



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

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**MODULACIÓN DEL CANAL TREK-1 POR LA PKA Y LA PKC EN EL DOLOR  
NEUROPÁTICO**

Tesis que presenta

**Biol. Karina Angélica Méndez Reséndiz**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en**

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directora de tesis: **Dra. Janet Murbartían Aguilar**

La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio No. 4 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav, Sede Sur), bajo la dirección de la Doctora Janet Murbartián Aguilar.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de Maestría No. 614053 otorgada por el Conacyt.

## ÍNDICE

I. LISTA DE ABREVIATURAS .....	I
II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	IV
1. RESUMEN .....	VI
2. ABSTRACT .....	VII
INTRODUCCIÓN .....	1
3.1. Dolor .....	1
3.2. Fisiología del dolor .....	2
3.3. Dolor neuropático .....	6
3.3.1. Sensibilización periférica .....	6
3.3.2. Sensibilización central .....	9
3.3.3. Actividad ectópica .....	14
3.4. Canales de potasio .....	15
3.5. Canales de potasio K2P .....	17
3.6. Canal TREK-1 .....	19
3.7. Fosforilación inducida por la PKA y la PKC en la nocicepción .....	21
3.8. Regulación del canal TREK-1 por fosforilación .....	24
4. JUSTIFICACIÓN .....	25
5. HIPÓTESIS .....	26
6. OBJETIVO .....	28
7. OBJETIVOS PARTICULARES .....	28
8. METODOLOGIA .....	29
8.1. Animales .....	29

8.2.	Ligadura de los nervios espinales .....	29
8.3.	Fármacos .....	29
8.4.	Evaluación de la conducta nociceptiva.....	30
8.5.	Inmunodetección de los canales TREK-1 por <i>Western blot</i> .....	31
8.6.	Extracción y cuantificación de proteínas totales .....	31
8.7.	<i>Western Blot</i> .....	31
8.8.	Diseño experimental.....	32
8.9.	Análisis estadístico .....	33
9.	RESULTADOS.....	34
9.1.	Curso temporal de la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales en ratas.....	34
9.2.	Efecto antialodínico de BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales .....	35
9.3.	Efecto de la espadina en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales .....	36
9.4.	Efecto del bloqueo de TREK-1 en ratas <i>naïve</i> .....	38
9.5.	Efecto de la activación de la PKA en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.....	39
9.6.	Efecto de la inhibición de la PKA en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.....	40
9.7.	Efecto de la activación de la PKC en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.....	41
9.8.	Efecto de la inhibición de la PKC en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.....	42
9.9.	Efecto de la ligadura de los nervios espinales en la expresión de TREK-1 .....	43

<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	44
<b>10.1. Modelo de neuropatía de Kim y Chung</b> .....	44
<b>10.2. Efecto del BL-1249 en ratas con dolor neuropático</b> .....	45
<b>10.3. Efecto de la forskolina y el forbol 12, 13-dibutirato sobre el BL-1249 en ratas con dolor neuropático</b> .....	46
<b>10.4. Efecto de Rp-cAMP y Gö-6983 sobre el BL-1249 en ratas con dolor neuropático</b> .....	48
<b>10.5. La ligadura de los nervios espinales aumenta la expresión del canal TREK-1 en neuronas del GRD</b> .....	49
<b>11. CONCLUSIONES</b> .....	52
<b>12. CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	52
<b>13. PERSPECTIVAS</b> .....	53
<b>14. REFERENCIAS</b> .....	54

## I. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>AKAP150</b>	Proteínas de anclaje de la cinasa A
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ASICs</b>	Canales iónicos sensibles a ácido
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	Canales de potasio activados por calcio
<b>CaMKII</b>	Subunidad catalítica
<b>CA</b>	Proteína cinasa II dependiente de calmodulina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>Ca<sub>v</sub></b>	Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro
<b>CSF1</b>	Factor 1 estimulante de colonias
<b>CSF1R</b>	Receptor del factor 1 estimulante de colonias
<b>Cx3cr1</b>	Receptor 1 de quimiocinas CX <sub>3</sub> C
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAP12</b>	Proteína adaptadora de membrana microglial
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ERK</b>	Proteína cinasa activada por señal extracelular
<b>FSK</b>	Forskolina
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glía
<b>GDP</b>	Guanosína difosfato
<b>gp130</b>	glicoproteína 130
<b>GRD</b>	Ganglio de la raíz dorsal

<b>GTP</b>	Guanosína trifosfato
<b>IASP</b>	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
<b>IL1R1</b>	Receptor tipo 1 de interleucina 1
<b>IL17A</b>	Interleucina 17A
<b>IL- 1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL- 5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IRF8</b>	Factor regulador de interferón 8
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>JNK</b>	Cinasas c-Jun N-terminal
<b>K2P</b>	Canales de potasio con dos segmentos de poro
<b>Kir</b>	Canales de potasio rectificadores entrantes
<b>K<sub>v</sub></b>	Canales de potasio dependientes de voltaje
<b>LNE</b>	Ligadura de los nervios espinales
<b>LTB4</b>	Leucotrieno B4
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesio
<b>mGluR1</b>	Receptor metabotrópico de glutamato 1
<b>mGluR5</b>	Receptor metabotrópico de glutamato 5
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Na<sub>v</sub></b>	Canales de sodio dependientes de voltaje
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neural
<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>	Factor nuclear- $\kappa\beta$
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NOS</b>	Sintasa de óxido nítrico
<b>PDBu</b>	Forbol 12,13-dibutirato
<b>PDD</b>	Forbol-12,13-didecanoate
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinasa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4-5 bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A

<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato 13-acetato
<b>R</b>	Subunidad reguladora
<b>Rp-cAMP</b>	Rp-adenosina 3',5' monofosforotioato cíclico
<b>RTK</b>	Receptor de tirosina cinasa
<b>SNK</b>	Student Newman Keuls
<b>STT</b>	Tracto espinotalámico
<b>TM</b>	Transmembranal
<b>TNFR2</b>	Receptor 2 del factor de necrosis tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>Tlr2</b>	Receptor tipo Toll 2
<b>TREM2</b>	Receptor de células mieloides 2
<b>TrkA</b>	Receptor de tropomiosina cinasa A
<b>TrkB</b>	Receptor tirosina cinasa B del factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>TRP</b>	Receptores de potencial transitorio
<b>TRPA1</b>	Receptor de potencial transitorio subtipo anquirina 1
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitorio subtipo vaniloide 1
<b>UA</b>	Unidades de área
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Micromolar
<b><math>^{\circ}\text{C}</math></b>	Grados Celsius
<b>5-HT4R</b>	Receptor 5-hidroxitriptamina 4

## II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### FIGURAS

- Figura 1** Estructura del sistema nociceptivo.
- Figura 2** Sensibilización periférica.
- Figura 3** Sensibilización central.
- Figura 4** Mecanismos periféricos y centrales que contribuyen al dolor neuropático.
- Figura 5** Expresión y función de los canales de  $K^+$  en las neuronas sensoriales.
- Figura 6** Organización estructural de los canales  $K2P$ .
- Figura 7** Diseño experimental de la evaluación conductual del canal TREK-1 en ratas neuropáticas.
- Figura 8** La ligadura de los nervios espinales L5 y L6 produce alodinia mecánica.
- Figura 9** Efecto antialodínico de la activación del canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.
- Figura 10** Efecto del bloqueo del canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.
- Figura 11** Efecto del bloqueo del canal TREK-1 sobre el BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.
- Figura 12** Efecto del bloqueo de TREK-1 en ratas naïve.
- Figura 13** Efecto de la activación de la PKA sobre el canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.
- Figura 14** Efecto de la inhibición de la PKA sobre el canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.
- Figura 15** Efecto de la activación de la PKC sobre el canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.
- Figura 16** Efecto de la inhibición de la PKC sobre el canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.

**Figura 17** Curso temporal de expresión de TREK-1 en los GRD de L5 y L4 después de la ligadura de los nervios espinales L5/L6.

### **TABLAS**

**Tabla 1** Efecto de la administración de inhibidores y activadores de la PKC en el dolor.

**Tabla 2** Efecto de la administración de inhibidores y activadores de la PKA en el dolor.

**Tabla 3**  $CI_{50}$  y  $CE_{50}$  de los fármacos.

## 1. RESUMEN

La desregulación de canales iónicos en respuesta a lesiones en el sistema nervioso somatosensorial resulta en un aumento de la excitabilidad neuronal que subyace al desarrollo del dolor neuropático. Los canales TREK-1 son miembros de la familia de canales de K<sup>+</sup> con dos segmentos de poro que contribuyen a las corrientes de fuga que mantienen el potencial de membrana en reposo en los nociceptores. El canal TREK-1 se modula por una amplia variedad de estímulos físicos y químicos (estimulación mecánica, acidificación intracelular, ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos). La activación de receptores acoplados a proteínas G inhibe la actividad del canal TREK-1, a través de la fosforilación en la región C-terminal del canal por las proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC). En el presente trabajo se determinó la participación del canal TREK-1 en la alodinia mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6. Asimismo, se evaluó el papel de la PKA y PKC sobre el efecto antialodínico del canal TREK-1 en ratas neuropáticas. La ligadura de los nervios espinales L5 y L6 produjo alodinia táctil a partir del día 3 y hasta 21 días posteriores a la lesión. La inyección intratecal de BL-1249 (1-100 µM), activador del canal TREK-1, pero no el vehículo, disminuyó de manera dosis dependiente la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales. De manera opuesta, la inyección intratecal de espadina (1-10 µM), bloqueador del canal TREK-1, produjo alodinia táctil en ratas intactas, además previno el efecto antialodínico inducido por BL-1249 (100 µM) en ratas neuropáticas. Por otra parte, la administración de los activadores de la PKA y PKC, forskolina y forbol 12,13-dibutirato (0.1 y 1 mM), disminuyó el efecto antialodínico de BL-1249 (100 µM). En contraste, la administración de inhibidores de la PKA y PKC, Rp-cAMP y Gö-6983 (1 mM), aumentó ligeramente el efecto antialodínico de BL-1249 (1 µM). Finalmente, la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 aumentó la expresión del canal TREK-1 en el GRD lesionado (L5) y no lesionado (L4) los días 7 y 14 después de la lesión. Los datos obtenidos sugieren que el canal TREK-1 juega un papel antinociceptivo en ratas con dolor neuropático. Además, se demostró que la PKA y PKC regulan el efecto antialodínico de los canales TREK-1 en condiciones de dolor neuropático.

## 2. ABSTRACT

Dysregulated ion channel function in response to nerve injury results in enhanced neuronal excitability that underlies neuropathic pain. TWIK-related 1 potassium channel (TREK-1) is member of the two-pore domain potassium channel family that contributes to background conductances in nociceptors. TREK-1 channel is modulated by a variety of different physical and chemical stimuli (mechanical, intracellular acidification, poly-unsaturated fatty acids and phospholipids). TREK-1 activity is inhibited in the C-terminal region of the channel by phosphorylation induced by G-protein coupled receptors activation through protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) activity. The aim of the present investigation was to determine the participation of TREK-1 in the mechanical hypersensitivity induced by a neuropathic pain model in rats. We also assessed the role of PKA and PKC on the TREK-1 antiallodynic effect in neuropathic rats. The L5 and L6 spinal nerve ligation induced tactile allodynia from 3 to 21 days after injury. Intrathecal injection of the TREK-1 activator BL-1249 (1-100  $\mu$ M), but not vehicle, reduced in a dose-dependent manner established tactile allodynia. Contrarywise, intrathecal injection of the TREK-1 blocker spadin (1-10  $\mu$ M) produced tactile allodynia in a dose-dependent manner in naïve rats and prevented the antiallodynic effect induced by BL-1249 (100  $\mu$ M) in neuropathic rats. Furthermore, the intrathecal injection of PKA and PKC activators, forskolin and phorbol 12,13- dibutyrate (0.1 and 1 mM), decreased the antiallodynic effect of BL-1249 (100  $\mu$ M). By contrast, administration of PKA and PKC inhibitors, Rp-cAMP (1 mM), and Gö-6983 (1 mM), slightly increased the antiallodynic effect of BL-1249 (1  $\mu$ M). Spinal nerve ligation enhanced TREK-1 expression in injured (L5) and uninjured (L4) dorsal root ganglia at 7 and 14 days post-injury. The data obtained suggest that TREK-1 channels play an antinociceptive role in neuropathic pain. Also, we demonstrated that in neuropathic conditions PKA and PKC regulate the antiallodynic effect of TREK-1 channels.

## INTRODUCCIÓN

### 3.1. Dolor

El dolor cumple funciones relevantes para la protección del organismo, ya que evita la interacción con estímulos nocivos que ponen en peligro su integridad. Sin embargo, cuando existe un funcionamiento anormal en las estructuras que regulan este mecanismo, el dolor sobrepasa su función y se vuelve patológico. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) lo define como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial que puede ser descrito en términos de la magnitud del daño (Jensen et al., 2011). Actualmente la clasificación del dolor más aceptada es la propuesta por Woolf, la cual se basa en los mecanismos fisiológicos que lo originan para clasificarlo en 4 tipos (Woolf, 2004):

- 1- Dolor nociceptivo: Dolor transitorio que responde a estímulos nocivos. Se considera un sistema de alerta ante estímulos potencialmente dañinos.
- 2- Dolor inflamatorio: Dolor agudo que se presenta de manera espontánea y responde a un daño tisular. Se acompaña de hipersensibilidad y se produce por la estimulación de nociceptores presentes en el tejido lesionado.
- 3- Dolor neuropático: Dolor crónico espontáneo acompañado de hipersensibilidad que se genera por lesiones en el sistema nervioso, tanto a nivel periférico como a nivel central.
- 4- Dolor funcional: Dolor no adaptativo ya que carece de un motivo de respuesta específico, se origina como consecuencia de un procesamiento central alterado (Woolf, 2004).

### 3.2. Fisiología del dolor

La integración de la información nociceptiva conforma una serie de eventos fisiológicos que colectivamente se denominan nocicepción. La nocicepción comprende los procesos de transducción, conducción, transmisión y percepción. La transducción es el proceso por el cual un estímulo térmico, mecánico o químico se convierte en un impulso eléctrico por canales iónicos expresados en las fibras aferentes primarias. Por su parte, la conducción es la propagación de los potenciales de acción desde las terminales periféricas hacia el ganglio de la raíz dorsal (GRD) donde el estímulo se transmite a las neuronas de proyección dentro del asta dorsal de la médula espinal. Un subconjunto de estas neuronas de proyección transfieren la información a la corteza somatosensorial a través del tálamo, proporcionando información sobre la ubicación y la intensidad del estímulo doloroso. Finalmente la percepción es el proceso por el cual se integran los estímulos nociceptivos con factores cognoscitivos y emocionales para crear la experiencia subjetiva de dolor (Scholz y Woolf, 2002).

La transducción y la transmisión de la información nociceptiva permiten detectar estímulos térmicos, mecánicos o químicos de alta intensidad por una subpoblación de fibras nerviosas periféricas llamadas nociceptores o fibras aferentes primarias. Estas fibras tienen una estructura pseudomonopolar que se bifurca por axones periféricos hacia la piel y axones centrales hacia la médula espinal (Steeds, 2016). Los cuerpos celulares de los nociceptores se localizan en el GRD y se clasifican de acuerdo con su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción en:

- Fibras A $\beta$ . Son fibras densamente mielinizadas de más de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y una velocidad de conducción mayor a los 30 m/s. Estas fibras, también llamadas mecanoreceptores, se encargan de codificar la información mecánica inocua de bajo umbral (Millan, 1999).
- Fibras A $\delta$ . Son fibras medianas poco mielinizadas de 2-6  $\mu\text{m}$  de diámetro y presentan una velocidad de conducción relativamente rápida, entre 5 a 30 m/s. Las fibras A $\delta$  se han dividido en tipo I y II. Las fibras A $\delta$  de tipo I

responden a estímulos térmicos de alto umbral (temperaturas mayores de 50 °C o por debajo de los 8 °C) y a estímulos mecánicos. Las fibras A $\delta$  de tipo II responden a estímulos térmicos (entre 40 a 45 °C) y mecánicos de alto umbral (Giordano, 2005; Basbaum et al., 2009).

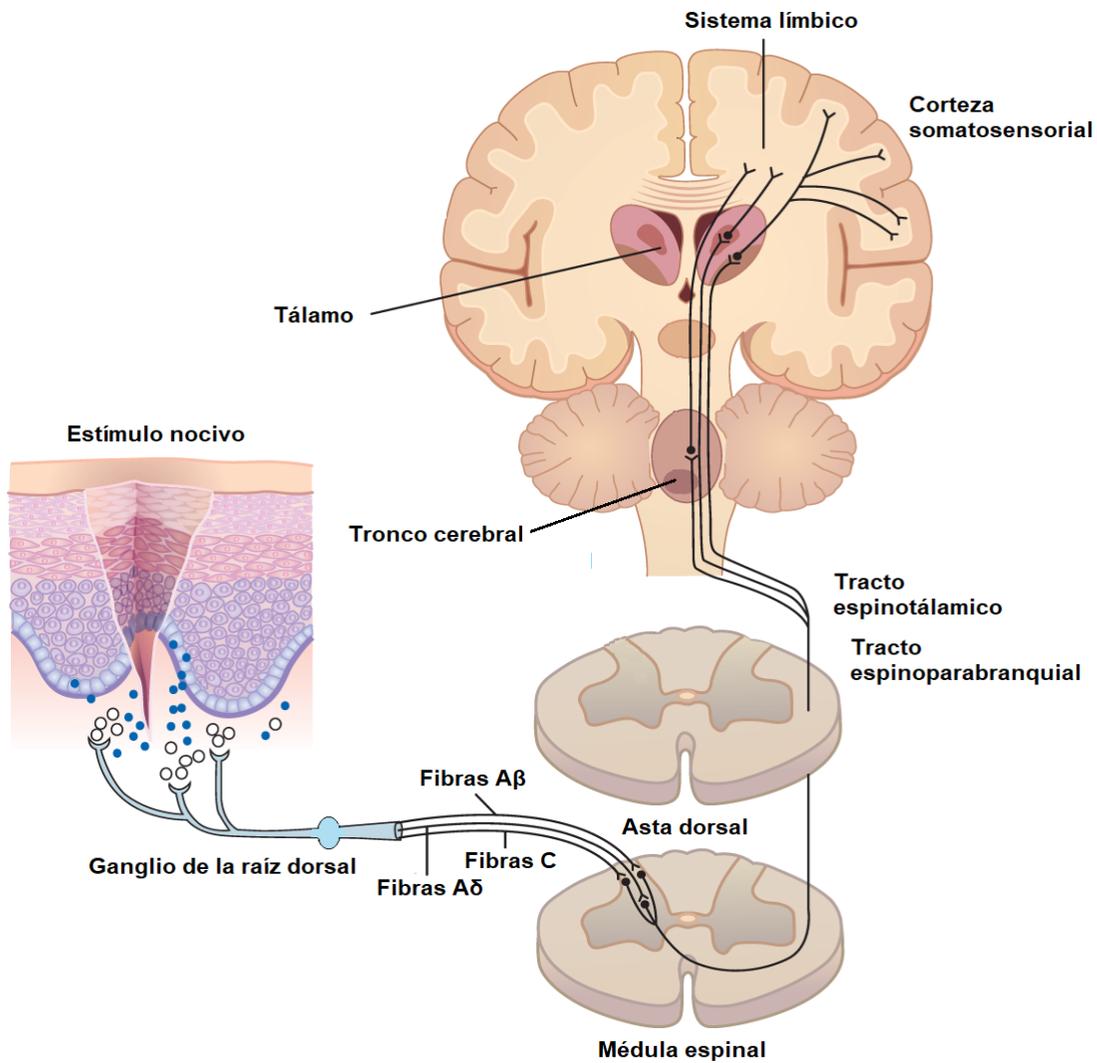
- Fibras C. Constituyen la mayoría de la inervación nociceptiva y son fibras no mielinizadas polimodales; es decir, se activan por estímulos mecánicos, térmicos y/o químicos. Las fibras C tienen una velocidad de conducción entre 0.5 y 2 m/s y un diámetro de 0.4 a 1.2  $\mu$ m (Millan, 1999; Giordano, 2005).

Las fibras C suelen clasificarse anatómicamente en dos grupos 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. Las fibras C peptidérgicas contienen sustancia P y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP). Además, expresan el receptor tirosina cinasa A (RTK), responden al factor de crecimiento neural (NGF) e inervan la lámina I y la lámina II externa del asta dorsal de la médula espinal. Por su parte, las fibras C no peptidérgicas expresan sitios de unión a isolectina B4 y a receptores purinérgicos P2X3. Además, responden al factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y terminan principalmente en la lámina II interna del asta dorsal de la médula espinal (Snider y McMahon, 1998; Sawynok y Liu, 2003).

El asta dorsal de la médula espinal es la zona que recibe la mayor inervación por parte de las fibras aferentes primarias. De acuerdo con el tamaño y empaquetamiento de la densidad neuronal se ha descrito la organización anatómica de ésta en; lámina I (capa marginal), II (sustancia gelatinosa), III y IV (núcleos propios), así como las V y VI (capas profundas). Las láminas más superficiales (I y II), junto con las profundas (V y VI) constituyen las regiones principalmente implicadas en la recepción, procesamiento y transmisión de la información nociceptiva (Todd, 2010). El asta dorsal de la médula espinal es también el sitio donde las fibras aferentes primarias hacen sinapsis con neuronas de segundo orden y ocurre la primera sinapsis en la vía ascendente que transmite la información sensorial para la percepción del dolor (Patestas y Gartner, 2009).

La información nociceptiva se transmite de las láminas superficiales de la médula espinal al cerebro mediante neuronas de proyección cuyos cuerpos celulares están ubicados en la lámina I de la médula espinal. Los axones de las neuronas de proyección cruzan la línea media hacia el lado contralateral y se unen al tracto espinotalámico (STT) que se proyecta al tálamo y al tracto espinoparabranchial que se proyecta al tronco cerebral (Basbaum et al., 2009; Ikoma et al., 2011; Cameron et al., 2015).

El tálamo es convencionalmente una estación de relevo para la información nociceptiva. Los axones que viajan en los tractos espinotalámico lateral y medial terminan en sus respectivos núcleos medial y lateral, y desde aquí las neuronas proyectan a la corteza somatosensorial primaria y secundaria, las áreas involucradas en el procesamiento emocional y de recompensa (corteza cingulada anterior y prefrontal, amígdala y sistemas límbicos) así como áreas involucradas en la conciencia (corteza insular) para finalmente percibir el estímulo nocivo como dolor (Steeds, 2016) (Fig. 1).



**Figura 1.** Estructura del sistema nociceptivo. Los nociceptores responden a estímulos térmicos, mecánicos o químicos, mediante la activación de receptores expresados en la terminal periférica de las fibras C y A $\delta$ , las cuales transducen la señal en potenciales de acción que se propagan hacia 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 Treede, 2003.

### **3.3. Dolor neuropático**

Según la IASP el dolor neuropático es el dolor causado por una lesión o enfermedad que afecta el sistema nervioso somatosensorial (Jensen et al., 2011; Finnerup et al., 2016). El dolor neuropático es una condición discapacitante que afecta del 7 al 8% de la población mundial (Smith y Torrance, 2012; Van Hecke et al., 2014). Enfermedades tales como la esclerosis múltiple, mielitis transversal, diabetes, infecciones, compresión o lesión del nervio, lesión de la médula espinal, canalopatías y enfermedades autoinmunes son algunas de las causas implicadas en el desarrollo del dolor neuropático (Finnerup et al., 2007).

Las neuropatías crónicas alteran las propiedades eléctricas de los nervios sensoriales, lo que conduce a desequilibrios entre la señalización excitatoria e inhibitoria central, ocasionando síntomas clínicos tales como sensaciones eléctricas, dolor punzante y quemante, hiperalgesia (dolor exagerado ante un estímulo nocivo) y alodinia (respuesta dolorosa ante un estímulo inocuo) (Sandkühler y Lee, 2013; Colloca et al., 2017).

#### **3.3.1. Sensibilización periférica**

La sensibilización periférica es resultado de un proceso inflamatorio que modifica el entorno químico del nervio lesionado (Cook et al., 2018). En respuesta al daño al tejido se liberan un conjunto de moléculas de señalización conocidas como "sopa inflamatoria". La sopa inflamatoria representa una amplia gama de mediadores que incluyen: serotonina, histamina, glutamato, ATP, adenosina, bradicinina, eicosanoides, CGRP, lípidos (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocannabinoides), neurotrofinas, citocinas y quimiocinas, así como proteasas y protones extracelulares. Estos factores pueden ser producidos y liberados, ya sea por el propio nociceptor o por células residentes al tejido lesionado como células cebadas, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos que residen o se infiltran en el área lesionada (Basbaum et al., 2009).

Estos mediadores inflamatorios pueden activar directamente a los nociceptores disminuyendo el umbral de activación del potencial de acción, favoreciendo la excitabilidad neuronal y generando el proceso de sensibilización (Ji et al., 2003). La sensibilización facilita la activación de las terminales centrales de los nociceptores produciendo una acción refleja del axón que provoca la liberación de CGRP y sustancia P de terminaciones libres adyacentes del mismo axón. Este proceso favorece la despolarización de las terminales nerviosas y la secreción de mediadores inflamatorios por nociceptores y células inmunes, lo cual favorece la expansión de las áreas de inflamación neurogénica prolongado de forma continua la sensibilización (Iyengar et al., 2017).

Adicionalmente, los mediadores inflamatorios y neuropéptidos liberados se unen a uno o más receptores de la superficie celular, incluidos los receptores acoplados a proteína G (GPCR), los canales de potencial transitorio (TRP), los canales iónicos sensibles a ácido (ASIC), los canales de potasio con dos segmentos de poro (K2P) y el receptor RTK. Este proceso promueve la activación de segundos mensajeros y cascadas de señalización que conducen al incremento de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular y la fosforilación de receptores y canales iónicos a través de la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la proteína cinasa activada por señal extracelular (ERK), la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa A (PKA), cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y p38 MAPK. Además, la activación de factores de transcripción modifica la expresión de canales iónicos y proteínas de membrana aumentando la excitabilidad celular y contribuyendo al proceso que amplifica la respuesta inflamatoria (Basbaum et al., 2009).

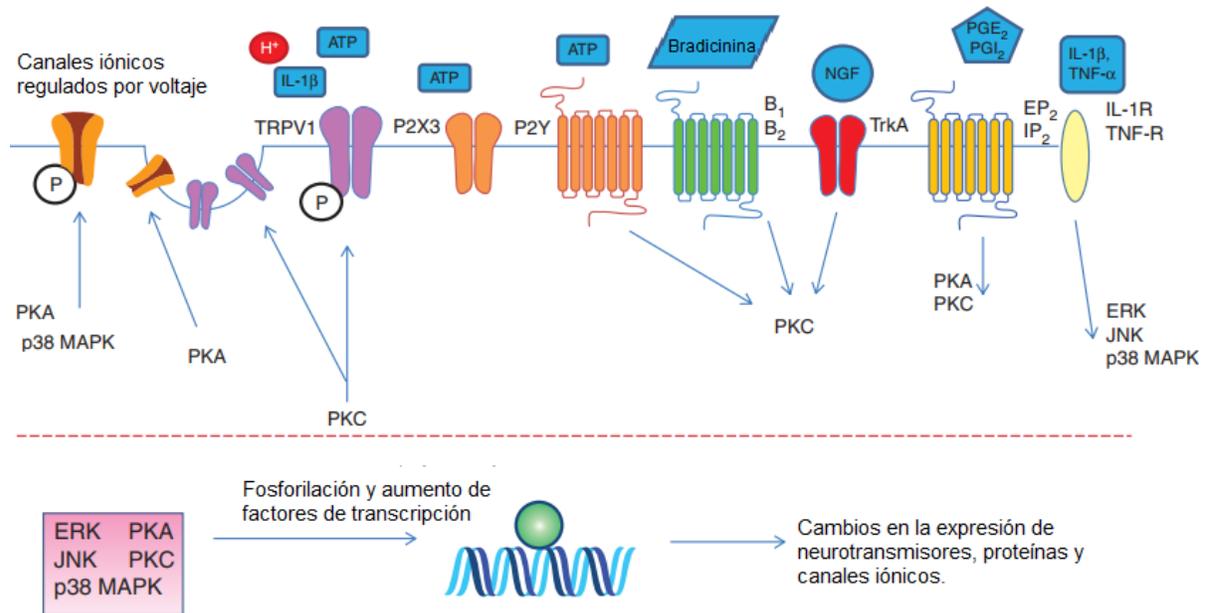
Como se mencionó anteriormente las citocinas inflamatorias son mediadores clave durante la sensibilización periférica. En particular, se ha demostrado que la IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , interleucina-17A (IL-17A) e IL-5 regulan de forma directa la actividad de los nociceptores (Pinho-Ribeiro et al., 2017). La IL-1 $\beta$  facilita la generación de potenciales de acción en los nociceptores mediante la activación de la p38 MAPK, lo cual promueve la fosforilación de los canales de sodio Nav1.8 (Binshtok et al., 2009). La IL-1 $\beta$  también regula la expresión del receptor de potencial transitorio del

subtipo vanilode 1 (TRPV1) al interactuar con el receptor tipo 1 de interleucina 1 (IL-1R1) aumentando así la sensibilidad al dolor ante estímulos térmicos (Fang et al., 2015). La IL-6 induce la producción de prostaglandinas al unirse a la glicoproteína 130 (gp130), un receptor de transducción de señales para citocinas expresado en los nociceptores, el cual aumenta la expresión de los canales de potencial transitorio del subtipo anquirina 1 (TRPA1) y los canales TRPV1 (Malsch et al., 2014); La sensibilización neuronal inducida por el TNF- $\alpha$  está relacionada con la fosforilación de los canales de sodio Nav1.8 y Nav1.9 a través de la señalización de la p38 MAPK. Adicionalmente, el TNF- $\alpha$  también aumenta la expresión del canal TRPV1 en los nociceptores al interactuar con el receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2) (Constantin et al., 2008). La IL-1 $\beta$ , la IL-6 y el TNF- $\alpha$  activan diferentes mecanismos de señalización para inducir la síntesis de prostaglandinas o para potenciar la activación de los receptores TRP y los canales Nav, lo cual conduce a la sensibilización rápida de los nociceptores (Pinho-Ribeiro et al., 2017).

Otro neuromodulador importante en el proceso de sensibilización periférica es el NGF el cual es producido por células inmunes innatas durante el proceso de inflamación. El NGF en los nociceptores activa al receptor de tropomiosina cinasa A (TrkA) desencadenando la señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y Src. La activación de estas cinasas conduce a la fosforilación del canal TRPV1 que a su vez se inserta rápidamente en la membrana, promoviendo la sensibilización de los nociceptores (Zhang et al., 2005; Eskander et al., 2015). Además de favorecer la translocación del canal TRPV1 a la membrana, el NGF induce la activación de la p38 MAPK aumentando la expresión del canal TRPV1 de manera independiente a la transcripción (Ji et al., 2002).

Los lípidos también son factores clave en la señalización al dolor. El ácido lisofosfatídico y la esfingosina-1-fosfato, por ejemplo, actúan directamente sobre los nociceptores para aumentar la actividad del canal TRPV1 (Nieto-Posadas et al., 2012; Langeslag et al., 2014). El leucotrieno B4 (LTB4) induce la activación de fibras C y fibras A $\delta$ . Un subconjunto de fibras positivas para el canal TRPV1 expresan al receptor para leucotrieno B4, que media el flujo de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a la activación

del ligando (Andoh y Kuraishi, 2005). Estas interacciones mejoran la excitabilidad neuronal, aumentando así la sensibilidad a la temperatura o al tacto (Basbaum et al., 2009).



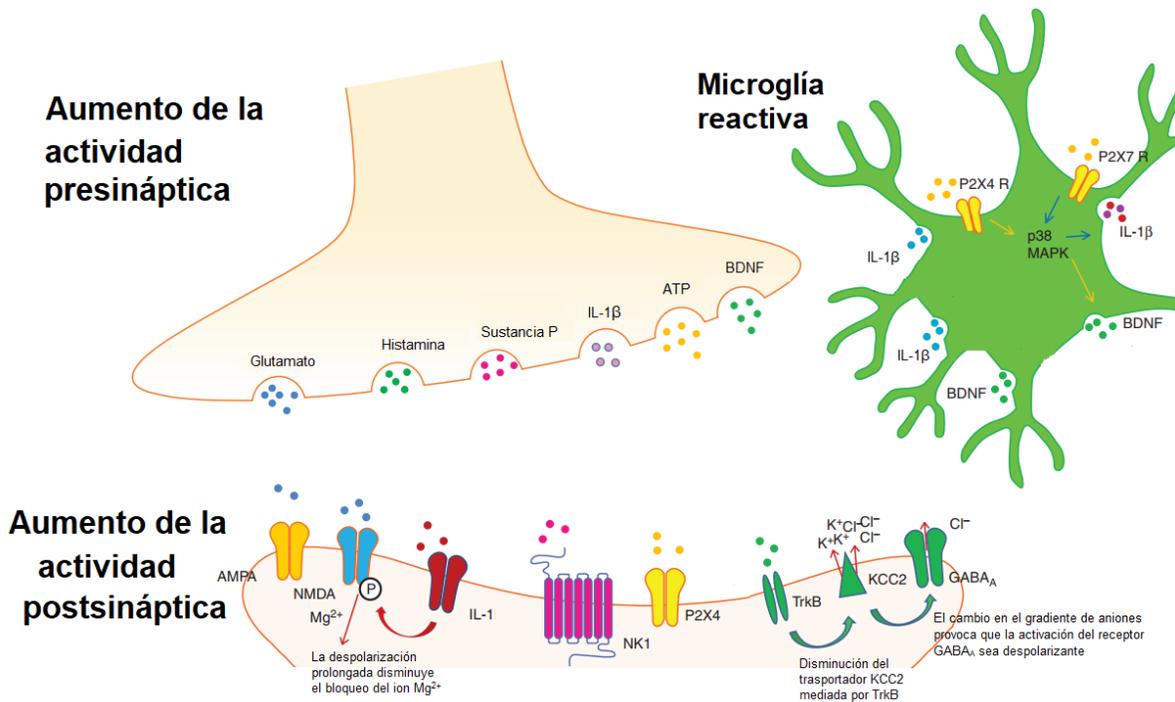
**Figura 2.** Representación esquemática de los mecanismos de sensibilización periférica. Las lesiones en los nervios periféricos inducen la liberación de mediadores inflamatorios por parte de células adyacentes al tejido lesionado como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , bradicinina, sustancia P, CGRP, NGF y prostaglandinas. Los mediadores inflamatorios sensibilizan a las neuronas sensoriales a través de la acción de segundos mensajeros (por ejemplo, PKA, PKC, ERK, JNK y p38 MAPK). La activación de segundos mensajeros conduce a la fosforilación y activación de factores de transcripción que conducen a cambios en la expresión de neurotransmisores, receptores y canales iónicos. Modificado de Ellis y Bennett, 2013.

### 3.3.2. Sensibilización central

La sensibilización central es resultado de la facilitación y amplificación de la respuesta sináptica entre las terminales postsinápticas de las fibras aferentes primarias y las neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Latremoliere y Woolf, 2009). Este proceso conlleva a cambios en el sistema nervioso central que promueven la transmisión anormal de la información nociceptiva e incluso contribuyen a los procesos a largo plazo que producen el mantenimiento del dolor (Costigan et al., 2009).

Los mecanismos que participan en el establecimiento de la sensibilización central implican la alteración de la transmisión glutamatérgica y la activación continua de los receptores amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), N-metil-D-apartato (NMDA) y los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), así como la liberación de BDNF, sustancia P, CGRP y óxido nítrico (Costigan y Woolf 2000). La activación del receptor AMPA permite la entrada de iones  $\text{Na}^+$  en la neurona postsináptica y su despolarización. Esta despolarización parcial remueve el ion de magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) del canal NMDA (Mayer et al., 1984). La eliminación de este bloqueo dependiente del voltaje es un mecanismo importante para aumentar rápidamente la eficacia sináptica y permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa una gran cantidad de vías de señalización dependientes de segundos mensajeros incluidos la vía de las MAPK, PKC, PKA, PI3K y Src. Estas vías de señalización facilitan la transmisión de la información nociceptiva al favorecer la expresión y fosforilación de receptores postsinápticos incluidos los receptores NMDA (Ashmawi y Freire., 2016). Adicionalmente, la liberación de neuromoduladores como sustancia P y BDNF promueven la activación de vías de señalización intracelular al unirse a sus receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, los cuales, aumentan las concentraciones de  $\text{Ca}^+$  y desencadenan la activación de PKA, PKC y la proteína cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII). Estas cinasas, así como la cinasa Src, fosforilan a los receptores NMDA y AMPA, lo que contribuye a la sensibilización central (Miyabe y Miletic, 2005). La participación de estos mediadores conlleva a la activación de mecanismos postraduccionales y transcripcionales que producen alteraciones a largo plazo (Ji et al., 2003). Adicionalmente, el aumento de BDNF promueve una disminución en la expresión del cotransportador KCC2, lo cual provoca un aumento en los niveles intracelulares de  $\text{Cl}^-$  (Rivera et al., 2002). El aumento en el gradiente de aniones intracelulares por la activación del receptor  $\text{GABA}_A$  convierte la inhibición GABAérgica de estas células en excitación y potencia la actividad glutamatérgica a través de los receptores NMDA (Coull et al., 2003). Este cambio en el gradiente intracelular favorece el aumento de la excitabilidad sináptica y conduce a la

activación de potenciales de acción en las neuronas de la lámina I del asta dorsal de la médula espinal (Ferrini et al., 2016) (Fig.3).



**Figura 3.** Representación esquemática de los mecanismos de sensibilización central. El aumento de la actividad presináptica promueve la despolarización postsináptica prolongada a través de la acción glutamatérgica de los receptores NMDA. Por otra parte, la activación de receptores microgliales favorece la activación de p38 MAPK y posteriormente la liberación de IL-1 $\beta$  y BDNF; a través de la activación del receptor TrkB por el BDNF se regula la actividad del cotransportador KCC2, promoviendo un cambio en el gradiente de aniones que favorece la generación de potenciales de acción. Modificado de Ellis y Bennett, 2013.

La sensibilización central también puede ser causada por una reducción en la transmisión inhibitoria debido a una pérdida de neuronas liberadoras de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en el asta dorsal de la médula espinal (Gwak y Hulsebosch, 2011). Las lesiones en los nerviosos periféricos inhiben la transmisión GABAérgica y glicinérgica provocando un procesamiento aberrante de la información sensorial (Prescott et al., 2014). La disminución de la transmisión GABAérgica facilita cambios en el gradiente de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) (Coull et al., 2003) y limita la liberación de glicina (Imlach et al., 2016). En condiciones fisiológicas la inhibición GABAérgica y glicinérgica suprimen la actividad de los circuitos sinápticos modulando el transporte de las fibras A $\beta$ , que hacen sinapsis en las láminas III y IV (Abraira et al., 2017), así

como fibras C y A $\delta$  que se transmiten a las láminas superficiales I y II de la médula espinal (Peirs y Seal, 2016). En respuesta a una pérdida de las terminales GABAérgicas y a la disminución de glicina, la información táctil e inocua que viaja a las láminas III y IV es transmitida por las láminas I y II, produciendo que los estímulos inocuos se perciban como dolor (Lu et al., 2013; Sascha et al., 2018).

Los canales TRPV1 expresados en la médula espinal también contribuyen a la sensibilización central favoreciendo procesos de desinhibición impulsados por las interneuronas GABAérgicas. La activación de los canales TRPV1 en las interneuronas GABAérgicas reduce la señalización inhibitoria de las neuronas de proyección del tracto espinotalámico (Kim et al., 2012). Además, el aumento en la excitabilidad de las neuronas que expresan TRPV1 puede contribuir a la sensibilización central de manera indirecta al aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y de la médula espinal (Beggs et al., 2010). Esto permite el acceso de citocinas proinflamatorias y células inmunocompetentes como los linfocitos T y macrófagos (Calvo et al., 2012).

Las células no neuronales del sistema nervioso central, monocitos, macrófagos, células T y células gliales, desempeñan funciones importantes durante el desarrollo de la sensibilización central. Los primeros hallazgos sobre el papel de la microglía a nivel espinal identificaron la participación de receptores purinérgicos (P2X4) y de p38 MAPK como moléculas microgliales específicas que se regulaban y activaban después de la lesión neural (Felmy et al., 2003; Jin et al., 2003).

Recientemente se ha demostrado que la activación de la microglía esta asociada a cambios en la expresión génica. Los análisis de transcriptomas de la microglía espinal aislada han identificado un conjunto de genes que muestran una expresión alterada (Inoue y Tsuda, 2018). Estos patrones de expresión son altamente selectivos en las células gliales, lo cual indica que durante estados de dolor crónico existe una regulación transcripcional selectiva de la microglía. Uno de los reguladores clave de la expresión génica de la microglía es el factor regulador de interferón 8 (IRF8) el cual está asociado a la transcripción de genes como BDNF, el receptor tipo Toll 2 (Tlr2), el receptor de citocinas P2ry12 y el receptor 1 de

quimiocinas-CX<sub>3</sub>C (Cx3cr1). La deficiencia de IRF8 reduce la expresión de estos genes y por lo tanto la hipersensibilidad al dolor (Masuda et al., 2012).

La actividad prolongada de las células gliales expresadas en el sistema nervioso central en respuesta a una lesión neural es un proceso conocido como microgliosis. La microgliosis en el asta dorsal de la médula espinal puede inducirse por la señalización del factor 1 estimulante de colonias (CSF1) el cual es activado de forma selectiva en estados de dolor neuropático por la acción de la IL-1 $\beta$  liberada por células satélites circundantes a las neuronas a través de la activación del factor nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) (Lim et al., 2017). El factor CSF1 se transporta de forma anterógrada a lo largo de los axones hacia las terminales presinápticas del asta dorsal de la médula espinal y actúa sobre su receptor CSF1 (CSF1R) en la microglía induciendo procesos de proliferación (Guan et al., 2015).

Por otra parte, la señalización de la proteína adaptadora de membrana microglial (DAP12) también contribuye a la microgliosis promoviendo la activación del receptor CSF1R mediado por la acción de cinasas de la familia Src y por la activación del receptor expresado en las células mieloides 2 (TREM2), el cual induce la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias (IL1 $\beta$ , BDNF y TNF- $\alpha$ ). La expresión de estos genes contribuye al estado funcionalmente activo de la microglía (Kobayashi et al., 2016).

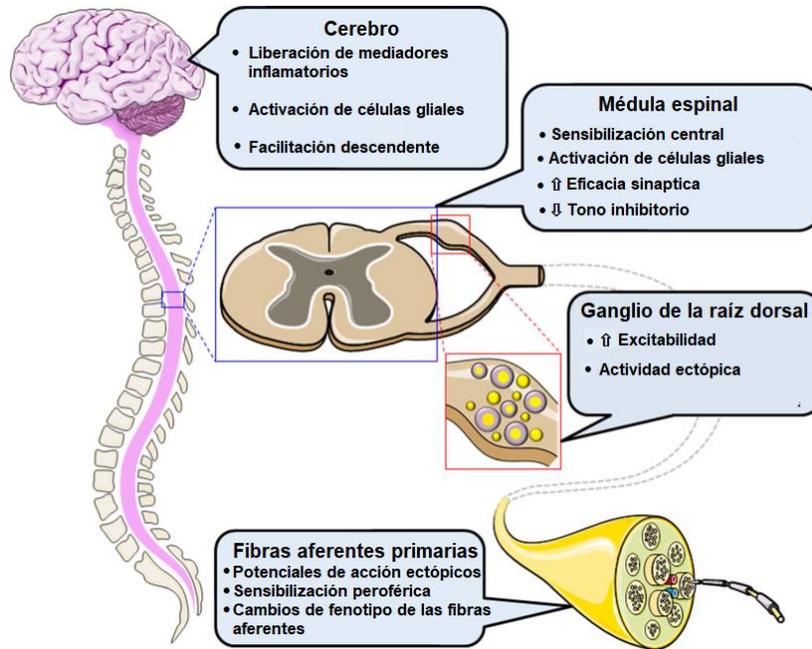
En resumen, estos mecanismos moleculares conducen al desarrollo de sensibilidad central facilitando el desarrollo de actividad espontánea, disminuyendo el umbral de activación por estímulos periféricos y amplificando la respuesta sináptica (Meacham et al., 2017).

### **3.3.3. Actividad ectópica**

Las propiedades eléctricas de los nociceptores se basan en la actividad de canales iónicos expresados en la membrana plasmática. Debido a que los canales iónicos establecen el potencial de membrana en reposo, la iniciación del potencial de acción, la despolarización y la repolarización, el período refractario entre potenciales de acción y la liberación de neurotransmisores, sus funciones son esenciales para la transmisión de la información nociceptiva (Waxman y Zamponi, 2014).

Los mediadores inflamatorios interactúan con receptores y canales iónicos en las fibras aferentes primarias favoreciendo la actividad ectópica que contribuye al dolor espontáneo (Devor, 2009). La actividad ectópica o generación de potenciales aberrantes es un evento caracterizado por fluctuaciones constantes del potencial de membrana en reposo que conducen a la despolarización de la membrana. Este mecanismo facilita la frecuencia de disparo de los potenciales de acción y es consecuencia directa de cambios en la función de canales iónicos expresados en los nociceptores (Du y Gamper, 2013; North et al., 2018).

Los nociceptores expresan una amplia variedad de canales iónicos como canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, canales TRP, canales ASIC y receptores purinérgicos P2X y P2Y (Tsantoulas y McMahon, 2014). El dolor crónico altera la expresión de canales iónicos induciendo la hiperexcitabilidad de los nociceptores lo que facilita la generación de potenciales de acción que se propagan a lo largo de los axones de las fibras aferentes primarias a sitios sinápticos en el asta dorsal de la médula espinal. Esto desencadena la liberación de neurotransmisores, como el glutamato y sustancia P, que activan neuronas de segundo orden que proyectan hacia el tálamo y estructuras encefálicas para favorecer la percepción al dolor (Waxman y Zamponi, 2014) (Fig. 4).

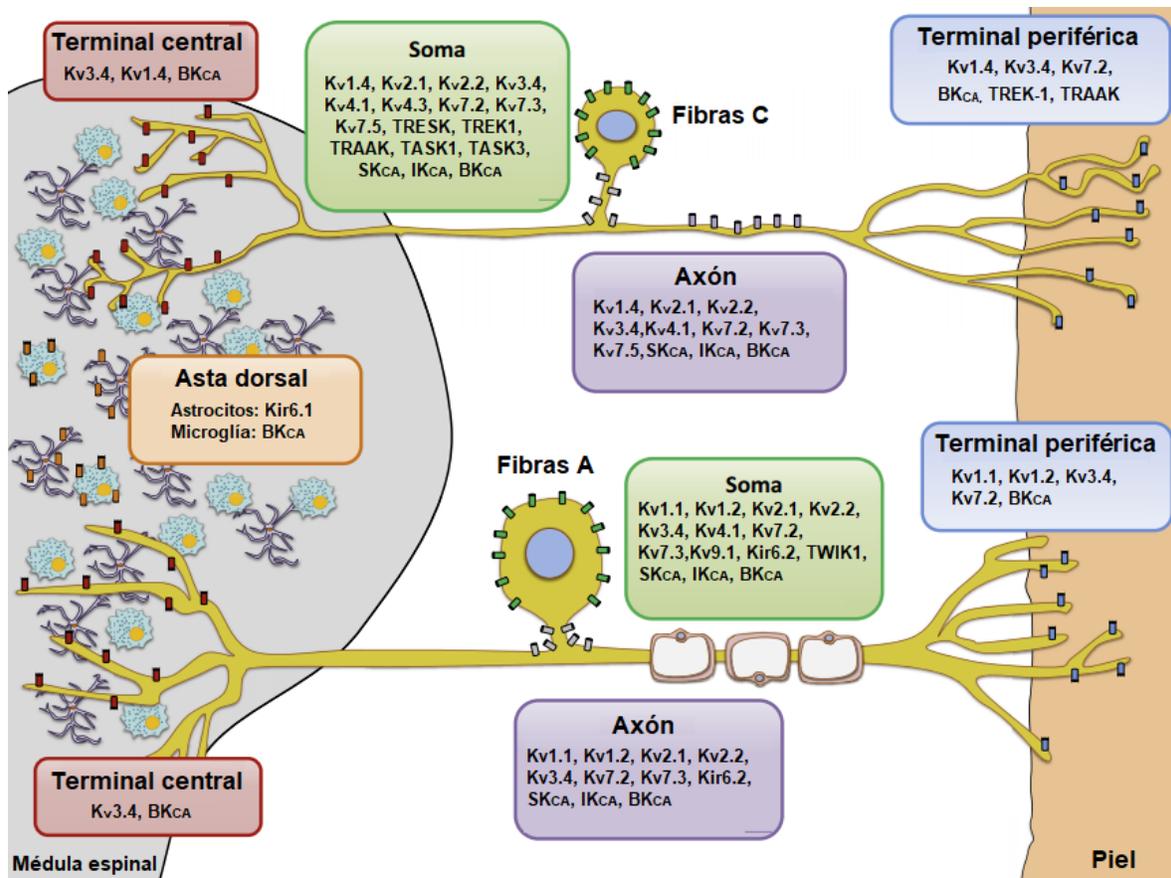


**Figura 4.** Mecanismos periféricos y centrales que contribuyen al dolor neuropático. Modificado de Meacham et al., 2017.

### 3.4. Canales de potasio

Los canales de  $K^+$  son proteínas de membrana que permiten el flujo rápido y selectivo de iones de  $K^+$  a través de la membrana celular (Li y Toyoda, 2015). Los canales de  $K^+$  se encuentran codificados por más de 70 genes diferentes (Maljevic y Lerche, 2013) y son la clase de canales iónicos más ampliamente distribuida y diversa (Tsantoulas y McMahon, 2014). Basados en sus características estructurales y fisiológicas, los canales de  $K^+$  se pueden dividir en 4 grupos: canales de  $K^+$  activados por voltaje ( $K_V$ ), canales de  $K^+$  activados por iones (es decir, activados por  $Ca^{2+}$  o  $Na^+$ ), canales  $K2P$  y canales de  $K^+$  rectificadores entrantes ( $Kir$ ) (Kubo et al., 2005). Dependiendo del perfil biofísico y de su localización en las neuronas sensoriales, la actividad de los canales de  $K^+$  puede contrarrestar la iniciación de los potenciales de acción, reducir la conducción a través del axón o limitar la liberación de los neurotransmisores a nivel central (Busserolles et al., 2016).

La lesión en los nervios sensoriales afecta la función de los canales de  $K^+$  expresados en los nociceptores. La ausencia de corrientes hiperpolarizantes impulsadas por la actividad de los canales de  $K^+$  es una de las principales causas de la sensibilización periférica y, por lo tanto, es un factor clave en el desarrollo del dolor neuropático (Du y Gamper, 2013). En estos casos, la actividad de los canales de  $K^+$  puede convertirse en un regulador importante de la excitabilidad al influir en la propagación y generación del potencial de acción (Busserolles et al., 2016). Los canales de  $K^+$  que participan en esta función son los expresados en los segmentos somal o axonal como los canales  $K_v4.3$  en fibras C mecanosensibles o los canales  $K_v2$  y  $K_v9.1$  en fibras A (Chien et al., 2007; Tsantoulas et al., 2014). Los canales  $K2P$  (TRESK, TREK-1, TASK-3, TASK-1 y TRAAK) generan corrientes hiperpolarizantes que estabilizan el potencial de membrana en reposo (Enyedi y Czirják, 2015). En las terminales centrales, los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  ( $BK_{Ca}$ ) regulan la liberación de neurotransmisores en la médula espinal en respuesta al flujo de  $Ca^{2+}$  durante el disparo del potencial de acción (Chen et al., 2009). Por su parte, los canales  $K_v3.4$  y  $K_v1.2$  participan en la transmisión sináptica al limitar la duración del potencial de acción (Dodson et al., 2003). Los canales de  $K^+$  expresados en células gliales, como los canales Kir6.1 y Kir4.1 en astrocitos, amortiguan el  $K^+$  extracelular para mantener el potencial de equilibrio durante el disparo neuronal en el GRD y el ganglio trigeminal (Tsantoulas y McMahon, 2014) (Fig. 5).



**Figura 5.** Expresión de los canales de K<sup>+</sup> en las neuronas sensoriales. Localización celular de las subunidades de los canales de K<sup>+</sup> en las fibras aferentes primarias A y C en modelos murinos. Modificado de Tsantoulas y McMahon, 2014.

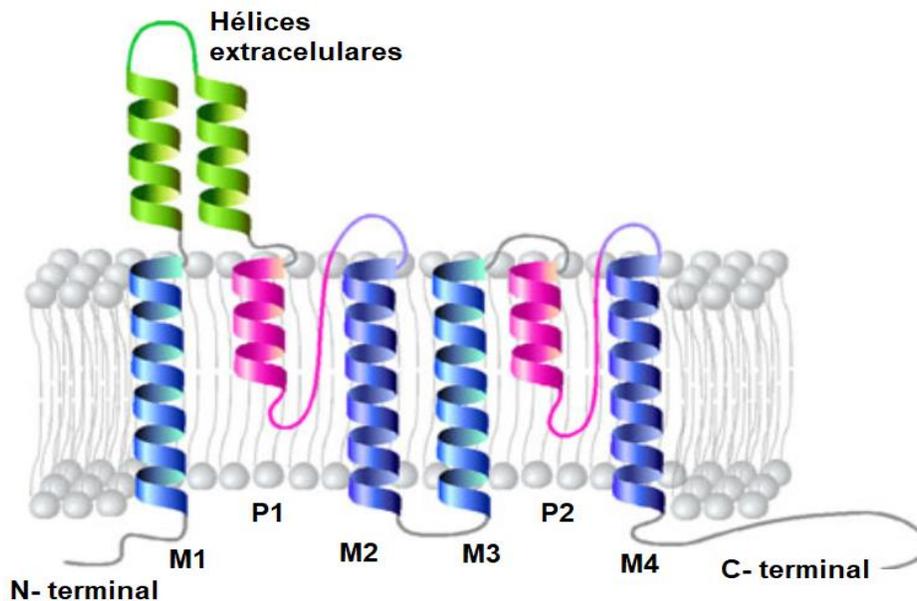
### 3.5. Canales de potasio K2P

Los canales K2P generan corrientes de fuga hiperpolarizantes que mantienen el potencial de membrana en reposo, reduciendo la excitabilidad celular (Enyedi y Czirjak, 2010). Debido a sus características funcionales, los canales K2P participan en procesos fisiológicos y farmacológicos como la depresión, la anestesia, la neuroprotección y el dolor (Heurteaux et al., 2004; Kennard et al., 2005; Alloui et al., 2006; Noël et al., 2011; Borsotto et al., 2015).

Los canales K2P se expresan en neuronas sensoriales (Bearzatto et al., 2000; Alloui et al., 2006) y están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico (Medhurst et al., 2001; Du y Gamper., 2013), así como en varios tejidos y

órganos no neuronales de mamíferos (Kim, 2005). Los canales K2P son proteínas transmembranales (TM) con el amino y el carboxilo terminal intracelular. El poro del canal resulta del ensamblaje de dos subunidades que contienen cuatro segmentos transmembranales helicoidales (M1-M4) dispuestos en tándem con dos dominios de poros (P1-P2) y dos hélices extracelulares (C1 y C2) (Fig. 6) (Milac et al., 2011). La familia de los canales K2P se divide con base en sus propiedades funcionales en 6 subfamilias (TREK, TASK, TWIK, THIK, TRESK y TALK). La actividad de los canales K2P está regulada por una diversidad de mediadores farmacológicos y fisiológicos como anestésicos volátiles, calor, estiramiento de la membrana, lípidos y por un gran número de vías de señalización activadas por neurotransmisores (Milac et al., 2011).

Los canales TREK-1, TREK-2, TRAAK y TRESK contribuyen al establecimiento del potencial de membrana en reposo en neuronas del GRD (Dobler et al., 2007; Yamamoto et al., 2009; Tulleuda et al., 2011) donde regulan la transmisión de estímulos mecánicos, térmicos y químicos (Alloui et al., 2006; Marsh et al., 2012; Acosta et al., 2014).



**Figura 6.** Organización estructural de los canales K2P (modificado de Feliciangeli et al., 2015).

### 3.6. Canal TREK-1

El canal TREK-1 atribuye su nombre a su similitud estructural con el canal TWIK-1 (Fink et al., 1996). Fue el primer canal de K<sup>+</sup> mecano-sensible que se identificó a nivel molecular en mamíferos. El canal TREK-1 se expresa en el sistema nervioso en el cerebro, la médula espinal, la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo, la amígdala, los ganglios basales (Hervieu et al., 2001) y en las neuronas sensoriales pequeñas y medianas del GRD (Medhurst et al., 2001), donde colocalizan con el canal TRPV1 (Maingret et al., 2000; Talley et al., 2001; Alloui et al., 2006).

En condiciones fisiológicas los canales TREK-1 expresados en los nociceptores contribuyen a las corrientes de fuga de K<sup>+</sup> que restablecen el potencial de membrana en reposo. Además, estos canales participan en procesos de transducción sensorial y regulación metabólica (Mathie y Veale, 2015).

La funcionalidad de los canales TREK-1 está regulada por factores fisiológicos y farmacológicos como cambios en el voltaje (Maingret et al., 2002), cambios en la temperatura (temperaturas entre 32-37 °C inducen la activación del canal) (Maingret et al., 2000), estimulación mecánica y cambios de pH (Maingret et al., 1999). El canal TREK-1 puede modularse mediante diversos agentes químicos, como los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido araquidónico (AA) o el ácido docosahexaenoico y los fosfolípidos (fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilestererina y ácido fosfatídico), además de anestésicos volátiles (cloroformo, éter dietílico y óxido nitroso) (Mathie y Veale, 2007; Honoré, 2007) .

Los canales TREK-1 son inhibidos por agonistas que actúan sobre los receptores acoplados a proteínas Gs y Gq (Shrestha et al., 2010), y por lo tanto son blanco de los mediadores del dolor que ejercen su acción a través de estas vías, tales como, PGE2 o serotonina (Alloui et al., 2006). Además, varias vías de segundos mensajeros están involucradas en la regulación del canal TREK-1. Por ejemplo, la activación de las proteínas PKA y PKC fosforila residuos del extremo C-terminal citoplásmico del canal lo cual inhibe su conductancia (Murbartián et al., 2005). De

igual forma, la serotonina a través de la activación del receptor 5-HT la proteína de anclaje AKAP150 y los receptores metabotrópicos de glutamato, mGluR1 y mGluR5 disminuyen la apertura del canal TREK-1 (Treptow y Klein, 2010; Vivier et al., 2016).

El canal TREK-1 está compuesto por 426 aminoácidos. Sin embargo, existe una variante de empalme alternativo del canal la cual origina una forma más corta que se trunca en el extremo N- terminal (Eckert et al., 2011). Las formas proteicas cortas y largas del canal TREK-1 se expresan en neuronas (Thomas et al., 2008) y sistemas de expresión heterologa (Eckert et al., 2011). El codón de iniciación de la traducción alternativa es una metionina que precede inmediatamente a la primera hélice transmembranal y produce una eliminación completa del extremo N- terminal intracelular del canal. La isoforma truncada da lugar a una corriente con una probabilidad de apertura muy reducida y cierta permeabilidad al Na<sup>+</sup> (Veale et al., 2014).

Los ratones *knockout* a los canales TREK-1 muestran un fenotipo normal (color de la piel, tono corporal, peso). Sin embargo, son menos sensibles a los anestésicos volátiles (Heurteaux et al., 2004; Steinberg et al., 2015), son más resistentes a la depresión (Heurteaux et al., 2006), son extremadamente sensibles a las crisis epilépticas y son más perceptivos a las sensaciones dolorosas (Alloui et al., 2006; Devilliers et al., 2013; Ehling et al., 2015; Mathie y Veale, 2015). En este sentido, estudios previos demuestran que los ratones *knockout* al canal TREK-1 son más sensibles a estímulos mecánicos (Heurteaux et al., 2004; Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009; Rodrigues et al., 2014), así como a sensaciones dolorosas causadas por estimulación térmica (20 °C y 40 °C) (Maingret et al., 2000), en comparación con los animales intactos. Además, se ha reportado que en el daño al nervio aumenta la expresión del ARNm y proteína de TREK-1 en las neuronas de GRD y en la médula espinal (Han et al., 2016; Fang et al., 2017; Shi et al., 2018).

### 3.7. Fosforilación inducida por la PKA y la PKC en la nocicepción

La PKC es una enzima clave en la regulación neuronal, tanto en la síntesis y liberación de neurotransmisores, como en la transducción de señales que controlan procesos biológicos importantes tales como la desensibilización de receptores, procesos metabólicos, neurotransmisión, regulación de la transcripción, mediación de la respuesta inmune, memoria y diferenciación celular (Rosse et al., 2010).

Las distintas isoformas de la PKC se pueden categorizar en tres familias: convencionales o clásicas, nuevas y atípicas. Las isoformas convencionales incluyen a la PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$  y  $\delta$  y son activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  y diacilglicerol (DAG). Las isoformas nuevas incluyen a la PKC- $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ , y requieren DAG pero no  $\text{Ca}^{2+}$  para su activación (Rosse et al., 2010). Por último, las isoformas atípicas PKC- $\zeta$ ,  $\lambda$  y  $\iota$  son insensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  y DAG (Ron y Kazanietz, 1999). Las distintas isoformas de la PKC se translocan a la membrana y fosforilan directamente a receptores o canales iónicos (Velázquez et al., 2007).

La vía canónica de activación de la PKC inicia cuando un agonista sintético o endógeno se une a un receptor acoplado a proteína Gq. La unión de la proteína G promueve el intercambio de GDP (guanosín difosfato) por GTP (guanosin trifosfato) en la subunidad  $\alpha$  que activa a la fosfolipasa  $\text{C}\beta$ , la cual cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4-5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>). La hidrólisis del PIP<sub>2</sub> resulta en la formación de dos segundos mensajeros: el DAG que activa a la PKC; y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) el cual facilita la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares. Los receptores acoplados a proteínas G son capaces de activar la vía de señalización de las MAPK, a través de la PKC. La traducción de señales por la activación de esta vía regula una amplia variedad de respuestas celulares que incluyen la proliferación, diferenciación y muerte celular (Neer, 1995).

Por su parte, la PKA representa una familia de cinasas tetraméricas compuestas por subunidades reguladoras (R) y catalíticas (C), cuya actividad depende de la concentración de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A bajas concentraciones de AMPc, la PKA se mantiene como una holoenzima (R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>)

inactiva. La unión de AMPc a subunidades R induce la disociación del complejo y la liberación de las subunidades C, facilitando la fosforilación del sustrato (Taylor et al., 1990). Cuatro subunidades reguladoras (RIa, RIb, RIIa, RIIb) y cuatro subunidades catalíticas (Ca, Cb, Cc, PrKX) conforman múltiples isoenzimas, clasificadas por sus subunidades R en PKA-I y PKA-II. Estas isoenzimas difieren en sus propiedades bioquímicas, patrón de expresión, proteínas con las que interactúan, así como su localización subcelular (Pidoux y Taskén, 2010). La activación de la PKA requiere de la unión de un ligando a un receptor acoplado a proteínas Gs, lo cual promueve la estimulación del adenilato ciclasa, que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP, favoreciendo la disociación de la proteína tetramérica inactiva. Las subunidades C se liberan de las subunidades R para posteriormente ser diana de numerosas proteínas (Dremier et al., 2003). La PKA puede migrar al núcleo y fosforilar al factor de transcripción CREB, que regula la transcripción de genes como c-Fos, BDNF y somatostatina, entre otros (Gonzalez y Montminy, 1989; Ginty et al., 1994; Luo et al., 2017).

La PKA y la PKC regulan de la actividad de canales iónicos expresados en la membrana plasmática. Por ejemplo, la aplicación de forskolina, un activador de la PKA, sensibiliza al canal TRPA1 aumentando las corrientes del canal y potenciando las respuestas producidas por la administración de su agonista carvacrol. Sin embargo, este fenómeno se previene por la aplicación de inhibidores de la PKA. Estos efectos en el canal TRPA1 pueden estar mediados en parte por la presencia de 4 sitios específicos de fosforilación de la PKA en el canal TRPA1 (Meents et al., 2017). Además, la inhibición farmacológica de la PKA y la PKC disminuye también las corrientes del canal TRPA1 evocadas por bradicinina en neuronas del GRD (Wang et al., 2008).

Por otra parte, la aplicación de ésteres de forbol (activadores de la PKC) en células que expresan el canal iónico TRPV1 potencian las corrientes inducidas por temperatura, reduciendo así el umbral de estimulación por calor y sensibilizando al canal TRPV1 tras la estimulación con capsaicina (Crandall et al., 2002). El mecanismo por el cual ocurre este proceso parece implicar la fosforilación directa

del canal (Bhave et al., 2003) que conduce, entre otros cambios, a la inserción dependiente de PKC de los canales TRPV1 en la membrana plasmática (Morenilla-Palao et al., 2004).

Debido a que las cinasas PKA y PKC modulan la expresión y función de receptores y canales iónicos en las neuronas sensoriales (Fan et al., 2009; Li et al., 2014; Isensee et al., 2014; Meents et al., 2017), su función es relevante para la transmisión nociceptiva. En este sentido, estudios *in vivo* han reportado que la administración de inhibidores de las cinasas disminuye las conductas nociceptivas en modelos de dolor neuropático e inflamatorio (Souza et al., 2002; Kassuya et al., 2007; Sachs et al., 2009). En contraste, la administración de activadores de las cinasas tiene efectos pronociceptivos (Souza et al., 2002; Di Castro et al., 2006) (Tabla 1 y 2).

**Tabla 1.** Efecto de la administración de inhibidores y activadores de la PKC en el dolor.

<b>INHIBIDORES DE LA PKC</b>				
<b>Fármaco</b>	<b>Administración</b>	<b>Efecto</b>	<b>Prueba</b>	<b>Referencia</b>
<b>Bisindolilmaleimida I</b>	Intraplatar, Ratonos	↓ hipersensibilidad mecánica (10 nmol) producida por la PGE2 (0.1 nmol)	Filamentos de Von Frey	Kassuya et al., 2007.
<b>Celeritrina</b>	Intraplatar, Ratas Wistar	↓ hipersensibilidad mecánica (1 mg) producida por la administración de formalina al 0.92%	Filamentos de Von Frey	Souza et al., 2002.
<b>Bisindolilmaleimida I</b>	Intraplatar, Ratas Wistar	↓ hipersensibilidad mecánica (10 µg) producida por la administración de bradicinina (10 µg)	Filamentos de Von Frey	Souza et al., 2002.
<b>Bisindolilmaleimida I</b>	Intratecal, Ratas Sprague Dawley	↓ efecto antialodínico (0.24 nmol) producido por la ligadura de nervios espinales (L5/L6)	Filamentos de Von Frey	Hua et al., 1999.
<b>PKC19–3 y Celeritrina</b>	Intratecal, Ratas Sprague Dawley	↓ efecto antialodínico producido por la ligadura de nervios espinales (L5/L6). PKC19–31 (3.0–30 nmol) y queleritrina (2.6–26 nmol)	Filamentos de Von Frey	Hua et al., 1999.
<b>ACTIVADORES DE LA PKC</b>				
<b>PDD</b>	Intraplatar, Ratas Wistar	Produce hipersensibilidad mecánica y conductas espontáneas de sacudida de la pata en ratones naïve (0.01, 0.1 y 1 µg)	Filamentos de Von Frey	Souza et al., 2002.

**Tabla 2.** Efecto de la administración de inhibidores y activadores de la PKA en el dolor.

<b>INHIBIDORES DE LA PKA</b>				
<b>Fármaco</b>	<b>Administración</b>	<b>Efecto</b>	<b>Prueba</b>	<b>Referencia</b>
<b>H89</b>	Intratecal, Ratas Sprague Dawley	↓ efecto antialodínico (5.8 nmol) producido por la ligadura de nervios espinales (L5/L6)	Filamentos de Von Frey	Hua et al., 1999.
<b>KT-5720</b>	Intraplatar, Ratones	↓ hipersensibilidad mecánica (0.1, 3 nmol) producida por la PGE2 (3 nmol)	Filamentos de Von Frey	Kassuya et al., 2007.
<b>Rp-cAMP y WIPTIDE</b>	Intraplatar, Ratas Sprague Dawley	↓ hipersensibilidad mecánica (0.1, 3 nmol) producida por la PGE2 (3 nmol)	Randall-Selitto	Aley y Levine, 1999.
<b>Rp-cAMP</b>	Intraplatar, Ratas Sprague Dawley	↓ hipersensibilidad mecánica (1 µg) ↓ hipersensibilidad mecánica producida por la PGE2 y forskolina	Randall-Selitto	Taiwo y Levine, 1991.
<b>AKAPI</b>	Intraplatar, Ratas Wistar	Previene la hipersensibilidad mecánica (0.03, 0.1, 0.3 µg) inducida por PGE2	Randall-Selitto	Sachs et al., 2009.
<b>H89</b>	Intraplatar, Ratas Wistar	↓ la hipersensibilidad mecánica (1, 3, 9 y 27 µg) inducida por la administración de PGE2 (100 ng)	Randall-Selitto	Cunha et al., 1999.
<b>ACTIVADORES DE LA PKA</b>				
<b>Forskolina</b>	Intraplatar, Ratas Sprague Dawley	↑ hipersensibilidad mecánica de manera dosis dependiente (1, 10, 100 y 1000 ng)	Randall-Selitto	Taiwo y Levine, 1991.
<b>PMA</b>	Intraplatar, Ratas Sprague Dawley	↑ hipersensibilidad mecánica de manera dosis dependiente (16, 160, y 1,600 pmol)	Filamentos de Von Frey	Di Castro et al., 2006.

### 3.8. Regulación del canal TREK-1 por fosforilación

La actividad del canal TREK-1 se inhibe por la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (Lesage et al., 2000) a través de la fosforilación de la PKA y la PKC (Kemp y Pearson 1990; Fink et al., 1996; Koh et al., 2001; Murbartián et al., 2005). La activación de receptores acoplados a proteínas Gs y Gq desencadena un mecanismo de señalización intracelular que conlleva a la activación de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C, lo que resulta en un aumento en los niveles de AMPc y DAG y finalmente la consecuente activación de la PKA y la PKC (Chemin et al., 2003). La activación de estas cinasas promueve la fosforilación de residuos en el extremo carboxilo terminal citoplasmático del canal TREK-1. La estimulación de los receptores acoplados a proteínas Gs inhibe las corrientes del canal TREK-1 por la

fosforilación de la PKA en el residuo Ser-333 (Patel et al., 1998); mientras que la estimulación de receptores acoplados a proteínas Gq inhibe las corrientes de TREK-1 por la fosforilación de los residuos Ser-333 seguida de Ser-300, a través de la PKC (Murbartián et al., 2005). La fosforilación del canal adiciona cargas negativas al extremo carboxilo terminal del canal TREK-1, lo que provoca un cambio conformacional en el canal, que reduce la unión del extremo C-terminal a la membrana plasmática favoreciendo su conformación cerrada (Sandoz et al., 2011). De esta forma la activación de receptores acoplados a las proteínas G facilita la fosforilación del canal TREK-1 provocando el cierre del canal y disminuyendo así las corrientes de fuga.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Las neuropatías periféricas alteran las propiedades eléctricas de las neuronas sensoriales debido a cambios en la expresión y función de canales iónicos. Este desequilibrio favorece un aumento de la excitabilidad neuronal que subyace al desarrollo del dolor neuropático. El canal TREK-1 genera corrientes de fuga que mantienen el potencial de membrana en reposo y estabilizan a los nociceptores por debajo del umbral de disparo del potencial de acción. Estas propiedades podrían modular la hiperexcitabilidad que se desarrolla durante el dolor neuropático. Asimismo, la liberación sostenida de mediadores inflamatorios es un mecanismo por el cual las cinasas PKA y PKC modulan el estado de fosforilación del canal TREK-1 y por lo tanto su posible efecto antialodínico.

## **5. HIPÓTESIS**

La fosforilación del canal TREK-1 por las cinasas PKA y PKC reduce el efecto antialodínico inducido por la activación del canal TREK-1 en ratas neuropáticas.

## **6. OBJETIVO**

Estudiar el papel del canal TREK-1 en el dolor neuropático y su modulación por proteínas cinasas.

## **7. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto de la activación y el bloqueo del canal TREK-1 en la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales de L5/L6.
- Evaluar el efecto de la activación e inhibición de las cinasas PKA y PKC sobre la actividad del canal TREK-1 en el dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales de L5/L6.
- Determinar si la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 modifica la expresión de los canales TREK-1 en neuronas del GRD de los nervios espinales L4 y L5.

## **8. METODOLOGIA**

### **8.1. Animales**

Se utilizaron ratas hembra Wistar de 120 a 130 g de peso provenientes del bioterio del Cinvestav, Sede Sur, alojadas en cajas de acrílico. Las ratas se mantuvieron durante todo el experimento con alimento y agua a libre demanda en un ciclo de luz/obscuridad de 12/12 horas, con temperatura y humedad controladas. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con el protocolo número 0092-14, aprobado por el comité interno del Cinvestav para el uso de animales y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### **8.2. Ligadura de los nervios espinales**

La cirugía para la ligadura de los nervios espinales se desarrolló de acuerdo al método descrito por Kim y Chung (1992). Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina (50 y 10 mg/kg respectivamente) por vía intraperitoneal (i.p.). Posteriormente, se realizó una incisión y se expuso la columna vertebral dorsal, se ligaron los nervios de L5 y L6 del lado izquierdo con una sutura 6-0. Solo se utilizaron animales que no presentaban alteraciones motoras.

### **8.3. Fármacos**

Los fármacos se administraron de manera intratecal entre las vértebras L4 y L5 con una aguja de 30G en ratas naïve y en ratas con ligadura de los nervios espinales siete días después de la cirugía. Se administró BL-1249 (Cat. # B2186, Sigma-Aldrich, St Louis MO), espadina (Cat. # SML1500, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier), Rp-adenosina 3',5' monofosforotioato cíclico (Cat. # A165, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), Go- 6983 (Cat. # G1918, Sigma-Aldrich, Temecula, CA), forskolina (Cat. # F6886 Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y forbol 12,13-dibutirato (Cat. # P1269, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cada fármaco se administró en un volumen final de

10 µL. Para todos los fármacos se utilizó como vehículo DMSO al 1%, a excepción de la espadina para la cual se utilizó como vehículo solución salina.

<b>Tabla 4. CI<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub> de los fármacos</b>		
<b>Fármacos</b>	<b>Concentración</b>	<b>Referencia</b>
<b>BL-1249</b>	CE <sub>50</sub> = 1.12 - 0.37 µM	Tertyshnikova et al., 2005.
<b>Espadina</b>	CI <sub>50</sub> = 0.70 µM	Mazella et al., 2010.
<b>Rp-cAMP</b>	CI <sub>50</sub> = 4.9 µM	Torgersen et al., 1997.
<b>Gö-6983</b>	CI <sub>50</sub> = PKCα 7 nM, PKCβ 7 nM, PKCα 7 nM, PKCβ 7 nM, PKCγ 10 nM, PKCδ 6 nM, PKCζ 60 nM	Gschwendt et al., 1996.
<b>Forskolina</b>	CE <sub>50</sub> : 5 - 10 µM	Joan D. Robbins et al., 1996.
<b>Forbol 12,13-dibutirato</b>	CE <sub>50</sub> : 12.4 - 1.2 µM	Ko et al., 1993.

#### 8.4. Evaluación de la conducta nociceptiva

Se evaluó la alodinia táctil en el modelo de ligadura de los nervios espinales. Los animales se colocaron en cajas de acrílico con fondo de malla metálica y se permitió su ambientación 30 minutos previos a la evaluación. Posteriormente, se determinó el umbral de retiro de la pata mediante el método *up and down* (Chaplan et al., 1994), el cual consiste en utilizar una serie de filamentos de von Frey calibrados. La evaluación se inició con el filamento de 1 g y se estimuló durante 10 segundos la superficie plantar de los animales; el calibre aumentó o disminuyó según la respuesta del animal. Los patrones de registro de respuesta se utilizaron para calcular el 50% de umbral de retiro usando la fórmula (Chaplan et al., 1994):  $50\% \text{ umbral (g)} = (10[x_f + k\delta])/10,000$  Donde:  $X_f$  es el valor del último filamento de von Frey utilizado;  $k$  es el factor de corrección basado en los patrones de respuesta de la tabla de calibración y al valor tabulado en base al patrón de respuestas positivas y negativas;  $\delta$  es la diferencia de promedio entre estímulos. El 50% del umbral de retiro se define como la intensidad de estímulo que se requiere para provocar una respuesta en el 50% de las aplicaciones para cada animal.

### **8.5. Inmunodetección de los canales TREK-1 por *Western blot***

Para determinar el curso temporal de la expresión de TREK-1, las ratas se sacrificaron 1, 3, 7 y 14 días posteriores a la ligadura de los nervios espinales. Se obtuvieron por separado los GRD L4 y L5. Estos se colocaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

### **8.6. Extracción y cuantificación de proteínas totales**

Los tejidos se homogenizaron en frío con un amortiguador de lisis (NaCl 150 mM, TrisHCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, Tritón X100 al 1%), más inhibidores de proteasas (aprotinina 2 mg/ml, leupeptina 2 mg/ml, pepstatina 10 mg/ml y PMSF 100 mM). Las muestras se incubaron por 10 minutos a 4°C y se centrifugaron por 10 minutos a 14,000 rpm para obtener el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (BioRad, Hercules, CA).

### **8.7. *Western Blot***

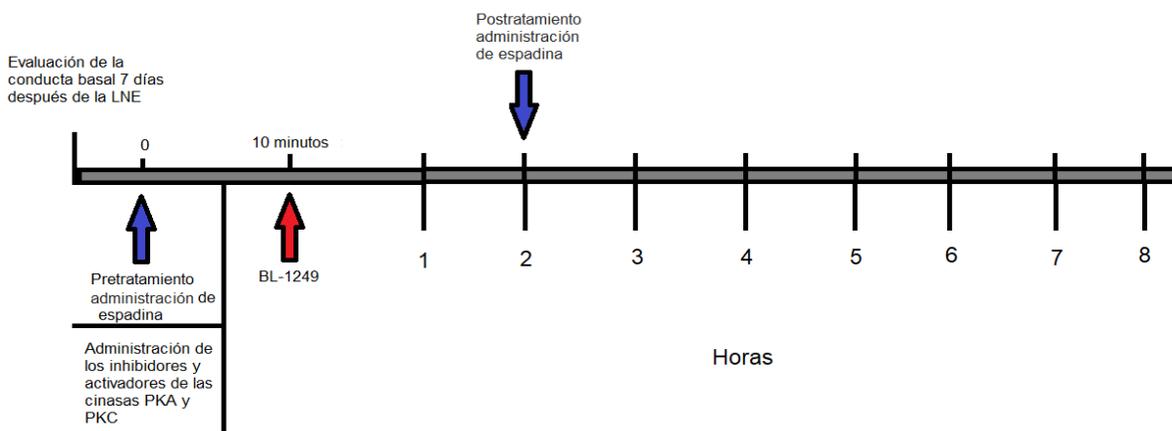
Se utilizaron 40 µg de proteína total para realizar la electroforesis en un gel desnaturizante de SDS-poliacrilamida al 10%. Posteriormente, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de PVDF la cual se bloqueó con 5% de leche descremada en PBS-Tween20 al 0.1% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se incubó a una dilución de 1:300 con el anticuerpo primario TREK-1 (*mouse anti-TREK-1*; Cat. # APC-047, Alomone, Jerusalem, Israel) en PBS-Tween 20 al 0.1%. Al término, el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-rabbit; Cat # 711-035-152, 1:3000, Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, EUA) se incubó durante una hora y se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con leche al 1% en PBS-Tween20 al 0.1%. La inmunodetección de las proteínas de interés se realizó mediante quimioluminiscencia. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el equipo C-Digit (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) para cuantificar la densidad de la señal óptica. Para normalizar la expresión de TREK-1 se utilizó la expresión de β-

actina (mouse anti-actina; Cat. # MAB1501, 1:10000, Millipore, Darmstadt, Alemania) como control de carga.

### **8.8. Diseño experimental**

Para determinar el papel funcional del canal TREK-1 en la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales, se evaluó el efecto de la administración intratecal de dosis crecientes de BL-1249 (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y de DMSO al 1% en ratas neuropáticas. Por otra parte, para evaluar el efecto pronociceptivo inducido por el bloqueo del canal TREK-1 se administró espadina (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), bloqueador del canal TREK-1, en ratas intactas. Posteriormente se evaluó el efecto de la espadina sobre la respuesta antialodínica inducida por BL-1249 para lo cual se realizaron dos protocolos de administración: un pretratamiento que consistió en la administración de espadina (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) 10 minutos antes de la administración de BL-1249 (100  $\mu\text{M}$ ) y un postratamiento en el cual la espadina (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) se administró 2 horas después de BL-1269 (100  $\mu\text{M}$ ).

Para evaluar el efecto de las cinasas PKA y PKC sobre el canal TREK-1, se administraron de manera intratecal los activadores (forskolina y forbol 12,13-dibutirato) e inhibidores (Rp-cAMP, Gö-6983) de las cinasas a las dosis de 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM, previo a la administración de BL-1249 (1  $\mu\text{M}$ ) 10 minutos antes. En todos los protocolos experimentales se evaluó la alodinia mecánica 7 días después de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 en las ratas. La conducta nociceptiva se evaluó durante 8 horas, posteriores a la administración de los fármacos (Fig. 7).



**Figura 7.** Diseño experimental de la evaluación conductual del canal TREK-1 en ratas neuropáticas.

### 8.9. Análisis estadístico

A partir del umbral de retiro se determinaron los cursos temporales de las conductas nociceptivas en función del tiempo. Posteriormente se establecieron los cursos temporales mediante el método de los trapecoides. Los datos se reportan como el promedio ( $n=6$ )  $\pm$  error estándar de las unidades de área (UA) para cada grupo.

En el caso de la expresión de la proteína TREK-1 se determinó el porcentaje de intensidad relativa y los resultados se reportan como el promedio ( $n=3$ )  $\pm$  error estándar para cada grupo.

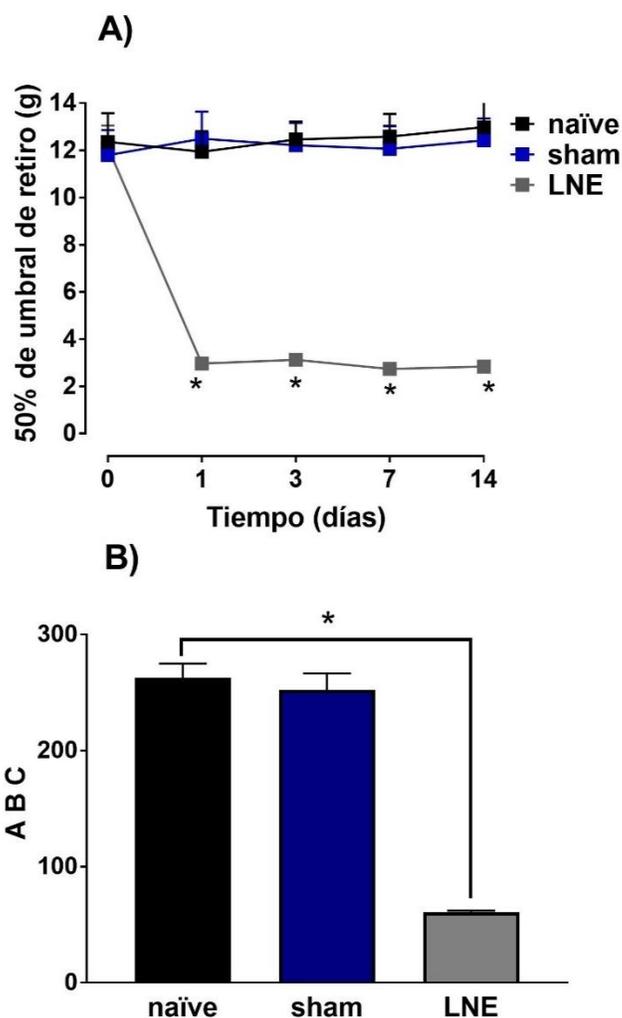
Para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos, se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK).

Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico Graph Prism 6.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Una  $P < 0.05$  se consideró significativa.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Curso temporal de la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales en ratas

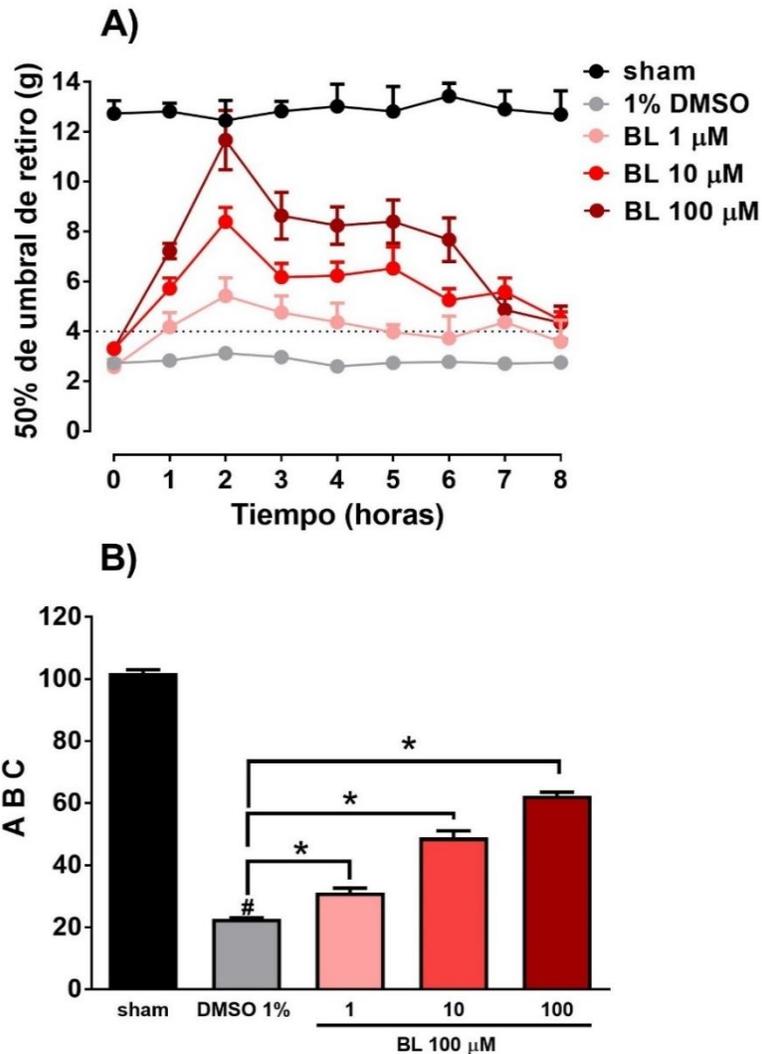
La ligadura de los nervios espinales produjo alodinia táctil en la rata manifestándose como una disminución del umbral de retiro de la pata ante la estimulación mecánica. La alodinia fue evidente desde el primer día posterior a la cirugía y se mantuvo constante hasta 21 días posteriores a la lesión, comparada con ratas naïve. No se encontraron diferencias significativas en el umbral de retiro de la pata entre los grupos naïve y sham (Fig. 8 A y B).



**Figura 8. La ligadura de los nervios espinales L5 y L6 produce alodinia mecánica.** A) Curso temporal del 50% de umbral de retiro de la pata (g) en ratas con ligadura de los nervios espinales (LNE). B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico  $\pm$  E.E. (n=6). \* $p < 0.05$  vs naïve. (A) ANOVA de dos vías seguidas de la prueba de Student-Newman-Keuls y (B) ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

## 9.2. Efecto antialodínico de BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales

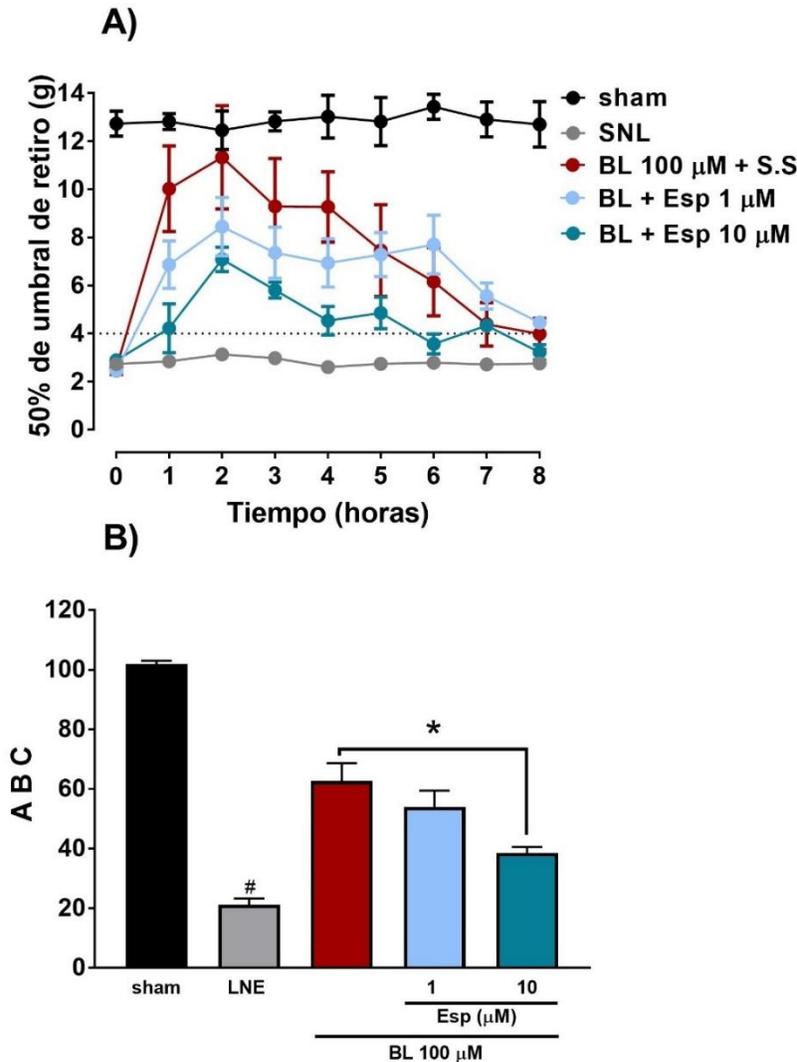
El BL-1249 produjo un aumento significativo en el umbral de retiro de la pata comparado con el grupo administrado con vehículo (DMSO 1%). Estos datos sugieren que el canal TREK-1 tiene un papel antialodínico en el dolor neuropático (Fig. 9 A y B).



**Figura 9. Efecto antialodínico de la activación del canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.** A) Curso temporal de la administración intratecal de BL-1249 (BL) en ratas con ligadura de los nervios espinales. B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico  $\pm$  E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) (n=6). #p<0.05 vs grupo sham, \*p<0.05 vs grupo con DMSO al 1%, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

### 9.3. Efecto de la espadina en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales

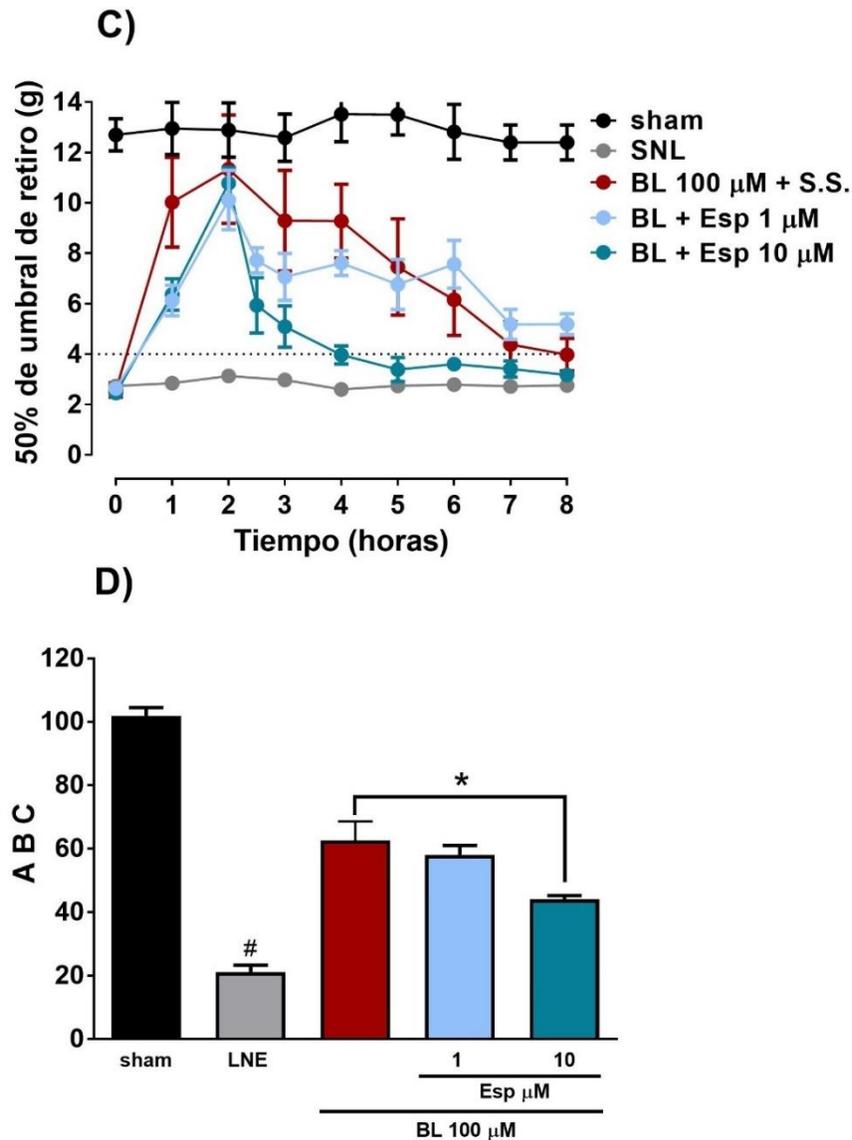
La administración intratecal de 1 y 10  $\mu\text{M}$  de espadina disminuyó de manera dosis dependiente el efecto antialodínico inducido por BL-1249 (100  $\mu\text{M}$ ) en ratas neuropáticas (Fig. 10 A y B). Estos datos sugieren que el efecto antialodínico producido por el BL-1249 se debe a la activación específica del canal TREK-1.



**Figura 10. Efecto del bloqueo del canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.**

A) Curso temporal del pretratamiento intratecal de espadina (Esp) sobre el efecto de 100  $\mu\text{M}$  de BL-1249 (BL) en ratas con ligadura de los nervios espinales (LNE). B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico  $\pm$  E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) ( $n=6$ ). # $p<0.05$  vs grupo sham, \* $p<0.05$ , ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

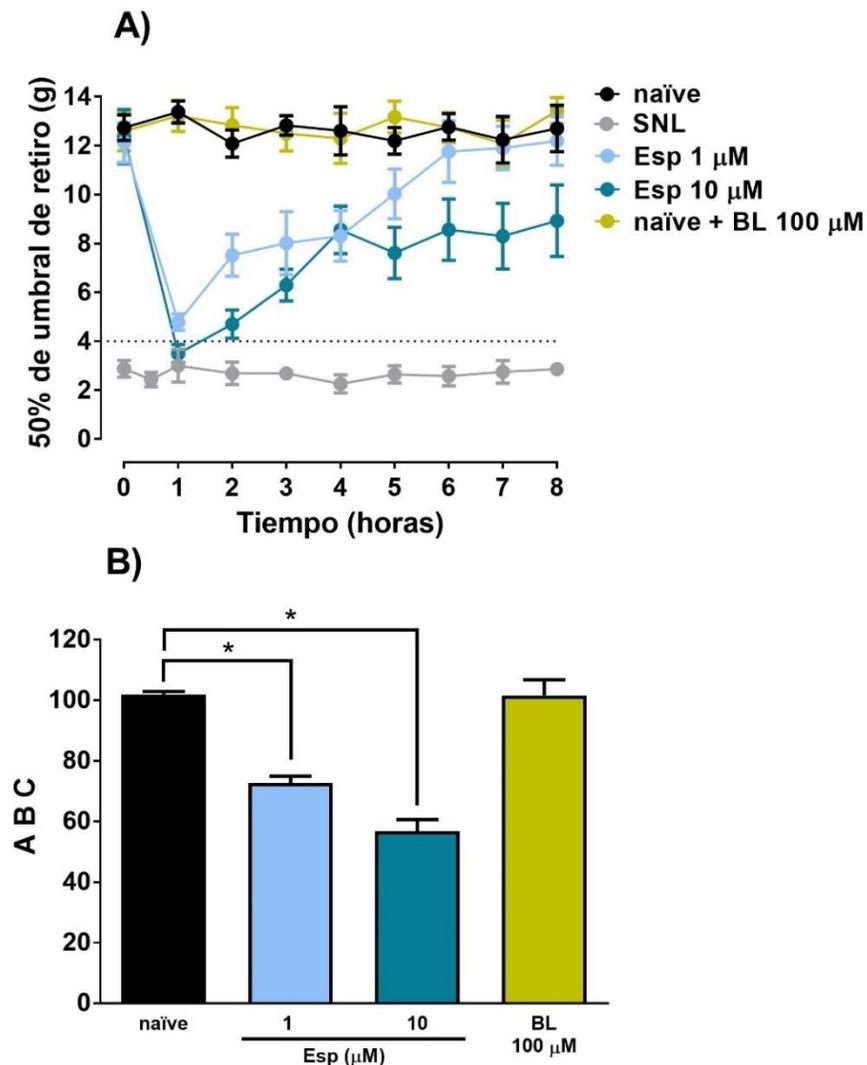
Por otra parte, la administración intratecal de espadina (1-10  $\mu\text{M}$ ) 2 horas después de la administración de BL-1249 (100  $\mu\text{M}$ ), revirtió el efecto antialodínico inducido por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales (Fig. 11 C y D).



**Figura 11. Efecto del bloqueo del canal TREK-1 sobre el BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.** C) Curso temporal del postratamiento (2 h) intratecal de espadina (Esp) sobre el efecto de 100  $\mu\text{M}$  de BL-1249 (BL). D) Área bajo la curva de la gráfica (C). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico  $\pm$  E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) (n=6). #p<0.05 vs grupo sham, \*p<0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

#### 9.4. Efecto del bloqueo de TREK-1 en ratas *naïve*

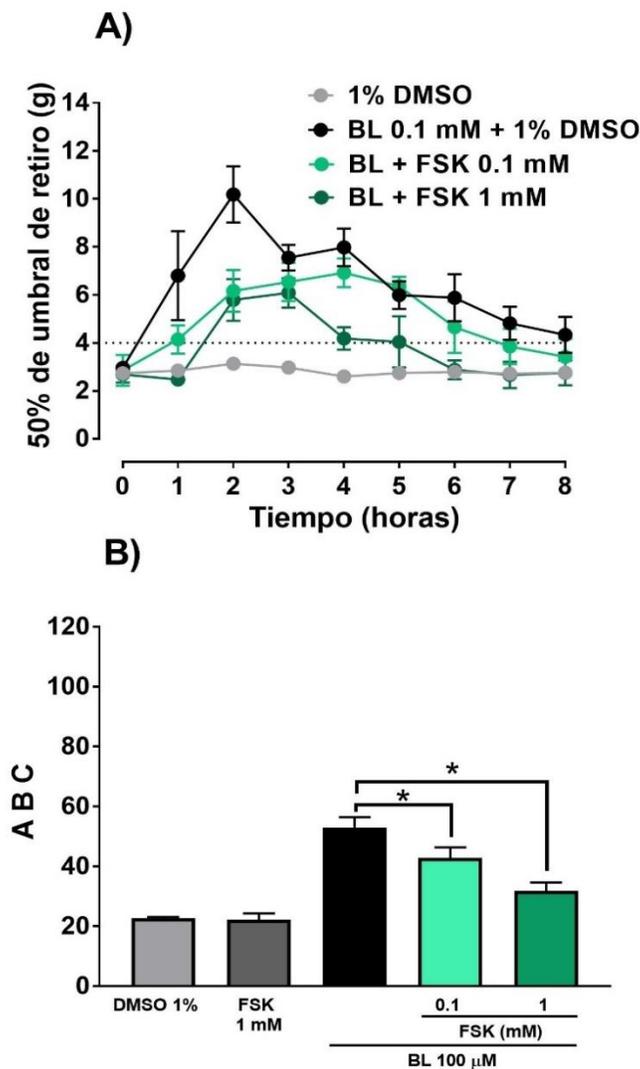
La administración intratecal de espadina (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) disminuyó el umbral de retiro de la pata en ratas *naïve* lo que se interpreta como alodinia táctil. Además, la administración de 100  $\mu\text{M}$  de BL-1249 no modificó el umbral de retiro de la pata (Fig. 12 A y B). Los datos obtenidos sugieren que en ratas *naïve* la actividad del canal TREK-1 es importante para generar las corrientes de fondo que mantienen a las fibras aferentes primarias silentes ante estímulos mecánicos inocuos en ratas *naïve* (tono inhibitor).



**Figura 12. Efecto del bloqueo de TREK-1 en ratas *naïve*.** A) Curso temporal de la administración intratecal de espadina (Esp) en ratas *naïve*. B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico  $\pm$  E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) ( $n=6$ ).  $*p<0.05$  vs grupo *naïve*, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

### 9.5. Efecto de la activación de la PKA en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales

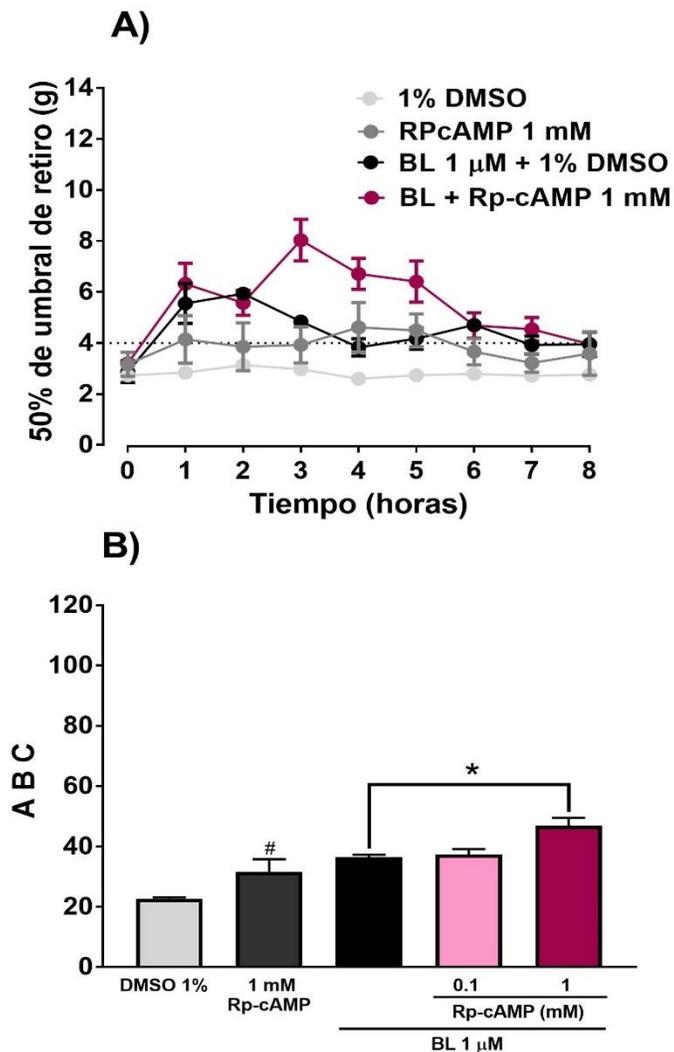
Para determinar si la activación de la PKA modifica el efecto antialodínico de BL-1249, se administró forskolina a las dosis de 0.1 y 1 mM previo a la administración de 100  $\mu$ M de BL-1249. La forskolina no tuvo efecto sobre la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales (Fig. 13 B). Sin embargo, disminuyó el efecto antialodínico de BL-1249 en ratas neuropáticas (Fig. 13 A y B). Los datos obtenidos sugieren que la fosforilación de TREK-1 por la PKA disminuye el efecto antialodínico de BL-1249 en ratas neuropáticas.



**Figura 13. Efecto de la activación de la PKA sobre el canal TREK-1 en ratas con LNE.** A) Curso temporal del pretratamiento intratecal de forskolina (FSK) sobre el efecto de 100  $\mu$ M de BL-1249 (BL). B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico  $\pm$  E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) (n=6). \*p<0.05 vs grupo BL 100  $\mu$ M, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

### 9.6. Efecto de la inhibición de la PKA en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales

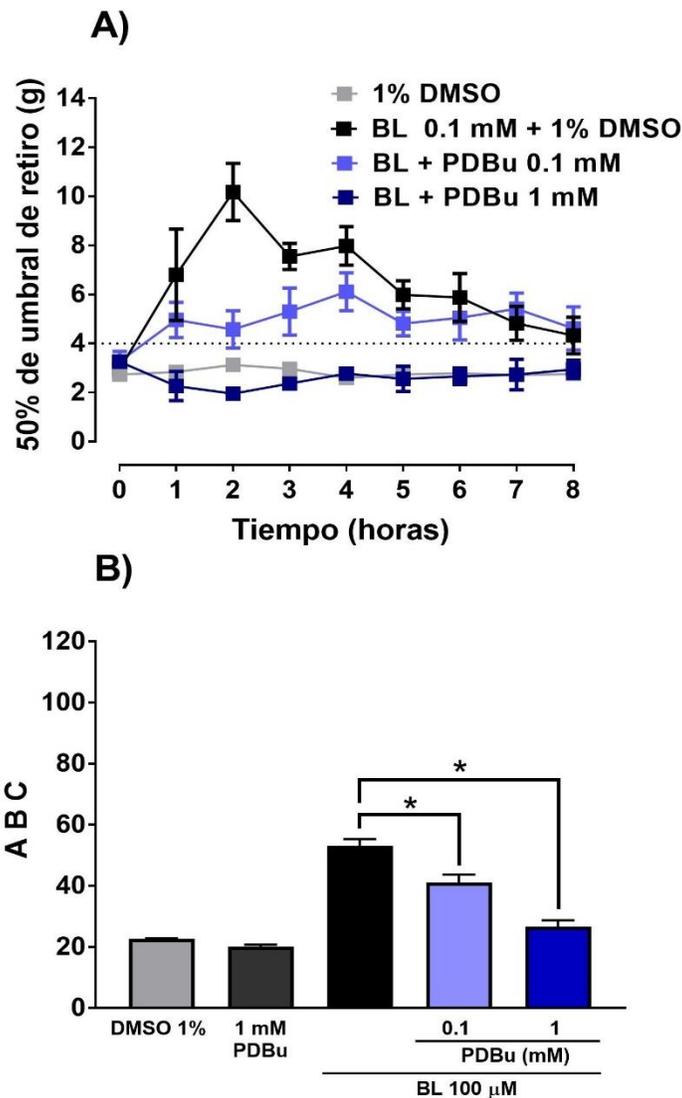
La administración de 1 mM de Rp-cAMP disminuyó de manera estadísticamente significativa la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales (Fig. 14 B). Además, el Rp-cAMP aumentó el efecto antialodínico de BL-1249 en ratas neuropáticas (Fig. 14 A y B). Estos datos sugieren que la inhibición de la cinasa PKA podría disminuir la fosforilación del canal TREK-1 aumentando el efecto antialodínico de BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.



**Figura 14. Efecto de la inhibición de la PKA sobre el canal TREK-1 en ratas con ligadura de los nervios espinales.** A) Curso temporal del pretratamiento intratecal de Rp-cAMP sobre el efecto de 1 μM de BL-1249 (BL). B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico ± E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) (n=6). #p<0.05 vs DMSO 1%, \*p<0.05 vs BL 1 μM, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

### 9.7. Efecto de la activación de la PKC en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales

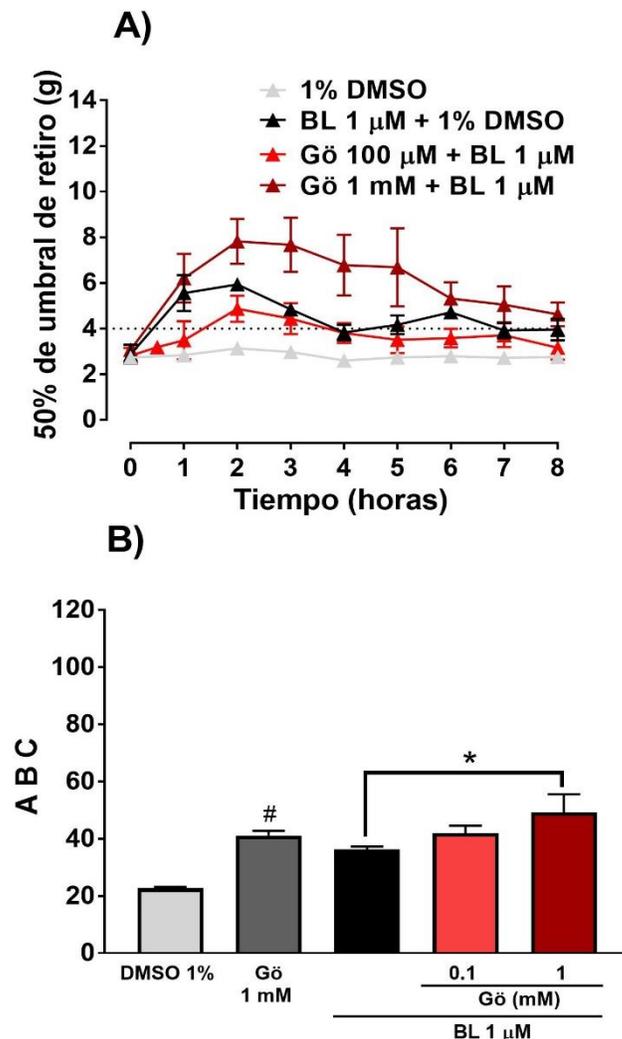
La administración intratecal de forbol 12,13-dibutirato a las dosis de 0.1 y 1 mM no tuvo efecto sobre la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales (Fig. 15 B). Sin embargo, redujo el efecto antialodínico de BL-1249 (0.1 mM) en ratas neuropáticas (Fig. 15 A y B). Los datos obtenidos sugieren que la fosforilación del canal TREK-1 por la PKC disminuye el efecto antialodínico de BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.



**Figura 15. Efecto de la activación de la PKC sobre el canal TREK-1 en ratas con LNE.** A) Curso temporal del pretratamiento intratecal de forbol 12,13-dibutirato (PDBu) sobre el efecto de 100 μM de BL-1249 (BL). B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico ± E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) (n=6). \*p<0.05 vs grupo BL 100 μM, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

### 9.8. Efecto de la inhibición de la PKC en la antinocicepción inducida por BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales

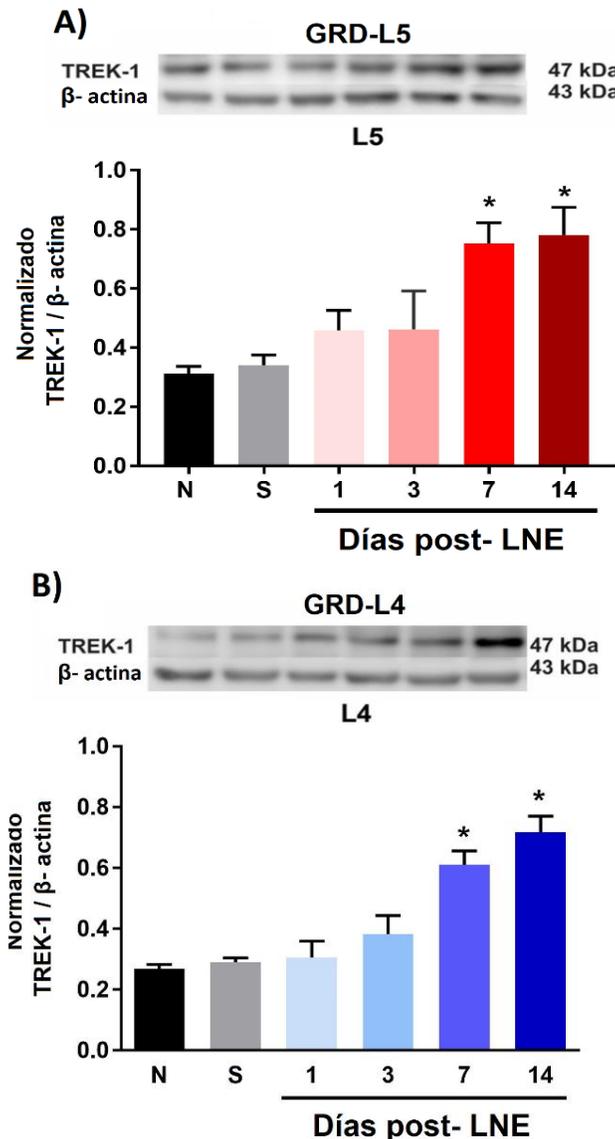
La administración de 1 mM de Gö-6983, disminuyó de manera estadísticamente significativa la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales (Fig. 16 B). Además, el Gö-6983 aumentó el efecto antialodínico de BL-1249 en ratas neuropáticas (Fig. 16 A y B). Estos datos sugieren que la inhibición de la cinasa PKC podría disminuir la fosforilación del canal TREK-1 aumentando el efecto antialodínico de BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales.



**Figura 16. Efecto de la inhibición de la PKC sobre el canal TREK-1 en ratas con LNE.** A) Curso temporal del pretratamiento intratecal de Gö-6983 (Gö) sobre el efecto de 1 µM de BL-1249 (BL). B) Área bajo la curva (ABC) de la gráfica (A). Los datos se presentan como el promedio del efecto antialodínico ± E.E. del 50% del umbral de retiro de la pata (g) (n=6). #p<0.05 vs DMSO 1%, \*p<0.05 vs BL 1 µM, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

### 9.9. Efecto de la ligadura de los nervios espinales en la expresión de TREK-1

El canal TREK-1 se expresó de manera constitutiva en ratas naïve y sham. Además, la ligadura de los nervios espinales L5/L6 aumentó la expresión de TREK-1 en el GRD L5 lesionado (Fig. 17 A) y L4 no lesionado (Fig. 17 B) los días 7 y 14 después de la lesión. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de TREK-1 entre el grupo naïve y el grupo sham de los GRD evaluados (Fig. 17).



**Figura 17. Curso temporal de la expresión de TREK-1.** A y B) Expresión del canal TREK-1 en el ganglio de la raíz dorsal (GRD) de L5 y L4 en ratas con ligadura de los nervios espinales (LNE). Los datos se expresan como la media  $\pm$  E.E. de la expresión normalizada contra  $\beta$ -actina (n = 4). N: naïve, S: sham \*P<0.05 vs N. Prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Student-Newman-Keuls.

## **10. DISCUSIÓN**

### **10.1. Modelo de neuropatía de Kim y Chung**

Se han utilizado diversos modelos de lesión a los nervios periféricos como herramientas para comprender los mecanismos fisiológicos que contribuyen al dolor neuropático. Los distintos modelos presentan condiciones fisiopatológicas similares a las reportadas en humanos, manifestándose con la presencia de alodinia e hiperalgesia (Huang et al., 2016).

El modelo de ligadura de los nervios espinales, descrito por Kim y Chung en 1992 (Kim y Chung, 1992), es uno de los modelos de dolor neuropático más utilizados debido a que presenta una baja variabilidad experimental y ausencia de autotomía en comparación con otros modelos (Wang y Wang, 2003). La alodinia táctil que produce el modelo de Kim y Chung es resistente al efecto analgésico de opioides administrados de manera espinal (Kim y Chung, 1992). Además, el procedimiento quirúrgico es estereotipado y los segmentos espinales intactos son aislados, permitiendo manipulaciones experimentales independientes. Una desventaja de este modelo es que la cirugía es considerablemente más extensa y complicada que los modelos de constricción crónica del nervio ciático (Bennett y Xie, 1988). La ligadura de los nervios espinales disminuye drásticamente el umbral de retiro de la pata provocando alodinia mecánica, la cual persiste y presenta baja variabilidad biológica 20 días postcirugía (Chaplan et al., 1994).

En el presente estudio más del 90% de las ratas con ligadura de los nervios espinales L5 y L6 desarrollaron alodinia mecánica. Asimismo, la estimulación de la pata del animal con los filamentos de Von Fray produjo un estímulo aversivo que se tradujo como alodinia táctil con valores por debajo de los 4 g. La administración de los vehículos (solución salina, DMSO 1%) no modificó el umbral de retiro durante el tiempo que duro la evaluación y éste no fue estadísticamente significativo respecto al grupo sham en el cual el umbral de retiro siempre se mantuvo por arriba de los 12 g. La ambientación previa de los animales durante una hora, la temperatura en un rango de 25 a 27 °C y el aislamiento en un cuarto con el mínimo de ruido tienen

un papel muy importante para encontrar un patrón de umbral de retiro coherente y similar al reportado.

## **10.2. Efecto del BL-1249 en ratas con dolor neuropático**

En el presente estudio se observó que la administración intratecal de BL-1249 disminuyó de manera dosis dependiente la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6. Dado que estudios electrofisiológicos indican que el BL-1249 es un activador del canal TREK-1 en cultivos de neuronas del GRD y sistemas de expresión heteróloga (Tertyshnikova et al., 2005; Plant, 2012; Veale et al., 2014; Dong et al., 2015; Loucif et al., 2018; Decher et al., 2017), nuestros resultados sugieren que el efecto antialodínico de BL-1249 se debe a la activación de los canales TREK-1. A nuestro conocimiento este es el primer estudio que demuestra el efecto antialodínico del BL-1249 en un modelo de dolor neuropático en la rata.

El BL-1249 no actúa de forma selectiva y aumenta la actividad de canales TASK-3 (Cao et al., 2010), además de inhibir la actividad de los canales  $K_{Ca}1.1$ ,  $K_V7.2$ ,  $K_V7.3$  y  $Na_V1.7$  (Loucif et al., 2018). Para resolver este problema, utilizamos espadina, bloqueador selectivo del canal TREK-1. Nuestros datos indican que el efecto antialodínico del BL-1249 se previene por la administración de espadina. Estos resultados sugieren que el efecto antialodínico del BL-1249 es debido solo a la activación de los canales TREK-1. En apoyo a nuestros datos un estudio reciente demostró que la administración intratecal de espadina abate el efecto analgésico del riluzol, un activador no selectivo del canal TREK-1, en un modelo de dolor neuropático inducido por la administración aguda de oxaliplatino (Poupon et al., 2018). Además, estudios electrofisiológicos indican que la espadina bloquea de forma selectiva la actividad de los canales TREK-1 en células COS-7, en cultivos de neuronas piramidales, así como en neuronas de la región CA3 del hipocampo (Mazella et al., 2010; Heurteaux et al., 2011). De forma interesante también se ha descrito que la espadina promueve la internalización de aproximadamente el 80% de los canales expresados en la membrana plasmática, proceso por el cual se inhibe la actividad del canal (Mazella et al., 2010).

Por otra parte, la administración intratecal de espadina disminuyó los umbrales de estimulación mecánica en ratas intactas, efecto que es consistente con la alodinia táctil reportada en ratones *knockout* al canal TREK-1 (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009). De forma particular, estos datos sugieren que en condiciones basales los canales TREK-1 inhiben de forma constante la excitabilidad en neuronas sensoriales. Este mecanismo podría deberse a que el canal TREK-1 participa en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y su inhibición facilita la generación de potenciales de acción que contribuyen a la excitabilidad de los nociceptores (Bockenbauer et al., 2001; Wang et al., 2011).

### **10.3. Efecto de la forskolina y el forbol 12, 13-dibutirato sobre el BL-1249 en ratas con dolor neuropático**

La administración intratecal de forskolina y forbol 12,13-dibutirato, activadores de la PKA y la PKC respectivamente, disminuyó de manera dosis dependiente el efecto antialodínico inducido por la administración de BL-1249 en ratas con ligadura de los nervios espinales L5 y L6. De acuerdo con nuestros datos, un estudio *in vitro* reportó que la aplicación de forskolina y forbol 12,13-dibutirato bloquea la actividad del canal TREK-1 al facilitar la fosforilación de dos residuos de serina (S300 y S333) en el dominio C-terminal del canal (Murbartián et al., 2005). Con base en lo anterior, nuestros datos sugieren que la activación de las cinasas PKA y PKC podrían fosforilar al canal TREK-1 provocando una disminución en la probabilidad de apertura del canal y reduciendo su efecto antialodínico en ratas con dolor neuropático. En este contexto un número importante de estudios han evidenciado los efectos pronociceptivos de la administración de activadores de las cinasas en modelos *in vivo*. Por ejemplo, en ratas intactas la administración intraplantar de análogos de AMPc (Ferreira y Nakamura, 1979; Taiwo et al., 1989; Cunha et al., 1999; Sachs et al., 2009) o del activador de la adenilato ciclasa, la forskolina, producen alodinia mecánica (Taiwo y Levine, 1991; Kress et al., 1996). Asimismo, diversos estudios reportan que la PKA participa en el desarrollo de hipersensibilidad mecánica inducida por mediadores inflamatorios como PGE2 (Taiwo y Levine, 1991;

Malmberg et al., 1997a; Aley y Levine, 1999; Cunha et al., 1999; Kassuya et al., 2007).

Por otra parte, la administración intratecal de forbol 12,13-dibutirato, activador de la PKC, en ratas intactas disminuyó los umbrales de estimulación mecánica; efecto que se previno cuando se administró GF109203X, inhibidor de la PKC (Sluka y Audette, 2006). Aunque en el presente estudio la administración de forskolina y forbol 12,13-dibutirato no agravó el umbral de estimulación mecánica en ratas con ligadura de los nervios espinales, se ha reportado que la administración periférica de forbol-12,13-didecanoate (PDD), activador de la PKC, induce alodinia mecánica en ratones intactos, así como aumento de las conductas nociceptivas espontáneas (Souza et al., 2002). Además, la administración de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), activador de la PKC, aumenta las conductas nociceptivas en ratas con dolor neuropático inducido por cancer de hueso (An et al., 2018).

Algunos efectos pronociceptivos inducidos por la activación de la PKA y la PKC se han asociado a la fosforilación y sensibilización de canales iónicos, tales como los canales  $Na_v$  1.8,  $Na_v$  1.9, TRPV1, canales ASIC y P2X3. Estos canales son cruciales en la regulación de la excitabilidad neuronal (England et al., 1996; Fitzgerald et al., 1999; Rathee et al., 2002; Bhave et al., 2003; Moriyama et al., 2003; Wang et al., 2008; Li et al., 2014).

Es importante mencionar que en estados de dolor neuropático se promueve la liberación sostenida de mediadores inflamatorios (Basbaum et al., 2009), los cuales interaccionan con receptores acoplados a proteínas G en la membrana plasmática desencadenando la activación de la PKA y PKC (Maingret et al., 2000; Dong et al., 2001; Hucho y Levine, 2007; Basbaum et al., 2009). Este mecanismo de retroalimentación positiva podría inhibir de forma constante la función del canal TREK-1, favoreciendo su fosforilación, reduciendo su probabilidad de apertura y contribuyendo al aumento de la excitabilidad neuronal lo que propicia el establecimiento de condiciones de dolor crónico.

#### **10.4. Efecto de Rp-cAMP y Gö-6983 sobre el BL-1249 en ratas con dolor neuropático**

De manera opuesta al efecto inducido por los activadores de las cinasas, la administración de Rp-cAMP y Gö-6983 a las dosis de 1 mM, pero no a la dosis de 100  $\mu$ M, aumentó sutilmente el efecto antialodínico inducido por la administración de BL-1249 (1  $\mu$ M). De acuerdo con nuestra observación, un estudio electrofisiológico demostró que la aplicación de forskolina o forbol 12,13-dibutirato disminuye la conductancia del canal TREK-1; efecto que se previene cuando se incuba con bisindolilmaleimida y Rp-cAMP, inhibidores de la PKC y PKA, respectivamente (Murbartían et al., 2005). Además, se ha reportado que la inhibición farmacológica de las cinasas tiene efectos antinociceptivos en modelos *in vivo*. Por ejemplo, en ratas con dolor neuropático la administración intratecal de H89, inhibidor PKA, disminuyó la hipersensibilidad mecánica inducida por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 (Hua et al., 1999). De igual manera, los inhibidores de la PKC, bisindolilmaleimida I, PKC (19-3) y celeritrina, administrados de manera intratecal, generaron efectos antialodínicos en ratas con dolor neuropático (Hua et al., 1999). Con base en la evidencia mostrada previamente, nuestros datos sugieren que la reducción en la actividad de la PKA y la PKC favorece el efecto antialodínico del canal TREK-1 en ratas con dolor neuropático.

Es importante enfatizar que la administración de Rp-cAMP y Gö-6983 disminuyó la alodinia táctil inducida por la ligadura de los nervios espinales. Este efecto puede explicarse debido a que la PKA y PKC son efectoras de múltiples mecanismos de señalización (Murray, 2008; Rosse et al., 2010). En este contexto, se sabe que existen al menos seis isoformas de la PKC expresadas en neuronas del GRD (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  I y II, PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  y PKC $\mu$ ) (Morioka et al., 2013) y en la médula espinal (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  I, PKC $\beta$  II, y PKC $\gamma$ ) (Sluka y Audette, 2006). Estudios previos han demostrado que solo la PKC $\epsilon$  en neuronas del GRD contribuye en el desarrollo de alodinia e hiperalgesia (Cesare et al., 1999; Khasar et al., 1999; Olah et al., 2002; Parada et al., 2005; Amadesi et al., 2006). La isoforma PKC $\gamma$  participa en gran medida a la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Polgar et al., 1999; Martin et al.,

2001), incrementando las corrientes evocadas por el canal NMDA en la médula espinal, impidiendo el bloqueo dependiente de voltaje del ion  $Mg^{2+}$  y contribuyendo así en el mecanismo de sensibilización central (Chen y Huang, 1992). Aunque la mayoría de los estudios en el contexto del dolor no toman en cuenta las diferentes isoformas de la PKA, recientemente se ha demostrado que la subunidad RII $\beta$  de la isoforma PKA-II se expresa de forma selectiva en fibras aferentes primarias. Además, solo la isoforma PKA-II se activa en respuesta a PGE2 en neuronas del GRD (Isensee et al., 2014).

De acuerdo con la evidencia mencionada anteriormente, aunque las cinasas ejercen funciones fisiológicas intrínsecas (Malmberg et al., 1997b; Hu, 2003; Velázquez et al., 2007; Sachs et al., 2009; Isensee et al., 2014), nuestros datos sugieren que la fosforilación del canal TREK-1, por la cinasas PKA y PKC, regula su papel antialodínico en el dolor neuropático.

#### **10.5. La ligadura de los nervios espinales aumenta la expresión del canal TREK-1 en neuronas del GRD**

El canal TREK-1 se expresa predominantemente en el sistema nervioso central. De manera específica se encuentra en la amígdala, los ganglios basales, la corteza, los GRDs y el hipocampo (Talley et al., 2001; Medhurst et al., 2001; Alloui et al., 2006). En neuronas del GRD su expresión se asocia a neuronas pequeñas y medianas donde se encuentra en fibras C peptidérgicas y no peptidérgicas (Talley et al., 2001; Alloui et al., 2006; Loucif et al., 2018; Viatchenko et al., 2018). Estudios de secuenciación del ARN en neuronas del GRD de rata demuestran que los canales TREK-1 se encuentran mayoritariamente en fibras C no peptidérgicas, contrariamente su expresión en fibras A es baja (Loucif et al., 2017). Durante el desarrollo de dolor crónico, las fibras mielinizadas A $\beta$  que en condiciones basales participan como mecanorreceptores de bajo umbral, modifican su fenotipo convirtiéndose en fibras de tipo C y A $\delta$  de alto umbral (Costigan y Woolf, 2000). Aunado a esto, dichas fibras presentan cambios en su patrón de inervación en el asta dorsal de la médula espinal proyectando ahora hacia láminas más superficiales (lámina II), lo que les permite contribuir en el desarrollo de alodinia mecánica

(Sawynok y Liu, 2003). El cambio en el fenotipo de las fibras sensoriales podría favorecer la expresión del canal TREK-1, proporcionando un tono inhibitorio basal que regule el potencial de membrana en reposo y contrarreste el desarrollo de la alodinia mecánica durante el dolor neuropático (Levitz et al., 2016).

Nuestros datos indican que la ligadura de los nervios espinales aumenta la expresión del canal TREK-1 en neuronas de GRD de L5 y L4. Debido a que la lesión de los nervios espinales favorece de forma particular la expresión del canal los días 7 y 14, es probable que el canal TREK-1 ejerza un efecto neuroprotector durante el mantenimiento del dolor crónico. En este sentido se ha reportado que los canales TREK-1 aumentan su expresión en la región CA1 del hipocampo durante el desarrollo de isquemia cerebral en ratas (Wang et al., 2012). Además, el efecto neuroprotector del canal TREK-1 en condiciones patológicas como la isquemia está asociado a su interacción con activadores endógenos como los ácidos grasos poliinsaturados y fosfolípidos. Estos mecanismos contrarrestan la excitabilidad neuronal confiriendo un papel neuroprotector a los canales TREK-1 (Lauritzen et al., 2000; Blondeau et al., 2002; Buckler y Honoré, 2005; Wang et al., 2012). De acuerdo con lo anterior, durante el desarrollo del dolor neuropático los canales TREK-1 podrían desempeñar un papel neuroprotector, aumentando su expresión y contrarrestando la excitabilidad periférica desregulada.

El aumento en la expresión de los canales TREK-1 observado en el presente estudio coincide con lo reportado por Han y colaboradores (Han et al., 2016), los cuales observaron que el canal TREK-1 aumentaba su expresión en los GRD de ratón 7 días después de la constricción crónica del nervio ciático. Asimismo, otro estudio publicado recientemente demuestra que los canales TREK-1 aumentan su expresión en el GRD de L4 y L5 después de la constricción crónica del nervio ciático (Shi et al., 2018).

Es importante mencionar que la ligadura de los nervios espinales aumentó la expresión del canal TREK-1 en el GRD L4 no lesionado (7 y 14 días después de la lesión). De acuerdo con lo anterior, diversos estudios han reportado que las neuronas no lesionadas del GRD participan en el desarrollo del dolor neuropático

contribuyendo al aumento de la excitabilidad neuronal (Michaelis et al., 2000; Wu et al., 2001; Hudson et al., 2001; Sapunar et al., 2005; Chen et al., 2011). Los cambios en las fibras no lesionadas podrían explicarse debido a la acción crónica de citocinas y factores neurotróficos liberados por fibras aferentes o células adyacentes lesionadas, las cuales promueven cambios fenotípicos en la expresión de receptores y canales iónicos de las fibras no lesionadas. En este sentido, se ha reportado que disminuir la expresión del receptor al factor de necrosis tumoral (TNFR1) y del receptor a TNF- $\alpha$  en neuronas del GRD L4 no lesionado inhibe significativamente la expresión de los canales Nav1.3 y Nav1.8 en un modelo de dolor neuropático inducido por la transección ventral del ganglio L5 (He et al., 2010; Chen et al., 2011). Además, el aumento de IL-1 $\beta$  se ha asociado al incremento en la expresión del canal Cav2.2 en el GRD L4 no lesionado (Yang et al., 2018).

Es importante enfatizar que en fibras no lesionadas existe una expresión diferencial de canales iónicos. Por ejemplo, datos de nuestro grupo de trabajo demuestran que en el dolor neuropático inducido por la ligadura de los nervios espinales L5 y L6 aumenta la expresión del canal anoctamina-1 en neuronas del GRD L4 no lesionadas (García et al., 2018). Asimismo, se ha reportado que el canal TRPV1 aumenta su expresión en el GRD L4 no lesionado, posterior a la ligadura del nervio espinal L5 (Hudson et al., 2001). De igual forma, en fibras no lesionadas aumenta la expresión de canales Nav 1.8 y Nav 1.3, mecanismo que está asociado a la actividad ectópica de las fibras no lesionadas (Gold et al., 2003; Zhang et al., 2004; He et al., 2010; Chen et al., 2011).

De acuerdo con la evidencia mostrada anteriormente es posible inferir que las fibras aferentes primarias lesionadas promueven la liberación de mediadores inflamatorios, como IL-1 $\beta$  (Yang et al., 2018), TNF- $\alpha$  (Schäfers et al., 2003; Xu et al., 2006) y BDNF (Fukuoka et al., 2001), en las fibras no lesionadas adyacentes, generando cambios en la expresión de canales iónicos que finalmente contribuyen al desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático.

## **11. CONCLUSIONES**

- La activación del canal TREK-1 tiene efecto antialodínico en ratas con dolor neuropático.
- La activación de la PKA y PKC reduce el efecto antialodínico inducido por la activación de los canales TREK-1, mientras que la inhibición de la PKA y PKC aumenta el efecto antialodínico de los canales TREK-1.
- El canal TREK-1 tienen un papel inhibitorio tónico en ratas intactas.
- La ligadura de los nervios espinales L5 y L6 aumenta la expresión del canal TREK-1 en el GRD de L4 y L5.

## **12. CONCLUSIÓN GENERAL**

- Los datos obtenidos indican que el canal TREK-1 tiene un papel antialodínico en el dolor neuropático y que este efecto puede ser regulado por mecanismos de señalización intracelular dependientes de la fosforilación por la PKA y PKC.

### 13. PERSPECTIVAS

- Evaluar mediante inmunohistoquímica la distribución subcelular del canal TREK-1 y las cinasas PKA y PKC en neuronas del GRD de rata.
- Evaluar mediante *western blot* la expresión del canal TREK-1 fosforilado después de la inducción de dolor neuropático.
- Evaluar mediante electrofisiología el papel de los inhibidores y activadores de las cinasas PKA y PKC sobre el canal TREK-1 en cultivo de neuronas del GRD.

## 14. REFERENCIAS

- Abraira E, Kuehn V, Chirila A, Heintz N, Hughes D, Ginty D. The cellular and synaptic architecture of the mechanosensory dorsal horn. *Cell* 2017;168(1-2):295-310.
- Acosta C, Djouhri L, Watkins R, Berry C, Bromage K, Lawson S. TREK-2 Expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous Pain. *J. Neurosci.* 2014;34(4):1494-1509.
- Aley K, Levine J. Role of protein kinase a in the maintenance of inflammatory pain. *J. Neurosci.* 1999;19(6):2181-2186.
- Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* 2006;25(11):2368-2376.
- Amadesi S, Cottrell G, Divino L, Chapman K, Grady E, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N and Bunnett N. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C $\epsilon$ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J. Physiol.* 2006;575(2):555-571.
- An K, Rong H, Ni H, Zhu C, Xu L, Liu Q, Chena Y, Zheng Y, Huang B, Yaob M. Spinal PKC activation-induced neuronal HMGB1 translocation contributes to hyperalgesia in a bone cancer pain model in rats. *Exp. Neurol.* 2018;303:80-94.
- Andoh T, Kuraishi Y. Expression of BLT1 leukotriene B4 receptor on the dorsal root ganglion neurons in mice. *Mol. Brain Res.* 2005;137(1-2):263-266.
- Ashmawi H, Freire G. Peripheral and central sensitization. *Rev. Dor.* 2016; 17:31-34.
- Basbaum A, Bautista D, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139(2):267-284.
- Bearzatto B, Lesage F, Reyes R, Lazdunski M, Laduron P. Axonal transport of TREK and TRAAK potassium channels in rat sciatic nerves. *Neuroreport.* 2000;11(5):927-930
- Beggs S, Liu X, Kwan C, Salter M. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Mol. Pain* 2010;6(1):74.
- Bennett G, Xie Y. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33(1):87-107.
- Bhave G, Hu H, Glauner K, Zhu W, Wang H, Brasier D, Oxford G, Gereau R. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100(21):12480-12485.
- Binshtok A, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Shi L, Brenner G, Ji R, Bean B, Woolf C. Nociceptors are interleukin-1 $\beta$  sensors. *J. Neurosci.* 2009;28(52):14062-14073.
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 2002;109(2):231-241.

Bockenbauer D, Zilberberg N, Goldstein S. KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nat. Neurosci.* 2001;4(5):486-491.

Borsotto M, Veyssiere J, Moha Ou Maati H, Devader C, Mazella J, Heurteaux C. Targeting two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *Br. J. Pharmacol.* 2015;172(3):771-784.

Buckler K, Honoré E. The lipid-activated two-pore domain K<sup>+</sup> channel TREK-1 is resistant to hypoxia: implication for ischaemic neuroprotection. *J. Physiol.* 2005;562(1):213-222.

Busserolles J, Tsantoulas C, Eschalier A, López J. Potassium channels in neuropathic pain. *Pain* 2016;157(2):7-14.

Calvo M, Dawes J, Bennett D. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol.* 2012;11(7):629-642.

Cameron D, Polgar E, Gutierrez M, Gomez M, Watanabe M, Todd A. The organisation of spinoparabrachial neurons in the mouse. *Pain* 2015;156(10):2061-2071.

Cao L, Veale EL, Mathie A, Stevens E (2010). Differential modulation of TREK-1, TASK-3 and TRESK K2P ion channels by BL-1249. Program No. 174.6/KK13. 2010 Neuroscience meeting planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience Online.

Cesare P, Dekker L, Sardini A, Parker P, McNaughton P. Specific involvement of PKC-ε in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 1999;23(3):617-624.

Chaplan S, Bach F, Pogrel J, Chung J, Yaksh T. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 1994;53(1):55-63.

Chemin J, Girard C, Duprat F, Lesage F, Romey G, Lazdunski M. Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K<sup>+</sup> channels. *EMBO J.* 2003;22(20):5403-5411.

Chen L, Huang L. Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channel as a mechanism of modulation. *Nature* 1992;355:57-59.

Chen S, Cai Y, Pan H. Plasticity and emerging role of BK<sub>Ca</sub> channels in nociceptive control in neuropathic pain. *J Neurochem.* 2009;1(3):233-245.

Chen X, Pang R, Shen K, Zimmermann M, Xin W, Li Y, Liu X. TNF-α enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury. *Exp. Neurol.* 2011;227(2):279-286.

Chien L, Cheng J, Chu D, Cheng C, Tsaor M. Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J. Neurosci.* 2007;27(37):9855-9865.

Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson A, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup N, Eccleston C, Kalso E, Bennett D, Dworkin R, Raja S. Neuropathic pain. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017;3:1-20.

Constantin C, Mair N, Sailer C, Andratsch M, Xu Z, Blumer M, Scherbakov N, Davis J, Bluethmann H, Ji R, Kress M. Endogenous tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) requires tnfr receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. *J. Neurosci.* 2008;28(19):5072-5081.

Cook A, Christensen A, Tewari D, McMahon S, Hamilton J. Immune cytokines and their receptors in inflammatory pain. *Cell Press* 2018;1-16.

Costigan M, Scholz J, Woolf C. Neuropathic pain. *Annu Rev Neurosci.* 2009;(32):1-32.

Costigan M, Woolf C. Pain: Molecular mechanisms. *J. Pain* 2000;1:35-44.

Coull J, Boudreau D, Bachand K, Prescott S, Nault F, Sik A, Koninck P, Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003;424(6951):938-942.

Crandall M, Kwash J, Yu W, White G. Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain* 2002;98(1-2):109-117.

Cunha F, Teixeira M, Ferreira S. Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP on inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 1999;127(3):671-678.

Decher N, Ortiz-Bonnin B, Friedrich C, Schewe M, Kiper A, Rinné S, Seemann G, Peyronnet R, Zumhagen S, Bustos D, Kockskämper J, Kohl P, Just S, González W, Baukrowitz T, Stallmeyer B, Schulze-Bahr E. Sodium permeable and "hypersensitive" TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Mol. Med.* 2017;9(4):403-414.

Devilliers M, Busserolles J, Lolignier S, Deval E, Pereira V, Alloui A, Christin M, Mazet B, Delmas P, Noel J, Lazdunski M, Eschalier A. Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* 2013;2941(4):1-9.

Devor M. Ectopic discharge in A $\beta$  afferents as a source of neuropathic pain. *Exp. Brain Res.* 2009;196(1):115-128.

Di Castro A, Drew L, Wood J, Cesare P. Modulation of sensory neuron mechanotransduction by PKC- and nerve growth factor-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(12):4699-4704.

Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R, Wischmeyer E, Döring F. TRESK two pore domain K<sup>+</sup> channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 2007;585(3):867-879.

Dodson P, Billups B, Rusznák Z, Szűcs G, Barker M, Forsythe I. Presynaptic rat K<sub>v</sub>1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *J. Physiol.* 2003;550(1):27-33.

Dong X, Han S, Zylka M, Simon M, Anderson D. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 2001;106(5):619-632.

Dong Y, Pike A, Mackenzie A, Mcclenaghan C, Dong L, Quigley A, Grieben M, Goubin S, Mukhopadhyay S, Ruda S, Clausen M, Cao L, Brennan P, Burgess-Brown N, Sansom N,

Tucker S, Carpenter E. Supplementary materials for a complex with Prozac. *Science* 2015;347(6227):1256-1259.

Dremier S, Kopperud R, Doskeland S, Dumont J, Maenhaut C. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Lett.* 2003;546(1):103-107.

Du X, Gamper N. Potassium channels in peripheral pain pathways: expression, function and therapeutic potential. *Curr. Neuropharmacol.* 2013;11(6):621-640.

Eckert M, Egenberger B, Döring F, Wischmeyer E. TREK-1 isoforms generated by alternative translation initiation display different susceptibility to the antidepressant fluoxetine. *Neuropharmacology.* 2011;61(5-6):918-923.

Ehling P, Cerina M, Budde T, Meuth S, Bittner S. The CNS under pathophysiologic attack examining the role of K2P channels. *Eur. J. Physiol.* 2015;467(5):959-972.

Ellis A, Bennett D. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br. J. Anaesth.* 2013;111(1):26-37.

England S, Bevan S, Docherty R. PGE2 modulates the tetrodotoxin resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.* 1996;495(2):429-440.

Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* 2010;90(2):559-605.

Enyedi P, Czirják G. Properties, regulation, pharmacology, and functions of the K2P channel, TREK. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2015;467(5):945-958.

Eskander M, Ruparel S, Green D, Chen P, Por E, Jeske E, Gao X, Flores E, Hargreaves K. Persistent nociception triggered by nerve growth factor (NGF) is mediated by TRPV1 and oxidative mechanisms. *J. Neurosci.* 2015;35(22):8593-8603.

Fan H, Zhang X, McNaughton P. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2009;284(41):27884-27891.

Fang D, Kong L, Cai J, Li S, Liu X, Han J, Xing G. Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain* 2015;156(6):1124-1144.

Fang Y, Huang X, Wan Y, Tian H, Tian Y, Wang W, Zhiu S, Xie M. Deficiency of TREK-1 potassium channel exacerbates secondary injury following spinal cord injury in mice. *J. Neurochem.* 2017;141(2):236-246.

Feliciangeli S, Chatelain F, Bichet D, Lesage F. The family of K2P channels: salient structural and functional properties. *J. Physiol.* 2015;593(12):2587-2603.

Felmy F, Rosenmund C, Sachs F, Schneggenburger R, Schultz G, Wo M. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003;424:1-6.

Ferreira SH, Nakamura M. Prostaglandin hyperalgesia, A cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. *Prostaglandins* 1979;18(2):179-190.

Ferrini F, Trang T, Mattioli T, Laffray S. Morphine hyperalgesia gated through microglia mediated disruption of neuronal Cl<sup>-</sup> homeostasis. *Nat. Neurosci.* 2016;16(2):183-192.

Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *EMBO J.* 1996;15(24):6854-6862.

Finnerup N, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett D, Bouhassira D, Cruccu G, Freeman R, Hansson P, Nurmikko T, Rajam S, Ricen A, Serra J, Smith B, Treder R, Jensen T. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain* 2016;157(8):1599-1606.

Finnerup N, Sindrup S, Jensen T. Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2007;21(2):129-136.

Fitzgerald E, Okuse K, Wood J, Dolphin A, Moss S. cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin resistant voltage dependent sodium channel SNS. *J. Physiol.* 1999;516:433-446.

Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K. Brain derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J. Neurosci.* 2001;21(13):4891-4900.

García G, Martínez V, Oviedo N, Murbartian J. Blockade of anoctamin-1 in injured and uninjured nerves reduces neuropathic pain. *Brain Res.* 2018;1696:38-48.

Ginty D, Bonni A, Greenberg M. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 1994;77:1-13.

Giordano J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician* 2005;8(3):277-290.

Gold M, Weinreich D, Kim C, Wang R, Treanor J, Porreca F, Lai J. Redistribution of Nav1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J. Neurosci.* 2003;23(1):158-166.

Gonzalez G, Montminy M. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 1989;59(4):675-680.

Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller H, Johannes F. Inhibition of protein kinase C  $\mu$  by various inhibitors. Inhibition from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* 1996;392(2):77-80.

Guan Z, Kuhn J, Wang X, Colquitt B, Solorzano C, Vaman S, Guan A, Evans-Reinsch Z, Braz J, Devor M, Werner S, Lanier L, Lomvardas S, Basbaum A. Injured sensory neuron derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. *Nat. Neurosci.* 2015;19(1):94-101.

Gwak Y, Hulsebosch C. GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology.* 2011;60(5):799-808.

Han H, Lee S, Kim G, Kim E, Kwon B, Kang D, Kim H, Seo K. Enhanced expression of TREK-1 is related with chronic constriction injury of neuropathic pain mouse model in dorsal root ganglion. *Biomol. Ther.* 2016;24(3):252-259.

- He X, Zang Y, Chen X, Pang RP, Xu JT, Zhou X, Wei H, Li Y, Xin Y, Qin Z, Liu X. TNF- $\alpha$  contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain* 2010;151(2):266-279.
- Hervieu G, Cluderay J, Gray C, Green J, Ranson J, Randall A, Meadows H. Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* 2001;103(4):899-919.
- Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G and Lazdunski M. TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* 2004;23(13):2684-2695.
- Heurteaux C, Lucas G, Guy N, Yacoubi M, Thümmeler S, Peng X, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois J, Debonnel G, Lazdunski M. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* 2006;9(9):1134-1141.
- Heurteaux C, Mazella J, Borsotto M. Spadin, a sortilin-derived peptide: A new concept in the antidepressant drug design. *OCL.* 2011;18(4):202-207.
- Honoré E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8(4):251-261.
- Hu H. ERK Integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. II. modulation of neuronal excitability. *J. Neurophysiol.* 2003;90(3):1680-1688.
- Hua X, Chen P, Yaksh T. Inhibition of spinal protein kinase C reduces nerve injury-induced tactile allodynia in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.* 1999;276(2):99-102.
- Huang Y, Zhang Q, Wu H, Zhang C. A comparison of surgical invasions for spinal nerve ligation with or without paraspinal muscle removal in a rat neuropathic pain model. *Biomed. Res. Int.* 2016;2016:1-8.
- Hucho T, Levine J. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 2007;55(3):365-376.
- Hudson L, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 2001;13(11):2105-2114.
- Ikoma A, Cevikbas F, Kempkes C, Steinhoff M. Anatomy and neurophysiology of pruritus. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 2011;30(2):64-70.
- Imlach W, Bhole R, Mohammadi S, Christie M. Glycinergic dysfunction in a subpopulation of dorsal horn interneurons in a rat model of neuropathic pain. *Sci. Rep.* 2016;6:1-14.
- Inoue K, Tsuda M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nature* 2018;19(3):138-152.

Isensee J, Diskar M, Waldherr S, Buschow R, Hasenauer J, Prinz A, Allgo F, Herberg F, Hucho T. Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons. *J. Cell Sci.* 2014;127(1):216-129.

Iyengar S, Ossipov M, Johnson K. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain.* 2017;158(4):543-59.

Jensen T, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser J, Rice A, Treede R. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 2011;152(10):2204-2205.

Ji R, Samad T, Jin S, Schmoll R, Woolf C. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 2002;36(1):57-68.

Ji R, Kohno T, Moore K, Woolf C. Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 2003;26(12):696-705.

Jin S, Zhuang Z, Woolf C, Ji R. p38 Mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J. Neurosci.* 2003;23(10):4017-4022.

Kassuya C, Ferreira J, Claudino R, Calixto J. Intraplantar PGE 2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid e receptors and protein kinases. *Br. J. Pharmacol.* 2007;150(6):727-737.

Kemp B, Pearson R. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* 1990;15(9):345-349.

Kennard L, Chumbley J, Ranatunga K, Armstrong S, Veale E, Mathie A. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br. J. Pharmacol.* 2005;144(6):821-829.

Khasar S, Lin Y, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, Hundle H, Aley A, Isenberg W, McCarter W, Green P, Hodge C, Levine J, Messing R. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase c  $\epsilon$  mutant mice. *Neuron* 1999;24(1):253-260.

Kim D. Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* 2005;11(21):2717-2736.

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

Kim Y, Back S, Davies A, Jeong H, Jo H, Chung G, Na S, Bae Y, Kim S, Kim J, Jung J, Bae Oh S. TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord. *Neuron* 2012;74(4):640-647.

Ko F, Chang Y, Kuo Y, Lin Y, Teng C. Daphnoretin, a new protein kinase C activator isolated from *Wikstroemia Indica* C.A. Mey. *Biochem J.* 1993;327:321-327.

Kobayashi M, Konishi H, Sayo A, Takai T, Kiyama H. TREM2/DAP12 signal elicits proinflammatory response in microglia and exacerbates neuropathic pain. *J. Neurosci.* 2016;36(43):11138-11150.

Koh S, Monaghan K, Sergeant G, Ro S, Walker R, Sanders K, Seungil Ro, Walker R, Sanders K, Horowitz B. TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase: an essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. *J. Biol. Chem.* 2001;276(47):44338-44346.

Kress M, Rödl J, Reeh P. Stable analogues of cyclic AMP but not cyclic GMP sensitize unmyelinated primary afferents in rat skin to heat stimulation but not to inflammatory mediators, in vitro. *Neuroscience* 1996;74(2):609-617.

Kubo Y, Adelman J, Clapham D, Jan L, Karschin A, Lazdunski M, Nichols C, Seino S. International union of pharmacology. LII. nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 2005;57(4):463-472.

Langeslag M, Quarta S, Leitner MG, Kress M, Mair N. Sphingosine 1-phosphate to p38 signaling via S1P1 receptor and Gai/o evokes augmentation of capsaicin-induced ionic currents in mouse sensory neurons. *Mol. Pain* 2014;10(74):1-10.

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

Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* 2000;19(8):1784-1793.

Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. Human TREK-2, a 2P domain mechanosensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 2000;275(37):28398-28405.

Levitz J, Royal P, Comoglio Y, Wdziekonski B, Schaub S, Clemens D, Isacoffa E, Sandoz G. Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016;113(15):4194-4199.

Li L, Hasan R, Zhang X. The basal thermal sensitivity of the TRPV1 ion channel is determined by PKC II. *J. Neurosci.* 2014;34(24):8246-8258.

Li X, Toyoda H. Role of leak potassium channels in pain signaling. *Brain Res. Bull.* 2015;119:73-79.

Lim H, Lee H, Noh K, Lee S. IKK/NF-kappaB dependent satellite glia activation induces spinal cord microglia activation and neuropathic pain after nerve injury. *Pain* 2017;158(9):1666-1677.

Loucif A, Saintot P, Liu J, Antonio B, Zellmer S, Yoger K, Veale E, Wilbrey A, Omoto K, Cao K, Gutteridge A, Castle N, Stevens E, Mathie A. GI-530159, a novel, selective, mechanosensitive two-pore-domain potassium (K2P) channel opener, reduces rat dorsal root ganglion neuron excitability. *Br. J. Pharmacol.* 2017;175(12):2272-2283.

Lu Y, Don H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu S, Xia N. A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *J. Clin. Invest.* 2013;123(9):327-343.

Luo Y, Kuang S, Li H, Ran D, Yang J. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Oncotarget* 2017;8(22):35558-35572.

Maingret F, Honoré E, Lazdunski M, Patel A. Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;292(2):339-346.

Maingret F, Lauritzen I, Patel A, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honoré H. TREK-1 is a heat-activated background K<sup>+</sup> channel. *EMBO J.* 2000;19(11):2483-2489.

Maingret F, Patel A, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.* 1999;274(38):26691-26696.

Maljevic S, Lerche H. Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *J. Neurol.* 2013;260(9):2201-2211.

Malmberg B, Brandon E, Idzerda R, Liu H, McKnight G, Basbaum A. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* 1997a;17(19):7462-7470.

Malmberg A, Chen C, Tonegawa S, Basbaum A. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science* 1997b;278(5336):279-283.

Malsch P, Andratsch M, Vogl C, Link A, Alzheimer C, Brierley S, Hughes P, Kress M. Deletion of interleukin-6 signal transducer gp130 in small sensory neurons attenuates mechanonociception and down-regulates TRPA1 expression. *J. Neurosci.* 2014;34(30):9845-9856.

Marsh B, Acosta C, Djouhri L, Lawson S. Leak K<sup>+</sup> channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Mol. Cell. Neurosci.* 2012;49(3):375-386.

Martin W, Malmberg A, Basbaum A. PKC  $\gamma$  contributes to a subset of the NMDA- dependent spinal circuits that underlie injury- induced persistent pain. 2001;21:5321-5327.

Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K. IRF8 Is a Critical Transcription Factor for Transforming Microglia into a Reactive Phenotype. *Cell Rep.* 2012;1(4):334-340.

Mathie A, Veale E. Therapeutic potential of neuronal two-pore domain potassium-channel modulators. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2007;8(7):555-562.

Mathie A, Veale E. Two-pore domain potassium channels: potential therapeutic targets for the treatment of pain. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2015;467(5):931-943.

Mayer M, Westbrook G, Guthrie P. Voltage dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984;309(5965):261-263.

Mazella J, Pétrault O, Lucas G, Deval E, Béraud-Dufour S, Gandin C, El-Yacoubi M, Widmann C, Guyon A, Chevet E, Taouji S, Conductier G, Corinus A, Coppola T, Gobbi G,

Meacham K, Shepherd A, Mohapatra D, Haroutounian S. Neuropathic pain: central vs. peripheral mechanisms. *curr. Pain Headache Rep.* 2017;21(6):1-11.

Medhurst A, Rennie G, Chapman C, Meadows H, Duckworth M, Kellsell R, Gloger I, Pangalos M. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Mol. Brain Res.* 2001;86(1-2):101-114.

Meents J, Fischer M, McNaughton P. Sensitization of TRPA1 by protein kinase A. *PLoS One* 2017;12(1):1-15.

Michaelis M, Liu X, Jänig W. Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J. Neurosci.* 2000;20(7):2742-2748.

Milac A, Anishkin A, Fatakia S, Chow C, Sukharev S, Guy H. Structural models of TREK channels and their gating mechanism. *Channels* 2011;5(1):23-33.

Millan M. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 1999;57(1):1-164.

Miyabe T, Miletic V. Multiple kinase pathways mediate the early sciatic ligation-associated activation of CREB in the rat spinal dorsal horn. *Neurosci. Lett.* 2005;381(1-2):80-5.

Morenilla-Palao C, Planells R, García N, Ferrer A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* 2004;279(24):25665-25672.

Morioka N, Yoshida Y, Nakamura Y, Hidaka N, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y. The regulation of exon-specific brain-derived neurotrophic factor mRNA expression by protein kinase C in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 2013;1509:20-31.

Moriyama T, Lida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H, Leon C, Suzuki N, Inoue K, Gachet K, Noguchi K, Tominaga M. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J. Neurosci.* 2003; 23:6058-6062.

Murbartián J, Lei Q, Sando J, Bayliss D. Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J. Biol. Chem.* 2005;280(34):30175-31784.

Murray A. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci. Signal* 2008;1(22):1-6.

Nahon L, Heurteaux C, Borsotto M. Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol.* 2010;8(4).

Neer E. Heterotrimeric C proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995;80(2):249-257.

Nieto A, Picazo G, Llorente I, Jara I, Morales S, Escalante D, Islas L, Rosenbaum T. Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat. Chem. Biol.* 2012;8(1):78-85.

Noël J, Sandoz G, Lesage F. Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions *Channels* 2011;5(5):402-409.

Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M. The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 2009;28(9):1308-1318.

North R, Lazaro T, Dougherty P. Ectopic spontaneous afferent activity and neuropathic pain. *Neurosurgery* 2018; 65:49-54.

Olah Z, Karai L, Iadarola M. Protein kinase C $\alpha$  is required for vanilloid receptor 1 activation. *J. Biol. Chem.* 2002;277(38):35752-35759.

Parada C, Reichling D, Levine J. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKC $\epsilon$  second messenger pathways. *Pain* 2005;113(1-2):185-190.

Patel A, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J.* 1998;17(15):4283-4290.

Patestas M, Gartner L. Chapter 10: ascending Sensory Pathways. *A textbook of neuroanatomy.* 2009;137-170.

Peirs C, Seal R. Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 2016;354(6312):578-584.

Pidoux G, Taskén K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J. Mol. Endocrinol.* 2010;44(5):271-284.

Pinho-Ribeiro F, Verri W, Chiu I. Nociceptor sensory neuron immune interactions in pain and inflammation. *Cell* 2017;38(1):5-19.

Plant L. A Role for K2P Channels in the Operation of Somatosensory Nociceptors. *Front. Mol. Neurosci.* 2012;5:1-11.

Polgar E, Fowler J, McGill M, Todd A. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. *Brain Res.* 1999;71-80.

Poupon L, Lamoine S, Pereira V, Barriere DA, Lolignier S, Giraudet F, Aissouni Y, Meleine M, Prival L, Richard D, Kerckhove D, Authier N, Balayssac D, Eschalier A, Lazdunski M. Targeting the TREK-1 potassium channel via riluzole to eliminate the neuropathic and depressive-like effects of oxaliplatin. *Neuropharmacology.* 2018;140:43-61.

Prescott S, Ma Q, De Koninck Y. Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain. *Nat. Neurosci.* 2014;17(2):183-191.

Rathee P, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang G, Wang S, Wang S, Nau C, Kress M. PKA/AKAP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J. Neurosci.* 2002;22(11):4740-4745.

Rivera C, Li H, Crusells T, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl<sup>-</sup> extrusion. *J. Cell Biol.* 2002;159(5):747-752.

Robbins J, Boring D, Tang W, Shank W, Seamon K. Forskolin carbamates: binding and activation studies with type I adenylyl cyclase. *J. Med. Chem.* 1996;39(14):2745-2752.

Rodrigues N, Bennis K, Vivier D, Pereira V, Chatelain FC, Chapuy E, Deokar H, Busserolles J, Lesage F, Eschalier A, Ducki S. Synthesis and structure-activity relationship study of substituted caffeate esters as antinociceptive agents modulating the TREK-1 channel. *Eur. J. Med. Chem.* 2014;75:391-402.

Ron D, Kazanietz M. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 1999;13(13):1658-1676.

Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJM, Boeckeler K, Parker P. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(2):103-112.

Sachs D, Villarreal C, Cunha F, Parada C, Ferreira S. The role of PKA and PKC $\eta$  pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. *Br. J. Pharmacol.* 2009;156(5):826-834.

Sandkühler J, Lee J. How to erase memory traces of pain and fear. *Trends Neurosci.* 2013;36(6):343-352.

Sandoz G, Bell S, Isacoff E. Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108(6):2605-2610.

Sapunar D, Ljubkovic M, Lirk P, Mccallum J, Hogan Q. Pain and regional anesthesia distinct membrane effects of spinal nerve ligation on injured and adjacent dorsal root ganglion neurons in rats. *Anesthesiology* 2005;103(2):360-376.

Sascha R, Alles A, Smith P. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. *Pharmacol. Rev.* 2018;70(2):315-347.

Sawynok J, Liu X. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* 2003;69(5):313-340.

Schäfers M, Lee D, Brors D, Yaksh T, Sorkin L. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor- $\alpha$  after spinal nerve ligation. *J. Neurosci.* 2003;23(7):3028-3038.

Scholz J, Woolf C. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 2002;5(11):1062-1067.

Shi D, Yuan Y, Ye D, Kang L, Wen J, Chen H. MiR-183-5p alleviates chronic constriction injury-induced neuropathic pain through inhibition of TREK-1. *Neurochem. Res.* 2018;43(6):1143-1149.

Shrestha S, Parmar M, Kennedy C, Bushell T. Two-pore potassium ion channels are inhibited by both Gq/11- and Gi-coupled P2Y receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* 2010;43(4):363-369.

Sluka K, Audette K. Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Mol. Pain* 2006;2:1-9.

Smith B, Torrance N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Curr. Pain Head Rep.* 2012;16(3):191-198.

- Snider W, McMahon S. Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. *Neuron* 1998;20(4):629-632.
- Souza A, Moreira F, Almeida K, Bertollo C, Costa K, Coelho M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Br. J. Pharmacol.* 2002;135(1):239-247.
- Steeds C. The anatomy and physiology of pain. *Surg.* 2016;34(2):55-59.
- Steinberg E, Wafford K, Brickley S, Franks N, Wisden W. The role of K2P channels in anaesthesia and sleep. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2015;467(5):907-916.
- Taiwo Y, Bjerknes L, Goetzl E, Levine J. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 1989;32(3):577-580.
- Taiwo Y, Levine J. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 1991;44(1):131-135.
- Talley E, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss D. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* 2001;21(19):7491-7505.
- Tertyshnikova S, Knox R, Plym M, Thalody G, Griffin C, Neelands T, Harden D, Signor L, Weaver D, Myers R, Lodge N. BL-1249 [(5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl] amine]: a putative potassium channel opener with bladder-relaxant properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;313(1):250-259.
- Thomas D, Plant L, Wilkens C, McCrossan Z, Goldstein S. Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron* 2008;58(6):859-870.
- Todd A. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010;11(12):823-836.
- Torgersen K, Vaage J, Levy F, Hansson V, Rolstad B, Taskén K. Selective activation of cAMP-dependent protein kinase type I inhibits rat natural killer cell cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 1997;272(9):5495-5500.
- Treede R. Neurophysiological studies of pain pathways in peripheral and central nervous system disorders. *J. Neurol.* 2003;250(10):1152-1161.
- Treptow W, Klein M. The membrane-bound state of K2P potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132(23):8145-8151.
- Tsantoulas C, McMahon S. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* 2014;37(3):146-158.
- Tsantoulas C, Zhu L, Yip P, Grist J, Michael GJ, McMahon S. Kv2 dysfunction after peripheral axotomy enhances sensory neuron responsiveness to sustained input. *Exp. Neurol.* 2014;251:115-126.

Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J, Gasull X. TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol. Pain* 2011;7(30):1-17.

Van Hecke O, Austin S, Khan R, Smith B, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* 2014;155(4):654-662.

Veale E, Moubarak E, Bajaria N, Omoto K, Cao L, Tucker SJ, Stevens E, Mathie A. Influence of the N terminus on the biophysical properties and pharmacology of TREK1 potassium channels. *Mol. Pharmacol.* 2014;85(5):671-681.

Velázquez K, Mohammad H, Sweitzer S. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol. Res.* 2007;55(6):578-589.

Viatchenko V, Ling J, Gu J. Characterization of temperature-sensitive leak K<sup>+</sup> currents and expression of TRAAK, TREK-1, and TREK2 channels in dorsal root ganglion neurons of rats. *Mol. Brain* 2018;11(1):1-9.

Vivier D, Bennis K, Lesage F, Ducki S. Perspectives on the two-pore domain potassium channel TREK-1 (TWIK-Related K<sup>+</sup> Channel 1). A Novel Therapeutic Target? *J. Med. Chem.* 2016;59(11):5149-5157.

Wang L, Wang Z. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003;55(8):949-965.

Wang M, Song J, Xiao W, Yang L, Yuan J, Wang W, Yu Z, Xie M. Changes in lipid-sensitive two-pore domain potassium channel TREK-1 expression and its involvement in astrogliosis following cerebral ischemia in rats. *J. Mol. Neurosci.* 2012;46(2):384-392.

Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain* 2008;131(5):1241-1251.

Wang W, Gu J, Li Y, Tao Y. Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain? *Mol. Pain* 2011;7(16):1-9.

Waxman S, Zamponi G. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat. Neurosci.* 2014;17(2):153-163.

Woolf C. Pain: Moving from symptom control toward mechanism specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.* 2004;140:441-451.

Woolf C, Thompson S. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-d-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1991;44(3):293-299.

Wu G, Ringkamp M, Hartke T, Murinson B, Campbell J, Griffin J, Meyer R. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J. Neurosci.* 2001;21(8):1-5.

Xu J, Xin W, Zang Y, Wu C, Liu X. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by lumbal 5 ventral root transection in rat. *Pain* 2006;123(3):306-321.

Yamamoto Y, Hatakeyama T, Taniguchi K. Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 2009;454(2):129-133.

Yang J, Xie M, Hu L, Wang X, Mai J, Li Y, Wuf N, Zhangf C, Lif J, Panga R, Liu X. Upregulation of N-type calcium channels in the soma of uninjured dorsal root ganglion neurons contributes to neuropathic pain by increasing neuronal excitability following peripheral nerve injury. *Brain. Behav. Immun.* 2018; 71:52-65.

Zhang X, Huang J, McNaughton P. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* 2005;24(24):4211-4223.

Zhang X, Zhu C, Thimmapaya R, Choi W, Honore P, Scott V, Kroegerb P, Sullivana J, Faltyneka C, Gopalakrishnana M, Shieh C. Differential action potentials and firing patterns in injured and uninjured small dorsal root ganglion neurons after nerve injury. *Brain Res.* 2004;1009(1-2):147-158.