1135.
32. Ambriz-Tututi M, Rocha-González HI, Castañeda-Corral G, et al. Role of opioid receptors in the reduction of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009;619(1–3):25–32.
33. Leem JW, Willis WD, Weller SC, Chung JM. Differential activation and classification of cutaneous afferents in the rat. *J Neurophysiol*. 1993;70(6):2411–2424.
34. Martínez-Rojas VA, Barragán-Iglesias P, Rocha-González HI, Murbartian J, Granados-Soto V. Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. *Pharmacol Reports*. 2014;66(6):964–971.
35. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(33):13525–13530.
36. Ambriz-Tututi M, Cruz SL, Urquiza-Marín H, Granados-Soto V. Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011;98(3):417–424.
37. Fernandes ES, Russell FA, Spina D, et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(3):819–829.
38. Mueller-Tribbensee SM, Karna M, Khalil M, Neurath MF, Reeh PW, Engel MA. Differential contribution of TRPA1, TRPV4 and TRPM8 to colonic nociception in mice. *PLoS One*. 2015;10(7):e0128242.
39. Dunham JP, Kelly S, Donaldson LF. Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptors in the rat. *Eur J Neurosci*. 2008;27(12):3151–3160.
40. Granados-Soto V, Alonso-López R, Asomoza-Espinosa R, Rufino MO, Gomes-Lopes LD, Ferreira SH. Participation of COX, IL-1 beta and TNF alpha in formalin-induced inflammatory pain. *Proc West Pharmacol Soc*. 2001;44:15–17.
41. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*. 2001;102(4):937–944.
42. Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur J Pain*. 2009;13(5):441–447.
43. Malmberg AB, Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci*. 1995;15(4):2768–2776.
44. Wei H, Koivisto A, Pertovaara A. Spinal TRPA1 ion channels contribute to cutaneous neurogenic inflammation in the rat. *Neurosci Lett*. 2010;479(3):253–256.
45. Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain*. 1997;71(3):225–235.
46. Fu KY, Tan YH, Sung B, Mao J. Peripheral formalin injection induces unique spinal cord microglial phenotypic changes. *Neurosci Lett*. 2009;449(3):234–239.
47. Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D, Guo W. Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain. *J Neurosci*. 2010;30(25):8624–8636.
48. Weller K, Reeh PW, Sauer SK. TRPV1, TRPA1, and CB1 in the isolated vagus nerve – axonal chemosensitivity and control of neuropeptide release. *Neuropeptides*. 2011;45(6):391–400.
49. Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 2007;27(16):4443–4451.
50. Wrigley PJ, Jeong HJ, Vaughan CW. Primary afferents with TRPM8 and TRPA1 profiles target subpopulations of rat superficial dorsal horn neurons. *Br J Pharmacol*. 2009;157(3):371–380.
51. Steen KH, Steen AE, Kreysel HW, Reeh PW. Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. *Pain*. 1996;66(2–3):163–170.
52. Rocha-González HI, Herrejon-Abreu EB, López-Santillán FJ, García-López BE, Murbartian J, Granados-Soto V. Acid increases inflammatory pain in rats: effect of local peripheral ASICs inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 2009;603(1–3):56–61.
53. Castañeda-Corral G, Rocha-González HI, Araiza-Saldaña CI, et al. Blockade of peripheral and spinal Na⁺/H⁺ exchanger increases formalin-induced long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia in rats. *Brain Res*. 2012;1475:19–30.
54. Leffler A, Mönter B, Koltzenburg M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience*. 2006;139(2):699–709.
55. Frederick J, Buck ME, Matson DJ, Cortright DN. Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(4):1058–1064.
56. Caspani O, Zurborg S, Labuz D, Heppenstall PA. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One*. 2009;4(10):e7383.
57. Ji G, Zhou S, Carlton SM. Intact A delta-fibers up-regulate transient receptor potential A1 and contribute to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience*. 2008;154(3):1054–1066.
58. Yang J, Li Y, Zuo X, Zhen Y, Yu Y, Gao L. Transient receptor potential ankyrin-1 participates in visceral hyperalgesia following experimental colitis. *Neurosci Lett*. 2008;440(3):237–241.

Journal of Pain Research

Publish your work in this journal

The Journal of Pain Research is an international, peer reviewed, open access, online journal that welcomes laboratory and clinical findings in the fields of pain research and the prevention and management of pain. Original research, reviews, symposium reports, hypothesis formation and commentaries are all considered for publication.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/journal-of-pain-research-journal>

Dovepress

The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.