

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2024-25
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

EVALUACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD DE PACLITAXEL Y OXALIPLATINO SOBRE CANALES TRP EN UN MODELO IN VITRO COMPARTIMENTALIZADO

Autor: Víctor Moreno Lozano

Tutor académico: Prof. Antonio Ferrer-Montiel

Co-tutor: Prof. Asia Fernández Carvajal

DECLARACIÓN DE LOS TUTORES

D. ANTONIO FERRER MONTIEL, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y **Dña. ASIA FERNÁNDEZ CARVAJAL** Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“EVALUACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD DE PACLITAXEL Y OXALIPLATINO SOBRE CANALES TRP EN UN
MODELO IN VITRO COMPARTIMENTALIZADO”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. VICTOR MORENO LOZANO

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 30 de junio de 2020

Fdo.: Prof. Antonio Ferrer Montiel

Profa. Asia Fernández Carvajal

Resumen

La neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN) es uno de los efectos secundarios más comunes y limitantes del tratamiento oncológico. Se estima que entre el 30 y el 60 % de los pacientes que reciben fármacos como paclitaxel u oxaliplatino desarrollan algún grado de daño en el sistema nervioso periférico, manifestando síntomas como dolor, parestesias o hipersensibilidad, especialmente en las extremidades. A pesar de su elevada incidencia, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes aún no están completamente comprendidos, y los tratamientos disponibles son poco eficaces. Por ello, resulta fundamental el estudio de nuevas estrategias que permitan entender mejor los efectos neurotóxicos de estos fármacos. Sin embargo, los métodos experimentales tradicionales para estudiar la CIPN presentan importantes limitaciones, ya que muchos se basan en modelos animales que no permiten un análisis detallado de los mecanismos celulares implicados.

En este trabajo se empleó un modelo in vitro microfluídico compartimentalizado para analizar el efecto del paclitaxel y del oxaliplatino sobre nociceptores derivados de ganglios de raíz dorsal (DRGs), prestando especial atención a la actividad de canales iónicos tipo TRP (TRPV1, TRPM8, TRPA1), implicados en la transmisión del dolor. Se evaluó la viabilidad neuronal a largo plazo, la respuesta funcional a estímulos específicos mediante imagen de calcio, y se analizaron posibles cambios morfológicos en los axones.

Los resultados mostraron que el paclitaxel provocó una retracción axonal evidente, lo que limitó el número de neuronas disponibles para el análisis funcional. Aun así, se observó un aumento significativo en la intensidad de respuesta a capsaicina (TRPV1), así como una tendencia hacia una mayor respuesta a AITC (TRPA1), lo que sugiere una posible sensibilización de estos canales. Estos efectos podrían estar relacionados con el daño progresivo en los axones y un aumento del estrés celular a largo plazo. Por el contrario, las neuronas tratadas con oxaliplatino mostraron una mayor capacidad de respuesta a los agonistas de TRPA1 sin cambios estructurales axonales importantes, lo que indica un mecanismo de toxicidad diferente centrado en la desregulación funcional.

Estos hallazgos refuerzan la utilidad del modelo microfluídico para investigar mecanismos diferenciales de neurotoxicidad y abren nuevas vías para el desarrollo de terapias dirigidas a canales iónicos como estrategia potencial contra la CIPN. Además, subrayan la importancia de estudiar posibles tratamientos que promuevan la regeneración axonal en el caso del paclitaxel, con el fin de preservar la integridad funcional de las neuronas sensitivas expuestas a este agente.

Abstract

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a frequent and dose-limiting complication of cancer treatment. Antineoplastic agents such as paclitaxel and oxaliplatin are particularly associated with peripheral nerve toxicity, leading to symptoms like pain, tingling, numbness, and hypersensitivity, especially in the hands and feet. Despite its high prevalence, the underlying mechanisms remain poorly understood, and current therapies offer limited effectiveness. Moreover, traditional models used to study CIPN—mainly based on animal testing—face important limitations, as they do not allow for precise dissection of the cellular and molecular processes involved in neurotoxicity.

To overcome these challenges, we used a compartmentalized *in vitro* microfluidic platform with primary sensory neurons derived from dorsal root ganglia (DRGs), enabling the independent analysis of axonal and somatic responses. The experimental design involved long-term neuronal cultures (25 days *in vitro*) to assess cell viability under repeated exposure to chemotherapeutic agents. Functional responses were evaluated using calcium imaging to assess the activity of TRP ion channels (TRPV1, TRPM8, TRPA1) following stimulation with specific agonists. Additionally, we examined axonal morphology to identify potential structural alterations.

Our results demonstrated that paclitaxel induced a clear retraction of axons, compromising the availability of neurons for functional analysis. Despite this, we observed a significant increase in calcium responses to capsaicin (TRPV1), and a trend toward enhanced TRPA1 activation, suggesting functional sensitization in surviving neurons. These effects may be attributed to prolonged culture time and cumulative stress, as TRPA1 is known to be upregulated under oxidative conditions. In contrast, oxaliplatin-treated neurons showed increased responsiveness to TRPA1 agonists without major axonal structural changes, indicating a different mechanism of toxicity more focused on functional dysregulation.

Overall, our findings highlight the distinct neurotoxic profiles of paclitaxel and oxaliplatin and validate the use of compartmentalized microfluidic systems to study CIPN *in vitro*. Furthermore, future research should explore pharmacological strategies that promote axonal regeneration in paclitaxel-treated neurons, potentially restoring neuronal integrity and counteracting the severe axonal damage induced by this chemotherapeutic agent.

Palabras Clave

Neuropatía periférica inducida por quimioterapia, paclitaxel, oxaliplatino, microfluídica, canales TRP.

Índice

Tabla de contenido

Resumen	3
Abstract	4
Palabras Clave	5
Índice	6
Introducción y antecedentes	8
1. Sistema Somatosensorial	8
1.1. Función general y componentes del sistema somatosensorial	8
1.2. Organización anatómica de las vías somatosensoriales	9
1.3 Relevancia clínica del sistema somatosensorial.....	11
2. Dolor.....	12
2.1 Definición y tipos de dolor	12
2.2 Fisiología del dolor agudo.....	12
2.3 Nociceptores y canales TRP.....	13
2.4 Dolor crónico y dolor neuropático	14
2.5 Dolor neuropático.....	15
2.6 Neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN).....	16
Objetivos.....	22
Procedimiento experimental.....	23
Animales	23
Cultivo Celular de DRGs.....	23
Microfluídica	25
Imagen de calcio	27
Materiales	28
Análisis Estadístico	29
Resultados.....	30
1. Extender la duración del cultivo neuronal hasta 25 días in vitro (DIV)	30
2. Evaluar la viabilidad de las neuronas sensitivas tras la exposición a solución salina y a los fármacos quimioterapéuticos	31

3. Analizar los efectos de paclitaxel y oxaliplatino sobre la morfología de los axones.	34
<i>Discusión</i>	40
<i>Conclusiones</i>	44
<i>Bibliografía</i>	46

Introducción y antecedentes

1. Sistema Somatosensorial

1.1. Función general y componentes del sistema somatosensorial

El sistema somatosensorial es una parte esencial del sistema nervioso que permite la detección, transmisión e interpretación de una gran variedad de estímulos físicos, como el tacto, la presión, la temperatura o el dolor. Está compuesto por receptores periféricos especializados, localizados en la piel, músculos y articulaciones, así como por vías nerviosas que conectan estos receptores con el sistema nervioso central (SNC). Las señales captadas por los receptores viajan a través de fibras nerviosas hasta el cerebro, donde se procesan y se genera una respuesta adecuada (Figura 1). (Wang et al., 2022)

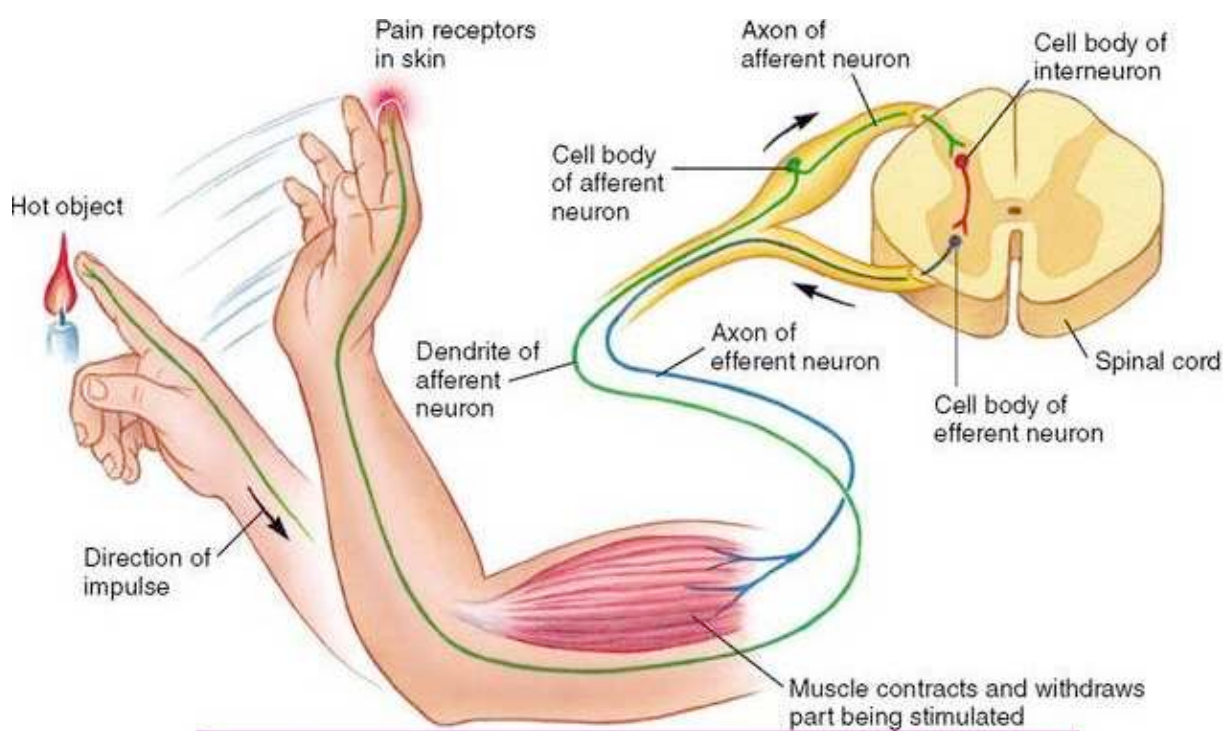


Figura 1. Esquema del funcionamiento del sistema somatosensorial ante un estímulo doloroso. Tomado de <https://quizlet.com/327331737/chapter-12-fundamentals-of-the-nervous-system-and-nervous-tissue-flash-cards/>

Gracias a esta red funcional, el organismo puede responder de forma precisa y adaptativa a los estímulos del entorno.

Existen diferentes tipos de receptores periféricos, cada uno especializado en un tipo de estímulo:

- Mecanorreceptores: Detectan el tacto, la presión y las vibraciones.
- Nociceptores: Detectan estímulos dolorosos o dañinos.
- Termorreceptores: Detectan cambios de temperatura.
- Propioceptores: Detectan el movimiento y la posición.

1.2. Organización anatómica de las vías somatosensoriales

Las señales captadas por los receptores sensoriales periféricos, como mecanorreceptores, nociceptores o propioceptores, viajan a través de neuronas sensitivas primarias hacia el sistema nervioso central (SNC). Estas neuronas, de morfología pseudounipolar (Figura 2), tienen su cuerpo celular localizado en los ganglios de la raíz dorsal (DRGs), situados a lo largo de la médula espinal.(Willis, 2007) Desde el soma, una única prolongación se divide en dos ramas: una se proyecta hacia la periferia, donde recoge la información sensorial, y la otra hacia el cuerno dorsal de la médula espinal, donde hace sinapsis con interneuronas.(Hsiao et al., 2002)

A partir de aquí, la información asciende por vías nerviosas específicas hacia estructuras superiores del SNC. Entre estas vías destacan el tracto espinotalámico, encargado de transmitir señales relacionadas con el dolor y la temperatura, y las columnas dorsales, responsables de la transmisión de información sobre propiocepción y tacto fino. Ambas vías terminan, principalmente, en el tálamo, desde donde las señales se proyectan a la corteza somatosensorial, donde se produce su interpretación consciente.(Norrzell, 1980)

Esta organización estructural permite una transmisión rápida, precisa y jerárquica de la información sensorial, lo que garantiza una respuesta adecuada del organismo ante los estímulos del entorno.

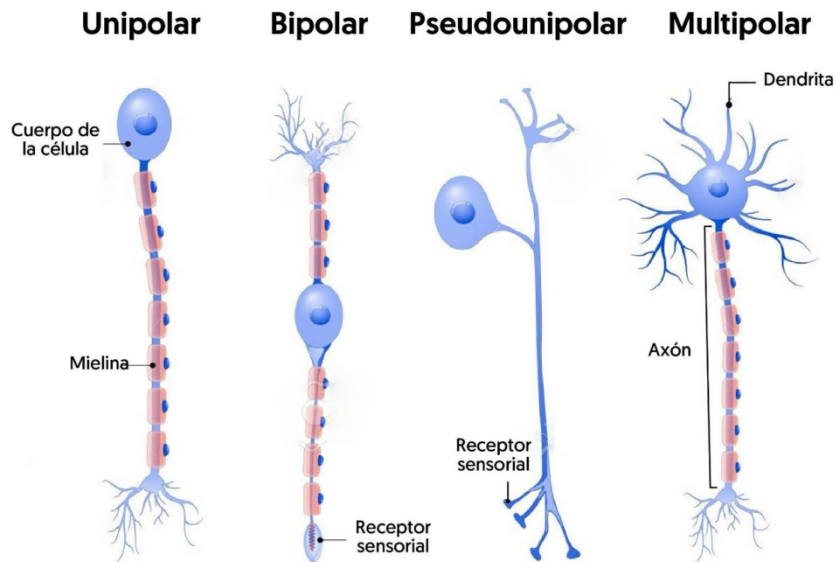


Figura 2. Diferentes tipos de morfología neuronal. Tomado de <https://neuro-class.com/tipos-neuronas/>

Estos receptores moleculares son, en su mayoría, canales iónicos, que permiten convertir estímulos mecánicos, térmicos o químicos en señales eléctricas capaces de ser transmitidas hasta el SNC. (Zheng, 2013)

Entre los canales más relevantes se encuentran:

- Canales de la familia de los receptores de potencial transitorio (TRP): Son fundamentales en la percepción de temperatura, dolor, presión y compuestos químicos irritantes. Dentro de esta familia se incluyen:
 - TRPV (Receptores de potencial transitorio vaniloide): implicados en la detección de calor y dolor.
 - TRPM (Receptor potencial transitorio de melastatina): relacionados con la percepción del frío.
 - TRPA (Receptor potencial transitorio de ankirina): activados por compuestos químicos irritantes. (Pedersen et al., 2005)
- Canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v): Importantes en la generación y propagación del potencial de acción en los nociceptores.
- Canales de potasio (K_v) y de calcio (Ca_v): Implicados en la excitabilidad neuronal, la sensibilización central y el dolor crónico. (Lai et al., s. f.)

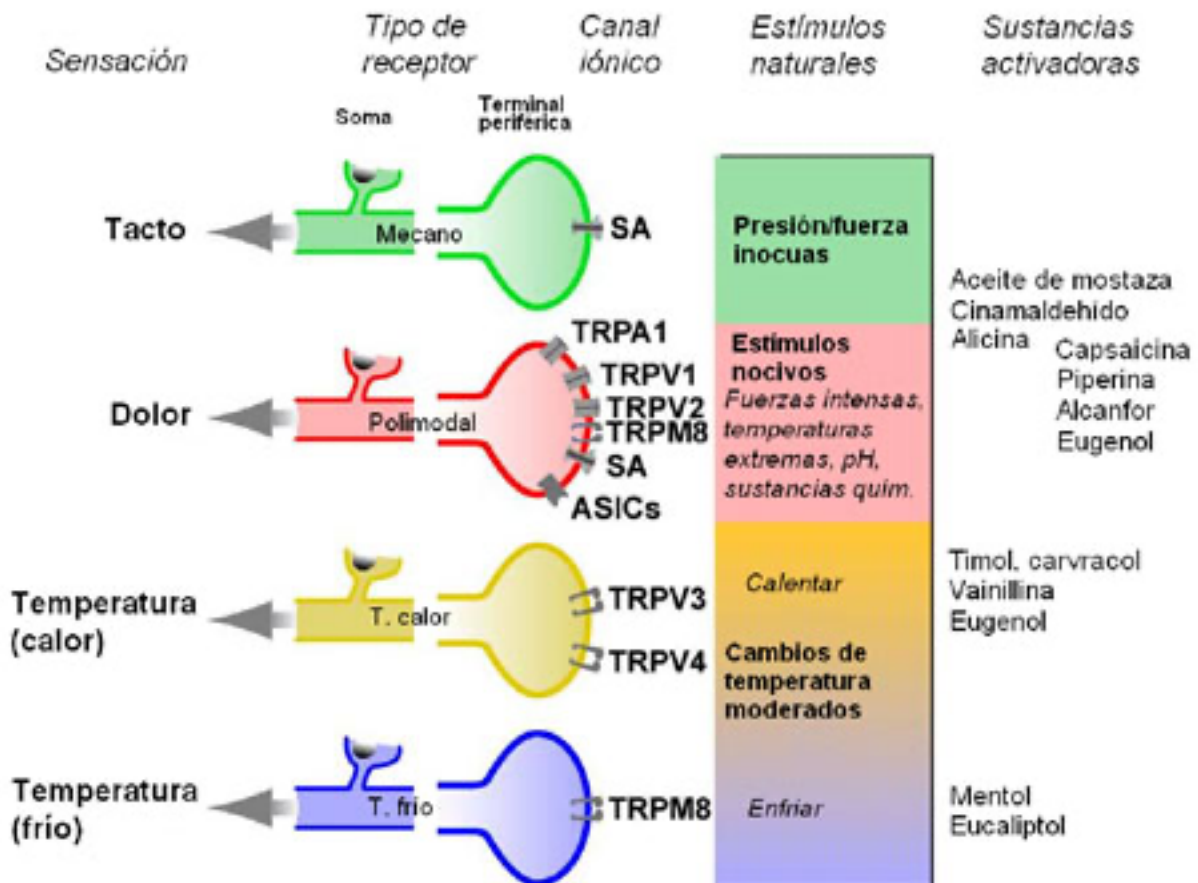


Figura 3. Tipos de receptores sensoriales y canales iónicos asociados a diferentes modalidades sensoriales. Tomado de https://www.researchgate.net/figure/Molecular-basis-of-somatosensory-specificity-The-Clear-Picture-Schematic_fig4_5432514.

1.3 Relevancia clínica del sistema somatosensorial

El sistema somatosensorial tiene un papel fundamental no solo en la detección de estímulos y su transmisión al SNC, sino también en la protección del organismo frente a señales potencialmente peligrosas. Sin embargo, alteraciones en este sistema pueden generar trastornos sensoriales que impactan significativamente en la calidad de vida. Entre las manifestaciones clínicas más comunes se encuentran:

- Hipoestesia: disminución de la sensibilidad.
- Parestesias: sensaciones anormales como hormigueo.
- Hiperalgesia: respuesta exagerada al dolor.
- Alodinia: percepción de dolor ante estímulos normalmente inocuos.

Estas disfunciones pueden ser consecuencia de lesiones nerviosas, enfermedades metabólicas como la diabetes, infecciones, trastornos autoinmunes o tratamientos farmacológicos agresivos como la quimioterapia.(Ma, 2022)

En este contexto, el estudio del sistema somatosensorial adquiere una gran relevancia, no solo desde el punto de vista fisiológico, sino también como base para comprender distintas patologías neurosensoriales y avanzar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

2. Dolor

2.1 Definición y tipos de dolor

El dolor es una sensación desagradable, como un hormigueo, pinchazo, y que envía el sistema nervioso como una señal para alertar de que algo no está bien en el cuerpo. Este dolor puede ayudar a saber que existe un problema en el cuerpo y como solucionar ese problema. Existen varios tipos de dolor, ya sea agudo o sordo, leve o intenso, intermitente o constante. Aunque este tipo de dolor varía dependiendo de la persona, ya que no todas las personas perciben el dolor de la misma manera. (Dubin & Patapoutian, 2010)

- Dolor agudo: Aparece debido a una lesión, inflamación o enfermedad, este dolor aparece de repente para actuar como una advertencia y normalmente suele desaparecer al poco tiempo.
- Dolor episódico: Aparece de vez en cuando y suele estar ligado a afecciones médicas a largo plazo.
- Dolor crónico: Dura mucho más tiempo (más de tres meses o el tiempo en el que debería haberse curado) y afecta a la vida diaria de las personas e incluso a sus relaciones.

2.2 Fisiología del dolor agudo

El dolor agudo se inicia con la activación de los nociceptores, que son terminaciones nerviosas especializadas en detectar estímulos nocivos. La señal dolorosa es transmitida al SNC por las fibras sensitivas A δ (mielinizadas, conducción rápida) y C (amielínicas, conducción

lenta). Una vez en el SNC, la señal es procesada en niveles como la médula espinal, el tálamo y la corteza cerebral.(Voscopoulos & Lema, 2010)

La respuesta resultante puede ser:

- Motora: retirada del estímulo.
- Autónoma: aumento de la frecuencia cardíaca o respiratoria.
- Afectiva: percepción emocional del dolor y la ansiedad.

2.3 Nociceptores y canales TRP

Los nociceptores, se encuentran en las terminaciones nerviosas y son los encargados de percibir el dolor. Su estructura incluye fibras A δ mielínicas y fibras C amielínicas, y sus receptores clave son los receptores de membrana que responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. (Middleton et al., 2021)

- Fibras A δ (mielínicas): Conducen la información del dolor más rápido y están relacionadas con el dolor agudo y bien localizado.
- Fibras C (amielínicas): Conducen la información de manera más lenta y están asociadas al dolor crónico. (Middleton et al., 2021)

Los nociceptores detectan estímulos potencialmente dañinos mediante la activación de canales iónicos específicos en sus terminaciones periféricas. Entre estos, los canales de la familia TRP desempeñan un papel crucial en la transducción del dolor.

Los canales TRP se encuentran altamente expresados en las membranas de las terminaciones libres de los nociceptores. Actúan como sensores polimodales capaces de responder a estímulos físicos (calor, frío, presión) y químicos (sustancias irritantes, mediadores inflamatorios). Su activación permite la entrada de cationes, principalmente calcio (Ca²⁺) y sodio (Na⁺), lo que despolariza la membrana neuronal y puede generar un potencial de acción que se propaga hacia el sistema nervioso central.(Venkatachalam & Montell, 2007)

Entre los canales TRP más relevantes en nociceptores destacan:

- TRPV1: sensible al calor, a la capsaicina y al pH ácido. Es un marcador característico de nociceptores peptidérgicos y está implicado tanto en el dolor fisiológico como en el inflamatorio.

- TRPA1: activado por compuestos irritantes (como AITC) y estrés oxidativo. Frecuentemente co-expresado con TRPV1, participa en respuestas nociceptivas a estímulos químicos, frío intenso y en el dolor neuropático.
- TRPM8: detecta temperaturas frías no dañinas y mentol. Aunque también se encuentra en fibras sensoriales no nociceptivas, su sobreexpresión o sensibilización puede contribuir a alodinia por frío en estados neuropáticos.

Estos canales pueden ser modulados por mediadores inflamatorios, lesiones nerviosas o fármacos neurotóxicos, lo que altera la excitabilidad de los nociceptores y puede contribuir a estados de dolor crónico o neuropático, como ocurre en la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN).(Zheng, 2013)

2.4 Dolor crónico y dolor neuropático

El dolor crónico se caracteriza por la presencia del dolor más allá del tiempo de curación de una lesión, y se considera complejo y multifactorial, ya que cuenta con la respuesta inicial a una lesión, como con cambios persistentes en el sistema nervioso periférico. Los mecanismos clave del dolor crónico, conllevan una estimulación repetida de los nociceptores, la cual puede producir una sensibilización de las neuronas de la médula espinal y el cerebro, haciendo que sean más sensibles a los estímulos dolorosos. Cuando se produce este dolor crónico, se produce un cambio en la estructura y la función de las neuronas, provocando cambios en la forma de recibir los estímulos dolorosos.(Apkarian et al., 2009)

A menudo, este dolor está asociado a una respuesta inflamatoria del sistema nervioso, ya que se llegan a liberar sustancias que contribuyen a la sensibilización neuronal.

Existen diferentes tipos de dolores crónicos:

- Dolor neuropático: Se produce por daño o disfunción de los nervios.
- Dolor nociceptivo: Se produce cuando hay una estimulación de los nociceptores en tejidos dañados.
- Dolor nociplástico: Debido a una alteración en la percepción del dolor en el sistema nervioso central. (Fornasari, 2012)

2.5 Dolor neuropático

El dolor neuropático se considera un tipo de dolor que afecta directamente al sistema somatosensorial y que presenta unos mecanismos muy específicos. Este dolor puede originarse tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico.

El dolor neuropático involucra procesos de sensibilización periférica, por alteración funcional de los nociceptores (como la sobreexpresión o activación anómala de canales TRP, Na_v o Ca_v), y de sensibilización central, caracterizada por una hiperactividad en las neuronas de la asta dorsal de la médula espinal y una reducción del umbral de respuesta a estímulos.(Giorgi et al., 2023)

Profundizando en la sensibilización periférica, los nociceptores se vuelven más sensibles y responden con mayor facilidad a estímulos mecánicos, térmicos o químicos. Esta hipersensibilidad está mediada por:

- Sobreexpresión o activación sostenida de canales iónicos, como los TRPV1, TRPA1, TRPM8, $\text{Na}_v1.8$, y canales de calcio tipo Ca_v .
- Alteración en la expresión génica de proteínas implicadas en la transmisión nociceptiva.
- Liberación sostenida de mediadores inflamatorios como prostaglandinas, bradicinina, o citoquinas proinflamatorias. (Huang et al., 2014)

Y en cuanto a la sensibilización central, las neuronas de la asta dorsal de la médula espinal experimentan cambios funcionales que potencian la transmisión del dolor:

- Aumento de la liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato y sustancia P.
- Pérdida de la inhibición sináptica, por disfunción de interneuronas GABAérgicas o glicinérgicas.
- Plasticidad sináptica aberrante, que genera nuevas conexiones excitatorias y facilita la cronificación del dolor.
- Glía reactiva: la activación de astrocitos y microglía contribuye a mantener un entorno inflamatorio en el SNC.(Donkelaar, 2020)

2.6 Neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN)

La neuropatía periférica inducida por la quimioterapia es un efecto secundario de la quimioterapia en la cual se produce daño en los nervios y lleva a una sensación de dolor especialmente agravada en las extremidades. (Staff et al., 2017)

En este tipo de neuropatía, los nervios más afectados suelen ser los nervios sensoriales, que son los encargados de percibir el tacto, la temperatura o el dolor. Los agentes quimioterapéuticos pueden dañar estos nervios de forma directa, lo que hace que se altere la forma en que transmiten las señales. Esta disfunción conduce a la aparición de síntomas como dolor, ardor, hormigueo o entumecimiento, con mayor frecuencia en las extremidades, especialmente en manos y pies. (Staff et al., 2017)

Además, en ciertas regiones del sistema nervioso, como los ganglios de la raíz dorsal, son más vulnerables porque no están tan protegidas como otras partes del cuerpo. En estas zonas, las neuronas pueden acumular el fármaco, lo que altera su funcionamiento fisiológico y contribuye al desarrollo de neuropatías.

Por otro lado, la quimioterapia también puede alterar ciertas proteínas de las neuronas llamadas canales iónicos, que son responsables de activar o inhibir la señal de dolor. Cuando estos canales funcionan mal, pueden enviar señales de dolor al cerebro incluso sin que exista un daño real. Esto explica por qué algunas personas con neuropatía inducida por quimioterapia sienten dolor ante estímulos muy suaves, como un simple roce, o frío en ambientes que normalmente no molestarían. (Zajackowska et al., 2019)

Todo esto contribuye a que el sistema nervioso se vuelva más sensible de lo normal, lo que hace que el dolor sea más intenso, duradero y difícil de tratar.

Los síntomas de esa neuropatía periférica dependen del tipo y gravedad del daño en los nervios, pero en general, causa dolor, hormigueo, entumecimiento, sensibilidad al tacto y temperatura, etc. (Quasthoff & Hartung, 2002)

Diversos grupos de fármacos quimioterapéuticos han sido asociados con la aparición de neuropatía periférica.

- Taxanos: Este grupo incluye fármacos como el paclitaxel y el docetaxel, que se utilizan en el tratamiento de varios tipos de cáncer como el de mama, ovario y pulmón. Su mecanismo de acción consiste en estabilizar los microtúbulos, impidiendo que se desensamblen y bloqueando así la división celular. Sin embargo,

esta acción también afecta a los microtúbulos de las neuronas, que son esenciales para el transporte interno de sustancias a lo largo del axón. Como consecuencia, se interrumpe el transporte axonal y se produce una degeneración progresiva de los nervios, especialmente en las fibras sensoriales largas. Los pacientes tratados con taxanos suelen presentar hormigueo, entumecimiento, pérdida de sensibilidad y dolor, principalmente en manos y pies.(Carr et al., 2008)

- Compuestos de platino: Entre ellos se encuentran el oxaliplatino, el cisplatino y el carboplatino. Estos fármacos se unen al ADN celular, formando enlaces cruzados que impiden la replicación de las células tumorales. En las neuronas, particularmente en las del ganglio de la raíz dorsal, esta unión con el ADN puede alterar la actividad normal de la célula y causar su disfunción. Además, el oxaliplatino se ha relacionado con alteraciones en los canales de sodio, lo que provoca síntomas como hipersensibilidad al frío. En este caso, los pacientes pueden sentir dolor o calambres al tocar objetos fríos o al exponerse a temperaturas bajas, lo cual es muy característico de este fármaco.
- Vinca alcaloides: Fármacos como la vincristina y la vinblastina pertenecen a este grupo. Su función es inhibir la polimerización de los microtúbulos, impidiendo la formación del huso mitótico durante la división celular. En las neuronas, esta acción provoca alteraciones en el transporte axonal y afecta tanto a fibras sensoriales como motoras. Por eso, además del entumecimiento o dolor, los pacientes pueden presentar debilidad muscular o pérdida de reflejos. el tiempo si no se ajusta la dosis del tratamiento.(Carr et al., 2008)

Se estima que entre el 30 y el 40 % de los pacientes tratados con quimioterapia desarrollan algún grado de neuropatía periférica durante o después del tratamiento. Sin embargo, esta cifra puede variar de forma considerable dependiendo del tipo de fármaco utilizado, la dosis administrada y la duración del tratamiento. En el caso de agentes como el paclitaxel o el oxaliplatino, la incidencia puede alcanzar hasta un 60 % o más, especialmente cuando se administran de forma cíclica.

Esta alta prevalencia convierte a la CIPN en una de las principales complicaciones no hematológicas del tratamiento oncológico. Además de afectar significativamente la calidad de vida del paciente, en muchos casos obliga a reducir la dosis, espaciar los ciclos o incluso suspender el tratamiento, lo cual compromete la eficacia terapéutica contra el cáncer.

A pesar de su impacto, la CIPN sigue siendo difícil de prevenir y tratar, lo que justifica la necesidad de seguir investigando sus mecanismos fisiopatológicos y de desarrollar modelos experimentales que permitan evaluar nuevos enfoques terapéuticos.(Carr et al., 2008)

2.6.1 Tratamientos actuales contra la CIPN

Los tratamientos actuales para combatir la neuropatía periférica inducida por la quimioterapia se centran fundamentalmente en aliviar los síntomas e intentan mejorar la calidad de vida del paciente. Los tratamientos más generales incluyen analgésicos, antidepresivos y anticonvulsivos, aunque estos no son especialmente eficaces. Sin embargo, dada la poca eficacia de los tratamientos farmacológicos, se han investigado otras áreas para tratar de mitigar esta condición. Una de ellas es la neuromodulación, la cual se basa en entrenar al cerebro para modificar su forma actual de funcionar, utilizando retroalimentación, estimulación u otras estrategias no farmacológicas. Una de las terapias de neuromodulación y que está bajo investigación es la terapia Scrambler, que consiste en la estimulación eléctrica no invasiva de fibras nerviosas periféricas sanas, con el objetivo de transmitir al cerebro señales "normales" o no dolorosas que compitan y sustituyan las señales de dolor crónico. De esta forma, el sistema nervioso es expuesto de manera repetida a información sensorial no nociva, lo que contribuye a reentrenar los circuitos cerebrales encargados de procesar el dolor y puede llevar a una reducción sostenida de la percepción dolorosa. (Kaley & Deangelis, 2009)

Además de la neuromodulación, existen otras estrategias que se están investigando para el tratamiento de la CIPN. Una de ellas es la fisioterapia y la rehabilitación neurosensorial, que pueden ayudar a mejorar la función nerviosa, la movilidad y el equilibrio en pacientes afectados.

También se están explorando tratamientos basados en nutrientes neuroprotectores, como el ácido alfa-lipoico, la vitamina B12 o la acetil-L-carnitina, aunque los resultados hasta ahora han sido mixtos y se necesitan más estudios clínicos para confirmar su eficacia.(Jeenia & Sojib, 2022)

Por otra parte, en los últimos años ha crecido el interés en el uso de la estimulación eléctrica transcutánea (TENS), técnicas de mindfulness o acupuntura, como parte de un enfoque multidisciplinar que combine intervenciones físicas, psicológicas y farmacológicas.

En todos los casos, el objetivo común es no solo reducir el dolor, sino también mejorar la funcionalidad y la calidad de vida del paciente, especialmente cuando los tratamientos farmacológicos convencionales no son suficientes.(Lu et al., 2020)

Dada la limitada eficacia de los tratamientos convencionales para la CIPN, se han abierto nuevas líneas de investigación centradas en el estudio del sistema nervioso periférico, con el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas. Entre estas estrategias, destacan aquellas que se enfocan en el papel de los canales iónicos implicados en la transmisión y modulación del dolor. En particular, se están investigando antagonistas de canales de la familia TRP (como TRPV1, TRPA1 o TRPM8), así como bloqueadores selectivos de canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), ambos con potencial para reducir la hiperexcitabilidad neuronal característica de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia.(Zheng, 2013)

Durante la CIPN, los canales TRP pueden activarse de forma anómala causando una sensación de dolor agravada como consecuencia de la acción de los quimioterapéuticos. De esta manera, intentar bloquear la actividad de estos canales es una estrategia prometedora para aliviar el dolor neuropático. Uno de los canales TRP que está más involucrado, es el TRPV1 que es activado por medio del calor y la capsaicina, y el antagonista más estudiado es la capsazepina aunque su uso clínico se ha visto limitado por efectos secundarios como la alteración de la percepción térmica. Por otro lado, está el TRPA1 que es activado por compuestos como AITC y está más asociado al dolor y al frío, uno de los antagonistas más estudiado para este canal es el HC-030031, probado en modelos animales donde ha demostrado capacidad para reducir el dolor inducido por oxaliplatino. El otro canal asociado a la CIPN es el TRPM8 que está relacionado con la percepción del frío y la alodinia al frío, pero este canal ha sido el menos estudiado y sigue en estudios preliminares. (Venkatachalam & Montell, 2007)

Adicionalmente, están los canales de sodio, particularmente Nav 1.7 y Nav 1.8 que son muy importantes en la generación y propagación del potencial de acción en las neuronas sensitivas. Estos canales, también tienen una activación anómala como ocurre con los canales TRP, esto se debe a descargas espontáneas en los nociceptores. En el caso del Nav 1.7, su inhibición ha demostrado aliviar el dolor en modelos animales, sin afectar significativamente la sensibilidad normal. Sin embargo, el Nav 1.8 es el canal que está más involucrado en cuanto al dolor crónico y la CIPN, su bloqueo reduce la respuesta al dolor sin alterar otras funciones neuronales.(Lai et al., s. f.)

2.6.2 Modelos experimentales para el estudio de la CIPN

La neuropatía periférica no solo presenta desafíos a nivel de terapia, sino también a la hora de poder investigar dicha condición, sobre todo cuando se intenta investigar en pacientes. La diferencia entre las respuestas de los pacientes a los tratamientos, la dificultad de llegar al tejido nervioso y las limitaciones éticas a la hora de investigar con humanos hace que la investigación clínica de la CIPN sea muy compleja. Por ello, se han tenido que desarrollar diferentes modelos experimentales, tanto in vitro como in vivo, para poder estudiar los mecanismos que hay detrás del desarrollo de neuropatía periférica inducida por la quimioterapia. (Lehmann et al., 2020)

El modelo experimental más común y utilizado es el modelo animal de roedores, especialmente ratones y ratas. Este modelo permite observar alteraciones en la conducta relacionada con el dolor, así como cambios estructurales en los nervios periféricos y expresión de marcadores moleculares. Además, permite replicar los efectos neurotóxicos de quimioterapéuticos como el paclitaxel y el oxaliplatino. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones, como la dificultad para aislar mecanismos celulares específicos, la complejidad del entorno fisiológico y la variabilidad interindividual, lo que puede dificultar la interpretación precisa de los resultados. (Gadgil et al., 2019)

Frente a estas limitaciones, los modelos in vitro han cobrado cada vez más relevancia. Estos modelos permiten trabajar directamente con neuronas sensitivas derivadas de ganglios de raíz dorsal (DRGs), que son las más afectadas en la CIPN. Al cultivarlas bajo condiciones controladas, es posible estudiar su respuesta funcional, la toxicidad de diferentes fármacos, así como alteraciones morfológicas o de actividad eléctrica, con mayor precisión y menor variabilidad experimental. Dentro de estos modelos in vitro, los dispositivos microfluídicos compartimentalizados representan una herramienta avanzada y muy útil. Estos sistemas permiten separar físicamente el compartimento somático del compartimento axonal, lo que ofrece la posibilidad de aplicar tratamientos de forma localizada y estudiar de forma independiente el efecto sobre cada una de las regiones neuronales. Esta compartimentalización es especialmente útil en estudios como el presente, donde el interés está en analizar cómo los quimioterápicos afectan específicamente a los axones sensoriales.

Además, estos dispositivos son compatibles con técnicas de imagen funcional y estructural, como la imagen de calcio, que permite estudiar la excitabilidad neuronal, o la microscopía confocal, que permite observar cambios morfológicos con alta resolución. En conjunto, el modelo microfluídico empleado en este estudio proporciona un entorno versátil, controlado y fisiológicamente relevante para analizar los efectos de la quimioterapia sobre los nociceptores.

No obstante, estudios previos realizados en este laboratorio han logrado mantener cultivos viables hasta 15 días *in vitro* (DIV), un periodo que resulta insuficiente para estudiar con detalle procesos como la sensibilización y la resolución de los efectos inducidos por agentes quimioterapéuticos. Por ello, en este trabajo se plantea como objetivo extender la duración de los cultivos hasta 25 DIV, lo que permite analizar con mayor profundidad tanto los efectos iniciales como los mecanismos de recuperación neuronal.

Objetivos

El trabajo de fin de máster explora los mecanismos moleculares involucrados en la sensibilización y desensibilización de nociceptores después de 2 ciclos de tratamiento (24 horas cada uno) de dos quimioterapéuticos como paclitaxel y oxaliplatino. También, se centra en estudiar la caracterización de nuevos moduladores de los canales TRP que podrían ayudar a atenuar la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN).

Los objetivos específicos son:

1. Extender la duración del cultivo neuronal hasta 25 días in vitro (DIV), con el fin de obtener un modelo más maduro y fisiológicamente representativo. Esta extensión permite estudiar no solo los efectos agudos, sino también los procesos de sensibilización progresiva y posible resolución tras la exposición a agentes quimioterapéuticos.
2. Evaluar la viabilidad de las neuronas sensitivas tras la exposición a solución salina (vehículo) y a los fármacos quimioterapéuticos, con el fin de comprobar la funcionalidad celular a largo plazo bajo condiciones experimentales controladas.
3. Analizar los efectos de paclitaxel y oxaliplatino sobre la morfología de los axones, observando si tras 25 días se produce retracción, daño o recuperación axonal, con el objetivo de identificar posibles diferencias estructurales inducidas por cada tratamiento.

Procedimiento experimental

En esta sección se describen los diferentes materiales y métodos utilizados en este proyecto. Para evaluar los efectos neurotóxicos de diferentes quimioterapéuticos como el paclitaxel y el oxaliplatino se utilizaron diferentes técnicas como la microfluídica o imagen de calcio.

Animales

Para este proyecto se utilizó la cepa de ratones C57BL/6JRccHSd tanto machos como hembras (entre 15 – 23 semanas de edad; Harlan, The Netherlands), estos animales fueron cuidados y mantenidos en condiciones estándar en el animalario de la Universidad Miguel Hernández de Elche, con un ciclo de luz de 12 horas, con luz de 8 de la mañana a ocho de la noche, con acceso libre a agua y alimento. Las condiciones estándar de estos ratones eran de $21\pm1^{\circ}\text{C}$ y $55\pm20\%$ de humedad. La experimentación animal que se llevó a cabo fue aprobada por el Comité Institucional Animal y Ético de la Universidad Miguel Hernández de Elche (2021/VSC/PEA/0089), siguiendo las bases de la Comunidad Europea (2010/63/EU) y del Comité de Ética en la Investigación de la Asociación Internacional del estudio del dolor.

Cultivo Celular de DRGs

En el cultivo celular, se utilizaron neuronas sensitivas, en este caso los ganglios de la raíz dorsal (DRGs). Se les practicó la eutanasia a los ratones mediante dislocación cervical y después decapitación. Tras la extracción de la columna vertebral, se aislaron los ganglios de la raíz dorsal (DRGs), que posteriormente se mantuvieron en medio de cultivo Neurobasal (Gibco) hasta que fueron tratados con colagenasa tipo XI (0,67 mg/mL, Sigma) y dispasa tipo II (3 mg/mL, Gibco) disuelto en una disolución INCMix (NaCl 155mM, K₂HPO₄ 1.5 mM, HEPES 5.6 nM, HEPES-Na 4.8 mM, glucosa 5 nM – Sigma) a 37°C y 5% CO₂ durante 1 hora. Una vez incubado, los DRGs fueron limpiados y añadidos a una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA, 15% p/v en PBS, Sigma). Esta solución fue centrifugada para formar el pellet y después fue diluido en medio de cultivo para centrifugarlo de nuevo. Una vez terminada la centrifuga, el exceso de medio fue retirado y el sedimento celular fue diluido en medio de cultivo

completo. Para terminar, los dispositivos de microfluídica fueron sembrados a 5 μ L de suspensión celular en el compartimento del soma en cada dispositivo. Una vez sembrados, fueron incubados a 37°C y 5% CO₂ durante 30 minutos, después 200 μ L de medio completo que contenía el factor de crecimiento nervioso murino (NGF, 25 s, 100 ng/mL, Promega) y el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial humano (hGDNF, 100 ng/mL, PeproTech) fue añadido a los dos compartimentos del soma y 100 μ L a los compartimentos de los axones. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas hasta llegar al día en vitro (DIV) 25, reduciendo la concentración de NGF y hGDNF en los compartimentos del soma a 25 ng/mL, como se detalla en la Tabla 1. En los días 5 y 10 del cultivo celular, se trataron los DRGs con 1 μ M de paclitaxel o 1 μ g/mL de oxaliplatino durante 24 horas o con un vehículo, DMSO en el caso del paclitaxel y agua destilada en el caso del oxaliplatino.

DIV	COMPARTIMENTO SOMÁTICO	COMPARTIMENTO AXONAL
DIV0	Medio de cultivo Neurobasal (Gibco) GlutaMAX (Gibco) Suplemento B27 (Gibco) Penicilina-Estreptomicina (10000 U/mL, Gibco) mNGF 25 s (Promega) – 100 ng/mL hGDNF (PeproTech) – 100 ng/mL	Medio de cultivo Neurobasal (Gibco) GlutaMAX (Gibco) Suplemento B27 (Gibco) Penicilina-Estreptomicina (10000 U/mL, Gibco) mNGF 25 s (Promega) – 100 ng/mL hGDNF (PeproTech) – 100 ng/mL
Cada 48h	Medio de cultivo Neurobasal (Gibco) GlutaMAX (Gibco) Suplemento B27 (Gibco) Penicilina-Estreptomicina (10000 U/mL, Gibco) mNGF 25 s (Promega) – 25 ng/mL hGDNF (PeproTech) – 25 ng/mL Uridina (Sigma) – 17,5 µg/mL 5-fluoro-2'-desoxiuridina (Sigma) – 7,5 µg/mL	Medio de cultivo Neurobasal (Gibco) GlutaMAX (Gibco) Suplemento B27 (Gibco) Penicilina-Estreptomicina (10000 U/mL, Gibco) mNGF 25 s (Promega) – 100 ng/mL hGDNF (PeproTech) – 100 ng/mL Uridina (Sigma) – 17,5 µg/mL 5-fluoro-2'-desoxiuridina (Sigma) – 7,5 µg/mL

Tabla 1. Composición del medio durante los días in vitro (DIV). La concentración de NGF y GDNF en el compartimento somático disminuye de 100 ng/mL en DIV0 a 25 ng/mL en DIV3 con el fin de establecer un gradiente de neurotrofinas que favorezca el crecimiento axonal.

Microfluídica

Para este estudio se utilizaron sistemas de microfluídica comerciales de doble compartimento (Axon Investigation System, AX150 design) diseñados para el cultivo compartimentalizado de neuronas (Figura 4). Estos dispositivos presentan dos cámaras proximales (soma) y dos cámaras distales (axones) de 8 mm de diámetro cada uno, y dos micro canales de 1.5 mm de largo interconectados por 120 micro canales finos, que permite el crecimiento de axones hacia las cámaras distales, y mantiene los somas restringidos en las cámaras proximales. Esta técnica es clave para estudiar los efectos locales de tratamientos farmacológicos y respuestas funcionales específicas de axones. Antes de su utilización, los cristales de 24 mm × 60 mm se irradiaron con luz ultravioleta durante 30 minutos por cada

lado para garantizar su esterilización. Paralelamente, los dispositivos de microfluídica fueron desinfectados con etanol al 70 % durante 5 minutos, seguidos de tres lavados con agua ultrapura estéril y posterior secado en una cabina estéril.

Los cristales se recubrieron con poli-D-lisina al 0,01 % (Sigma) e incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron tres veces con agua ultrapura estéril y se dejaron secar completamente. A continuación, los dispositivos microfluídicos se adhirieron a los cristales con los canales orientados hacia abajo, asegurando un contacto firme y homogéneo.

Finalmente, un día antes de la siembra celular, se aplicó laminina a una concentración de 20 µg/mL disuelta en PBS: 200 µL en los compartimentos somáticos y 100 µL en los compartimentos axonales. Este recubrimiento favorece la adhesión neuronal y promueve el crecimiento y la orientación axonal. Diferentes imágenes fueron tomadas usando el microscopio confocal LSM900 con Airyscan 2, usando el objetico 20x. Para ello se añadió calceína-AM a las neuronas, un fluoróforo que atraviesa la membrana celular en células vivas y, una vez dentro, es hidrolizado por esterasa intracelular en su forma fluorescente activa (calceína). Esto permite visualizar neuronas viables bajo el microscopio confocal, ya que solo las células con metabolismo activo retienen el colorante. Así, se obtuvo información sobre la morfología axonal y la viabilidad celular tras los tratamientos.

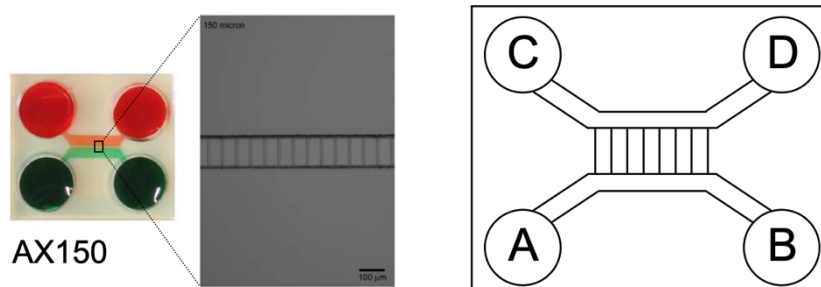


Figura 4. Dispositivo microfluídico para cultivo compartimentalizado de neuronas (Axon Investigation System, AX150). A y B muestran los compartimentos de los axones, C y D muestran los compartimentos del soma, permitiendo el crecimiento direccional de los axones a través de microcanales de 150 µm de longitud. Tomado de Giorgi et al, 2023.

Imagen de calcio

Las medidas funcionales fueron realizadas mediante la técnica de imagen de calcio, ya que permite estudiar la actividad funcional de las neuronas sensitivas, en este caso de los DRGs, mediante la detección de cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Para ello, se utilizó el compuesto fluorescente Fluo4-AM (F14201, Thermo Fisher Scientific), que emite fluorescencia en respuesta a un aumento del calcio citosólico. Para facilitar su incorporación en las neuronas, se disolvió en presencia de ácido plurónico al 0,02 % p/v (Molecular Probes, Invitrogen). Las células fueron incubadas con tampón de carga que contenía 6 mg/mL de Fluo4-AM y 0,2% de ácido plutónico disuelto en HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) (NaCl 140 mM, KCl 4mM, CaCl_2 1.8 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 10 mM y glucosa-D 5 mM), durante 1 hora. Después de la incubación, se removió el exceso de fluoróforo y se lavó las células con HBSS. Para la imagen de calcio se utilizó el microscopio invertido (Axiovert 200/B, ZEISS), equipado con la cámara Hamamatsu Flash 4.0 LT (C11440-42U30, Hamamatsu, Sunayama-cho, Japan). Las regiones de interés fueron seleccionadas de manera manual y las imágenes fueron tomadas cada 3 segundos. Durante el análisis, se aplicaron diferentes estímulos como la capsaicina, agonista del canal TRPV1, mentol, agonista del canal TRPM8, y AITC, agonista del canal TRPA1. Estos estímulos fueron aplicados con el objetivo de evaluar a funcionalidad de los canales iónicos de la familia TRP expresados en las neuronas sensitivas. Lo que permitió comprobar la viabilidad funcional de las neuronas tras la exposición a los tratamientos quimioterapéuticos, midiendo su capacidad de respuesta mediante el aumento de fluorescencia asociado a la entrada de Ca^{2+} intracelular. Los experimentos fueron llevados a cabo a 22-26°C. Los resultados fueron normalizados para poder ser comparados. Para ello, fueron normalizados por el control positivo en cada uno de los experimentos. Se consideraron respuestas positivas si el aumento de fluorescencia era superior a 0,2 unidades arbitrarias, el tamaño de las señales de calcio fue calculado midiendo los valores máximos después de aplicar el estímulo menos los valores de fluorescencia en estado basal. Los estímulos disueltos en HBSS fueron aplicados durante un periodo de 300 segundos entre ellos para asegurarse de que los niveles de fluorescencia volvían a su estado basal antes de aplicar el siguiente estímulo. Una vez aplicados los tres estímulos, se añadió KCl (cloruro potásico) en el compartimento de los axones para evaluar la integridad funcional de los axones y confirmar

que estos pueden despolarizarse y general una respuesta, más tarde, se añadió también KCl en el compartimento del soma para evaluar la viabilidad y funcionalidad de as neuronas.

El análisis se realizó evaluando: El porcentaje de neuronas que respondieron, normalizado frente a la respuesta obtenida con KCl, la amplitud de la respuesta relativa al control positivo y el área de las células respondedoras.

Se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1:

$$\Delta F = \text{MAX}(\Delta F_{\text{post-estímulo}}) - \text{MEAN}(\Delta F_{\text{pre-estímulo}})$$

El cambio en la fluorescencia (ΔF) se definió como la diferencia entre la intensidad máxima registrada tras la aplicación del estímulo y la media de la señal basal antes del estímulo.

Ecuación 2:

$$\Delta F_{\text{ajustado}} = \Delta F - [\text{DE}(\text{señal basal}) \times 10]$$

Para corregir el ruido, se restó a ΔF diez veces la desviación estándar (DE) de la señal antes del estímulo. Si el valor obtenido era mayor que cero, se consideraba una respuesta positiva.

Ecuación 3:

$$\text{Tamaño de la respuesta} = \Delta F_{\text{estímulo}} / \Delta F_{\text{KCl}}$$

La amplitud de la respuesta inducida por el estímulo se expresó como fracción del valor máximo de fluorescencia inducido por KCl.

Materiales

Compuesto	Proveedor (Referencia)	Disolvente	Concentración Stock	Concentración Final	Aplicación
Paclitaxel	Taxol®, Tocris Bioscience (Bristol, UK)	DMSO	25 nM	1 μ M	Tratamiento en compartimento axonal

Oxaliplatino	Tocris Bioscience (Bristol, UK)	Agua destilada	1 µg/mL	1 µg/mL	Tratamiento en compartimento axonal
Capsaicina	Sigma (St. Louis, MO, USA)	DMSO	10 mM	0,2 µM	Estímulo para <i>imagen de calcio</i> (TRPV1)
AITC	Sigma (St. Louis, MO, USA)	DMSO	10 mM	100 µM	Estímulo para <i>imagen de calcio</i> (TRPA1)
Mentol	Sigma (St. Louis, MO, USA)	DMSO	10 mM	100 µM	Estímulo para <i>imagen de calcio</i> (TRPM8)

Tabla 2. Compuestos utilizados durante el estudio

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó usando GraphPad Prism® 8.0.0. Las variables cuantitativas fueron evaluadas para comprobar si seguían una distribución normal mediante el test de D'Agostino-Pearson. Los datos con distribución normal se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante pruebas t no apareadas cuando fue apropiado.

Dada la heterogeneidad de las neuronas de los DRG y las limitaciones en el tamaño muestral, el análisis estadístico se restringió a grupos definidos por tratamiento y sexo. Los datos paramétricos se analizaron mediante ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post hoc de Tukey. En cambio, los datos no paramétricos fueron evaluados con el test de Kruskal–Wallis, seguido de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

Los datos sin distribución normal se expresan como mediana (rango intercuartílico, Q25–Q75) y se analizaron con la prueba de Mann–Whitney. En todos los casos, se consideró significativa una $P < 0,05$.

Resultados

1. Evaluación del cultivo neuronal a largo plazo (hasta 25 días *in vitro* (DIV))

Con el objetivo de comprobar si las neuronas sensitivas derivadas de ganglios de raíz dorsal (DRGs) pueden mantenerse viables en cultivo durante 25 días, se llevaron a cabo cultivos prolongados bajo condiciones controladas (Figura 5). Este paso resulta esencial para establecer un modelo *in vitro* que permita simular de forma más realista los tratamientos quimioterapéuticos aplicados *in vivo*, los cuales suelen implicar exposiciones repetidas a lo largo del tiempo.

En estudios previos, como el realizado por Lamberti et al. (en revisión en FEBS Journal), se analizó el efecto del paclitaxel en cultivos de DRGs durante un periodo de 15 días. En el presente trabajo de fin de máster, se decidió extender la duración del cultivo hasta 25 días para evaluar la viabilidad celular a más largo plazo. Además, se incorporó por primera vez el análisis del efecto del oxaliplatino bajo las mismas condiciones experimentales, con el objetivo de ampliar la comparativa entre distintos agentes neurotóxicos.

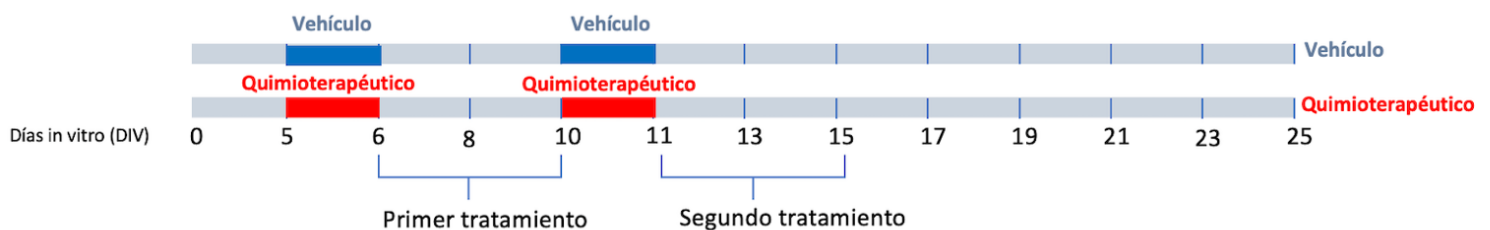


Figura 5. Esquema del protocolo de tratamiento *in vitro* con quimioterapéuticos (DIV 25).

Para ello, se llevó a cabo un experimento con una duración de 22 días *in vitro* (DIV 22). En ese momento, se aplicó cloruro potásico (KCl) tanto en el compartimento somático como en el compartimento axonal, con el fin de comprobar si las neuronas respondían al estímulo y, por tanto, seguían vivas y funcionales.

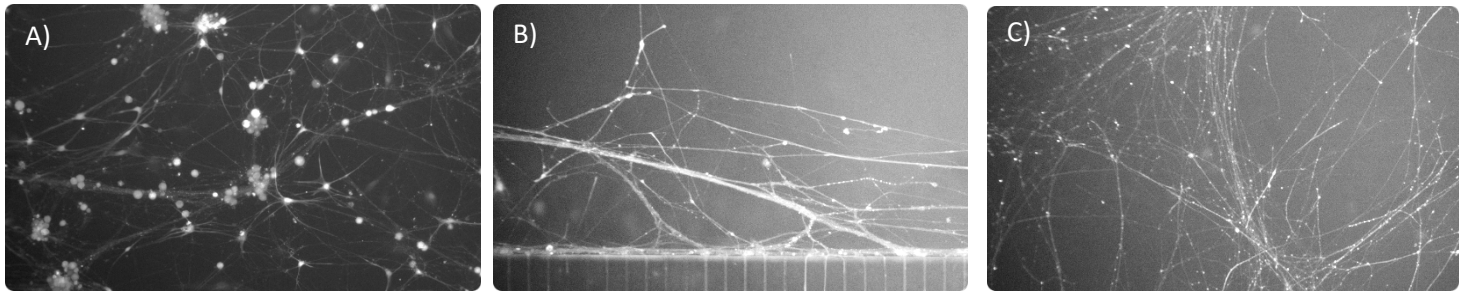


Figura 6. Imágenes representativas de células tratadas con paclitaxel y vehículo en el día 22 de cultivo. A) Compartimento somático. B) Compartimento axonal tratado con paclitaxel (1 μ M). C) Compartimento axonal tratado con vehículo.

La Figura 6A muestra la zona correspondiente al compartimento somático, donde se observa una alta densidad de cuerpos celulares y un patrón claro de ramificación neuronal. Por su parte, la Figura 6B representa los axones del compartimento axonal tratados con paclitaxel. Finalmente, la Figura 6C muestra los axones del grupo control tratado con vehículo.

2. Viabilidad de las neuronas sensitivas tras la exposición a solución salina y a los fármacos quimioterapéuticos

Paclitaxel

Para ello, se aplicaron dos ciclos de paclitaxel a 1 μ M durante 24 horas, seguidos de un periodo de recuperación de 96 horas (Figura 5). Se evaluó el efecto del paclitaxel en la actividad de los canales TRP, particularmente en los canales TRPV1, TRPM8 y TRPA1, ya que estos canales están estrechamente implicados en la aparición de la CIPN. Para analizar la funcionalidad de los nociceptores tras el tratamiento, se llevó a cabo un ensayo de imagen de calcio mediante la aplicación de distintos estímulos: AITC (agonista de TRPA1), mentol (TRPM8), capsaicina (TRPV1) y KCl (tanto en el compartimento somático como en el axonal) para comprobar la viabilidad neuronal.

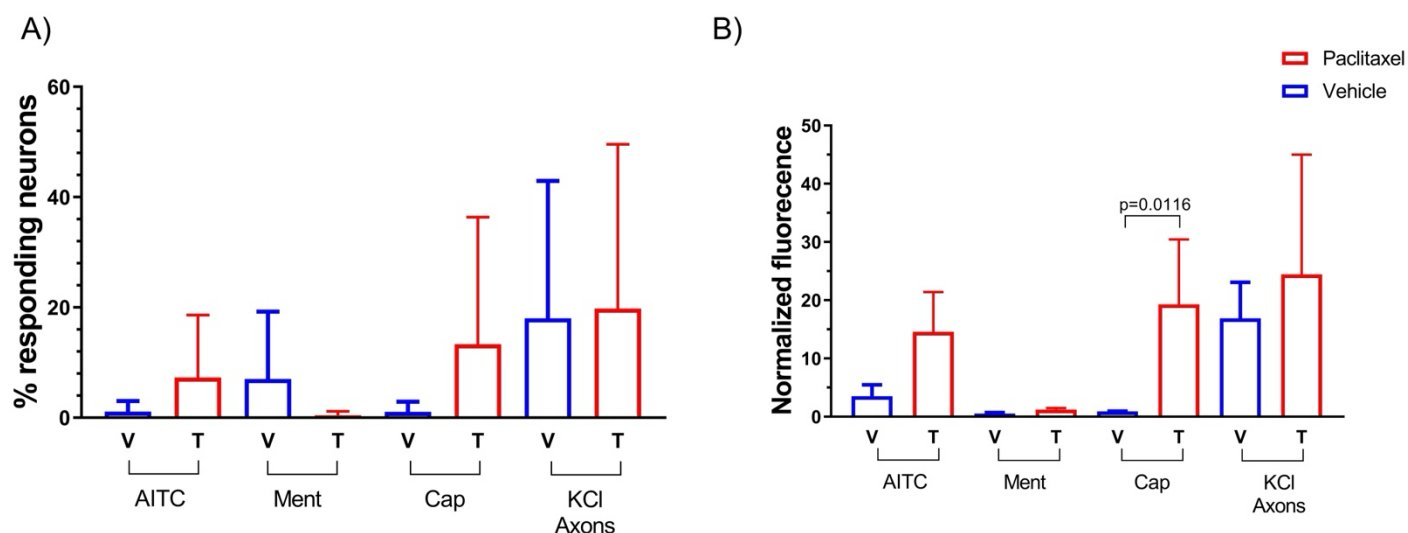


Figura 7. Respuesta funcional de neuronas tratadas con paclitaxel frente a distintos estímulos. A) Porcentaje de neuronas que respondieron a AITC 100 μ M (TRPA1), mentol 100 μ M (TRPM8), capsaicina 0,2 μ M (TRPV1) y KCl aplicado en compartimentos axonal. B) Fluorescencia normalizada como medida de la intensidad de respuesta frente a los mismos estímulos. Los datos se representan como columnas de media \pm error estándar de la media (SEM). N = 3 experimentos independientes, n \geq 6 dispositivos de microfluídica utilizados en cada experimento ROI: 100 – 150. ***p \leq 0.0005; **p \leq 0.005; *p \leq 0.01. Mann-Whitney test.

La Figura 7 muestra los resultados del análisis de la actividad funcional en neuronas sensitivas tras el tratamiento con paclitaxel (T, en rojo) en comparación con su vehículo (V, en azul), mediante la técnica de imagen de calcio.

En el panel A, se representa el porcentaje de neuronas que respondieron a la aplicación de diferentes estímulos: AITC (activador de TRPA1), mentol (TRPM8), capsaicina (TRPV1) y KCl (despolarización). En términos generales, el porcentaje de neuronas que respondieron fue bajo para todos los estímulos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control. No obstante, se aprecia una ligera tendencia a un mayor porcentaje de respuesta en el grupo tratado con paclitaxel, especialmente frente a AITC y capsaicina, aunque con una gran variabilidad entre muestras.

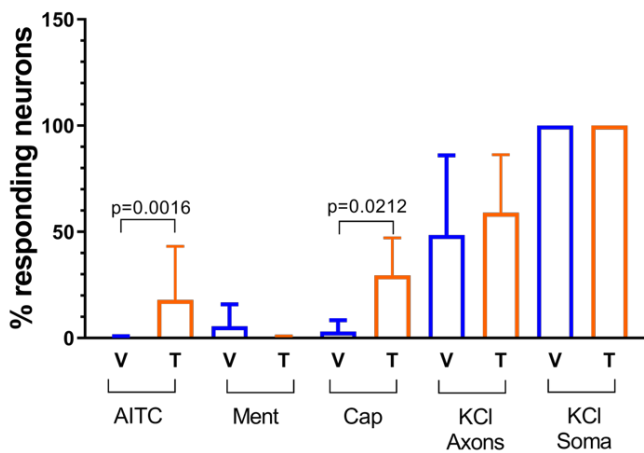
El panel B muestra la intensidad de las respuestas de calcio, expresada como fluorescencia normalizada. En este caso, la señal inducida por capsaicina fue significativamente mayor en las neuronas tratadas con paclitaxel en comparación con las del grupo vehículo (*p < 0,0116), lo que sugiere una mayor sensibilidad o activación de los canales TRPV1 tras la exposición al fármaco. En el caso del AITC y mentol, no se observaron diferencias significativas entre ambos

grupos. Finalmente, la respuesta al KCl fue elevada en ambos casos, lo que indica que las neuronas conservaban su viabilidad y capacidad funcional básica a pesar del tratamiento.

Oxaliplatino

Para ello, se aplicaron dos ciclos de oxaliplatino (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas, seguidos de un periodo de recuperación de 96 horas, utilizando el mismo protocolo descrito previamente (Figura 5). Se evaluó el efecto del oxaliplatino en la actividad de los canales TRP, particularmente en los canales TRPV1, TRPM8 y TRPA1, ya que están estrechamente implicados en el desarrollo de la CIPN. Para analizar la funcionalidad de los nociceptores tras el tratamiento, se llevó a cabo un ensayo de imagen de calcio mediante la aplicación de distintos estímulos: AITC (agonista de TRPA1), mentol (TRPM8), capsaicina (TRPV1) y KCl (tanto en el compartimento somático como en el axonal) para comprobar la viabilidad neuronal.

A)



B)

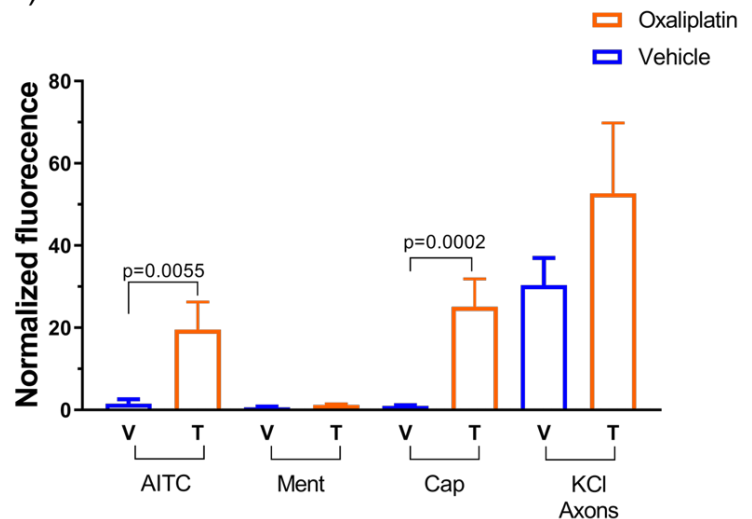


Figura 8. Respuesta funcional de neuronas tratadas con oxaliplatino frente a distintos estímulos. A) Porcentaje de neuronas que respondieron a AITC 100 μM (TRPA1), mentol 100 μM (TRPM8), capsaicina 0,2 μM (TRPV1) y KCl aplicado en compartimentos axonal y somático. B) Fluorescencia normalizada como medida de la intensidad de respuesta frente a los mismos estímulos. Los datos se representan como columnas de media \pm error estándar de la media (SEM). N = 3 experimentos independientes, $n \geq 6$ dispositivos de microfluídica utilizados en cada experimento. N = 3 experimentos independientes, $n \geq 6$ dispositivos de microfluídica utilizados, ROI: 100 – 150. *** $p \leq 0.0005$; ** $p \leq 0.005$; * $p \leq 0.01$. Mann-Whitney test.

La Figura 8 recoge los resultados obtenidos en cultivos de neuronas sensitivas tratadas con oxaliplatino (T, barras rojas) o con su vehículo (V, barras azules), analizados mediante imagen de calcio. El panel A muestra el porcentaje de neuronas que respondieron a cada estímulo aplicado: AITC (TRPA1), mentol (TRPM8), capsaicina (TRPV1), y KCl aplicado en axones y somas como control positivo. El panel B, por su parte, representa la magnitud de las respuestas de calcio intracelular (fluorescencia normalizada) inducidas por los mismos estímulos.

En cuanto al estímulo con AITC, se observa un incremento notable y significativo tanto en el porcentaje de neuronas que respondieron ($p < 0,01$) como en la intensidad de la señal de calcio ($p < 0,01$) en el grupo tratado con oxaliplatino. Esto sugiere una activación aumentada del canal TRPA1 tras el tratamiento. En el caso de la capsaicina, también se aprecia una diferencia significativa: el número de neuronas respondedoras fue mayor en el grupo tratado ($p < 0,05$) y la señal de calcio intracelular fue significativamente más intensa ($p < 0,0002$), lo que indica una posible sensibilización de los canales TRPV1.

Por el contrario, el estímulo con mentol produjo una baja respuesta en ambos grupos, sin diferencias estadísticamente significativas ni en el porcentaje de neuronas activadas ni en la magnitud de la señal, lo que sugiere que el canal TRPM8 no se ve alterado de forma apreciable por el oxaliplatino en estas condiciones.

Finalmente, la aplicación de KCl en ambos compartimentos (axonal y somático) produjo una activación robusta en todos los cultivos, sin diferencias entre el grupo tratado y el vehículo. La fluorescencia normalizada en respuesta al KCl fue elevada en ambos casos, lo que confirma la viabilidad funcional de las neuronas tras el tratamiento.

3. Efectos de paclitaxel y oxaliplatino sobre la morfología de los axones.

Paclitaxel

Además de los cambios funcionales observados, se analizó también el efecto estructural de los tratamientos sobre los axones sensoriales.

En un estudio previo realizado en este mismo laboratorio, se llevó a cabo un análisis de la morfología axonal tras tratamiento con paclitaxel durante cultivos de 15 días *in vitro* (DIV15). Las imágenes obtenidas a los días 10, 11, 13 y 15 (Figura 9) post-siembrá muestran una progresiva retracción de los axones en las condiciones tratadas con paclitaxel, en comparación con los controles tratados con vehículo, donde la red axonal se mantiene estable y densa. Estas observaciones evidencian un deterioro estructural acumulativo a lo largo del tiempo tras la exposición al fármaco.

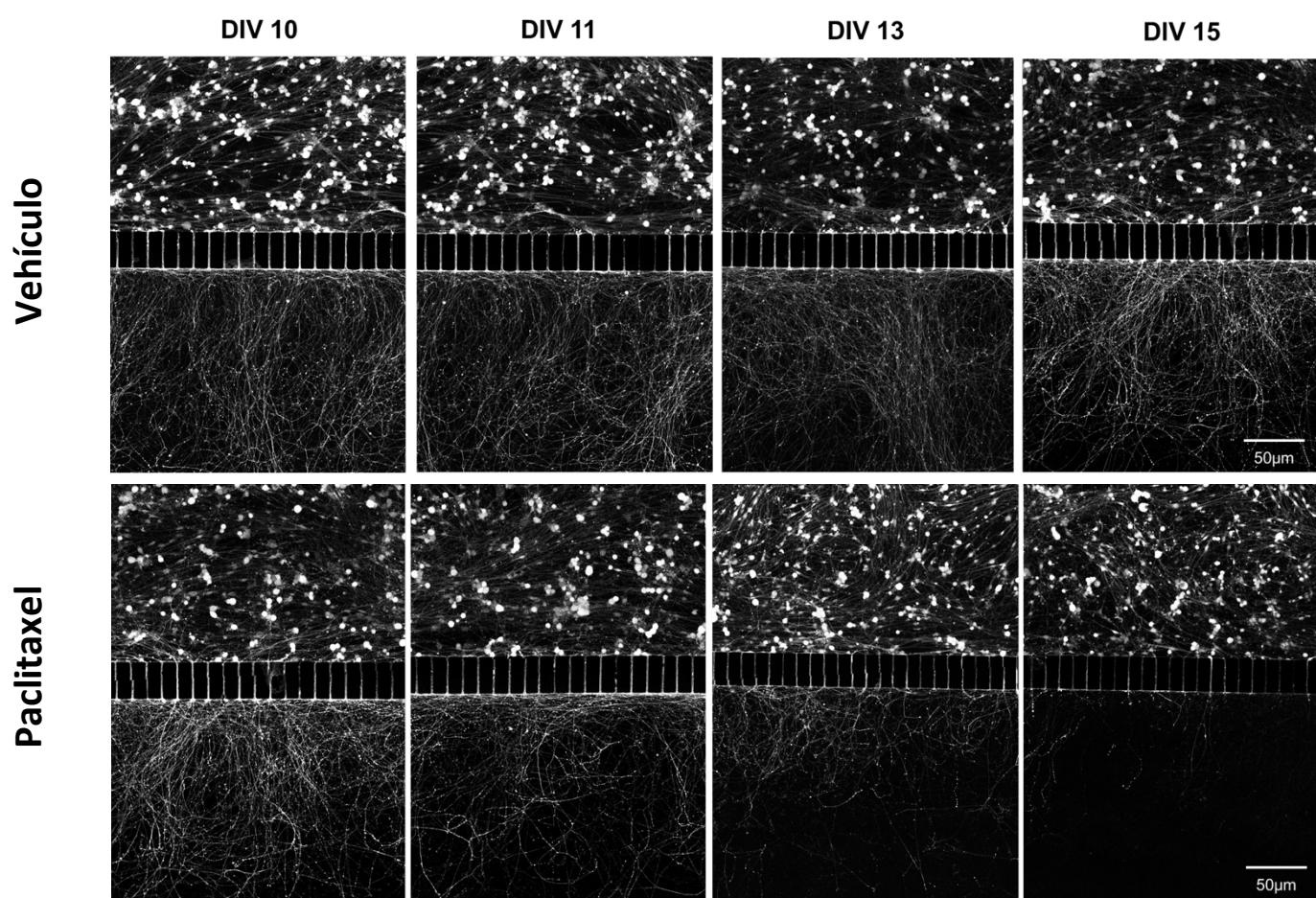


Figura 9. Evolución de la morfología axonal tras tratamiento con paclitaxel en cultivos de DRGs hasta DIV15. Recuperado de Lamberti et al, en revisión en FEBS Journal.

A partir de estos hallazgos, en este trabajo se decidió extender el análisis morfológico hasta DIV25 para evaluar si la retracción axonal observada se mantiene, se revierte o se intensifica con una exposición más prolongada.

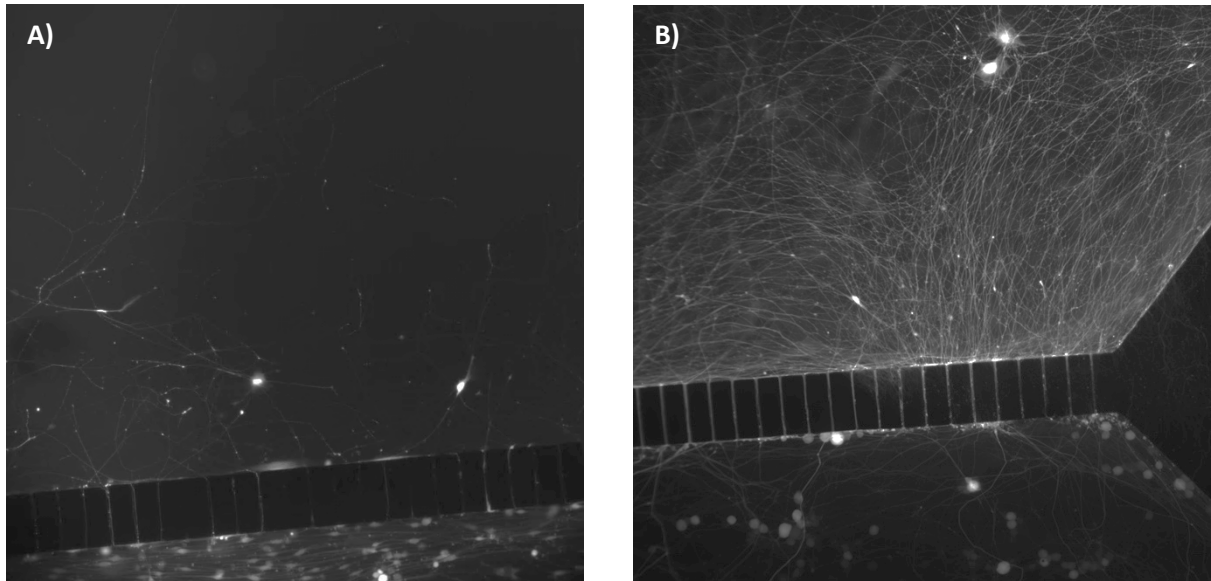


Figura 10. Comparación de la morfología axonal tras A) tratamiento con paclitaxel y B) tratamiento con vehículo a DIV 25.

La Figura 10 muestra imágenes representativas del compartimento axonal obtenidas mediante microscopía de fluorescencia tras 25 días de cultivo. A la izquierda se observa el estado de los axones en una cámara tratada con paclitaxel, mientras que a la derecha se muestra una cámara tratada con su correspondiente vehículo.

En la imagen correspondiente al tratamiento con paclitaxel se aprecia una notable reducción en la densidad y longitud de los axones, con proyecciones más escasas, finas y menos organizadas. Por el contrario, en la imagen del grupo vehículo se observan numerosos axones bien definidos que cruzan el microcanal, formando una red densa y estructurada. Esta diferencia sugiere una menor extensión axonal en las condiciones tratadas con paclitaxel, en comparación con el control.

Oxaliplatino

En el caso del oxaliplatino, se dispone también de datos previos obtenidos en este mismo laboratorio utilizando cultivos mantenidos hasta DIV15, donde se evaluó la morfología axonal tras el tratamiento.

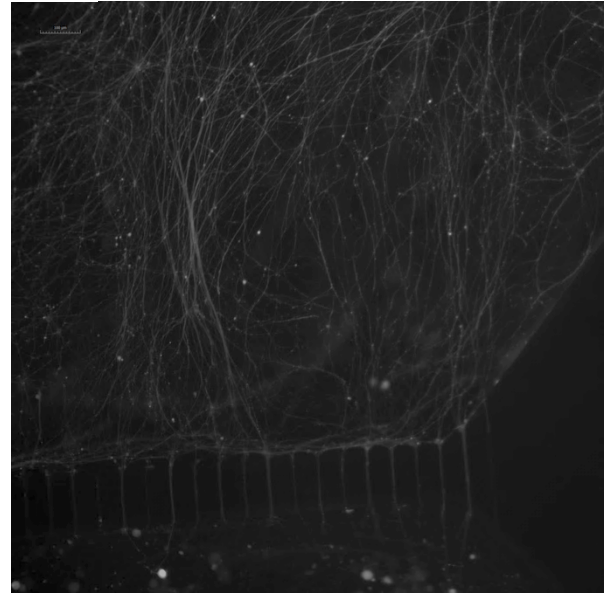
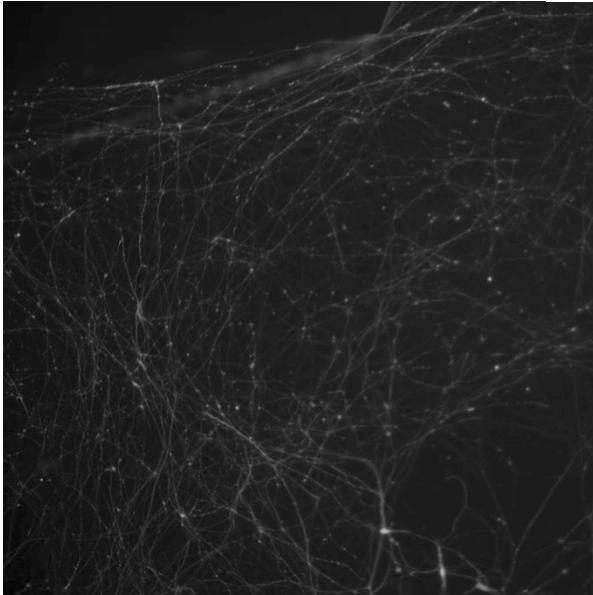
La figura 11, muestra comparaciones representativas de la morfología axonal en cultivos de DRGs tratados con oxaliplatino frente a su vehículo.

En la fila superior se presentan dos imágenes correspondientes al grupo vehículo. Se observa una red densa y bien organizada de axones que se extienden uniformemente desde el compartimento somático a través de los microcanales hacia el compartimento axonal, lo que indica una buena preservación estructural de las proyecciones neurales.

En la fila inferior, las imágenes muestran el grupo tratado con oxaliplatino. De forma similar al control, se mantiene una abundante arborización axonal sin signos evidentes de retracción ni desorganización. La densidad y distribución de las fibras axonales son comparables a las del grupo vehículo, lo que sugiere que el tratamiento con oxaliplatino no induce una pérdida estructural significativa en las condiciones analizadas.

DIV 15

Vehículo



Oxaliplatino

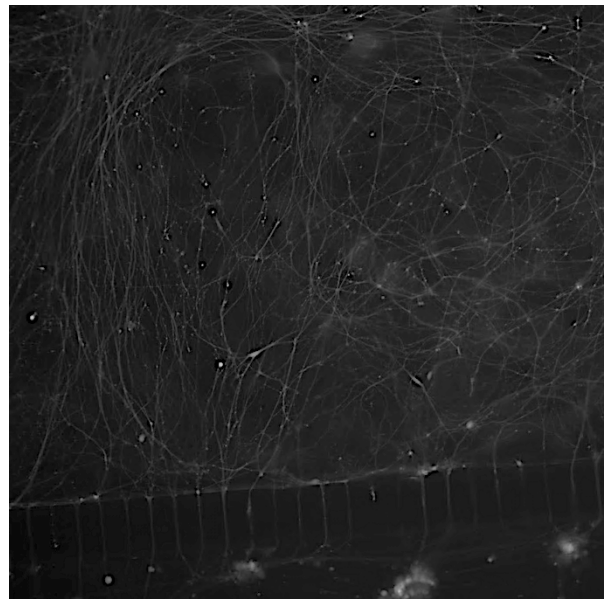
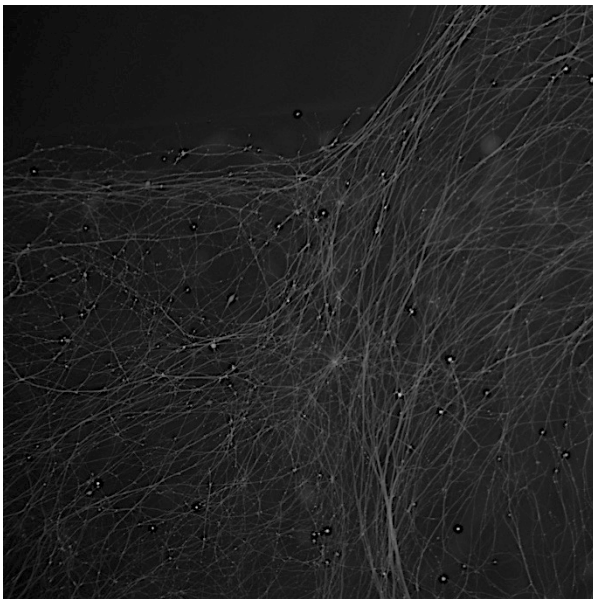


Figura 11. Morfología axonal tras tratamiento con oxaliplatino en cultivos de DRGs a DIV15.

Con el objetivo de ampliar este análisis, en el presente trabajo se prolongó el cultivo hasta DIV25, incorporando imágenes adicionales que permiten valorar si el mantenimiento axonal observado a DIV15 se conserva en un periodo más prolongado.

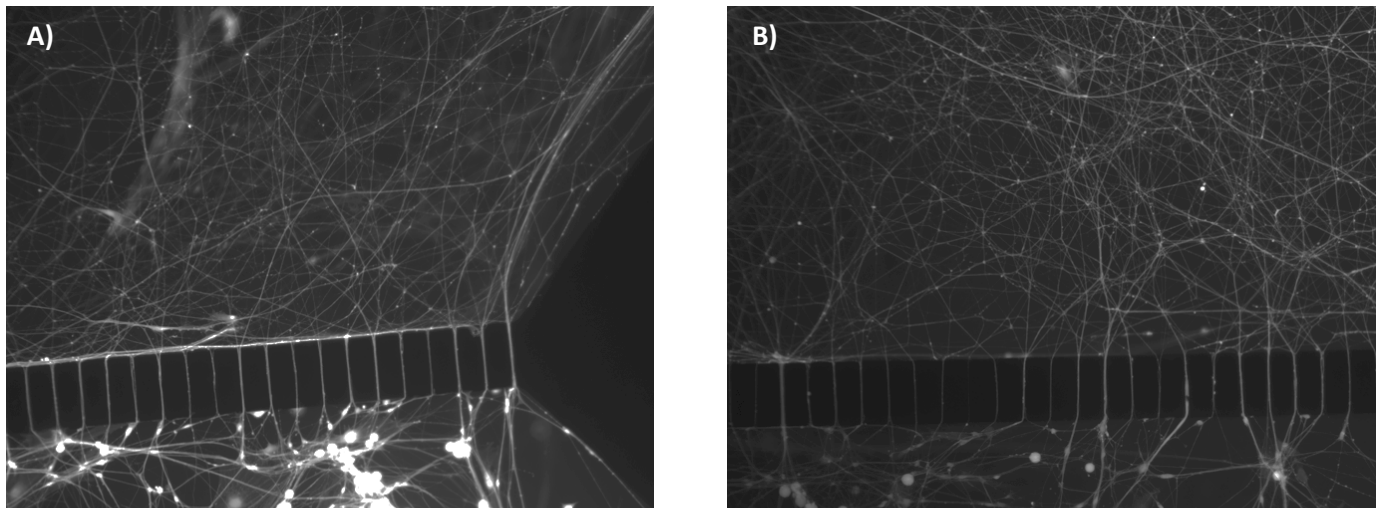


Figura 12. Comparación de la morfología axonal tras A) tratamiento con oxaliplatino y B) tratamiento con vehículo a DIV 25.

La Figura 12 muestra dos imágenes correspondientes al grupo tratado con oxaliplatino (izquierda) y su vehículo (derecha). En ambos casos se observa una extensa red de axones atravesando los microcanales del dispositivo microfluídico.

En la condición tratada con oxaliplatino, los axones presentan una morfología conservada, con fibras delgadas, pero bien definidas y distribuidas a lo largo del compartimento. De forma similar, en el grupo vehículo se aprecia una red axonal densa y continua, sin signos evidentes de interrupción o retracción.

Estas observaciones sugieren que, bajo estas condiciones experimentales, el tratamiento con oxaliplatino no provoca una alteración visible en la estructura axonal en comparación con el control.

Discusión

Este proyecto tiene como objetivo estudiar los efectos de dos quimioterapéuticos como paclitaxel y oxaliplatino en nociceptores sensoriales como son las DRGs, utilizando un modelo in vitro microfluídico compartimentalizado. A través de este modelo se analizaron tanto aspectos de viabilidad neuronal y morfología axonal, como la actividad funcional de canales iónicos tipo TRP mediante la técnica de imagen de calcio. La interpretación de los resultados obtenidos permite comprender mejor cómo estos fármacos afectan la funcionalidad de los nociceptores y su posible implicación en la fisiopatología de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN). A continuación, se discuten los hallazgos experimentales en relación con estudios previos, destacando la utilidad del modelo empleado y las posibles implicaciones terapéuticas.

Uno de los primeros objetivos de este estudio era evaluar si las DRGs podían mantenerse viables y funcionales con un cultivo de 25 días, ya que los estudios previos en el laboratorio se limitaban a un cultivo de 15 días, por lo que los primeros experimentos se centraron en evaluar el cultivo a más largo plazo. Como control de funcionalidad neuronal se utilizó el cloruro potásico (KCl) en el compartimento axonal y somático, se pudo ver que las células estaban funcionales al cabo del día 22. Con esto, se pudo establecer que se podía empezar a realizar los experimentos con el protocolo de 25 días.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento con paclitaxel muestran ciertas particularidades que merecen ser discutidas con detenimiento. Aunque no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de neuronas que respondieron a los distintos estímulos, sí se apreció una tendencia al aumento de la respuesta frente a AITC (TRPA1) en el grupo tratado, así como un incremento significativo en la magnitud de la señal inducida por capsaicina (TRPV1) ($p < 0,05$), en comparación con el grupo vehículo.

En estudios anteriores realizados a DIV 15 (Lamberti et al. (en revisión)), se había observado una alteración más clara en la respuesta a mentol (TRPM8), mientras que, en este estudio, con un cultivo más largo de 25 días, la tendencia se desplazó hacia una mayor reactividad frente a TRPA1. Este cambio puede estar relacionado con el estrés oxidativo acumulado a lo largo del tiempo en cultivo, ya que el canal TRPA1 es altamente sensible a

especies reactivas de oxígeno y se ha vinculado en diversos estudios con mecanismos de daño oxidativo en neuropatía periférica inducida por quimioterapia.

Por otro lado, es importante destacar una limitación técnica relevante en este experimento: muchas de las cámaras tratadas con paclitaxel no presentaban axones o tenían una cantidad muy reducida, lo que dificultó el registro de respuestas y redujo el número de datos disponibles para el análisis. Esta observación concuerda con lo descrito en la literatura, donde el paclitaxel se ha asociado frecuentemente con fenómenos de retracción axonal, lo cual podría explicar la escasa presencia de fibras en varios compartimentos axonales y, por tanto, la limitada respuesta global observada.

A pesar de esta restricción, los resultados sugieren que el paclitaxel podría inducir alteraciones funcionales en canales como TRPV1 y posiblemente TRPA1, aunque el bajo número de células analizadas en algunas condiciones hace que estas observaciones deban interpretarse con cautela. En conjunto, estos datos refuerzan la idea de que la CIPN inducida por paclitaxel no solo implica mecanismos de degeneración axonal, sino también una posible modulación funcional de canales iónicos implicados en la transducción nociceptiva, cuya expresión o sensibilidad puede depender del tiempo de exposición y del entorno del cultivo.

Una vez confirmada la viabilidad funcional del modelo, se procedió a evaluar la actividad de canales TRP en respuesta al tratamiento con oxaliplatino, uno de los quimioterapéuticos más asociados a neuropatía periférica en pacientes. Para ello, se aplicaron diferentes agonistas específicos (AITC, mentol y capsaicina), que activan los canales TRPA1, TRPM8 y TRPV1, respectivamente, además de KCl como control de viabilidad.

Los resultados obtenidos muestran diferencias claras en la respuesta funcional de las neuronas sensitivas tratadas con oxaliplatino frente a las del grupo control. Aunque el porcentaje de neuronas que respondieron al mentol y a la capsaicina fue bajo y no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, se observó un incremento notable en el número de neuronas que respondieron al AITC (agonista de TRPA1) en la condición tratada. Este aumento fue además acompañado por una mayor intensidad de la señal de calcio ($p < 0,01$), lo que indica una sensibilización funcional de las neuronas mediada por TRPA1 tras la exposición al quimioterapéutico.

También se detectó una diferencia significativa en la amplitud de la señal inducida por capsaicina ($p < 0,001$) en el grupo tratado, lo que sugiere una posible potenciación funcional del canal TRPV1, a pesar de que el número de neuronas que respondieron no varió de forma significativa. Estos resultados coinciden con estudios previos que han relacionado la activación anómala de canales TRP con fenómenos de alodinia y dolor neuropático en modelos de CIPN. (Villalba-Riquelme et al., 2025) Además, los datos aquí presentados son consistentes con estudios anteriores realizados en el mismo laboratorio utilizando cultivos a DIV 15, donde se observaron patrones similares de aumento en la reactividad frente a agonistas de TRP tras tratamiento con oxaliplatino. (Villalba-Riquelme et al., 2025)

Por otro lado, la aplicación de KCl tanto en el compartimento axonal como somático provocó respuestas robustas y similares en ambos grupos, confirmando que las neuronas se mantenían viables y funcionales tras el tratamiento. Esto refuerza la idea de que los efectos observados sobre los canales TRP no se deben a una pérdida de viabilidad neuronal, sino a una alteración funcional específica.

En conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el oxaliplatino induce una sensibilización de determinados canales iónicos, como TRPA1 y TRPV1, sin provocar neurodegeneración evidente. Esto es consistente con un mecanismo de hipersensibilización periférica, donde los nociceptores responden de forma exagerada a estímulos normalmente inofensivos, contribuyendo al desarrollo de la sintomatología característica de la neuropatía inducida por quimioterapia.

Las diferencias observadas en la morfología axonal tras el tratamiento con paclitaxel y oxaliplatino refuerzan la idea de que estos agentes quimioterapéuticos actúan mediante mecanismos neurotóxicos distintos. En las imágenes obtenidas, el paclitaxel mostró una clara retracción axonal, con una notable disminución del número y longitud de las fibras en comparación con el vehículo. Esta alteración estructural puede atribuirse a la propia naturaleza del paclitaxel, ya que su mecanismo de acción se basa en la estabilización anormal de los microtúbulos, impidiendo su despolimerización. Aunque este efecto es útil para frenar la división de células tumorales, en las neuronas —particularmente en los axones, que dependen críticamente del transporte axoplásmico mediado por microtúbulos— provoca disfunción y degeneración. Además, se ha descrito que el paclitaxel puede generar

alteraciones mitocondriales, estrés oxidativo y desorganización del citoesqueleto, lo cual contribuiría aún más al daño axonal y a la imposibilidad de regeneración durante el cultivo.

Por el contrario, las neuronas tratadas con oxaliplatino no presentaron signos evidentes de retracción axonal en las imágenes analizadas, y mostraron una densidad de fibras comparable a la del grupo control. Esto se debe a que el oxaliplatino no afecta directamente a la dinámica de los microtúbulos, sino que su toxicidad parece estar más relacionada con alteraciones funcionales. Concretamente, se ha propuesto que el oxaliplatino modifica la excitabilidad neuronal al interferir con canales iónicos, como los canales TRP y Nav, y que su acción está estrechamente ligada al desarrollo de alodinia o hipersensibilidad, más que a una pérdida estructural marcada. Así, el oxaliplatino induciría una neuropatía funcional basada en una hiperrespuesta de los nociceptores, sin llegar a comprometer significativamente la integridad de las fibras neuronales, al menos en las condiciones experimentales empleadas en este modelo in vitro.

Conclusiones

Este trabajo de fin de máster ha permitido evaluar, mediante un modelo in vitro de microfluídica compartimentalizada, los efectos funcionales de dos quimioterapéuticos — paclitaxel y oxaliplatino— sobre nociceptores primarios, centrándose especialmente en la actividad de los canales TRP implicados en la neuropatía periférica inducida por quimioterapia (CIPN).

En base a los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones principales:

- El modelo microfluídico in vitro permite mantener cultivos de neuronas sensoriales viables y funcionales durante al menos 25 días.
- El tratamiento con paclitaxel produce una retracción axonal evidente y una reducción del número de axones en los compartimentos distales.
- A nivel funcional, paclitaxel induce un aumento significativo en la respuesta a capsaicina (TRPV1) y muestra una tendencia de aumento en la respuesta a AITC (TRPA1).
- El tratamiento con oxaliplatino no genera degeneración axonal aparente, pero sí provoca una hiperrespuesta significativa a AITC, indicando una sensibilización funcional del canal TRPA1.
- La degeneración axonal solo se observó tras el tratamiento con paclitaxel, mientras que oxaliplatino afectó principalmente la funcionalidad sin comprometer la estructura.
- El modelo empleado permite estudiar de forma compartimentalizada los efectos de los fármacos sobre soma y axones, así como aplicar técnicas como el calcium imaging para el análisis funcional de la CIPN.

A partir de estos hallazgos, se hace evidente la necesidad de continuar investigando los mecanismos moleculares implicados en la CIPN, particularmente en lo que respecta a la sensibilización de canales iónicos como TRPA1, TRPV1 y TRPM8. Además, considerando la importante retracción axonal observada en cultivos tratados con paclitaxel, futuras investigaciones podrían centrarse en evaluar compuestos neuroprotectores o regenerativos que favorezcan el mantenimiento y crecimiento axonal. Identificar estrategias que no solo mitiguen la hipersensibilidad, sino que también contribuyan a revertir la degeneración axonal,

sería clave para mejorar la comprensión de la patología y avanzar hacia nuevas opciones terapéuticas más eficaces en pacientes oncológicos que desarrollan neuropatía periférica.

Bibliografía

- Apkarian, A. V., Baliki, M. N., & Geha, P. Y. (2009). Towards a theory of chronic pain. *Progress in Neurobiology*, 87(2), 81-97. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.018>
- Carr, C., Ng, J., & Wigmore, T. (2008). The side effects of chemotherapeutic agents. *Current Anaesthesia and Critical Care*, 19(2), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.01.004>
- Donkelaar, H. J. T. (2020). Clinical neuroanatomy: Brain circuitry and its disorders. En *Clinical Neuroanatomy: Brain Circuitry and Its Disorders*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41878-6>
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010, noviembre). Nociceptors: The sensors of the pain pathway. En *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 120, Número 11, pp. 3760-3772). <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Fornasari, D. (2012). Pain Mechanisms in Patients with Chronic Pain: *Clinical Drug Investigation*, 32, 45-52. <https://doi.org/10.2165/11630070-000000000-00000>
- Gadgil, S., Ergün, M., Van Den Heuvel, S. A., Van Der Wal, S. E., Scheffer, G. J., & Hooijmans, C. R. (2019). A systematic summary and comparison of animal models for chemotherapy induced (peripheral) neuropathy (CIPN). *PLOS ONE*, 14(8), e0221787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221787>
- Giorgi, S., Lamberti, A., Butrón, L., Gross-Amat, O., Alarcón-Alarcón, D., Rodríguez-Cañas, E., Fernández-Carvajal, A., & Ferrer-Montiel, A. (2023). Compartmentalized primary cultures of dorsal root ganglion neurons to model peripheral pathophysiological conditions. *Molecular Pain*, 19. <https://doi.org/10.1177/17448069231197102>
- Hsiao, S. S., Lane, J., & Fitzgerald, P. (2002). Representation of orientation in the somatosensory system. *Behavioural Brain Research*, 135(1-2), 93-103. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00160-2)
- Huang, J., Han, C., Estacion, M., Vasylyev, D., Hoeijmakers, J. G. J., Gerrits, M. M., Tyrrell, L., Lauria, G., Faber, C. G., Dib-Hajj, S. D., Merkies, I. S. J., & Waxman, S. G. (2014). Gain-of-function mutations

- in sodium channel NaV1.9 in painful neuropathy. *Brain*, 137(6), 1627-1642.
<https://doi.org/10.1093/brain/awu079>
- Jeenia, F. T., & Sojib, F. A. (2022). Neuroprotective Effect of Vitamin B6 and Vitamin B12 against Vincristine- Induced Peripheral Neuropathy: A Randomized, Double- Blind, Placebo Controlled, Multicenter Trial. *Pharmaceutics and Pharmacology Research*, 5(6), 01-09.
<https://doi.org/10.31579/2693-7247/080>
- Kaley, T. J., & Deangelis, L. M. (2009). Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *British Journal of Haematology*, 145(1), 3-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07558.x>
- Lai, J., Gold, M. S., Kim, C.-S., Bian, D., Ossipov, M. H., Hunter, J. C., & Porreca, F. (s. f.). *Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8*. www.elsevier.com/locate/pain
- Lehmann, H. C., Staff, N. P., & Hoke, A. (2020). Modeling chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN) in vitro: Prospects and limitations. *Experimental Neurology*, 326, 113140.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113140>
- Lu, W., Giobbie-Hurder, A., Freedman, R. A., Shin, I. H., Lin, N. U., Partridge, A. H., Rosenthal, D. S., & Ligibel, J. A. (2020). Acupuncture for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Breast Cancer Survivors: A Randomized Controlled Pilot Trial. *The Oncologist*, 25(4), 310-318.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0489>
- Ma, Q. (2022, marzo). A functional subdivision within the somatosensory system and its implications for pain research. En *Neuron* (Vol. 110, Número 5, pp. 749-769). Cell Press.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.12.015>
- Middleton, S. J., Barry, A. M., Comini, M., Li, Y., Ray, P. R., Shiers, S., Themistocleous, A. C., Uhelski, M. L., Yang, X., Dougherty, P. M., Price, T. J., & Bennett, D. L. (2021). Studying human nociceptors: From fundamentals to clinic. *Brain*, 144(5), 1312-1335.
<https://doi.org/10.1093/brain/awab048>
- NeuroLab. (s. f.). ¿Qué es el sistema somatosensorial? En *NeuroLab*.

- Norrrell, U. (1980). Behavioral studies of the somatosensory system. *Physiological Reviews*, 60(2), 327-354. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.2.327>
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium*, 38(3-4 SPEC. ISS.), 233-252. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.028>
- Quasthoff, S., & Hartung, H. P. (2002). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. En *J Neurol* (Vol. 249, pp. 9-17).
- Staff, N. P., Grisold, A., Grisold, W., & Windebank, A. J. (2017, junio). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. En *Annals of Neurology* (Vol. 81, Número 6, pp. 772-781). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ana.24951>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 76, pp. 387-417). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Villalba-Riquelme, E., De La Torre-Martínez, R., Fernández-Carvajal, A., & Ferrer-Montiel, A. (2025). Oxaliplatin reversibly and differentially affects electrogenic activity of small IB4(+) of male and female rat sensory neurons. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 183, 117849. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2025.117849>
- Voscopoulos, C., & Lema, M. (2010). When does acute pain become chronic? *British Journal of Anaesthesia*, 105, i69-i85. <https://doi.org/10.1093/bja/aeq323>
- Wang, L. H., Ding, W. Q., & Sun, Y. G. (2022, agosto). Spinal ascending pathways for somatosensory information processing. En *Trends in Neurosciences* (Vol. 45, Número 8, pp. 594-607). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.05.005>
- Willis, W. D. (2007). The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. En *Brain Research Reviews* (Vol. 55, Número 2 SPEC. ISS., pp. 297-313). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.010>
- Zajackowska, R., Kocot-Kępska, M., Leppert, W., Wrzosek, A., Mika, J., & Wordliczek, J. (2019, marzo). Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Número 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20061451>

Zheng, J. (2013). Molecular mechanism of TRP channels. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 221-242.

<https://doi.org/10.1002/cphy.c120001>