

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE E FARMACOLOGICHE

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE FARMACOLOGICHE
CURRICULUM TOSSICOLOGIA E TERAPIA
CICLO XXXII

**LA MODULAZIONE DEI CANALI TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL
V1 E A1 CON PROSTAGLANDINA-E₂ E BRADICHININA È ASSOCIATA AD
AUMENTO DELLA RISPOSTA TUSSIGENA ALLA CAPSAICINA ED A
VARIAZIONI DELLA REGOLAZIONE AUTONOMICA DEL RITMO
CARDIACO IN SOGGETTI SANI**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Nicola Ferri

Supervisore: Ch.mo Prof. Piero Maestrelli

Dottorando: Filippo Liviero

RIASSUNTO

BACKGROUND:

Vi sono evidenze in modelli animali che l'inalazione di particolato fine (PM), attivi i recettori polmonari TRPV1 e TRPA1 e attraverso una modulazione del sistema nervoso centrale possa influenzare la regolazione autonoma dell'attività cardiaca. Questa ipotetica via neurogena, potrebbe essere responsabile degli effetti cardiovascolari avversi osservati in soggetti suscettibili dopo esposizioni acute a PM.

OBIETTIVI:

Verificare che l'attività di TRPV1 e TRPA1 può essere modulata in vivo dall'inalazione di prostaglandina-E₂ (PGE₂) e bradichinina (BK), e che i cambiamenti nell'attività dei canali TRP interferiscano con la regolazione autonoma del ritmo cardiaco nell'uomo. In un gruppo di volontari sani abbiamo valutato:

1. la risposta tussigena alla capsaicina (CPS) ed alla cinnamaldeide (CMA), agonisti esogeni rispettivamente dei canali TRPV1 e TRPA1, somministrati per via inalatoria prima e dopo l'inalazione di PGE₂ e BK, agonisti endogeni in grado di attivare in vitro i canali TRP;
2. la variabilità della frequenza cardiaca (HRV) al momento della modulazione dei canali TRP con PGE₂ e BK.

È stato inoltre verificato:

3. il meccanismo molecolare della modulazione del canale TRPV1 in vitro su cellule HeLa trasfettate con la forma wild-type del TRPV1;
4. se la presenza di polimorfismi funzionali (SNPs) di TRPV1 spieghi la variabilità della risposta tussigena alla CPS e se modifichi la risposta tussigena alla modulazione dei canali TRP con PGE₂ e BK.

MATERIALI E METODI:

1. Sono stati reclutati 20 volontari sani, 17 dei quali hanno effettuato l'inalazione di PGE₂ e BK o diluente, in modo randomizzato e in doppio cieco. Subito dopo, ogni soggetto è stato sottoposto al test di stimolazione specifica del recettore TRPV1 con CPS e TRPA1 con CMA.
2. In 12 dei volontari sani arruolati è stata misurata la HRV tramite la registrazione dell'elettrocardiogramma (ECG), avvenuta dopo l'inalazione di diluente, PGE₂ e BK. Abbiamo analizzato tre variabili delle componenti spettrali nel dominio della frequenza che rappresentano indici di modulazione simpatica, vagale e del bilancio simpatico-vagale.
3. Abbiamo monitorato la funzionalità del canale TRPV1 misurando la concentrazione di [Ca²⁺] nelle cellule HeLa dopo trattamento con CPS e CMA. Abbiamo trasfettato le cellule

HeLa con il canale umano TRPV1 per misurarne la funzionalità, dopo il pre-trattamento con dosi crescenti di PGE₂, BK o particolato di scarico diesel (DEP) e successiva stimolazione con CPS.

4. Tutti i volontari sono stati caratterizzati per la risposta tussigena alla CPS. Abbiamo analizzato il DNA di ciascuno per caratterizzare sei SNPs di TRPV1.

RISULTATI:

1. L'inalazione di PGE₂ e BK ha determinato un aumento significativo della risposta tussigena indotta dalla CPS, indicando un aumento di sensibilità del TRPV1. La modulazione del TRPA1 ha mostrato cambiamenti inconsistenti della risposta tussigena indotta dalla CMA.
2. L'inalazione di PGE₂ e BK ha modificato significativamente l'HRV comportando uno sbilanciamento della regolazione autonoma del ritmo cardiaco a favore del sistema simpatico rispetto al vagale.
3. Il pretrattamento con PGE₂ o BK delle cellule HeLa che esprimono il TRPV1, non ha modificato le risposte cellulari indotte da CPS, dimostrando come nel nostro modello sperimentale, questi due mediatori non sensibilizzano direttamente il canale TRPV1. Il trattamento con il DEP ha aumentato significativamente le risposte cellulari mediate da CPS, indicando che TRPV1 è direttamente sensibilizzato dal particolato.
4. La variabilità della risposta tussigena alla CPS tra soggetti sani è spiegata da molteplici SNPs del canale TRPV1. Il contributo maggiore alla sensibilità in termini di risposta tussigena alla CPS in vivo è dovuto alla presenza di quattro SNPs combinati: I315M; I585V; T469I; P91S.

Questi dati supportano l'ipotesi che l'inalazione di PM, interferendo con la funzione dei TRP, induca effetti cardiovascolari acuti in soggetti suscettibili.

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto, desidero ringraziare il mio mentore, il professore Piero Maestrelli, la dottoressa Gabriella Guarnieri, la dottoressa Maria Cristina Scarpa, la dottoressa Paola Mason e tutto il team della Fisiopatologia Respiratoria dell'Unità di Medicina del Lavoro per il loro supporto, consulenza e competenza scientifica, ed in particolare per avermi dato l'opportunità di rimanere e completare il mio dottorato di ricerca. È stata un'esperienza estremamente gratificante da cui trarrò un grande beneficio.

È stato un piacere collaborare con il dottor Diego De Stefani del laboratorio guidato dal professor Rosario Rizzuto nel Dipartimento di Scienze Biomediche e con la dott.ssa Manuela Campisi del laboratorio di Mutagenesi Ambientale guidato dalla professoressa Sofia Pavanello nel Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità pubblica. Ringrazio il professor Sabino Iliceto, il professor Marcello Lotti, il dottor Franco Folino dell'Università di Padova ed il professor Massimo Corradi dell'Università di Parma per il loro supporto e contributo scientifico.

Un ringraziamento particolare al collegio docenti ed a tutto il XXXII ciclo del corso di dottorato in Farmacologia Tossicologia e Terapia del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova.

Un ringraziamento a tutti i volontari che hanno partecipato in maniera attiva alla realizzazione del progetto di ricerca permettendo la finalizzazione di questo contributo scientifico.

Tutti hanno svolto un ruolo importante nell'aiutarmi in questi ultimi tre anni.

Il mio amore, rispetto ed i miei ringraziamenti vanno a tutti i miei cari, a Fabiola ed a tutti coloro che mi vogliono bene.

INDICE

Riassunto	pagina 2
Ringraziamenti	pagina 4
Indice	pagina 5
CAPITOLO I	
Introduzione	pagina 7
<i>Etiologia della tosse</i>	pagina 8
<i>Neurofisiologia del riflesso della tosse</i>	pagina 9
<i>Fibre C</i>	pagina 10
<i>“Recettori della tosse” Aδ</i>	pagina 11
<i>Il ruolo dei meccanosensori nella tosse:</i>	
<i>Recettori ad adattamento rapido e lento</i>	
<i>Ruolo dei meccanosensori extrapolmonari:</i>	pagina 12
<i>Ruolo dei chemosensori nella tosse:</i>	pagina 13
<i>Ruolo dei recettori di superficie sulle terminazioni dei nervi delle vie aeree nel mediare la tosse:</i>	
<i>Transient Receptor Potential (TRP)</i>	pagina 14
<i>TRPV1</i>	
<i>TRPA1</i>	pagina 16
<i>Polimorfismi</i>	
<i>Recettore della Bradichinina</i>	pagina 17
<i>I canali ionici stimolati dall'acido (ASICs)</i>	
<i>Recettore della Prostaglandina E2</i>	pagina 18
<i>Na⁺ K⁺ ATPasi</i>	
CAPITOLO II	
Materiali e metodi	pagina 19
<i>Razionale</i>	pagina 20
<i>Partecipanti</i>	
<i>Disegno dello studio</i>	
<i>Questionario Leicester</i>	pagina 21
<i>Test di stimolazione dei recettori TRPV1 con capsaicina e TRPA1 con Cinnamaldeide</i>	pagina 22
<i>Test di modulazione dei canali TRP con diluente</i>	
<i>Test di modulazione dei canali TRP con Prostaglandina E2 e Bradichinina</i>	
<i>Valutazione della variabilità della frequenza cardiaca</i>	pagina 23
<i>Funzionalità di TRPV1 in vitro</i>	pagina 24
<i>Prodotti chimici, coltura cellulare e trasfezione</i>	
<i>Misure della concentrazione di [Ca²⁺]_{mt}</i>	
<i>Analisi dei polimorfismi</i>	pagina 26
<i>Isolamento e quantificazione del DNA</i>	
<i>Genotipizzazione di TRPV1</i>	
<i>Analisi statistica</i>	pagina 29
CAPITOLO III	
Risultati	pagina 30
<i>Test della tosse</i>	
<i>Modulazione dei canali TRP con inalazione di PGE2 e BK</i>	pagina 31
<i>Funzionalità di TRPV1 in vitro</i>	pagina 40
<i>Analisi dei polimorfismi</i>	pagina 45
CAPITOLO IV	
Discussione	pagina 51
Conclusioni	pagina 55
Bibliografia	pagina 56



CAPITOLO I

INTRODUZIONE

L'inquinamento atmosferico, in particolare quello da polveri di ridotte dimensioni, il cosiddetto PM (particulate matter), affligge tutte le aree urbane ed in particolare quelle della pianura padana. Numerosi studi epidemiologici hanno messo in evidenza problemi di salute pubblica in conseguenza di questo inquinamento tra cui l'aumento di morbilità e mortalità per infarto del miocardio che si osserva 1-2 ore dopo i picchi di concentrazione di PM nell'aria urbana (*Peters et al. 2004; Brook et al. 2010; Pope and Dockery 2006; Folino et al. 2017*). Particolarmente suscettibili agli effetti acuti cardiovascolari del PM sono i pazienti con malattia coronarica (*Sun et al, 2010*). Il meccanismo con cui l'esposizione per via inalatoria agli inquinanti atmosferici è associato ad eventi avversi cardiovascolari non è attualmente chiaro. I dati presenti in letteratura a supporto del verificarsi di una infiammazione sistemica sono incoerenti e sono più compatibili con gli effetti a lungo termine. In alternativa, è stato ipotizzato un meccanismo neuromorale (*Rhoden et al. 2005*). I recettori broncopulmonari vagali, come le terminazioni delle fibre C, sono i principali responsabili della stimolazione dei riflessi mediati a livello centrale, come la tosse, dovuti all'esposizione a sostanze irritanti (*Lee and Widdicombe 2001*). Vi sono evidenze che gli inquinanti atmosferici attivino i canali sensoriali TRPV1 e TRPA1 (canali TRP). *Robertson et al. (2014)* hanno dimostrato nei ratti che il particolato diesel induce effetti avversi cardiovascolari attraverso l'attivazione del canale sensoriale TRPV1. Nei ratti la stimolazione del Transient Receptor Potential Vanniloid 1 (TRPV1) dovuta all'inalazione di PM causa cambiamenti nel ritmo cardiaco e nella morfologia dell'ECG. (*Ghelfi et al. 2008*). *Robinson et al. (2018)* hanno osservato nella cavia di laboratorio e nei nervi sensoriali umani un'interazione tra DEP e TRPA1 nelle fibre C afferenti delle vie aeree. Pertanto, la regolazione simpatica e parasimpatica dell'attività cardiaca sembra influenzata dai riflessi mediati centralmente attraverso queste fibre C afferenti non mieliniche del nervo vago, che sono attivate dal PM (figura 1). In questo modo può essere spiegata la diminuzione dell'HRV che si verifica in soggetti sensibili dopo esposizioni a breve termine a PM (*Holguin et al. 2003*). Ciò è ulteriormente supportato dalla nostra osservazione che l'associazione tra esposizione a PM e la riduzione dell'HRV non è evidente in pazienti con attività simpatica regolata da β -bloccanti. (*Folino et al. 2009*). Tuttavia, non è mai stata fornita una prova diretta che questa sequenza sia operativa in vivo nell'uomo. La funzionalità dei canali TRPV1 e TRPA1 in vivo può essere studiata con il test della tosse dopo l'inalazione di agonisti specifici, capsaicina per TRPV1 e cinnamaldeide per TRPA1. (*Morice et al. ERS guidelines on the assessment of cough*).

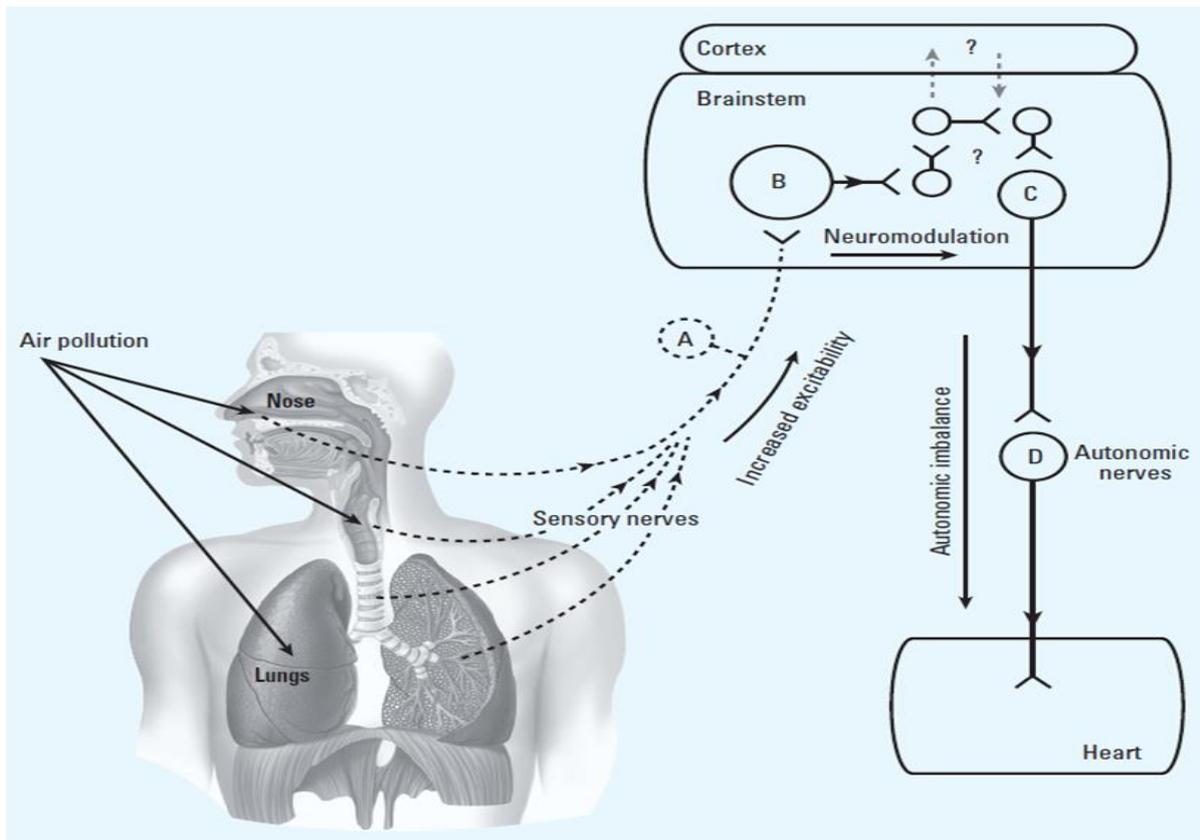


Figura 1. Rappresentazione semplificata di come l'esposizione agli inquinanti atmosferici possa determinare uno squilibrio della regolazione autonoma del cuore. L'attivazione dei nervi sensoriali delle vie aeree (A) provoca effetti locali e stimola i neuroni nel mesencefalo (B). I circuiti neurali all'interno del mesencefalo elaborano i segnali e quindi attivano il neurone autonomo preganglionico (C); i neuroni autonomi postgangliari (D) portano il segnale al cuore. L'inquinamento atmosferico può aumentare l'eccitabilità del neurone A (sensibilizzazione), che potrebbe potenziare la trasmissione nel neurone B che, a sua volta, aumenta/riduce la risposta del sistema nervoso centrale da parte del neurone C determinando uno squilibrio del sistema nervoso autonomo.*

*Adattata da Undem et al. (2000).

Etiologia della tosse

La tosse è un problema significativo a livello mondiale ed il motivo più frequente per cui le persone chiedono consiglio al proprio medico (Schappert et al. 2006). La tosse funge da importante meccanismo protettivo per liberare le vie aeree superiori da materiali estranei ed irritanti, ma in casi patologici il riflesso può essere accentuato o compromesso. Il riflesso della tosse è stato descritto come una "manovra espulsiva forzata, di solito contro una glottide chiusa associata a un suono caratteristico" (Morice et al. 2006). La tosse può esistere come sintomo acuto, cioè per meno di 3 settimane, di solito causato da un'infezione virale del tratto respiratorio superiore, o cronico, in tal caso viene definita come tosse che dura più di 8 settimane (Morice et al. 2006). La tosse cronica è un sintomo chiave di varie condizioni respiratorie come l'asma bronchiale (Marsden et al. 2008), la broncopneumopatia cronica ostruttiva (Smith et al. 2006) la fibrosi polmonare idiopatica (Key et al. 2010) ed il cancro ai polmoni (Harle et al. 2012). Tuttavia, la tosse persistente si può anche presentare ai medici come un'unica entità senza ovvia causa sottostante. Ad un certo numero di

pazienti, valutati presso centri specializzati per la tosse, possono essere diagnosticate e trattate alcune patologie associate alla sintomatologia tussiva: asma variante tosse, rinorrea post-nasale o malattia da reflusso gastroesofageo (*Morice 2002*). Tuttavia fino al 40% dei pazienti rimane resistente al trattamento e in questo caso si parla di tosse idiopatica cronica di eziologia sconosciuta (*Haque et al. 2005*).

Neurofisiologia del riflesso della tosse

La maggior parte delle nostre conoscenze sulla neurofisiologia della tosse è derivata da studi sugli animali (*Canning et al. 2004*). Il riflesso della tosse si genera attraverso una via afferente vagale la cui esistenza è stata dimostrata sia negli animali che nell'uomo dall'abolizione della sintomatologia tussiva con il blocco vagale (*Chung KF e JG Widdicombe 2009*). I nervi afferenti delle vie aeree sono attivati da irritanti meccanici o chimici che causano la trasmissione di potenziali d'azione attraverso il nervo vago al nucleo del tratto solitario (NTS), nel midollo allungato del tronco cerebrale. L'NTS quindi proietta verso i nervi efferenti per produrre la risposta motoria della tosse attraverso l'attivazione muscolare della glottide, della laringe, del diaframma e dei muscoli intercostali (figura 2). Il riflesso motore della tosse è costituito da 3 fasi; inspirazione, compressione contro una glottide chiusa seguita da rapida espulsione dell'aria (*Morice et al. 2007*). Il riflesso motorio fisico è generalmente preceduto da un bisogno di tosse, una sensazione spesso descritta come un solletico o un'irritazione nella gola o nel torace. L'impulso di tossire è un concetto complesso da comprendere, sebbene sia ben descritto dalle persone e possa essere misurato soggettivamente (*Dicpinigaitis et al. 2012*); la sua percezione varia da individuo a individuo ed è difficile da studiare negli animali. Le reti neurali coinvolte nella generazione del bisogno di tossire rimangono poco chiare, ma ulteriori approfondimenti sono stati forniti da studi di imaging effettuati con la risonanza magnetica funzionale (fMRI) (*Mazzone et al. 2007*). Mazzone et al. hanno dimostrato associazioni tra la sensazione di stimolo a tossire e l'attivazione di più aree del cervello. Tuttavia nello studio suddetto l'impulso di tossire è stato stimolato tramite l'inalazione di capsaicina che provoca altri effetti transitori quali il bruciore alla gola e la lacrimazione degli occhi, che potrebbero aver contribuito ad alcune delle attivazioni cerebrali evidenziate con la fMRI. Gli studi di fMRI hanno anche dimostrato che la percezione della sensazione dello stimolo di tossire e la tosse stessa possono essere inibiti da parte del placebo, il che suggerisce che esistano anche reti inibitorie che modificano i processi sensoriali centrali (*Leech et al. 2012 and 2013*). Un concetto interessante è che esistono diversi tipi di tosse sotto vari livelli di controllo cosciente. Ad esempio, quando si avverte il bisogno di tossire, gli esseri umani sani e in stato cosciente hanno la capacità di scegliere di tossire e soddisfare l'impulso o di sopprimere la tosse se ritengono che non sia appropriata. Tuttavia, quando c'è un bisogno improvviso e immediato di tossire, come nel caso

dell'aspirazione di una particella estranea, il controllo cosciente è molto limitato e la tosse è spontanea. Inoltre, gli esseri umani possono tossire in modo completamente volontario senza stimolare le vie aeree. Questo implica che più reti cerebrali complesse sono probabilmente coinvolte sia nella produzione che nell'inibizione della tosse.

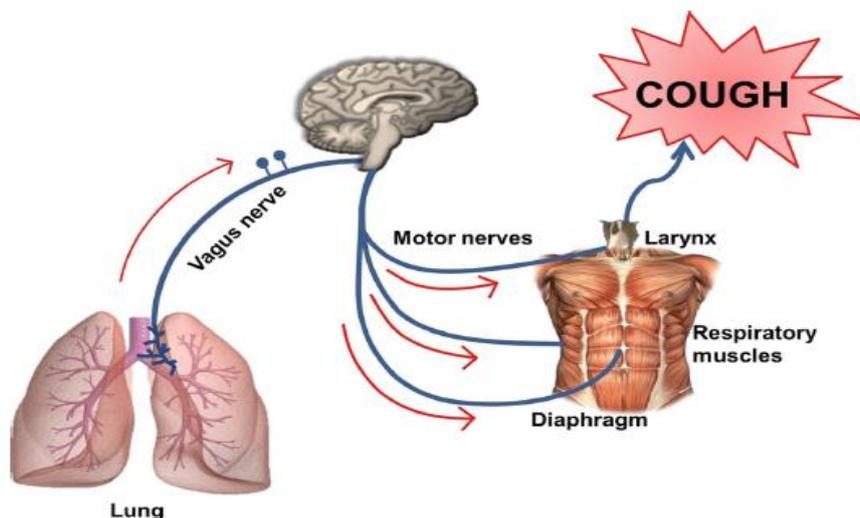


Figura 2. Gli irritanti chimici o meccanici stimolano i nervi afferenti vagali che comunicano con l'NTS del tronco cerebrale. Il segnale proietta verso vie efferenti che generano l'attivazione muscolare nel torace e una risposta motoria della tosse. *

*Adattata da Bonvini et al. (2015).

Sebbene sia risaputo che la tosse è mediata dalle vie vagali, non è chiaro esattamente quali nervi siano coinvolti e in che modo differiscono il riflesso difensivo della tosse dall'eccesso di tosse che si verifica in alcune malattie. Gli studi sui nervi afferenti coinvolti nella tosse e altri riflessi respiratori furono descritti per la prima volta nei gatti da Widdicombe nel 1954 (*Widdicombe 1954*), che contribuì in modo significativo alla ricerca in questo campo. Da allora le fibre afferenti che si ritiene regolino la tosse sono state ampiamente studiate (*Canning et al. 2006*) e si ritiene che almeno due tipi principali, le fibre C e le fibre A δ , svolgano ruoli fondamentali.

Fibre C

Le fibre C sono nervi non mielinizzati a conduzione lenta (<1 m/s) che innervano le vie aeree superiori e inferiori (*Grace et al. 2013*). Esse possono essere suddivise secondo la loro origine e secondo l'attivazione. Le fibre C hanno origine principalmente nei gangli vagali giugulari che innervano le vie aeree superiori (bronchiali) ed inferiori (polmonari). Alcune fibre C originano anche nel ganglio vagale nodoso che innerva solo le vie aeree inferiori (*Undem et al. 2004*). Le fibre C sono stimulate principalmente da sostanze chimiche nocive, sostanze irritanti ambientali, calore ed acido. Inoltre sono sensibili alla stimolazione meccanica ma generalmente rispondono meno prontamente (*Canning et al. 2006*). Si ritiene che la fibra C abbia un ruolo nel riflesso

tussigeno poichè questa esprime il recettore per la capsaicina, il TRPV1 che induce la tosse negli animali e nell'uomo (*Midgren et al. 1992, Laloo et al. 1995*), ma questo ruolo è ancora oggetto di discussione (*Caterina et al. 1997*). Tuttavia, i dati in letteratura hanno suggerito che il ruolo delle fibre C nella tosse può essere più complesso di quanto si pensi e che diversi sottotipi possono avere compiti opposti. Ad esempio, le fibre C che terminano nei bronchi (dove la tosse è facilmente stimolabile) possono essere coinvolte nella stimolazione della tosse mentre le fibre C polmonari possono inibire il riflesso tussigeno (*Canning et al. 2006, Undem et al. 2004*). L'inibizione della sintomatologia tussiva a seguito dell'attivazione di fibre C polmonari è stata dimostrata in animali anestetizzati (*Tatar et al. 1988, 1994*).

“Recettori della tosse” A δ

Il termine "recettore della tosse" è stato introdotto in letteratura per identificare un sottotipo specifico di fibre nervose A δ che sono distinte dai tradizionali meccanorecettori intrapolmonari e hanno una funzione primaria di regolazione della tosse (*Canning et al. 2006, Widdicombe 1954*). Queste distinte fibre A δ originano prevalentemente nei gangli vagali nodosi ed innervano le vie aeree superiori. È stato attribuito a queste fibre un ruolo regolatorio della sintomatologia tussiva nelle cavie studiate mediante stimolazione meccanica, elettrica, osmolare ed acida delle fibre della trachea e della laringe (*Canning et al. 2004*). Sono distinte dalle fibre C per la loro mielinizzazione e la maggiore velocità di conduzione (*Canning et al. 2006*). In precedenza si pensava che le fibre A δ mancassero di sensibilità alla capsaicina, ma prove recenti mostrano che esistono sottotipi A δ sensibili alla capsaicina (*Adcock et al. 2014*): pertanto diversi percorsi afferenti possono regolare una differente risposta tussigena. Canning et al. hanno suggerito che due distinte vie vagali afferenti che iniziano dalle fibre C e dalle fibre A δ possano produrre diversi tipi di tosse, vale a dire la “buona tosse” e la “cattiva tosse”. I recettori della tosse sensibili all'acido possono avere un'importante funzione protettiva per difenderci dall'aspirazione gastrica e dalle particelle estranee, mentre le fibre C possono contribuire all'aumento della tosse patologica nella malattia (*Canning et al. 2009, 2011*).

Il ruolo dei meccanosensori nella tosse:

Recettori ad adattamento rapido e recettori ad adattamento lento

Ai recettori ad adattamento rapido (RAR) e recettori ad adattamento lento (SAR) che innervano le vie aeree intrapolmonari ed extrapolmonari è stato imputato un ruolo nella regolazione della tosse. Tuttavia, negli ultimi anni il loro coinvolgimento diretto è stato messo in discussione. La distribuzione e l'attivazione di questi sottotipi varia tra le specie animali e le tecniche utilizzate per

identificarle differiscono tra i diversi laboratori (*Canning et al. 2006*). I RAR si adattano rapidamente all'infrazione polmonare e la loro attivazione è coinvolta in processi meccanici come la contrazione muscolare delle vie aeree, il broncospasmo, il collasso polmonare e la secrezione di muco. I SAR o i recettori di stiramento hanno un grande coinvolgimento nel controllo della respirazione (*Schelegle et al. 2001*), il che ha portato all'idea che potrebbero anche avere un ruolo nella sintomatologia tossiva. Tuttavia, studi sugli animali hanno dimostrato che i SAR non rispondono agli stimoli chimici come la capsaicina (*Ho et al. 2001*). Sebbene RAR e SAR possano non avere un ruolo diretto nella tosse, esiste la possibilità che siano coinvolti indirettamente poiché la loro attivazione può modulare i nervi che quindi provocano direttamente la tosse (*Canning et al. 2006*). Bradichinina e capsaicina possono facilmente causare tosse e possono anche causare broncocostrizione e secrezione di muco che può portare all'attivazione dei RARs (*Widdicombe 1998; Widdicombe 2003*). Vi sono tuttavia due motivi che suggeriscono che i RAR non siano coinvolti nella tosse. Sostanze come la metacolina, l'istamina e le neurochine stimolano i RARs ma non comportano tosse (*Barnes, Piper et al 1984; Fujimura, Sakamoto et al 1992*). Anche in cavie, i RARs hanno dimostrato di essere attivi durante la respirazione normale, ma la tosse non è indotta a meno che stimoli specifici non vengano somministrati (*Canning, Reynolds et al 2001; Canning, Mazzone et al 2004*).

Ruolo dei meccanosensori extrapolmonari:

Nel caso delle cavie, i meccanosensori extrapolmonari si trovano nella trachea e nella laringe e sono stimolati attraverso stimoli meccanici come il tatto e anche qualsiasi cambiamento nel pH (*Kollarik e Undem 2002; Canning, Mazzone et al. 2004*). La loro posizione e il tipo di stimoli che provocano la loro attivazione suggerirebbero un coinvolgimento nella tosse "difensiva" che viene prodotta in risposta all'inalazione di un corpo estraneo o contenuto acido come da reflusso. La tosse prodotta attraverso l'attivazione di queste fibre è presente in entrambi gli stati cosciente ed incosciente (es. durante l'anestesia generale) (*Canning, Mazzone et al. 2004*), suggerendo che la corteccia cerebrale non giochi un ruolo nell'interpretazione dei segnali generati dalla loro attivazione e che la risposta sia puramente di tipo neurogeno. Il meccanismo attraverso il quale l'acido attiva queste fibre non è attualmente chiaro. La sensibilità di queste fibre non è tuttavia mediata dal recettore TRPV1 che invece è il recettore coinvolto nella sensibilità della fibra C agli acidi (*Kollarik e Undem 2002*). È interessante notare che la sensibilità di queste fibre all'acido dipende dalla velocità di riduzione del pH poiché una rapida riduzione del pH nell'arco di 1-2 secondi comporta la loro attivazione, ma un simile grado di riduzione nell'arco di 60 secondi non lo farebbe (*Kollarik e Undem 2002*). Anche l'attivazione di queste fibre su applicazione di acido è transitoria e da queste due osservazioni, si ritiene che queste fibre siano attivate attraverso i canali ionici stimolati dall'acido (ASIC).

La possibilità della loro esistenza nell'uomo è supportata dall'osservazione che un leggero tocco alla laringe o alla trachea, ad esempio in procedure come la broncoscopia, provocherebbe tosse (Nishino, Tagaito et al. 1996).

Ruolo dei chemosensori nella tosse:

Stimoli come l'inalazione di capsaicina e bradichinina sono potenti agenti tussigeni e agiscono attivando i chemosensori (Ho Gu et al. 2001; Lee e Pisarri 2001). Questi stimoli agiscono in gran parte o interamente attraverso il recettore TRPV1, la cui presenza è stata confermata nelle fibre C delle vie aeree (Groneberg, Niimi et al. 2004; Watanabe, Horie et al. 2006; Kwong, Carr et al. 2008). La tosse prodotta dall'attivazione dei chemosensori è tuttavia abolita dall'anestesia generale (Tatar, Webber et al. 1988; Tatar, Sant'Ambrogio et al. 1994; Canning, Mazzone et al. 2004) e sulla base di questa osservazione, è stato suggerito che gli impulsi generati dall'attivazione dei chemosensori vengano elaborati nell'area corticale superiore (Mazzone et al. 2004). Pertanto si pensa che la tosse generata dalla loro attivazione non sia strettamente di natura riflessa. Almeno nelle cavie, le fibre C possono essere suddivise in sottotipi a seconda della loro origine gangliare, della sensibilità all'adenosina, all'ATP e agli agonisti 5HT₃ della serotonina ed alla distribuzione nelle vie aeree (Undem, Chuaychoo et al. 2004; Chuaychoo, Lee et al. 2005; Chuaychoo, Lee et al. 2006). Poiché l'applicazione di capsaicina o bradichinina alla mucosa tracheale migliora la successiva sensibilità agli stimoli che inducono la tosse (Mazzone, Mori et al. 2005; Canning, Mori et al. 2006), è stato ipotizzato che le fibre C giugulari attivate siano responsabili dell'aumentata risposta tussigena. A differenza delle fibre C giugulari, le fibre C nodose sono attivate attraverso gli agonisti 5 HT₃ e nei cani anestetizzati l'attivazione della fibra C attraverso fenildiguanide, che è un agonista di 5 HT₃, ha dimostrato di inibire la tosse (Tatar, Sant'Ambrogio et al. 1994). Queste osservazioni suggeriscono che le fibre C si suddividano in due sottotipi che possono avere effetti opposti sulla tosse. Ciò è ulteriormente supportato dall'osservazione che sebbene il test della tosse con capsaicina e bradichinina nell'uomo causi tosse, la somministrazione di serotonina o adenosina potrebbe non farlo (Stone, Worsdell et al. 1993; Burki, Dale et al. 2005).

Ruolo dei recettori di superficie sulle terminazioni dei nervi delle vie aeree nel mediare la tosse:

In letteratura, i neuroni coinvolti nella trasmissione di impulsi tussigeni sono spesso definiti sensori, ad esempio meccanosensori e chemosensori, come descritto in precedenza. D'altra parte, i recettori sono canali di superficie cellulare o proteine che svolgono un ruolo nel generare un potenziale d'azione quando viene applicato un determinato stimolo. Esistono molti tipi di recettori che svolgono un ruolo nel mediare la tosse e questi sono descritti di seguito.

Transient Receptor Potential (TRP)

La famiglia dei Transient Receptor Potential (TRP) è costituita da proteine che sono ampiamente distribuite nel corpo e svolgono un ruolo importante nella trasmissione di una serie di stimoli sensoriali. Esistono sette classi principali della famiglia TRP e queste sono etichettate come TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP e TRPV. Questa suddivisione si basa sulle somiglianze nelle sequenze di aminoacidi (*Clapham, Julius et al. 2005; Ramsey, Delling et al. 2006*). Insieme, questi recettori sono responsabili della trasmissione di una varietà di sensazioni come la temperatura, il dolore e il gusto. I recettori TRP sono essenzialmente canali che, all'attivazione, consentono ai cationi come il sodio e il calcio di muoversi secondo il loro gradiente di concentrazione. Ciò provoca la depolarizzazione della cellula nei tessuti eccitabili.

Della famiglia TRP, per quanto riguarda la tosse, il tipo che è stato oggetto di maggiore interesse è stata la sottofamiglia TRPV. Questo perché include il recettore TRPV1 che è noto per essere attivato dalla capsaicina (*Szallasi e Blumberg 1999*), una sostanza che è stata utilizzata come agente tussigeno inalatorio per i test della tosse. Si ritiene che TRPV1 svolga un ruolo centrale nella tosse cronica e il suo ruolo è ulteriormente descritto di seguito.

TRPV1

Il TRPV1 è un canale cationico non selettivo appartenente alla sottofamiglia vanilloide dei canali cationici TRP (*Montell C, 2005*). È localizzato nei neuroni nocicettivi dei nervi sensoriali delle vie aeree e partecipa (tramite la generazione di segnali Ca_{2+} dipendenti), ai meccanismi che contribuiscono alla difesa delle vie aeree come la tosse e la clearance mucociliare (*Groneberg DA, et al. 2004; McLeod et al. 2006*). È anche considerato un “recettore patologico” che svolge un ruolo importante nella trasduzione di stimoli nocivi e nel mantenimento di condizioni infiammatorie (*Ferrer-Montiel et al, 2012*). Infatti l'attività di TRPV1 è stata correlata a diversi aspetti delle patologie croniche delle vie aeree come l'infiammazione neurogenica (*Zhang G. et al. 2008; Geppetti P. et al. 2006*), la tosse cronica indotta da irritanti (*Groneberg DA et al. 2004; McLeod RL et al. 2006*), la sindrome da ipersensibilità delle vie aeree (*Lee LY, and Gu Q, 2009*) e l'iperreattività bronchiale da sensibilizzazione a isocianati (TDI) (*Devos FC et al. 2016*). Esperimenti in vitro hanno mostrato che irritanti agonisti esogeni, come capsaicina e resiniferatossina, ed endogeni, come l'anandamide (*Jia et al. 2002; Kagaya et al, 2002*) si legano direttamente e aprono i canali ionici TRPV1 (*Caterina et al. 1997, Deering-Rice et al. 2012*). Gli agonisti del canale TRPV1 sono in grado non solo di attivarlo ma anche di sensibilizzarlo, tuttavia non è sempre possibile distinguere tra i due meccanismi. Ad esempio, un basso livello di pH ed il calore possono sia attivare che sensibilizzare il canale TRPV1, riducendo la soglia di attivazione del

canale stesso (Caterina et al, 1997; Trevisani et al. 2007). Agonisti esogeni come la capsaicina e l'acido citrico ed endogeni come bradichinina e prostaglandina E₂, stimolano la tosse negli esseri umani e in modelli animali. Inoltre lo stimolo tussigeno viene inibito dagli antagonisti del TRPV1 (capsazepine e analoghi della cinnamide) (Grace et al. 2012). Esperimenti in vitro hanno dimostrato che anche le sostanze inquinanti di particolato ambientale interagiscono con il TRPV1. Nei ratti la stimolazione del TRPV1 da parte del PM, causa alterazioni del ritmo cardiaco e della morfologia dell'elettrocardiogramma (Ghelfi et al. 2008). Particelle fini ambientali possono inoltre aumentare i livelli plasmatici di angiotensina II, suggerendo un ruolo del sistema renina-angiotensina nello sviluppo di eventi cardiaci acuti (Ghelfi et al. 2010). Numerosi stimoli diversi come la bradichinina e le prostaglandine possono modulare la funzione di TRPV1. Queste interazioni tra TRPV1 ed altri recettori sono illustrate in figura 3.

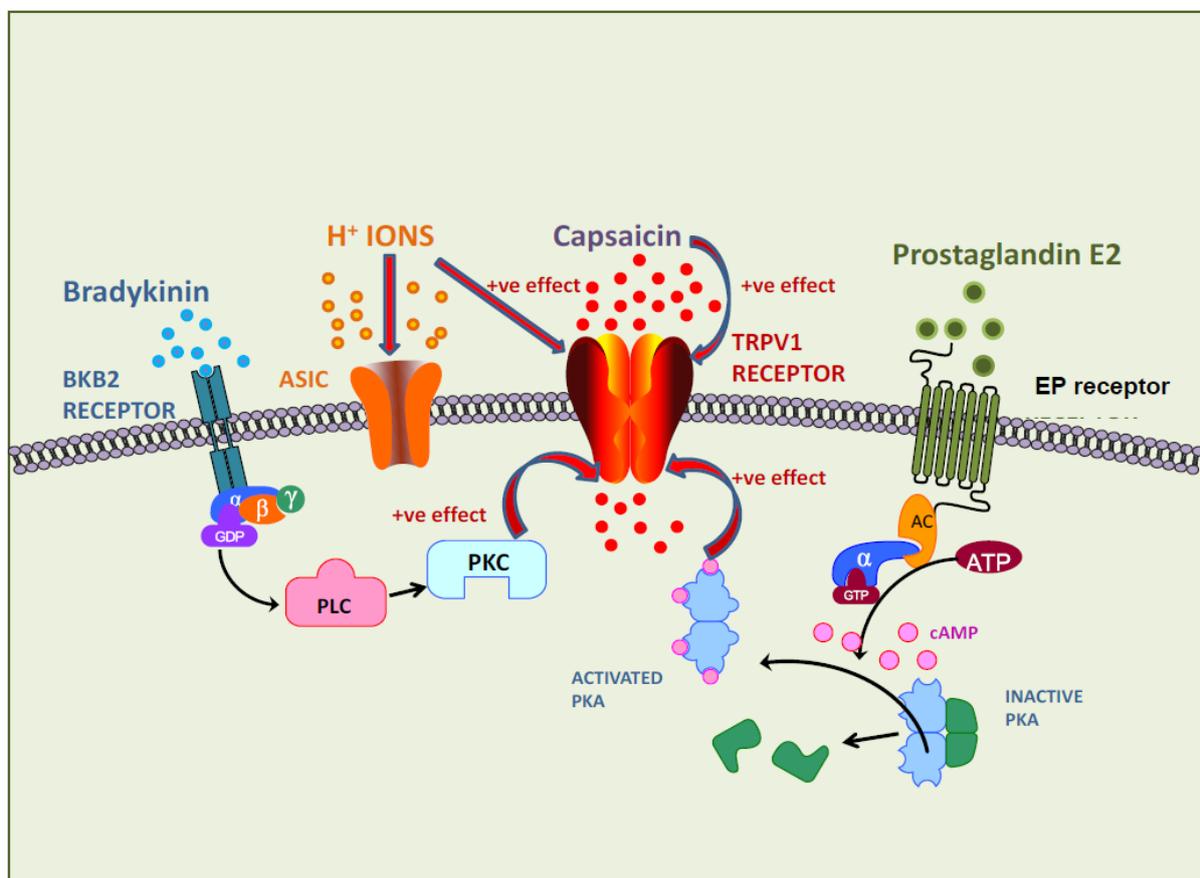


Figura 3. (PLC = fosfolipasi C, AC = adenilato ciclasi, PKC = proteina chinasi C, ASIC = canali ionici di rilevamento dell'acido, PKA = proteina chinasi A, EP = recettore della prostaglandina E, BKB2 = recettore della bradichinina)*.

*Adattata da: Szallasi, Cortright et al. 2007

Il canale TRPV1 interagisce con un'intera varietà di altri recettori come i recettori delle prostaglandine e il recettore della bradichinina e con i canali ionici sensibili agli acidi. Pertanto è possibile che TRPV1 possa essere attivato da un numerosi stimoli diversi oltre che dalla capsaicina. A causa delle strette interazioni con così tanti altri recettori e vie cellulari che possono provocare

l'attivazione delle fibre C, il blocco del TRPV1 può essere di beneficio terapeutico nella tosse cronica.

TRPA1

Anche il canale TRPA1 è un canale cationico non selettivo, altamente espresso nei neuroni sensoriali di piccolo diametro del polmone, svolge l'importante funzione di sensore di stimoli nocivi e di danni tissutali (*Rech et al. 2010*). Gli agonisti esogeni del TRPA1 includono estratti di cibi piccanti, come l'olio di mostarda, aglio, cannella e wasabi (*Bandell et al, 2004; Macpherson et al, 2005*), irritanti ambientali presenti nell'inquinamento atmosferico, quali lo scarico dei veicoli, il fumo di sigaretta, isotiocianati ed acroleina (*Bautista et al. 2006; Andrè et al. 2008*) e prodotti di ossidazione (4-idrossinonenale e l'oxononenale) (*Trevisani et al. 2007*). Risultati controversi sono stati ottenuti per quanto riguarda l'attivazione di TRPA1 a basse temperature $< 17^{\circ} \text{C}$ (*Zhou et al. 2011*). Inoltre esistono prove sulla sensibilizzazione ed attivazione di TRPA1 anche da parte degli agonisti endogeni BK (attraverso il recettore BKB2) (*Bandell et al. 2004; Grace et al. 2012*) e PGE₂ (attraverso il recettore EP3) (*Bang et al. 2007*). Nelle vie aeree i canali TRPA1 sono espressi principalmente nei neuroni vagali (*Nassenstein et al. 2008; Jang et al. 2012*). L'attivazione dei canali TRPA1, stimola le fibre-C vagali broncopulmonari nei roditori (*Andrè et al. 2009; Birrell et al. 2009; Grace et al. 2012*) evocando la tosse nelle cavie e nei soggetti sani (*Birrell et al. 2009*). Perciò, l'attivazione di TRPA1 sembra essere un meccanismo chiave nel provocare la tosse, causata da esposizioni inalatorie ad irritanti ambientali e professionali (*Grace et al. 2011*), che sono in grado di attivare TRPA1 nelle vie aeree (*Deering-Rice et al. 2011; Shapiro et al. 2013*).

Polimorfismi

TRPV1 e TRPA1 sono canali ionici polimorfici nell'uomo. *Cantero-Recasens et al. (2010)* riportano l'analisi funzionale del TRPV1-I585V, utilizzando il colorante fura-2 per misurare le concentrazioni di Ca₂₊ intracellulare, rivelando una minore attività del canale in risposta a due stimoli tipici del TRPV1, il calore e la capsaicina. In uno studio più recente sono stati identificati 28 polimorfismi genetici di TRPV1, TRPV-4 e TRPA1, tuttavia solo i 6 polimorfismi del TRPV1, non comunque testati dal punto di vista funzionale, sono risultati associati a tosse in soggetti sani, in due studi indipendenti condotti in 8 paesi europei (*Smit et al. 2012*).

Recettore della Bradichinina

La bradichinina è un peptide di 9 aminoacidi che ha una serie di effetti nel corpo come l'aumento della permeabilità vascolare e della vasodilatazione, svolgendo un ruolo importante nell'infiammazione e nella trasmissione del dolore. Agisce sia da attivatore che da modulatore per quanto riguarda la tosse. Esistono due tipi di recettori per la bradichinina nel corpo, il recettore BKB1 che è inducibile ed è espresso dalla presenza di infiammazione e danno tissutale (*Ahluwalia e Perretti 1999*) e il recettore BKB2 che è presente costitutivamente (*Couture, Harrison et al. 2001*). La bradichinina stimola tutti i tipi di fibre afferenti ai polmoni, tranne le fibre sensoriali che si adattano lentamente (*Coleridge et al. 1983; Bergren 1997; Kajekar, Proud et al. 1999*). Entrambi i recettori BKB1 e BKB2 esercitano il loro effetto come recettori accoppiati a proteine G e attivando la fosfolipasi C o A2. L'attivazione della fosfolipasi C porta alla sensibilizzazione di TRPV1 attraverso la proteina chinasi C (*Premkumar e Ahern 2000; Sugiura, Tominaga et al. 2002*). Il recettore BKB2 può sensibilizzare il TRPV1 anche attraverso la produzione di metaboliti della 12-lipossigenasi e della 5-lipossigenasi (*Shin, Cho et al. 2002; Carr, Kollarik et al. 2003*).

L'attivazione indotta da BKB2 delle fibre C è ridotta dai farmaci che bloccano il recettore TRPV1 e nei topi privi del recettore TRPV1 (*Carr, Kollarik et al. 2003; Kollarik e Undem 2004*), tali dati suggeriscono che la risposta sia mediata in parte attraverso l'attivazione del recettore TRPV1. Infatti, bloccando il recettore TRPV1 non si impedisce del tutto la risposta tussigena indotta dalla bradichinina. Nelle fibre C tracheali della cavia, l'attivazione in risposta alla bradichinina è inibita dai bloccanti dei canali del cloro (*Lee, Macglashan et al. 2005*); quindi oltre all'attività attraverso il recettore TRPV1, la bradichinina può anche esercitare il suo effetto attraverso l'attività del canale del cloro.

I canali ionici stimolati dall'acido (ASICs)

I canali ionici di rilevamento dell'acido sono membri della super famiglia dei canali del sodio e sono costituiti da molti sottotipi (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 e ASIC4). Come è stato descritto sopra, le caratteristiche della tosse indotta dall'applicazione locale dell'acido citrico sono transitorie e dipendono dal tasso di riduzione del pH, il che suggerisce la partecipazione di questi canali (*Kollarik e Undem 2002*). Inibitori non selettivi di ASIC come l'amiloride provocano una parziale inibizione della tosse indotta dall'acido citrico nella cavia inconscia (*Canning, Farmer et al. 2006*). Gli ASIC sono sovraregolati nei neuroni sensoriali in risposta all'infiammazione e questo meccanismo può svolgere un ruolo nella sensibilizzazione (*Mamet, Baron et al. 2002*).

Recettore della Prostaglandina E₂

La prostaglandina E₂ esercita i suoi effetti principalmente attraverso l'attivazione dei recettori EP che sono di quattro tipi: EP1, EP2, EP3 ed EP4, vengono distinti sulla base della risposta agli agonisti ed agli antagonisti della prostaglandina E₂. Oltre ai recettori EP per i quali ha un'elevata affinità, PGE₂ può anche attivare altri recettori prostanoidi, cioè recettori FP, IP, TP, DP e CRTh2 per i quali ha un'affinità inferiore (Maher, Birrell et al. 2009). L'EP1 e l'EP3 sono considerati recettori stimolanti poiché la loro attivazione porta alla stimolazione della cellula interessata, come la contrazione della cellula muscolare liscia o l'attivazione del neurone. L'EP2 e l'EP4 sono considerati recettori inibitori a causa di effetti opposti. Sui neuroni sensoriali vagali diverse prostaglandine tra cui PGE₂ sono note per esercitare effetti eccitatori (Undem e Weinreich 1993; Maher, Birrell et al. 2009). Recentemente, è stato dimostrato che nell'uomo, nei topi e nelle cavie, la PGE₂ provoca la depolarizzazione delle fibre nervose del vago e che ciò può essere bloccato mediante l'uso di antagonisti selettivi del recettore EP3 (Maher, Birrell et al. 2009) suggerendo che la tosse dovuta alla prostaglandina-E₂ inalata è causata dall'attivazione dei recettori EP3. Oltre all'attivazione diretta delle fibre sensoriali afferenti con conseguente tosse, la PGE₂ ha anche dimostrato di essere in grado di influenzare la tosse in risposta ad altri stimoli. L'inalazione di PGE₂ prima dell'inalazione di capsaicina provoca una maggiore sensibilità alla capsaicina (Choudry, Fuller et al. 1989).

Na⁺ K⁺ ATPasi

Un certo tipo di meccanosensori è stato descritto nelle grandi vie aeree che sono molto sensibili a stimoli meccanici e alla riduzione del pH (Kollarik e Undem 2002; Canning, Mazzone et al. 2004) e sono insensibili agli stimoli chimici come capsaicina, bradichinina e adenosina. Poiché la tosse dovuta a queste fibre è presente anche nello stato di incoscienza, si pensa che trasmettano una risposta veramente riflessa e la loro posizione nelle grandi vie aeree e la natura degli stimoli che portano alla loro attivazione suggeriscono che queste fibre provocano una tosse protettiva che protegge contro l'aspirazione. Na⁺ K⁺ ATPasi è assente nelle fibre C polmonari (Mazzone e McGovern 2006). L'uso di ouabaina che inibisce selettivamente l'isoenzima α_3 di Na⁺ K⁺ ATPasi provoca l'inibizione della tosse evocata dall'applicazione di acido citrico, o da stimoli elettrici in cavie anestetizzate (Mazzone, Reynolds et al. 2009). Come atteso l'applicazione di ouabaina non ha avuto alcun effetto sui riflessi delle fibre C.

CAPITOLO II

MATERIALI E METODI

Razionale

Lo scopo del presente studio è di verificare le ipotesi secondo cui l'attività di TRPV1 e TRPA1 può essere modulata dall'inalazione di mediatori endogeni e che i cambiamenti nell'attività dei canali TRP interferiscano con la regolazione autonoma del ritmo cardiaco. Per verificare queste ipotesi in un gruppo di volontari sani, abbiamo innanzitutto valutato la risposta al test della tosse con capsaicina e con cinnamaldeide prima e dopo l'inalazione di prostaglandina E₂ e bradichinina (BK), agenti in grado di attivare sia i canali TRPV1 che TRPA1 in vitro. In secondo luogo, abbiamo valutato la variabilità della frequenza cardiaca al momento della modulazione dei canali TRP con PGE₂ e BK. Inoltre, abbiamo esplorato il meccanismo molecolare della modulazione del canale TRP in vitro su cellule HeLa trasfettate con il TRPV1 wild-type. Infine, abbiamo valutato se la presenza di polimorfismi funzionali di TRPV1 modifichi la risposta tussigena alla modulazione dei TRP con PGE₂ e BK.

Partecipanti

Sono stati reclutati 20 volontari sani, in ciascun soggetto è stata valutata nel DNA la presenza di sei polimorfismi funzionali non sinonimi di TRPV1. Tra questi 17 sono stati sottoposti ai tests di modulazione dei canali TRP con agonisti esogeni ed endogeni, 12 sono stati sottoposti all'analisi dell'HRV dopo modulazione dei canali TRP con PGE₂ e BK. Il numero approssimativamente uguale di maschi e femmine è stato scelto intenzionalmente. Tutti i pazienti dovevano essere non fumatori, senza malattie acute o croniche e non assumere farmaci in maniera regolare. Lo studio è stato approvato dal Comitato etico per la ricerca locale (4057/AO/ 17) e tutti i volontari hanno fornito il consenso informato scritto.

Disegno dello studio

Trattandosi di un progetto di ricerca che mira a spiegare dei meccanismi fisiologici, abbiamo intenzionalmente scelto di testare volontari sani. Quest'ultimi a differenza dei soggetti patologici non hanno i confondenti rappresentati dalla malattia o dalla terapia farmacologica (es. beta-bloccanti), che potrebbero alterare il meccanismo fisiologico oggetto di studio. Inoltre riteniamo che gli individui sani costituiscano un campione ideale in quanto il maggiore impatto dell'inalazione di PM è sulla popolazione generale che è prevalentemente costituita da soggetti sani. Poiché si tratta di uno studio pilota, non è stato possibile stabilire a priori la numerosità campionaria, pertanto abbiamo scelto una numerosità campionaria in linea con la dimensione del campione di studi precedenti sul test della tosse (*Sadofsky et al. 2017, Belvisi et al. 2016, Kanazaki et al. 2012*). A ciascun paziente è stato somministrato il Leicester Cough Questionnaire (LCQ), al fine di escludere

soggetti con sintomatologia tussiva. Ai soggetti è stata richiesta l'astensione da cibi piccanti, aglio, cannella e dallo svolgimento di attività sportive all'aperto almeno 24 ore prima dei tests. I soggetti hanno portato a termine lo studio in dieci diverse occasioni (V1-V10). Lo studio è stato condotto in doppio cieco ed ogni soggetto è stato sottoposto a:

- valutazione della risposta tussigena basale agli agonisti esogeni dei canali TRP, inalando crescenti diluizioni di capsaicina (CPS) e cinnamaldeide (CMA) in ordine casuale (V1, V2);
- inalazione di attivatori endogeni dei canali TRP (BK, PGE₂) o diluente, in modo randomizzato. Subito dopo l'ultima inalazione del modulatore, è stato effettuato il test di stimolazione specifico per il recettore TRPV1 (CPS) e per il recettore TRPA1 (CMA), (V3-V8). (Tabella 1).
- La variabilità della frequenza cardiaca è stata valutata dopo inalazione di diluente, PGE₂ in 12 soggetti e diluente, BK in 10 volontari somministrati alla stessa concentrazione ed allo stesso modo rispetto ai tests della tosse (V9-V10). Gli esperimenti sono stati condotti ad intervalli di almeno 5 giorni l'uno dall'altro.

Al fine di determinare se PGE₂ e BK hanno avuto un effetto diretto sull'attività di TRPV1, sono stati condotti studi funzionali su cellule HeLa trasfettate con il canale TRPV1 wild-type in vitro usando la capsaicina come agonista.

La presenza di sei polimorfismi funzionali non sinonimi di TRPV1 (K2N rs9894618, P91S rs222749, I315M rs222747, T469I rs224534, T505A rs17633288 e I585V rs8065080) è stata valutata nel DNA di ciascun soggetto.

Tabella 1. Schema della studio.

Visita	Modulatore			Test della tosse		HRV		
	BK	PGE ₂	Diluente	CPS	CMA	BK	PGE ₂	Diluente
V1				X				
V2					X			
V3	X			X				
V4		X		X				
V5			X	X				
V6	X				X			
V7		X			X			
V8			X		X			
V9						X		X
V10							X	X

Questionario Leicester

A ciascun paziente è stato somministrato un questionario di auto-valutazione della qualità di vita correlata alla tosse: il Leicester Cough Questionnaire (LCQ), al fine di escludere soggetti con sintomatologia tossiva che influiva sulla qualità della vita, (Birring SS, et al. 2003). Il più basso punteggio possibile indicante un forte disagio determinato dalla tosse è di 3, mentre il massimo è di 21.

Test di stimolazione dei recettori TRPV1 con Capsaicina e TRPA1 con Cinnamaldeide

I tests della tosse sono stati eseguiti secondo le attuali linee guida (Morice et al 2007), singoli respiri a capacità vitale di concentrazioni incrementali di capsaicina (1–1.000 μ M; Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, IT) o cinnamaldeide (50-800 mM; Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, IT) sono stati effettuati a 2 minuti d'intervallo da un nebulizzatore controllato da un dosimetro (Mefar MB3 CE, Mefar S.p.A., Brescia, Italia). Il flusso di inalazione è stato limitato a circa 0,5 L/sec applicando un orifizio critico all'ingresso del nebulizzatore. Ogni concentrazione dell'agente tossigeno è stata inalata quattro volte con una pausa di 30 secondi tra ciascuna inalazione. Sia i soggetti che lo sperimentatore erano ignari delle concentrazioni dell'agente tossigeno inalato dal volontario. Il numero di colpi di tosse nei 15 secondi successivi a ciascuna inalazione è stato acquisito con un registratore digitale e registrato. È stato calcolato il numero medio di colpi di tosse dopo ciascuna concentrazione dell'agonista esogeno dei canali TRP somministrato ed è stata costruita una curva concentrazione-risposta per ciascun test. È stata calcolata la concentrazione dell'agente che evoca almeno due colpi tosse (C2).

Test di modulazione dei canali TRP con diluente

La modulazione con diluente consiste nell'inalazione di 0,9 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).

Test di modulazione dei canali TRP con Prostaglandina E₂ e Bradichinina

PGE₂ e BK sono state usate come modulatori di TRPV1 e TRPA1 poiché è stato dimostrato da studi in vitro che entrambe attivano i canali TRP espressi dai nervi sensoriali nell'uomo (Grace M, et al. 2012). La soluzione madre di PGE₂ è stata preparata diluendo 10 mg di PGE₂ (Tocris Bioscience, Bristol, UK) con 1 ml di alcool disidratato. La risultante soluzione da 10 mg/ml è stata aliquotata in 0,1 ml di flaconcini monouso e conservata a -70°C. La soluzione madre di BK (Sigma-Aldrich S.r.l., Milano, Italia) è stata preparata diluendo 20 mg di BK in 1 ml di etanolo al 10% in NaCl allo

0,9%. La risultante soluzione da 20 mg/ml è stata aliquotata in flaconcini monouso di 0,1 ml e conservata a -70°C. Prima dell'uso, la soluzione madre è stata diluita con 0,8 ml di soluzione di NaCl allo 0,9%. Le soluzioni di diluente, PGE₂ e BK sono state inalate tramite un nebulizzatore De Vilbiss 646 collegato a un dosimetro (Mefar MB3) con un output di 18 µl per respiro. I soggetti hanno effettuato cinque inalazioni per ciascuna soluzione con conseguente somministrazione di 100 µg di PGE₂ e 200 µg di BK. Queste dosi sono state scelte in quanto hanno mostrato effetti biologici sull'uomo per inalazione e possono essere somministrate in sicurezza per via inalatoria (*Kharitonov SA et al. 1999 e Hartert TV et al. 2000*).

Valutazione della variabilità della frequenza cardiaca

La variabilità della frequenza cardiaca è stata valutata con l'elettrocardiogramma ottenuto in posizione supina da un dispositivo collegato al paziente tramite due elettrodi. I dati HRV sono stati acquisiti da un sistema di acquisizione bluetooth (BT16 Plus, FM, Monza, Italia). L'ECG è stato registrato a riposo per almeno 5 minuti. Quindi, ciascun soggetto ha effettuato cinque inalazioni di diluente nebulizzato da un dosimetro e l'ECG è stato registrato per almeno 5 minuti. Successivamente, il soggetto ha effettuato cinque inalazioni di PGE₂ o BK, in ordine casuale ed in giorni diversi, alle stesse concentrazioni utilizzate per la modulazione della risposta tussigena. L'HRV è stata analizzata utilizzando il software Kubios HRV (ver. 3.3) (*Tarvainen MP et al. 2014*). I complessi normali ed aberranti sono stati discriminati e sono stati considerati tutti gli intervalli adiacenti tra battiti normali, su intervalli di 5 minuti. Abbiamo analizzato le componenti spettrali (variabili del dominio della frequenza HRV) come valori assoluti di potenza (ms²), come raccomandato dalle linee guida sulla valutazione dell'HRV (*Malik et al. 1996*). I principali componenti spettrali che abbiamo considerato sono: la frequenza molto bassa (VLF), la bassa frequenza (LF), l'alta frequenza (HF) ed il rapporto LF/HF. L'area sotto la curva dei picchi spettrali nell'intervallo di frequenze di 0,01-0,4, 0,01-0,04, 0,04-0,15 e 0,15-0,40 Hz è stata definita come potenza totale (TP), potenza a frequenza molto bassa (VLF), potenza a bassa frequenza (LF) e potenza ad alta frequenza (HF), rispettivamente. Per normalizzare LF ed HF, abbiamo utilizzato la potenza totale nell'intervallo di frequenza di 0,01-0,4 Hz. La potenza normalizzata a bassa frequenza (nLF = LF/TP) rappresenta un indice di modulazione simpatica e vagale combinata (*Koizumi K et al. 1985*) ed un indice del baroriflesso (*Moak JP et al. 2009; Rahman F et al. 2011*), e l'HF normalizzato (nHFP = HFP/TP) corrisponde a un indice di modulazione vagale. Il rapporto di potenza a bassa/alta frequenza (LHR = LF/HF) è l'indice del bilancio simpatico-vagale.

Funzionalità di TRPV1 in vitro

Prodotti chimici, coltura cellulare e trasfezione

Tutti i prodotti chimici sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, se non diversamente specificato. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su cellule HeLa (numero ATCC: CCL-2) coltivate nel terreno basale Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco #41966052, Thermo Fisher Scientific), integrato con siero bovino fetale al 10% (FBS) (Thermo Fisher Scientific), contenente penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml) (Euroclone). Se necessario, le cellule sono state seminate su vetrini di diametro 13 mm (n. 1.5) ed è stata consentita la crescita fino al 50% della confluenza prima della trasfezione. La trasfezione è stata eseguita con procedura standard Ca_2^+ fosfato. Il plasmide di espressione di TRPV1 è stato un gentile dono di Christopher A. Reilly (*Reilly et al, 2003*). Il finto vettore pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific) è stato usato come controllo.

Misure della concentrazione di $[\text{Ca}_2^+]_{\text{mt}}$

Le cellule HeLa sono state coltivate su vetrini rotondi del diametro 13 mm con una confluenza del 50% e trasfettate con sonda a base di aequorina citosolica (cytAEQ) insieme ai plasmidi indicati. Trentasei o quarantotto ore dopo la trasfezione, le cellule sono state incubate con celenterazina 5 µM per 1-2 ore in KRB (tampone modificato Krebs-Ringer: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na_3PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 5,5 mM glucosio, 20 mM HEPES, pH 7,4) a 37°C integrato con 1 mM CaCl_2 , quindi trasferito nella camera di perfusione. Tutte le misurazioni a base di aequorina sono state eseguite in KRB. Per gli esperimenti condotti in condizioni prive di Ca_2^+ , KRB è stato integrato con EGTA 100 µM. Agonisti e altri farmaci sono stati aggiunti allo stesso mezzo specificato nel testo. Gli esperimenti sono stati terminati lisando le cellule con digitonina 100 µM in una soluzione ipotonica a base di Ca_2^+ (10 mM di CaCl_2 in H_2O), scaricando così il restante pool di aequorina. Il segnale luminoso è stato raccolto e calibrato in valori della concentrazione di $[\text{Ca}_2^+]_{\text{mt}}$ da un algoritmo basato sulla curva di risposta Ca_2^+ dell'aequorina in condizioni fisiologiche di pH, $[\text{Mg}_2^+]$ e forza ionica, come precedentemente descritto (*Granatiero et al. 2014*). In alternativa, le misurazioni della concentrazione di $[\text{Ca}_2^+]_{\text{mt}}$ sono state eseguite su un lettore di piastre PerkinElmer Envision dotato di un'unità a due iniettori. Le cellule sono state trasfettate come descritto sopra in piastre da 24 pozzetti e quindi ripassate in piastre da 96 pozzetti (diluizione 1:5) il giorno prima dell'esperimento. Dopo la ricostituzione con celenterazina 5 µM, le cellule sono state poste in 70 µl di KRB e la luminescenza da ciascun pozzetto è stata misurata per 1 minuto. Durante l'esperimento, l'istamina è stata inizialmente iniettata alla concentrazione desiderata per attivare i canali ionici che regolano il passaggio del Ca_2^+ , quindi è stata aggiunta una soluzione ipotonica, contenente Ca_2^+ e

digitonina per scaricare il restante pool di aequorina. Utilizzando questa tecnica, abbiamo potuto monitorare dinamicamente l'attivazione selettiva e la funzionalità del canale TRPV1 in cellule intatte con elevata specificità. Abbiamo quindi misurato la concentrazione di $[Ca^{2+}]$ intracellulare in risposta a due diversi attivatori di TRP, CPS e CMA (Sigma-Aldrich S.r.l. Milano, IT) che sono rispettivamente agonisti selettivi di TRPV1 e TRPA1. Dopo aver testato stimolazioni a diverse concentrazioni di capsaicina, si è notato che la risposta migliore da parte di cellule HeLa trasfettate con TRPV1 WT, è ad una concentrazione di pari a 10 nM (*Bianchi BR et al. 2010*). Abbiamo misurato la concentrazione di $[Ca^{2+}]$ in cellule che esprimono il TRPV1 eterologo e trattate con CMA a concentrazioni indicate da *Bandell M. et al. 2004*. Abbiamo quindi misurato la funzionalità di TRPV1 in cellule trattate con: PGE₂ (Tocris Bioscience, Bristol, UK), BK (Sigma-Aldrich S.r.l., Milano, Italia) e particolato di scarico diesel [DEP 2975 National Institute of Standards and Technology (NIST), Maryland, U.S.A.]. Per questi esperimenti, abbiamo prima pretrattato le cellule con dosi crescenti di ciascun agente perturbante (*Bastien L. et al. 1994, Aramori I. et al. 1996*). Dopo 1 ora, le cellule sono state stimulate con CPS ed il picco di aumento della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ è stato utilizzato come lettura della funzionalità di TRPV1. Abbiamo caratterizzato il DEP mediante la componente laser dello strumento Lung Vision. Si tratta di un sistema di analisi che permette di valutare le dimensioni e la distribuzione delle particelle disperse in un fluido. Abbiamo confrontato: 5 diverse concentrazioni di DEP e soluzioni normali vs soluzioni sonicate. Come controllo abbiamo usato il diluente della soluzione di DEP (soluzione fisiologica). Le quattro concentrazioni testate sono le stesse utilizzate nelle sperimentazioni in vitro, così come le condizioni di sonicazione. Da queste analisi abbiamo calcolato un diametro medio delle particelle di 1 micron (range 0.2-5 micron) e confermato che le particelle in soluzione non formano aggregati anche alle concentrazioni massime utilizzate (dati non mostrati). Tali analisi sono compatibili con il diametro medio di $1,62 \pm 0,01$ (number distribution μM) delle particelle dichiarato sulla certificazione di analisi del DEP fornita dal NIST.

Analisi dei polimorfismi

Isolamento e quantificazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata completata su tutti i campioni di sangue intero utilizzando il kit DNAeasy Blood & Tissue (QIAGEN) su un sistema QIAcube (QIAGEN) seguendo il protocollo automatizzato fornito dalle istruzioni del produttore. In particolare, sono stati processati 200 µl di sangue intero da ciascun campione ed il DNA è stato rilevato per tutti i soggetti dello studio in un range compreso tra 25 e 65 ng/ml, quantificato utilizzando il QIA expert Quantification System (QIAGEN). Il DNA era esente da contaminazioni di RNA (verificato con lettura spettrofotometrica che rilevava rapporti di assorbanza del DNA a 260/230 nm e 260/280 nm, che erano sempre circa 2,3 e 1,7-1,9, rispettivamente).

Genotipizzazione di TRPV1

Sono stati valutati sei polimorfismi funzionali non sinonimi di TRPV1 (K2N rs9894618, P91S rs222749, I315M rs222747, T469I rs224534, T505A rs17633288 e I585V rs8065080). La genotipizzazione è stata eseguita mediante i kit di genotipizzazione reperibili in commercio: KASP genotyping chemistry, KASP genotyping reaction comprendente KASP Assay mix (contenente i primer specifici) e KASP Master mix. Le reazioni sono state stabilite in base al protocollo del produttore ed i campioni sono stati analizzati in triplice copia su uno strumento Steponeplus Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le condizioni di amplificazione erano: primo passo 94°C 15 min; 10 cicli di 94°C 20 secondi e 61-55°C 60 secondi (calo di 0,6°C per ciclo); 26 cicli di 94°C 20 secondi e 55°C 60 secondi. La discriminazione allelica è stata eseguita utilizzando il software SDS v2.3 (Applied Biosystems). È stato attribuito a ciascun soggetto un gradiente di responsività basato sulla genotipizzazione di TRPV1, variabile da 8 a 0, in base alla presenza di 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0 copie delle varianti più reattive alla CPS in vitro; cioè 585I; 469I; 315M; 91S, rispettivamente (come descritto nella Tabella 2) (*Deering-Rice CE et al. 2016*), supponendo un effetto additivo della presenza dell'allele a rischio (*Pavanello S et al. 2018*).

Tabella 2. Livello di responsività basato sul numero di SNPs con elevata sensibilità alla capsaicina. Gli alleli con una maggiore responsività alla CPS sono sottolineati.

SNP-based CPS responsiveness (n° of alleles)	rs<u>T</u>8065080C (<u>I</u>585V)	rsG224534<u>A</u> (T469<u>I</u>)	rsG222747<u>C</u> (I315<u>M</u>)	rsC222749<u>T</u> (P91<u>S</u>)
8	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
7	<u>TC</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>GA</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>CG</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>TC</u>
6	<u>TC</u>	<u>GA</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
	<u>TC</u>	<u>AA</u>	<u>CG</u>	<u>TT</u>
	<u>TC</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>TC</u>
	<u>TT</u>	<u>GA</u>	<u>CG</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>GA</u>	<u>CC</u>	<u>TC</u>
	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>CG</u>	<u>TC</u>
	<u>CC</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>GG</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>GG</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>CC</u>
5	<u>TT</u>	<u>GG</u>	<u>CC</u>	<u>TC</u>
	<u>TT</u>	<u>GG</u>	<u>CG</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>GG</u>	<u>TC</u>
	<u>TT</u>	<u>GA</u>	<u>CG</u>	<u>TC</u>
	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>CG</u>	<u>CC</u>
	<u>TT</u>	<u>GA</u>	<u>GG</u>	<u>TT</u>
	<u>TT</u>	<u>GA</u>	<u>CC</u>	<u>CC</u>
	<u>TC</u>	<u>GG</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
	<u>TC</u>	<u>AA</u>	<u>CG</u>	<u>TC</u>
	<u>TC</u>	<u>GA</u>	<u>CC</u>	<u>TC</u>
	<u>TC</u>	<u>GA</u>	<u>CG</u>	<u>TT</u>
	<u>TC</u>	<u>AA</u>	<u>GG</u>	<u>TT</u>
	<u>TC</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>CC</u>
	<u>CC</u>	<u>GA</u>	<u>CC</u>	<u>TT</u>
	<u>CC</u>	<u>AA</u>	<u>CG</u>	<u>TT</u>
	<u>CC</u>	<u>AA</u>	<u>CC</u>	<u>TC</u>
4	<u>TT</u>	<u>AA</u>	<u>GG</u>	<u>CC</u>
	<u>TT</u>	<u>GG</u>	<u>CC</u>	<u>CC</u>
	<u>TT</u>	<u>GG</u>	<u>GG</u>	<u>TT</u>

	CC	<u>AA</u>	<u>CC</u>	CC
	CC	<u>AA</u>	GG	<u>TT</u>
	CC	GG	<u>CC</u>	<u>TT</u>
3	<u>TT</u>	<u>GA</u>	GG	CC
	<u>TT</u>	GG	<u>CG</u>	CC
	<u>TT</u>	GG	GG	<u>TC</u>
	<u>TC</u>	<u>AA</u>	GG	CC
	<u>TC</u>	GG	<u>CC</u>	CC
	<u>TC</u>	GG	GG	<u>TT</u>
	CC	<u>AA</u>	<u>CG</u>	CC
	CC	<u>AA</u>	GG	<u>TC</u>
	CC	GG	<u>CC</u>	<u>TC</u>
	CC	GG	<u>CG</u>	<u>TT</u>
	CC	<u>GA</u>	<u>CC</u>	CC
	CC	<u>GA</u>	GG	<u>TT</u>
	2	<u>TT</u>	GG	GG
<u>TC</u>		<u>GA</u>	GG	CC
<u>TC</u>		GG	<u>CG</u>	CC
<u>TC</u>		GG	GG	<u>TC</u>
CC		<u>AA</u>	GG	CC
CC		GG	<u>CC</u>	CC
CC		GG	GG	<u>TT</u>
CC		<u>GA</u>	<u>CG</u>	CC
CC		<u>GA</u>	GG	<u>TC</u>
CC		GG	<u>CG</u>	<u>TC</u>
1	<u>TC</u>	GG	GG	CC
	CC	<u>GA</u>	GG	CC
	CC	GG	<u>CG</u>	CC
	CC	GG	GG	<u>TC</u>
0	CC	GG	GG	CC

Analisi statistica

I dati in vivo sono espressi come mediana (range interquartile, IQR), range o percentuale. Tests statistici non parametrici sono stati utilizzati per valutare i cambiamenti nella risposta tussigena alla CPS ed alla CMA dopo la stimolazione di TRPV1 e TRPA1 con PGE₂ e BK.

Il Wilcoxon Signed Rank è stato utilizzato per valutare la differenza nei parametri dell'ECG tra diluente e PGE₂ o BK.

I dati funzionali in vitro sono espressi come valore medio \pm s.d. e sono rappresentativi di almeno tre trasfezioni indipendenti. La varianza è stata calcolata con il test ANOVA a una, due o tre code, e le comparazioni multiple sono state effettuate utilizzando il post hoc test di Holm-Sidak.

Per determinare se la distribuzione genotipica rispettava l'equilibrio di Hardy-Weinberg, le distribuzioni delle frequenze genotipiche osservate ed attese sono state confrontate utilizzando il test chi-quadrato. La regressione lineare non parametrica è stata utilizzata per confrontare la sensibilità tussigena alla CPS (C2 e numero medio di colpi di tosse alla concentrazione di CPS 30 μ M), di ciascun soggetto in relazione al numero di varianti genetiche con maggiore responsività alla CPS. Se tutte le concentrazioni venivano inalate senza raggiungere la C2, è stato deciso ai fini dell'analisi statistica che i valori di C2 dovevano avere un valore doppio della più alta concentrazione inalata.

Una $p < 0.05$ è stata considerata come livello di significatività per tutte le analisi effettuate. Le analisi statistiche sono state calcolate utilizzando StatView/MatLab/SigmaPlot/StatsDirect.

CAPITOLO III

RISULTATI

1. Modulazione dei canali TRP con inalazione di PGE₂ e BK

Sono stati reclutati diciassette volontari sani, 10 uomini e 7 donne, con una età media di 35 anni (intervallo interquartile, IQR, 29,5-47). Tutti i soggetti hanno completato i tests della tosse con CPS e CMA senza effetti collaterali, a parte il gusto di cannella dopo l'inalazione di CMA. Nessuno dei soggetti ha mostrato tosse cronica al basale. Infatti i punteggi LCQ indicavano che la tosse non influiva sulla qualità della vita, poiché tutti i risultati erano vicini (range 20-21) al massimo punteggio ottenibile, cioè 21. Due soggetti sono stati esclusi dallo studio per disagio dopo l'inalazione di PGE₂ (uno per tachicardia, una per oppressione toracica). Le curve dose-risposta al basale sono visualizzate nella Figura 4a per la CPS e 4b per la CMA. La C2 mediana calcolata per il test con capsaicina è risultata di 23 μ M (IQR 12,75-30 μ M) e la sensibilità alla CPS, espressa come valore mediano del numero di colpi di tosse dopo inalazione di capsaicina 30 μ M, è risultata di 2,5 (2,0-3,25). La curva dose-risposta alla cinnamaldeide è apparsa piuttosto piatta, infatti la C2 è stata ottenuta solo in 1 soggetto. Il numero di colpi di tosse a 200 mM di cinnamaldeide variava da 0 a 2. Non sono state osservate differenze significative nella risposta tussigena tra maschi e femmine. La prima inalazione di PGE₂ e/o BK ha causato tosse nella maggior parte dei soggetti, mentre le successive dosi di mediatori sono state ben tollerate senza ulteriori colpi di tosse. Le Figure 5a e 5b mostrano la modulazione di TRPV1 dopo inalazione di PGE₂ (5a) e BK (5b). È stato osservato un consistente aumento del numero di colpi di tosse alla concentrazione di 30 μ M di CPS dopo inalazione di PGE₂ ($p=0,0008$) e BK ($p=0,0058$) rispetto al diluente. Le Figure 6a e 6b mostrano la modulazione di TRPA1 dopo inalazione di PGE₂ (6a) e BK (6b). È stato osservato un aumento significativo del numero di colpi di tosse alla concentrazione di 200 mM di cinnamaldeide dopo inalazione di PGE₂ rispetto al diluente ($p=0,02$), ma il segnale è risultato piuttosto debole. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nella risposta alla CMA dopo il pretrattamento con BK. Per ciascun soggetto è stato calcolato il “delta cough” ovvero la differenza tra il numero di colpi di tosse, ottenuti alla concentrazione 30 μ M di capsaicina, dopo modulazione con PGE₂ rispetto al diluente. Questo valore è stato riportato in funzione della C2 ottenuta al test della tosse basale (figura 7a). Si è quindi osservato che per i soggetti più sensibili alla CPS (ridotti valori di C2 al baseline), il “delta cough” tra il modulatore (PGE₂) ed il diluente tendeva a crescere. Escludendo il soggetto cerchiato in rosso, considerato come un outlier, la correlazione inversa tra baseline C2 e delta cough risultava statisticamente significativa; ossia maggiore è la sensibilità del soggetto alla capsaicina (evidenziata dal valore C2 al test basale), maggiore sarà lo scarto misurato in termini di risposta tussigena, tra la modulazione con PGE₂ rispetto al diluente. Anche nel caso della BK è stato calcolato il “delta cough” ed è stato riportato in funzione della C2 al baseline. Si è osservato che l'andamento del “delta cough” tra BK e diluente non era correlato in maniera statisticamente significativa alla C2 basale (figura 7b).

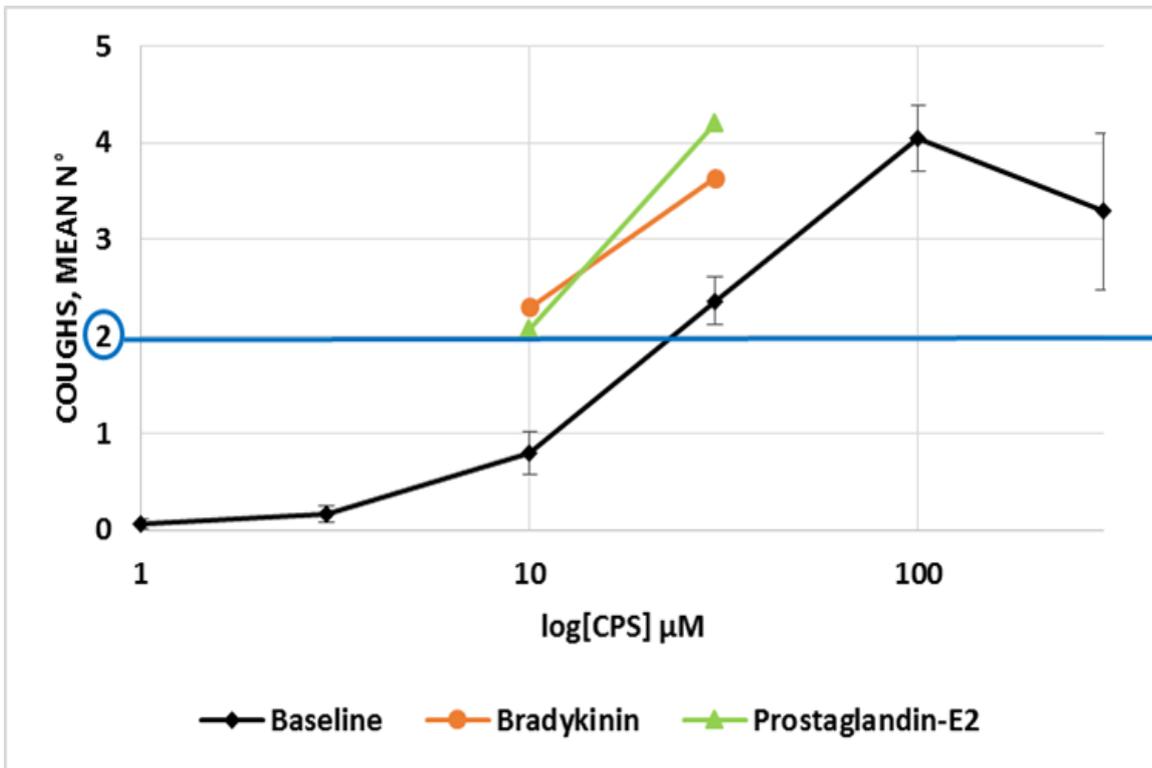


Figura 4a. Curva dose-risposta (media \pm SE) al baseline test con capsaicina. Dalla linea blu che rappresenta i due colpi di tosse, per interpolazione è stata calcolata la C2. In verde ed in rosso parte delle curve dose risposta alla capsaicina dopo modulazione del canale TRPV1 rispettivamente con PGE₂ e BK.

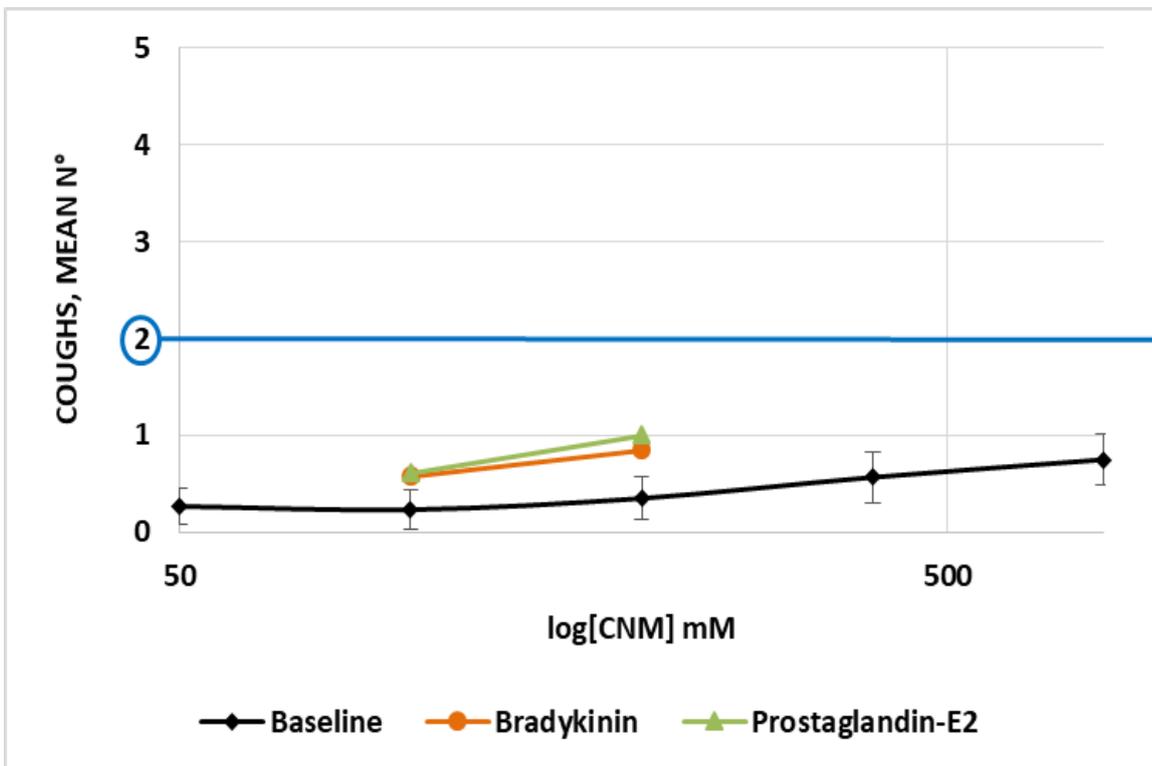


Figura 4b. Curva dose-risposta (media \pm SE) al baseline test con cinnamaldeide. La linea blu rappresenta i due colpi di tosse. In verde ed in rosso parte delle curve dose risposta alla capsaicina dopo modulazione del canale TRPV1 rispettivamente con PGE₂ e BK.

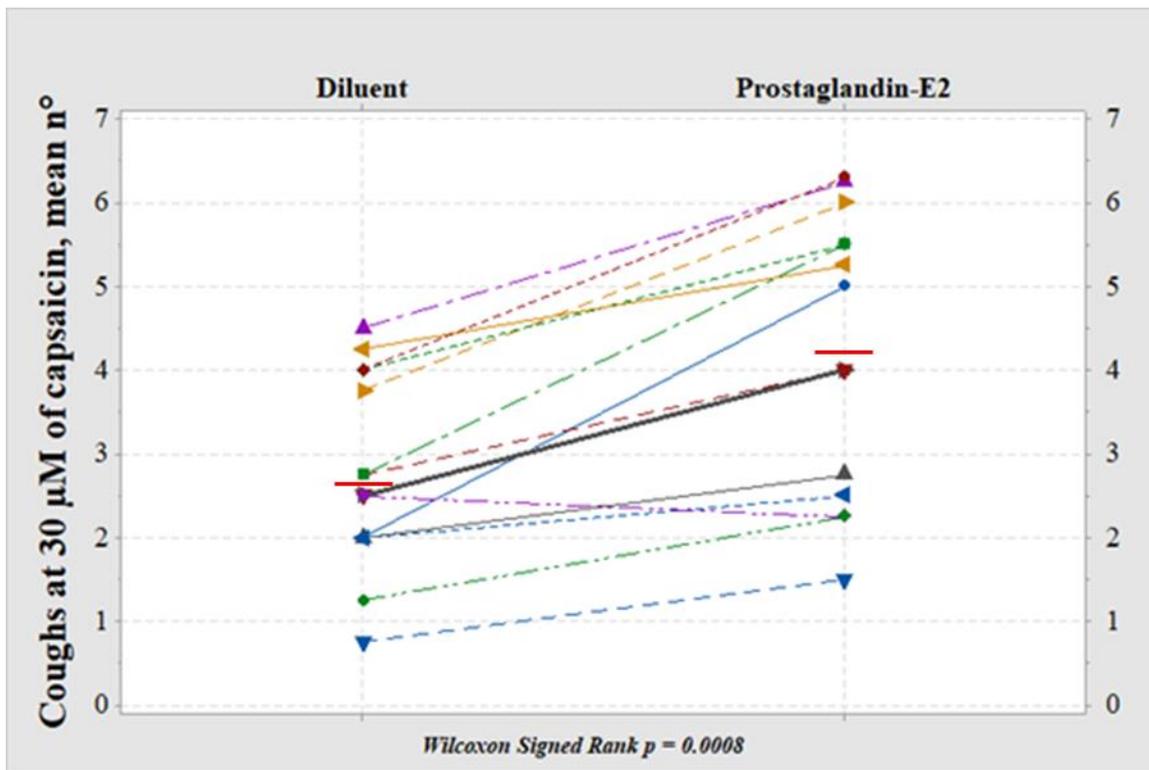


Figura 5a. Numero medio di colpi di tosse dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e PGE₂ (gruppo a destra) alla concentrazione di capsaicina 30 μM. Il numero medio di colpi di tosse è significativamente aumentato dopo inalazione di PGE₂ ($n = 4,20 \pm 0,42$; $p = 0,0008$), rispetto al diluente ($n = 2,77 \pm 0,29$). Le barre orizzontali rappresentano il valore medio. La linea più spessa nella trama indica una sovrapposizione tra due soggetti.

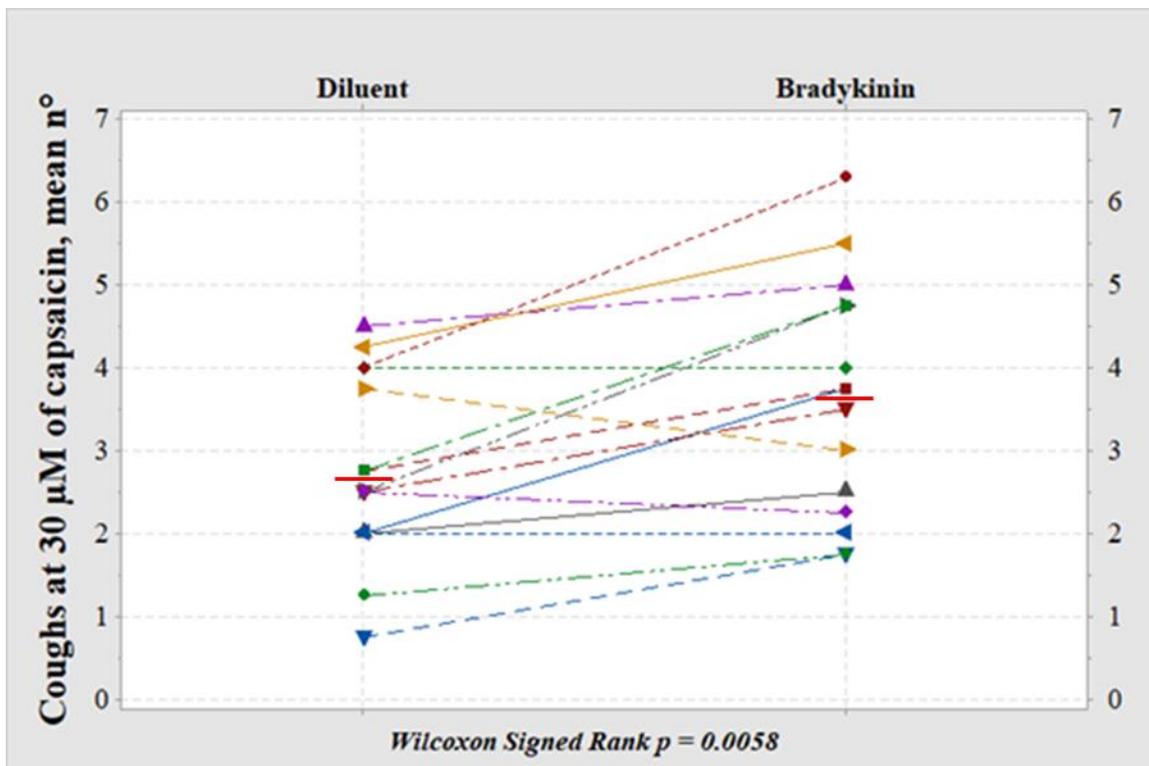


Figura 5b. Numero medio di colpi di tosse dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e BK (gruppo a destra) alla concentrazione di capsaicina 30 μM. Il numero medio di tosse è risultato significativamente aumentato dopo inalazione di BK ($n = 3,64 \pm 0,37$; $p = 0,0058$) rispetto al diluente ($n = 2,77 \pm 0,29$). Le barre orizzontali rappresentano il valore medio.

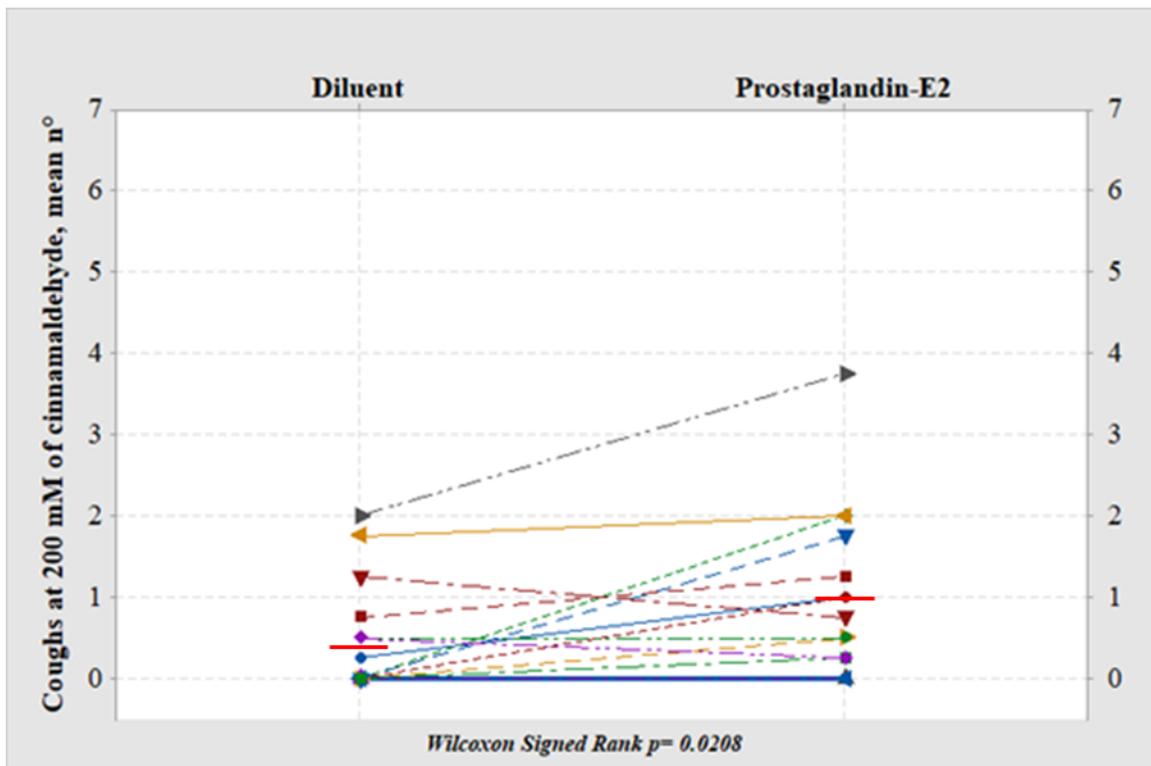


Figura 6a. Numero medio di colpi di tosse dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e PGE₂ (gruppo a destra) alla concentrazione di cinnamaldehyde 200 mM. Il numero medio di colpi di tosse è significativamente aumentato dopo inalazione di PGE₂ ($n = 1,00 \pm 0,27$; $p = 0,0208$) rispetto al diluente ($n = 0,47 \pm 0,19$), ma il segnale è risultato piuttosto debole. Le barre orizzontali rappresentano il valore medio. La linea più spessa nella trama indica una sovrapposizione tra soggetti.

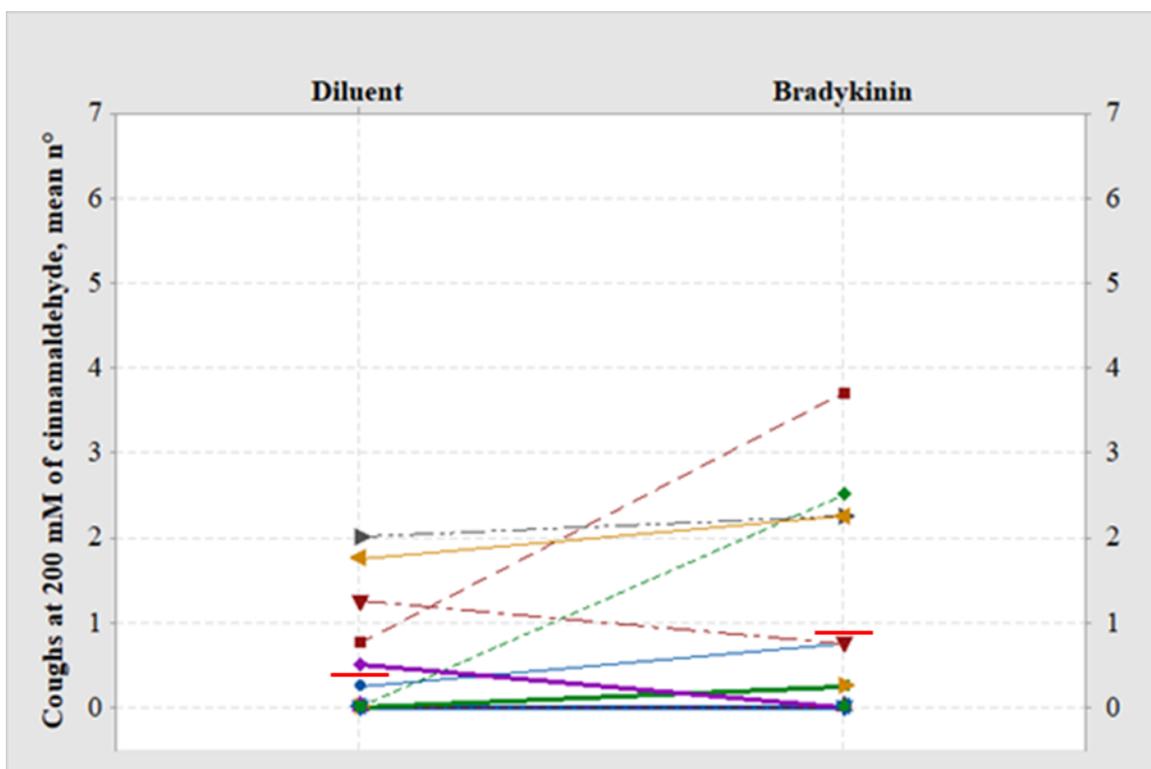


Figura 6b. Numero medio di colpi di tosse dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e BK (gruppo a destra) alla concentrazione di cinnamaldehyde 200 mM. Il numero medio di colpi di tosse è aumentato in maniera non significativa dopo inalazione di BK ($n = 0,85 \pm 0,31$) rispetto al diluente ($n = 0,47 \pm 0,19$). Le barre orizzontali rappresentano il valore medio. Le linee più spesse nella trama indicano una sovrapposizione tra soggetti.

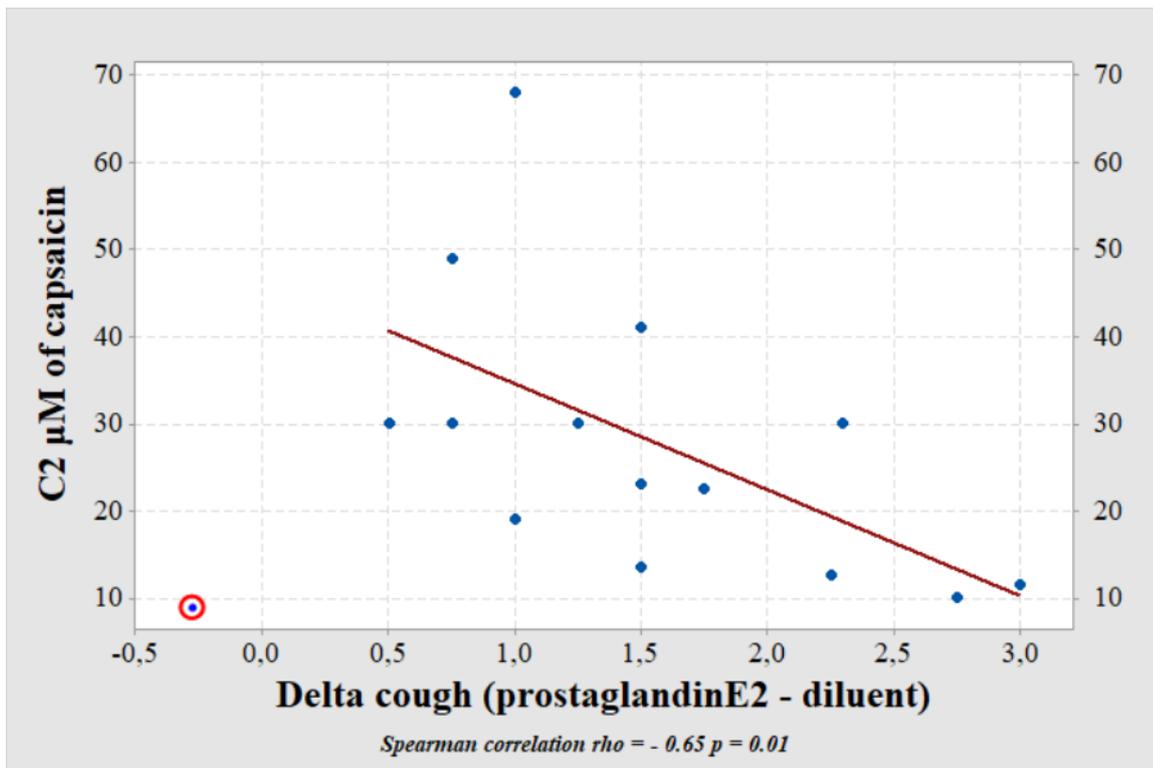


Figura 7a. Relazione tra sensibilità alla capsicina, espressa come baseline C2, e risposta tussigena alla modulazione di TRPV1 con prostanglandina E2 espressa come incremento del numero di colpi di tosse rispetto al diluente, delta cough (pge – dil).

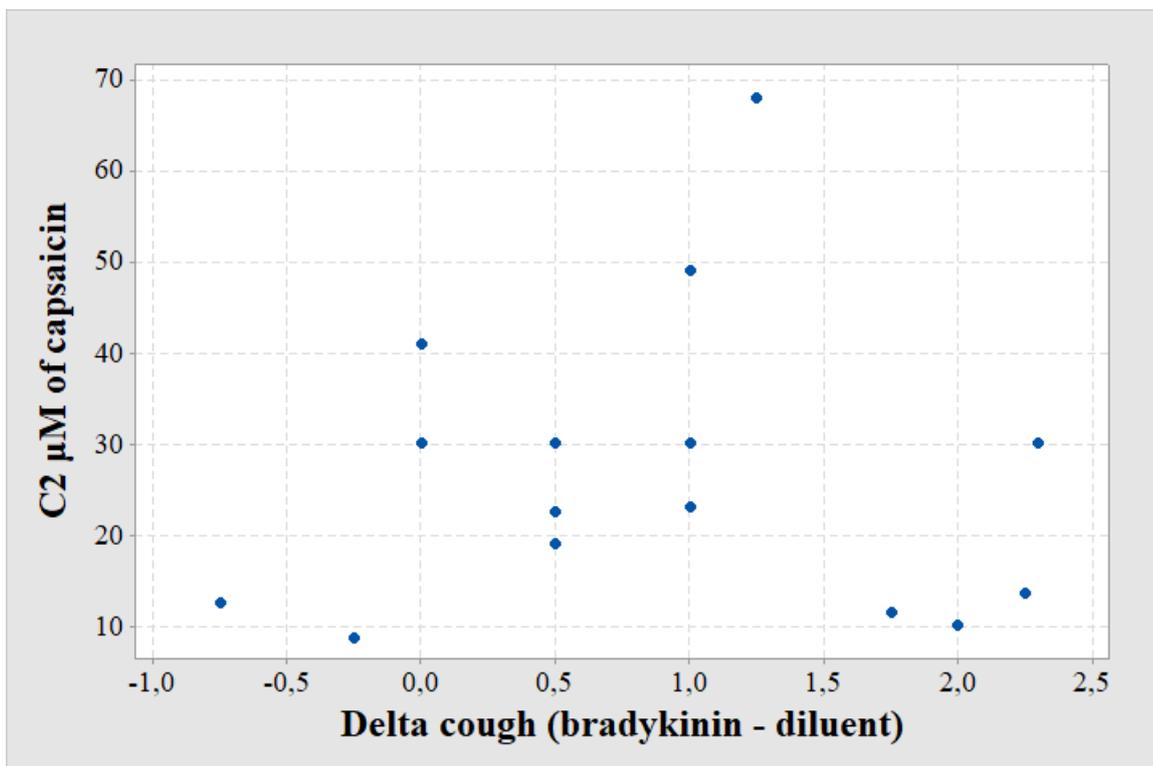


Figura 7b. Relazione tra sensibilità alla capsicina, espressa come baseline C2, e risposta tussigena alla modulazione di TRPV1 con bradichinina espressa come incremento del numero di colpi di tosse rispetto al diluente, delta cough (bk – dil).

2. Valutazione della variabilità della frequenza cardiaca

Sono stati reclutati dodici volontari sani, 8 uomini e 4 donne, con una età media di 34 anni (intervallo interquartile, IQR, 28,5-51). Dodici soggetti (4 femmine e 8 maschi) hanno completato gli esperimenti di HRV dopo la modulazione di TRPV1 con PGE₂ senza riportare particolari effetti avversi. L'effetto della somministrazione di diluente è stato valutato in 8 soggetti nella sessione con PGE₂ e in 7 soggetti nella sessione con BK, confrontando l'HRV prima e dopo l'inalazione del diluente. Nessuno dei parametri dell'HRV ha mostrato cambiamenti significativi dopo l'inalazione del diluente (dati non mostrati). Nessuno dei parametri dell'HRV ha mostrato cambiamenti significativi tra maschi e femmine. La figura 8 esemplifica un tacogramma e le relative analisi spettrali di frequenza di un partecipante lo studio.

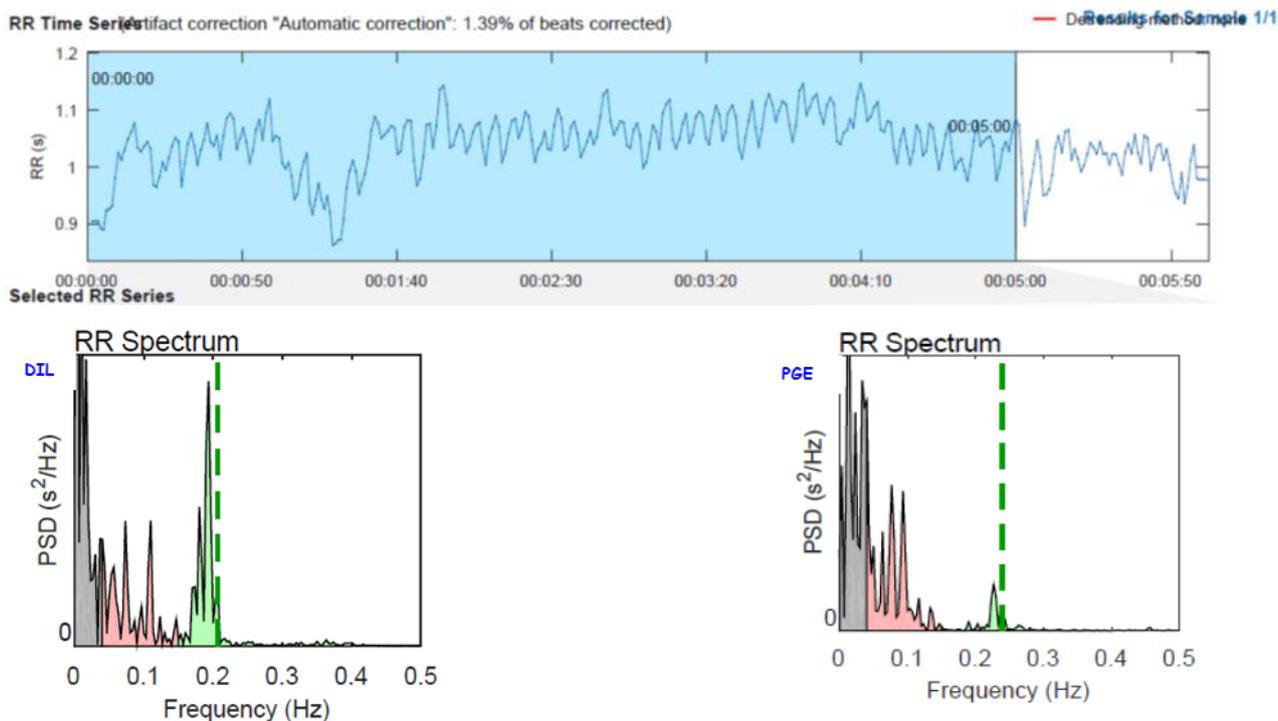


Figura 8. Esempi di tacogramma (in alto) ed analisi di distribuzione spettrale della frequenza (PSD) dopo inalazione di diluente (in basso a sinistra) e PGE₂ (in basso a destra) di un partecipante lo studio. Le nLF sono rappresentate in rosso e le nHF sono raffigurate in verde. LF/HF è rappresentato in grigio.

La tabella 3 evidenzia i valori assunti dalle variabili delle componenti spettrali nel dominio della frequenza, dopo inalazione dei modulatori endogeni dei TRP (PGE₂ e BK) rispetto al diluente. La Figura 9 mostra la variazione delle alte frequenze normalizzate (nHF) dopo modulazione dei TRPV con PGE₂ (9a) e BK (9b). In particolare si evidenzia una riduzione statisticamente significativa dell'nHF dopo modulazione dei TRP con PGE₂ ($p=0,0022$) e BK ($p=0,0166$) rispetto al diluente. La Figura 10 mostra la variazione delle basse frequenze normalizzate (nLF) dopo modulazione dei TRP con PGE₂ (10a) e BK (10b). In particolare si evidenzia un aumento statisticamente

significativo dell'nLF dopo modulazione dei TRP con PGE₂ (p=0,0022) e BK (p=0,0166) rispetto al diluente. Tali dati indicano che vi sia stata una modulazione del sistema autonomo cardiaco nel senso di una riduzione dell'attività vagale ed aumento dell'attività simpatica. Come descritto in Tabella 3 si segnala un aumento della frequenza cardiaca media (Mean HR) misurata in battiti per minuto (bpm), dopo inalazione di PGE₂ (mediana=86; p=0,0022) rispetto al diluente (mediana=64). L'inalazione di BK non comporta invece variazioni significative della frequenza cardiaca.

Tabella 3: descrizione dei parametri della HRV dopo l'inalazione di diluente rispetto all'inalazione dei modulatori endogeni dei TRP (PGE₂ e BK). I valori sono espressi come mediana and IQR₂₅₋₇₅. * Wilcoxon Signed Rank Test

	Diluent	IQR₂₅₋₇₅	Prostaglandin-E2	IQR₂₅₋₇₅	p *
HF (n.u.)	28,7	23,16 - 42,69	14,07	11,28 - 22,58	0,0022
LF (n.u.)	71,25	57,28 - 76,77	85,91	77,4 - 89,01	0,0022
LF/HF	2,5	1,36 - 3,31	6,1	3,56 - 7,87	0,0022
Mean HR (bpm)	64	58 - 71	86	81 - 90,5	0,0022
Mean RR (ms)	964	844 - 1039	707	659,75 - 771,75	0,0022
	Diluent	IQR₂₅₋₇₅	Bradykinin	IQR₂₅₋₇₅	p*
HF (n.u.)	24,85	17,09 - 42,51	19,24	11,58 - 23,58	0,0166
LF (n.u.)	75,09	57,46 - 82,89	80,74	76,39 - 88,4	0,0166
LF/HF	3,28	1,35 - 4,9	4,24	3,25 - 7,63	0,0218
Mean HR (bpm)	67	62,25 - 79,25	68	66 - 83,75	0,066
Mean RR (ms)	897	755 - 968,5	878	713,25 - 907,25	0,046

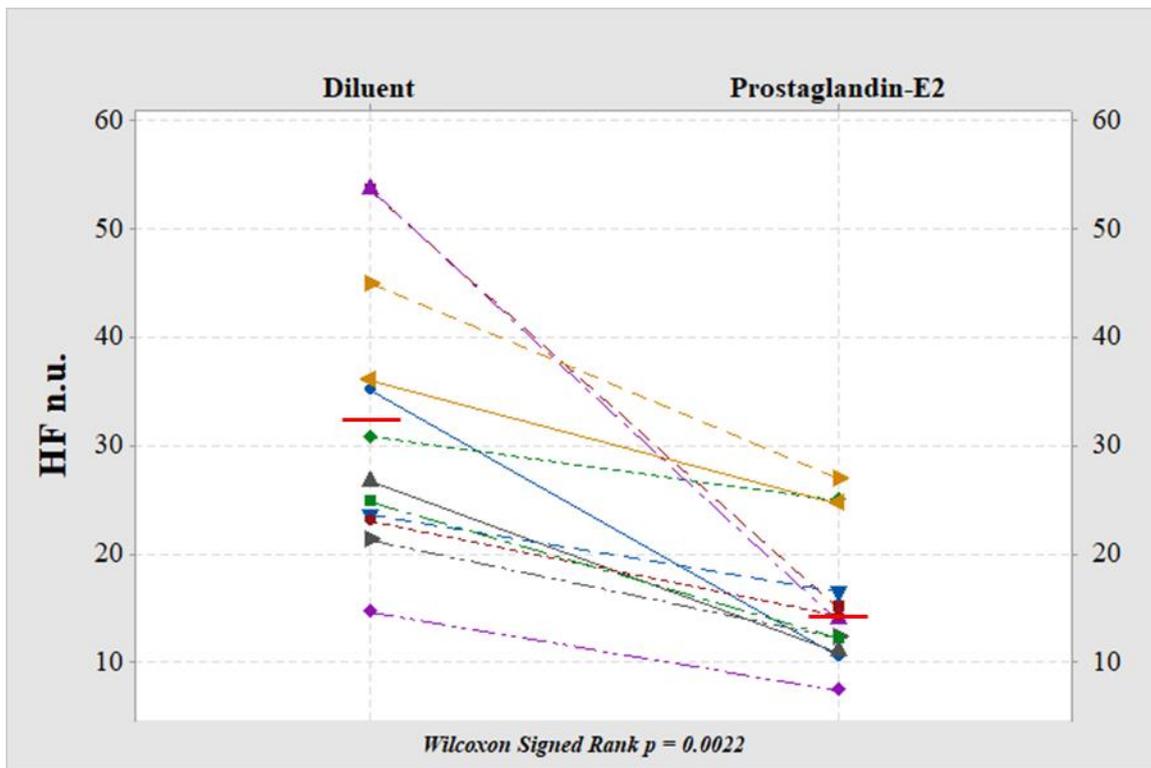


Figura 9a. Valore medio di nHF dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e PGE₂ (gruppo a destra). Il valore medio di nHF è significativamente diminuito dopo inalazione di PGE₂ ($n = 15.80 \pm 1.82$; $p = 0,0022$) rispetto al diluente ($n = 32.46 \pm 3.60$). Le barre orizzontali rappresentano il valore medio.

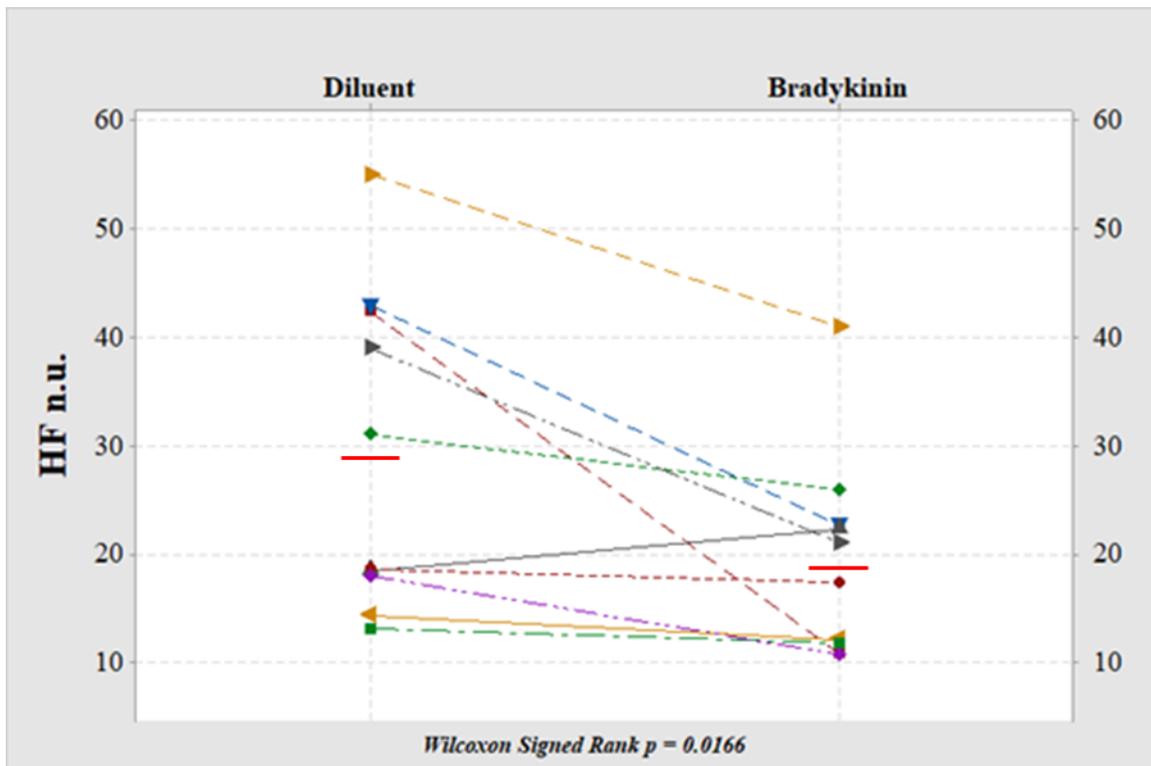


Figura 9b. Valore medio di nHF dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e BK (gruppo a destra). Il valore medio di nHF è significativamente diminuito dopo inalazione di BK ($n = 19.62 \pm 2.96$; $p = 0,0166$) rispetto al diluente ($n = 29.29 \pm 4.66$). Le barre orizzontali rappresentano il valore medio.

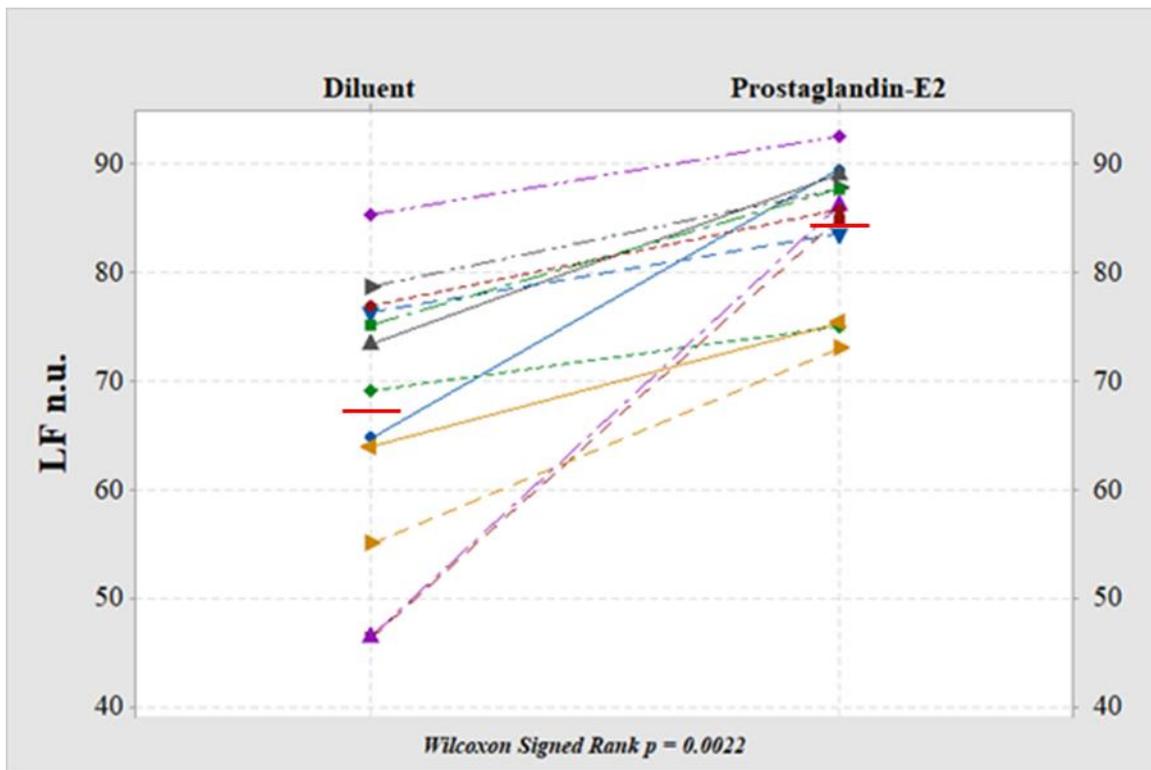


Figura 10a. Valore medio di nLF dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e PGE₂ (gruppo a destra). Il valore medio di nLF è significativamente aumentato dopo inalazione di PGE₂ ($n = 84.16 \pm 1.82$; $p = 0,0022$) rispetto al diluente ($n = 67.49 \pm 3.60$). Le barre orizzontali rappresentano il valore medio.

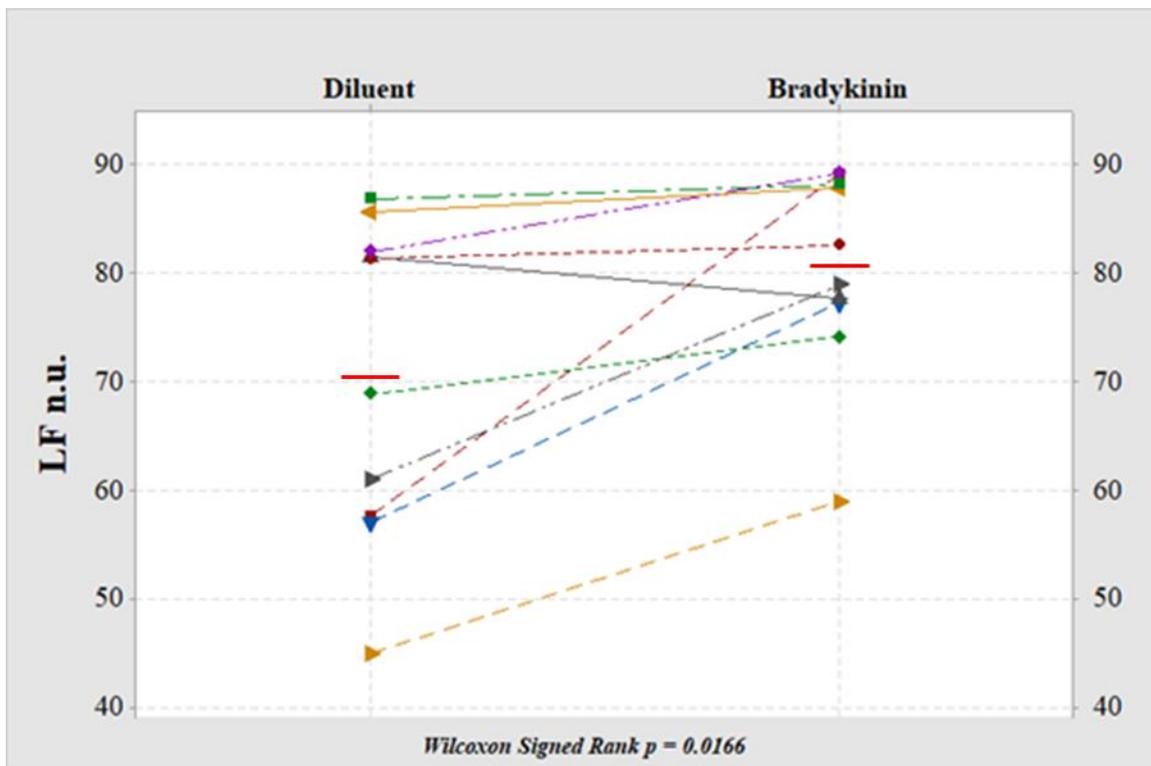


Figura 10b. Valore medio di nLF dopo inalazione di diluente (gruppo a sinistra) e BK (gruppo a destra). Il valore medio di nLF è significativamente aumentato dopo inalazione di BK ($n = 80.35 \pm 2.96$; $p = 0,0166$) rispetto al diluente ($n = 70.67 \pm 4.66$). Le barre orizzontali rappresentano il valore medio.

3. Funzionalità di TRPV1 in vitro

Abbiamo sviluppato un test su cellule coltivate in vitro per valutare l'espressione e la funzionalità del canale TRPV1 e abbiamo cercato linee cellulari senza espressione rilevabile di canali TRP, in particolare di TRPV1. L'analisi RNA-seq delle linee cellulari ENCODE ha rivelato che nelle cellule HeLa la maggior parte dei membri della famiglia TRP, incluso TRPV1, non sono espressi (Tabella 4). Pertanto, le cellule HeLa rappresentano il sistema eterologo ideale per esprimere il canale TRPV1. Volevamo quindi confermare questi dati a livello funzionale. Infatti è noto che dopo la stimolazione, i canali TRP permeabili al Ca_2^+ generano cambiamenti nella concentrazione intracellulare di Ca_2^+ ($[\text{Ca}_2^+]$) attraverso l'afflusso di Ca_2^+ tramite la membrana plasmatica (Gees, Colsoul et al. 2010). Abbiamo utilizzato un indicatore Ca_2^+ codificato geneticamente ed ampiamente usato, basato sulla fotoproteina aequorina (Rizzuto et al. 1992; Shimomura et al. 1963). Utilizzando questa tecnica, abbiamo monitorato l'attivazione selettiva e la funzionalità del canale TRPV1 in cellule intatte con elevata specificità. Abbiamo quindi misurato la concentrazione di $[\text{Ca}_2^+]$ intracellulare in risposta a due diversi attivatori di TRP, CPS e CMA, che sono rispettivamente agonisti selettivi di TRPV1 e TRPA1. Come mostrato nella Figura 11, né la CPS né la CMA possono attivare la via di segnalazione del Ca_2^+ nelle normali cellule HeLa. Al contrario, le cellule HeLa rispondono prontamente alla stimolazione dell'istamina con un aumento transitorio della concentrazione di $[\text{Ca}_2^+]$ intracellulare. In effetti, è noto che le cellule HeLa esprimono il recettore H1 dell'istamina che, all'attivazione, innesca il rilascio di Ca_2^+ dai depositi intracellulari attraverso la cascata di segnalazione GPCR-PLC-IP3. Nel complesso, questo esperimento dimostra che le cellule HeLa non esprimono i canali TRPV1 e TRPA1. Successivamente, abbiamo trasfettato cellule HeLa con una codifica plasmidica per il canale umano TRPV1 con un tag V5 fuso sul terminale C (Figura 12a). Dopo aver verificato l'espressione proteica mediante Western blot (Figura 12b), abbiamo misurato la concentrazione di $[\text{Ca}_2^+]$ in cellule che esprimono il TRPV1 eterologo. La Figura 13 mostra che l'applicazione della CPS nelle cellule HeLa che esprimono TRPV1 innesca un consistente aumento del $[\text{Ca}_2^+]$ intracellulare. Al contrario, la CMA è inefficace, mentre l'istamina a controllo positivo innesca ancora il rilascio di Ca_2^+ dai depositi intracellulari. Infine, ci siamo chiesti se anche in questo sistema il canale TRPV1 media l'afflusso di Ca_2^+ dall'ambiente extracellulare. Per verificarlo, abbiamo stimolato le cellule HeLa che esprimono TRPV1 durante la perfusione di un tampone extracellulare privo di Ca_2^+ . Come mostrato nella Figura 14, il trattamento con CPS non provoca alcun aumento della concentrazione di $[\text{Ca}_2^+]$. Al contrario, con l'istamina è evidente una risposta Ca_2^+ , cioè uno stimolo che innesca il rilascio di calcio dalle riserve intracellulari e non l'afflusso di Ca_2^+ dall'ambiente extracellulare come nel caso di TRPV1. Nel complesso, questi dati confermano che le cellule HeLa sono un sistema eterologo ideale utile per

studiare il canale TRPV1. Abbiamo quindi misurato la funzionalità di TRPV1 in cellule trattate con PGE₂, BK o particolato di scarico diesel (DEP). Per questi esperimenti, abbiamo prima pretrattato le cellule con dosi crescenti di ciascun agente perturbante. Il pre-trattamento con PGE₂ e BK non ha determinato un aumento significativo della concentrazione di [Ca₂⁺] intracellulare (dati non mostrati). Infatti in letteratura non vi è evidenza che le cellule HeLa esprimano i recettori EP3 e BKB2. Dopo 1 ora, le cellule sono state stimulate con CPS ed il picco di aumento della concentrazione di [Ca₂⁺] è stato utilizzato come lettura della funzionalità di TRPV1. Il trattamento con PGE₂ o BK non ha modificato le risposte cellulari indotte dalla CPS (Figure 15 e 16). Ciò suggerisce che nel nostro modello sperimentale, questi due mediatori infiammatori non sensibilizzano il canale TRPV1, verosimilmente perché nel nostro modello cellulare mancano alcune vie di trasduzione. Tuttavia, il trattamento con la massima dose di DEP aumenta significativamente le risposte cellulari mediate da TRPV1 (Figura 17). Questi dati indicano che TRPV1 è direttamente sensibilizzato dal particolato.

Tabella 4. Espressione dei canali TRP tra diverse linee cellulari. I dati sono espressi come TPM come riportato in RNA-seq di RNA poliadenilato lungo e RNA lungo non poliadenilato dalle linee cellulari ENCODE (dataset E-GEOD-26284).

Gene	A549	AG445	BJ	GM12878	HUVEC	HeLa	HepG2	K562	MCF-7	NHLF	SK-N-SH
TRPV1											
TRPA1	2	36								36	
TRPV-4		2	5		13		3		2		3
TRPM-4			3		6			3	3		6
TRPC-4			4							7	
TRPC-6		2	3							7	
TRPM-2											
TRPC-1	9	4	2	2			5		5	5	5
TRPV-3				2							
TRPV-2		12	2	20	2		12	17		26	4

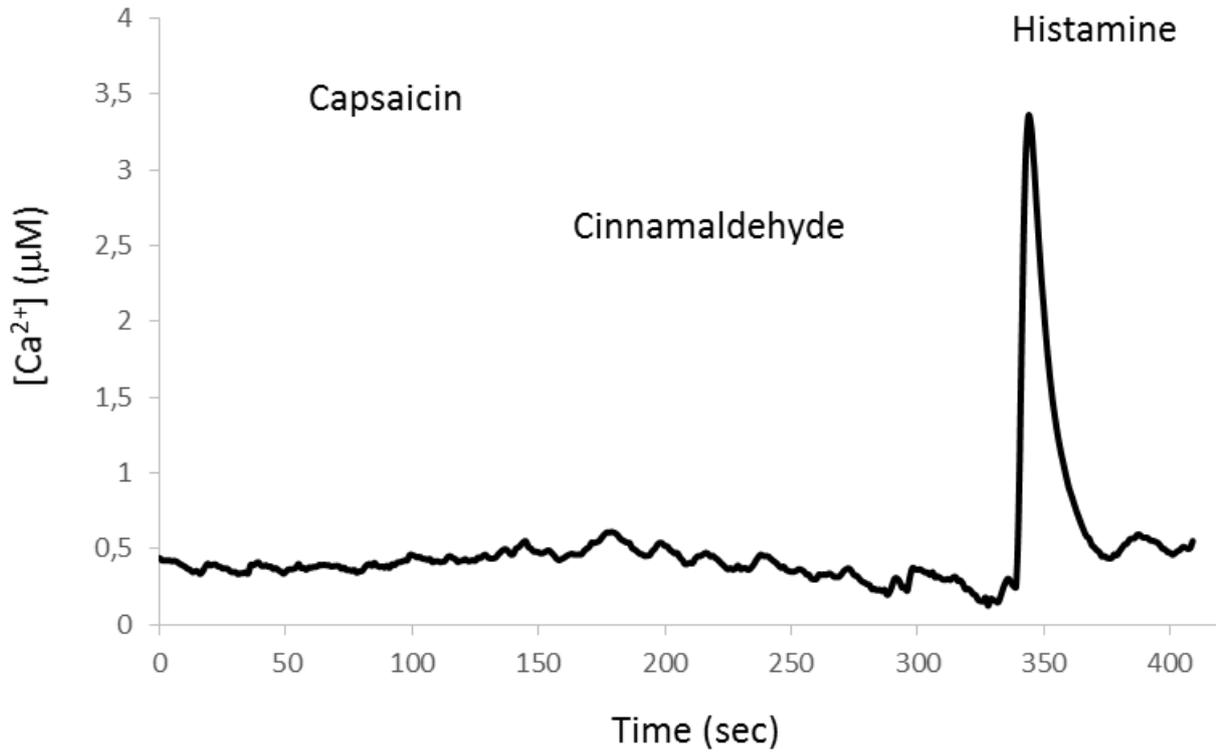


Figura 11. Misurazioni della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ in cellule HeLa di controllo. Dove indicato, le cellule sono state trattate con 10 μ M di capsaicina, 10 μ M di cinnamaldehyde o 100 μ M di istamina.

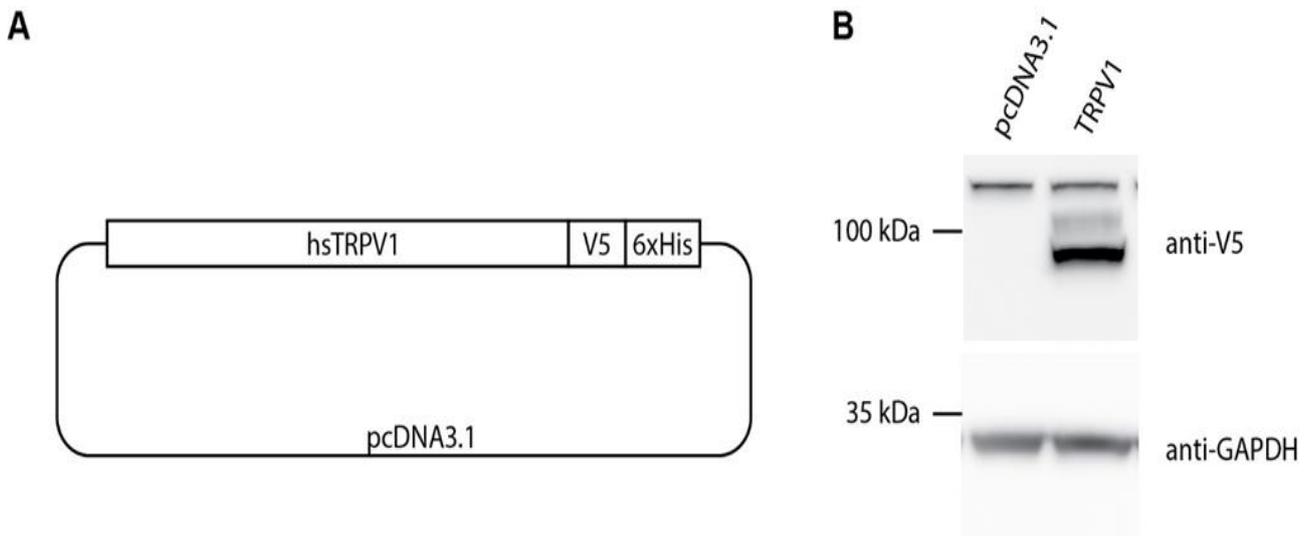


Figura 12. (a) Rappresentazione schematica del canale TRPV1 umano (hsTRPV1) che esprime il plasmide. (b) Le cellule HeLa sono state trasfettate con il plasmide codificante per pcDNA3.1 o TRPV1. Le proteine sono state estratte, separate in SDS-PAGE ed è stato eseguito un Western blot sondando la membrana con anticorpi V5 e GAPDH (loading control).

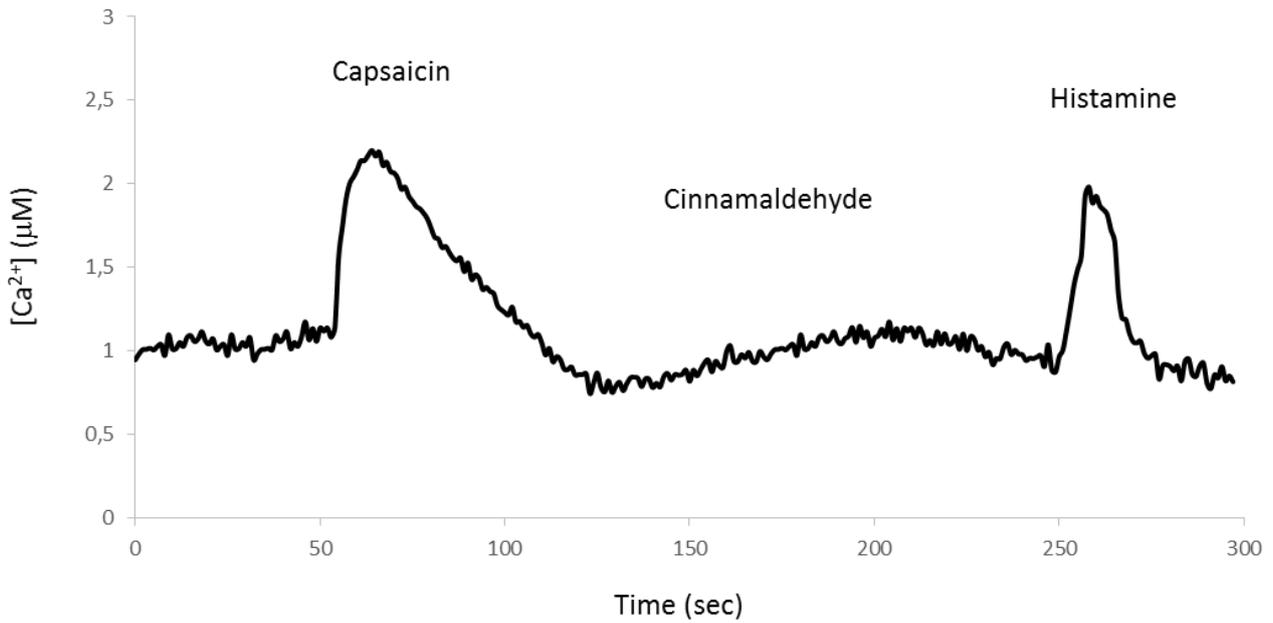


Figura 13. Misurazioni della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ in cellule HeLa che esprimono TRPV1. Dove indicato, le cellule sono state trattate con $10 \mu M$ di capsicina, $10 \mu M$ di cinnamaldehyde o $100 \mu M$ di istamina.

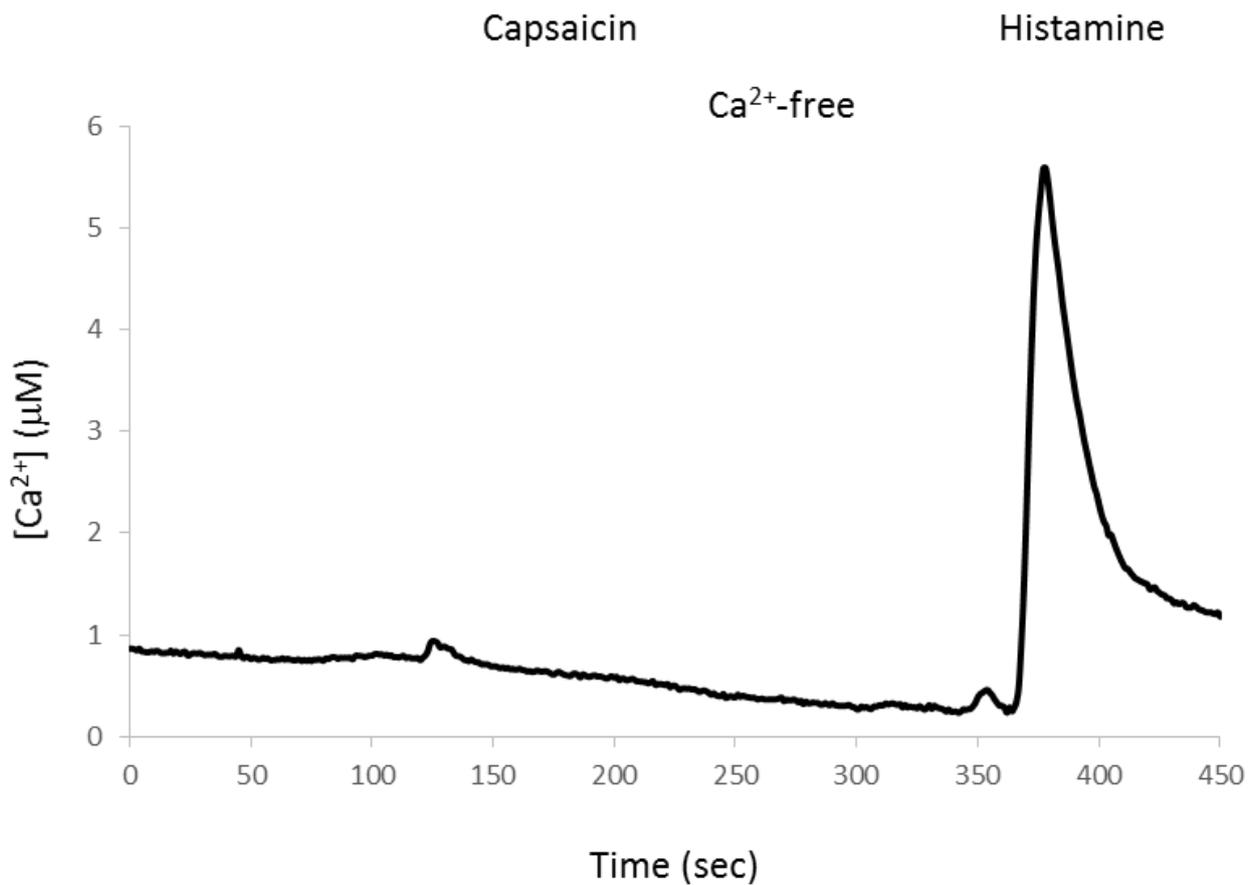


Figura 14. Misurazioni della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ in cellule HeLa TRPV1 perfuse con un tampone privo di Ca^{2+} . Dove indicato, le cellule sono state trattate con capsicina $10 \mu M$ o istamina $100 \mu M$.

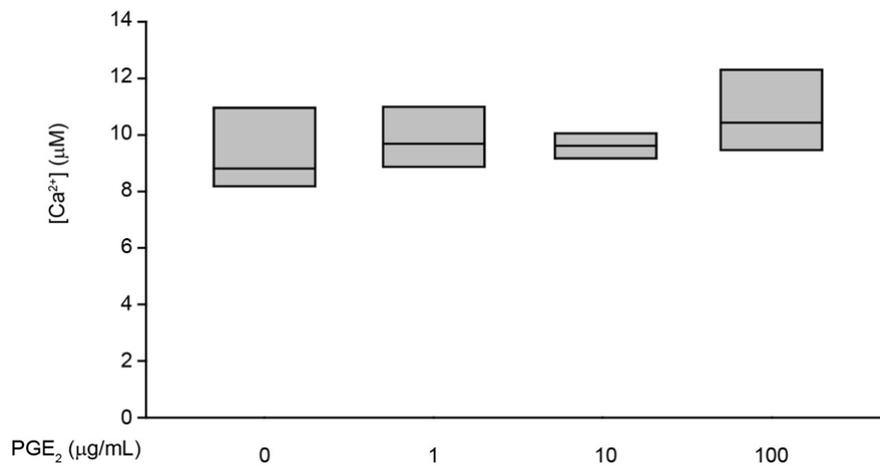


Figura 15. Misurazioni della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ in cellule HeLa che esprimono TRPV1 e sono state perfuse con CPS 100 nM (valori di picco). Le cellule sono state pretrattate con la dose indicata di PGE₂ per 1 ora. Nei grafici a riquadri, il limite del riquadro più vicino a zero indica il 25 ° percentile, la linea all'interno del riquadro segna la mediana e il limite del riquadro più lontano da zero indica il 75 ° percentile.

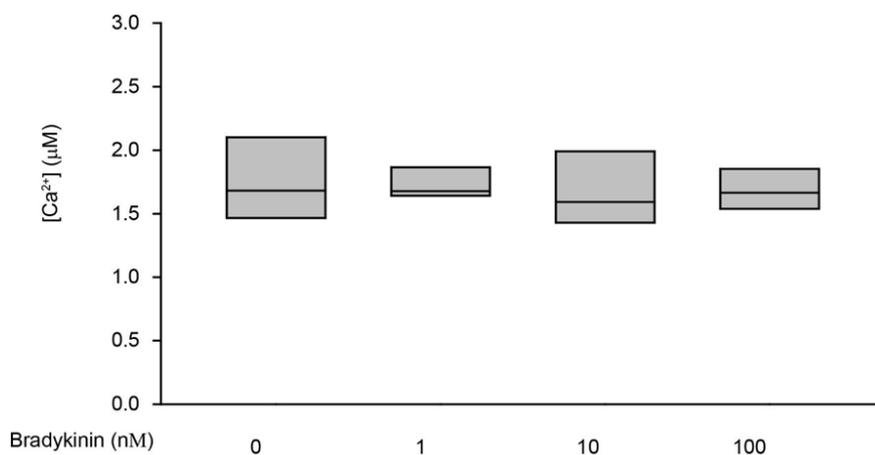


Figura 16. Misurazioni della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ in cellule HeLa che esprimono TRPV1 e sono state perfuse con CPS 10 nM (valori di picco). Le cellule sono state pretrattate con la dose indicata di BK per 1 ora. Nei grafici a riquadri, il limite del riquadro più vicino a zero indica il 25 ° percentile, la linea all'interno del riquadro segna la mediana e il limite del riquadro più lontano da zero indica il 75 ° percentile.

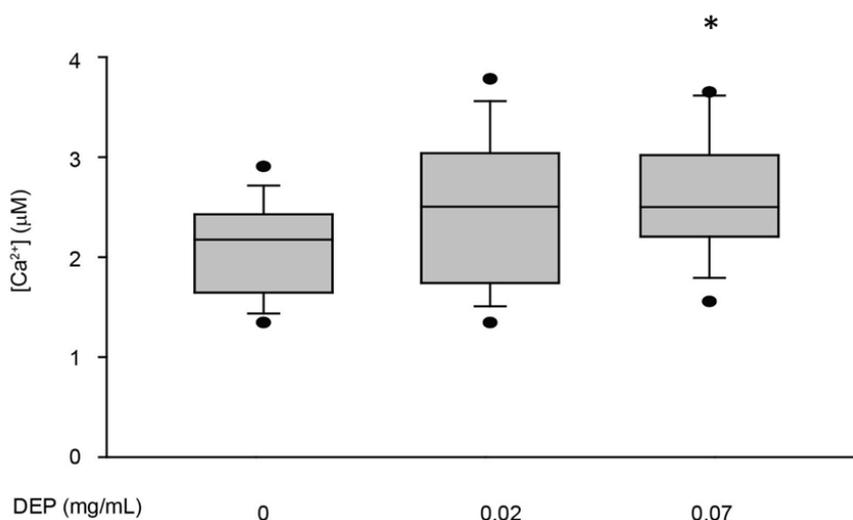


Figura 17. Misurazioni della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ in cellule HeLa che esprimono TRPV1 e perfuse con CPS 10 nM (valori di picco). Le cellule sono state pretrattate con la dose indicata di DEP per 1 ora. Nei grafici a riquadri, il limite del riquadro più vicino a zero indica il 25 ° percentile, la linea all'interno del riquadro segna la mediana e il limite del riquadro più lontano da zero indica il 75 ° percentile. Baffi (barre di errore) sopra e sotto la casella indicano il 95 ° e il 5 ° percentile. I punti rappresentano i punti periferici.

4. *Analisi dei polimorfismi*

Le caratteristiche dei soggetti sono riassunte in Tabella 5. Tutti i partecipanti hanno completato il test della tosse con capsaicina senza riportare effetti collaterali. Nessuno dei soggetti ha mostrato tosse cronica al basale. Infatti i punteggi LCQ indicavano che la tosse non influiva sulla qualità della vita, poiché tutti i risultati erano vicini al massimo punteggio ottenibile, cioè 21 (range 20-21). Le varianti wild type degli SNPs T505A e K2N erano presenti in tutti i partecipanti motivo per cui non sono state considerate nella nostra analisi (Figura 18). Invece sono stati identificati i polimorfismi di P91S rs222749, I315M rs222747, T469I rs224534, and I585V rs8065080 con una percentuale di eterozigosi $\geq 15\%$ (Tabella 5). Le frequenze genotipiche dei 4 polimorfismi non deviano dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (chi-square test: $X^2=0.1736, 0.6286, 1.6519, 0.6574$ per rs8065080, rs224534, rs222747, rs22274, rispettivamente e $X^2=$ non applicabile per rs17633288 e rs9894618). La C2 mediana è risultata di 12.75 μM di CPS con un range tra 1.55 e $>1000 \mu\text{M}$. La sensibilità alla capsaicina, espressa come numero di colpi di tosse alla concentrazione di 30 μM , ha mostrato un valore mediano di 3.0 (IQR 2.0-3.6) (Tabella 5). Non abbiamo osservato differenze statisticamente significative tra maschi e femmine per quanto riguarda la risposta tussigena alla capsaicina. Sono evidenziate in Tabella 6 le associazioni tra singole e diverse combinazioni di SNPs e la risposta tussigena alla capsaicina, espressa come C2. Il maggior contributo per la determinazione della sensibilità alla capsaicina in vivo, è dato dalla combinazione di 4 SNPs: 315M, 585I, 469I e 91S (Tau = -0.440, p = 0.015). Tuttavia abbiamo scoperto che la presenza di un minimo di 2 polimorfismi, il 91S combinato con il 315M (Tau = -0.410; p = 0.032) o con il 585I (Tau = -0.424; p = 0.025), è sufficiente per determinare un effetto sulla sensibilità alla capsaicina, espressa come C2. Anche la combinazione di 3 polimorfismi 315M; 585I; 469I (Tau = -0.405; p = 0.028) o 315M; 585I; 91S (Tau = -0.417; p = 0.023) ha determinato un effetto significativo sulla C2, mentre quando sono stati analizzati i singoli SNPs, non si sono evidenziate correlazioni statisticamente significative con la C2 (Tabella 6).

Tabella 5. Caratteristiche dei partecipanti, genotipo e risposta tussigena alla capsaicina.

Variabile	
Numero (M:F)	20 (11:9)
Età, anni	34 (29.5-48.5)*
LCQ punteggio, (min-max)	19.6-21
Genotipo	Alleli (%)
SNP rs T8065080C	
TT	35
CT	50
CC	15
SNP rs G224534A	
GG	35
GA	45
AA	20
SNP rs C222747G	
CC	50
CG	45
GG	5
SNP rs C222749T	
CC	85
TC	15
SNP rs T17633288A	
TT	100
SNP rs 9894618	
CC	100
Risposta tussigena alla capsaicina	
C2, μ M di capsaicina	12.75 (10-30)*
Tosse a 30 μ M di capsaicina, n°	3.0 (2.0-3.6)*

*Median and IQR

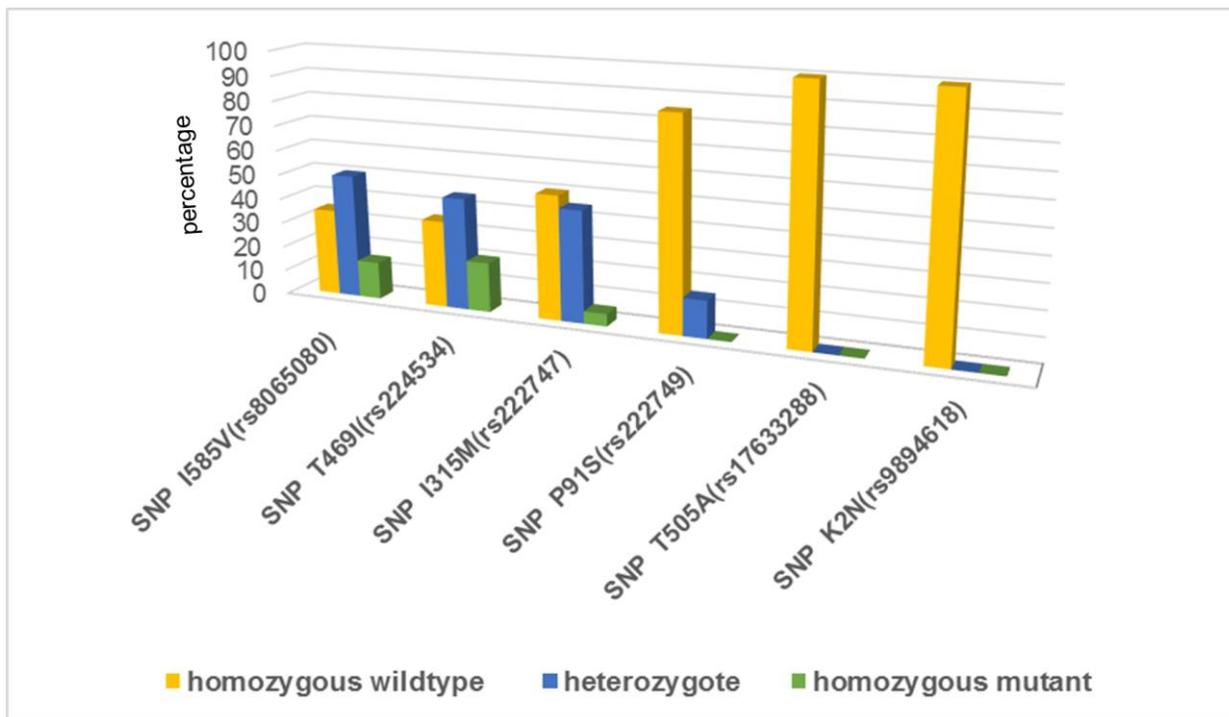


Figura 18. Tutti i soggetti hanno esibito un SNP wild-type T505A e K2N. Le distribuzioni della frequenza genotipica nella nostra popolazione sono paragonabili a quelle trovate in altri studi.

Tabella 6. Associazioni tra singole e diverse combinazioni di SNPs e sensibilità alla capsaicina espressa come concentrazione che causa 2 colpi di tosse (C2).

	C2	
1 SNPs	τ^a	p-value
I315M	-0.149	0.485
I585V	-0.230	0.252
T469I	-0.149	0.463
P91S	ND	
2 combined SNPs		
I315M; T469I	-0.380	0.057
I585V; I315M	-0.323	0.079
I315M; P91S	-0.410	0.032
T469I; I585V	-0.177	0.349
I585V; P91S	-0.424	0.025
T469I; P91S	-0.076	0.702
3 combined SNPs		
I315M; I585V; T469I	-0.405	0.028
I315M; I585V; P91S	-0.417	0.023
I315M; T469I; P91S	-0.369	0.056
I585V; T469I; P91S	-0.241	0.193
4 combined SNPs		
I315M; I585V; T469I; P91S	-0.440	0.015

^a Kendall's rank correlation coefficient tau b.

In Figura 19 è mostrata la distribuzione dei partecipanti in relazione al gradiente di responsività alla capsaicina. Il gradiente di responsività alla capsaicina, geneticamente determinato, variava tra un valore minimo di 2 ed un valore massimo di 6, e la maggior parte dei soggetti (n=7) ha presentato un punteggio di responsività genetica pari a 3, mentre nessun soggetto ha esibito il punteggio minimo (0 e 1) e massimo (7 e 8). Nelle Figura 20 è rappresentata la correlazione tra il gradiente di responsività genetica e la risposta tussigena (a), espressa come C2 (Kendal rank correlation coefficient, Tau = -0.440, p=0.015) e (b) come numero medio di colpi di tosse alla concentrazione di capsaicina 30 μ M (Tau = 0.439, p=0.015). Può essere approssimativamente stimata una differenza di 10 volte nella concentrazione di capsaicina che provoca 2 colpi di tosse (C2) e di 2 volte nel numero di colpi di tosse alla concentrazione di capsaicina 30 μ M, tra i soggetti con un gradiente di responsività alla capsaicina variabile da un minimo punteggio di 2 ad un massimo di 6. Tuttavia, il gradiente di responsività alla capsaicina non è risultato correlato al grado di modulazione dei canali TRP da parte di PGE₂ e BK (dati non mostrati).

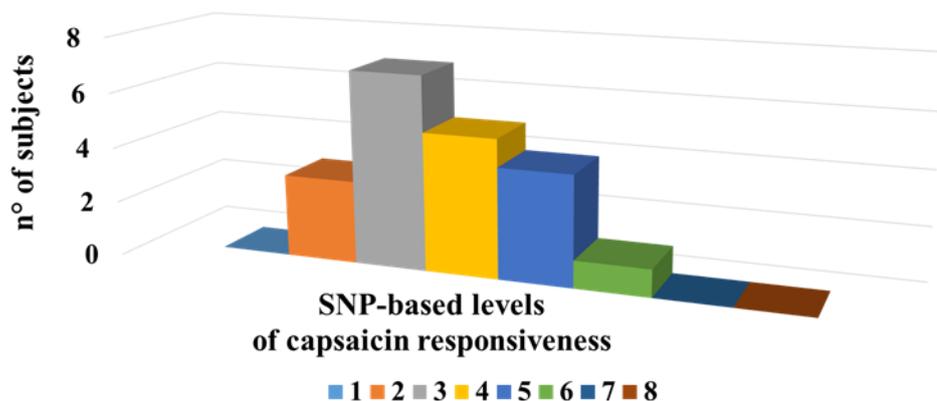


Figura 19. Distribuzione dei partecipanti in relazione al gradiente di responsività alla capsaicina.

Infine è stata valutata la relazione tra i parametri della HRV analizzati (nLF ed nHF), espressi come differenza tra il valore assunto dopo inalazione di diluente e dopo inalazione dei modulatori endogeni dei canali TRP e il gradiente di responsività alla capsaicina, ma tale relazione non è risultata statisticamente significativa. (dati non mostrati)

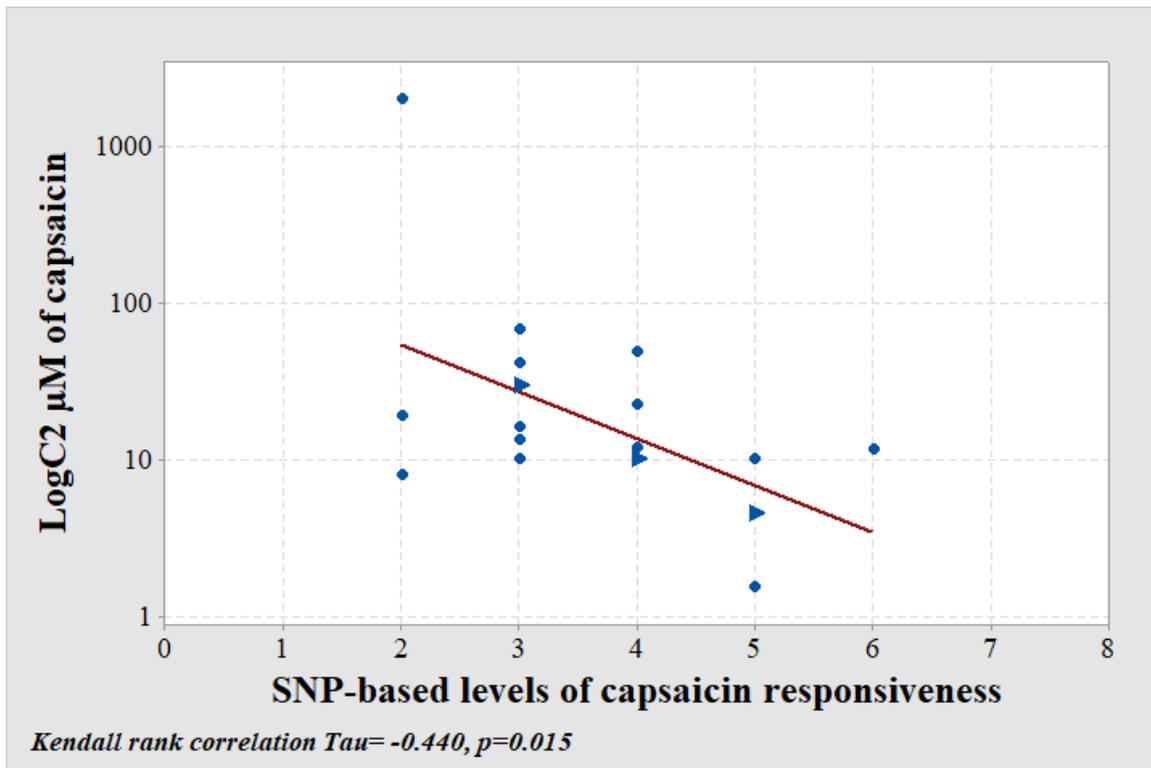


Figura 20a. Correlazione tra il gradiente di responsività genetica e la risposta tussigena alla CPS, espressa come C2. I triangoli nella figura indicano la sovrapposizione tra soggetti.

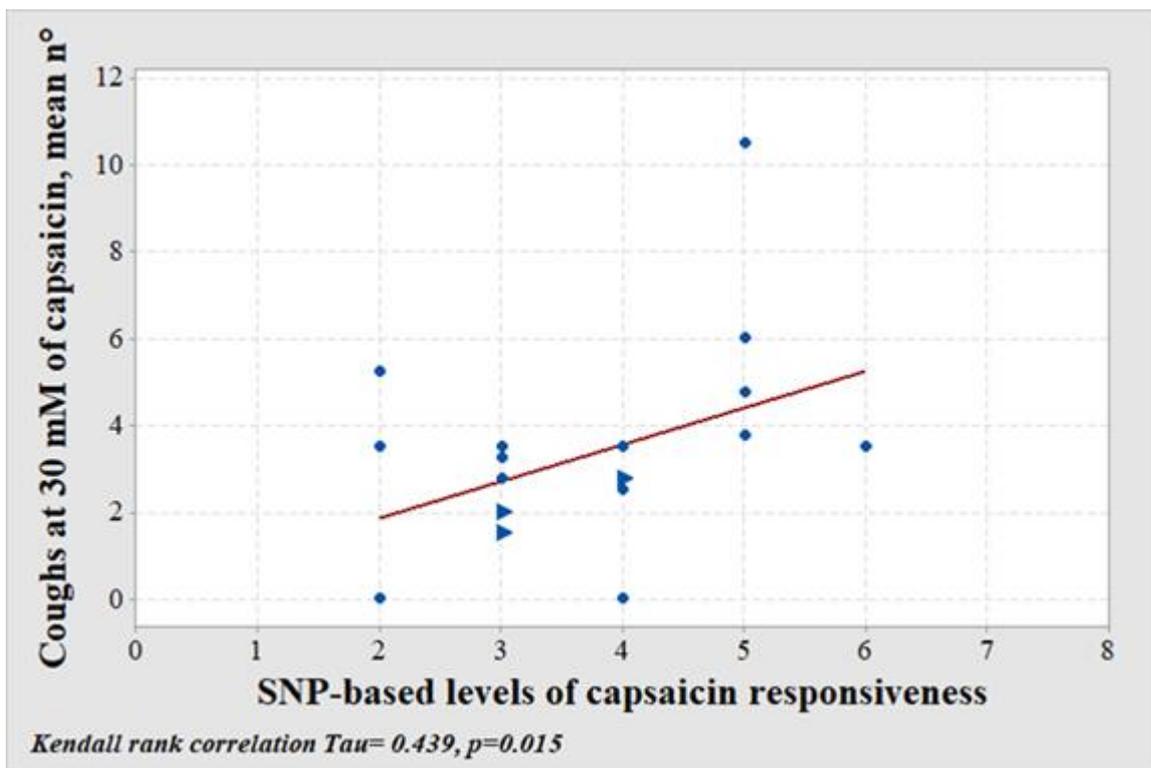


Figura 20b. Correlazione tra il gradiente di responsività genetica e la risposta tussigena, espressa come numero medio di colpi di tosse alla concentrazione di capsaicina 30 μM . I triangoli nella figura indicano la sovrapposizione tra soggetti.

DISCUSSIONE

In questo lavoro, abbiamo dimostrato che il canale TRPV1 è sensibilizzato dall'inalazione di PGE₂ e BK in volontari sani. La modulazione dell'attività di TRPV1 da parte di questi agenti somministrati per via inalatoria è in grado di influenzare la regolazione autonoma dell'HRV nei nostri soggetti aumentando l'attività simpatica e diminuendo l'attività vagale. Sulla base degli esperimenti condotti in vitro, abbiamo dimostrato che PGE₂ e BK agiscono indirettamente sulla funzione di TRPV1. Al contrario, l'attività di TRPV1 viene direttamente stimolata dal DEP. Questi risultati forniscono prove dirette che i recettori TRPV1 localizzati nelle vie aeree sono implicati nella regolazione autonoma del ritmo cardiaco in vivo e forniscono una prova che i picchi d'inquinamento possano indurre effetti acuti sulla funzione cardiovascolare con un meccanismo neurogeno.

Misurando la risposta tussigena ad uno specifico ligando di TRPV1, la capsaicina, prima e dopo il pretrattamento con due stimoli indipendenti somministrati per via inalatoria, PGE₂ e BK, a dosi in grado di indurre tosse in volontari sani, abbiamo dimostrato che il canale TRPV1 localizzato nelle vie aeree è modulabile in vivo. L'aumento della risposta tussigena è stato costante tra i singoli soggetti e tra gli agenti sensibilizzanti. I nostri risultati estendono quelli di Choudry et al. (1989) che hanno ottenuto un aumento della risposta tussigena in 6 volontari sani, facendo loro inalare dosi di PGE₂ e BK 3-4 volte superiori rispetto a quelle da noi utilizzate; inoltre lo studio di Choudry et al. non era stato in grado di mostrare un significativo effetto della BK sulla risposta tussigena indotta dalla capsaicina. L'evidenza di una sensibilizzazione di TRPA1 è stata meno coerente, dal momento che non abbiamo rilevato nessun effetto significativo dopo modulazione con BK ed il segnale con PGE₂ si è dimostrato piuttosto debole. Questo dato suggerisce che TRPA1 sia meno incline ad essere sensibilizzato da PGE₂ e BK. Tuttavia, questo risultato può anche essere spiegato dalla scarsa risposta tussigena di base alla cinnamaldeide, il ligando specifico di TRPA1. (Birrell et al. 2009).

In base ai risultati ottenuti con il test della tosse abbiamo deciso di effettuare ulteriori analisi concentrandoci sul canale TRPV1.

È stata solamente ipotizzata l'interazione tra l'inalazione di PM ed il verificarsi di effetti cardiovascolari acuti in soggetti sensibili, ma tale interazione non è mai stata dimostrata direttamente nell'uomo. Esistono prove che il sistema nervoso centrale può modulare la regolazione autonoma del cuore. Modelli animali e studi in vitro hanno dimostrato che gli inquinanti atmosferici attivano i canali sensoriali TRPV1 e TRPA1 (canali TRP) e Robertson et al. (2014) che il particolato diesel induce effetti avversi cardiovascolari acuti nei ratti attraverso l'attivazione del canale TRPV1. La stimolazione nei ratti del canale TRPV1 tramite l'inalazione di PM causa infatti cambiamenti nel ritmo cardiaco e nella morfologia dell'ECG (Ghelfi et al. 2008). Robinson et al.

(2018) hanno osservato l'interazione tra DEP ed il canale TRPA1 localizzato nelle fibre C afferenti delle vie aeree, nella cavia e nei nervi sensoriali umani. In questo studio abbiamo fornito la prova nell'uomo in vivo che i segnali provenienti dai nervi sensoriali delle vie aeree sono integrati nel sistema nervoso centrale e modificano l'output simpatico e parasimpatico diretto al sistema cardiovascolare. Tale prova è data dalla dimostrazione che gli stimoli in grado di sensibilizzare il canale TRPV1 localizzato nelle vie respiratorie, inducono uno squilibrio della regolazione autonoma della HRV in volontari sani. Questo effetto appare indipendente dalla variazione della frequenza cardiaca, poiché si osserva che l'inalazione di BK, a differenza della PGE₂, non induce tachicardia. Peraltro è noto che i componenti spettrali dell'HRV non correlano alla frequenza cardiaca (Malik *et al.* 1996). Alla luce delle prove epidemiologiche che mettono in relazione l'attività simpatica a eventi cardiovascolari avversi in soggetti suscettibili e della nostra dimostrazione che la stimolazione dei nervi sensoriali delle vie aeree con PGE₂ e BK è responsabile dell'aumento dell'attività simpatica in soggetti sani, concludiamo con ragionevole certezza che la stimolazione dei nervi sensoriali delle vie aeree da parte degli inquinanti possa essere responsabile di eventi cardiovascolari avversi in soggetti con patologie cardiache. Tale conclusione sarà oggetto di future indagini che avranno come obiettivo primario l'analisi della HRV in volontari sani esposti a PM per via inalatoria. Le analisi verranno condotte con le metodiche messe a punto in questo lavoro di ricerca. Tale estensione del presente progetto risulta peraltro già approvato dal Comitato Etico per la ricerca locale.

Si ritiene che alcuni agonisti siano in grado sia di attivare che di sensibilizzare i canali TRPV1, e non è possibile distinguere se uno stimolo agisca come un attivatore o piuttosto come un sensibilizzatore, che abbassi la soglia di attivazione per un altro stimolo (Grace *et al.* 2014). PGE₂ e BK si legano a specifici recettori accoppiati a proteine G (GPCR) sulla membrana cellulare, cioè rispettivamente ai recettori EP3 e BKB2 i quali iniziano una cascata di segnalazione intracellulare. È stato dimostrato che PGE₂ attiva i nervi sensoriali della cavia, del topo ed umani in vitro e provoca tosse nel modello animale tramite l'attivazione del recettore EP3 (Maher *et al.* 2009). Nelle cavie, la BK attiva i nervi sensoriali e provoca la tosse attraverso l'attivazione dei recettori BKB2 (Grace *et al.* 2012). Si ritiene inoltre che TRPV1 sia coinvolto in alcune cascate di segnalazione dei recettori a 7 domini transmembrana (G-protein coupled receptors, GPCR), attivati ad esempio da BK e PGE₂. Gli antagonisti selettivi di TRPV1 hanno parzialmente inibito la risposta tussiva a PGE₂ e BK in un modello di cavia creato per lo studio della tosse. I percorsi a valle dell'accoppiamento con GPCR che portano alla sensibilizzazione o all'attivazione di TRPV1 non sono stati completamente chiariti, ma probabilmente la produzione di diacilglicerolo (DAG) e l'attivazione della fosfochinasi C (PKC) è implicata poiché DAG e PKC si trovano a legare

direttamente il canale TRPV1 (*Grace et al. 2013*). Non era tuttavia noto se TRPV1 potesse essere attivato da PGE₂ e BK anche in assenza dei percorsi sopra indicati mediati dall'accoppiamento GPCR. I nostri esperimenti in vitro hanno dimostrato che PGE₂ e BK non sono in grado di aprire direttamente i canali TRPV1 espressi dalle cellule HeLa. Pertanto è corretto considerare questi mediatori endogeni come sensibilizzanti indiretti di TRPV1.

Nello studio dei polimorfismi del canale TRPV1 abbiamo dimostrato che la variabilità della risposta tussigena alla capsaicina tra soggetti sani è spiegata da molteplici polimorfismi del canale TRPV1. Il contributo maggiore alla sensibilità in termini di risposta tussigena alla capsaicina in vivo è dovuto alla presenza di quattro SNPs combinati: I315M; I585V; T469I; P91S. Abbiamo scoperto tuttavia che la presenza di un minimo di due polimorfismi, il 91S combinato con 315M o con 585I, è sufficiente per rilevare un effetto sulla concentrazione di capsaicina che causa 2 colpi di tosse. Il polimorfismo P91S (rs222749) di TRPV1 si trova nell'esone 1 nella parte terminale NH₂ della proteina insieme a K2N (rs9894618). Il polimorfismo I315M (rs222747) colpisce l'esone 5 ed è localizzato nella regione dei domini anchirinici ripetuti, che sono responsabili di mediare le interazioni proteina-proteina. È stato ipotizzato che i due SNPs, P91S e I315 M, influenzino le proprietà funzionali del canale (*van Esch et al. 2009*). I nostri risultati sono in linea con quelli ottenuti in vitro da *Xu et al. 2007*, che hanno esaminato le stesse sei varianti polimorfiche e dimostrato che soprattutto la combinazione di P91S e I315M modifica le proprietà funzionali del canale ed induce un aumento dell'espressione della proteina TRPV1 dovuta ad un aumento del numero di copie del DNA. Il polimorfismo I585V comporta una sostituzione conservativa che influenza il dominio transmembrana di TRPV1. *Deering-rice et al. 2016* hanno dimostrato che gli SNPs I585V nelle cellule HEK-293 hanno un effetto inibitorio sull'espressione, l'attivazione e l'interiorizzazione del TRPV1 wild-type. Nelle normali cellule epiteliali bronchiali umane, la secrezione di IL-8 in risposta al trattamento con polveri di carbone è risultata ridotta nelle cellule eterozigoti per TRPV1-I585V. Pertanto è il polimorfismo I585 wild-type ad essere correlato a una maggiore responsività alla capsaicina. È stato ipotizzato che il polimorfismo 585 V sia importante nella sensibilità individuale in termini di risposta tussigena poiché implica una perdita del 20-30% della funzione del canale e la corrispondente mutazione TRPV1 585 V è associata a un minor rischio di respiro sibilante e tosse nei bambini con asma (*Cantero-Recasens et al. 2010*). Le varianti I315M e T469I sono risultate anche le più sensibili alla capsaicina nelle cellule HEK-293 (*Deering-rice et al. 2016*). Questo è il primo studio in vivo condotto in una popolazione non selezionata, per la ricerca del ruolo di diversi SNPs sulla funzionalità del canale TRPV1 espressa come risposta al test della tosse con capsaicina. Finora, i pochi studi disponibili sull'uomo si sono concentrati sull'associazione tra il singolo SNP, il più delle volte I585V e la responsività alla capsaicina in

termini di risposta tussigena o di dolore (*Sadofsky et al. 2017, Forstenpointner et al. 2017*). *Sadofsky et al.* hanno sequenziato il gene TRPV1 in 4 maschi che non rispondevano alla test della tosse con capsaicina e hanno dimostrato che i soggetti resistenti erano portatori delle triple mutazioni I315-I469-V585 del canale TRPV1. *Forstenpointner et al.* hanno dimostrato che la presenza di una variante I585V omozigote (CC) di TRPV1 in 8 soggetti sani era associata ad una sensazione dolorosa indotta da capsaicina e legata allo stimolo termico di calore, minore rispetto a 8 soggetti eterozigoti (TC) o 9 soggetti omozigoti di tipo wild-type (TT) per la variante I585V di TRPV1. Il nostro studio, in accordo con questi risultati, estende le indagini di *Sadofsky et al.* sulla risposta tussigena alla capsaicina all'intera gamma di SNPs caratterizzati funzionalmente in una popolazione non selezionata e più ampia. Oltre alle varianti I585V, abbiamo dimostrato che altri SNPs sono importanti per la sensibilità alla capsaicina in vivo. Sebbene l'identificazione del meccanismo molecolare implicato nella responsività alla capsaicina conferita da diversi SNPs esuli dall'ambito della nostra indagine, i nostri risultati sono biologicamente plausibili poiché gli SNPs rilevanti si trovano nella regione codificante del gene TRPV1. La nuova scoperta che conferma come sia necessaria una combinazione di più SNPs per avere un effetto sulla risposta tussigena suggerisce che probabilmente la responsività alla capsaicina dipende da più di un meccanismo, ovvero la morfologia alterata del canale, il cambiamento dipendente dallo stimolo nella conformazione del canale e/o l'aumento del numero di recettori TRPV1 espressi. Il nostro studio ha alcune limitazioni. Innanzitutto, è stato esaminato un numero relativamente basso di soggetti. Tuttavia, la distribuzione della frequenza degli alleli è paragonabile a quella di altri studi, suggerendo che i nostri casi sono rappresentativi di una popolazione più ampia (*Deering Rice et al. 2016, van Esch et al. 2009, Song YA et al. 2012*). Inoltre, la numerosità del nostro gruppo è in linea con la dimensione del campione di studi precedenti sul test della tosse (*Sadofsky et al. 2017, Belvisi et al. 2016, Kanazaki et al. 2012*). Riteniamo che i nostri risultati siano robusti poiché sono concordi anche valutando diversi parametri usati per la misura della sensibilità alla capsaicina, come il numero di colpi di tosse dopo una concentrazione relativamente bassa dell'agente tussigeno. In secondo luogo, la risposta alla capsaicina è stata valutata con il conteggio dei colpi di tosse usando il suono caratteristico, mentre non sono state prese in considerazione le misure sensoriali come Urge-to-Cough, l'attività dei muscoli respiratori registrata con elettromiografia o il flusso d'aria determinato dalla tosse (*Kanazaki et al. 2012, Hegland et al. 2012*). Abbiamo deliberatamente selezionato l'approccio standard del test della tosse con capsaicina suggerito dalla Task Force della Società Respiratoria Europea (*Morice et al. 2007*), poiché desideravamo utilizzare un metodo facilmente applicabile in ambito clinico. Il range di C2 di capsaicina rilevata nei nostri soggetti sani è in linea con la variabilità rilevata in studi precedenti (*Nieto et al. 2003, Belvisi et al. 2016*). I nostri risultati sono clinicamente rilevanti poiché contribuiscono a spiegare l'origine di questa

variabilità. In effetti, è stata rilevata una differenza sostanziale nella sensibilità alla capsaicina tra soggetti con livelli diversi del gradiente di responsività alla capsaicina compresi tra 2 e 6. I risultati possono avere applicazione nella valutazione degli effetti antitussigeni di trattamenti specifici e nella valutazione di pazienti con tosse cronica, aiutare a distinguere se un riflesso acuto della tosse è dovuto ad una sensibilità intrinseca, cioè genetica, o a fattori dipendenti da malattie e/o esposizioni esogene.

CONCLUSIONI

Con il presente studio abbiamo dimostrato tramite esperimenti in vitro ed in vivo nell'uomo che l'attività dei canali ionici TRPV1 e TRPA1 può essere modulata dall'inalazione di mediatori endogeni ed esogeni. La sensibilizzazione dei canali TRP da parte di PGE₂ e BK avviene con un meccanismo indiretto e porta ad uno sbilanciamento della regolazione autonoma cardiaca, in favore del sistema simpatico rispetto al parasimpatico, il quale comporta una modifica della HRV in soggetti sani. Tale dato dimostra che i segnali provenienti dai recettori sensoriali polmonari possono essere integrati nel sistema nervoso centrale e portare alla modifica della risposta autonoma cardiaca. Infine i recettori sensoriali polmonari possono essere sensibilizzati dal DEP (un componente dell'inquinamento ambientale), in maniera diretta. I nostri dati permettono quindi di spiegare quale sia il meccanismo per cui i picchi di inquinamento ambientale possano determinare effetti cardiovascolari acuti in soggetti suscettibili.

BIBLIOGRAFIA

- Adcock, J.J., Birrell, M.A., Maher, S.A., Bonvini, S.J., Dubuis, E., Wortley, M.A., Baker, K.E., Belvisi, M.G. *Making Sense Of Sensory Nerves: An In Vivo Characterisation Of A δ - And C-Fibres Innervating Guinea-Pig Airways [Abstract]. Am J Respir Crit Care Med, 2014. 189: p. A3969.*
- Ahluwalia, A., & Perretti, M. (1999). *B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1? Trends Pharmacol Sci, 20(3), 100-104.*
- Andre, E., Campi, B., Materazzi, S., Trevisani, M., Amadesi, S., Massi, D., Creminon, C., Vaksman, N., Nassini, R., Civelli, M., Baraldi, P.G., Poole, D.P., Bunnnett, N.W., Geppetti, P., & Patacchini, R. (2008). *Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. J Clin Invest, 118(7), 2574-2582.*
- Andre, E., Gatti, R., Trevisani, M., Preti, D., Baraldi, P.G., Patacchini, R., & Geppetti, P. (2009). *Transient receptor potential ankyrin receptor 1 is a novel target for pro-tussive agents. Br J Pharmacol, 158(6), 1621-1628.*
- Aramori, I., Zenkoh, J., Morikawa, N., O'Donnell, N., Asano, M., Nakamura, K., Iwami, M., Kojo, H., & Notsu, Y. (1997). *Novel subtype-selective nonpeptide bradykinin receptor antagonists FR167344 and FR173657. Mol Pharmacol, 51(2), 171-176.*
- Ayari, I., Fedeli, U., Saguem, S., Hidar, S., Khlifi, S., & Pavanello, S. (2013). *Role of CYP1A2 polymorphisms in breast cancer risk in women. Mol Med Rep, 7(1), 280-286.*
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., & Patapoutian, A. (2004). *Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. Neuron, 41(6), 849-857.*
- Bang, S., Kim, K.Y., Yoo, S., Kim, Y.G., & Hwang, S.W. (2007). *Transient receptor potential A1 mediates acetaldehyde-evoked pain sensation. Eur J Neurosci, 26(9), 2516-2523.*
- Barnes, N.C., Piper, P.J., & Costello, J.F. (1984). *Comparative effects of inhaled leukotriene C4, leukotriene D4, and histamine in normal human subjects. Thorax, 39(7), 500-504.*

- Bastien, L., Sawyer, N., Grygorczyk, R., Metters, K.M., & Adam, M. (1994). Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. *J Biol Chem*, 269(16), 11873-11877.
- Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., & Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124(6), 1269-1282.
- Belvisi, M.G., Birrell, M.A., Khalid, S., Wortley, M.A., Dockry, R., Coote, J., Holt, K., Dubuis, E., Kelsall, A., Maher, S.A., Bonvini, S., Woodcock, A., & Smith, J.A. (2016). Neurophenotypes in Airway Diseases. Insights from Translational Cough Studies. *Am J Respir Crit Care Med*, 193(12), 1364-1372.
- Bergren, D.R. (1997). Sensory receptor activation by mediators of defense reflexes in guinea-pig lungs. *Respir Physiol*, 108(3), 195-204.
- Bianchi, B.R., El Kouhen, R., Chen, J., & Puttfarcken, P.S. (2010). Binding of [(3)H]A-778317 to native transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channels in rat dorsal root ganglia and spinal cord. *Eur J Pharmacol*, 633(1-3), 15-23.
- Birrell, M.A., Belvisi, M.G., Grace, M., Sadofsky, L., Faruqi, S., Hele, D.J., Maher, S.A., Freund-Michel, V., & Morice, A.H. (2009). TRPA1 agonists evoke coughing in guinea pig and human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*, 180(11), 1042-1047.
- Birring, S.S., Fleming, T., Matos, S., Raj, A.A., Evans, D.H., & Pavord, I.D. (2008). The Leicester Cough Monitor: preliminary validation of an automated cough detection system in chronic cough. *Eur Respir J*, 31(5), 1013-1018.
- Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L.P., & Ramkumar, V. (2014). TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells*, 3(2), 517-545.
- Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., 3rd, Brook, J.R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A.V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R.V., Mittleman, M.A., Peters, A., Siscovick, D., Smith, S.C., Jr., Whitsel, L., & Kaufman, J.D. (2010). Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 121(21), 2331-2378.
- Burki, N.K., Dale, W.J., & Lee, L.Y. (2005). Intravenous adenosine and dyspnea in humans. *J Appl Physiol* (1985), 98(1), 180-185.

Canning, B.J., Reynolds, S.M., & Mazzone, S.B. (2001). Multiple mechanisms of reflex bronchospasm in guinea pigs. *J Appl Physiol* (1985), 91(6), 2642-2653.

Canning, B.J., Mazzone, S.B., Meeker, S.N., Mori, N., Reynolds, S.M., & Udem, B.J. (2004). Identification of the tracheal and laryngeal afferent neurones mediating cough in anaesthetized guinea-pigs. *J Physiol*, 557(Pt 2), 543-558.

Canning, B.J., Farmer, D.G., & Mori, N. (2006). Mechanistic studies of acid-evoked coughing in anesthetized guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(2), R454-463.

Canning, B.J., Mori, N., & Mazzone, S.B. (2006). Vagal afferent nerves regulating the cough reflex. *Respir Physiol Neurobiol*, 152(3), 223-242.

Canning, B.J., & Chou, Y.L. (2009). Cough sensors. I. Physiological and pharmacological properties of the afferent nerves regulating cough. *Handb Exp Pharmacol*(187), 23-47.

Canning, B.J. (2011). Functional implications of the multiple afferent pathways regulating cough. *Pulm Pharmacol Ther*, 24(3), 295-299.

Cantero-Recasens, G., Gonzalez, J.R., Fandos, C., Duran-Tauleria, E., Smit, L.A., Kauffmann, F., Anto, J.M., & Valverde, M.A. (2010). Loss of function of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) genetic variant is associated with lower risk of active childhood asthma. *J Biol Chem*, 285(36), 27532-27535.

Carr, M.J., Kollarik, M., Meeker, S.N., & Udem, B.J. (2003). A role for TRPV1 in bradykinin-induced excitation of vagal airway afferent nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(3), 1275-1279.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824.

Choudry, N.B., Fuller, R.W., & Pride, N.B. (1989). Sensitivity of the human cough reflex: effect of inflammatory mediators prostaglandin E2, bradykinin, and histamine. *Am Rev Respir Dis*, 140(1), 137-141.

Chuaychoo, B., Lee, M.G., Kollarik, M., & Udem, B.J. (2005). Effect of 5-hydroxytryptamine on vagal C-fiber subtypes in guinea pig lungs. *Pulm Pharmacol Ther*, 18(4), 269-276.

Chuaychoo, B., Lee, M.G., Kollarik, M., Pullmann, R., Jr., & Udem, B.J. (2006). Evidence for both adenosine A1 and A2A receptors activating single vagal sensory C-fibres in guinea pig lungs. *J Physiol*, 575(Pt 2), 481-490.

Chung, K.F., & Widdicombe, J.G. (2009). Cough: setting the scene. *Handb Exp Pharmacol*(187), 1-21.

Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., & Schultz, G. (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 427-450.

Coleridge, H.M., Coleridge, J.C., & Roberts, A.M. (1983). Rapid shallow breathing evoked by selective stimulation of airway C fibres in dogs. *J Physiol*, 340, 415-433.

Couture, R., Harrison, M., Vianna, R.M., & Cloutier, F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, 429(1-3), 161-176.

Deering-Rice, C.E., Romero, E.G., Shapiro, D., Hughen, R.W., Light, A.R., Yost, G.S., Veranth, J.M., & Reilly, C.A. (2011). Electrophilic components of diesel exhaust particles (DEP) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): a probable mechanism of acute pulmonary toxicity for DEP. *Chem Res Toxicol*, 24(6), 950-959.

Deering-Rice, C.E., Johansen, M.E., Roberts, J.K., Thomas, K.C., Romero, E.G., Lee, J., Yost, G.S., Veranth, J.M., & Reilly, C.A. (2012). Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) is a mediator of lung toxicity for coal fly ash particulate material. *Mol Pharmacol*, 81(3), 411-419.

Deering-Rice, C.E., Stockmann, C., Romero, E.G., Lu, Z., Shapiro, D., Stone, B.L., Fassl, B., Nkoy, F., Uchida, D.A., Ward, R.M., Veranth, J.M., & Reilly, C.A. (2016). Characterization of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1) Variant Activation by Coal Fly Ash Particles and Associations with Altered Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1) Expression and Asthma. *J Biol Chem*, 291(48), 24866-24879.

Devos, F.C., Boonen, B., Alpizar, Y.A., Maes, T., Hox, V., Seys, S., Pollaris, L., Liston, A., Nemery, B., Talavera, K., Hoet, P.H., & Vanoirbeek, J.A. (2016). Neuro-immune interactions in chemical-induced airway hyperreactivity. *Eur Respir J*, 48(2), 380-392.

- Dicpinigaitis, P.V., Rhoton, W.A., Bhat, R., & Negassa, A. (2012). Investigation of the urge-to-cough sensation in healthy volunteers. *Respirology*, 17(2), 337-341.
- Ferrer-Montiel, A., Fernandez-Carvajal, A., Planells-Cases, R., Fernandez-Ballester, G., Gonzalez-Ros, J.M., Messeguer, A., & Gonzalez-Muniz, R. (2012). Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Pat*, 22(9), 999-1017.
- Folino, A.F., Scapellato, M.L., Canova, C., Maestrelli, P., Bertorelli, G., Simonato, L., Iliceto, S., & Lotti, M. (2009). Individual exposure to particulate matter and the short-term arrhythmic and autonomic profiles in patients with myocardial infarction. *Eur Heart J*, 30(13), 1614-1620.
- Folino, F., Buja, G., Zanotto, G., Marras, E., Allocca, G., Vaccari, D., Gasparini, G., Bertaglia, E., Zoppo, F., Calzolari, V., Suh, R.N., Ignatiuk, B., Lanera, C., Benassi, A., Gregori, D., & Iliceto, S. (2017). Association between air pollution and ventricular arrhythmias in high-risk patients (ARIA study): a multicentre longitudinal study. *Lancet Planet Health*, 1(2), e58-e64.
- Forstenpointner, J., Forster, M., May, D., Hofschulte, F., Cascorbi, I., Wasner, G., Gierthmuhlen, J., & Baron, R. (2017). Short Report: TRPV1-polymorphism 1911 A>G alters capsaicin-induced sensory changes in healthy subjects. *PLoS One*, 12(8), e0183322.
- Fujimura, M., Sakamoto, S., Kamio, Y., & Matsuda, T. (1992). Effects of methacholine induced bronchoconstriction and procaterol induced bronchodilation on cough receptor sensitivity to inhaled capsaicin and tartaric acid. *Thorax*, 47(6), 441-445.
- Gees, M., Colsool, B., & Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10), a003962.
- Geppetti, P., Materazzi, S., & Nicoletti, P. (2006). The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. *Eur J Pharmacol*, 533(1-3), 207-214.
- Ghelfi, E., Rhoden, C.R., Wellenius, G.A., Lawrence, J., & Gonzalez-Flecha, B. (2008). Cardiac oxidative stress and electrophysiological changes in rats exposed to concentrated ambient particles are mediated by TRP-dependent pulmonary reflexes. *Toxicol Sci*, 102(2), 328-336.
- Ghelfi, E., Wellenius, G.A., Lawrence, J., Millet, E., & Gonzalez-Flecha, B. (2008). Cardiac oxidative stress and dysfunction by fine concentrated ambient particles (CAPs) are mediated by angiotensin-II. *Inhal Toxicol*, 22(11), 963-972.

Grace, M., Birrell, M.A., Dubuis, E., Maher, S.A., & Belvisi, M.G. (2012). Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E2 and bradykinin. *Thorax*, 67(10), 891-900.

Grace, M.S., & Belvisi, M.G. (2011). TRPA1 receptors in cough. *Pulm Pharmacol Ther*, 24(3), 286-288.

Grace, M.S., Dubuis, E., Birrell, M.A., & Belvisi, M.G. (2012). TRP channel antagonists as potential antitussives. *Lung*, 190(1), 11-15.

Grace, M.S., Baxter, M., Dubuis, E., Birrell, M.A., & Belvisi, M.G. (2013). Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *Br J Pharmacol*, 171(10), 2593-2607.

Grace, M.S., Dubuis, E., Birrell, M.A., & Belvisi, M.G. (2013). Pre-clinical studies in cough research: role of Transient Receptor Potential (TRP) channels. *Pulm Pharmacol Ther*, 26(5), 498-507.

Granatiero, V., Patron, M., Tosatto, A., Merli, G., & Rizzuto, R. (2014). Using targeted variants of aequorin to measure Ca²⁺ levels in intracellular organelles. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014(1), 86-93.

Groneberg, D.A., Niimi, A., Dinh, Q.T., Cosio, B., Hew, M., Fischer, A., & Chung, K.F. (2004). Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med*, 170(12), 1276-1280.

Haque, R.A., Usmani, O.S., & Barnes, P.J. (2005). Chronic idiopathic cough: a discrete clinical entity? *Chest*, 127(5), 1710-1713.

Harle, A.S., Blackhall, F.H., Smith, J.A., & Molassiotis, A. (2012). Understanding cough and its management in lung cancer. *Curr Opin Support Palliat Care*, 6(2), 153-162.

Hartert, T.V., Dworski, R.T., Mellen, B.G., Oates, J.A., Murray, J.J., & Sheller, J.R. (2000). Prostaglandin E(2) decreases allergen-stimulated release of prostaglandin D(2) in airways of subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 162(2 Pt 1), 637-640.

Ho, C.Y., Gu, Q., Lin, Y.S., & Lee, L.Y. (2001). Sensitivity of vagal afferent endings to chemical irritants in the rat lung. *Respir Physiol*, 127(2-3), 113-124.

Holguin, F., Tellez-Rojo, M.M., Hernandez, M., Cortez, M., Chow, J.C., Watson, J.G., Mannino, D., & Romieu, I. (2003). Air pollution and heart rate variability among the elderly in Mexico City. *Epidemiology*, 14(5), 521-527.

Jang, Y., Lee, Y., Kim, S.M., Yang, Y.D., Jung, J., & Oh, U. (2012). Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Arch Pharm Res*, 35(10), 1823-1830.

Jia, Y., McLeod, R.L., Wang, X., Parra, L.E., Egan, R.W., & Hey, J.A. (2002). Anandamide induces cough in conscious guinea-pigs through VR1 receptors. *Br J Pharmacol*, 137(6), 831-836.

Kagaya, M., Lamb, J., Robbins, J., Page, C.P., & Spina, D. (2002). Characterization of the anandamide induced depolarization of guinea-pig isolated vagus nerve. *Br J Pharmacol*, 137(1), 39-48.

Kajekar, R., Proud, D., Myers, A.C., Meeker, S.N., & Udem, B.J. (1999). Characterization of vagal afferent subtypes stimulated by bradykinin in guinea pig trachea. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(2), 682-687.

Kharitonov, S.A., Sapienza, M.M., Chung, K.F., & Barnes, P.J. (1999). Prostaglandins mediate bradykinin-induced reduction of exhaled nitric oxide in asthma. *Eur Respir J*, 14(5), 1023-1027.

Koizumi, K., Terui, N., & Kollai, M. (1985). Effect of cardiac vagal and sympathetic nerve activity on heart rate in rhythmic fluctuations. *J Auton Nerv Syst*, 12(2-3), 251-259.

Kollarik, M., & Udem, B.J. (2002). Mechanisms of acid-induced activation of airway afferent nerve fibres in guinea-pig. *J Physiol*, 543(Pt 2), 591-600.

Kollarik, M., & Udem, B.J. (2004). Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1^{-/-} mice. *J Physiol*, 555(Pt 1), 115-123.

- Kwong, K., Carr, M.J., Gibbard, A., Savage, T.J., Singh, K., Jing, J., Meeker, S., & Udem, B.J. (2008). Voltage-gated sodium channels in nociceptive versus non-nociceptive nodose vagal sensory neurons innervating guinea pig lungs. *J Physiol*, 586(5), 1321-1336.
- Laloo, U.G., Fox, A.J., Belvisi, M.G., Chung, K.F., & Barnes, P.J. (1995). Capsazepine inhibits cough induced by capsaicin and citric acid but not by hypertonic saline in guinea pigs. *J Appl Physiol* (1985), 79(4), 1082-1087.
- Lee, L.Y., & Pizarri, T.E. (2001). Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respir Physiol*, 125(1-2), 47-65.
- Lee, L.Y., & Widdicombe, J.G. (2001). Modulation of airway sensitivity to inhaled irritants: role of inflammatory mediators. *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 4, 585-589.
- Lee, L.Y., & Gu, Q. (2009). Role of TRPV1 in inflammation-induced airway hypersensitivity. *Curr Opin Pharmacol*, 9(3), 243-249.
- Lee, M.G., Macglashan, D.W., Jr., & Udem, B.J. (2005). Role of chloride channels in bradykinin-induced guinea pig airway vagal C-fibre activation. *J Physiol*, 566(Pt 1), 205-212.
- Leech, J., Mazzone, S.B., & Farrell, M.J. (2012). The effect of placebo conditioning on capsaicin-evoked urge to cough. *Chest*, 142(4), 951-957.
- Leech, J., Mazzone, S.B., & Farrell, M.J. (2013). Brain activity associated with placebo suppression of the urge-to-cough in humans. *Am J Respir Crit Care Med*, 188(9), 1069-1075.
- Macpherson, L.J., Geierstanger, B.H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S.R., Hwang, S., & Patapoutian, A. (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol*, 15(10), 929-934.
- Maher, S.A., Birrell, M.A., & Belvisi, M.G. (2009). Prostaglandin E2 mediates cough via the EP3 receptor: implications for future disease therapy. *Am J Respir Crit Care Med*, 180(10), 923-928.
- Malik et al. (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*, 93(5), 1043-1065.

- Mamet, J., Baron, A., Lazdunski, M., & Voilley, N. (2002). Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci*, 22(24), 10662-10670.
- Marsden, P.A., Smith, J.A., Kelsall, A.A., Owen, E., Naylor, J.R., Webster, D., Sumner, H., Alam, U., McGuinness, K., & Woodcock, A.A. (2008). A comparison of objective and subjective measures of cough in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 122(5), 903-907.
- Mazzone, S.B., Mori, N., & Canning, B.J. (2005). Synergistic interactions between airway afferent nerve subtypes regulating the cough reflex in guinea-pigs. *J Physiol*, 569(Pt 2), 559-573.
- Mazzone, S.B., & McGovern, A.E. (2006). Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters and Cl⁻ channels regulate citric acid cough in guinea pigs. *J Appl Physiol* (1985), 101(2), 635-643.
- Mazzone, S.B., McLennan, L., McGovern, A.E., Egan, G.F., & Farrell, M.J. (2007). Representation of capsaicin-evoked urge-to-cough in the human brain using functional magnetic resonance imaging. *Am J Respir Crit Care Med*, 176(4), 327-332.
- Mazzone, S.B., Reynolds, S.M., Mori, N., Kollarik, M., Farmer, D.G., Myers, A.C., & Canning, B.J. (2009). Selective expression of a sodium pump isozyme by cough receptors and evidence for its essential role in regulating cough. *J Neurosci*, 29(43), 13662-13671.
- McLeod, R.L., Fernandez, X., Correll, C.C., Phelps, T.P., Jia, Y., Wang, X., & Hey, J.A. (2006). TRPV1 antagonists attenuate antigen-provoked cough in ovalbumin sensitized guinea pigs. *Cough*, 2, 10.
- Midgren, B., Hansson, L., Karlsson, J.A., Simonsson, B.G., & Persson, C.G. (1992). Capsaicin-induced cough in humans. *Am Rev Respir Dis*, 146(2), 347-351.
- Moak, J.P., Goldstein, D.S., Eldadah, B.A., Saleem, A., Holmes, C., Pechnik, S., & Sharabi, Y. (2009). Supine low-frequency power of heart rate variability reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation. *Heart Rhythm*, 4(12), 1523-1529.
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2005(272), re3.

- Morice, A.H., Higgins, K.S., & Yeo, W.W. (1992). Adaptation of cough reflex with different types of stimulation. *Eur Respir J*, 5(7), 841-847.
- Morice, A.H. (2001). Research methods in human respiratory pharmacology. *Br J Clin Pharmacol*, 51(4), 287.
- Morice, A.H., McGarvey, L., & Pavord, I. (2006). Recommendations for the management of cough in adults. *Thorax*, 61 Suppl 1, i1-24.
- Morice, A.H., Fontana, G.A., Belvisi, M.G., Birring, S.S., Chung, K.F., Dicpinigaitis, P.V., Kastelik, J.A., McGarvey, L.P., Smith, J.A., Tatar, M., & Widdicombe, J. (2007). ERS guidelines on the assessment of cough. *Eur Respir J*, 29(6), 1256-1276.
- Mustafic, H., Jabre, P., Caussin, C., Murad, M.H., Escolano, S., Tafflet, M., Perier, M.C., Marijon, E., Vernerey, D., Empana, J.P., & Jouven, X. (2012). Main air pollutants and myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 307(7), 713-721.
- Nassenstein, C., Kwong, K., Taylor-Clark, T., Kollarik, M., Macglashan, D.M., Braun, A., & Undem, B.J. (2008). Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J Physiol*, 586(6), 1595-1604.
- Nishino, T., Tagaito, Y., & Isono, S. (1996). Cough and other reflexes on irritation of airway mucosa in man. *Pulm Pharmacol*, 9(5-6), 285-292.
- Pavanello, S., Angelici, L., Hoxha, M., Cantone, L., Campisi, M., Tirelli, A.S., Vigna, L., Pesatori, A.C., & Bollati, V. (2018). Sterol 27-Hydroxylase Polymorphism Significantly Associates With Shorter Telomere, Higher Cardiovascular and Type-2 Diabetes Risk in Obese Subjects. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 309.
- Peters, A., von Klot, S., Heier, M., Trentinaglia, I., Hormann, A., Wichmann, H.E., & Lowel, H. (2004). Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 351(17), 1721-1730.
- Pope, C.A., 3rd, & Dockery, D.W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc*, 56(6), 709-742.

Premkumar, L.S., & Ahern, G.P. (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408(6815), 985-990.

Rahman, F., Pechnik, S., Gross, D., Sewell, L., & Goldstein, D.S. (2011). Low frequency power of heart rate variability reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation. *Clin Auton Res*, 21(3), 133-141.

Ramsey, I.S., Delling, M., & Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68, 619-647.

Rech, J.C., Eckert, W.A., Maher, M.P., Banke, T., Bhattacharya, A., & Wickenden, A.D. (2010). Recent advances in the biology and medicinal chemistry of TRPA1. *Future Med Chem*, 2(5), 843-858.

Reilly, C.A., Taylor, J.L., Lanza, D.L., Carr, B.A., Crouch, D.J., & Yost, G.S. (2003). Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci*, 73(1), 170-181.

Rhoden, C.R., Wellenius, G.A., Ghelfi, E., Lawrence, J., & Gonzalez-Flecha, B. (2005). PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochim Biophys Acta*, 1725(3), 305-313.

Rizzuto, R., Simpson, A.W., Brini, M., & Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358(6384), 325-327.

Robertson, S., Thomson, A.L., Carter, R., Stott, H.R., Shaw, C.A., Hadoke, P.W., Newby, D.E., Miller, M.R., & Gray, G.A. (2014). Pulmonary diesel particulate increases susceptibility to myocardial ischemia/reperfusion injury via activation of sensory TRPV1 and beta1 adrenoreceptors. *Part Fibre Toxicol*, 11, 12.

Robinson, R.K., Birrell, M.A., Adcock, J.J., Wortley, M.A., Dubuis, E.D., Chen, S., McGilvery, C.M., Hu, S., Shaffer, M.S.P., Bonvini, S.J., Maher, S.A., Mudway, I.S., Porter, A.E., Carlsten, C., Tetley, T.D., & Belvisi, M.G. (2018). Mechanistic link between diesel exhaust particles and respiratory reflexes. *J Allergy Clin Immunol*, 141(3), 1074-1084 e1079.

- Sadofsky, L.R., Cantero-Recasens, G., Wright, C., Valverde, M.A., & Morice, A.H. (2017). TRPV1 polymorphisms influence capsaicin cough sensitivity in men. *J Thorac Dis*, 9(3), 839-840.
- Schappert, S.M., & Burt, C.W. (2006). Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments: United States, 2001-02. *Vital Health Stat* 13(159), 1-66.
- Schelegle, E.S., & Green, J.F. (2001). An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. *Respir Physiol*, 125(1-2), 17-31.
- Shapiro, D., Deering-Rice, C.E., Romero, E.G., Hughen, R.W., Light, A.R., Veranth, J.M., & Reilly, C.A. (2013). Activation of transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) in lung cells by wood smoke particulate material. *Chem Res Toxicol*, 26(5), 750-758.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., & Saiga, Y. (1963). Microdetermination of Calcium by Aequorin Luminescence. *Science*, 140(3573), 1339-1340.
- Shin, J., Cho, H., Hwang, S.W., Jung, J., Shin, C.Y., Lee, S.Y., Kim, S.H., Lee, M.G., Choi, Y.H., Kim, J., Haber, N.A., Reichling, D.B., Khasar, S., Levine, J.D., & Oh, U. (2002). Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(15), 10150-10155.
- Smit, L.A., Kogevinas, M., Anto, J.M., Bouzigon, E., Gonzalez, J.R., Le Moual, N., Kromhout, H., Carsin, A.E., Pin, I., Jarvis, D., Vermeulen, R., Janson, C., Heinrich, J., Gut, I., Lathrop, M., Valverde, M.A., Demenais, F., & Kauffmann, F. (2012). Transient receptor potential genes, smoking, occupational exposures and cough in adults. *Respir Res*, 13, 26.
- Smith, J., Owen, E., Earis, J., & Woodcock, A. (2006). Cough in COPD: correlation of objective monitoring with cough challenge and subjective assessments. *Chest*, 130(2), 379-385.
- Stone, R.A., Worsdell, Y.M., Fuller, R.W., & Barnes, P.J. (1993). Effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan infusion on the human cough reflex. *J Appl Physiol* (1985), 74(1), 396-401.

- Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H., & Mizumura, K. (2002). Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol*, 88(1), 544-548.
- Sun, Q., Hong, X., & Wold, L.E. (2010). Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure. *Circulation*, 121(25), 2755-2765.
- Szallasi, A., & Blumberg, P.M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 51(2), 159-212.
- Tanraev, A.D. (1975). [Helminthological evaluation of the use of manure in dairy complexes]. *Veterinariia*(6), 42-44.
- Tarvainen, M.P., Niskanen, J.P., Lipponen, J.A., Ranta-Aho, P.O., & Karjalainen, P.A. (2014). Kubios HRV--heart rate variability analysis software. *Comput Methods Programs Biomed*, 113(1), 210-220.
- Tatar, M., Webber, S.E., & Widdicombe, J.G. (1988). Lung C-fibre receptor activation and defensive reflexes in anaesthetized cats. *J Physiol*, 402, 411-420.
- Tatar, M., Sant'Ambrogio, G., & Sant'Ambrogio, F.B. (1994). Laryngeal and tracheobronchial cough in anesthetized dogs. *J Appl Physiol* (1985), 76(6), 2672-2679.
- Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D.M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andre, E., Patacchini, R., Cottrell, G.S., Gatti, R., Basbaum, A.I., Bunnett, N.W., Julius, D., & Geppetti, P. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(33), 13519-13524.
- Udem, B.J., & Weinreich, D. (1993). Electrophysiological properties and chemosensitivity of guinea pig nodose ganglion neurons in vitro. *J Auton Nerv Syst*, 44(1), 17-33.
- Udem, B.J., Chuaychoo, B., Lee, M.G., Weinreich, D., Myers, A.C., & Kollarik, M. (2004). Subtypes of vagal afferent C-fibres in guinea-pig lungs. *J Physiol*, 556(Pt 3), 905-917.

van Esch, A.A., Lamberts, M.P., te Morsche, R.H., van Oijen, M.G., Jansen, J.B., & Drenth, J.P. (2009). Polymorphisms in gene encoding TRPV1-receptor involved in pain perception are unrelated to chronic pancreatitis. *BMC Gastroenterol*, 9, 97.

Watanabe, N., Horie, S., Michael, G.J., Keir, S., Spina, D., Page, C.P., & Priestley, J.V. (2006). Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. *Neuroscience*, 141(3), 1533-1543.

Widdicombe, J. (2003). Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 270(1), 2-10.

Widdicombe, J.G. (1954a). Receptors in the trachea and bronchi of the cat. *J Physiol*, 123(1), 71-104.

Widdicombe, J.G. (1954b). Respiratory reflexes from the trachea and bronchi of the cat. *J Physiol*, 123(1), 55-70.

Widdicombe, J.G. (1954c). Respiratory reflexes excited by inflation of the lungs. *J Physiol*, 123(1), 105-115.

Widdicombe, J.G. (1998). Afferent receptors in the airways and cough. *Respir Physiol*, 114(1), 5-15.

Xu, H., Tian, W., Fu, Y., Oyama, T.T., Anderson, S., & Cohen, D.M. (2007). Functional effects of nonsynonymous polymorphisms in the human TRPV1 gene. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(6), F1865-1876.

Zhang, G., Lin, R.L., Wiggers, M., Snow, D.M., & Lee, L.Y. (2008). Altered expression of TRPV1 and sensitivity to capsaicin in pulmonary myelinated afferents following chronic airway inflammation in the rat. *J Physiol*, 586(23), 5771-5786.

Zhou, Y., Sun, B., Li, Q., Luo, P., Dong, L., & Rong, W. (2011). Sensitivity of bronchopulmonary receptors to cold and heat mediated by transient receptor potential cation channel subtypes in an ex vivo rat lung preparation. *Respir Physiol Neurobiol*, 177(3), 327-332.