

# El plomo inhibe la corriente activada por protones (ASIC) en las neuronas de los ganglios dorsales

Aníbal Garza-Carbajal\*

Laboratorio de Neurofisiología Sensorial, Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Pue., México

Recibido en su versión modificada: 25 de enero de 2007

Aceptado: 26 de enero de 2007

## RESUMEN

**Antecedentes.** Los canales iónicos ASIC (del inglés Acid Sensing Ion Channel) son canales iónicos activados por reducciones transitorias en el pH extracelular. Pese a no conocerse con exactitud su mecanismo, la activación ocurre por medio de la unión de protones al dominio extracelular del canal y es modulada por iones calcio y zinc.

**Objetivo.** El hecho de que los cationes divalentes modifiquen el funcionamiento del canal nos llevó a preguntar si el plomo, otro cation divalente, sería capaz de alterar el funcionamiento de los ASIC.

**Métodos y resultados.** Mediante el uso de la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de la rata, encontramos que el plomo inhibe la corriente ASIC en forma dependiente de la concentración.

**Conclusiones.** Estos resultados contribuyen a definir los mecanismos de activación de los canales ASIC y a explicar algunos de los mecanismos tóxicos del plomo en el organismo.

**Palabras clave:**  
ASIC, acidificación extracelular, pH, toxicidad, corrientes iónicas

## SUMMARY

**Background.** Acid sensing ion channels (ASIC) are ionic channels activated by transient pH reductions in the extracellular environment. Although the activation mechanism is not fully elucidated, it is clear that the channel is activated by proton binding to its extracellular domain, a process that is modulated by calcium and zinc.

**Objective.** The fact that divalent cations are able to modify ASIC operation, lead us to consider if lead, another divalent cation and widely distributed neurotoxicant, is also capable to affect ASIC function.

**Methods.** For this purpose, we recorded ASIC currents in rat dorsal root ganglion neurons using the whole cell patch-clamp technique.

**Results.** The results indicated that lead inhibits ASIC currents in a concentration-dependent fashion.

**Conclusions.** These results contribute to the understanding of the activation mechanism of ASIC and to explain some of the toxic mechanisms of lead in the organism.

## Keywords:

Acid sensing ion channel, ASIC, extracellular pH, ionic currents, cations

## Introducción

En los últimos años se ha acumulado evidencia de que los ambientes intra y extracelular no son tan homogéneos como se pensaba, existiendo en un mismo espacio puntos focalizados donde las condiciones iónicas, de pH o de potencial *redox* pueden variar significativamente sin necesidad de encontrarse delimitados por una membrana.<sup>1-3</sup> Esto ha ocasionado que las alteraciones funcionales en la maquinaria celular producidas por dichos estados pasaran de ser consideradas como efectos no fisiológicos —dada la aparente imposibilidad de encontrar tales condiciones en el microambiente celular— a ser replanteadas como una forma de modulación de los procesos celulares. Actualmente se conocen distintas proteínas de adhesión, moléculas chaperonas y canales iónicos cuyo funcionamiento depende de las condiciones *redox*, de pH o de iones presentes a su alrededor y donde, en algunos casos, actúan como sensores para estas condiciones.<sup>4-9</sup>

En el caso concreto del pH extracelular, actualmente se sabe que puede variar de manera considerable en la proximidad de sitios de liberación de protones ( $H^+$ ) tales como las bombas e intercambiadores de  $H^+$  o los sitios de liberación de vesículas sinápticas, muchas de las cuales poseen una elevada concentración de  $H^+$  que son coliberados con el neurotransmisor.<sup>2,10-12</sup> Igualmente se ha demostrado el efecto que la acidificación del pH extracelular tiene sobre procesos como la comunicación sináptica donde, de manera simultánea, afecta múltiples blancos.<sup>2,4,6-8,10,13-23</sup>

Los receptores a neurotransmisores como el receptor glutamatérgico NMDA (N-metil-D-aspártico) o canales iónicos como los TRPV1 (del inglés *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), por mencionar algunos, son modulados en su conductancia por la unión de protones al canal.<sup>13,16,24,25</sup> En particular, los canales ASIC (del inglés *Acid Sensing Ion Channel*) tienen en la unión a los protones su principal mecanismo de activación. Los ASIC se activan específicamente al reducirse la porción extracelular del canal durante

\* Correspondencia y solicitud de sobretiros: 14 sur 6301, CU, San Manuel, 72570 Puebla, Pue., México. Tel.: (01 22) 2229-5500 ext. 7318, Fax: (01 22) 2229-5500 ext. 7301. Correo electrónico: anibalgar@gmail.com

disminuciones transitorias en el pH extracelular y son típicamente bloqueados por el diurético amilorida. Además de poseer sitios de unión para  $H^+$ , que es el principal ligando del canal, los ASIC poseen sitios de unión para los cationes  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , los cuales regulan su funcionamiento.<sup>26,27</sup> Uno de los mecanismos por el cual la unión a protones conduce a la activación de los ASIC es el desplazamiento de iones de  $Ca^{2+}$  del vestíbulo del canal por la reducción de los grupos encargados de coordinarlo. Ya que el  $Ca^{2+}$  normalmente ocluiría el poro del ASIC, esto permitiría en principio que los iones permeen libremente por el canal sin necesidad de un cambio conformacional en la proteína.<sup>28-30</sup> Una vez activado el canal, los principales iones que por él permean son  $Na^+$  y en menor medida  $Ca^{2+}$ , con efectos despolarizantes sobre la célula.<sup>31</sup> Si bien los ASIC se expresan ampliamente en células del sistema nervioso central y periférico,<sup>32-35</sup> hasta el momento su papel en la fisiología neuronal no se encuentra del todo esclarecido dada la dificultad que implica identificar la ocurrencia de microambientes ácidos *in vivo* que conduzcan a su activación. Pese a ello se ha demostrado su participación en la nocicepción,<sup>36,37</sup> el daño isquémico,<sup>38</sup> la activación de las aferentes vestibulares<sup>33</sup> y, probablemente, en la transmisión sináptica y potenciación a largo plazo.<sup>31,39</sup>

Los canales ASIC son homo o heterotetrámeros de las seis distintas subunidades ASIC conocidas, cada una conformada por dos segmentos transmembranales conectados por una larga aza extracelular.<sup>32,34</sup> La corriente generada en los ASIC es típicamente entrante, de rápida activación y de desensibilización parcial o completa, dependiendo de las subunidades que lo conformen.

El plomo ( $Pb^{2+}$ ), por su parte, es un contaminante ambiental de amplia distribución cuyos efectos suelen estar mediados por la ocupación de sitios de unión a cationes, principalmente  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , en la maquinaria celular.<sup>40</sup> Dado el papel regulatorio que  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  desempeñan sobre el funcionamiento de los ASICs, decidimos investigar los efectos del  $Pb^{2+}$  sobre la corriente acarreada por estos canales en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD) de la rata.

## Material y métodos

Se emplearon ratas Wistar de 7 a 10 días postnatal. Tras ser anestesiadas con halotano, se procedió a su decapitación. La columna vertebral fue abierta, la médula espinal removida y los ganglios de la raíz dorsal, torácicos y lumbares, disecados para su posterior cultivo.<sup>41,42</sup>

Las neuronas provenientes de estos ganglios se cultivaron como se ha descrito previamente.<sup>41,43-45</sup> Brevemente, los ganglios disecados se colocaron en medio de cultivo L-15 al 100% en presencia de tripsina y colagenasa IA (1.25 mg/ml) por 30 min a 37° C, tras lo cual las células fueron lavadas y disociadas mecánicamente. Una vez disociadas, se colocaron las células en cajas de Petri recubiertas con poli-L-lisina y se mantuvieron en cultivo de 8 a 20 horas en medio L-15 modificado con 10% de SBF a 37° C y con una atmósfera de  $CO_2$  al 5%.

Todos los registros se realizaron utilizando un amplificador Axopatch-10 (Axon inst). Los microelectrodos (1-5 MΩ) se elaboraron a partir de capilares de vidrio de borosilicato con un estirador de micropipetas Sutter P-2000. Los registros de fijación de voltaje (*Patch Clamp*) en la configuración de célula completa se realizaron en una cámara de registro perfundida con una solución Tyrode normal (pH 7.4) a temperatura ambiente (22-25° C). Las soluciones extracelulares fueron impulsadas por gravedad utilizando un sistema de perfusión de 3 tubos cuadrados colocados en la proximidad de las células. Los cambios de una solución por otra (< 100 ms) se realizaron por medio de un sistema SB-77 de perfusión controlado por computadora (Warner inst.). El control experimental y registro de las corrientes se efectuaron usando el programa Pclamp 8 (Axon Inst.). Las corrientes provocadas por ácido fueron generadas al perfundir la célula en registro con solución ácida por 5 segundos.

Los registros fueron capturados usando un convertidor analógico digital (Digidata 1200), empleando el software pClamp8 (Axon Instruments). El voltaje de membrana se mantuvo a -60 mV. La capacitancia y la resistencia en serie fueron compensadas electrónicamente. La resistencia en serie se compensó al 80%.

Las soluciones empleadas fueron:

- *extracelular normal* (en mM): KCl 5.4, NaCl 140,  $MgCl_2$  2,  $CaCl_2$  1.8, HEPES o MES 10, Glucosa 10, ajustada al pH con NaOH. Para aquellas soluciones cuyo pH fue inferior a 6.1 se empleó MES en vez de HEPES como amortiguador. Se emplearon soluciones con pH 7.4, 7.0, 6.5, 6.1, 5.5, 4.0;
- *intracelular* (en mM): KCl 125, NaCl 10,  $CaCl_2$  0.1, HEPES 10, EGTA 10, GTPNa 1, ATPMg 2. pH 7.2 ajustado con KOH. Para evitar su precipitación, el acetato de  $Pb^{2+}$  se adicionó a las soluciones poco antes de iniciar el experimento, a partir de una solución madre (10 mM) preparada en el momento.

## Análisis de datos

Los datos fueron analizados con el programa Clampfit 9.2 (Axon inst.). Cada condición experimental se realizó por duplicado para cada célula, promediando los valores obtenidos. En cada caso, se realizó un registro control y uno de lavado. Las corrientes obtenidas fueron normalizadas con respecto a la corriente control y los datos se reportan como la media  $\pm$  el error estándar. Las curvas concentración-efecto de pH y  $Pb^{2+}$  fueron ajustadas empleando la función:

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + (x/CE_{50})^H)$$

Donde Y es el efecto farmacológico de la sustancia probada ( $H^+$  o  $Pb^{2+}$ ), x la concentración del fármaco ( $H^+$  o  $Pb^{2+}$ ), max y min son el máximo y mínimo del efecto sobre la corriente ASIC, la  $CE_{50}$  es la concentración a la que se observa el 50% del efecto sobre la corriente entre ambos límites y H es la constante de Hill.

Para comparar datos en la misma célula se empleó la prueba t de Student pareada.

## Resultados

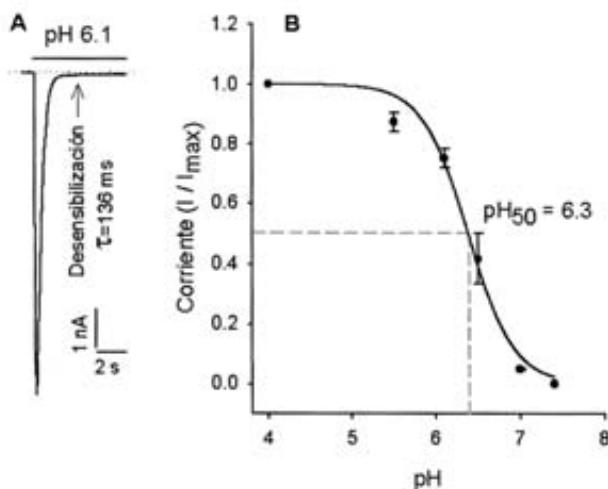
La corriente ASIC en neuronas del ganglio de la raíz dorsal fue registrada al perfundir transitoriamente la célula con una solución ácida en presencia y ausencia de acetato de  $\text{Pb}^{2+}$  a distintas concentraciones. El voltaje de las células en registro se mantuvo fijo a -60 mV para descartar la activación de corrientes dependientes de voltaje. En todos los registros se usó capsazepina (CZP) 10  $\mu\text{M}$  para evitar la activación de canales TRPV1. Cabe destacar que la CZP tiene un efecto selectivo y no afecta a las corrientes mediadas por ASICs. En estas condiciones, la perfusión ácida sostenida por 5 segundos generó una corriente entrante de rápida activación, la cual se desensibilizó dentro del primer segundo de la estimulación (Figura 1A). La densidad de corriente producida por el pH 6.1 tuvo una magnitud promedio en control de  $0.078 \pm 0.014 \text{ nA/pF}$  ( $n = 20$ ) y se desensibilizó con una constante de tiempo ( $\tau$ ) de  $136 \pm 7.2 \text{ ms}$  ( $n = 20$ ). Se construyó la curva de sensibilidad al pH de la corriente en un intervalo de pH de 4 a 7.4, tomando la corriente obtenida a pH 4 como máxima. Se encontró un  $\text{pH}_{50}$  (pH al cual se obtiene el 50% de la corriente ASIC máxima) de  $6.3 \pm 0.04$  y una constante de Hill de  $1.6 \pm 0.25$  (Figura 1B). Con base en este resultado, en los experimentos subsecuentes se empleó un pH de 6.1 para estimular a las células.

Al perfundir las células con la solución ácida a la cual se adicionó  $\text{Pb}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ , observamos una reducción al  $67\% \pm 0.05\%$  en la corriente producida por el pH 6.1 ( $n = 6$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 2A). Aunque se observó un ligero incremento en la  $\tau$  de desensibilización de la corriente en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ ,

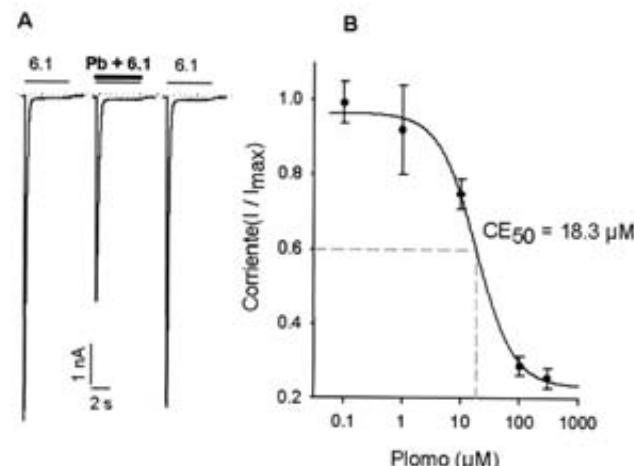
este incremento no fue significativo ( $136 \pm 7.2 \text{ ms}$  el control vs.  $159.6 \pm 15.4 \text{ ms}$  en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ ;  $n = 6$ ). El efecto inhibitorio del  $\text{Pb}^{2+}$  sobre la corriente producida por pH ácido fue reversible y tras un periodo de lavado de 50 segundos la corriente retornó a su valor control. En la curva concentración-efecto para la interacción ASIC- $\text{Pb}^{2+}$  se encontró una  $\text{CE}_{50}$  de  $18.3 \pm 6.7 \mu\text{M}$ , con una constante de Hill de  $1.3 \pm 0.63$  ( $n = 6$  en 10  $\mu\text{M}$ , 9 en 1  $\mu\text{M}$  y 4 para el resto de puntos) (Figura 2B).

## Discusión

Los resultados del estudio indican que el  $\text{Pb}^{2+}$  tiene un efecto inhibitorio sobre la corriente provocada por la acidificación del medio extracelular en neuronas del GRD. Consideramos que dicha corriente se encuentra mediada únicamente por los canales ASIC debido a que el voltaje al que se realizaron los experimentos (-60 mV) descarta la participación de otros canales iónicos dependientes de voltaje —como los de calcio— donde los efectos del  $\text{Pb}^{2+}$  se encuentran bien caracterizados. Así mismo, la CZP añadida a nuestras soluciones de registro descarta la posible participación de los canales TRPV1 —también sensibles a los cationes extracelulares— en las corrientes registradas. Aunado a esto, trabajos recientes confirman que la corriente ASIC es la única activada por protones en neuronas de los GRD que presenta una cinética similar a la aquí reportada.<sup>46</sup> El hecho de que el  $\text{Pb}^{2+}$  tenga un efecto inmediato sobre la corriente ASIC sugiere una acción directa sobre el canal. Los datos hasta el momento disponi-



**Figura 1.** A) Corriente producida por pH de 6.1. El pH ácido provoca la apertura de los canales ASIC, lo que origina una corriente entrante completando su ciclo de activación-desensibilización dentro del primer segundo de perfusión. La línea punteada indica el 0 de corriente. B) Curva pH versus corriente para las neuronas de los GRD. Las líneas en gris marcan el  $\text{pH}_{50}$  ( $\text{pH}_{50} = 6.3 \pm 0.04$ , Hill =  $1.6 \pm 0.25$ ). La corriente se encuentra normalizada con respecto a la corriente obtenida a pH 4 ( $n = 8$  para pH 4, 5 para pH 6.1, 4 para pH 7 y 3 para los puntos restantes).



**Figura 2.** A) Efecto de añadir acetato de  $\text{Pb}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ) a la solución ácida (pH 6.1). La coperfusión del  $\text{Pb}^{2+}$  con la solución a pH 6.1 reduce la amplitud de la corriente ASIC al 67% con respecto al control ( $n = 6$ ;  $p < 0.001$ ). El efecto inhibitorio del  $\text{Pb}^{2+}$  se revierte tras el lavado (50 seg). La línea punteada indica el 0 de corriente. B) Curva concentración efecto del  $\text{Pb}^{2+}$  sobre la corriente ASIC a pH 6.1. Las líneas en gris señalan la  $\text{CE}_{50}$  ( $\text{CE}_{50} = 18.3 \pm 6.7 \mu\text{M}$ , Hill =  $1.3 \pm 0.63$ ). La corriente se normalizó con respecto a la corriente control a pH 6.1.

bles sobre la estructura de los ASICs postulan a su segmento extracelular como el candidato más probable para esta interacción, dada la afinidad que presenta por otros cationes divalentes. Aunque nuestro objetivo original era llevar nuestra investigación más allá e identificar el sitio específico de unión al  $Pb^{2+}$ , al término del trabajo aquí reportado —que representaba la primera fase de nuestra investigación—, fue publicado un trabajo realizado por Wang y cols.<sup>47</sup> donde se reporta que el mecanismo de acción del  $Pb^{2+}$  en los ASIC no es debido a la interacción con el sitio de unión a  $Ca^{2+}$ . Estos autores reportaron que el  $Pb^{2+}$  inhibe de manera reversible y dependiente de la concentración la corriente ASIC en neuronas, evitando el incremento en el  $Ca^{2+}$  intracelular y la despolarización de membrana consecutivas a la activación de esta corriente. Tras caracterizar sus efectos, los autores buscaron identificar las subunidades afectadas por el  $Pb^{2+}$  expresando *in vitro* las distintas combinaciones posibles de subunidades ASIC, identificando como tales a ASIC1 y ASIC3. Por último y basados en estudios de competencia con amilorida, los autores concluyen que el  $Ca^{2+}$  y el  $Pb^{2+}$  tienen distintos sitios de unión en el canal, sustentando dicha conclusión en dos hechos: a) el  $Pb^{2+}$  y la amilorida muestran independencia en sus efectos de bloqueo, mientras que amilorida y el  $Ca^{2+}$  parecen competir entre sí; b) el  $Ca^{2+}$  media distintos efectos según sea preaplicado o coaplicado con la solución ácida, mientras que el  $Pb^{2+}$  siempre actúa como un inhibidor sin importar el orden de su aplicación. Cabe anotar que aunque consideramos esta explicación como factible, también existe la posibilidad de que el  $Pb^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  se encuentren interactuando con un mismo sitio de unión y que sean las diferencias iónicas de cada metal las responsables de los efectos observados. Aunque ambos son cationes metálicos divalentes, poseen diferencias en sus preferencias de coordinación, electronegatividad y radio iónico. El  $Pb^{2+}$  es un cation de mayor radio iónico y electronegatividad que el  $Ca^{2+}$ , lo que promueve una interacción anormalmente afín con las proteínas de unión a este ión. Además, la presencia de un par inerte de electrones en el  $Pb^{2+}$  provocan que los grupos que coordinan este metal en las proteínas se orienten hacia un solo lado del ión en vez de hacerlo holodireccionalmente como lo hacen cuando coordinan al  $Ca^{2+}$ .<sup>48,49</sup> El resultado neto de estas diferencias es, en muchos casos, una activación anómala de la proteína al interactuar con el  $Pb^{2+}$ . Dicho efecto del  $Pb^{2+}$  se ha podido constatar en numerosas proteínas celulares donde el  $Pb^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  tienen efectos distintos a pesar de interactuar con el mismo sitio de unión.<sup>50-55</sup>

Aunque el mecanismo exacto de modulación de los canales sensores de acidez por cationes divalentes puede ser materia de debate y quizás no pueda esclarecerse hasta no contar con estudios suplementarios que enriquezcan la información disponible sobre la estructura-función de los ASIC, lo cierto es que el  $Pb^{2+}$  es un importante neurotóxico, cuyos blancos conocidos en el sistema nervioso siguen incrementándose conforme nuevas proteínas y procesos son identificados y comprendidos. Aunque normalmente el  $Pb^{2+}$  en plasma de los individuos intoxicados de manera crónica por este metal se encuentra en valores inferiores a la  $CE_{50}$  aquí reportada, deben tenerse en cuenta dos factores importan-

tes: a) la concentración plasmática de este metal no refleja necesariamente la concentración presente en tejidos como el cerebro donde el  $Pb^{2+}$  puede acumularse a lo largo de la vida del individuo alcanzando concentraciones mayores;<sup>48</sup> b) *in vivo* es de esperar que los ASIC operen a un pH menos ácido que el empleado para este estudio, por lo tanto si  $H^+$  y  $Pb^{2+}$  compiten por un mismo sitio de unión, a menor concentración de  $H^+$  mayor será el efecto inhibitorio del  $Pb^{2+}$ .

## Agradecimientos

Aníbal Garza Carbajal es becario del CONACyT (193722), México. Este proyecto fue financiado parcialmente por los proyectos VIEP-BUAP 9/G/SAL/05, 19/SAL/06-I y el proyecto CONACyT 46511.

## Referencias

1. Goldberg JH, Tamas G, Aronov D, Yuste R. Calcium microdomains in aspiny dendrites. *Neuron* 2003;40:807-821.
2. Krishtal OA, Osipchuk YV, Shelest TN, Smirnoff SV. Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1987;436:352-356.
3. Ro HA, Carson JH. pH microdomains in oligodendrocytes. *J Biol Chem* 2004;279:37115-37123.
4. Palmer MJ, Hull C, Vigh J, von Gersdorff H. Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 2003;23:11332-11341.
5. Soto E, Vega R, Budelli R. The receptor potential in type I and type II vestibular system hair cells: a model analysis. *Hear Res* 2002;165:35-47.
6. Pietrobon D, Prod'hom B, Hess P. Interactions of protons with single open L-type calcium channels. pH dependence of proton-induced current fluctuations with  $Cs^+$ ,  $K^+$ , and  $Na^+$  as permeant ions. *J Gen Physiol* 1989;94:1-21.
7. Sitges M, Rodriguez RM. Effects of external pH variations on brain presynaptic sodium and calcium channels; repercussion on the evoked release of amino acid neurotransmitters. *Neurochem Res* 1998;23:477-485.
8. DeVries SH. Exocytosed proton feedback to suppress the  $Ca^{2+}$  current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 2001;32:1107-1117.
9. Graf PC, Jakob U. Redox-regulated molecular chaperones. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1624-1631.
10. Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 2003; 83:1183-1221.
11. Molina AJ, Verzi MP, Birnbaum AD, Yamoah EN, Hammar K, Smith PJ et al. Neurotransmitter modulation of extracellular  $H^+$  fluxes from isolated retinal horizontal cells of the skate. *J Physiol* 2004;560:639-657.
12. Molina AJ, Smith PJ, Malchow RP. Hydrogen ion fluxes from isolated retinal horizontal cells: modulation by glutamate. *Biol Bull* 2000;199:168-170.
13. Baumann TK, Martenson ME. Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin- gated channels. *J Neurosci* 2000;20:RC80.
14. Bianchi L, Driscoll M. Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron* 2002;34:337-340.
15. Abdurakhmanova G, Dorfman J, Xiao Y, Morad M. Protons enhance the gating kinetics of the alpha3/beta4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor by increasing its apparent affinity to agonists. *Mol Pharmacol* 2002;61:369-378.
16. Banke TG, David SM, Traynelis SF. Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *J Neurosci* 2005;25:42-51.
17. Gao J, Wu LJ, Xu L, Xu TL. Properties of the proton-evoked currents and their modulation by  $Ca^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  in the acutely dissociated hippocampus CA1 neurons. *Brain Res* 2004;1017:197-207.
18. Krishen BJ, Smart TG. Proton sensitivity of rat cerebellar granule cell GABA<sub>A</sub> receptors: dependence on neuronal development. *J Physiol* 2001;530:219-233.
19. Peretz A, Schottelndreier H, Aharon-Shamgar LB, Attali B. Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *J Physiol* 2002;545:751-766.
20. Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular  $H^+$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6445-6449.
21. Stoop R, Surprenant A, North RA. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *J Neurophysiol* 1997;78:1837-1840.
22. Vega R, Mercado F, Chavez H, Limon A, Almanza A, Ortega A et al. pH modulates the vestibular afferent discharge and its response to excitatory amino acids. *Neuroreport* 2003;14:1327-1328.

23. **Vega R, Soto E.** Opioid receptors mediate a postsynaptic facilitation and a presynaptic inhibition at the afferent synapse of axolotl vestibular hair cells. *Neuroscience* 2003;118:75-85.
24. **Baumann TK, Chaudhary P, Martenson ME.** Background potassium channel block and TRPV1 activation contribute to proton depolarization of sensory neurons from humans with neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 2004;19:1343-1351.
25. **Tominaga M, Tominaga T.** Structure and function of TRPV1. *Pflügers Arch* 2005;451:143-150.
26. **Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M.**  $Zn^{2+}$  and  $H^+$  are coactivators of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 2001;276:35361-35367.
27. **Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, et al.** Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 2004;24:8678-8689.
28. **Immke DC, McCleskey EW.** Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of  $Ca^{2+}$  blockade. *Neuron* 2003;37:75-84.
29. **Paukert M, Babini E, Pusch M, Grunder S.** Identification of the  $Ca^{2+}$  blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J Gen Physiol* 2004;124:383-394.
30. **Zhang P, Caressa CM.** Single channel properties of rat acid-sensitive ion channel-1alpha, -2a, and -3 expressed in Xenopus oocytes. *J Gen Physiol* 2002;120:553-566.
31. **Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC et al.** The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 2002;34:463-477.
32. **Kellenberger S, Schild L.** Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 2002;82:735-767.
33. **Mercado F, Lopez IA, Acuna D, Vega R, Soto E.** Acid-sensing ionic channels in the rat vestibular endorgans and ganglia. *J Neurophysiol* 2006;96:1615-1624.
34. **Mercado F, Vega R, Soto E.** Canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones: estructura, función, farmacología y fisiopatología. *Rev Neurol* 2005;41:667-675.
35. **Vukicevic M, Kellenberger S.** Modulatory effects of acid-sensing ion channels on action potential generation in hippocampal neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C682-C690.
36. **Krishnal OA, Pidoplichko VI.** A "receptor" for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neurosci Lett* 1981;24:243-246.
37. **Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW.** Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:711-716.
38. **Xiong ZG, Chu XP, Simon RP.**  $Ca^{2+}$ -permeable acid-sensing ion channels and ischemic brain injury. *J Membr Biol* 2006; 209:59-68.
39. **Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH, Jr., Welsh MJ.** Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 2003;23:5496-5502.
40. **Garza A, Chávez H, Vega R, Soto E.** Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud Mental* 2005;28:48-58.
41. **Salceda E, Garateix A, Soto E.** The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:1067-1074.
42. **Soto E, Limon A, Ortega A, Vega R.** Características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del ganglio vestibular en cultivo. *Gac Med Mex* 2002;138:1-13.
43. **Limon A, Perez C, Vega R, Soto E.**  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -current density is correlated with soma size in rat vestibular-afferent neurons in culture. *J Neurophysiol* 2005;94:3751-3761.
44. **Standker L, Beress L, Garateix A, Christ T, Ravens U, Salceda E, et al.** A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* 2006;48:211-220.
45. **Salceda E, Garateix A, Aneiros A, Salazar H, Lopez O, Soto E.** Effects of ApC, a sea anemone toxin, on sodium currents of mammalian neurons. *Brain Res* 2006;1110:136-143.
46. **Poirot O, Berta T, Decosterd I, Kellenberger S.** Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J Physiol* 2006;576:215-234.
47. **Wang W, Duan B, Xu H, Xu L, Xu TL.** Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *J Biol Chem* 2006;281:2497-2505.
48. **Garza A, Vega R, Soto E.** Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit* 2006;12:RA57-RA65.
49. **Magyar JS, Weng TC, Stern CM, Dye DF, Rous BW, Payne JC, et al.** Reexamination of lead(II) coordination preferences in sulfur-rich sites: Implications for a critical mechanism of lead poisoning. *J Am Chem Soc* 2005;127:9495-9505.
50. **Bouton CM, Frelin LP, Forde CE, Arnold GH, Pevsner J.** Synaptotagmin I is a molecular target for lead. *J Neurochem* 2001;76:1724-1735.
51. **Ghiring AB, Jenkins LM, Schenck BL, Deo S, Mayer RA, Pikaart MJ, et al.** Spectroscopic and functional determination of the interaction of  $Pb^{2+}$  with GATA proteins. *J Am Chem Soc* 2005;127:3751-3759.
52. **Habermann E, Crowell K, Janicki P.** Lead and other metals can substitute for  $Ca^{2+}$  in calmodulin. *Arch Toxicol* 1983;54:61-70.
53. **Markovac J, Goldstein GW.** Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 1988; 334:71-73.
54. **Westerink RH, Klompmakers AA, Westenberg HG, Vijverberg HP.** Signaling pathways involved in  $Ca^{2+}$ - and  $Pb^{2+}$ -induced vesicular catecholamine release from rat PC12 cells. *Brain Res* 2002;957:25-36.
55. **Westerink RH, Vijverberg HP.**  $Ca^{2+}$ -independent vesicular catecholamine release in PC12 cells by nanomolar concentrations of  $Pb^{2+}$ . *J Neurochem* 2002;80:861-873.