



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

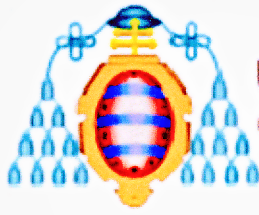
Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

“Estudio de la implicación de canales TRPV1 y TRPA1 en la hiperalgesia evocada por la quimiocina CCL5 en ratones”

Miguel García Álvarez

Julio 2015

Trabajo Fin de Máster



Universidad
de Oviedo



INSTITUTO
UNIVERSITARIO
DE ONCOLOGIA

OBRA SOCIAL CAJASTUR

Dña. Ana Baamonde Arbaiza y D. Luis Menéndez Antolín, profesores del Área de Farmacología, del Departamento de Medicina de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICAN:

Que el Graduado en Biología, D. Miguel García Álvarez, ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster titulado: “Estudio de la implicación de canales TRPV1 y TRPA1 en la hiperalgesia evocada por la quimiocina CCL5 en ratones”, que reúne a mi juicio las condiciones necesarias de originalidad y calidad para ser admitido como Trabajo Fin de Máster de la Universidad de Oviedo

Y para que así conste, firman la presente certificación.

Ana Baamonde Arbaiza

Luis Menéndez Antolín

Oviedo, a 30 de Junio de 2015

Índice

Abreviaturas.....	5
1. Resumen	6
2. Introducción.....	7
2.1. Definición de dolor y transmisión de las señales nociceptivas	7
2.2. Canales TRP	9
2.2.1. Canales TRP y su papel en la transmisión nociceptiva	11
2.2.1.1. Canales TRPV1	11
2.2.1.2. Canales TRPA1.....	12
2.3. Quimiocinas.....	13
2.3.1. Características generales	13
2.3.2. Receptores de quimiocinas y señalización intracelular.....	15
2.3.3. Características generales y funciones de la quimiocina CCL5	16
2.3.4. Papel de la quimiocinas en la transmisión nociceptiva.....	17
3. Justificación y objetivos.....	20
4. Materiales y Métodos.....	21
4.1. Animales	21
4.2. Fármacos.....	21
4.3. Valoración del tiempo de lamido.....	22
4.4. Test de la placa caliente unilateral.....	22
4.5. Ensayos inmunohistoquímicos	23
4.6. Análisis estadístico	24
5. Resultados.....	25
5.1. Efecto de la quimiocina CCL2 sobre el lamido evocado por la administración i.pl. de capsaicina. Implicación de los receptores CCR2	25
5.2. Efecto de la quimiocina CCL5 sobre el lamido evocado por el estímulo de canales TRPV1. Participación de receptores CCR1 y CCR5.....	27
5.3. Efecto de la quimiocina CCL5 sobre el lamido evocado por el estímulo de canales TRPA1. Participación de receptores CCR1 y CCR5	28
5.4. Efecto hiperalgésico de la administración de la quimiocina CCL5. Implicación de los receptores CCR1 y CCR5	30
5.5. Participación de los canales TRPV1 y TRPA1 en la hiperalgesia térmica evocada por la administración i.pl de CCL5 en ratones	33

5.6. Modulación por la CCL5 de la fosforilación de ERK en neuronas espinales de ratones tratados con capsaicina	34
6. Discusión	36
7. Conclusiones	41
8. Bibliografía.....	42

Abreviaturas

AITC: alil-isotiocianato

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CPZ: capsazepina

DAG: diacilglicerol

DRG: dorsal root ganglia

GPCR: G-protein coupled receptors

IASP: International Association for the Study of Pain

i.pl.: intraplantar

IP3: inositol 1,4,5-trifosfato

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; CCL2

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato

NMDA: N-metil D-aspartato

pERK: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PLC: fosfolipasa C

PKC: proteína cinasa C

RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; CCL5

TG: trigeminal ganglion

TRPM8: transient receptor potential melastatin 8

TRP: transient receptor potential

TRPA1: transient receptor potential ankyrin 1

TRPV1: transient receptor potential vanilloid 1

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

1. Resumen

Cada vez se dispone de más datos que indican la participación de algunas quimiocinas en el procesamiento de señales nociceptivas. Asimismo, algunos trabajos indican que quimiocinas como la CCL2 o la CCL3 podrían producir hiperalgesia actuando como sensibilizadores de canales TRP. En este trabajo, utilizando como referencia a la quimiocina CCL2, se llevaron a cabo experimentos con el fin de dilucidar si la propia CCL2 y la CCL5 son capaces de potenciar el comportamiento de lamido provocado en ratones por la administración intraplantar de agonistas TRPV1 y TRPA1, y determinar a través de qué receptores podrían hacerlo. Además, se estudió si la administración intraplantar de CCL5 en ratones produce hiperalgesia térmica mediada por receptores CCR1 y/o CCR5, y si en ella participa la sensibilización de los canales TRPV1 y TRPA1. Finalmente, se propuso comprobar si la administración de la quimiocina CCL5 aumenta la sensibilización central provocada por el agonista TRPV1 capsaicina, a través de la cuantificación de la expresión de la proteína pERK a nivel espinal mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Nuestros resultados indican que tanto la CCL2, actuando sobre receptores CCR2, como la CCL5, a través de receptores CCR1 y CCR5, potencian de una manera dependiente de la dosis el comportamiento de lamido provocado por los agonistas TRPV1 capsaicina y TRPA1 alil-isotiocianato. Apoyando la relevancia funcional de esta potenciación de la CCL5 sobre los canales TRP, pudimos observar que el bloqueo de canales TRPV1 y TRPA1 inhibe la hiperalgesia térmica que se produce tras la administración local de la CCL5 en la pata de los ratones. Finalmente, se realizaron ensayos inmunohistoquímicos preliminares que parecen indicar que los efectos amplificadores de la CCL5 no implican el establecimiento de sensibilización espinal, ya que la activación de pERK provocada por capsaicina en neuronas espinales no aumenta tras el tratamiento con CCL5.

2. Introducción

2.1. Definición de dolor y transmisión de las señales nociceptivas

Según la Asociación Internacional para el estudio del Dolor (IASP), el dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable frente a un daño tisular actual o potencial, o descrita en términos de ese daño. Es importante resaltar que el dolor no solo comprende una dimensión sensorial sino también componentes emocionales y cognitivos, configurando un proceso realmente complejo ya que cada persona percibe esta sensación de manera diferente. No debe confundirse el dolor, emoción totalmente subjetiva, con el concepto de nocicepción que se refiere al conjunto de procesos implicados en la detección y procesamiento de los estímulos que componen la experiencia dolorosa (Loeser y Treede, 2008). En el ámbito de la experimentación animal se estudian los aspectos relativos a la nocicepción ya que la experiencia dolorosa sufrida por los animales no resulta fácilmente cuantificable.

La captación y transmisión de señales nociceptivas comienza con los nociceptores, que constituyen una población heterogénea de neuronas periféricas capaces de detectar y transmitir estímulos nociceptivos térmicos, mecánicos o químicos. Son neuronas pseudounipolares con un terminal central y otro periférico que proceden de un tronco axonal común y que pueden tanto recibir como enviar información (Basbaum et al., 2009; Dubin y Patapoutian, 2010; Salat et al., 2013). En un nociceptor puede distinguirse una terminación nerviosa periférica que detecta los estímulos e inicia los potenciales de acción, un axón que los conduce, un soma que se encuentra localizado en los ganglios de la raíz dorsal (Dorsal Root Ganglia; DRG) o en el ganglio del trigémino (trigeminal ganglion; TG), y un terminal central que penetra en el asta dorsal de la médula espinal para hacer sinapsis con las neuronas nociceptivas de segundo orden (Basbaum et al., 2009).

Cuando el nociceptor recibe un estímulo externo de características apropiadas, se inicia el proceso de transducción que transforma este estímulo en potenciales de acción. Para que el nociceptor sea excitado es necesario que se genere una despolarización de la membrana, se alcance el potencial umbral y se inicie el potencial de acción que conduzca la información hasta la médula espinal, conducción en la que juegan un papel

fundamental los canales de Na^+ dependientes de voltaje. Además, es importante señalar que en la excitabilidad de los nociceptores participan tres clases de proteínas presentes en la superficie de los nociceptores: receptores ionotrópicos (la superfamilia más conocida son los canales TRP (transient receptor potential)), receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (G-protein coupled receptors, GPCR) y receptores con actividad tirosina cinasa (Gold y Gebhart, 2010). Algunos mediadores liberados por parte de las células no neuronales presentes en el tejido dañado o sus alrededores como la histamina, la bradisinina o las prostaglandinas, actúan sobre receptores acoplados a proteínas G generando un aumento en la respuesta y un descenso en el umbral de detección durante un daño tisular. Este fenómeno se conoce como sensibilización periférica y es el responsable de la hiperalgesia primaria que se detecta en los tejidos lesionados, donde estímulos de baja intensidad pueden producir dolor.

Una vez generados, los potenciales de acción son conducidos a la médula espinal, donde continúa el procesamiento de la señal nociceptiva. La transmisión en la médula es muy compleja, y en ella participan numerosos neurotransmisores excitadores e inhibidores, como el glutamato y la sustancia P, que son liberados por los nociceptores (Dubin y Patapoutian, 2010). La sustancia P se libera tras el estímulo doloroso en las sinapsis de la médula espinal desde los nociceptores peptidérgicos, junto con otros neuropéptidos como el CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) y el neuropéptido Y.

Por otra parte, la presencia de glutamato, el neurotransmisor excitador por excelencia en el Sistema Nervioso Central, es imprescindible para la transmisión nociceptiva y actúa fundamentalmente a través de 3 tipos de receptores: receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), receptores NMDA (N-metil D-aspartato) y receptores metabotrópicos de glutamato acoplados a proteínas G (mGluR) presentes en las neuronas postsinápticas del asta dorsal de la médula espinal. La conducción de la información nociceptiva en respuesta a un estímulo agudo leve deriva de la unión del glutamato, y en menor medida del aspartato, a los receptores AMPA generando la despolarización rápida de la membrana postsináptica y el incremento de la concentración de Na^+ intracelular en las neuronas espinales. Este mecanismo permite

la transmisión de potenciales de acción a neuronas nociceptivas supraespinales que llevan la información hasta el cerebro (Basbaum et al., 2009; Salat et al., 2013).

Ante una estimulación nociceptiva prolongada a nivel periférico, se produce una liberación continua de mediadores en la médula espinal como consecuencia del incremento en el número de potenciales de acción. Este estado de hipersensibilidad en el sistema nervioso central, que conduce al descenso del umbral y al aumento de la actividad de las neuronas nociceptivas espinales, conlleva un tipo de plasticidad sináptica que se conoce como sensibilización central (D'Mello y Dickenson, 2008; Woolf, 2011) y contribuye tanto a la amplificación de la sensación nociceptiva como al hecho de que la estimulación de áreas no dañadas situadas alrededor de la lesión original produzca dolor, lo que se conoce como hiperalgesia secundaria.

2.2. Canales TRP

Los miembros de la superfamilia de canales iónicos conocida como TRP comparten una serie de rasgos, como la presencia de 6 segmentos transmembrana, un grado variable de homología de secuencia, y la permeabilidad a cationes. A pesar de estas semejanzas, estos canales presentan mecanismos de activación específicos. De esta manera, un único canal TRP puede ser activado a través de mecanismos aparentemente dispares.

Constituyen un tipo de receptores permeables a Na^+ y Ca^{2+} que se localizan en la membrana de los nociceptores y cuya excitación los activa directamente. Una característica común de esta superfamilia es la importancia que tienen en las respuestas a todas las diferentes modalidades de estímulos externos, incluyendo luz, sonido, estímulos químicos, temperatura y tacto (Venkatachalam y Montell, 2007). Los canales TRP se expresan y funcionan en multitud de organismos multicelulares, y se dividen en los grupos 1 y 2, que se dividen a su vez en 7 subfamilias (Montell, 2005). Dentro de los TRP1 se encuentran las superfamilias TRPC, TRPV, TRPM, TRPA y TRPN, mientras que dentro de los TRP2 se encuentran las subfamilias TRPP y TRPML. Se ha descubierto una octava subfamilia, TRPY, formada por canales TRP de levaduras, que están relacionados lejanamente con los grupos 1 y 2 (Palmer et al., 2001). La existencia de estos canales en levaduras indica que el origen de esta superfamilia es anterior a la aparición de los metazoos.

En mamíferos, están presentes miembros de 6 subfamilias en función de la secuencia de aminoácidos que poseen: TRPC (1-7), TRPM (1-8), TRPA (1), TRPP, TRPML y TRPV (1-6). Estos canales son permeables a sodio y calcio y forman homo o heterodímeros que poseen terminales N y C citoplasmáticos (Levine y Alessandri-Haber, 2007). Además, su permeabilidad para diferentes cationes mono y bivalentes varía en función de los subtipos. Por ejemplo, los canales TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) son moderadamente más selectivos para iones de calcio que de sodio ($\approx 10:1$) (Salat et al., 2013).

Los modos de activación de los canales TRP en mamíferos se pueden dividir en tres categorías:

1. Activación directa: se puede producir por cambios en la temperatura ambiente que están fuertemente asociados a la apertura de canales TRPV1-3 y TRPM8 (transient receptor potential melastatin 8), así como por estímulos mecánicos, por acoplamiento a receptores inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), y por la fosforilación del canal (Vriens et al., 2004).
2. Activación por ligandos: existen ligandos que activan a los canales TRP y se clasifican en (a) moléculas orgánicas de pequeño tamaño exógenas que incluyen tanto compuestos sintéticos como productos naturales (capsaicina, icilina); (b) lípidos endógenos o productos del metabolismo lipídico (diacilgliceroles, fosfoinositidos); (c) nucleótidos de purina y sus metabolitos (adenosin-difosforibosa); o (d) iones inorgánicos, como los iones calcio, y magnesio (Ramsey et al., 2006).
3. Activación por receptor: los receptores acoplados a proteínas G y los receptores de tirosina cinasas que activan a las fosfolipasas C modulan los canales TRP de tres maneras diferentes: (a) mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), (b) mediante la producción de diacilglicerol (DAG), o (c) mediante la producción de IP3 y la consecuente liberación del calcio intracelular (Berridge et al., 2003; Clapham, 2003).

El mecanismo a través del cual un canal TRP concreto es activado y regulado no está asociado a su pertenencia a una subfamilia concreta. Sin embargo, en algunos casos hay semejanzas entre miembros de una misma subfamilia. Así, todos los canales TRPC

son activados a través de vías acopladas a la estimulación de la fosfolipasa C (PLC). Todo esto pone en evidencia que la mayoría de los canales TRP pueden ser activados a través de una gran diversidad de mecanismos. Así, existen canales TRP, como los pertenecientes a la subfamilia TRPV1 que responden a estímulos que van desde el calor hasta compuestos como la capsaicina y agentes proinflamatorios (Venkatachalam y Montell, 2007).

De los 28 canales TRP descubiertos hasta la fecha, 7 detectan temperaturas calientes o templadas (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4 y TRPM5), mientras que 2 son activados por frío o “frescor” (TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) y TRPM8). En conjunto, estos canales que reciben el nombre de “TermoTRPs”, detectan un amplio rango de temperatura con extremos desde los 10°C (TRPA1) hasta los 53°C (TRPV2) (Brederson et al., 2013).

2.2.1. Canales TRP y su papel en la transmisión nociceptiva

Las sustancias irritantes y picantes de las plantas de la pimienta, la menta y la mostaza han servido para identificar moléculas y mecanismos subyacentes en esta etapa inicial de la sensación dolorosa. Estos productos naturales han revelado la existencia de tres miembros de la superfamilia de canales iónicos TRP – TRPV1, TRPM8 y TRPA1 – como detectores moleculares de estímulos térmicos y químicos que activan neuronas sensitivas para producir dolor agudo o persistente. El análisis de la función y expresión de estos canales TRP ha contribuido a confirmar que los nociceptores son un grupo de neuronas sensitivas especializadas destinadas a la detección de estímulos (Julius, 2013). Aunque se han identificado varias subfamilias relacionadas con el dolor, este trabajo se centrará en las subfamilias de canales TRPV1 y TRPA1.

2.2.1.1. Canales TRPV1

Los canales TRPV1 permiten que los nociceptores aferentes primarios, u otras células, detecten cambios en la temperatura ambiente dentro de un amplio rango fisiológico (Patapoutian et al., 2003; Julius, 2005). Los TRPV1 son activados por temperaturas con un umbral de activación térmica de aproximadamente 43°C (Caterina et al., 1997). Fueron identificados por primera vez en neuronas de los DRG y del TG, y también se

expresan ampliamente en terminales nerviosos espinales y periféricos, así como en multitud de tipos celulares no neuronales (Pedersen, 2005).

Se ha descrito que ratones knockout para canales TRPV1 muestran un déficit parcial en la nocicepción térmica aguda, lo que avala la participación de este canal en el dolor evocado por calor (Julius, 2013). Es importante señalar que productos de daño tisular e inflamación pueden disminuir de manera notable este umbral, lo que demuestra que los canales TRPV1 son un componente esencial en los mecanismos de señalización celular a través de los cuales las lesiones producen hiperalgesia térmica e hipersensibilidad al dolor (Basbaum et al., 2009; Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000).

La expresión de estos canales en los nociceptores es consistente con la capacidad de los agonistas TRPV1, como la capsaicina (un compuesto químico picante que se encuentra en las guindillas), para desencadenar nocicepción en animales. Su activación en las fibras sensitivas también libera neuropéptidos como la sustancia P o el GCPR, provocando un incremento del flujo sanguíneo y edemas, un fenómeno denominado en ocasiones inflamación neurogénica (Szallasi y Blumberg, 1999). La característica más importante de los TRPV1 es su capacidad para integrar los efectos de múltiples estímulos nocivos y mediadores inflamatorios, una característica que, combinada con la localización celular de estos canales, proporciona una interesante base para la posible utilidad de los antagonistas TRPV1, como la capsazepina (CPZ), en el tratamiento del dolor (Cortright y Szallasi, 2009).

2.2.1.2. Canales TRPA1

Los canales TRPA1, que son conocidos como receptores de frío al ser activados a temperaturas bajas ($\approx 10^{\circ}\text{C}$), juegan un papel importante en la quimiocepción sirviendo como detectores de compuestos químicos irritantes que pueden desencadenar dolor inflamatorio (Julius, 2013). Son activados por componentes picantes del aceite de mostaza, ajo, aceite de gaulteria, aceite de clavo, jengibre y aceite de canela, y en todos ellos induce un ardor agudo y doloroso o una sensación de picor. Además, estudios recientes muestran que estos canales también pueden ser activados por calor

ya que la administración de agonistas TRPA1 es capaz de inducir hiperalgesia térmica (Tsagareli et al., 2010; Hoffman et al., 2013).

Están localizados tanto en tejidos neuronales como no neuronales ya que se expresan en las células pilosas, pero también en las neuronas de los DRG y del TG (Pedersen, 2005). En el tejido neuronal, los canales TRPA1 se encuentran en neuronas de pequeño diámetro peptidérgicas y positivas para TRPV1 en los DRG (Kobayashi et al., 2005).

Existen datos que apoyan un alto grado de colocación entre TRPV1 y TRPA1 en neuronas sensitivas (Brederson et al., 2013), lo que pone de manifiesto su papel en la nocicepción. Así, los canales TRPA1 están frecuentemente coexpresados con TRPV1 en nociceptores peptidérgicos, mientras que raramente se coexpresan con TRPM8. Además, la ablación de neuronas TRPV1 con resiniferatoxina (agonista TRPV1) en ratones ocasiona la pérdida de respuesta a capsaicina y de sensibilidad al alil-isotiocianato (AITC), un agonista TRPA1 (Pecze et al., 2009).

2.3. Quimiocinas

2.3.1. Características generales

Las quimiocinas constituyen una extensa familia formada por proteínas de peso molecular relativamente bajo (7-14 kD). Hoy día se sabe que las quimiocinas y sus receptores juegan un papel crucial dirigiendo el movimiento de las células inmunitarias, generando la respuesta inmune adaptativa y contribuyendo a la patogénesis de una gran variedad de enfermedades (Charo y Ransohoff, 2006).

Estas proteínas se pueden clasificar en cuatro familias teniendo en cuenta la posición de los residuos de cisteína en el extremo N-terminal (Fig. 1) (Charo y Ransohoff, 2006; Rostène et al., 2007). La primera y más numerosa está formada por las quimiocinas CC, en las que los dos primeros residuos de cisteína de los cuatro que poseen están situados consecutivamente. Los miembros de esta familia atraen células mononucleares hacia los lugares de inflamación crónica, y están en forma activa cuando forman dímeros, o incluso tetrámeros (Proudfoot et al., 2003). La más conocida es la CCL2 o MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), que actúa como un potente agente quimiotáctico para los monocitos, células T de memoria y basófilos. Otros

ejemplos de esta familia son la CCL3, la CCL4 y la CCL5 o RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted).

La segunda familia es la de las quimiocinas CXC, que tienen un único residuo aminoacídico entre los dos primeros residuos de cisteína. Un miembro de esta familia es la CXCL8 que atrae leucocitos polimorfonucleares a los lugares de inflamación aguda.

La tercera familia corresponde a las quimiocinas CX3C que presentan tres residuos aminoacídicos entre las dos cisteínas. Su único miembro es la fractalquina o CX3CL1 que se caracteriza por poseer un dominio fusionado con un residuo similar a la mucina que le permite mantenerse unida a la membrana de las células. Cuando es separada de la membrana celular por el factor de necrosis tumoral queda libre y actúa como un agente quimiotáctico soluble.

Por último, la cuarta familia es constituida por las quimiocinas C y consta de dos miembros, la XCL1 y la XCL2 (linfotactinas a y linfotactina b, respectivamente), que poseen un único residuo de cisteína y funcionan como agentes quimiotácticos de linfocitos T.

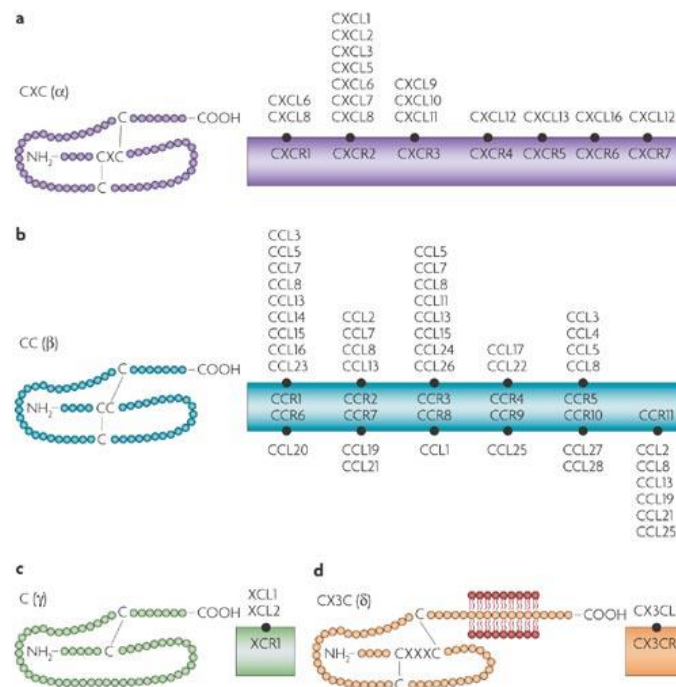


Figura 1. Clasificación de las quimiocinas en función de la posición de los residuos de cisteína en el extremo N-terminal (Rostène et al., 2007).

2.3.2. Receptores de quimiocinas y señalización intracelular

Se han clonado hasta el momento 19 receptores de quimiocinas, incluyendo 11 receptores CC (CCR1-11), 6 receptores CXC (CXCR1-6), un receptor CX3C (CX3CR1) y uno C (XCR1). Las interacciones entre las quimiocinas y sus receptores varían ampliamente en selectividad de tal manera que algunas quimiocinas se unen a un solo receptor y viceversa, como es el caso de la interacción entre CCL20 (LARC) y CCR6, y CCL25 (TECK) con CCR9, CXCL12 (SDF-1) con CXCR4, CXCL13 (BCA-1) con CXCR5, y CXCL16 con CXCR6. Sin embargo, otras quimiocinas se unen a más de un receptor, del mismo modo que varios receptores reconocen más de una quimiocina. Por ejemplo, la quimiocina CCL5 se une al menos a CCR1, CCR3 y CCR5, mientras que las quimiocinas CXCL11 (eotaxina), CCL24 (eotaxina-2), CCL26 (eotaxina-3), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), y CCL13 (MCP-4) se unen al receptor CCR3 (Le et al., 2004).

El sistema de señalización en el que participan estas proteínas está formado por las propias quimiocinas, que actúan como ligandos, y sus receptores, que poseen 7 dominios transmembrana. Éstos son expresados por todos los leucocitos y muchas células no hematopoyéticas, incluyendo células cancerosas, y pueden dividirse en dos grupos. La inmensa mayoría son receptores acoplados a proteínas G, principalmente del tipo G_i , como lo demuestra el hecho de que sean bloqueadas por la toxina *pertussis* (Oh et al., 2001; White y Wilson, 2008), aunque también pueden ser del tipo G_q . El segundo grupo de receptores es el de los llamados receptores atípicos cuyo modo de actuación es independiente de proteínas G (Bachelier et al., 2014).

Cuando las quimiocinas se unen a sus receptores se desencadenan una serie de cambios conformacionales que llevan a la disociación de las proteínas G heterotriméricas acopladas al receptor en las subunidades α y $\beta\gamma$ (Horuk et al., 2001), que pueden activar a varias enzimas efectoras. En el caso de la proteína G_i , la subunidad α actúa principalmente sobre la adenilato ciclasa inhibiéndola y reduciendo así la formación de AMPc (Rodríguez-Frade et al., 2001). Por su parte, las proteínas G_q pueden utilizar como enzima efectora a la PLC que escinde al PIP2 en DAG e IP3. Éste último provoca un aumento en el calcio intracelular que junto con el DAG lleva a la activación de la proteína cinasa C (PKC) que cataliza la fosforilación de varias proteínas

intracelulares. En menor medida, la subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G_i también puede utilizar a la PLC como enzima efectora (Zhang et al., 2005).

Esta cascada de transducción iniciada por receptores acoplados a proteínas G, fundamentalmente de tipo G_q , en la que está implicada la PLC y que lleva en último término al aumento del Ca^{2+} intracelular y a la activación de la PKC, parece estar implicada también en la sensibilización de los canales TRPV1 y TRPA1. (Wang et al., 2008; Than et al., 2013). Así, se ha propuesto que algunos receptores de quimiocinas al estar acoplados a proteínas G_q , podrían activar esta cascada de transducción y participar en la sensibilización de estos canales, como es el caso de la CCL2 al unirse a su receptor CCR2 (Jung et al., 2008). Otra quimiocina que podría estar implicada en este proceso es la CCL5 ya que se ha visto que es capaz de inducir un aumento en los niveles de Ca^{2+} en neuronas de los DRG, lo que resulta fundamental para el inicio de la cascada de transducción anteriormente citada (Zhang et al., 2005).

2.3.3. Características generales y funciones de la quimiocina CCL5

La quimiocina CCL5, también conocida como RANTES, actúa como ligando para los receptores CCR1, CCR3 y CCR5, siendo su función dirigir la migración de monocitos/macrófagos y células T. Es, por tanto, una quimiocina proinflamatoria que media el movimiento no solo de los tipos celulares anteriormente citados, sino que también tiene efecto sobre otras células como los basófilos, eosinófilos, células NK, células dendríticas y mastocitos (Appay y Rowland-Jones, 2001; Liou et al., 2012). A continuación se describen las principales funciones de la CCL5 a excepción de su implicación en la transmisión nociceptiva, que se comentará más detalladamente en la sección siguiente.

Distintas evidencias indican que la CCL5 es capaz de modular la respuesta inflamatoria en multitud de condiciones patológicas. Así, está implicada en la patogénesis de varios trastornos inflamatorios, incluyendo la esclerosis múltiple, demencia asociada al virus de inmunodeficiencia humana, y la artritis reumatoide, además de en un modelo animal de artritis, endotoxemia, y colitis crónica (Liou et al., 2012). Además de su función quimiotáctica, la CCL5 juega un papel importante en otras situaciones patológicas. Uno de los más destacados sería los diversos efectos que presenta en la

respuesta inmune a la infección viral. La CCL5 es liberada por los linfocitos T CD8⁺ activados específicamente por virus, junto a la perforina o la granzima A, y su importancia en la inmunidad antiviral queda patente en el desarrollo de mecanismos de evasión por parte de numerosos virus (Appay y Rowland-Jones, 2001). En este contexto, la CCL5 desempeña un papel fundamental en la supresión de la replicación de cepas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) del tipo VIH-1 *in vitro*, lo que permitió la identificación del receptor CCR5 como el principal correceptor para la entrada en las células diana de este virus. Se trata de un GPCR que se une a quimiocinas CC, principalmente CCL3, CCL4 y CCL5, que junto con otros receptores, es coexpresado en células T CD4⁺ (Corbeau y Reynes, 2009). La unión, fusión y entrada del virus VIH en estas células se produce a través de su interacción con el CCR5, y se cree que la forma en que la CCL5 suprime la replicación del VIH es compitiendo con el virus por la unión al receptor (An et al., 2002).

2.3.4. Papel de la quimiocinas en la transmisión nociceptiva

Diversas quimiocinas, y sus correspondientes receptores, están implicados en los procesos dolorosos. Este es el caso de la CCL2/CCR2, CCL3/CCR1 y CCR5, CCL5/ CCR1 y CCR5, CCL22/CCR4, CXCL1/CXCR1, CXCL2/CXCR1, CXCL8/CXCR2, CXCL12/CXCR4, y CX3CL1/CX3CR1.

Tanto estas quimiocinas como sus receptores se pueden encontrar tanto a nivel periférico como central. Así, se ha descrito que pueden ejercer su acción sobre los terminales nerviosos periféricos de los nociceptores llevando a la modificación de su actividad, como es el caso de la CCL2, CCL5, CCL22 y CXCL12 (Dawes y McMahon, 2013). Se ha demostrado la presencia de receptores para diferentes quimiocinas en las neuronas de los DRG, en concreto CX3CR1, CXCR4, CCR4, CCR1, CCR5 y CCR2 (Abbadie, 2005; Kiguchi et al., 2012). La participación de muchas de ellas en procesos nociceptivos espinales viene avalada por la presencia en neuronas espinales de receptores como los CCR2, CCR1, CCR5, CXCR2, CXCR4, y CX3CR1 así como por la reacción hiperalgésica que ocurre tras la administración intratecal de moléculas como la CX3CL1 y la CCL2 (Milligan et al., 2004; Baamonde et al., 2011).

La función hipernociceptiva de las quimiocinas ha sido estudiada en diferentes modalidades de dolor, especialmente en modelos experimentales de dolor neuropático. Este tipo de dolor se asocia con una gran variedad de lesiones sobre el sistema nervioso, tanto a nivel central como periférico, como consecuencia de enfermedades como la diabetes, el cáncer o por acción de agentes infecciosos. Estudios recientes muestran además que la neuroinflamación, un proceso que puede relacionarse con la acción de quimiocinas proinflamatorias liberadas como consecuencia del daño nervioso, juega un papel importante a distintos niveles. En la periferia, la producción de moléculas inflamatorias por parte de las células del sistema inmune que acuden al lugar de la lesión es capaz de desencadenar la transmisión nociceptiva asociada a esta modalidad de dolor, mientras que en la médula espinal como consecuencia de la señal generada a nivel periférico se produce la activación de las células gliales (microglia y astrocitos) que liberan moléculas inflamatorias (Abbadie, 2005; Old y Malcangio, 2012; Kaguchi et al., 2012). Se ha descrito que tras una lesión neuropática, se produce una regulación al alza de diferentes receptores de quimiocinas como pueden ser CCR2, CCR1, CCR5, CXCR4, y CXCR3, además de la liberación de sus correspondientes ligandos endógenos en las neuronas de los DRG afectados por el daño (White et al., 2007; Kiguchi et al., 2010).

De entre todas las quimiocinas, la más estudiada en el ámbito del dolor es la CCL2 o MCP-1. En los últimos años son varios los trabajos que han mostrado que la CCL2 y su receptor CCR2 podrían jugar un papel fundamental en el dolor neuropático (Zhang et al., 2012; Abbadie et al., 2009). Del mismo modo, la quimiocina CCL2 también está implicada en el dolor inflamatorio, por ejemplo en la inflamación derivada de patología en la articulación temporomandibular (Ogura et al., 2010). Además, se ha descrito cómo ratones sin el receptor CCR2 presentan menos síntomas nociceptivos en un modelo de dolor inflamatorio (Miller et al., 2012), así como una regulación al alza de la quimiocina CCL2 en los DRG de animales con inflamación (Jeon et al., 2008).

Por último, la CCL2 también podría jugar un papel importante en el dolor neoplásico y, de acuerdo con ello en nuestro laboratorio se ha descrito su participación en la hipernocicepción tumoral evocada en ratones tras la inoculación intratibial de células

de fibrosarcoma NCTC 2472 (Pevida et al, 2012; Pevida et al., 2014a) o de cáncer de próstata RM1 (Llorián-Salvador et al., 2015).

La implicación de la CCL5 en el procesamiento nociceptivo ha sido menos estudiada que la de la CCL2. Sin embargo, algunos trabajos muestran cómo esta quimiocina es capaz de inducir el desarrollo de hiperalgesia y alodinia en diferentes modelos de experimentación animal, demostrando su participación en el procesamiento de la señal nociceptiva (Oh et al., 2001; Benamar et al., 2008).

Mediante el uso de ratones knockout para la CCL5, se ha descrito la participación de esta quimiocina en un modelo murino de dolor neuropático especialmente en la modulación la migración de las células inflamatorias a los lugares dañados (Liou et al., 2012).

Finalmente, se ha descrito que la CCL5 espinal está implicada en el desarrollo de hiperalgesia mecánica en ratas inoculadas con células tumorales (Hang et al., 2013). En este contexto, estudios recientes demuestran que el bloqueo del receptor de CCL5, CCR1 inhibe la hiperalgesia mecánica y térmica de origen tumoral en ratones inoculados con células de fibrosarcoma (Pevida et al., 2014b).

3. Justificación y objetivos

El conocimiento del papel de diferentes quimiocinas en la nocicepción ha aumentado mucho en los últimos años. Diferentes ensayos han demostrado la relevancia en situaciones de dolor patológico de moléculas como la CCL2, CCL3 y CCL5 (Abbadie et al., 2009; Kim et al., 2011; Liou et al., 2012). Asimismo, algunos trabajos indican que moléculas como la CCL2 podrían ejercer su acción hiperalgésica actuando como moduladores de receptores de la familia TRP. De esta forma, se ha demostrado que el cultivo de células de DRG con CCL2 aumenta la expresión del mRNA de TRPV1 (Khasabova et al., 2007) y que el bloqueo de receptores TRPV1 puede evitar la hiperalgnesia evocada por CCL2 en ratas (Pflücke et al., 2013). En relación con la acción hiperalgésica producida por CCL3, se ha demostrado en ensayos *in vitro* que esta quimiocina puede sensibilizar los canales TRPV1 (Zhang et al., 2005).

En nuestro trabajo pretendemos estudiar si la acción hiperalgésica producida por la quimiocina CCL5 podría también deberse a la sensibilización de canales de la familia TRP, como son los receptores TRPV1 y TRPA1.

Utilizando como referencia a la quimiocina CCL2, nuestros objetivos principales fueron los siguientes:

- 1) Estudiar si el comportamiento de lamido que ocurre tras la administración de agonistas de canales TRP puede utilizarse para mostrar su sensibilización por la CCL2 y la CCL5, y dilucidar los receptores implicados en dicha amplificación.
- 2) Valorar si la administración intraplantar (i.pl.) de CCL5 en ratones produce hiperalgnesia térmica mediada por receptores CCR1 y/o CCR5, y si en ella participa la sensibilización de los canales TRPV1 y TRPA1.
- 3) Evaluar si la administración de la quimiocina CCL5 aumenta la sensibilización central provocada por el agonista TRPV1 capsaicina, a través de la cuantificación de la expresión de la proteína pERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase) a nivel espinal mediante técnicas inmunohistoquímicas.

4. Materiales y Métodos

4.1. Animales

Los experimentos fueron llevados cabo con ratones macho Swiss CD-1 con un peso comprendido entre los 30-40 gramos en el momento de su utilización. Los animales se criaron en el Animalario de la Universidad de Oviedo (Reg. 33044 13A) con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y con acceso libre a comida y agua.

4.2. Fármacos

Las quimiocinas CCL2 (Sigma) y CCL5 (ProSpec), y el antagonista de receptores CCR5, DAPTA (Tocris) se administraron disueltos en suero salino en el caso de la CCL5 y el DAPTA, y en agua destilada en el caso de la CCL2.

El antagonista de receptores CCR2, RS504393 (Tocris), el antagonista TRPV1 CPZ (Tocris) y el antagonista TRPA1, HC030031 (Tocris) se disolvieron en una mezcla de suero salino y DMSO a una concentración máxima respectivamente de 3, 15 y 10% de DMSO para las mayores concentraciones utilizadas. El agonista TRPV1 capsaicina (Tocris) y el antagonista de receptores CCR1, J113863 se disolvieron en una mezcla de agua destilada y DMSO a una concentración máxima respectivamente de 10 y 1,8% de DMSO para las mayores concentraciones utilizadas. El agonista TRPA1 AITC (Sigma) se administró disuelto en una mezcla de solución salina con DMSO al 5% y Tween 80 al 10% para las mayores concentraciones utilizadas.

En los ensayos de lamido, la administración i.pl. de RS504393, J113863, DAPTA, CCL2 y CCL5 se realizó en un volumen de 5µL mientras que los agentes irritantes capsaicina y 5-AITC se administraron en un volumen de 25 µL. En los ensayos de hiperalgesia térmica, los fármacos utilizados (CCL5, J113863, DAPTA, CPZ y HC030031) se administraron en un volumen de 25 µL por vía i.pl. En todos los casos, los animales control recibieron la cantidad correspondiente de solvente por la misma vía de administración.

4.3. Valoración del tiempo de lamido

Se trata de una prueba para medir la reacción del ratón tras la administración i.pl. de una sustancia o estímulo que pueden ser dolorosos. Se observa el tiempo que los ratones se lamen la pata en la que se ha administrado el fármaco durante un periodo de 10 minutos. Previamente, se habitúan los ratones durante 10 minutos en el interior de un recipiente (28 x 22 x 18 cm).

Con este método, se ha estudiado el efecto de las quimiocinas CCL5 y CCL2 administradas en 5 μ L por vía i.pl. 90 minutos antes (en el caso de la CCL2) o 30 minutos antes (en el caso de la CCL5) del ensayo sobre el lamido evocado por diferentes dosis del agonista TRPV1 capsaicina y el agonista TRPA1 AITC disueltos en 25 μ L.

4.4. Test de la placa caliente unilateral

Se utilizó la prueba de la placa caliente unilateral (Menéndez et al., 2002) que constituye una variante del test clásico de la placa caliente y que sirve para medir la reactividad del ratón a un estímulo doloroso térmico a través de la medida de la latencia de retirada de la pata estimulada. Los ratones se inmovilizan sujetándolos por la piel de la parte posterior del cuello y cuando se observa su adecuada inmovilidad, se coloca la superficie plantar de una de sus patas traseras sobre una placa caliente (IITC Life Science, Woodland Hills, California, USA) mantenida a 48,5 °C. Las latencias de retirada para cada pata trasera de la placa caliente se midieron con un cronómetro. Las medidas se realizaron alternativamente a intervalos de 1-2 minutos y se consideró la media de las dos o tres medidas hechas en cada pata.

Como latencias basales, previas a la aplicación de tratamiento, se buscaron valores de 13-15 segundos y animales que presentaron latencias superiores a 20 segundos fueron desechados. Cada animal se utilizó solo una vez, y se estableció un máximo de 30 segundos para las latencias experimentales.

4.5. Ensayos inmunohistoquímicos

El objetivo de estos ensayos fue el marcaje de la proteína pERK en la médula espinal de ratones tratados con distintos compuestos alógenos por vía i.pl. Los animales fueron tratados con la quimiocina CCL5 (10 ng/5 μ L), o su correspondiente solvente 30 minutos antes de la administración de la capsaicina (10 μ g/25 μ L), siendo anestesiados y sacrificados 5 y 10 minutos después del tratamiento con el agonista TRPV1, respectivamente.

Los animales se anestesian con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y se abre la caja torácica exponiendo el corazón e introduciendo en el ventrículo izquierdo una aguja conectada a una bomba peristáltica, realizándose un corte en la aurícula derecha para que salga la sangre y sea sustituida por la sustancia fijadora. En primer lugar, se hace circular PBS a pH 7,4 (con heparina para evitar coágulos) durante 10 minutos y a continuación se perfunde con paraformaldehído al 4% durante unos 15-20 minutos (850 μ l/min). La perfusión se realiza 10 minutos después de la inyección i.pl. de capsaicina.

Tras extraer la médula y seleccionar los segmentos L4-L6, ésta se postfija durante 4 h en paraformaldehído al 4% y se incuba en sacarosa al 30% durante un mínimo de 24 h. Posteriormente, se realizan cortes de 30 μ m con la ayuda de un microtomo de congelación (Microm HM 480). Los cortes se lavan en PBS a pH 7,4 y se incuban durante 30 minutos en PB-BSA-T. Pasado este tiempo y sin lavar, se incuban con el anticuerpo primario (Phospho-p44/42 MAPK de Cell Signaling (#9101)-Rabbit) a una concentración 1:1000 en PBS y se dejan unas 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes se vuelven a lavar en PBS y se incuban con el anticuerpo secundario (Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) de Vector) a una concentración 1:500 en PBS durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se lavan con PBS y se incuban en oscuridad en presencia del ABC kit (avidina-biotina-peroxidasa) durante media hora. Después, se vuelven a realizar lavados en PBS y se procede al revelado sumergiendo los cortes durante 2 minutos y medio en diaminobencidina (DAB). Finalmente, se montan los cortes en portaobjetos colocando cubreobjetos y Fluoromount-G® para mantener en buenas condiciones el tejido mejorando también la visualización. Para el recuento

de las células marcadas con pERK, en cada animal se consideraron los 5 cortes con mayor marcaje.

Este procedimiento se realiza por flotación, de tal manera que los cortes obtenidos de la médula espinal no van a estar pegados sobre un portaobjetos sino que van a ser sumergidos en las distintas soluciones utilizadas para este procedimiento.

4.6. Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios y sus correspondientes errores estándar con los datos obtenidos en las pruebas de comportamiento o el número de células del asta posterior de la médula espinal marcadas con el anticuerpo anti pERK. Las comparaciones múltiples se realizaron inicialmente empleando un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnett (cuando se compara el efecto producido por distintas dosis de un fármaco con el valor obtenido tras la administración del solvente) o el test de Newman-Keuls (cuando los animales reciben distintos tratamientos). La significación se estableció para valores de $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Efecto de la quimiocina CCL2 sobre el lamido evocado por la administración i.pl. de capsaicina. Implicación de los receptores CCR2

La administración i.pl. del agonista TRPV1 capsaicina (1-10 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$) provoca un comportamiento de lamido en ratones que comienza inmediatamente después de la inyección. En el rango de dosis estudiado, el tiempo de lamido comenzó a ser significativo a partir de la dosis de 3 μg y aumentó de un modo dependiente de la dosis (Fig. 2). En vista de la curva dosis-efecto obtenida, se seleccionó la dosis subefectiva de 1 μg , ya que supone un 10-15% del efecto máximo obtenido por la dosis más elevada de capsaicina, para realizar los estudios de potenciación con el fin de detectar el incremento del lamido en presencia de la quimiocina CCL2.

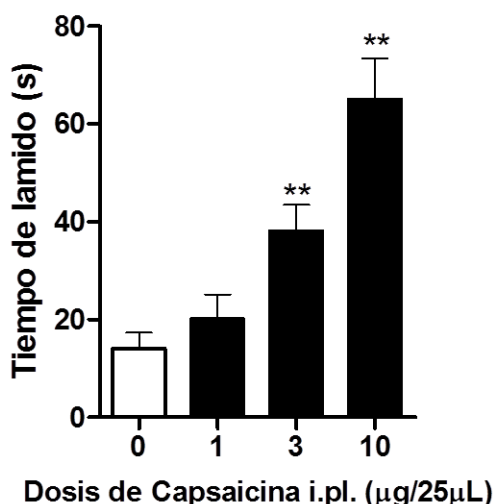


Figura 2. Curva dosis-efecto del lamido provocado por la administración i.pl. de dosis crecientes del agonista TRPV1 capsaicina (1-10 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$). Datos expresados como media \pm S.E.M. ** $P < 0,01$ comparada con el grupo solvente, test de Dunnett.

Posteriormente, se estudió la capacidad de la quimiocina CCL2 para aumentar el tiempo de lamido evocado por la activación de canales TRPV1 midiendo el efecto de la administración i.pl. de 1 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$ de capsaicina en ratones tratados 90 minutos antes con CCL2 (10-500 $\text{ng}/5\mu\text{L}$) en la misma pata. Como puede observarse (Fig. 3), la administración i.pl. previa de CCL2 produjo un aumento dependiente de la dosis del tiempo de lamido provocado por dicha dosis de capsaicina.

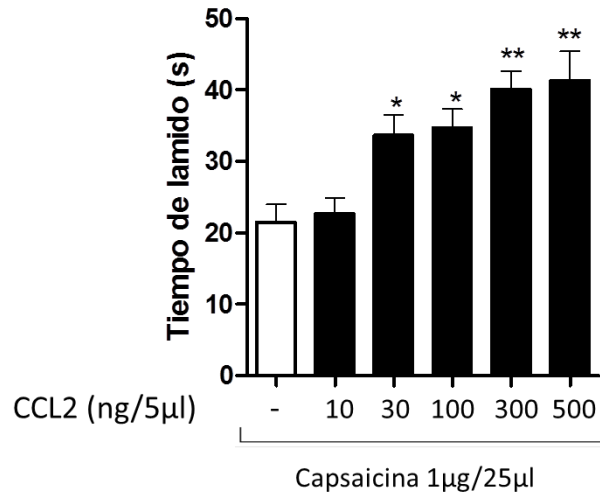


Figura 3. Potenciación del lamido provocado por la capsaicina (1 µg/25µL; i.pl.) a través de la administración previa de distintas dosis de la quimiocina CCL2 (10-500 ng/5µL; i.pl.). Datos expresados como media ± S.E.M. *P<0,05; **P<0,01, comparada con el grupo tratado solo con capsaicina, test de Dunnett.

Para comprobar si este aumento de la respuesta a la capsaicina provocado por la CCL2 es producido a través de receptores CCR2, se ensayó la influencia en dicha respuesta de la administración del antagonista CCR2, RS504393 (3 µg) 90 minutos antes que el agonista TRPV1. El bloqueo de receptores CCR2 antagonizó completamente la potenciación producida por 300 ng de CCL2 del lamido provocado por capsaicina (1µg). La administración del RS504393 (RS) solo no modifica el tiempo de lamido tras la administración de la capsaicina (Fig. 4).

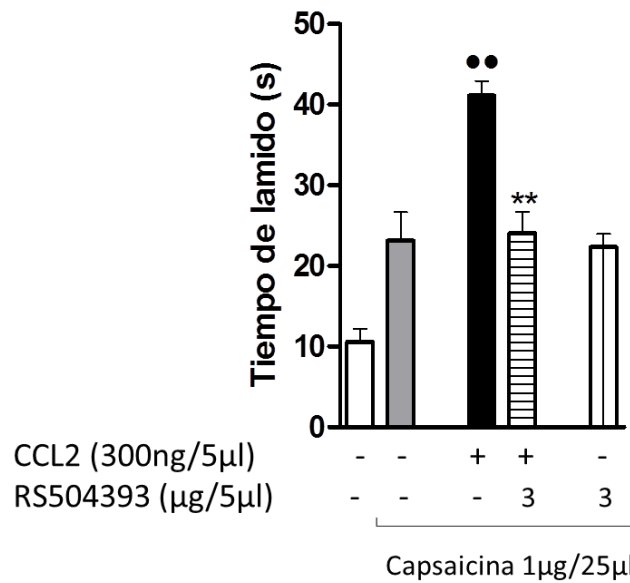


Figura 4. Antagonismo de la potenciación del lamido provocado por la capsaicina (1 µg/25µL; i.pl.) con la quimiocina CCL2 (300 ng/5µL i.pl.) por medio del antagonista CCR2 RS504393 (3µg/5µl; i.pl.). Datos expresados como media ± S.E.M. ••P<0,01, comparada con el grupo tratado solo con el agonista TRPV1, **P<0,01, comparada con el grupo tratado con CCL2+capsaicina, test de Newman-Keuls.

5.2. Efecto de la quimiocina CCL5 sobre el lamido evocado por el estímulo de canales TRPV1. Participación de receptores CCR1 y CCR5

Con un planteamiento similar al descrito en el apartado anterior, se estudió si la quimiocina CCL5 podía amplificar el lamido producido por el agonista TRPV1 capsaicina. La administración de CCL5 (3-100 ng/5 μ L) 30 minutos antes de la inyección de capsaicina (1 μ g/25 μ L; i.pl.) potenció de un modo dependiente de la dosis el lamido evocado por éste (Fig. 5).

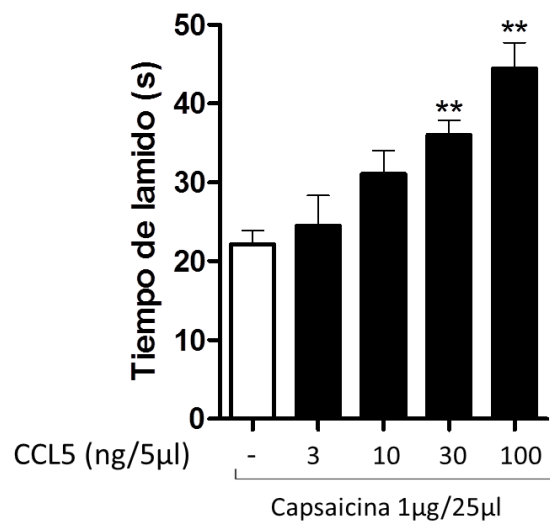


Figura 5. Potenciación del lamido provocado por la capsaicina (1 μ g/25 μ L; i.pl.) a través de la administración previa de la quimiocina CCL5 (3-100 ng/5 μ L; i.pl.). Datos expresados como media \pm S.E.M. **P<0,01, comparada con el grupo tratado solo con el agonista TRPV1, test de Dunnet.

Puesto que las respuestas hiperalgésicas ejercidas por la CCL5 pueden producirse a través de receptores CCR1 y CCR5, se estudiaron los posibles efectos de antagonistas selectivos de ambos receptores (J113863 y DAPTA respectivamente) administrados por vía i.pl. 30 minutos antes que la capsaicina. Puesto que tanto la administración de 1 μ g como de 3 μ g/5 μ L de estos antagonistas produjo una reversión parcial de la potenciación evocada por la CCL5, se decidió administrar conjuntamente ambos antagonistas a la dosis de 1 μ g. Siguiendo esta última estrategia se detectó que el bloqueo simultáneo de los receptores CCR1 con el antagonista J113863 y el de los receptores CCR5 con el antagonista DAPTA provocó la reversión completa de la amplificación del comportamiento de lamido provocado por la quimiocina CCL5 (100

ng) (Fig. 6). La administración única de estos antagonistas no modificó el tiempo de lamido tras la administración de la capsaicina.

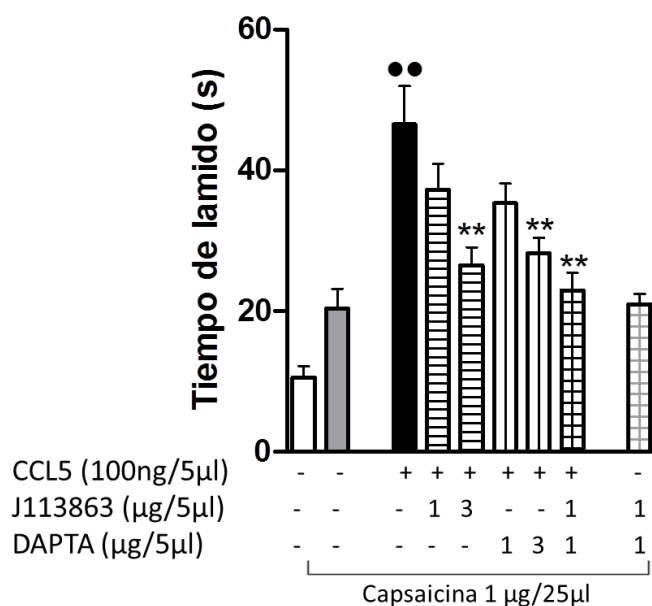


Figura 6. Antagonismo de la potenciación del lamido provocado por la capsaicina (1 µg/25µL; i.pl.) con la quimiocina CCL5 (100 ng/25µL; i.pl.) por medio de los antagonistas CCR1, J113863 y CCR5, DAPTA (1 y 3 µg/5µL; i.pl.). Datos expresados como media ± S.E.M., ••P<0,01 comparada con el grupo tratado solo con capsaicina, test de Newman-Keuls, **P<0,01 comparada con el grupo tratado con CCL5+capsaicina, test de Dunnett.

5.3.Efecto de la quimiocina CCL5 sobre el lamido evocado por el estímulo de canales TRPA1. Participación de receptores CCR1 y CCR5

En este apartado se realizaron experimentos para tratar de dilucidar si, al igual que ocurre con la respuesta de lamido evocada por estímulo de canales TRPV1, la quimiocina CCL5 puede amplificar respuestas mediadas a través de receptores TRPA1. La administración i.pl. del agonista TRPA1 AITC (10-100 µg/25µL), provocó un comportamiento de lamido que se manifiesta de forma dependiente de la dosis (Fig. 7).

En vista de la curva dosis-efecto obtenida, se seleccionó, al igual que en el caso de la capsaicina, la dosis subefectiva de 10 µg, que supone un 10-15% del efecto máximo obtenido, para realizar los estudios de potenciación posteriores en presencia de la CCL5.

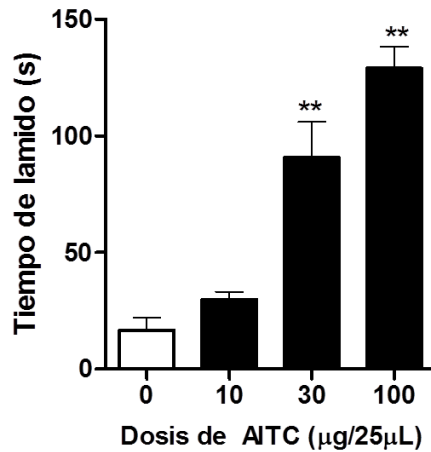


Figura 7. Curva dosis-efecto del lamido provocado por la administración i.pl. del agonista TRPA1 AITC (10-100 µg/25µL). Datos expresados como media ± S.E.M. **P<0,01 comparada con el grupo solvente, test de Dunnett.

Al igual que con el agonista TRPV1, se estudió la capacidad de la quimioquina CCL5 para potenciar el lamido evocado por la activación de los canales TRPA1 a través del tiempo de lamido provocado por la administración i.pl. de 10 µg de AITC en ratones tratados 30 minutos antes con dosis crecientes de CCL5 (10-300 ng/5µl) administradas en la misma pata y siguiendo la misma vía de administración. Como puede observarse, (Fig. 8) la potenciación del lamido con CCL5 fue limitada ya que únicamente la dosis de 100 ng provocó un aumento significativo en el tiempo de lamido siendo posiblemente el efecto máximo, ya que cuando se administra una dosis más elevada de la quimioquina (300 ng) no se observa un aumento del lamido.

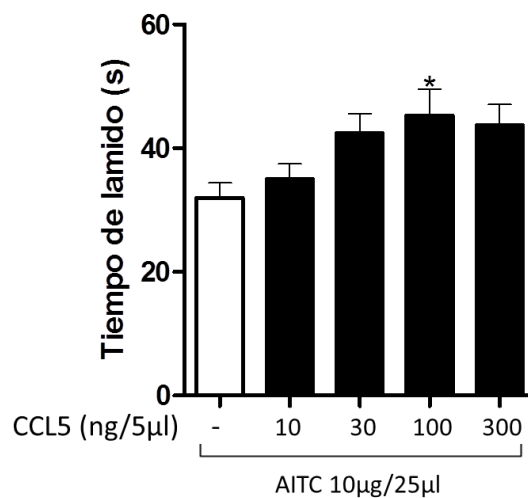


Figura 8. Potenciación del lamido provocado por el AITC (10 µg/25µL; i.pl.) a través de la administración previa de la quimioquina CCL5 (10-300 ng/5µL; i.pl.). Datos expresados como media ± S.E.M. *P<0,05, comparada con el grupo tratado solo con el agonista TRPA1, test de Dunnett.

A continuación, se coadministraron junto con la CCL5 i.pl. los antagonistas selectivos CCR1, J113863 y CCR5, DAPTA en una dosis de 1µg 30 minutos antes que el agonista TRPA1. Como se puede observar, tanto el bloqueo de los receptores CCR1 como el de los receptores CCR5 fueron capaces del antagonizar la amplificación del comportamiento de lamido provocado por la quimiocina CCL5 (100 ng/5µL) (Fig. 9). La administración i.pl. única de los antagonistas no produjo ningún tipo de efecto.

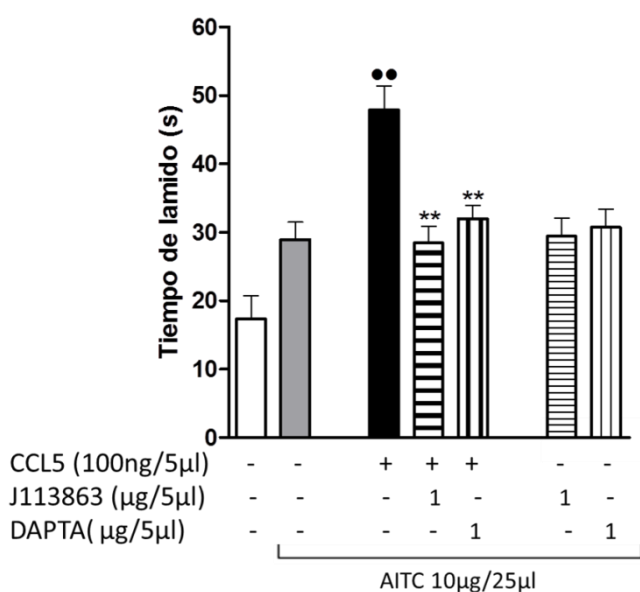


Figura 9. Antagonismo de la potenciación del lamido provocado por el AITC (10 µg/25µL; i.pl.) con la quimiocina CCL5 (100 ng/5µL; 30 minutos antes) por medio de la coadministración con J113863 (1µg) o DAPTA (1µg). Datos expresados como media ± S.E.M. ••P<0,01, comparada con el grupo tratado solo con el 5-AITC, **P<0,01, comparada con el grupo tratado con CCL5+AITC, test de Newman-Keuls.

5.4. Efecto hiperalgésico de la administración de la quimiocina CCL5. Implicación de los receptores CCR1 y CCR5

Los experimentos de lamido descritos en los apartados anteriores, sugieren que la quimiocina CCL5 puede provocar efectos hiperalgésicos. Por ello, se estudió si dicha quimiocina era capaz de generar hiperalgesia térmica y si ésta podría estar mediada a través de la estimulación de receptores CCR1 y CCR5.

Inicialmente, se comprobó que la administración i.pl. aguda de CCL5 provocaba hiperalgesia térmica medida en la prueba de la placa caliente unilateral. Así, la

administración i.pl. de la CCL5 (5-30 ng/25 μ L; 30 minutos antes) produce un descenso dependiente de la dosis en las latencias de retirada en la pata inyectada. El descenso de estas latencias comienza a partir de 5 ng y es máximo con la dosis de 10 ng, con la que las latencias de retirada pasaron a ser de 9,2 s en lugar de los 13,6 s que se detectaron en el grupo control tratado con salino (Fig. 10). Inesperadamente, este efecto desaparece para dosis mayores (30 ng), tras las que no se observaron efectos hiperalgésicos.

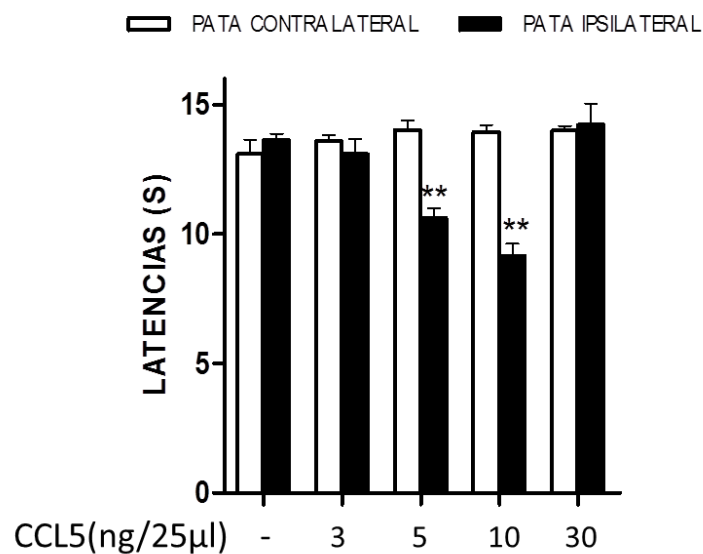


Figura 10. Curva dosis-efecto de la hiperalgesia térmica producida por la quimiocina CCL5 (3-30 ng/25 μ L; i.pl. 30 minutos antes). Datos expresados como media \pm S.E.M. **P<0,01 comparada con la pata ipsilateral del grupo solvente, test de Dunnett.

El efecto hiperalgésico producido por la dosis de 10 ng de CCL5 fue antagonizado de un modo dependiente de la dosis por la coadministración de J113863 (0,01-1 μ g/25 μ L), demostrando la implicación de los receptores de tipo CCR1 (Fig. 11) en esta hiperalgesia térmica. La administración i. pl. de la dosis más alta (1 μ g) de J113863 no modificó la latencia de retirada.

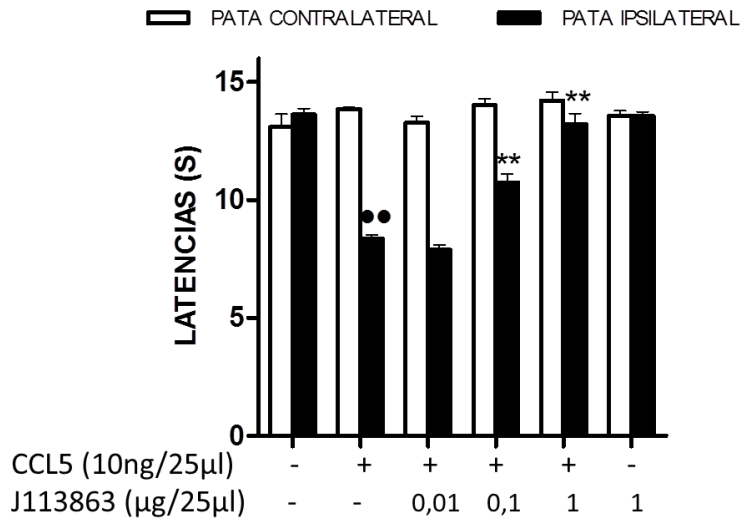


Figura 11. Antagonismo de la hiperalgesia térmica evocada por la quimiocina CCL5 (10 ng/25µL; i.pl.) cuando es administrada conjuntamente con el antagonista CCR1 J113863 (0,01-1 µg/25µL) 30 minutos antes. Datos expresados como media ± S.E.M. ••P<0,01, comparada con su pata contralateral, test de Newman-Keuls, **P<0,01, comparada con la pata ipsilateral tratada solo con la CCL5, test de Dunnett.

Del mismo modo, se decidió comprobar si los receptores de tipo CCR5 también pueden estar implicados en la hiperalgesia térmica inducida por la quimiocina CCL5. Para ello, se llevó a cabo la coadministración de DAPTA (0,3-3 µg/25µL) y se observó que el efecto hiperalgésico producido por la CCL5 (10 ng) es inhibido de forma dependiente de la dosis en presencia de este antagonista CCR5, al igual que ocurría con el J113863 (Fig. 12). La administración i. pl. de la dosis más alta (3 µg) de DAPTA no modificó la latencia de retirada.

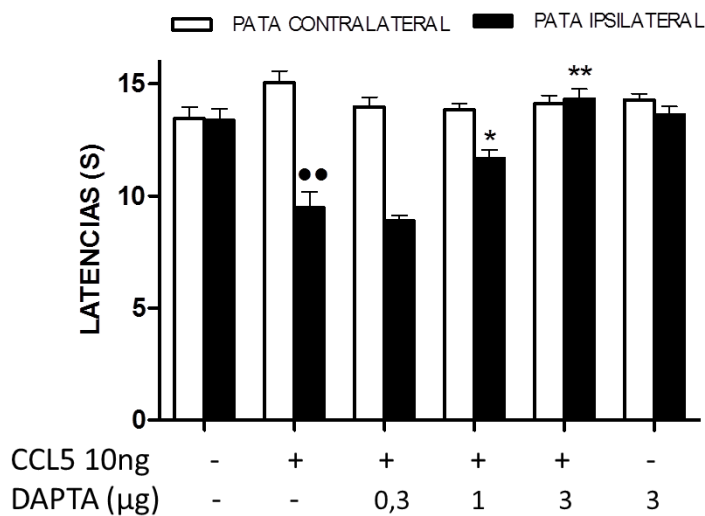


Figura 12. Antagonismo de la hiperalgesia térmica evocada por la quimiocina CCL5 (10 ng/25µL; i. pl.) cuando es administrada conjuntamente con el antagonista CCR5 DAPTA (0,3-3 µg/25µL) 30 minutos antes. Datos expresados como media ± S.E.M. ••P<0,01, comparada con su pata contralateral, test de Newman-Keuls *P<0,05 y **P<0,01, comparadas con la pata ipsilateral tratada solo con la CCL5, test de Dunnett.

5.5. Participación de los canales TRPV1 y TRPA1 en la hiperalgesia térmica evocada por la administración i.pl de CCL5 en ratones

Para estudiar la posible participación de los receptores TRPV1 en el efecto hiperalgésico evocado por CCL5 (i.pl.), se estudió si la administración del antagonista de receptores TRPV1 CPZ, afectaba a dicho efecto. Como se observa en la figura 13, la coadministración i.pl. de CPZ (0,03-0,3 μ g) evitó de un modo dependiente de la dosis el efecto hiperalgésico producido por la CCL5 (10 ng/25 μ L; i.pl. 30 minutos antes). La administración i.pl. de la dosis más alta (0,3 μ g) de CPZ no modificó la latencia de retirada.

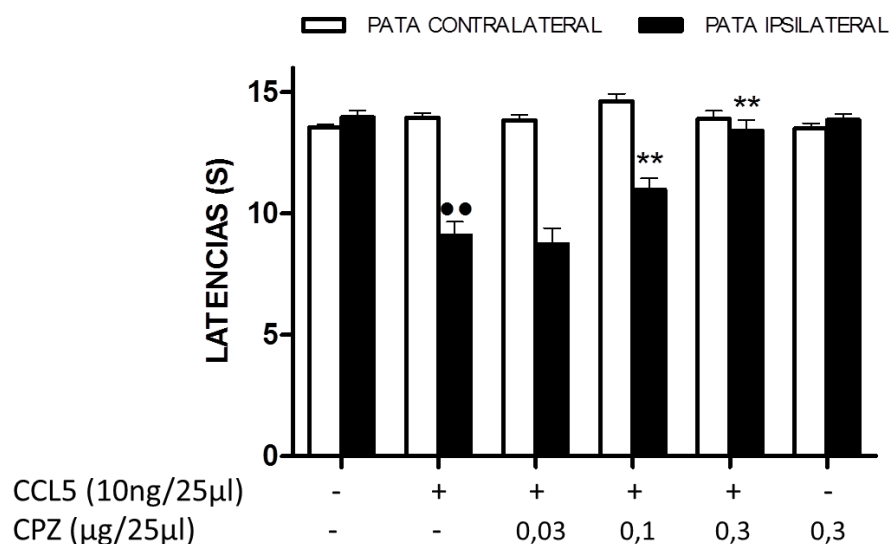


Figura 13. Antagonismo de la hiperalgesia térmica evocada por CCL5 (10 ng/25 μ L; i.pl. 30 minutos antes) tras su coadministración el antagonista TRPV1 CPZ (0,03-0,3 μ g/25 μ L). Datos expresados como media \pm S.E.M. ••P<0,01, comparada con su pata contralateral, test de Newman-Keuls, **P<0,01, comparada con la pata ipsilateral tratada solo con la CCL5, test de Dunnett.

Un efecto similar se produjo cuando dicha quimiocina (10 ng) fue coadministrada con el antagonista TRPA1 HC030031 (10-50 μ g), demostrando así la participación de los canales receptores TRPA1 en el efecto hiperagésico evocado por la CCL5 (Fig. 14). La administración i.pl. de la dosis más alta de HC030031 (50 μ g) no modificó la latencia de retirada.

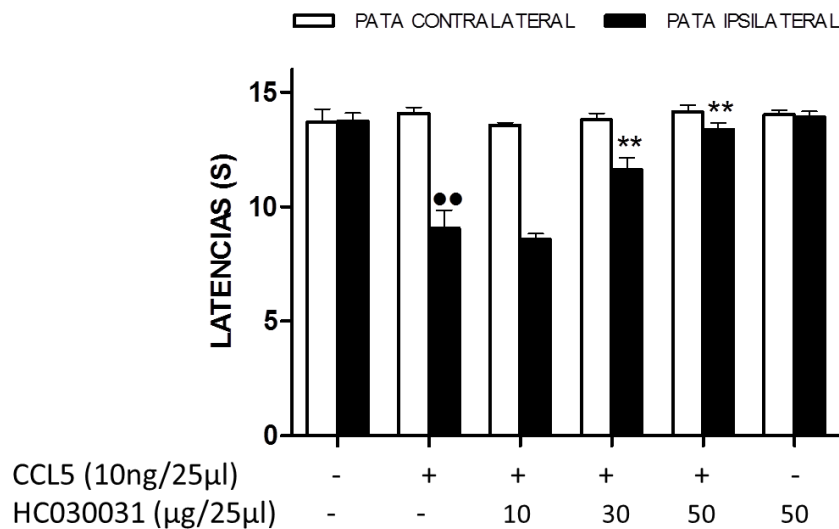


Figura 14. Antagonismo de la hiperalgesia térmica evocada por CCL5 (10 ng/25µL; i.pl. 30 minutos antes) tras coadministración con el antagonista TRPA1 HC030031 (10-50 µg/25µL). Datos expresados como media ± S.E.M. ••P<0,01, comparada con su pata contralateral, test de Newman-Keuls, **P<0,01, comparada con la pata ipsilateral tratada solo con la CCL5, test de Dunnett.

5.6. Modulación por la CCL5 de la fosforilación de ERK en neuronas espinales de ratones tratados con capsaicina

A través de experimentos inmunohistoquímicos, se trató de estudiar si la administración periférica de CCL5 podía potenciar la excitación de neuronas espinales provocada por el estímulo de receptores TRPV1 a través de la amplificación en la expresión de la proteína pERK. La administración de capsaicina (10 µg/25µl; i.pl.) produjo marcaje de pERK en las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal, y en aquellos tratados 30 minutos antes con CCL5 (10 ng/5µl; i.pl.). El contaje de los puntos de expresión de la proteína pERK en ambos grupos no mostró diferencia en los niveles de expresión de la misma (Fig. 15).

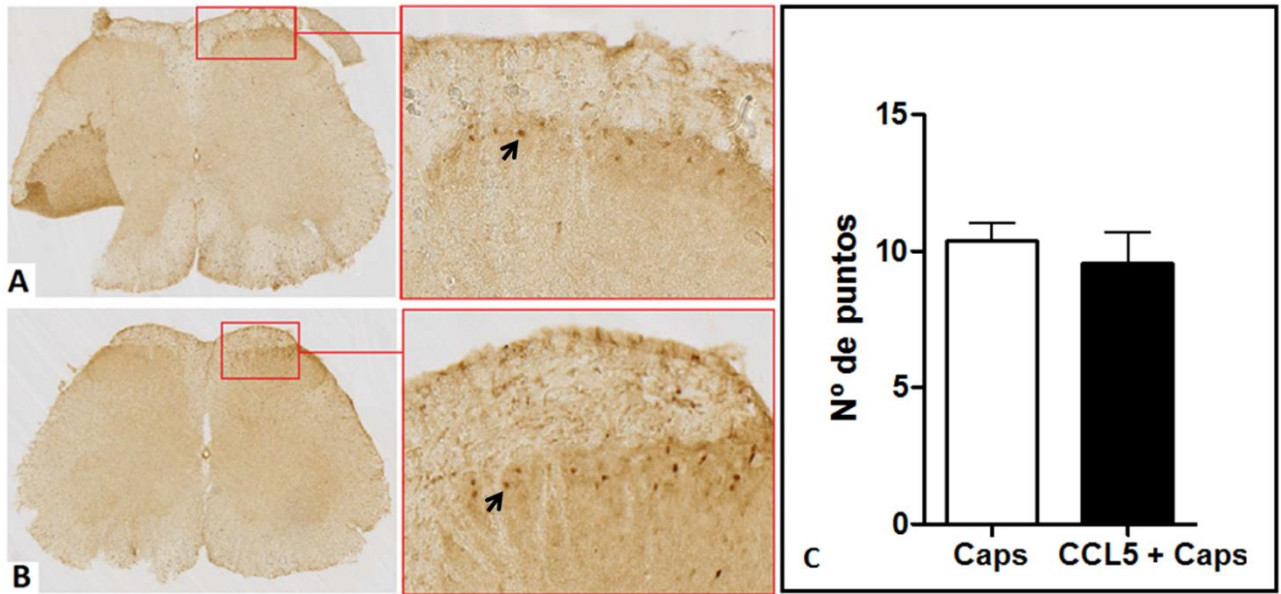


Figura 15. Modulación por la CCL5 de la fosforilación de ERK en neuronas espinales de ratones tratados con capsaicina. A: Marcate inmunohistoquímico de la expresión de pERK en la médula espinal de ratones tratados únicamente con capsaicina (10 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$; i.pl.). B: Marcate inmunohistoquímico de la expresión de pERK en la médula espinal de ratones tratados con la quimiocina CCL5 (10 ng/5 μL ; i. pl.) y 30 minutos después con capsaicina (10 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$). C: Gráfica de barras que representa la media y el error estándar de la media en los dos tratamientos (n=5). Las flechas señalan el marcaje de la proteína pERK.

6. Discusión

En el presente trabajo, se describe la participación de la sensibilización de canales TRPV1 y TRPA1 en los efectos evocados por la quimiocina CCL5. De acuerdo con ello, la administración previa de esta quimiocina provoca la potenciación del lamido ocasionado en ratones tanto por el agonista TRPV1 capsaicina como por el agonista TRPA1 AITC, a través de la activación de receptores CCR1 y CCR5. La repercusión funcional de esta acción sensibilizadora de la CCL5 sobre receptores de la familia TRP viene avalada por la inhibición que los antagonistas TRPV1 y TRPA1 producen sobre la hiperalgesia evocada por CCL5 en ratones.

El principal objetivo abordado en el presente trabajo fue tratar de dilucidar si los canales TRPV1 y TRPA1 podían estar implicados en la acción hiperalgésica mediada por la quimiocina CCL5 a nivel periférico y para ello se utilizó como referencia inicial el efecto producido por una quimiocina que ha sido más estudiada como es la CCL2. La implicación de la quimiocina CCL2 en hiperalgesia y el dolor patológico está bien establecida, especialmente en dolor neuropático (Abbadie et al., 2009) y neoplásico (Khasabova et al., 2007; Pevida et al., 2012; Pevida et al., 2014a). Datos recientes sugieren que el papel hipernociceptivo de la quimiocina CCL2 podría deberse a que la activación de receptores CCR2 favorece la apertura de canales TRPV1 o TRPA1 (Pflücke et al., 2013). Así, se ha demostrado que en torno al 80% de las neuronas de los DRG que expresan receptores CCR2 coexpresan TRPV1 (Jung et al., 2008) y que una buena parte de las neuronas periféricas que liberan CCL2 en situación de daño nervioso son nociceptores que expresan TRPV1 (van Steenwinckel et al., 2011). A nivel comportamental, un trabajo previo describe la inhibición de la hiperalgesia mecánica y térmica evocada por CCL2 i.pl. a través del bloqueo de receptores TRPA1 y TRPV1 respectivamente (Pflücke et al., 2013), aunque este aspecto se estudia de un modo colateral y no se demuestra que el efecto de los antagonistas TRPV1 y TRPA1 sea dependiente de la dosis. Hay datos previos que sugieren que la potenciación de los receptores TRPV1 pueden también participar en la hiperalgesia evocada por administración de CCL2 a nivel de la médula espinal (Spicarova et al., 2014), lo que sugiere que podría tratarse de un mecanismo de acción no solo circunscrito a nociceptores. Apoyando la posible relación entre quimiocinas y canales TRP, ha sido

también descrito que la quimiocina CCL3 podría producir hiperalgesia a través de la sensibilización de canales TRPV1 (Zhang et al., 2005).

En nuestros experimentos tratamos de obtener pruebas de la modulación por parte de la CCL2 sobre TRPV1 y TRPA1 con la idea de poder valorar sobre esta base los efectos de la CCL5 sobre estos receptores. La estrategia experimental utilizada inicialmente fue el estudio de la potenciación del comportamiento de lamido provocado por la inyección i.pl. del agonista TRPV1 capsaicina o del agonista TRPA1 AITC producida por una administración previa única de CCL2 o CCL5. Estos experimentos se diseñaron considerando que si la transducción activada por las quimiocinas conduce a una sensibilización de estos canales TRP, la exposición previa a quimiocinas debería provocar la amplificación del lamido desencadenado por estímulo directo de los mismos con agonistas selectivos. Se realizó inicialmente una exploración de las dosis de capsaicina capaces de provocar comportamiento de lamido en ratones y se observó que el tiempo de lamido aumentaba de manera dependiente de la dosis en el intervalo de 1 a 10 μ g de acuerdo con datos previos de nuestro laboratorio (Menéndez et al., 2004). Para realizar los ensayos de potenciación, se seleccionó una dosis subefectiva (1 μ g), que produjo un aumento de en torno al 10-15% del efecto máximo. Con esta dosis pudimos observar que la administración previa de CCL2 provoca un aumento del tiempo de lamido dependiente de la dosis (10-500 ng) a través del estímulo de receptores CCR2, ya que dicha potenciación desapareció completamente tras la administración del antagonista selectivo, RS504393 (Mirzadegan et al., 2000).

En animales pretratados con CCL5 (3-100 ng) se obtuvo una potenciación similar y dependiente de la dosis. Mediante el empleo de antagonistas selectivos, se pudo demostrar la participación de receptores CCR1 y CCR5, a los que se une la CCL5 (Bachelerie et al., 2014) y cuya participación en respuestas nociceptivas mediadas por esta quimiocina ha sido demostrada previamente (Pevida et al., 2014b). De esta forma, la administración conjunta de los antagonistas CCR1, J113863 (Naya et al., 2001) y CCR5, DAPTA (Ruff et al., 2003) revirtió por completo la potenciación de la CCL5 sobre el comportamiento de lamido evocado por la capsaicina.

Se realizaron experimentos similares utilizando el agonista TRPA1, AITC, aislado del aceite de mostaza (Jordt et al., 2004). Al igual que en el caso anterior, se seleccionó

una dosis subefectiva de AITC (10µg) para estudiar la posible potenciación con la CCL5. Mediante el uso de antagonistas selectivos se pudo observar que esta quimiocina era capaz de aumentar el tiempo de lamido provocado por AITC a través de la estimulación de receptores CCR1 y CCR5. Por tanto, los resultados obtenidos con capsaicina y AITC demuestran la capacidad de la CCL5 para sensibilizar los canales TRPV1 y TRPA1. Como se comentó más arriba, aunque datos previos apoyaban la capacidad de la CCL2 para potenciar la acción de estos canales TRPA1 y TRPV1 (Pflücke et al., 2013), su posible modulación por la quimiocina CCL5 no había sido descrita con anterioridad. Aunque nuestros resultados no nos permiten deducir ningún mecanismo concreto, puesto que se ha sido descrito que la activación de la PLC puede llevar a la sensibilización de los canales TRPV1 y TRPA1 (Wang et al., 2008; Than et al., 2013), parece posible que el acoplamiento de los receptores CCR2, CCR1 y CCR5 a proteínas Gq, pueda conducir a la fosforilación de dichos canales y explicar la mayor excitabilidad de los mismos. Sin embargo, esta hipótesis solo ha sido demostrada para los receptores CCR2 (Jung et al., 2008).

Una vez demostrada la capacidad de las quimiocinas ensayadas para aumentar respuestas mediadas a través de canales TRPV1 y TRPA1, el siguiente objetivo de nuestro trabajo fue estudiar si la sensibilización de dichos canales podría estar implicada en la hiperalgesia producida por CCL5. Datos previos describían que la administración periférica de CCL5 produce alodinia mecánica en ratas (Oh et al., 2001) y en nuestros experimentos nos planteamos estudiar si la administración de CCL5 era capaz de producir hiperalgesia térmica y si ésta podía ser mediada a través de canales TRPV1 y/o TRPA1. La administración i.pl. de CCL5 redujo las latencias de retirada de la pata en la placa caliente en ratones de un modo dependiente de la dosis. Esta reducción fue máxima a la dosis de 10 ng, aunque la administración de una dosis mayor, 30 ng, provocó la desaparición del efecto hiperalgésico. La desaparición de la hiperalgesia a dosis altas podría tener que ver con la entrada en juego de mediadores analgésicos desencadenados por las células inmunes atraídas por la quimiocina y, de acuerdo con resultados preliminares de nuestro laboratorio podría tratarse de un efecto opioide, quizás debido a la liberación de opioides endógenos procedentes de leucocitos que se movilizan durante la respuesta inmune (Brack et al., 2004; Rittner et

al., 2005; Stein y Lang, 2009). En cualquier caso, en el establecimiento de esta hiperalgesia debida a la quimiocina CCL5 participan de nuevo receptores CCR1 y CCR5 puesto que fue inhibida mediante la administración de los antagonistas selectivos de receptores CCR1 J113863 y CCR5 DAPTA de una manera dependiente de la dosis.

La administración i.pl. de los antagonistas TRPV1 CPZ (Dickenson y Dray, 1991) y TRPA1 HC030031 (McNamara et al., 2007) permitió demostrar que dichos canales participan en la hiperalgesia térmica provocada por la CCL5 ya que en ambos casos las latencias de retirada aumentaron, de una manera dependiente de la dosis, en los ratones tratados con esta quimiocina hasta antagonizar completamente la hiperalgesia. Estos resultados están de acuerdo con resultados previos que demuestran que los receptores TRPA1 no solo son activados por frío, sino que también tienen un papel importante en presencia de calor, de tal manera que la administración i.pl. de agonistas TRPA1 es capaz de provocar hiperalgesia térmica (Tsagareli et al., 2010).

Dado que los resultados anteriormente descritos se basan en el papel de la CCL5 en la sensibilización de nociceptores, nos pareció interesante tratar de dilucidar si ello podía conducir a la activación de un mayor número de neuronas espinales. Para ello tratamos de detectar la expresión de la proteína pERK en médula espinal, ya que ésta puede ser usada como marcador de la activación de las neuronas del asta dorsal en respuesta a estímulos nociceptivos (Gao y Ji, 2009). Mediante ensayos inmunohistoquímicos se observó que la administración aguda de capsaicina 10 minutos antes del sacrificio del ratón provocaba la fosforilación de ERK en el lado ipsilateral al estímulo en neuronas de las láminas I y II del asta dorsal probablemente asociadas a transmisión nociceptiva. Sin embargo, la administración previa de CCL5 no produjo un aumento en el número de neuronas que expresan pERK. Inicialmente, parecía esperable que, si el número de potenciales de acción disparado por los nociceptores en respuesta a la capsaicina estuviera aumentado por acción de la CCL5, el número de neuronas que expresan pERK debería haber aumentado. De hecho, en un trabajo previo de nuestro laboratorio, pudimos ver cómo la administración de endotelina-1 producía un aumento en la expresión de la proteína c-Fos en médula espinal en respuesta a un estímulo térmico (Menéndez et al., 2003). El resultado negativo obtenido podría deberse a diferentes motivos. Aunque no puede descartarse

que la acción de la CCL5 sobre los nociceptores simplemente no conlleve la excitación de un mayor número de neuronas espinales, es posible que la brevedad de su estímulo no produzca la fosforilación de ERK en cantidades detectables. En cualquier caso, estos resultados preliminares sugieren que el tratamiento periférico con CCL5 no produce efectos espinales marcados.

7. Conclusiones

1. Las quimiocinas CCL2 y CCL5 pueden amplificar las respuestas producidas a través de receptores TRPV1 y TRPA1, como se pudo demostrar a través de la medida de las respuestas de lamido provocadas por agonistas de ambos receptores.
2. Los canales TRPV1 y TRPA1 participan en la hiperalgesia térmica evocada por la acción de la quimiocina CCL5 sobre receptores CCR1 y CCR5.
3. En base a estudios preliminares, parece desprenderse que la administración periférica de la quimiocina CCL5 no parece desencadenar la sensibilización espinal, ya que la expresión de la proteína pERK en la médula espinal producida por capsaicina no se ve amplificada por exposición previa a la CCL5.

8. Bibliografía

- Abbadie, C. Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol.* 2005; 26(10): 529-534.
- Abbadie, C., Bhangoo, S., De Koninck, Y., Malcangio, M., Melik-Parsadaniantz, S., y White, F. A. Chemokines and pain mechanisms. *Brain Res Rev.* 2009; 60(1): 125-134.
- An, P., Nelson, G. W., Wang, L., Donfield, S., Goedert, J. J., Phair, J., et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(15): 10002-10007.
- Appay, V., y Rowland-Jones, S. L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001; 22(2); 83-87.
- Baamonde, A., Hidalgo, A., y Menéndez, L. (2011). Involvement of glutamate NMDA and AMPA receptors, glial cells and IL-1 β in the spinal hyperalgesia evoked by the chemokine CCL2 in mice. *Neurosci Lett.* 2011; 502(3): 178-181.
- Bachelier, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A. M., Combadiere, C., Farber, J. M., Graham, G. J., et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2014; 66(1): 1-79.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., y Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 2009; 139(2): 267-284.
- Benamar, K., Geller, E. B., y Adler, M. W. Elevated level of the proinflammatory chemokine, RANTES/CCL5, in the periaqueductal grey causes hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008; 592(1): 93-95.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., y Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(7): 517-529.
- Brack, A., Rittner, H. L., Machelska, H., Leder, K., Mousa, S. A., Schäfer, M., et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain.* 2004; 112(3): 229-238.
- Brederson, J. D., Kym, P. R., y Szallasi, A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol.* 2013; 716(1): 61-76.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., y Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997; 389(6653): 816-824.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., y Julius, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000; 288(5464): 306-313.

Charo, I. F., y Ransohoff, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006; 354(6): 610-621.

Clapham, D. E., Montell, C., Schultz, G., y Julius, D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*. 2003; 55(4): 591-596.

Corbeau, P., y Reynes, J. CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects. *AIDS*. 2009; 23(15): 1931-1943.

Cortright, D. N., y Szallasi, A. (2009). TRP channels and pain. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(15): 1736-1749.

Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000; 405(6783): 183-187.

Dawes, J. M., y McMahon, S. B. Chemokines as peripheral pain mediators. *Neurosci Lett*. 2013; 557: 1-8.

Dickenson, A. H., Y Dray, A. Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. *Br J Pharmacol*. 1991; 104 (4): 1045-1049.

D'Mello, R., y Dickenson, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*. 2008; 101(1): 8-16.

Dubin, A. E., y Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010; 120(11): 3760.

Gao, Y. J., y Ji, R. R. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury?. *Open Pain J*. 2009; 2: 11-17.

Gold, M. S., y Gebhart, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med*. 2010; 16(11): 1248-1257.

Hang, L. H., Shao, D. H., Chen, Z., Chen, Y. F., Shu, W. W., y Zhao, Z. G. Involvement of spinal CC chemokine ligand 5 in the development of bone cancer pain in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013; 113(5): 325-328.

Hoffmann, T., Kistner, K., Miermeister, F., Winkelmann, R., Wittmann, J., Fischer, M. J. et al. TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur J Pain*. 2013; 17(10): 1472-1482.

Horuk, R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001; 12(4): 313-335.

Jeon, S. M., Lee, K. M., Park, E. S., Jeon, Y. H., y Cho, H. J. Monocyte chemoattractant protein-1 immunoreactivity in sensory ganglia and hindpaw after adjuvant injection. *Neuroreport*. 2008; 19(2): 183-186.

Jordt, S. E., Bautista, D. M., Chuang, H. H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 2004; 427(6971): 260-265.

Julius, D. From peppers to peppermints: natural products as probes of the pain pathway. *Harvey Lect*. 2005; 101: 89-115.

Julius, D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013; 29: 355-384.

Jung, H., Toth, P. T., White, F. A., y Miller, R. J. Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *J Neurochem*. 2008; 104(1): 254-263.

Khasabova, I. A., Stucky, C. L., Harding-Rose, C., Eikmeier, L., Beitz, A. J., Coicou, L. G., et al. Chemical interactions between fibrosarcoma cancer cells and sensory neurons contribute to cancer pain. *J Neurosci*. 2007; 27(38): 10289-10298.

Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Maeda, T., Saika, F., y Kishioka, S. CC-chemokine MIP-1 α in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2010; 484(1): 17-21.

Kiguchi, N., Kobayashi, Y., y Kishioka, S. Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol*. 2012; 12(1): 55-61.

Kim, D., You, B., Lim, H., y Lee, S. J. Toll-like receptor 2 contributes to chemokine gene expression and macrophage infiltration in the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *Mol Pain*. 2011; 7: 74.

Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with $\alpha\delta/c$ -fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol*. 2005; 493(4): 596-606.

Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., y Wang, J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1(2): 95-104.

Levine, J. D., y Alessandri-Haber, N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772(8): 989-1003.

Liou, J. T., Yuan, H. B., Mao, C. C., Lai, Y. S., y Day, Y. J. Absence of C-C motif chemokine ligand 5 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and behavioral hypersensitivity in a murine neuropathic pain model. *Pain*. 2012; 153(6): 1283-1291.

Llorián-Salvador, M., Pevida, M., Fernández-García, M. T., Lastra, A., Obaya, Á., Cal, S., et al. Hypernociceptive responses following the intratibial inoculation of RM1 prostate cancer cells in mice. *Prostate*. 2015; 75(1): 70-83.

Loeser, J. D., y Treede, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain*. 2008; 137(3): 473-477.

McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(33): 13525-13530.

Menendez, L., Lastra, A., Hidalgo, A., y Baamonde, A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J Neurosci Methods*. 2002; 113(1): 91-97.

Menéndez, L., Lastra, A., Hidalgo, A., y Baamonde, A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2003; 367(1): 28-34.

Menéndez, L., Lastra, A., Hidalgo, A., y Baamonde, A. The analgesic effect induced by capsaicin is enhanced in inflammatory states. *Life Sci*. 2004; 74(26): 3235-3244.

Miller, R. E., Tran, P. B., Das, R., Ghoreishi-Haack, N., Ren, D., Miller, R. J., et al. CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(50): 20602-20607.

Milligan, E. D., Zapata, V., Chacur, M., Schoeniger, D., Biedenkapp, J., O'connor, K. A., et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci*. 2004; 20(9): 2294-2302.

Mirzadegan, T., Diehl, F., Ebi, B., Bhakta, S., Polsky, I., McCarley, D., et al. Identification of the binding site for a novel class of CCR2b chemokine receptor antagonists binding to a common chemokine receptor motif within the helical bundle. *J Biol Chem*. 2000; 275(33): 25562-25571.

Montell, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. 2005; (272), re3.

Naya, A., Sagara, Y., Ohwaki, K., Saeki, T., Ichikawa, D., Iwasawa, Y., et al. Design, synthesis, and discovery of a novel CCR1 antagonist. *J Med Chem.* 2001; 44(9): 1429-1435.

Ogura, N., Satoh, K., Akutsu, M., Tobe, M., Kuyama, K., Kuboyama, N., et al. MCP-1 production in temporomandibular joint inflammation. *J Dent Res.* 2010; 89(10): 1117-1122.

Oh, S. B., Tran, P. B., Gillard, S. E., Hurley, R. W., Hammond, D. L., y Miller, R. J. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. *J Neurosci.* 2001; 21(14): 5027-5035

Old, E. A., y Malcangio, M. Chemokine mediated neuron–glia communication and aberrant signalling in neuropathic pain states. *Curr Opin Pharmacol.* 2012; 12(1), 67-73.

Palmer, C. P., Zhou, X. L., Lin, J., Loukin, S. H., Kung, C., y Saimi, Y. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(14): 7801-7805.

Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., y Viswanath, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(7): 529-539.

Pecze, L., Pelsőczy, P., Kecskés, M., Winter, Z., Papp, A., Kaszás, K., et al. Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1+ neurons removes TRPA1 as well. *Can J Neurol Sci.* 2009; 36(2): 234-241.

Pedersen, S. F., Owsianik, G., y Nilius, B. TRP channels: an overview. *Cell calcium.* 2005; 38(3): 233-252.

Pevida, M., González-Rodríguez, S., Lastra, A., Hidalgo, A., Menéndez, L., y Baamonde, A. CCL2 released at tumoral level contributes to the hyperalgesia evoked by intratibial inoculation of NCTC 2472 but not B16-F10 cells in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012; 385(11): 1053-1061.

Pevida, M., González-Rodríguez, S., Lastra, A., García-Suárez, O., Hidalgo, A., Menéndez, L., et al. Involvement of spinal chemokine CCL2 in the hyperalgesia evoked by bone cancer in mice: a role for astroglia and microglia. *Cell Mol Neurobiol.* 2014a; 34(1): 143-156.

Pevida, M., Lastra, A., Meana, A., Hidalgo, A., Baamonde, A., y Menéndez, L. The chemokine CCL5 induces CCR1-mediated hyperalgesia in mice inoculated with NCTC 2472 tumoral cells. *Neuroscience.* 2014b; 259: 113-125.

- Pflücke, D., Hackel, D., Mousa, S. A., Partheil, A., Neumann, A., Brack, A., et al. The molecular link between CC-chemokine ligand 2-induced leukocyte recruitment and hyperalgesia. *J Pain*. 2013; 14(9): 897-910.
- Proudfoot, A. E., Handel, T. M., Johnson, Z., Lau, E. K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(4): 1885-1890.
- Ramsey, I. S., Delling, M., y Clapham, D. E. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*. 2006; 68: 619-647.
- Rittner, H. L., Machelska, H., y Stein, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J Leukoc Biol*. 2005; 78(6): 1215-1222.
- Rodríguez-Frade, J. M., Mellado, M., y Martínez-A, C. Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol*. 2001; 22(11): 612-617.
- Rostène, W., Kitabgi, P., y Parsadaniantz, S. M. Chemokines: a new class of neuromodulator?. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(11): 895-903.
- Ruff, M. R., Polianova, M., Yang, Q. E., Leoung, G. S., Ruscetti, F. W., y Pert, C. B. Update on D-ala-peptide T-amide (DAPTA): a viral entry inhibitor that blocks CCR5 chemokine receptors. *Curr HIV Res*. 2003; 1(1): 51-67.
- Salat, K., Moniczewski, A., y Librowski, T. Transient receptor potential channels-emerging novel drug targets for the treatment of pain. *Curr Med Chem*. 2013; 20(11): 1409-1436.
- Spicarova, D., Adamek, P., Kalynovska, N., Mrozkova, P., y Palecek, J. TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology*. 2014; 81: 75-84.
- Stein, C., y Lang, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9(1): 3-8.
- Szallasi, A., y Blumberg, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999; 51(2): 159-212.
- Than, Y. X., Li, L., Hasan, R., y Zhang, X. Excitation and modulation of TRPA1, TRPV1, and TRPM8 channel-expressing sensory neurons by the pruritogen chloroquine. *J Biol Chem*. 2013; 288(18): 12818-12827.
- Tsagareli, M. G., Tsiklauri, N., Zanutto, K. L., Carstens, M. I., Klein, A. H., Sawyer, C. M., et al. Behavioral evidence of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia induced by intradermal cinnamaldehyde in rats. *Neurosci Lett*. 2010; 473(3): 233-236.

van Steenwinckel, J., Reaux-Le Goazigo, A., Pommier, B., Mauborgne, A., Dansereau, M. A., Kitabgi, P., et al. CCL2 released from neuronal synaptic vesicles in the spinal cord is a major mediator of local inflammation and pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 2011; 31(15): 5865-5875.

Venkatachalam, K., y Montell, C. TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 2007; 76: 387-417

Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., y Nilius, B. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(1): 396-401.

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

White, F. A., Jung, H., y Miller, R. J. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(51): 20151-20158.

White, F. A., y Wilson, N. Chemokines as pain mediators and modulators. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008; 21(5): 580-585.

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

Zhang, N., Inan, S., Cowan, A., Sun, R., Wang, J. M., Rogers, T. J., Caterina, M., y Oppenheim, J. J. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat-and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(12): 4536-4541.

Zhang, Z. J., Dong, Y. L., Lu, Y., Cao, S., Zhao, Z. Q., y Gao, Y. J. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the medullary dorsal horn are involved in trigeminal neuropathic pain. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 136.