



Modulación del canal iónico TRPA1 por la chaperona sigma 1: papel en la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino

Tesis doctoral presentada por:
Aída Marcotti

Director de tesis:
Dr. Félix Viana de la Iglesia.

Co-directora de tesis:
Dra. Elvira María de la Peña García

- 2020 -

*Programa de Doctorado en Neurociencias
Instituto de Neurociencias – UMH-CSIC*





Sant Joan d'Alacant, 1st July 2020

To whom it may concern,

The doctoral thesis entitled “Modulación del canal iónico TRPA1 por la chaperona sigma 1: papel en la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino” has been developed by myself, Aída Marcotti. This thesis is presented in a conventional format. It is based on experimental studies undertaken at the Neuroscience Institute of Alicante during the PhD program in neuroscience of the Miguel Hernández University.

Yours sincerely

Aída Marcotti



Sant Joan d'Alacant, 1st July 2020

To whom it may concern,

The doctoral thesis entitled “Modulación del canal iónico TRPA1 por la chaperona sigma 1: papel en la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino” has been developed by myself, Aída Marcotti. This thesis includes the following publication, of which I am the first author. I declare that the publication has not been used and will not be used in any other thesis in agreement with my thesis director Dr. Félix Viana de la Iglesia.

“Joint nociceptor nerve activity and pain in an animal model of acute gout and its modulation by intra-articular hyaluronan.” Aida Marcotti, Ana Miralles, Eduardo Dominguez, Eliseo Pascual, Ana Gomis, Carlos Belmonte and Elvira de la Peña. PAIN (2018). doi: 10.1097/j.pain.0000000000001137.

Yours sincerely,

Aída Marcotti

Dr. Félix Viana



Sant Joan d'Alacant, 1 de julio 2020

El Dr. Félix Viana de la Iglesia, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y la Dra. Elvira María de la Peña García, Profesora titular de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández.

AUTORIZAMOS la presentación de la Tesis Doctoral titulada “Modulación del canal iónico TRPA1 por la chaperona sigma 1: papel en la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino” realizada por D^a Aída Marcotti bajo nuestra inmediata dirección y supervisión como directores de su Tesis Doctoral en el Instituto de Neurociencias (UMH-CSIC) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado.

Dr. Félix Viana de la Iglesia

Dra. Elvira María de la Peña García



Sant Joan d'Alacant, 1 de julio 2020

D. Miguel Valdeolmillos López, Catedrático y Coordinador del programa de doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral titulada “Modulación del canal iónico TRPA1 por la chaperona sigma 1: papel en la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino” has sido realizada por D^a. Aída Marcotti, bajo la dirección del Dr. Félix Viana de la Iglesia y la Dra. Elvira María de la Peña García; y doy mi conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Dr. Miguel Valdeolmillos López

E-mail :
miguel.valdeolmillos@umh.es
www.in.umh.es

Tel: +34 965 919540
Fax: +34 965 919549

Av. Ramón y Cajal s/n
CAMPUS DE SANT JOAN
03550 SANT JOAN
D'ALACANT– ESPAÑA



Sant Joan d'Alacant, 1 de julio 2020

La presente tesis doctoral ha sido financiada por la Beca Santiago Grisolí (REF: GRISOLIA/2015/034) otorgada por la Generalitat Valenciana, por fondos de un contrato de colaboración con Laboratorios del Dr. Esteve S.A. como parte del proyecto titulado: "Efecto de nuevos analgésicos sobre neuronas nociceptivas" y el proyecto SAF2016-77233R del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIIN).

*A mi familia: Amelia, Lito y Euge
por el amor y la admiración
recíproca y por el aprendizaje
constante*

AGRADECIMIENTOS

Cuando pienso en los cinco años que han pasado desde que llegué a Alicante con la ilusión de lo desconocido me cuesta poner en palabras los sentimientos que he ido experimentando. Sin embargo, voy a elegir el agradecimiento como la palabra con la capacidad de contener cada uno de ellos y dirigido a todas las personas que, de alguna manera, han contribuido en esta porción de mi vida.

Empezando por mis directores, que han sabido transmitir conocimiento, cada uno con un estilo singular. Félix, inmerso en un mundo de ideas sobre todo nocturnas, de silbidos y tarareos, lleva notas mentales de detalles que a veces uno mismo se olvida. Tiene una vista aguda, la experiencia de los años y una manera muy particular de relacionarse que lo hace único.

Elvira, quizás una de las personas que más me ha influenciado en estos años. Desde el primer día me sorprendió la habilidad para manejar con tanta organización y responsabilidad todo lo que hace. Es de aquellas personas que lo da todo, que no titubea en compartir el conocimiento, que se cuestiona cada cosa y tiene pasión por enseñar y aprender. Gracias porque me he sentido muy cómoda en todos estos años, por tu empatía y por la energía que pones en lo que haces.

Ana, que no ha dudado en hacer lo que tenía a su alcance para solucionar todos los problemas que pueden surgir con la administración pública cuando eres un extranjero.

En esos momentos cuando los experimentos no van como lo tenías perfectamente planificado, no se puede agradecer más la existencia de los amigos, que dejan lo que están haciendo para ayudarte y es aquí donde no voy a dejar de mencionarlos.

Josemi, mi primera amistad. Josemi es, por su naturaleza, una persona sociable, alegre casi la totalidad del día, cantando siempre una canción con energía, silbando o improvisando un instrumento musical (casi siempre de percusión). Josemi fue el primero en aceptar el desafío del mate y decidir incluirlo en su vida y eso, para un argentino es inolvidable! Gracias por los consejos, por los descansos con mate y bocata, y por encontrar siempre el lado positivo a las cosas.

Danny, que por compartir el continente sudamericano te unes indefectiblemente y te sientes menos lejos de casa. ¡Gracias por las primeras explicaciones que fueron todas de mucha ayuda!

A Ana que con sus expresiones a veces indescifrables me ha regalado todos estos años una amistad incondicional ¡Gracias por ir recogerme muchas madrugadas cuando los experimentos eran interminables!

Aitana que, siempre daba consejos de biología molecular para los inexpertos y que ha sido quizás una de las guías turísticas más cualificadas de la terreta alicantina, además de una de las amistades más fuertes que me llevo ¡Gracias!

Kat, la alemana con el apellido poco pronunciable! Kat, es de las personas que van siempre con el paso firme y seguro. Tiene una habilidad admirable para mantener todo en perfecto orden, no solo el planning de los experimentos sino cada fin de semana y festivo que exista. Ese google calendar estaba pidiendo un anexo. Gracias por tu sonrisa cada vez que entraba al labo y por los brownies más ricos que he probado.

En la segunda sesión del imperio del dolor aparecieron personas que me han llegado por su calidez y su esencia, ahí están Jorge, Pablo y Alex.

Jorge, tiene la capacidad de convertir lo complejo en fácil de una manera elegante, y mucho más cuando en una presentación dice “onda evanescente” y al mismo tiempo aparece un dibujo simplísimo, made in power point. Después de eso, te vas contento de haber entendido todo con tan poco. ¡Gracias por venir al llamado de socorro cuando el set up de TIRF se revela contra la ciencia!

Pablo, Pabli, que además de tener una inteligencia exquisita tiene un sentido de la estética que convierte en obras de arte todo lo que sale de un microscopio. El mundo de la imagen es de él, pero también el de los journals clubs. Con qué delicadeza y tranquilidad te explica cómo funciona la tecnología trap. ¡Gracias también por todos los ciegos y los donuts!

Alex, el chico patch, con el que hemos chocado codos y no para saludarnos en épocas de pandemia sino por compartir el sitio. La soledad en un despacho da concentración, pero desde que fuimos compañeros de labo tuve más alegría, ¡aunque creo que también estoy un poco más sorda de tanto escuchar los disparos de tus fibras mecano-cold-lowthershould sonar y sonar todas las tardes de mi vida!

En la tercera generación quiero agradecer a Khalid y Raquel. Khalid, my friend, gracias por tus frases de ánimo cuando con exactitud descifras a través de la mirada lo que pasa, cuándo son días buenos y cuándo malos. Y a Raquel, la multifacética Raquel, porque detrás de una persona muy tímida existe una humorista genuina que siempre tiene el comentario acertado.

Quiero agradecer también a Eva que fue la primera persona con la que trabajé, quien me enseñó muchísimas cosas, por estar siempre dispuesta a hacer la vida más sencilla y alegre por supuesto. A Mireille porque está en cada detalle y tiene una dedicación única para explicar todo lo que hace y compartir su experiencia, a Rosa por musicalizar la sala de cultivos y por sus historias, a Laura y Ana.

Y también a los amigos que nacen en los pasillos: Arturo, por su ánimo incondicional, a Sergio por sus consejos y el tiempo de ayuda, Khalil, Álvaro, Lucía, Michael, Aroa, Jordi, Salma, Kevin, Mercedes, Almu, Pablo. A todos los que ya no están por aquí: Anton, Annia, Edu, Sempere y a los que desde la distancia me han acompañado siempre: Adi, Anto, Brenda, Belu, Mechi, Adrian, Carli y Manel.

Finalmente, si hoy puedo estar escribiendo estas palabras de agradecimiento es porque ante todo tengo una familia incondicional, que me ha dado todo lo que tengo, que me ha enseñado el valor del ser humano en su versión más simple. Porque confía en mí y me espera.

Índice

ABREVIATURAS	1
Resumen	3
Abstract	6
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Sistema somatosensorial	10
1.2 Dolor y nocicepción	12
1.2.1 Nociceptores.....	13
1.2.1.1 Clasificación de los nociceptores.....	13
1.2.2 Procesamiento del dolor: vías ascendentes	14
1.2.3 Dolor neuropático.....	16
1.3 Canales iónicos TRP	17
1.4 El canal iónico TRPA1	22
1.4.1 Estructura de TRPA1	22
1.4.2 Expresión de TRPA1	24
1.4.3 TRPA1 como sensor de temperatura.....	26
1.4.4 TRPA1 como sensor mecánico.....	27
1.4.5 TRPA1 como sensor químico	28
1.4.6 Mecanismo de activación de TRPA1 por sustancias químicas.....	32
1.4.7 Bloqueantes de TRPA1	33
1.5 TRPA1 y dolor	35
1.5.1 Neuropatía periférica inducida por oxaliplatino (NPIO).....	38
1.5.1.1 Fisiopatología de la NPIO.....	39
1.5.1.2 TRPA1 en la neuropatía inducida por quimioterapéuticos	44
1.6 La chaperona sigma 1	46
1.6.1 Estructura de $\sigma 1$	47
1.6.2 Expresión y localización subcelular de $\sigma 1$	48
1.6.3 Farmacología de $\sigma 1$: ligandos endógenos y exógenos	50
1.6.4 Fisiología de $\sigma 1$	53
1.6.4.1 Modulación de canales iónicos por $\sigma 1$	55
1.6.5 La chaperona $\sigma 1$ y dolor: uso de antagonistas como estrategia de analgesia	59
2. OBJETIVOS	63
3. MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1 Animales	66

3.1.1	Inducción del modelo de neuropatía por oxaliplatino en ratones	66
3.1.2	Inyección de S1RA en ratones	67
3.2	Pruebas de comportamiento	68
3.2.1	von Frey	68
3.2.2	Prueba de acetona.....	70
3.2.3	Prueba de placa fría unilateral a 10 °C	70
3.2.4	Inyección intraplantar de AITC	71
3.3	Cultivos celulares, transfección y disociación de neuronas.....	71
3.3.1	Medios de cultivo	72
3.3.2	Línea celular HEK293	73
3.3.3	Células HEK293-σ1KO	73
3.3.4	Transfección transitoria.....	74
3.3.4.1	Protocolo de transfección	74
3.3.4.2	Plásmidos utilizados	74
3.3.4.3	Generación línea celular estable HEK293-hTRPA1-tGFP	75
3.3.5	Disociación de neuronas sensoriales obtenidas de (DRG)	76
3.4	Sistemas de Registro	77
3.4.1	Soluciones extracelulares e intracelulares	77
3.4.2	Sustancias químicas aplicadas a las células durante los registros	78
3.4.3	Registro del cambio de la concentración de Ca ²⁺ intracelular.....	79
3.4.3.1	Medidas de la razón de fluorescencia (F340/F380)	81
3.4.3.2	Protocolo de estimulación con sustancias químicas	82
3.4.3.3	Protocolo de estimulación con rampa de frío en neuronas sensoriales	83
3.4.3.4	Análisis de datos de imagen de calcio in vitro.....	84
3.4.4	Registros de corriente de membrana.....	87
3.4.4.1	Protocolos de estimulación	89
3.4.4.2	Análisis de datos de registros de electrofisiológicos.....	89
3.5	Técnicas Bioquímicas	90
3.5.1	Co-inmunoprecipitación	90
3.6	Western blot	92
3.6.1	Procesamiento de imágenes	97
3.7	Análisis estadístico y programas de análisis	97
3.8	Tablas, gráficas y figuras	98
4.	RESULTADOS	99
4.1	Efecto del S1RA sobre la neuropatía inducida por oxaliplatino y su relación con TRPA1 ...	100

4.1.1 Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad a estímulos mecánicos y estímulos de frío en ratones silvestres.....	102
4.1.2 Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad a estímulos mecánicos y estímulos de frío en ratones deficientes para el canal iónico TRPA1.....	104
4.1.3 Efecto del S1RA, bloqueante de la chaperona σ_1 , en ratones silvestres y ratones TRPA1 ^{-/-} , sobre la respuesta de dolor inducida por AITC intraplantar	107
4.1.4 La administración intraperitoneal de S1RA reduce el desarrollo de la neuropatía inducida por oxaliplatino.....	108
4.2 Caracterización del efecto del S1RA sobre la actividad de TRPA1 en células HEK293 transfectadas.....	111
4.2.1 Evaluación del efecto de S1RA sobre los cambios de la concentración de calcio intracelular en células HEK293-hTRPA1-tGFP	111
4.2.2 Evaluación del efecto del S1RA sobre las corrientes de membrana a través del canal TRPA1.....	115
4.2.3 Estudio del efecto del S1RA en la respuesta de TRPA1 al agonista carvacrol	119
4.2.4 Comparación del efecto de S1RA en la respuesta a un agonista electrófilo y un agonista no electrófilo del canal TRPA1.....	120
4.2.5 Estudio del efecto del BD1086, otro antagonista de la chaperona σ_1 , sobre las respuestas de TRPA1.....	123
4.2.6 Comparación del efecto de dos antagonistas de la chaperona σ_1 , S1RA y BD1063 en la respuesta a AITC del canal TRPA1	126
4.2.7 Efecto del S1RA en la respuesta a AITC en células en las que la chaperona σ_1 se encuentra silenciada.....	129
4.3 Estudio del efecto del S1RA sobre la actividad de TRPA1 en neuronas sensoriales obtenidas de ratones que habían desarrollado neuropatía por tratamiento con oxaliplatino	133
4.3.1 Efecto del S1RA <i>in vitro</i> sobre las respuestas a AITC en neuronas de DRG de ratones silvestres	133
4.3.2 Efecto <i>in vitro</i> del S1RA sobre las respuestas a AITC en neuronas de DRG de ratones silvestres tratados con oxaliplatino.	134
4.3.3 Estudio de la respuesta a AITC en las neuronas de DRG obtenidas de ratones tratados con S1RA y oxaliplatino en simultáneo: efecto preventivo del S1RA.....	137
4.3.4 Estudio de la respuesta a frío en las neuronas de DRG obtenidas de ratones silvestres y deficientes para TRPA1 tratados con oxaliplatino.....	139
4.3.5 Efecto <i>in vitro</i> del S1RA sobre las respuestas a frío en neuronas de DRG de ratones silvestres y deficientes para TRPA1 previamente tratados con oxaliplatino.....	146
4.4 Interacción entre el canal TRPA1 y la chaperona σ_1	150
5. DISCUSIÓN	153
5.1 El canal TRPA1 contribuye en el desarrollo de la neuropatía periférica por administración de oxaliplatino	155
5.2 S1RA reduce el dolor producido por la inyección de AITC a través de TRPA1	161

5.3 La administración simultánea de S1RA y oxaliplatino ayuda a prevenir el desarrollo de la neuropatía periférica	163
5.4 El oxaliplatino induce un incremento en la actividad del canal TRPA1 a nivel celular que se reduce con la administración de S1RA	165
5.5 El tratamiento con oxaliplatino incrementa las respuestas a frío de neuronas de DRG <i>in vitro</i>	169
5.6 La chaperona σ1 modula la actividad del canal iónico TRPA1 en un sistema de expresión heteróloga	175
5.6.1 La inhibición de la actividad de TRPA1 es independiente del tipo de agonista químico con el que se le estimula	177
5.7 La chaperona σ1 modula la actividad del canal TRPA1 en neuronas sensoriales de DRG ..	179
5.8 La chaperona σ1 es necesaria para que S1RA module la actividad del canal TRPA1	180
5.9 La chaperona σ1 y el canal TRPA1 forman un complejo físico	183
6. CONCLUSIONES.....	186
7. BIBLIOGRAFÍA.....	189
8. ANEXO: PUBLICACIÓN	216

ABREVIATURAS

AITC: isotiocianato de alilo

AP18:4-(4-Clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona oxima

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosin trifosfato

BCTC: N-(4-tertiaributilfenil)-4-(3-cloropiridin-2-il) tetrahidropirazina-1(2H)-
Carboxamida

BiP: proteína de unión a inmunoglobulinas

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular

Cch: carbacol o carbamilcolina

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

DAG: diacilglicerol

DHEA: sulfato de deshidroepiandrosterona

DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle Medium"

DMSO: dimetil sulfóxido

DRG: ganglio raquídeo, del inglés "Dorsal Root Ganglia"

EGTA: Ácido etilenglicol-bis (2 aminoetiléter)-. N, N, N', N'- tetra-acético

EYFP: proteína fluorescente amarilla mejorada

F340: Fluorescencia emitida por el Fura-2 excitado con luz de longitud de onda de
340 nm

F380: Fluorescencia emitida por el Fura-2 excitado con luz de longitud de onda de
380 nm

Fura 2-AM: Fura-2 acetoximetil ester

GFP: proteína fluorescente verde

GPCR: receptor acoplado a proteínas G

GT: ganglio trigémino

HBSS: "Hank's balanced salt solution"

HC-030031:2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7 -il)-N-
(4-isopropilfenil) acetamida

HEK293: línea celular "Human Embryonic Kidney 293"

HEK293-hTRPA1: células HEK con expresión estable del canal TRPA1 humano

HEK293-σ1KO: línea HEK con σ1 silenciada

HEPES: ácido N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(4-butasulfónico)

IB4: isolectina B4

IC₅₀: valor medio de la concentración inhibitoria máxima

IP: inmunoprecipitación

IP3: inositol 1,4,5 trifosfato

KCl: cloruro potásico

MAM: membranas asociadas a mitocondrias
mCherry: proteína fluorescente roja de la familia de las mFruits
MEM: "Minimal Essential Medium"
MFA: microscopía de fuerza atómica
NPIO: neuropatía periférica inducida por oxaliplatino
NSP: neurona sensorial primaria
PBS: tampón fosfato salino
PIP2: inositol 4,5 bifosfato
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C
PLC: fosfolipasa C
PSA: persulfato de amonio
SDS: dodecilsulfato sódico
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
SP: sustancia P
TBS: solución salina tamponada con tris
TBS-T: TBS con tween
TEMED: tetrametiletildiamina
TG: ganglio trigémino
tGFP: turbo GFP
TM: dominio transmembrana
TRIS: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)aminomethane
TRP: potencial receptor transitorio
TRPA1: potencial receptor transitorio anquirina 1
TWEEN: detergente (polisorbato)
UCP: placa fría unilateral, del inglés "unilateral cold plate"
 $\sigma 1$: chaperona $\sigma 1$

Resumen

El canal iónico TRP Anquirina 1 (TRPA1) es un canal catiónico polimodal que juega un papel crítico en la quimionocicepción, como sensor molecular de irritantes reactivos, estrés y daño tisular. En mamíferos, TRPA1 también ha sido considerado como un sensor de frío nocivo y de estímulos mecánicos, aunque esto aún es debatido. En el contexto del dolor neuropático, se ha demostrado, en modelos animales murinos, que el canal TRPA1 tiene un papel prominente en la hipersensibilidad al frío y la alodinia mecánica observada durante la neuropatía inducida por quimioterapia. Por otro lado, sigma 1 (σ_1) es una chaperona ubicada principalmente en las membranas del retículo endoplásmico asociadas a mitocondrias (MAM) y que se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos del organismo, incluyendo su expresión en las neuronas sensoriales primarias. Sigma 1 actúa como un modulador de la excitabilidad, regulando la función y el tráfico de diferentes canales iónicos de la membrana plasmática, así como en la homeostasis de la concentración del calcio intracelular. El tratamiento con S1RA, un antagonista selectivo de σ_1 , tiene efectos antinociceptivos en modelos animales de dolor neuropático. Sin embargo, el mecanismo molecular de estos efectos se desconoce.

El objetivo de esta tesis ha sido estudiar la posible modulación del canal TRPA1 por σ_1 en un modelo de neuropatía inducida por administración sistémica de oxaliplatino en ratones. Para explorar esta hipótesis, hemos utilizado una combinación de diferentes enfoques: evaluación de moduladores de σ_1 en pruebas de comportamiento, técnicas de imagen de calcio y registros electrofisiológicos en sistemas de expresión heteróloga y en neuronas sensoriales primarias disociadas de ganglios raquídeos (DRG), así como técnicas de biología molecular y bioquímicas. En las pruebas de comportamiento, encontramos que los ratones silvestres tratados con oxaliplatino desarrollaron alodinia mecánica e hipersensibilidad al frío. Cuando los ganglios raquídeos de estos ratones fueron disociados y estudiados con imagen de calcio *in vitro*, las neuronas sensoriales mostraron mayores respuestas a AITC (agonista selectivo de TRPA1). También se observó un incremento en el número de neuronas que respondían a estímulos de frío, aunque este incremento no parece estar asociado a las neuronas que expresan TRPA1. Además, se observó, en contra de lo esperado, una disminución en el umbral promedio

de detección de la temperatura. En contraste, los ratones TRPA1^{-/-} tratados con oxaliplatino no mostraron hipersensibilidad al frío y desarrollaron menos alodinia mecánica en comparación con los ratones silvestres. En condiciones *in vitro*, las neuronas sensoriales obtenidas de ratones TRPA1^{-/-} mostraron un incremento en el número de neuronas que respondían a frío, menor que en los ratones silvestres. En su conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con oxaliplatino modifica la actividad del canal TRPA1 y también la de otros canales iónicos sensores de frío.

Además, encontramos que el comportamiento nocifensivo de los ratones en respuesta a AITC se vio disminuido por el antagonismo de $\sigma 1$ con S1RA. En concreto, los ratones tratados con una inyección intraperitoneal de S1RA mostraron una disminución en las respuestas nocifencivas a la inyección intraplantar de AITC, sugiriendo una posible modulación *in vivo* del canal TRPA1 por $\sigma 1$.

Debido a que la quimioterapia es un proceso planificado, implementamos un tratamiento simultáneo con S1RA y oxaliplatino para evaluar el posible efecto preventivo del S1RA en el desarrollo de la neuropatía. Los ratones silvestres tratados simultáneamente con S1RA y oxaliplatino desarrollaron menor alodinia mecánica e hipersensibilidad al frío que los tratados únicamente con oxaliplatino. Las neuronas sensoriales obtenidas de estos ratones mostraron una menor amplitud en las respuestas de calcio intracelular al estímulo de AITC, lo que sugiere una inhibición de la actividad de TRPA1 por el tratamiento con S1RA. Además, los cambios en las respuestas a frío en condiciones *in vitro*, en neuronas previamente tratadas con oxaliplatino, fueron restablecidos a condiciones basales con la administración de S1RA.

La medición de los cambios intracelulares de calcio en células HEK293-hTRPA1 incubadas con S1RA a diferentes concentraciones mostraron una disminución dosis dependiente en la respuesta provocada por diferentes tipos de agonistas de TRPA1 (AITC y carvacrol). Las corrientes de membrana en respuesta a AITC, en células HEK293-hTRPA1, también se redujeron después de la incubación con S1RA. S1RA no indujo cambios en la actividad de TRPA1 en una línea celular donde $\sigma 1$ se encuentra silenciado (HEK293- $\sigma 1$ KO), lo que sugiere una modulación directa de TRPA1 por $\sigma 1$. Los resultados bioquímicos de inmunoprecipitación sugirieron la formación de un complejo entre TRPA1 y $\sigma 1$ cuando éstos fueron expresados en células HEK293. Debido a los déficits

funcionales observados tras la incubación con S1RA, ésta podría producir una alteración en el tráfico, así como en el plegamiento y la estructura final del canal TRPA1.

En resumen, estos resultados muestran que la chaperona $\sigma 1$ modula la actividad del canal TRPA1 (humano y de ratón) y que el uso del antagonista de $\sigma 1$, S1RA, atenúa los síntomas neuropáticos consecuencia del tratamiento por oxaliplatino, pudiendo utilizarse como una estrategia analgésica preventiva. Además, los resultados obtenidos sugieren que tanto la neuropatía inducida por oxaliplatino como los efectos de S1RA no solo afectan a la población de canales TRPA1.

Abstract

The ion channel TRP Ankyrin 1 (TRPA1) is a polymodal cation channel that plays a critical role in chemonociception as a molecular sensor of reactive irritants, stress and tissue damage. In mammals TRPA1 has also been shown to be involved as a sensor of noxious cold and mechanical stimuli but this role is still a matter of debate. In the context of neuropathic pain, the role of TRPA1 channels in the development of cold and mechanical allodynia, observed during chemotherapy-induced neuropathy, is very prominent. It has been shown, in mice, that TRPA1 is involved in the exacerbated pain in this particular neuropathy. On the other hand, sigma 1 ($\sigma 1$), is a chaperone mainly located at the mitochondrion-associated membrane (MAM) of the endoplasmic reticulum and is widely distributed in body tissues, including its expression in primary sensory neurons. Sigma 1 acts as an inter-organelle signaling modulator that regulates the excitability and trafficking of different ion channels and it has also been involved in the homeostasis of the intracellular calcium concentration. The treatment with S1RA, a selective antagonist of $\sigma 1$, has antinociceptive effects in neuropathic pain animal models. However, the molecular mechanism of this action is still unknown.

The goal in this thesis was to study the possible modulation of TRPA1 channels by $\sigma 1$ in a model of chemotherapy-induced neuropathy in mice by systemic injection of oxaliplatin.

To explore this hypothesis, we used different approaches: evaluation of $\sigma 1$ modulators in behavioral tests, *in vitro* measurement of intracellular calcium changes and patch-clamp recordings in heterologous expression systems and in primary sensory neurons dissociated from dorsal root ganglia (DRG) and molecular biology and biochemical techniques. Through behavioral tests, we found that wild type animals treated with oxaliplatin show mechanical allodynia and cold hypersensitivity. When the DRG from mice previously treated with oxaliplatin were dissociated, sensory neurons showed an increase in response to AITC (selective TRPA1 agonist) using *in vitro* calcium imaging experiments. Also, we observed an increase in the cold response under *in vitro* conditions, which was no dependent of TRPA1. Contrary to our expectations, we observed a decrease in the cold detection threshold to lower temperatures. In contrast,

mice TRPA1^{-/-} treated with oxaliplatin do not develop cold hypersensitivity and they develop less mechanical allodynia compared with wild type mice. The response to cold of sensory neurons *in vitro* condition was also increased after oxaliplatin treatment but this increment was reduced compared to wild type mice. Taken together, these results suggest that treatment with oxaliplatin modifies TRPA1 channel activity and that of other cold-sensing ion channels.

Additionally, we found that pain-related behavior in response to AITC is diminished by the antagonism of σ 1. Thus, mice treated with a single intraperitoneal injection of S1RA showed a decrease in the nocifensive behavior when AITC was injected intraplantarly, suggesting a possible *in vivo* modulation of TRPA1 by σ 1.

Since chemotherapy is a planned process, we implemented a simultaneous treatment of S1RA and oxaliplatin to evaluate the possible preventive effect of S1RA in the neuropathy development. Wild type mice treated with S1RA and oxaliplatin develop less mechanical allodynia and cold hypersensitivity than those treated with oxaliplatin alone. Sensory neurons cultured show a decrease in the intracellular calcium level when they are activated with AITC, suggesting an inhibition of TRPA1 by S1RA treatment. Furthermore, altered responses to cold in sensory neurons cultured from mice treated with oxaliplatin were restored to baseline levels after administration of S1RA.

Measurement of intracellular calcium changes in HEK293-hTRPA1 incubated with S1RA at different concentrations show a decrease in the response evoked by TRPA1 agonists (AITC and carvacrol). Whole-cell membrane currents in HEK293-hTRPA1 cells in response to AITC were also reduced after incubation with S1RA. S1RA did not induce changes in the TRPA1 activity in a cell line where σ 1 is silenced (HEK293- σ 1KO), suggesting a direct modulation of TRPA1 by σ 1. Also, the biochemical assays of immunoprecipitation suggested a physical interaction between TRPA1 and σ 1 in HEK293 cells. Considering the TRPA1 functional deficits observed after incubation with S1RA, we can hypothesize alterations in the trafficking, folding and final structure of TRPA1 channel.

In summary, these results show that the σ 1 chaperone modulates TRPA1 activity (human and mouse). The use of S1RA, a σ 1 antagonist, attenuates neuropathic symptoms induced by oxaliplatin treatment and it could be used as a preventive

analgesic strategy. However, the results suggest that both oxaliplatin-induced neuropathy and the effects of S1RA do not only affect the TRPA1 population of channels.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema somatosensorial

Los organismos pluricelulares monitorizan constantemente los cambios que se producen, tanto en el medio interno como en su entorno, lo cual es fundamental para adaptarse a los cambios que se producen y por ende para su supervivencia. La capacidad de recolectar esta información depende del sistema somatosensorial y sus receptores periféricos en la piel, los músculos, las articulaciones y los órganos internos, responsables de la detección de los estímulos sensoriales para transmitirlos al sistema nervioso central (SNC). El SNC integra la información y elabora una respuesta de adaptación al cambio detectado.

Haciendo un breve acercamiento a los comienzos, comentaré que el fisiólogo británico Charles Sherrington definió tres funciones principales del sistema somatosensorial: una función *exteroceptiva*, cuyo rol es recibir información desde el exterior, incluyendo el tacto, la temperatura y el dolor, una función *interoceptiva* que monitoriza estímulos provenientes de órganos internos y una tercera llamada *propioceptiva* que nos permite tener conciencia de la postura y movimiento de nuestro cuerpo (Sherrington 1906). El sistema somatosensorial está formado por neuronas sensoriales especializadas, llamadas neuronas sensoriales primarias (NSP), que permiten detectar diferentes tipos de estímulos, inocuos y nocivos, externos e internos a través de sus terminales periféricas.

Los somas de las NSP se encuentran anatómicamente distribuidos dependiendo la zona que inervan en la superficie corporal. Así, los somas de las neuronas que inervan la piel, músculos, articulaciones del tronco, las extremidades del cuerpo y algunos órganos internos se encuentran en los ganglios raquídeos (DRG), ubicados a ambos lados a la médula espinal. Los somas de las NSP que inervan la cabeza y la cara se localizan de manera bilateral en el ganglio trigémino (TG), también conocido como ganglio de Gasser, ubicado en la parte petrosa del hueso temporal (Fig. 1.1A y B) (Purves 2018).

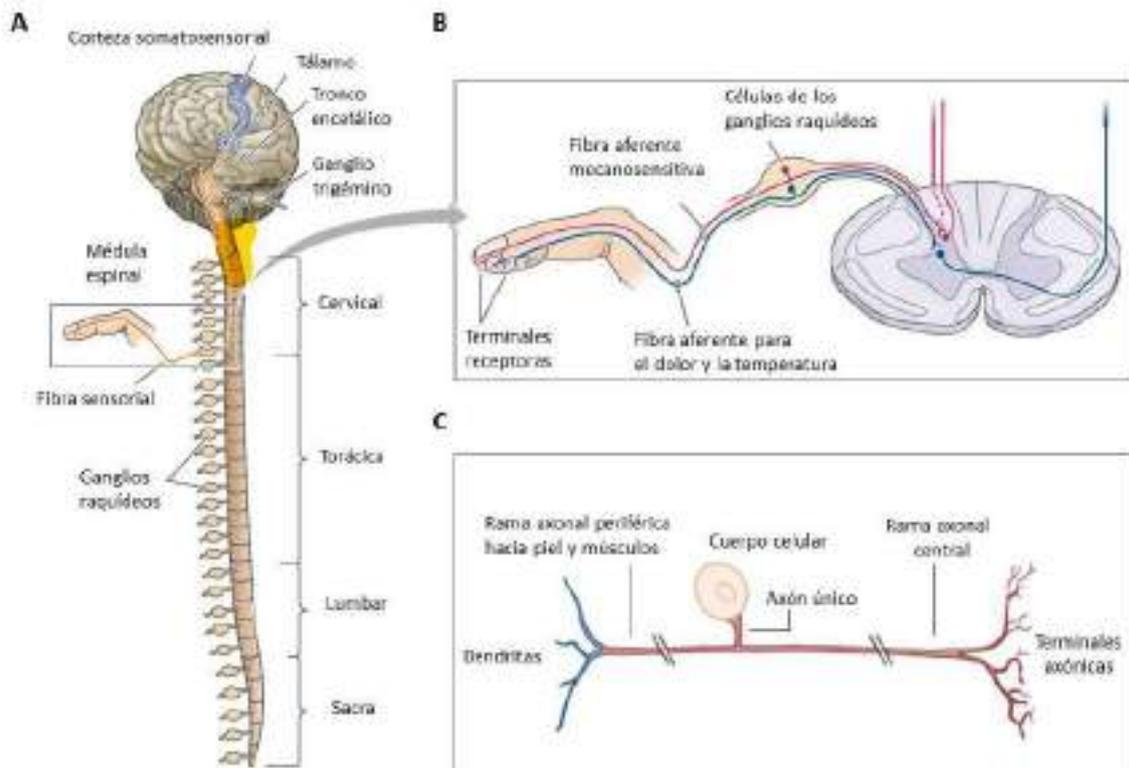


Figura 1.1. Sistema somatosensorial. **A)** Los cuerpos neuronales de las fibras aferentes somatosensoriales que transmiten información de la piel, músculos, articulaciones del tronco, las extremidades del cuerpo y algunos órganos internos se encuentran en los ganglios raquídeos ubicados a lo largo de la médula espinal. Los que transmiten información de la cabeza y la cara se encuentran en el ganglio trigémino. **B)** Las fibras aferentes de las neuronas pseudounipolares de los ganglios raquídeos (DRG) se ramifican dentro de la piel, músculos y articulaciones mientras que las fibras eferentes hacen sinapsis con neuronas ubicadas en la médula espinal. Los procesos periféricos de las aferentes mecanosensitivas están encapsulados por células receptoras especializadas mientras que, las que llevan información de temperatura y dolor acaban en la periferia como terminaciones libres. **C)** Las neuronas sensoriales primarias son pseudounipolares. Estas neuronas presentan un solo axón que se bifurca en dos ramas. La rama periférica inerva la piel, los músculos y otros tejidos. La rama central se dirige hacia la médula espinal. Modificado de Purves 6ta Edición 2018 y Kandel 5ta Edición 2013.

Las neuronas sensoriales primarias son del tipo pseudounipolar ya que presentan un axón que se bifurca en dos ramas; una de ellas recoge la información desde la periferia (piel, articulaciones, músculo, oído interno y órganos internos) y la otra envía información a diferentes estructuras del SNC (médula espinal o tronco encefálico) para luego ser integrada en la corteza somatosensorial o en el cerebelo (Fig. 1.1C).

Las terminales axónicas de las neuronas sensoriales primarias (NSP) expresan una gran variedad de proteínas de membrana consideradas sensores biológicos para la detección de diferentes estímulos. Estas proteínas tienen la capacidad de captar alteraciones del entorno y la consecuente *transducción* de diversos estímulos

sensoriales (físicos o químicos) en señales eléctricas (potenciales generadores) que serán *transmitidas* en forma de trenes de potenciales de acción al SNC, donde tendrá lugar la integración de la información para generar una *percepción* específica. Dependiendo de la naturaleza del estímulo que pueden detectar, los receptores de membrana se clasifican como termorreceptores (temperatura), quimiorreceptores (sustancias químicas), mecanorreceptores (fuerzas mecánicas) y nociceptores capaces de transducir señales nocivas de diferente naturaleza.

1.2 Dolor y nocicepción

El *dolor* es una de las principales respuestas desarrolladas por nuestro sistema nervioso para protegernos de un daño. Se puede describir como una experiencia consciente que resulta de la actividad cerebral en respuesta a un estímulo nocivo, involucrando procesos sensoriales, emocionales y cognitivos.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, International Association for the Study of Pain) lo define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”(Merskey H 1979, Loeser and Treede 2008, Cohen, Quintner et al. 2018).

Es importante mencionar que el dolor cuenta con dos componentes fundamentales, uno discriminativo que hace referencia a la ubicación, intensidad y calidad del estímulo doloroso y un componente afectivo-emocional responsable de la sensación desagradable que provoca. Cada uno de estos componentes depende de diferentes circuitos neurales que serán mencionados en el apartado 1.2.2 de esta introducción.

La *nocicepción*, en cambio, es el proceso por el cual la información de un estímulo nocivo se transmite al cerebro. Dicho de otra manera, es la sumatoria de la actividad neuronal que ocurre antes de los procesos cognitivos. Así pues, la nocicepción es necesaria pero no suficiente para la experiencia del dolor.

1.2.1 Nociceptores

Los nociceptores son definidos según la IASP como: “un receptor sensorial de alto umbral del sistema nervioso somatosensorial periférico que es capaz de transducir y codificar estímulos nocivos”. Sin embargo, no solo los nociceptores pueden responder a estímulos nocivos. Los receptores mecánicos o térmicos pueden responder a estímulos nocivos cuando éstos superan sus umbrales de detección, pero solo los nociceptores son capaces de codificar la información relevante de los estímulos nocivos, por ejemplo la intensidad del estímulo en el rango doloroso (Loeser and Treede 2008).

Estos nociceptores inervan diferentes estructuras y órganos como la piel. Como indica su definición, en condiciones normales los nociceptores se excitan solo cuando la intensidad del estímulo alcanza el rango nocivo, lo que les permite detectar estímulos de manea altamente selectiva y responder solo a los potencialmente dañinos (Basbaum, Bautista et al. 2009). Sin embargo, en determinados escenarios de sensibilización, los nociceptores tienen mayor capacidad de repuesta con lo que no solo estímulos nocivos son capaces de activarlos (Loeser and Treede 2008).

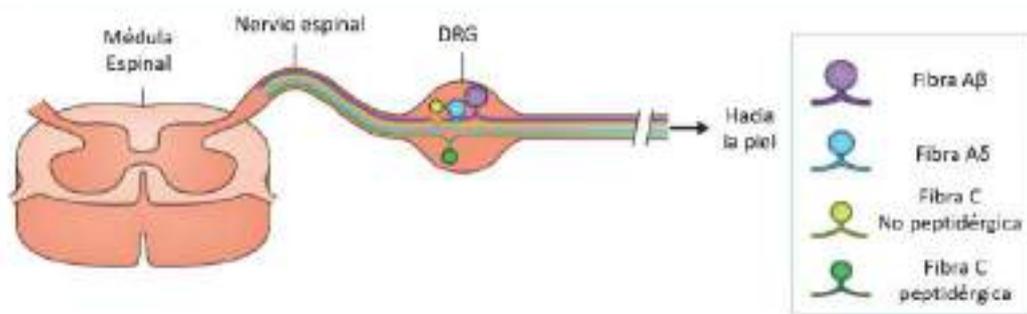
1.2.1.1 Clasificación de los nociceptores

Los nociceptores pueden clasificarse según diferentes características o criterios, tanto morfológicos como funcionales. Una clasificación los separa de acuerdo a la velocidad de conducción, el diámetro de los axones y su grado de mielinización. Así, las denominadas fibras A δ presentan axones mielinizados (no densamente) y de diámetro medio (1-6 μm). Debido a su velocidad de conducción (4–36 m/s) son las responsables del dolor rápido, agudo y localizado (Purves 2018). Las fibras A β , con un diámetro mayor (6-12 μm) y altamente mielinizadas, presentan una alta velocidad de conducción (36-72 m/s) aunque en su mayoría detectan estímulos inocuos (Tabla 1.1). Por el contrario, las fibras nociceptoras C presentan un diámetro pequeño (0.2-1.5 μm), no están mielinizadas, y tienen una velocidad de conducción de entre 0.2–1.5 m/s. Transmiten el dolor lento y poco localizado (Meyer, Ringkamp et al. 2006). Si bien casi todos los nociceptores pertenecen a este grupo de fibras, también hay evidencias en las que algunas fibras C responden a frío y a estímulos mecánicos inocuos (Olausson, Wessberg et al. 2010).

Los nociceptores también pueden clasificarse según el tipo de estímulo al que responden (Tabla 1.1). Las fibras A δ de tipo I responden a estímulos químicos y mecánicos nocivos. Estas fibras pueden sensibilizarse en respuesta a una lesión tisular, respondiendo a estímulos inocuos.

Tabla 1.1. Tipos de axones aferentes primarios (modificado de Kandel 2013, Moehring, Halder et al. 2018)

	Fibra cutánea	Diámetro de la fibra (μm)	Velocidad de conducción (m/s)	Modalidad sensorial	
	Mielinizada Diámetro medio	A β	5 - 12	36 - 72	Tacto
	Mielinizada Diámetro pequeño	A δ	1 - 6	4 - 36	Nocicepción mecánica, térmica y química
	No mielinizadas	C	0.2 - 1.5	0.4 - 2.0	Temperatura inocua, picor Nocicepción mecánica, térmica y química



Se cree que las fibras A δ median el primer dolor provocado por estímulos mecánicos intensos como el de pinchar. Un segundo tipo de nociceptor A δ se conoce como tipo II; responden a calor y estímulos mecánicos, pero el umbral para la respuesta mecánica es mayor que en el tipo I. Estos nociceptores representan la primera respuesta al calor nocivo. Por otro lado, la mayoría de las fibras C son sensibles a más de un estímulo nocivo por lo que se denominan polimodales, son capaces de responder a estímulos químicos, térmicos y mecánicos dañinos. A su vez, una subpoblación de las fibras C tiene la capacidad de liberar neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionados con el gen de la calcitonina (CGRP) y por esta razón son llamados nociceptores peptidérgicos (Basbaum, Bautista et al. 2009).

1.2.2 Procesamiento del dolor: vías ascendentes

En el proceso de la transmisión del dolor, los nociceptores son neuronas sensoriales de primer orden y hacen sinapsis en la médula espinal con neuronas

sensoriales de segundo orden, para iniciar la vía ascendente hacia el encéfalo. Estas aferencias primarias transmiten la información periférica hacia diferentes secciones anatómicas de la médula espinal cuya distribución sigue el llamado esquema laminar de Rexed. En esta estratificación de la sustancia gris, la médula espinal está dividida en diez láminas (numeradas con números romanos) de las cuales las seis primeras se localizan en el asta dorsal de la médula espinal donde convergen las fibras nociceptoras. Así, las fibras A δ mielínicas proyectan sus axones centrales hacia las láminas I y V, mientras que las fibras C lo hacen hacia las láminas más superficiales I y II (Fig. 1.2). Las aferencias nociceptivas A β terminan en las láminas III, IV y V (Kandel 2013).

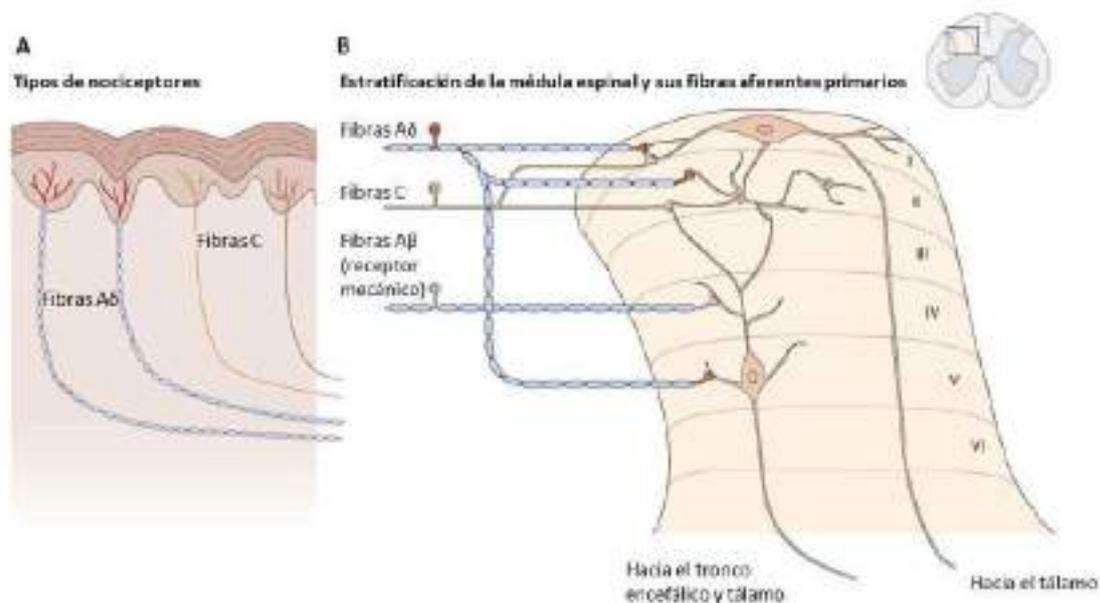


Figura 1.2. Las fibras nociceptivas arriban a diferentes láminas de la médula espinal. A) Tipos de nociceptores periféricos. Fibras A δ mielinizadas y fibras C no mielinizadas. **B)** Estratificación de la médula espinal. La materia gris de la médula espinal está dividida en seis láminas cada una de las cuales presenta diferentes funciones y poblaciones neuronales. Las neuronas de la lámina I reciben información de las fibras nociceptivas A δ y C. Las fibras C envían información directa hacia la lámina I y también indirecta a través de interneuronas en la lámina II. La lámina V recibe información táctil de las fibras mielinizadas A β , así como de los aferentes nociceptivos A δ y C. Las neuronas de la lámina V envían dendritas hacia la lámina IV donde se encuentran las terminales primarias de las fibras A β . Las dendritas en la lámina III provenientes de neuronas en la lámina V están conectadas con los axones de las interneuronas de la lámina II (modificado de Kandel 5ta Edición 2013).

Una vez en el asta dorsal, las prolongaciones de las fibras nociceptivas se conectan con el soma de las neuronas de segundo orden cuyos axones cruzan la línea media y ascienden al tronco encefálico y al tálamo a través de las vías

espinoreticulotalámicas y espinotalámicas respectivamente. Los axones de las neuronas de segundo orden en las láminas I y V cruzan la línea media y ascienden al tronco encefálico y al tálamo en el cuadrante anterolateral de la mitad contralateral de la médula espinal, razón por la cual esta vía ascendente suele llamarse anterolateral.

Las fibras nerviosas de segundo orden que conforman el sistema anterolateral son las responsables del aspecto discriminativo y sensorial del dolor (aquel que se refiere a la naturaleza del estímulo nocivo, ubicación e intensidad del mismo). Se cree que este aspecto depende de la información que se transmite a través del núcleo ventral posterior lateral del tálamo hacia las neuronas de la corteza somatosensorial primaria y secundaria. Por otro lado, el componente afectivo-emocional del dolor en el que se incluye la sensación desagradable, la ansiedad y miedo que se produce, así como la activación del sistema autónomo, está mediada por diversas estructuras cerebrales como la formación reticular, el hipotálamo, la amígdala que transmiten señales a la corteza cingulada anterior y la ínsula (Purves 2018).

1.2.3 Dolor neuropático

En ocasiones, el dolor puede aparecer por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial dando como consecuencia una actividad anormal de las vías nociceptivas. En estas circunstancias las aferencias nerviosas pueden ser activadas por estímulos inadecuados y el dolor deja de presentar una función protectora. Este escenario se ha denominado clínicamente como dolor neuropático (Bouhassira 2019). El dolor neuropático es un dolor crónico, continuo y en ocasiones punzante y abarca una amplia variedad de trastornos periféricos o centrales. Se estima que alrededor de un 20 % de los pacientes que sufren algún tipo de cáncer manifiestan dolor neuropático (Lema, Foley et al. 2010).

En los casos clínicos de dolor neuropático, los pacientes suelen presentar cuadros de sensibilización de diferentes tipos. Una de ellas es la denominada *alodinia* que por definición, es el dolor inducido por un estímulo que normalmente no provoca dolor (extraído de la página web de la IASP, International Association for the Study of Pain). En estas condiciones los pacientes muestran un incremento en la percepción del dolor con el frío o el calor leve, un estímulo táctil suave o una ligera presión es aplicada sobre la piel (Fig. 1.3). La *hiperalgesia* es otro tipo de sensibilización en la cual hay un

incremento en la sensación de dolor a un estímulo lesivo (Fig. 1.3). Cuando la hiperalgesia se manifiesta en la región de la lesión, se la denomina hiperalgesia primaria. Cuando el dolor aumenta en zonas adyacentes no lesionadas se la denomina hiperalgesia secundaria (Viana 2018). El dolor neuropático genera situaciones incapacitantes en los pacientes que lo padecen. En la actualidad no existen tratamientos altamente eficaces, y los tratamientos disponibles producen efectos colaterales. Por ello, el desarrollo de nuevos fármacos y terapias representa un aspecto fundamental para un mejor tratamiento del dolor.

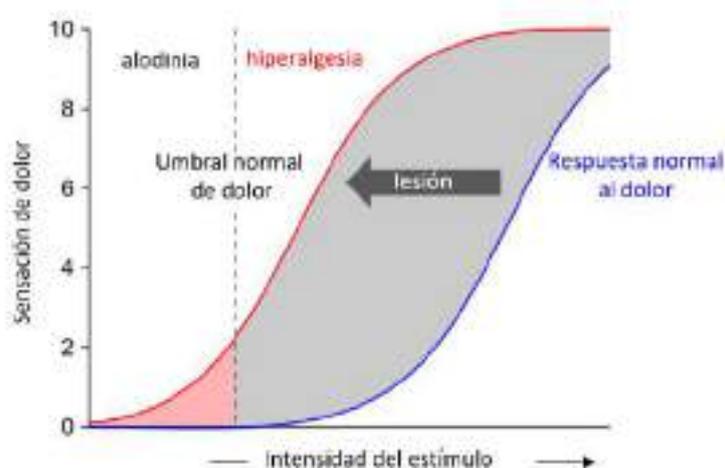


Figura 1.3 Tipos de sensibilización tras lesión tisular. En condiciones normales, estímulos inocuos o débiles no provocan sensación de dolor. Sin embargo, tras una lesión, las respuestas a los estímulos son sensibilizadas. Esta sensibilización provoca un desplazamiento de la curva de respuesta hacia la izquierda con lo cual un estímulo que provoca un dolor moderado es percibido como intenso (modificado de Viana 2018).

1.3 Canales iónicos TRP

Como ya se ha mencionado, la capacidad de las terminales nerviosas para detectar diferentes modalidades de estímulos se debe a la expresión de proteínas de membrana especializadas, conocidas como canales iónicos. La activación de estos canales produce una despolarización de las terminales nerviosas y una consecuente generación de trenes de potenciales de acción, proceso que se conoce como transducción sensorial. En las dos últimas décadas, el conocimiento acerca de los mecanismos de transducción para los estímulos sensoriales ha avanzado

exponencialmente, incluyendo en dicho avance la caracterización de la familia de canales iónicos conocidos como TRP (Transient Receptor Potential channels) (Clapham 2003).

Los canales TRP constituyen una gran familia de canales iónicos. Su nombre es debido al fenotipo que presenta un mutante de la mosca *Drosophila melanogaster*. El registro del potencial global en fotorreceptores del ojo de la mosca mutante presenta, a diferencia de la mosca silvestre, un *potencial receptor transitorio* que rápidamente vuelve a la línea basal cuando es estimulado lumínicamente de manera prolongada (Cosens and Manning 1969). Debido a la característica transitoria de la respuesta, estas proteínas fueron bautizadas como proteínas de potencial receptor transitorio (TRP) (Minke, Wu et al. 1975) y, 20 años más tarde, fueron identificadas como canales iónicos (Montell and Rubin 1989).

En mamíferos, la familia TRP está conformada por siete subfamilias (Fig. 1.4), cuyos miembros han sido agrupados de acuerdo a la homología en su secuencia de aminoácidos: TRPA por anquirina (solo un miembro, TRPA1), TRPC por canónico (siete miembros TRPC1-7), TRPM por melastatina (TRPM1-8), TRPV por vaniloide (TRPV1-6), TRPML por mucolipina (TRPML1-3), TRPP por policistina (TRPP2, TRPP3, y TRPP5) (Nilius and Szallasi 2014).

Los TRP son, mayormente, canales catiónicos no selectivos, presentando una permeabilidad relativa a diferentes cationes dependiendo de la subfamilia. La mayoría de ellos son altamente permeables a Ca^{2+} , con excepción a los canales TRPM4 y TRPM5 (Gees, Owsianik et al. 2012, Boonen, Alpizar et al. 2018), convirtiéndose en mediadores del transporte de iones a través de su membrana plasmática. Tras la activación de los canales, los cationes Ca^{2+} y Na^{+} presentes en el medio extracelular ingresan al interior de la célula a favor de un gradiente electroquímico, generando un incremento de las concentraciones intracelulares de ambos cationes. La entrada de Ca^{2+} y Na^{+} resulta en un cambio del potencial de la membrana plasmática hacia valores más positivos o despolarizantes. Dependiendo del tipo celular, este cambio en el potencial de membrana puede generar potenciales de acción y su consecuente propagación, como ocurre en células excitables como las neuronas.

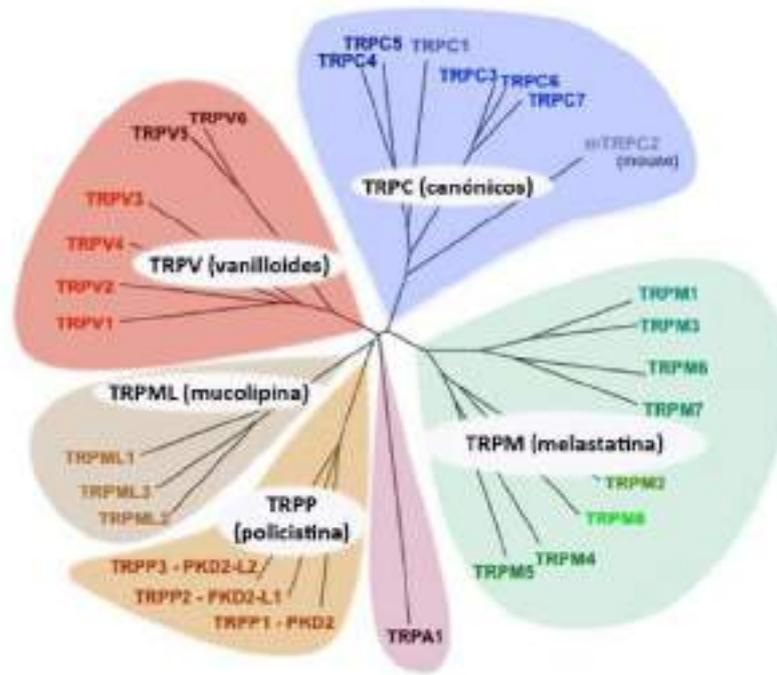


Figura 1.4. Árbol filogenético de la familia de los canales TRPs en humanos. Cada uno de los grupos representados en diferentes colores muestran las subfamilias clasificadas en función de su homología (modificado de Doerner y Clapham 2018).

Estructuralmente, los canales TRP están constituidos por cuatro subunidades proteicas ensambladas en tetrámeros, dando como resultado un canal funcional. Los tetrámeros pueden estar conformados por homómeros así como por heterómeros. Cada subunidad presenta seis segmentos transmembrana (S1-S6) y una región de poro permeable a los cationes entre los segmentos S5 y S6 (Moran 2018) (Fig. 1.5). Los extremos intracelulares amino (N) y carboxilo (C), varían en longitud de acuerdo a la subfamilia. La mayoría de los canales presentan una secuencia altamente conservada en el extremo C terminal llamado dominio TRP, sin embargo, el dominio anquirina, presente en extremo N terminal, difiere significativamente entre los miembros de las subfamilias TRP (Owsianik, D'Hoedt et al. 2006, Rosasco and Gordon 2017). Gracias a las técnicas de microscopía electrónica criogénica (cryo-EM) se conoce la estructura atómica de muchos canales TRP (Liao, Cao et al. 2013, Paulsen, Armache et al. 2015, Zubcevic, Herzik et al. 2016).

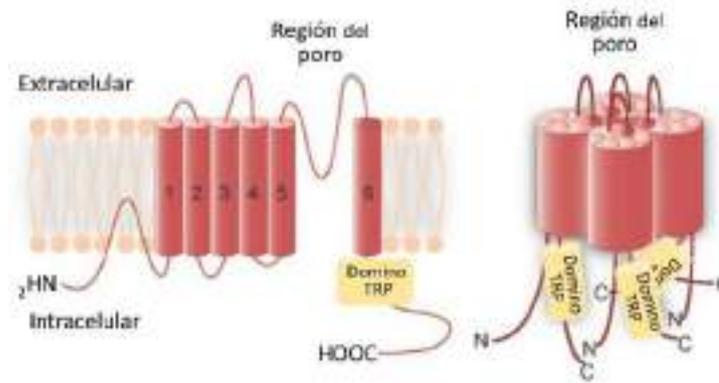


Figura 1.5. Topología de los canales TRP. Estructuralmente los canales TRP son tetrámeros, donde cada subunidad presenta seis dominios transmembrana y un poro hidrofóbico entre el quinto y sexto segmento. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal son citoplasmáticos. Todos los canales TRP contienen dominios de repetición de anquirina en el extremo N terminal (excepto el canal TRPM8), aunque la cantidad varía considerablemente entre las subfamilias de canales (modificado de Takahashi, Kozai et al. 2012).

Funcionalmente, los canales TRP tienen la capacidad de detectar una gran variedad de estímulos extra e intracelulares. Son canales polimodales, ya que pueden ser activados por diferentes tipos de estímulos siendo integradores distintas modalidades sensoriales como el tacto, la temperatura y el dolor (Clapham 2003).

Algunas de las subfamilias de los canales TRP, como TRPV, TRPM y TRPA han sido bien documentados como termosensibles a calor y frío, en el rango de temperaturas inocuas y nocivas (Caterina, Schumacher et al. 1997, Caterina, Rosen et al. 1999, Peier, Moqrich et al. 2002, Story, Peier et al. 2003, Yarmolinsky, Peng et al. 2016). Así, está ampliamente demostrado que TRPM8 es un sensor de frío, teniendo mayor rol en el sensado de temperaturas inocuas (McKemy, Neuhauser et al. 2002, Bautista, Siemens et al. 2007, Colburn, Lubin et al. 2007, Dhaka, Murray et al. 2007). Por otro lado, TRPA1 es activado por frío nocivo en ratones (Story, Peier et al. 2003), aunque Yarmolinsky en 2016 utilizando registros de imagen de calcio *in vivo* demostró la participación de TRPA1 en la detección de calor y no de frío en experimentos realizados en neuronas sensoriales del ganglio trigémino (Yarmolinsky, Peng et al. 2016). Aún así, el papel específico de TRPA1 en la termosensación está todavía en tela de juicio, mostrando importantes variaciones interespecies (Panzano, Kang et al. 2010, Kang, Panzano et al. 2011, Kurganov, Zhou et al. 2014, Moparthi, Kichko et al. 2016, Kurganov and Tominaga 2017, Oda, Saito et al. 2017), debatiéndose todavía si en humanos también está involucrado en esta modalidad.

Respecto a los canales TRP sensibles al calor, varios miembros de la familia vaniloide han sido reportados como sensores de calor, a diferentes rangos de temperatura. Así, está bien establecido el rol de TRPV1 como sensor de calor nocivo, aunque también se ha descrito para TRPV2 (Leffler, Linte et al. 2007), TRPV3 (Peier, Reeve et al. 2002), TRPV4 (Watanabe, Vriens et al. 2002), así como algunos miembros de otras subfamilias como el TRPM3 (Vriens, Owsianik et al. 2011) y TRPM2 (Tan and McNaughton 2016) (Fig. 1.6).

Debido a la heterogeneidad de los estímulos capaces de activar a los canales TRP, y al creciente número de patologías en las que se les involucra (Moran 2018), su modulación representa una vía fundamental para el entendimiento de los mecanismos que subyacen en diferentes enfermedades, así como para el desarrollo de moduladores terapéuticos de estos canales.

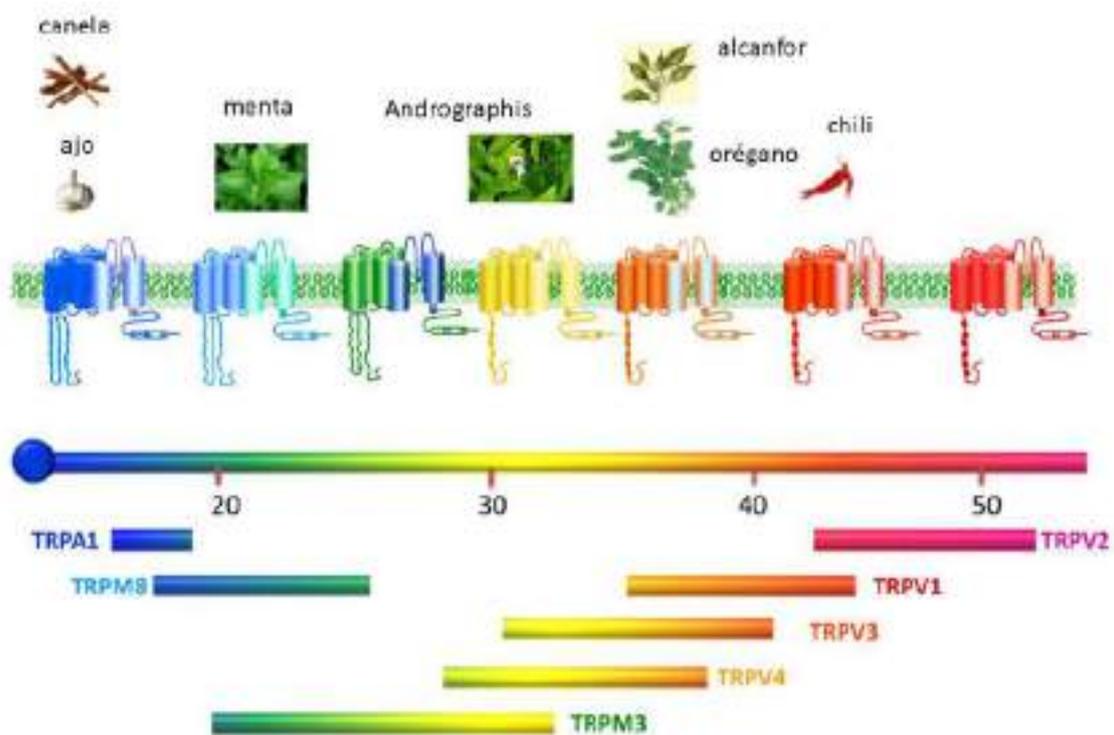


Figura 1.6. Los canales de potencial transitorio (TRP) termosensibles. Los canales TRP termosensibles responden a diferentes rangos de temperatura, presentando diferentes umbrales de activación, desde el frío nocivo (TRPA1) hasta el calor nocivo (TRPV2). Además, los canales TRPs se activan mediante compuestos naturales y sintéticos capaces de inducir sensaciones térmicas en humanos. Adicionalmente, estos canales pueden ser activados por diferentes sustancias químicas (modificado de Ferrandiz-Huertas, Mathivanan et al. 2014).

1.4 El canal iónico TRPA1

En este trabajo nos centraremos específicamente en el canal TRPA1, el único miembro hasta ahora descrito de la subfamilia TRPA.

Originalmente, la proteína fue detectada por primera vez en cultivos de fibroblastos humanos y llamada P120 debido a su peso molecular (127 KDa) (Jaquemar, Schenker et al. 1999). Años más tarde Story y colaboradores clonaron este canal a partir de una genoteca obtenida de neuronas del ganglio raquídeo de ratón (Story, Peier et al. 2003), denominándola ANKTM1 debido al gran número de repeticiones de ankirinas presentes en el extremo N-terminal de la proteína. Por otro lado, la presencia de seis dominios transmembrana hizo pensar en la posibilidad que esta proteína fuese un canal iónico. Tomando estas consideraciones estructurales Jaquemar y colaboradores sugieren en su trabajo del 1999 que P120 podría ser un nuevo miembro de la familia TRP (Jaquemar, Schenker et al. 1999). Con el paso de los años fue llamada TRPA1 y se comprobó su expresión en neuronas sensoriales teniendo un papel relevante en el sensado de compuestos irritantes.

TRPA1 es un canal catiónico con una alta permeabilidad a calcio. Este canal ha sido involucrado en la detección de una gran variedad de señales endógenas y exógenas muchas de las cuales resultan potencialmente dañinas. En mamíferos, por ejemplo, TRPA1 es activado por compuestos irritantes, frío intenso y estrés oxidativo, convirtiéndolo en una diana terapéutica atractiva (revisado por Talavera, Startek et al. 2019).

1.4.1 Estructura de TRPA1

Estructuralmente, el canal TRPA1 comparte similitudes con otros miembros de la familia TRP. Es un canal constituido por cuatro subunidades, cada una de ellas con seis segmentos transmembrana y donde el poro permeable a cationes se encuentra ubicado entre el quinto y sexto segmento (Fig. 1.7). Cuando la proteína se ensambla en un tetrámero, se consigue la configuración funcional del canal (Paulsen, Armache et al. 2015). Cada subunidad de TRPA1 está formado por 1119 aminoácidos en humanos, y 1115 en ratones, y con un peso molecular de aproximadamente 120-130 KDa, similar a otros miembros de la familia TRP. La región N terminal, es de mayor longitud que la presente en otros canales de la misma familia, debido a un gran número de repeticiones

de anquirina que, dependiendo de la especie, podrán variar de 14 a 17 (Brewster and Gaudet 2015), el canal TRPA1 humano presenta 16 repeticiones de anquirina. Inicialmente se demostró que la eliminación de éstas da como resultado una proteína no funcional y con el tráfico alterado hacia la membrana plasmática (Nilius, Prenen et al. 2011). Algunos trabajos han sugerido que las repeticiones de anquirinas podrían estabilizar el extremo N terminal a la membrana plasmática, contribuyendo así al correcto ensamblaje del mismo (Paulsen, Armache et al. 2015). Sin embargo, en el año 2014, Moparthi y colaboradores demostraron que TRPA1 puede ser funcional y estar plegado correctamente tras eliminar genéticamente los residuos de anquirina, por lo que la función de estas estructuras aún no está perfectamente definida (Moparthi, Survery et al. 2014). Adicionalmente, varios trabajos han propuesto que las repeticiones de anquirina podrían modular la unión de ligandos y también mantener el canal unido al citoesqueleto celular (Howard and Bechstetd 2004, Mosavi, Cammett et al. 2004, Lishko, Procko et al. 2007). En la región N terminal se encuentran también los residuos de cisteína y lisinas que resultan de gran importancia para la activación del canal por muchos compuestos electrofílicos (Macpherson, Dubin et al. 2007). Así, se ha demostrado que en TRPA1 humano, los residuos C621, C633 y C665 participan en la activación del canal por los compuestos de naturaleza electrófila, y que el sensor de cambios de calcio intracelular, que permite la activación de TRPA1, también está presente en el extremo N terminal (Zurborg, Yurgionas et al. 2007) (Fig. 1.7).

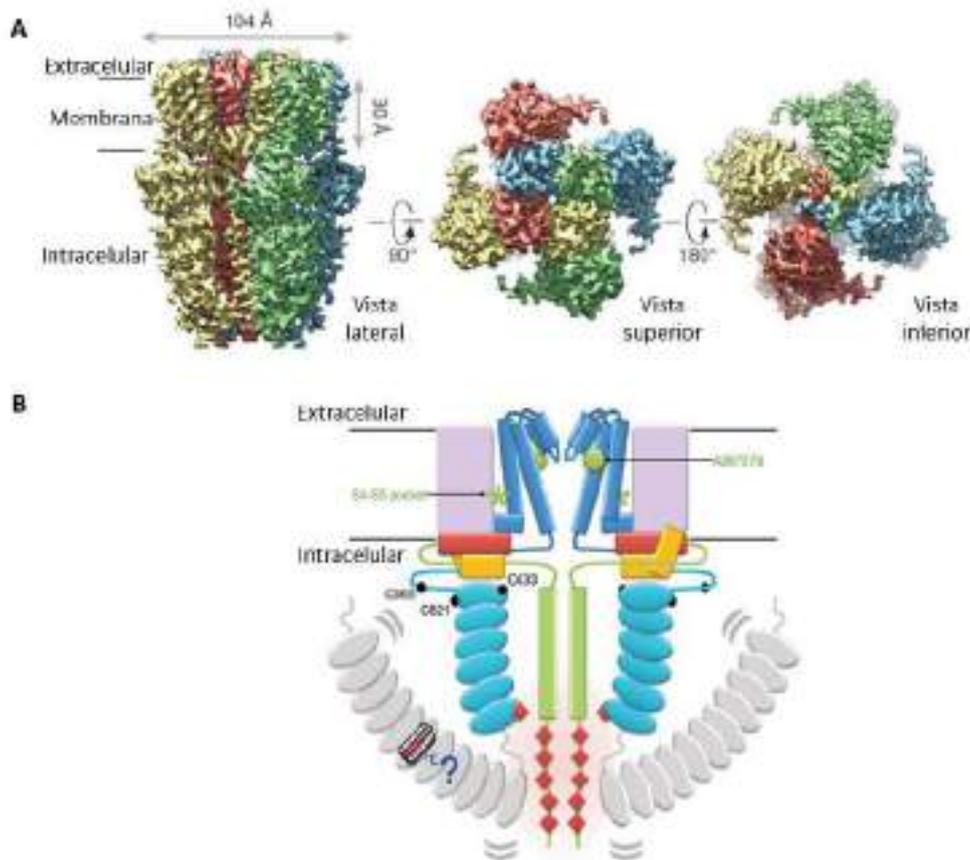


Figura 1.7 Estructura del canal TRPA1. A) Reconstrucción 3D del canal TRPA1 humano tratado con AITC a partir de imágenes de microscopía electrónica criogénica (cryo-EM). Cada monómero está representado con un color diferente. Se muestran tres vistas, lateral con sus dimensiones, superior e inferior. Modificado de Paulsen 2015. **B) Esquema topológico del canal TRPA1 humano basado en imágenes de microscopía electrónica criogénica (cryo-EM).** Los colores del esquema se describen en el sentido N a C-terminal: repeticiones de anquirina (turquesa), enlazador (amarillo), S1-S4 (lila), S5 – S6 (azul), dominio TRP (rojo), C-terminal (verde). Las regiones ausentes en la estructura se muestran en gris. El antagonista A967079 se representa como un círculo verde y el bolsillo S4 – S5 está marcado con un asterisco verde. Las posiciones de las cisteínas esenciales para la respuesta a los electrófilos reactivos están marcadas como círculos negros en la región N terminal. Las repeticiones de anquirina 1-11 del extremo N-terminal que faltan en la estructura del canal TRPA1, están en gris. Las líneas grises curvas denotan la supuesta flexibilidad de la vinculación entre 1–11 y las repeticiones restantes de anquirina. Las mutaciones intracelulares que perturban la potenciación dependiente de calcio o la inactivación de TRPA1 están marcadas con diamantes rojos que se agrupan en el extremo C-terminal (modificado de Brewster 2015).

1.4.2 Expresión de TRPA1

Como se mencionó en la sección anterior, originalmente TRPA1 fue descubierto en cultivos celulares de fibroblastos. Sin embargo, el gran salto en el conocimiento sobre el funcionamiento y propiedades del canal ocurrió tras la demostración de la expresión

de TRPA1 en neuronas nociceptivas, y su respuesta a frío intenso, por el grupo de Ardem Patapoutian en 2003 (Story, Peier et al. 2003).

En el sistema nervioso periférico, TRPA1 se expresa en las neuronas de los ganglios raquídeos, trigéminos y nodosos. TRPA1 se expresa en la subpoblación de fibras nerviosas nociceptivas C (no mielinizadas) y en las en las poco mielinizadas A δ , colocalizando frecuentemente con la expresión de TRPV1 (Fernandes, Fernandes et al. 2012). A nivel de sistema nervioso central, se ha demostrado la expresión de TRPA1 en la corteza somatosensorial, así como en el tronco encefálico de roedores (Kheradpezhoh, Choy et al. 2017).

La expresión de TRPA1 se extiende más allá del sistema nervioso. Se ha demostrado su expresión en muchos tejidos considerados con función protectora de barrera como: los vasos sanguíneos, la piel, los pulmones, el intestino, la vejiga, el páncreas, el riñón y células del sistema inmune (Fig. 1.8) (Bautista, Movahed et al. 2005, Fernandes, Fernandes et al. 2012, Nassini, Materazzi et al. 2014, Zygmunt and Hogestatt 2014, Viana 2016).

A nivel celular, TRPA1 presenta una distribución en membrana y también citoplasmática, aunque la localización específica todavía no se ha dilucidado completamente. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que TRPA1 reside en las balsas lipídicas de la membrana plasmática. Además, su localización en estas regiones ricas en colesterol repercute en la funcionalidad del canal, ya que se ha visto que la actividad de TRPA1 disminuye cuando los niveles de colesterol en la membrana celular se reducen (Startek, Boonen et al. 2019; Startek, Talavera 2020)

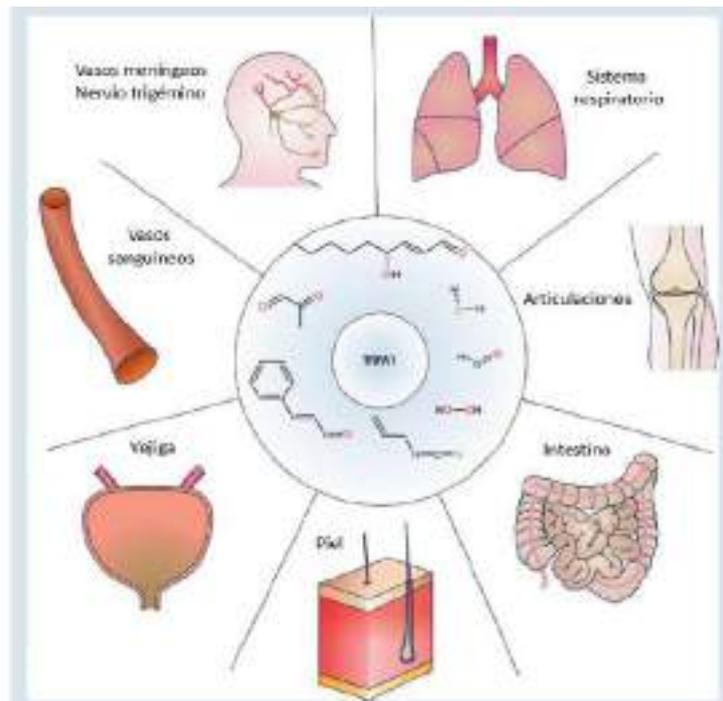


Figura 1.8 Expresión de TRPA1 en diferentes tejidos de barrera. TRPA1 se ha estudiado principalmente en el sistema nervioso periférico, pero también se expresa en diferentes tejidos considerados de barrera. Entre ellos se incluye el endotelio vascular y la piel, el pulmón, el intestino y las articulaciones. La presencia de TRPA1 en estos diferentes tejidos le otorga un papel biológico relevante como sensor de señales biológicamente dañinas (modificado de Viana 2016).

1.4.3 TRPA1 como sensor de temperatura

En el año 2003, Story y colaboradores demostraron por primera vez que el canal TRPA1 de ratón era capaz de activarse a bajas temperaturas en el rango nocivo ($\leq 17\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, este hallazgo ha sido cuestionado en estudios posteriores. La controversia continua: aunque muchos trabajos demuestran que TRPA1 en las isoformas de humano, ratón y rata se activa por frío nocivo (Sawada, Hosokawa et al. 2007, Fajardo, Meseguer et al. 2008, Karashima, Talavera et al. 2009, Talavera, Gees et al. 2009, del Camino, Murphy et al. 2010, Moparthi, Survery et al. 2014), otros grupos no han podido mostrar esta activación (Jordt, Bautista et al. 2004, Nagata, Duggan et al. 2005, Zurborg, Yurgionas et al. 2007).

Adicionalmente, en el año 2016, Moparthi y colaboradores exploraron si TRPA1 humano podría considerarse como un sensor térmico bimodal. Así, haciendo registros electrofisiológicos de canal único en un sistema de bicapa lipídica, encontraron que TRPA1 humano fue capaz de responder en un rango de temperaturas de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, obteniendo la máxima probabilidad de apertura del canal para temperaturas cercanas a

10 °C y 35 °C (Moparthi, Kichko et al. 2016). En el mismo año, Yarmolinsky y colaboradores utilizando registros de imagen de calcio *in vivo* en neuronas sensoriales del ganglio trigémino, demostraron la participación de TRPA1 en la detección de calor (hasta 47 °C) pero no de frío (Yarmolinsky, Peng et al. 2016).

Pese a estas controversias, muchos trabajos proponen a TRPA1 como sensor de frío directo y/o indirecto en estudios celulares y conductuales en ratas y ratones donde el papel como sensor de frío se ha visto pronunciado en situaciones patológicas (Kwan, Allchorne et al. 2006, del Camino, Murphy et al. 2010, Nassini, Gees et al. 2011, Barriere, Rieusset et al. 2012, Zhao, Isami et al. 2012, Miyake, Nakamura et al. 2016, Chukyo, Chiba et al. 2018).

Adicionalmente, se ha demostrado una clara diferencia inter-especies. Así, las isoformas de TRPA1 presentes en mosca, mosquito, rana, lagartijas, pollo, serpientes y los peces medaka y takifugu (pez globo) se activan por calor (revisado por Talavera, Startek et al. 2019).

1.4.4 TRPA1 como sensor mecánico

Originalmente se consideró a TRPA1 como un sensor implicado en la mecanotransducción en células receptoras auditivas en vertebrados y en fibras sensoriales cutáneas (Corey, García-Añoveros et al. 2004). Sin embargo, estudios posteriores en el ratón mutante para TRPA1 mostraron que los animales no presentan problemas auditivos, por lo que el canal no es indispensable para la audición (Bautista, Jordt et al. 2006, Kwan, Allchorne et al. 2006).

La sensibilidad mecánica se ha atribuido a las propiedades de las repeticiones de anquirina presentes en el extremo N terminal. Varios estudios han propuesto que estas repeticiones de anquirina actúan como amortiguadores biológicos, uniéndose al citoesqueleto y que esta unión le confiere elasticidad para compensar cambios de tensión en la membrana producidos por estímulos mecánicos generando la activación del canal (Corey, García-Añoveros et al. 2004, Howard and Bechstedt 2004).

Adicionalmente, se ha demostrado en diferentes estudios la capacidad de TRPA1 para detectar estímulos mecánicos en otros tipos celulares, como las células de Merkel y en neuronas sensoriales. Por ejemplo, Kerstein y colaboradores en el año 2009

demonstraron que a través del bloqueo farmacológico de TRPA1 en la preparación *ex vivo* de “skin-nerve” las respuestas a estímulos mecánicos en las fibras C se vieron marcadamente reducidas (Kerstein, del Camino et al. 2009). Simultáneamente, Kwan demostró, que en ratones deficientes para TRPA1, la tasa de disparo de potenciales de acción de las fibras C es 50 % menor respecto a los ratones silvestres. Además, este comportamiento también afectó a las fibras A δ (mecanociceptoras) en ratones deficientes para TRPA1 (Kwan, Glazer et al. 2009). Todo ello sugiere que TRPA1 modula la mecanotransducción en las fibras sensoriales que inervan la piel.

En condiciones *in vitro* se ha demostrado, que en odontoblastos de rata, TRPA1 fue capaz de responder a estímulos hipotónicos y cuya respuesta fue inhibida por la aplicación del antagonista HC-030031 (Tsumura, Sobhan et al. 2013). Sin embargo, trabajos previos han demostrado que la isoforma de TRPA1 de rata en cultivos de DRG o expresada en células HEK293 respondió a estímulos hipertónicos pero no a los hipotónicos (Zhang, Chen et al. 2008). En controversia con estos hallazgos, recientemente, Fujita y colaboradores demostraron que la variedad TRPA1 de humano expresado en células HEK293 también respondió a la estimulación con una solución hipotónica (Fujita, Uchida et al. 2018).

1.4.5 TRPA1 como sensor químico

En multitud de estudios, se ha demostrado que TRPA1 responde como quimiosensor de gran cantidad de sustancias químicas con estructuras moleculares muy diferentes. En concreto, sustancias químicas irritantes endógenas y exógenas activan a TRPA1 (Andrade, Meotti et al. 2012, Bautista, Pellegrino et al. 2013).

Kang y colaboradores demostraron en 2010 que el papel de TRPA1 como detector de sustancias electrófilas aversivas se ve conservado en *Drosophila* y en mosquito. Además, en su estudio filogenético observaron que incluso esta característica se conserva en esponjas de mar, concluyendo que esta función de TRPA1 tiene un origen realmente ancestral (Kang K et al., 2010).

Existen numerosas sustancias que actúan como agonistas directos de TRPA1 y como moduladores de su actividad. Así, TRPA1 es activado por los isotiocianatos (compuestos biológicos activos en crucíferas como la planta de mostaza) y tiosulfatos

(compuestos azufrados) como la alicina y el dialil disulfido responsables del olor aliáceo presente el ajo (Fig. 1.9) (Bautista, Movahed et al. 2005, Julius 2013). TRPA1 también puede activarse con cinamaldehído (presente en aceite de canela), carvacrol (presente en el orégano), jengibre y aldehídos insaturados como acroleína, entre otros (Viana 2011). En los años 2006 y 2007, los grupos de David Julius y Ardem Patapoutian demostraron que el aceite de mostaza, cinamaldehído, dialil disulfido, y acroleína son capaces de activar TRPA1 debido a una modificación covalente en los residuos de cisteína presentes en el extremo N terminal del canal (Hinman, Chuang et al. 2006, Macpherson, Dubin et al. 2007).

Probablemente, el activador de TRPA1 más utilizado en distintos trabajos experimentales, es el isotiocianato de alilo (AITC), compuesto picante del aceite de mostaza. Desde hace muchos años, este compuesto se ha utilizado experimentalmente para inducir inflamación neurogénica y la consecuente liberación de neuropéptidos inflamatorios (Louis, Jamieson et al. 1989) pero no fue hasta el año 2004 cuando Jordt y colaboradores descubrieron el mecanismo de acción de esta sustancia, convirtiéndola en uno de los activadores de TRPA1 más robustos (Jordt, Bautista et al. 2004). El AITC es considerado el agonista de TRPA1 por excelencia por la selectividad que ha demostrado a concentraciones del orden micro molar. Sin embargo, a concentraciones más elevadas el AITC también activan otros canales TRP (Gees, Alpizar et al. 2013), por lo que la interpretación de algunos resultados *in vivo* debe de hacerse con cierta cautela.

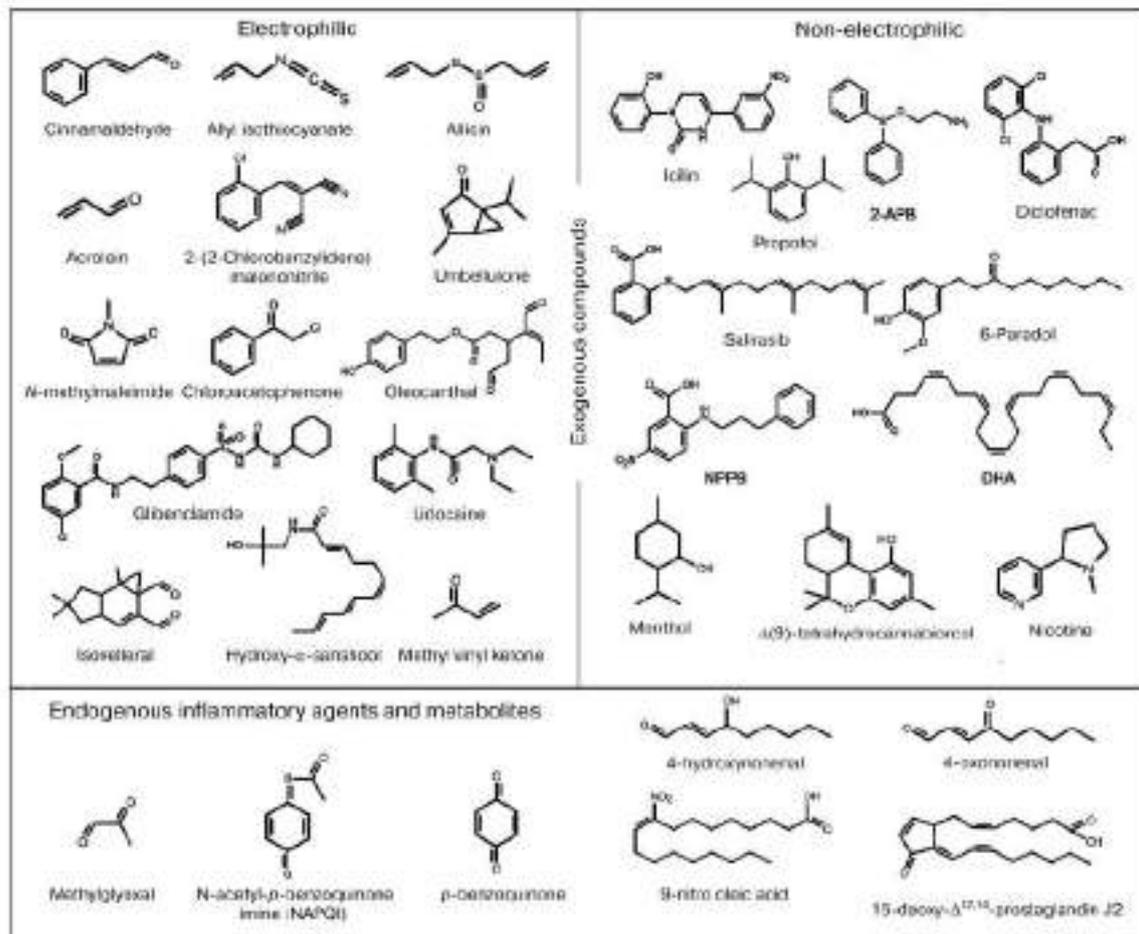


Figura 1.9. Algunos activadores endógenos y exógenos del canal TRPA1 (extraído de Logashina, Korolkova et al. 2019).

TRPA1 además de ser un canal permeable a calcio, puede ser activado directamente por los iones de calcio intracelular (Zurborg, Yurgionas et al. 2007). Así, el flujo de calcio a través de los canales TRPA1 abiertos produce una retroalimentación positiva que potencia la activación del canal. La activación es seguida por la desensibilización dependiente de Ca^{2+} que ayuda a generar un estado de homeostasis. Además, TRPA1 también es activado por otros cationes divalentes como el Cd^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} (Viana and Ferrer-Montiel 2009).

Productos endógenos del estrés oxidativo como son las especies reactivas de oxígeno (ROS), hiperoxia e hipoxia también son activadores de este canal (Trevisani, Siemens et al. 2007, Andersson, Gentry et al. 2008, Miyake, Nakamura et al. 2016). El peróxido de hidrógeno, H_2O_2 y la deoxy-d (12,14)-prostaglandina J2, son productos del estrés oxidativo y se ha mostrado que actúan a través de TRPA1 en diversas patologías produciendo dolor (Fig. 1.8) (Viana and Ferrer-Montiel 2009). El H_2O_2 se produce

intracelularmente a bajas cantidades en condiciones fisiológicas pero se ve incrementada en escenarios patológicos como las neuropatías periféricas (neuropatía inducida por oxaliplatino por ejemplo) y se ha demostrado que es un agonista de TRPA1 (Bessac, Sivula et al. 2008, Chen, Lian et al. 2019).

Los fosfolípidos y las lipoproteínas presentes en las membranas celulares se convierten en fosfolípidos oxidados (OxPL) por el estrés oxidativo. Oehler y colaboradores demostraron que el OxPAPC, presente en muestras de tejido inflamado es capaz de activar a TRPA1. Esta activación a través de la modificación de cisteínas induce dolor agudo, hiperalgesia y liberación inducida de péptidos pro-nociceptivos (Liu, Tai et al. 2016, Oehler, Kistner et al. 2017)

TRPA1 también tiene un importante rol como sensor de sustancias dañinas. El sulfuro de hidrógeno (H₂S), es un gas sintetizado en el sistema nervioso central y periférico. Se le ha descrito como modulador de distintas funciones biológicas como la nocicepción. Se ha demostrado que H₂S causa inflamación neurogénica y provoca hiperalgesia. Ogawa y colaboradores demostraron que H₂S es capaz de activar a TRPA1, provocando dolor agudo (Ogawa, Takahashi et al. 2012).

Así mismo, se ha demostrado que la bradiquinina, sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), prostanglandinas A2 y J2 también son activadores de TRPA1 (Bandell, Story et al. 2004, Taylor-Clark, McAlexander et al. 2008, Nilius, Appendino et al. 2012, Nassini, Materazzi et al. 2014).

La acidificación intracelular y extracelular también son activadores de este canal. En situaciones de inflamación se producen cambios en el pH extracelular y se ha demostrado que en situaciones de daño tisular valores de pH igual o por debajo de 7 activan a TRPA1 humano (Takahashi, Mizuno et al. 2008, de la Roche, Eberhardt et al. 2013).

Por otro lado, la alcalosis intracelular activa a TRPA1 humano y de ratón. Así, Fujita y colaboradores en 2008 mostraron la activación de TRPA1 por la alcalinización intracelular en registros de electrofisiológicos de "patch-clamp inside-out". Adicionalmente, la alcalosis extracelular también es capaz de activar a TRPA1, ya que experimentos en los que se realizó la inyección intraplantar de cloruro de amonio indujo

comportamientos nocifensivos en ratones silvestres que no se observaron en los ratones deficientes para TRPA1 (Fujita, Uchida et al. 2008).

1.4.6 Mecanismo de activación de TRPA1 por sustancias químicas

Si bien la naturaleza de los activadores de TRPA1 es muy diferente, muchos de ellos son compuestos electrófilos (aquellos capaces de aceptar electrones en una reacción química). Estos compuestos tienen la capacidad de modificar covalentemente los residuos de cisteína y lisinas presentes en el canal, produciendo su activación (Hinman, Chuang et al. 2006, Macpherson, Dubin et al. 2007, Bang and Hwang 2009, Sadofsky, Boa et al. 2011).

TRPA1 humano presenta 28 residuos de cisteínas (Viana 2016) pero se ha demostrado que los compuestos electrófilos son capaces de modificar solo unas pocas de ellas. De hecho, se han identificado tres cisteínas (en humano Cys621, Cys641, Cys 665 y en ratón Cys415, Cys422, Cys622) como sitios sensibles a isotiocianatos como el isotiocianato de alillo (AITC) (Hinman, Chuang et al. 2006, Macpherson, Dubin et al. 2007). Sin embargo, en 2014 Moparthy y colaboradores demostraron la activación de TRPA1 humano por compuestos electrofílicos en ausencia de los primeros 668 aminoácidos (porción N terminal que incluye también los residuos de anquirinas) lo que demuestra que la existencia de otros mecanismos de activación para estos compuestos (Moparthy, Survery et al. 2014).

Por otro lado, activadores no electrofílicos como el carvacrol (presente en el orégano) y nicotina o el mentol también activan a TRPA1, pero sin modificar los residuos de cisteínas y sin establecer enlaces covalentes. El mentol tiene una acción dual, a bajas concentraciones actúa como activador, pero a altas concentraciones actúa como bloqueante. Se cree que este tipo de compuestos se unen de manera directa al canal para producir su activación temporal en un sitio localizado dentro del quinto dominio transmembrana, siendo este el mismo sitio de acción que el del mentol (Xu, Blair et al. 2005, Lee, Buber et al. 2008, Viana and Ferrer-Montiel 2009, Zygmunt and Hogestatt 2014). Meents y colaboradores en el año 2016 demostraron que el mutando los aminoácidos S873 y T874 presentes en el quinto dominio transmembrana de TRPA1

humano, eran capaces de abolir completamente la sensibilidad a carvacrol (Meents, Fischer et al. 2016).

1.4.7 Bloqueantes de TRPA1

En comparación con el gran número de agonistas identificados para TRPA1, el número de antagonistas específicos descritos es relativamente menor, aunque rápidamente creciente (Logashina, Korolkova et al. 2019, Talavera, Startek et al. 2019). Una de las principales restricciones en encontrar antagonistas efectivos es la diferencia inter-especies existente. Así, compuestos que han mostrado buenos resultados en modelos animales no presentan la misma eficacia en ensayos clínicos (Klionsky, Tamir et al. 2007).

Entre los primeros productos químicos identificados como bloqueantes de TRPA1 se encuentran el rojo de rutenio y la gentamicina aunque esta inhibición no es específica, actuando también sobre otros canales (Nagata, Duggan et al. 2005). Existen otros compuestos que han demostrado la inhibición de la actividad de TRPA1 pero que dependiendo de las concentraciones también son capaces de activarlo. Uno de ellos es el alcanfor, que utilizado a altas concentraciones (10 mM) es capaz de inhibir la activación de TRPA1 por aceite de mostaza. Sin embargo, este compuesto es conocido por su capacidad de activar no solo TRPA1, si no también TRPV1 y TRPV3 (Xu, Blair et al. 2005).

Mecamilamina es un inhibidor de los receptores nicotínicos de acetilcolina y ha mostrado ser un bloqueante de TRPA1 a concentraciones más altas que las necesarias para inhibir los receptores nicotínicos (Talavera, Gees et al. 2009).

HC-030031 ($IC_{50} \leq 1.8 - 20 \mu M$) (Fig. 1.10) fue el primer bloqueante selectivo de TRPA1 desarrollado en 2007 por la compañía farmacéutica Hydra Biosciences. Este compuesto pertenece al grupo de los antagonistas creados a base de xantinas que se une al canal para inhibir su actividad de manera reversible (McNamara, Mandel-Brehm et al. 2007, Baraldi, Preti et al. 2010). A nivel de experimentación *in vitro*, HC-030031 ha demostrado una alta eficiencia en la inhibición de las corrientes de TRPA1 inducidas por AITC, así como una rápida reversión del efecto. La potencia de este inhibidor también ha sido ampliamente demostrada en experimentos de imagen de calcio *in vitro*. HC-030031 ha sido utilizado *in vivo* a altas concentraciones (100-300 mg/Kg) con buenos

resultados en ratas revirtiendo la alodinia mecánica provocada por la inyección intraplantar de CFA (“Complete Freund’s Adjuvant”) (Eid, Crown et al. 2008). También se han encontrado resultados favorables en ratas en estudio de la alodinia mecánica provocada por la compresión de crónica del ganglio raquídeo (CCD), cuando se realizó una inyección intratecal de 50 µg de HC-030031 (Zhang, Liu et al. 2014). En ratones se observó que la inyección sistémica de HC-030031 (100 mg/Kg) fue capaz de revertir la alodinia mecánica y al frío provocada por la constricción crónica del nervio ciático (CCI) (Pinheiro Fde, Villarinho et al. 2015).

En 2007 el laboratorio de Patapoutian testó un nuevo compuesto, AP18, que mostró buena especificidad en la inhibición de TRPA1 en cultivos celulares mediante imagen de calcio *in vitro*, registros de electrofisiología y experimentos conductuales. AP18 mostró mejorías en diversas pruebas de comportamiento en la hiperalgesia mecánica presente en la neuropatía por Coadyuvante de Freud (CFA) en ratones (Petrus, Peier et al. 2007). Sin embargo, posteriormente se demostró que las oximas relacionadas con AP18 tienen tanto actividad agonista como antagonista sobre TRPA1 (Defalco, Steiger et al. 2010), además de demostrarse que no es capaz de inhibir a TRPA1 en algunas especies como en la rana occidental (Nakatsuka, Gupta et al. 2013).

Posteriormente, Orion Pharma publicó la síntesis de otro compuesto, también a base de xantinas, el TCS 5861528, también llamado Chembridge-5861528, mostrando un efecto más potente que el HC-030031. Wei y colaboradores demostraron en 2009 que Chembridge-5861528 atenúa la hipersensibilidad mecánica en un modelo animal de diabetes (Wei, Hamalainen et al. 2009).

La farmacéutica Abbott desarrolló un nuevo compuesto, A-967079 ($IC_{50} = 67 - 209$ nM) (Fig. 1.10), se trata de otra oxima y se lo considera como el más potente antagonista de TRPA1 en mamíferos. A concentraciones muy bajas (nanomolares), A-967079 ha mostrado atenuar la alodinia al frío producida por una lesión nerviosa en ratas, sin alterar la sensación a frío nocivo en animales sin lesión (Chen, Joshi et al. 2011).

Poco tiempo después, Nakatsuka y colaboradores identificaron el sitio de acción de A-967079 dentro del quinto dominio transmembrana (Nakatsuka, Gupta et al. 2013). Recientemente, se ha demostrado que la inyección intragástrica de A967079 (100

mg/Kg) y HC-030031 (300 mg/Kg) revierte la alodinia mecánica y al frío en un modelo de dolor de cáncer de piel (melanoma) (Antoniuzzi, Nassini et al. 2019).

Respecto a ensayos en humanos, Hydra Biosciences obtuvo pruebas clínicas exitosas en fase I con un compuesto denominado CB-625 aunque el estudio fue interrumpido por problemas de baja solubilidad (Preti, Saponaro et al. 2015). La farmacéutica india, Glenmark Pharmaceuticals, SA, ha testado un nuevo antagonista GRC-17536 en pacientes con neuropatía periférica por diabetes y en pacientes con trastornos respiratorios cuyas pruebas clínicas se encuentran en fase II (Mukhopadhyay, Kulkarni et al. 2014).

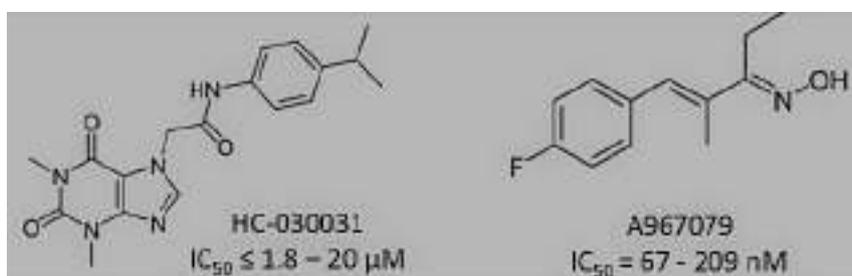


Figura 1.10. Antagonistas del canal TRPA1 más utilizados en modelos animales y experimentación *in vitro* (modificado de Preti, Saponaro et al. 2015)

1.5 TRPA1 y dolor

Con el paso del tiempo, la vinculación del canal TRPA1 y diferentes patologías dolorosas se ha visto incrementada. Así, solo en el último año, se han publicado más de cien artículos científicos donde se relaciona a TRPA1 con inflamación neurogénica, dolor neuropático y dolor visceral, entre otros, denotando una fuerte vinculación de este canal en patologías de diferente etiología (revisado por Koivisto, Jalava et al. 2018, Logashina, Korolkova et al. 2019).

Debido a que el canal TRPA1 se expresa en una gran cantidad de tejidos, y por su promiscua activación por moléculas endógenas, se lo ha relacionado con una gran cantidad de condiciones dolorosas en las cuales su modulación podría significar una ventana hacia terapias útiles para el tratamiento del dolor.

Se ha demostrado que la mutación en el gen TRPA1 altera la percepción del dolor. Específicamente, se ha descrito una mutación (N855S) en el segmento

transmembrana S4 de TRPA1 humano que provoca un síndrome de dolor episódico familiar. Esta enfermedad se caracteriza por episodios de dolor intenso provocado por el frío, el ayuno y la fatiga (Kremeyer, Lopera et al. 2010). Las pruebas sensoriales realizadas en pacientes con el síndrome mostraron hiperalgesia cuando se realizó una aplicación tópica de aceite de mostaza en las extremidades superiores. Sin embargo, los umbrales sensoriales basales no se vieron modificados. Además, Kremeyer y colaboradores demostraron que esta mutación altera las propiedades biofísicas del canal hTRPA1 (cuando fue transfectado en células HEK293), donde la corriente de entrada dependiente de TRPA1 fue cinco veces mayor que en condiciones normales y que ésta fue inhibida con la aplicación del antagonista de TRPA1, HC-03001.

Los modelos animales, especialmente en roedores, han demostrado que tanto la inhibición farmacológica de TRPA1 como la eliminación genética de éste reduce el comportamiento nocifensivo en modelos de dolor neuropático, inflamatorio y visceral, donde la nocicepción provocada por estímulos de frío y mecánicos se ve más disminuida (revisado por Moran 2018).

Entre los mecanismos por los cuales, la activación del canal TRPA1 se asocia a la sensación de dolor se encuentra ha descrito, además de la activación directa por compuestos altamente dañinos (algunos de los cuales han sido mencionados en el apartado 1.4.5), la potenciación de la actividad del canal TRPA1 por los receptores acoplados a proteínas G.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son proteínas de membrana que junto con los canales TRP se consideran los principales detectores de estímulos nocivos, irritantes e inflamatorios (Chen and Hackos 2015). En las neuronas sensoriales primarias, la activación de los receptores acoplados a proteínas (GPCR) por mediadores de la inflamación (bradiquinina, histamina, prostaglandinas) pueden activar mediante rutas intracelulares a los canales TRP, provocando a su vez la activación de los canales de sodio dependientes de voltaje, la consecuente despolarización y la transmisión de las señales sensoriales (Fig. 1.11) (Geppetti, Veldhuis et al. 2015, Talavera, Startek et al. 2019).

La activación de los GPCR por algunos mediadores inflamatorios, estimula la enzima fosfolipasa C (PLC) y ésta la formación de inositol tripofato (IP3) y diacilglicerol (DAG) por hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2). El IP3 se une a sus

receptores produciendo la liberación de calcio al interior celular desde los almacenamientos presentes en el retículo endoplasmático (RE).

Una de las posibles vías de sensibilización del canal TRPA1 en diversos contextos de dolor, se cree que esta mediada por la activación de TRPA1 a través de la liberación de calcio intracelular, activador de TRPA1, y la consecuente eliminación del efecto inhibitor del PIP2 (Fig. 1.11). Adicionalmente, el incremento de calcio intracelular promueve la liberación de neuropéptidos como la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) los cuales son mediadores proinflamatorios capaces de activar al canal TRPA1. Adicionalmente, el DAG y la activación de la proteína kinasa C (PKC) mediada por calcio intracelular producen la sensibilización de TRPA1 y la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) por los GPCR produce la formación de metabolitos de ácido araquidónico, los cuales se han descrito como activadores endógenos de TRPA1 (Talavera, Startek et al. 2019). Estos compuestos endógenos, junto con los liberados por el estrés oxidativo, contribuyen a generar cuadros de dolor persistente y crónico en muchas patologías como la migraña, el dolor visceral, la osteoartritis, la gota, la neuropatía periférica inducida por diabetes y la neuropatía producida por sustancias quimioterapéuticas, entre otras (Koivisto, Chapman et al. 2014, Nassini, Materazzi et al. 2014, Chen and Hackos 2015, Viana 2016).

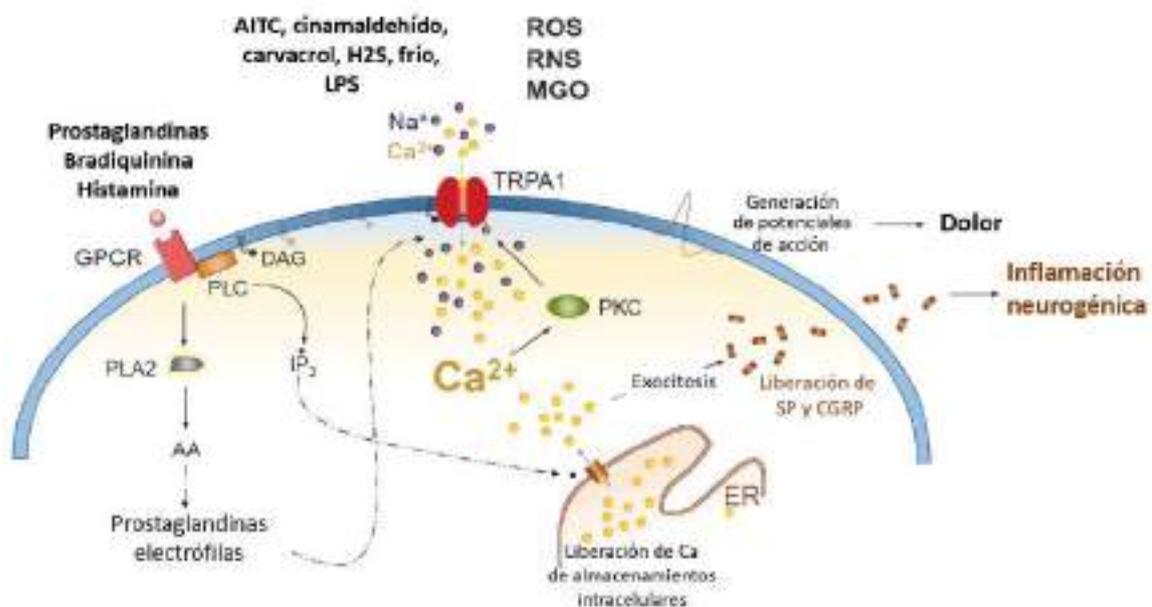


Figura 1.11. Activación y sensibilización del canal TRPA1. TRPA1 es modulado de diferentes maneras y se lo considera como un integrador de señales nociceptivas. La activación directa de TRPA1 por agonistas

o diferentes sustancias como ROS, RNS, LPS desencadena la generación de potenciales de acción en neuronas sensoriales que se transmiten como señales dolorosas. La actividad de TRPA1 puede potenciarse por sustancias liberadas en el interior celular. La activación de los GPCR por sustancias inflamatorias como la histamina o bradiquinina provocan la activación de la PLC la cual, por hidrólisis de PIP2 y la consecuente eliminación de su efecto inhibitorio sobre TRPA1, produce IP3 y DAG. El IP3 se une a sus receptores en el RE induciendo la liberación de calcio desde los sitios de almacenamiento. El aumento de la concentración de calcio intracelular liberado activa a TRPA1 y potencia el efecto de sus agonistas. El calcio intracelular produce la exocitosis de péptidos proinflamatorios como SP y CGRP los cuales al atravesar la membrana celular son capaces de activar a TRPA1 provocando una retroalimentación positiva, proceso llamado inflamación neurogénica (modificado de Talavera, Startek et al. 2019).

1.5.1 Neuropatía periférica inducida por oxaliplatino (NPIO)

El oxaliplatino (Fig. 1.12) es un agente quimioterapéutico que forma parte de los antineoplásicos a base de platino y representa la tercera generación de este tipo de fármacos. La administración de oxaliplatino es altamente efectiva en el tratamiento de diversos tipos de cáncer como el de mama, pulmón y especialmente en el tratamiento del cáncer colorrectal. Si bien, con el tratamiento de oxaliplatino la tasa de pacientes que sobreviven se ha visto incrementada en la última década, un alto porcentaje de éstos desarrolla efectos secundarios, comúnmente denominados como neuropatía periférica inducida por oxaliplatino (NPIO).

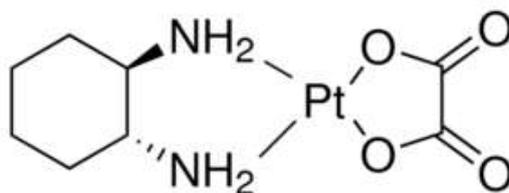


Figura 1.12. Estructura molecular del compuesto oxaliplatino. Extraído del catálogo comercial de Sigma-Aldrich.

Los efectos neurotóxicos del oxaliplatino incluyen el desarrollo de una neuropatía que se puede clasificar en una fase aguda y otra crónica. La fase *aguda* y transitoria ocurre a las pocas horas de la infusión del fármaco y puede disminuir entre los ciclos del tratamiento. Se caracteriza por disestesias y parestesias en las manos y los pies. Es común que la exposición y contacto a temperaturas frías induzca o enfatice estos síntomas definiendo cuadros de alodinia al frío y mecánica (Argyriou, Cavaletti et al. 2013, Pachman, Qin et al. 2015). Además de los mencionados, suelen manifestarse

síntomas motores como espasmos o contracciones musculares prolongadas (Saif and Reardon 2005, Argyriou, Cavaletti et al. 2013). Si el paciente está bajo una administración repetida del fármaco, la neuropatía aguda puede mudar a un estado grave crónico (Extra, Marty et al. 1998). La fase *crónica* es inducida por la dosis acumulada del fármaco y suele manifestarse cuando los valores superan los 540 mg/m² (Cersosimo 2005, Argyriou, Cavaletti et al. 2013). Los síntomas en esta fase también incluyen la presencia de alodinia e hiperalgesia al frío y alodinia mecánica focalizados también en las extremidades corporales. Adicionalmente, si los valores de oxaliplatino acumulado supera los 780 mg/m² los pacientes pueden presentar cambios en la propiocepción, afectando actividades de coordinación motora fina (Cersosimo 2005, Saif and Reardon 2005).

Resulta importante destacar que lograr la efectividad en los tratamientos quimioterapéuticos implica el uso de altas dosis de oxaliplatino y que, debido a la neuropatía periférica que se desarrolla, en muchos casos la única opción es suspender el tratamiento o limitar la dosis terapéutica (Pachman, Qin et al. 2015).

Si bien la fase aguda de la NPIO en muchos casos es reversible, desapareciendo antes del siguiente ciclo de administración, la sintomatología de la fase crónica solo es parcialmente reversible en aproximadamente un 80 % de los casos. Únicamente se resuelven completamente en un 40 % de los pacientes y esto requiere un período de cuatro a seis meses. Si la neuropatía no desaparece luego de nueve meses de finalizado el tratamiento, es considerado un cuadro clínico irreversible (Sisignano, Baron et al. 2014). Con esta evidencia explícita, el mensaje de urgencia por desarrollar terapias nuevas y eficientes contra el dolor parece casi trivial.

1.5.1.1 Fisiopatología de la NPIO

Los fármacos quimioterapéuticos a base de platino cruzan la barrera hematoencefálica de manera poco eficiente, pero pueden acceder a los ganglios raquídeos (DRG) (Malik and Stillman 2008). Esta característica le confiere mayor vulnerabilidad al sistema nervioso periférico por estos agentes y su posterior afectación sensitiva. (Windebank and Grisold 2008). El oxaliplatino, al igual que otros compuestos a base de platino, interfiere con la proliferación de células tumorales y esto lo logra a

través de los enlaces o “aductos” que el platino genera con el ADN lo que conlleva a la inhibición de la síntesis del mismo (Jung and Lippard 2007). La presencia de estos aductos provoca modificaciones en la maquinaria celular, interfiriendo en el proceso de transcripción y reparación celular dando como consecuencia la activación de las vías apoptóticas.

Los mecanismos celulares y moleculares que contribuyen al desarrollo de la neuropatía aún no están bien establecidos. Uno de ellos sugiere que el oxaliplatino, una vez dentro de las células, se degrada en oxalato y en dicloro platino, $Pt(DACH)Cl_2$. El oxalato produce la quelación del calcio intracelular causando alteraciones en el potencial de la membrana neuronal y la actividad de los canales iónicos activados por voltaje (Sisignano, Baron et al. 2014). Sin embargo, existe controversia en cómo afecta el oxalato en el desarrollo de la neuropatía. Sakurai y colaboradores en el año 2009 mostraron que la inyección intraperitoneal repetida (1.3 mg/Kg dos veces por semana) de oxalato produjo el desarrollo de alodinia e hiperalgesia al frío en una fase temprana, desde horas posteriores a la administración de oxalato, la cual se mantuvo hasta tres semanas. Sin embargo, la administración de oxalato no produjo cambios en la sensibilidad mecánica. Por otro lado, observaron que la inyección de platino solo indujo alodinia mecánica en una fase tardía (a partir de la segunda semana). En función de estos resultados, los autores vinculan al oxalato con el desarrollo de la hipersensibilidad (alodinia e hiperalgesia) al frío (Sakurai, Egashira et al. 2009). Sin embargo, Deuis y colaboradores en el año 2013 mostraron que una inyección intraplantar de oxalato no produce hipersensibilidad, ni mecánica ni al frío, aunque subiendo la dosis aplicada los ratones desarrollaban alodinia mecánica (Deuis, Zimmermann et al. 2013). Recientemente, Pereira y colaboradores demostraron que la inyección intraperitoneal de oxalato (1.7 mg/ kg una dosis cada siete días) induce alodinia mecánica a partir de la segunda semana pero no encontraron cambios en la sensibilidad al frío (Pereira, de Oliveira et al. 2018).

Park y colaboradores sugieren con sus trabajos que la fase aguda que se desarrolla en la neuropatía por oxaliplatino es debida en gran medida a la alteración transitoria de los canales de sodio de las membranas axonales, mientras que la fase crónica podría deberse a cambios en la excitabilidad sensorial debido a la dosis

acumulada (Park, Lin et al. 2009). Dentro de los canales de sodio dependientes de voltaje, la isoforma Na_v 1.6 ha sido relacionada con el desarrollo de la hipersensibilidad al frío por oxaliplatino en la fase aguda de la neuropatía. Sittl y colaboradores mostraron, en el año 2012, que en condiciones *in vitro*, la aplicación de oxaliplatino y frío es capaz de enlentecer la cinética de inactivación en Na_v 1.6 y aumentar la probabilidad de apertura del canal. (Sittl, Lampert et al. 2012). Por otro lado, Deuis y colaboradores en el año 2013, utilizando una inyección intraplantar de oxaliplatino en ratones, mostraron que la inhibición farmacológica del canal Na_v 1.6 abolió la alodinia al frío previamente desarrollada (Deuis, Zimmermann et al. 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que el tratamiento con oxaliplatino indujo un incremento en la expresión de ARNm de Na_v 1.8 (Descoeur, Pereira et al. 2011) aunque otras publicaciones la administración de bloqueantes selectivos para el canal Na_v 1.8 o ratones deficientes de este desarrollaron alodinia al frío por administración de oxaliplatino (Deuis, Zimmermann et al. 2013). Por lo que la contribución de estos canales aún no ha sido clarificada.

Respecto a los canales de potasio, diferentes publicaciones han mostrado una regulación negativa de éstos en la neuropatía periférica por oxaliplatino. Así, Descoeur y colaboradores encontraron una disminución en los niveles de expresión de ARNm de TREK-1 y TRAAK así como K_v 1.1 en neuronas de DRG (Descoeur, Pereira et al. 2011). Recientemente se ha publicado que el uso de riluzol, un activador de los canales TREK-1 y TRAAK es capaz de prevenir los déficits sensoriales (alodinia al frío y mecánica) así como los déficits motores inducidos por oxaliplatino a través de la modulación del canal TREK-1 en un modelo animal en ratón (Poupon, Lamoine et al. 2018).

Los efectos del oxaliplatino no se explican completamente por su interacción con canales de sodio y de potasio, por lo que deben existir otros mecanismos que contribuyen al desarrollo de la NIPO. Se conoce que el oxaliplatino provoca un incremento en el estrés oxidativo celular activando vías de muerte celular (Carozzi, Canta et al. 2015).

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres, que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en

diferentes procesos celulares. Su función principal es la generación de adenosin trifosfato (ATP), a través de la fosforilación oxidativa. Este proceso es producido por la cadena transportadora de electrones que, por naturaleza, a través de reacciones de óxido-reducción, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical superóxido (Davies 2000). En condiciones normales las mitocondrias producen una pequeña cantidad ROS. Sin embargo, el oxaliplatino, como otros agentes quimioterapéuticos, causan daño a las mitocondrias, generando un incremento en la producción de ROS lo que se traduce en un mayor estrés oxidativo (Sangeetha, Das et al. 1990, Look and Musch 1994, Weijl, Cleton et al. 1997, McDonald and Windebank 2002). También, se ha descrito que el aumento patológico en la producción de ROS puede inducir procesos de sensibilización de la transducción de información (Jiang, Hu et al. 2011).

Además de los cambios que se han demostrado en los canales de sodio y potasio, se ha vinculado esta neuropatía con los canales TRP. No es extraño pensar que estos canales sensoriales encargados de sensar estímulos de diversas modalidades se vean alterados en esta neuropatía. Debido al cuadro clínico bien definido en la NPIO distintos candidatos se han propuesto como contribuyentes de los síntomas. Entre ellos encabezan la lista el canal TRPA1, TRPM8 y TRPV1, aunque la contribución específica de cada uno de ellos está aún en tela de juicio debido a la falta de resultados debidamente replicados y a la falta de información acerca de los posibles mecanismos de actuación (Fig. 1.13) (Descoeur, Pereira et al. 2011, Chukyo, Chiba et al. 2018).

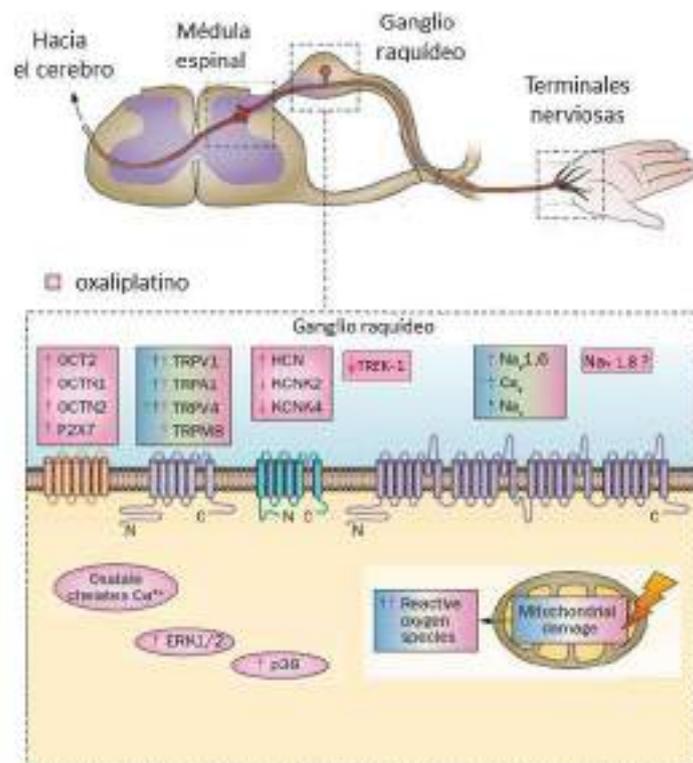


Figura 1.13: Esquema del mecanismo del dolor neuropático periférico inducido por quimioterapia. Alteraciones fisiopatológicas desencadenadas por oxaliplatino (rosa) en los ganglios raquídeos (modificado de Sisignano, Baron et al. 2014).

TRPA1 se expresa en gran medida en las fibras C nociceptivas que inervan estructuras como la piel. Este canal se considera muy promiscuo en su mecanismo de activación, ya que responde a una gran cantidad de sustancias consideradas como dañinas, productos químicos irritantes, estrés oxidativo y frío nocivo. Se ha demostrado que el pretratamiento con oxaliplatino en cultivos celulares de neuronas de DRG produce un aumento en el número de neuronas sensibles a AITC, agonista específico de TRPA1, pero no genera ningún cambio en las respuestas a agonistas de TRPM8 ni TRPV1 (Zhao, Isami et al. 2012). Trabajos previos en nuestro laboratorio han mostrado que la ausencia del canal TRPM8 produce un déficit en la detección de estímulos de frío pero que éste no es suficiente para evitar el desarrollo de la neuropatía por oxaliplatino. Sin embargo, el antagonismo del canal TRPA1 pudo revertir la hipersensibilidad mecánica y al frío y ratones deficientes de TRPA1 no la desarrollaron (Fernández-Peña 2015).

1.5.1.2 TRPA1 en la neuropatía inducida por quimioterapéuticos

Existen estudios, la mayoría desarrollados en modelos animales, en los cuales se ha vinculado a TRPA1 con en el desarrollo de esta neuropatía (Fernández-Peña 2015, Yamamoto, Chiba et al. 2015).

Como se mencionó en el apartado 1.4.5, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son capaces de activar a TRPA1. Además se ha demostrado que en la fase crónica de NPIQ, especialmente por oxaliplatino, existe una disfunción mitocondrial y la consecuente producción de ROS lo que podría indicar que al menos parte de la NPIQ puede deberse a la activación de TRPA1 por estas sustancias (Nassini, Gees et al. 2011, Miyake, Nakamura et al. 2016).

Además, algunos estudios han demostrado que el oxaliplatino es capaz de aumentar los niveles de expresión de ARNm de TRPA1 y TRPM8 (Descoeur, Pereira et al. 2011) pero no de TRPV1 en DRG de ratón, sugiriendo que podría haber una mayor síntesis de estas proteínas las cuales podrían ser responsables de la hipersensibilidad y alodinia al frío que se desarrolla en la neuropatía.

Si bien la neuropatía inducida por oxaliplatino presenta algunos síntomas similares con la neuropatía inducida por otros compuestos de la misma familia como el paclitaxel o cisplatino, existen estudios que demuestran que solo el oxaliplatino parece modular al canal TRPA1. Para llegar a esta conclusión Zhao y colaboradores inyectaron ratones con estas sustancias quimioterapéuticas y al cabo de un par de horas realizaron inyecciones intraplantares de AITC. Se pudo observar un incremento en el comportamiento nocifensivo solo en aquellos que previamente habían recibido el tratamiento con oxaliplatino (Zhao, Isami et al. 2012). Además, solo el tratamiento con oxaliplatino indujo hiperalgesia a frío que fue eliminada con la administración del antagonista de TRPA1, HC-030031, y la cual no fue desarrollada cuando se utilizaron ratones deficientes en TRPA1. En este estudio Zhao y su equipo también analizaron el efecto del oxaliplatino aplicado *in vitro* incubado a diferentes concentraciones en neuronas de DRG de ratón. En estos experimentos se observó un incremento dosis dependiente en el número de células sensibles a la estimulación con AITC, pero no a mentol o capsaicina, agonistas selectivos de los canales TRPM8 y TRPV1

respectivamente, sugiriendo un efecto claro en la modulación del canal TRPA1 por el oxaliplatino.

En otro trabajo, publicado por Nassini y colaboradores, se vincula a TRPA1 no solo a los síntomas asociados al frío sino también al desarrollo de la alodinia mecánica. Los autores demuestran que, en ratas, una inyección de oxaliplatino es capaz de producir hiperalgesia mecánica y al frío cuyo efecto se ve disminuido por la administración de HC-030031 (Nassini, Gees et al. 2011). Este resultado se reprodujo en ratones silvestres mientras que aquellos ratones deficientes en TRPA1 no desarrollaron ninguno de los dos síntomas. Además, proponen que esta activación de TRPA1 es a través de la generación excesiva de ROS por la administración de oxaliplatino ya que células CHO que expresaban TRPA1 de ratón mostraron un incremento del calcio intracelular tras la estimulación con oxaliplatino que es abolida en presencia de glutatión (un antioxidante celular endógeno). Apoyando estos resultados otro estudio reciente ha demostrado que oxaliplatino induce un incremento en la expresión de TRPA1 la cual disminuye si se administra un tratamiento simultáneo de oxaliplatino con el antioxidante glutatión (GSH) (Lee, Cho et al. 2017).

Nativi y colaboradores desarrollaron un compuesto que demostró revertir los síntomas de la neuropatía por oxaliplatino presente en ratas. Este compuesto llamado ADM_09 presenta efectos antioxidantes, pero además ha mostrado ser un antagonista del canal TRPA1. Una vez más se demuestra una clara vinculación del desarrollo de esta neuropatía con la presencia de este canal (Nativi, Gualdani et al. 2013).

Aunque todas estas evidencias apuntan a una clara vinculación del canal TRPA1 en la neuropatía por oxaliplatino, existen estudios en los que se involucran otros canales de la familia TRP. Principalmente los canales TRPM8 y TRPV1 son los candidatos que en conjunto con TRPA1 han sido mayormente estudiados para entender el mecanismo de acción del oxaliplatino y otros compuestos de la misma familia (Chen, Yang et al. 2011, Descoeur, Pereira et al. 2011, Fernández-Peña 2015, Chukyo, Chiba et al. 2018).

Cabe destacar que aquí solo se han mencionado algunos de los trabajos que se han realizado poniendo la atención en la familia de los canales TRP. En 2017 Naziroglu y Braidy realizaron un buen trabajo de recopilación acerca de la participación de esta familia de canales en la neuropatía inducida por la familia de los platinos (oxaliplatino,

cisplatino y paclitaxel principalmente). Esta revisión sugiere la diversidad y complejidad de los mecanismos por los cuales la neuropatía periférica por quimioterapéuticos es generada (Naziroglu and Braidy 2017).

1.6 La chaperona sigma 1

La chaperona sigma-1 ($\sigma 1$) es una proteína que se encuentra localizada en el retículo endoplásmico y ampliamente distribuida en el organismo: cerebro y neuronas sensoriales, pulmón, riñón, hígado, páncreas, bazo y médula adrenal. Se ha demostrado que $\sigma 1$ está implicada en la regulación de un gran número de sistemas de neurotransmisión, así como de diversos tipos de canales iónicos y receptores como el receptor de inositol trifosfato (IP3) participando en la homeostasis de los niveles de calcio intracelular (Davis 2015, Su, Su et al. 2016).

En 1976 Martin y colaboradores propusieron por primera vez, en base a sus observaciones conductuales realizadas en perros y el uso agonistas opiáceos como la Nalilnormetazocina (SKF-10047), la existencia de las chaperonas σ como un subtipo de receptor opioide, al que definieron como “receptor σ ” (Martin, Eades et al. 1976). Sin embargo, posteriormente, Su y Vaupel, a través de experimentos de unión de radioligandos revelaron que la naturaleza del receptor sigma no era opiácea ya que el sitio de unión era diferente al de los receptores opioides. Su demostró que el sitio de interacción del agonista SKF-10047 no tenía las propiedades correspondientes a las de un receptor de tipo opioide, y Vaupel demostró que el uso de la naloxona, considerado un antagonista universal de los receptores opiáceos, no era capaz de inducir ningún efecto sobre los receptores σ , confirmando así que no pertenecía a la clase opioide (Su 1982, Vaupel 1983).

Unos años más tarde, se demostró la existencia de dos subtipos de receptores σ , en base a la selectividad de diferentes fármacos y a su patrón de pesos moleculares. En 1989 y 1990, Hellewell y Bowen demostraron, con experimentos de unión a ligandos, que podían existir al menos dos subtipos ya que encontraron diferentes sitios de unión e interacción de los benzomorfanos y no-benzomorfanos (Hellewell and Bowen 1990). Estos subtipos fueron denominados sigma-1 ($\sigma 1$) y sigma-2 ($\sigma 2$). En 1996 Hanner y

colaboradores purificaron y clonaron por primera vez a la chaperona σ_1 de muestras del hígado de cobaya, encontrando que el σ_1 reside en retículo endoplasmático de la célula (Hanner, Moebius et al. 1996) . Esta primera aproximación bioquímica y farmacológica abrió caminos para comenzar su caracterización y profundizar en la investigación sobre σ_1 en diferentes áreas de estudio donde se lo considera como un blanco potencial de patologías neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades cardiológicas, drogodependencia y dolor (Maurice, Martin-Fardon et al. 2002, Benarroch 2018, Jia, Cheng et al. 2018, Penke, Fulop et al. 2018, Lewis, Li et al. 2020). Recientemente σ_2 ha sido clonado (Alon, Schmidt et al. 2017) lo que impulsará a ampliar el conocimiento sobre sus propiedades moleculares y funciones biológicas. Sin embargo, hasta el momento, se lo ha postulado como diana terapéutica para el tratamiento de cáncer (Georgiadis, Karoutzou et al. 2017).

Si bien, ha sido documentada la función chaperona de σ_1 y σ_2 , en la bibliografía a lo largo del tiempo, se ha seguido utilizando la palabra receptor para referirse a éstas, lo cual podría generar confusiones. Por ello, a lo largo de este trabajo haremos uso del término chaperona para referirnos a ella.

En este trabajo haremos énfasis en la chaperona σ_1 , de ahora en adelante σ_1 y específicamente su vinculación con el dolor neuropático.

1.6.1 Estructura de σ_1

Estructuralmente se sabe que σ_1 es un péptido formado por 223 aminoácidos y su peso molecular es de 25 KDa y presenta una estructura trimérica. Después de su clonaje en cobaya, σ_1 fue clonada en células de coriocarcinoma placentario humano (Kekuda, Prasad et al. 1996), cerebro humano (Prasad, Li et al. 1998), cerebro de rata (Seth, Fei et al. 1998, Mei and Pasternak 2001), y cerebro de ratón (Pan, Mei et al. 1998). Los resultados de estos trabajos demostraron definitivamente que σ_1 no es estructuralmente similar a los receptores opioides.

Entender la estructura de σ_1 ha sido trabajo de muchos años y aún todavía resulta en controversia. Desde el primer clonaje de σ_1 por Kekuda 1996 y Seth en 1998 se publicaron propuestas estructurales en las que, a grandes rasgos, σ_1 presentaba solo un dominio transmembrana. Sin embargo, publicaciones posteriores en 1998 por Pan, y

en 2002 por Aydar, hipotetizaron la presencia de dos dominios transmembrana conocidos como TMI y TMII (Aydar, Palmer et al. 2002). En 2013, Brune publicó el primer modelo tridimensional de $\sigma 1$, utilizando como herramientas la resonancia magnética nuclear (NRM) y modelados *in silico*, estando en concordancia con la presencia de al menos dos dominios de membrana (Brune, Pricl et al. 2013). Sin embargo, en el año 2016 Schmidt y colaboradores publicaron la estructura global de $\sigma 1$ humano utilizando la técnica de cristalografía, sugiriendo que $\sigma 1$ presenta una estructura trimérica y solo un dominio transmembrana contrario a las publicaciones anteriores (Schmidt, Zheng et al. 2016). Si bien esto ha llevado a discusiones, el modelo propuesto por Schmidt es actualmente el más aceptado (Fig. 1.14). En su trabajo, uno de los aspectos que se abordan para tratar de entender las diferencias encontradas, es que la estructura cristalina, aunque presenta una alta resolución es información de tipo estática mientras que el modelado 3D por homología es dinámico. Esto ha llevado a pensar que la proteína podría adoptar diferentes estructuras bajo estados sólidos (revelados por la estructura cristalina) y en solución (revelados por los modelos *in silico* y NMR).

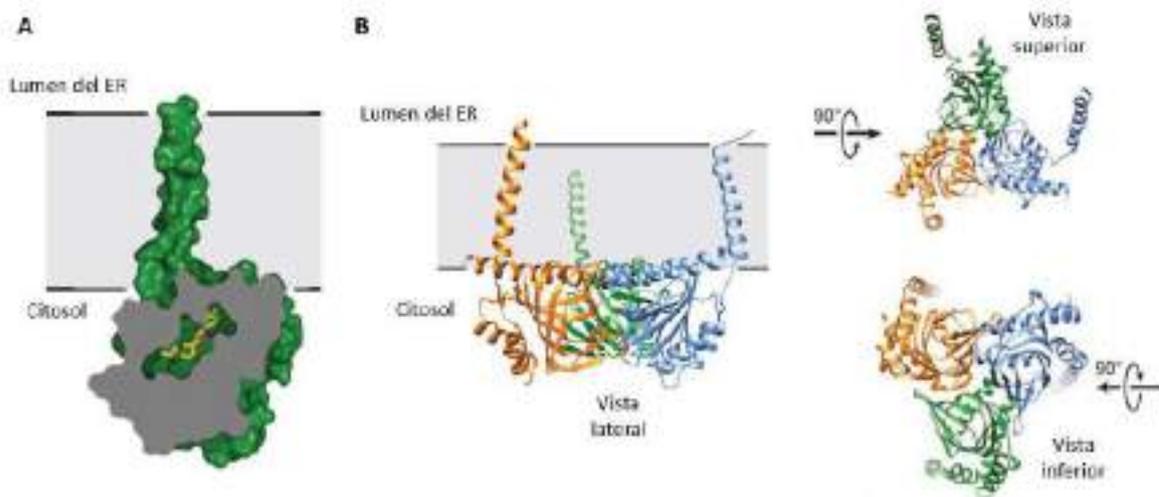


Figura 1.14 Estructura de la chaperona $\sigma 1$ humana. A) Reconstrucción 3D de $\sigma 1$ mostrando la presencia de solo un dominio transmembrana. B) Vista de $\sigma 1$ perpendicular a al plano de la membrana del RE. Cada monómero está representado en un color diferente. Tres vistas de $\sigma 1$ se muestran, lateral, superior e inferior. Extraído de Schmidt 2016 y 2019.

1.6.2 Expresión y localización subcelular de $\sigma 1$

A nivel celular $\sigma 1$, reside en los contactos entre el retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias, denominándose esta interfaz como membranas asociadas a

mitocondrias MAM (Hayashi and Su 2007) (Fig. 1.15). Hayashi y colaboradores identificaron por primera vez a $\sigma 1$ como una chaperona regulada por ligando y describieron su papel en la modulación de la señalización del calcio intracelular (Hayashi and Su 2007, Su, Su et al. 2016).

$\sigma 1$ ha sido identificado en las llamadas balsas lipídicas (microdominios de lípidos altamente agrupados) presentes en las membranas reticulares y plasmática. Además, la presencia de $\sigma 1$ en estos microdominios tiene un papel activo ya que se ha demostrado que regula la degradación de proteínas presentes en las balsas lipídicas y el transporte de lípidos (Hayashi and Su 2003, Hayashi and Su 2007, Ryskamp, Korban et al. 2019).

Los estudios de localización han demostrado que $\sigma 1$ está ampliamente distribuida en el organismo, encontrándose en diferentes tipos de tejidos: $\sigma 1$ está presente en riñones, hígado, pulmones, corazón, bazo. También se ha encontrado en la retina, en el sistema reproductor como en ovarios y testículos, en sistema digestivo específicamente en el tracto gastrointestinal y también en el sistema nervioso (Zhang, Zhao et al. 2017).

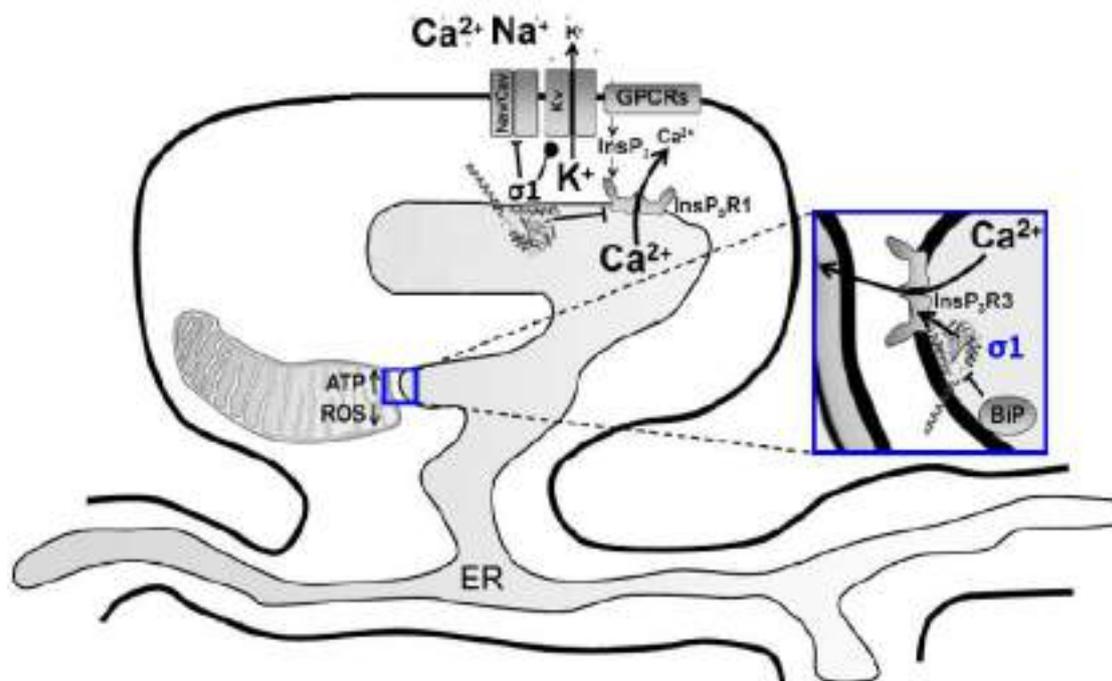


Figura 1.15 Localización intracelular de $\sigma 1$ y modulación de proteínas. $\sigma 1$ reside principalmente en las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) y unida a la chaperona BiP (proteína de unión a inmunoglobulina) (recuadro azul). Dentro de la MAM, $\sigma 1$ regula la dinámica de los lípidos y acompaña al receptor $InsP_3R_3$ hacia la MAM, facilitando el flujo de calcio desde el ER hasta las mitocondrias. Tras su activación, $\sigma 1$ se redistribuye a toda la red ER donde interactúa con canales iónicos y receptores de

membrana como canales de Na⁺ y K⁺ así como los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Modificado de Ryskamp 2019.

En el sistema nervioso central, σ_1 se encuentra expresada en áreas relacionadas con la memoria, emociones y funciones motoras (Guitart, Codony et al. 2004, Bermack and Debonnel 2005, Monnet and Maurice 2006) pero también se ha detectado en áreas claves para el procesamiento del dolor: se expresa en diferentes láminas del asta dorsal de la médula espinal (donde las aferentes sensoriales hacen sinapsis para comenzar las vías ascendentes del dolor), en el locus coeruleus (conocido como fuente de noradrenalina y por su papel en la inhibición descendente de la transmisión dolorosa) y en la sustancia gris periacueductal, considerado un punto importante en la activación del sistema de analgesia. Además, se expresa también en la corteza cerebral, tálamo y amígdala (Alonso, Phan et al. 2000, Phan, Miyamoto et al. 2005), astrocitos y microglia. En el sistema nervioso periférico σ_1 , se ha demostrado que se expresa en las neuronas de los ganglios raquídeos (Guitart, Codony et al. 2004, Bangaru, Weihrauch et al. 2013). Si bien esta información proviene de trabajos publicados en diferentes especies como rata, ratón, cobaya, conejo, mono; aparentemente existen patrones de expresión similares en cerebro de roedores y mono lo que sugiere la posibilidad de poder extrapolar las investigaciones en modelos animales a la clínica (Romero, Merlos et al. 2016).

1.6.3 Farmacología de σ_1 : ligandos endógenos y exógenos

La chaperona σ_1 está regulada tanto por ligandos sintéticos como endógenos, habiéndose determinado que el extremo C-terminal contiene sitios de unión a ligandos, dominios de unión a esteroides y un dominio chaperona (Morales-Lázaro, González-Ramírez et al. 2019).

Los ligandos de σ_1 convencionalmente han sido clasificados como agonistas y antagonistas. Se considera un antagonista a aquel compuesto capaz de imitar la desactivación genética o eliminación de σ_1 , no suelen tener efectos por sí mismos y atenúan los provocados por la estimulación de σ_1 (Nguyen, Lucke-Wold et al. 2015). Los agonistas, por el contrario, imitan el fenotipo de sobreexpresión de σ_1 o ejercen un

efecto dependiente de σ_1 distinto de la desactivación genética de este (Schmidt and Kruse 2019).

La búsqueda de ligandos endógenos de σ_1 no ha tenido mucho éxito. Algunos neuroesteroides, como las hormonas sexuales progesterona y pregnenolona han sido propuestos como ligandos de σ_1 . En 1988 Su y colaboradores demostraron que la progesterona tenía efectos inhibitorios sobre σ_1 , resultado que ha sido confirmado en otros trabajos (Su, London et al. 1988, Ortiz-Rentería, Juárez-Contreras et al. 2018). Sin embargo, se cree que las concentraciones fisiológicas de progesterona no son suficientes para producir una interacción con σ_1 (Schwarz, Pohl et al. 1989). En otros estudios se ha visto que la hormona neuroesteroidea pregnenolona actúa como agonista del σ_1 y se la ha involucrado en la mejoría cognitiva de los cuadros de esquizofrenia (Hayashi 2015).

El sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEA), un esteroide endógeno producido por la corteza suprarrenal, también ha sido descrito como agonista de σ_1 , mostrando atenuación de la amnesia producida en un modelo animal de ratas (Maurice, Su et al. 1998). Recientemente, se ha descrito que la colina, precursora de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina, es un agonista de σ_1 y que es capaz de competir con (+) - pentazocina para unirse a σ_1 (Brailoiu, Chakraborty et al. 2019).

Sin embargo, la lista de ligandos exógenos es mucho más extensa. Se ha demostrado que σ_1 es capaz de interactuar con muchos fármacos utilizados con diferentes acciones terapéuticas. Dentro de ellos se encuentran los antidepresivos, antipsicóticos, antitusivos, compuestos para el tratamiento de Alzheimer y Parkinson y también con drogas de abuso como la cocaína (Cobos, Entrena et al. 2008, Sanchez-Fernandez, Entrena et al. 2017).

Dentro de los agonistas selectivos de σ_1 se encuentran, el benzomorfolano [3H] (+) - pentazocina con el que se identificó la región de σ_1 responsable de las interacciones específicas. Glennon describió que el sitio de unión, es un mini farmacoporo que consiste en una amina flanqueada por dos regiones hidrófobas (Glennon 2005). El compuesto PRE084 (2-morfolin-4-iletíl 1-fenilciclohexano-1-carboxilato) también es un agonista selectivo de σ_1 (Maurice, Su et al. 1998). Existen también fármacos usados

como agonistas de σ_1 , aunque no son selectivos para éste, entre ellos se encuentran el, haloperidol, donepezil y fluvox-amina (Nguyen, Lucke-Wold et al. 2015).

Entre los antagonistas exógenos de σ_1 más utilizados se encuentran, el BD1063 (1-[2-(3,4-dichlorophenyl) ethyl]-4methylpiperazine) y E-52862 también conocido como MR-309 o S1RA (Fig. 1.15) el cual ha mostrado una alta afinidad de unión con la chaperona σ_1 (K_i 17.0 ± 7.0 nM) y el cual ha completado exitosamente las pruebas clínicas de fase II en el área terapéutica del dolor neuropático (Diaz, Cuberes et al. 2012). Ambos antagonistas han sido utilizados en este trabajo y en los apartados siguientes se ampliará la información respecto a la evidencia en el contexto de la nocicepción y el dolor.

Otros antagonistas ampliamente usados son el BD1047 (N-[2-(3,4-dichlorophenyl) ethyl]-N-methyl-2-(dimethylamino) ethylamine) y el NE-100 (4-methoxy-3-(2-phenylethoxy)N,N-dipropylbenzeneethanamine).

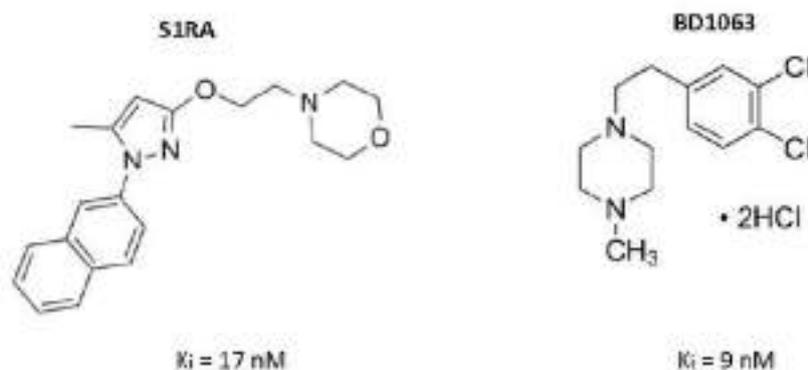


Figura 1.16. Estructura química de los antagonistas de la chaperona σ_1 S1RA y BD1063 utilizados en este trabajo. Extraído de <https://www.medchemexpress.com> y de la casa comercial Sigma Aldrich.

Recientemente, se ha demostrado la existencia de σ_1 en diferentes estados de oligomerización (monómeros, dímeros, tetrámeros y niveles de mayor oligomerización) (Gromek, Suchy et al. 2014). Algunos estudios, como los de Mishra 2015 y Hong 2017 sugieren que la unión a ligando induce cambios en los niveles de oligomerización de σ_1 (Mishra, Mavlyutov et al. 2015, Hong, Yano et al. 2017). Así, los agonistas disocian los oligómeros a especies de menor peso molecular, mientras que los antagonistas mantienen a σ_1 en niveles mayores de oligomerización. Mishra y Hong proponen un modelo de funcionalidad del σ_1 basado en su grado de oligomerización. Los agonistas

promueven la disociación de $\sigma 1$ en monómeros o dímeros, que pueden movilizarse hacia otros compartimentos subcelulares y asociarse con proteínas dianas. Bajo este modelo, los antagonistas evitarían tales interacciones manteniendo a $\sigma 1$ en niveles de oligomerización más elevados, en los que $\sigma 1$ pierde su funcionalidad. Así, proponen una conformación de menor oligomerización (monómero, dímeros) como el estado activo de $\sigma 1$ para interactuar con diferentes proteínas (Ryskamp, Korban et al. 2019).

1.6.4 Fisiología de $\sigma 1$

Como se ha mencionado previamente, la chaperona $\sigma 1$ se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico (RE), distribuída específicamente en las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) (Hayashi y Su 2007, 2010).

El retículo endoplasmático es una organela involucrada en la traducción de proteínas, una vez sintetizadas éstas son traslocadas al lumen del RE donde las chaperonas presentes se encargan del correcto plegamiento (Hayashi and Su 2007). Además, el RE controla la homeostasis del calcio donde la mayoría de las chaperonas presentes, en condiciones fisiológicas, almacenan calcio. En este contexto, desde la década de los 90, se ha sugerido la posible vinculación de $\sigma 1$ en la señalización de calcio en el RE, pero no fue hasta el año 2007 en el cual Hayashi y Su publicaron que $\sigma 1$ actúa como chaperona para mantener al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) en la conformación adecuada, garantizando una correcta señalización de calcio desde el RE hacia las mitocondrias para la producción de ATP (Hayashi and Su 2007, Tagashira, Bhuiyan et al. 2014). En el modelo propuesto, en condiciones basales, $\sigma 1$ se encuentra unida a otra chaperona llamada proteína de unión a inmunoglobulinas, conocida como BiP, formando un complejo. Sin embargo, en condiciones de estrés celular, agotamiento de calcio en el RE o por activación de $\sigma 1$ con agonistas, $\sigma 1$ se disocia de BiP migrando desde las MAM a las membranas plasmáticas donde interactúa y modula la función de otros receptores, canales iónicos y enzimas. Se ha demostrado que $\sigma 1$ también puede translocarse hacia la envoltura nuclear, reclutando factores de remodelación de la cromatina para afectar la regulación transcripcional de los genes (Fig. 1.17) (Su, Su et al. 2016).

Además, en las MAM, $\sigma 1$ actúa como sensor de estrés del RE para garantizar la transmisión correcta de éste hacia el núcleo y la consecuente producción de antioxidantes a través de la modulación de IRE1, un sensor de estrés intracelular, que también reside en las MAM (Mori, Hayashi et al. 2013).

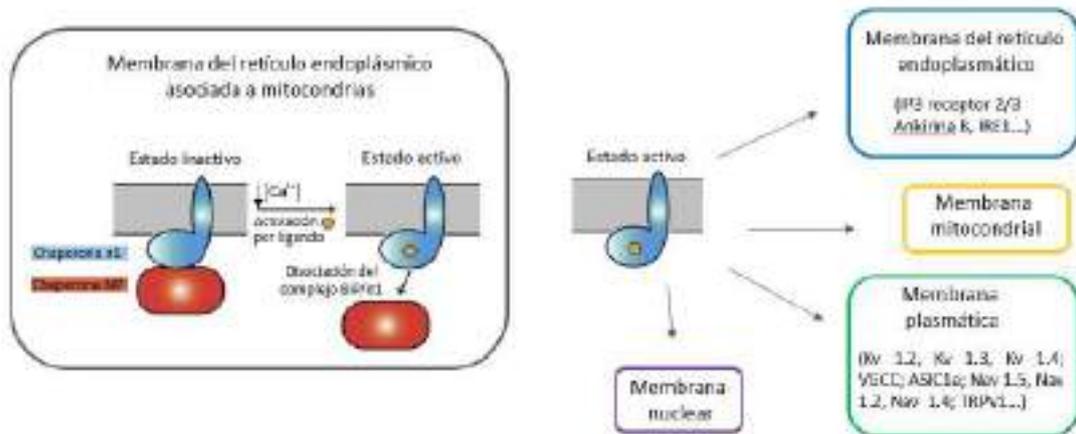


Figura 1.17. Esquema de activación de la chaperona $\sigma 1$ operada por ligandos y su interacción en diferentes compartimentos celulares. En estado de reposo $\sigma 1$ se encuentra en las MAM unido a la chaperona BiP. Cuando $\sigma 1$ es activada por ligandos o descenso del calcio en el RE se disocia de BiP y se transloca a diferentes compartimentos celulares para la modulación de proteínas (modificado de Schmidt and Kruse 2019).

Respecto a cómo $\sigma 1$ induce una modulación del flujo de calcio en el RE, en 2008 Cobos y colaboradores propusieron un modelo de interacción con agonistas y antagonistas de $\sigma 1$ basado en publicaciones previas por Hayashi y Su en el año 2001. Cobos menciona que en estado basal $\sigma 1$ se encuentra unido a los receptores IP3 (IP3R) y anquirina (específicamente anquirina 220), formando un complejo ($\sigma 1$ -anquirina-IP3R) en las balsas lipídicas del RE. La activación de $\sigma 1$ por un agonista produce una modificación del complejo. Así, $\sigma 1$ -anquirina se disocian de IP3R pudiendo translocarse hacia otro compartimento celular. En estas condiciones IP3 puede unirse a sus receptores y potenciar el flujo de calcio. Por otro lado, en presencia de un antagonista de $\sigma 1$, éste se disocia del complejo mientras que IP3R se mantiene acoplado a la anquirina impidiendo la potenciación del flujo de calcio (Fig. 1.18) (Cobos, Entrena et al. 2008).

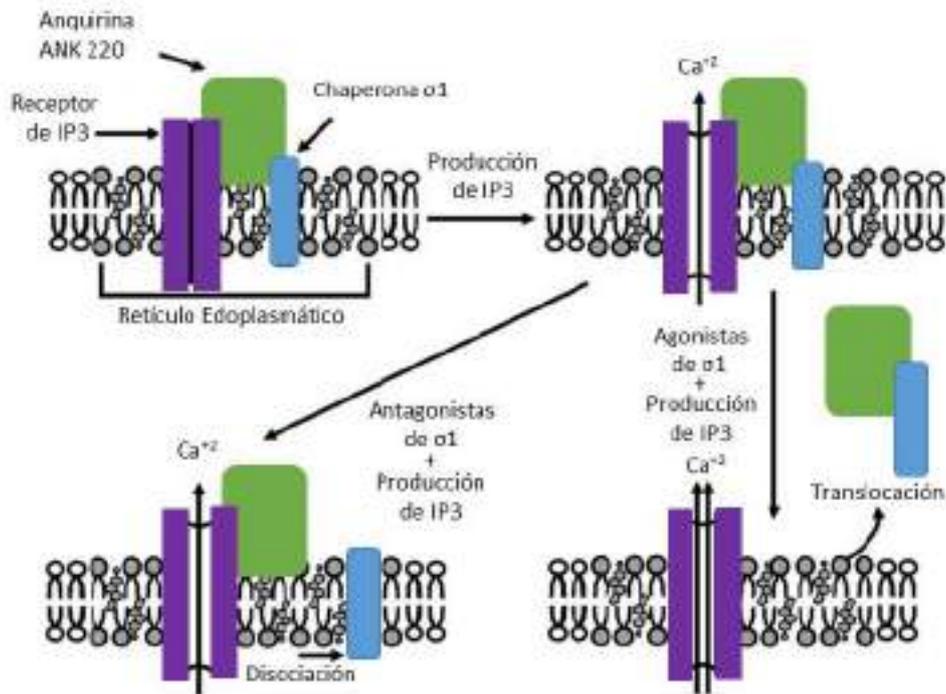


Figura 1.18. Modelo de modulación del flujo de calcio por la chaperona $\sigma 1$. En condiciones basales $\sigma 1$, IP3R y anquirina (ANK220) forman un complejo en las balsas lipídicas de la membrana del RE. Los agonistas de $\sigma 1$ disocian a $\sigma 1$ -anquirina del IP3R permitiendo la translocación a diferentes compartimentos celulares. IP3 se une a sus receptores potenciando el flujo de calcio. Los antagonistas de $\sigma 1$ provocan la disociación de éste mientras que la anquirina permanece unida a IP3R impidiendo la potenciación del flujo de calcio. (modificado de Cobos, Entrena et al. 2008).

1.6.4.1 Modulación de canales iónicos por $\sigma 1$

$\sigma 1$ es capaz de interactuar con una gran variedad de canales iónicos y receptores, modulando su actividad. Debido a su característica de chaperona modulada por ligando, $\sigma 1$ regula el plegamiento de proteínas, así como su degradación (Hayashi 2015) y también se ha demostrado su interacción en la membrana plasmática con diferentes tipos de canales, entre los que se incluyen canales de potasio, sodio y calcio entre otros (Zamanillo, Romero et al. 2013). Además, se ha demostrado que esta modulación en algunos casos resulta potenciada por agonistas e inhibida con la aplicación de antagonistas de $\sigma 1$, aunque los mecanismos de acción no se conocen completamente (Tabla 1.2).

A lo largo de la última década, se ha demostrado que $\sigma 1$ es capaz de inhibir la actividad de los **canales de sodio**. Si bien la mayoría de los estudios se han realizado en células y tejidos no neuronales, cabría esperar que en células excitables como las neuronas también ocurra lo mismo. Utilizando la técnica de inmunoprecipitación, se ha descrito la interacción directa de $\sigma 1$ con el canal $Na_v 1.5$ presente en los miocardiocitos.

Tabla 1.2: Interacción de $\sigma 1$ con diferentes canales iónicos.

Canal iónico	Línea celular/tejido	Método y principal efecto	Referencia
Nav 1.5	cardiocitos	IP. Agonistas y antagonistas impiden la formación del complejo Nav 1.5- $\sigma 1$	Balasuriya 2012
Nav 1.5	HEK293	Reducción en la corriente por agonistas de $\sigma 1$, revertida por progesterona (antagonista endógeno de $\sigma 1$)	Johannessen 2009 Johannessen 2011
Nav 1.2 Nav 1.4	HEK293 COS-7	Inhibición corriente por agonistas y antagonistas de $\sigma 1$	Gao 2012
Kv1.4	ovocitos	IP Registros electrofisiológicos. Inactivación del canal por agonistas	Aydar 2002
Kv1.3	ovocitos	IP el uso de agonistas o antagonistas no modifica la interacción	Kinoshita 2012
Kv 1.2	NG108-15 HEK293	IP Inhibición de corrientes por agonistas	Kourrich 2013 Abraham 2019
VGCC tipo L	RGC-5	IP	Tchedra 2008
VGCC tipo N	Neuronas colinérgicas del núcleo estriado de ratas HEK293	Inhibición de corrientes de calcio por agonistas y reversión del efecto antagonista de $\sigma 1$ IP	Zhang y Zhao 2017
ASIC1a	HEK293 Neuronas corticales	IP MFA Reducción de la interacción por antagonistas Inhibición de corriente por activación de $\sigma 1R$	Carnally 2010 Herrera 2008
TRPV1	HEK293 Neuronas de DRG de ratón	IP Inhibición por inactivación de $\sigma 1R$	Ortiz-Rentería 2018

Esta interacción se ha visto modificada con el uso de ligandos de $\sigma 1$, tanto el uso de agonistas o antagonistas impide la formación del complejo lo que podría sugerir una modulación por otro mecanismo (Balasuriya, Stewart et al. 2012).

El efecto inhibitorio de agonistas de $\sigma 1$ en canales de sodio, también ha sido demostrado en sistemas heterólogos (células HEK293 transfectadas con Nav 1.5). Además, se ha demostrado que la progesterona, antagonista endógeno de $\sigma 1$, es capaz de bloquear la

inhibición de $\text{Na}_v 1.5$ provocada por agonistas de $\sigma 1$ (Johannessen, Ramachandran et al. 2009, Johannessen, Fontanilla et al. 2011). Otros miembros de esta familia de canales también son modulados por agonistas de $\sigma 1$ como el $\text{Na}_v 1.2$ y $\text{Na}_v 1.4$ aunque en estos casos la inhibición de la actividad resultó independiente de la activación de $\sigma 1$ (Gao, Yao et al. 2012).

Diferentes trabajos también han demostrado que $\sigma 1$ modula negativamente a los **canales de potasio**. Aydar y colaboradores en 2002 demostraron que $\sigma 1$ inmunoprecipita con $\text{K}_v 1.4$, demostrando así su interacción directa en ovocitos y también en el sistema nervioso central.

En estudios funcionales, demostraron que el uso de agonistas de $\sigma 1$ disminuye la amplitud de la corriente del canal $\text{K}_v 1.4$ (Aydar, Palmer et al. 2002). Más tarde, en 2012, Kinoshita demostró que el canal $\text{K}_v 1.3$ también interacciona con $\sigma 1$, sin embargo, el uso de ligandos de $\sigma 1$ no indujo ninguna modificación en la interacción $\text{K}_v 1.3$ - $\sigma 1$ y la amplitud de la corriente de $\text{K}_v 1.3$ no se vio afectada por éstos (Kinoshita, Matsuoka et al. 2012).

El canal $\text{K}_v 1.2$ también forma físicamente un complejo proteína-proteína con $\sigma 1$ en células provenientes del núcleo accumbens y también cuando se co-transfectan en la línea celular NG108-15 (Kourrich, Hayashi et al. 2013). Los canales $\text{K}_v 1.2$ son rectificadores de salida y se activan, con un cierto retardo, en presencia de despolarizaciones moderadas. En el contexto de la nocicepción, esta interacción muestra una actividad disminuida en $\text{K}_v 1.2$ que contribuye al dolor neuropático mecánico y de frío al despolarizar el potencial de membrana en reposo, reducir la corriente umbral y, por ello, aumentar las tasas de activación en las neuronas mielinizadas (Zhao, Tang et al. 2013, Tsantoulas and McMahon 2014). Recientemente Abraham y colaboradores demostraron que, la activación farmacológica de $\sigma 1$, con los agonistas PRE084 y SKF, induce una disminución en la corriente dependiente de $\text{K}_v 1.2$ utilizando células HEK293 como un sistema de expresión heteróloga. Además, demostraron la formación de un complejo físico entre ambas proteínas (Abraham, Fleming et al. 2019).

Davis en su revisión del año 2015 también ha enfatizado en la directa vinculación de $\sigma 1$ con los canales de potasio y su importancia en el procesamiento del dolor. La

conclusión general resulta en una inactivación directa de los canales de potasio por σ_1 , que lleva a repolarizaciones de membrana más lentas manteniendo a las neuronas activas por mayor tiempo (Davis 2015).

Existe evidencia que σ_1 modula, directa e indirectamente, a los **canales de calcio dependientes de voltaje** (VGCC, del inglés Voltage-Gated Calcium Channels) bloqueando el flujo de calcio hacia el interior de la célula (Zhang and Cuevas 2002). Dentro de las diferentes familias de VGCC, existe evidencia de interacción directa, demostrada por inmunoprecipitación, entre σ_1 y el VGCC tipo L, en células ganglionares de la retina. En esta preparación, a nivel funcional se demostró que el uso de agonistas de σ_1 indujo una inhibición del calcio intracelular y de las corrientes de calcio dependientes de voltaje (Tchedre, Huang et al. 2008). Pan y colaboradores demostraron que el uso de agonistas de σ_1 induce una inhibición de la corriente de calcio dependiente de voltaje en neuronas de DRG provenientes de animales lesionados y también en las neuronas controles. Sin embargo, el uso del antagonista BD1063 no generó cambios en la corriente en condiciones control, mientras que en neuronas de DRG axotomizados produjo un incremento de ésta (Pan, Guo et al. 2014). Recientemente, Zhang y colaboradores demostraron una interacción directa entre σ_1 y el VGCC tipo N cuando es sobre expresado en células HEK293 resultado que fue validado utilizando la técnica de FRET. A nivel funcional, cuando registraron neuronas colinérgicas del núcleo estriado de ratas, encontraron que agonistas de σ_1 son capaces de inhibir la corriente de calcio dependiente de voltaje y que este efecto inhibitorio fue abolido con el uso de un antagonista de σ_1 (Zhang, Zhao et al. 2017).

Los canales sensibles a la concentración extracelular de protones, **ASIC**, por sus siglas en inglés (Acid Sensing Ion Channels) también se han relacionado con σ_1 . Así, Kwon y colaboradores demostraron en un modelo de dolor producido por isquemia, que el uso del antagonista de σ_1 , BD1063, y un bloqueante de los canales de ASICs redujo la alodinia mecánica. Además, esta hipersensibilidad se vio incrementado cuando se administró de manera simultánea PRE084, agonista de σ_1 , y una solución con pH ácido, sugiriendo una modulación de los canales ASIC por σ_1 (Kwon, Roh et al. 2016). Previamente ya se habían publicado trabajos en los que se demostraba una interacción física y funcional entre σ_1 y los canales ASICs. En el año 2010 Carnally, utilizando la

técnica de microscopía de fuerza atómica (MFA), demostró la interacción directa de ASIC1a con $\sigma 1$ en células HEK293 co-transfectadas con ambas proteínas y observó una disminución en la interacción con la utilización de un antagonista de $\sigma 1$ (Carnally, Johannessen et al. 2010). En otro estudio, Herrera y colaboradores en el año 2008 demostraron una interacción funcional entre ASIC1 and $\sigma 1$. En este estudio, realizado en neuronas corticales, la corriente y el calcio intracelular dependiente de ASIC1a se vio disminuida con la aplicación de agonistas de $\sigma 1$, efecto que fue contrarrestado por antagonistas de éste (Herrera, Katnik et al. 2008).

Los **canales TRP**, como se ha mencionado previamente en el apartado 1.2.3, están íntimamente relacionados a los procesos nociceptivos. Sin embargo, hasta ahora la evidencia existente de su posible modulación por el $\sigma 1$ es casi nula. La primer y única evidencia que existe, fue publicada en el año 2018 por el grupo de investigación liderado por Morales-Lázaro. En este trabajo demuestran una interacción física y funcional entre el canal TRPV1 y $\sigma 1$. Sus resultados sugieren que $\sigma 1$ modula directamente al canal TRPV1 y que esta modulación afecta los niveles de expresión del mismo. En este trabajo se describe que el uso de BD1063, un antagonista sintético del $\sigma 1$, disminuye los niveles de expresión de proteína de TRPV1 en neuronas de DRG y en células HEK293 que expresan de manera transitoria el canal. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con la aplicación de progesterona, un antagonista endógeno de $\sigma 1$. A nivel funcional, los registros de “patch-clamp” mostraron una reducción en la corriente evocada por capsaicina, agonista del canal TRPV1, tras la incubación con BD1063 o progesterona (Ortiz-Renteria, Juarez-Contreras et al. 2018).

1.6.5 La chaperona $\sigma 1$ y dolor: uso de antagonistas como estrategia de analgesia

Como se ha mencionado previamente, los antagonistas de $\sigma 1$ son los ligandos capaces de imitar la desactivación genética o eliminación de $\sigma 1$ (Nguyen, Lucke-Wold et al. 2015). Diversos resultados obtenidos en modelos de dolor inducidos en ratones deficientes para $\sigma 1$ muestran una atenuación en las respuestas nocifensivas inducidas por formalina o capsaicina (Cendan, Pujalte et al. 2005, de la Puente, Nadal et al. 2009, Entrena, Cobos et al. 2009) y en modelos de lesión nerviosa. Respecto a este aspecto, De la Puente y colaboradores observaron en el año 2009 que en ratones carentes de $\sigma 1$

no se desarrollaba alodinia mecánica ni térmica (frío) tras lesionar el nervio ciático (de la Puente, Nadal et al. 2009, Merlos, Romero et al. 2017). Estas evidencias han centrado la atención en estudiar los antagonistas de σ_1 en diferentes modelos de dolor.

Debido al creciente número de ligandos utilizados en diferentes modelos de dolor en (revisado por Cobos, Entrena et al. 2008, Romero, Merlos et al. 2016) nos centraremos sólo en los que se han utilizado en el presente estudio (BD1063 y S1RA). Los antagonistas BD-1047, BD-1063 (Matsumoto, Bowen et al. 1995) han sido probados en diferentes modelos de dolor en animales. Entrena y colaboradores publicaron en 2009 que estos compuestos mostraron efectos antialodínicos en la respuesta mecánica, en ratones silvestres que habían recibido previamente una inyección de capsaicina. El efecto de estos fármacos fue dependiente de la dosis administrada, siendo BD-1063 el más potente y cuyo efecto pudo revertirse con la administración de PRE-084, un agonista del σ_1 (Entrena, Cobos et al. 2009). BD1063 ha sido involucrado recientemente como modulador del dolor provocado por la inyección intraplantar de capsaicina. Ratones previamente tratados con una inyección intraescapular de BD1063 mostraron menor comportamiento nocifensivo tras la inyección intraplantar de capsaicina (Ortiz-Renteria, Juarez-Contreras et al. 2018).

S1RA, desarrollado en la farmacéutica catalana ESTEVE, también llamado en la literatura como E-52862 o MR-309, ha sido descrito como uno de los mejores ligandos de la chaperona σ_1 por su alta selectividad para ésta (Diaz, Cuberes et al. 2012, Romero, Zamanillo et al. 2012). Por sus propiedades químicas, S1RA es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, uniéndose a σ_1 en el sistema nervioso central. Además, S1RA también ejerce una inhibición dosis-dependiente del perfil nociceptivo que se desarrolla tras la aplicación intraplantar de formalina, la hipersensibilidad térmica y mecánica por lesión nerviosa y por aplicación de capsaicina. Por otro lado, la aplicación sistémica de S1RA inhibió la hipersensibilidad térmica y mecánica derivada de la ligación del nervio ciático en ratones, efecto que también es dosis dependiente (Romero, Zamanillo et al. 2012). Recientemente, Bravo-Caparrós y colaboradores han publicado los efectos antinociceptivos de S1RA en un modelo de lesión nerviosa parcial en ratones. En este trabajo se confirmó que los ratones deficientes de σ_1 no desarrollan la alodinia al frío y muestran una marcada reducción en la alodinia mecánica respecto a los ratones

silvestres. Sin embargo, sí desarrollaron hiperalgesia al calor. Por otro lado, la administración sistémica de S1RA a ratones silvestres atenuó los tres síntomas mencionados, los cuales fueron observados nuevamente con la administración del agonista PRE-084 (Bravo-Caparros, Perazzoli et al. 2019). Distintas evidencias sugieren que los efectos antinociceptivos del tratamiento con S1RA presentan un sitio de acción en el sistema nervioso central. Sin embargo, Vidal-Torres y colaboradores demostraron en 2014 que tras la administración de formalina intraplantar, S1RA produce atenuación en el comportamiento nocifensivo (tiempo de lamida y número de elevaciones de la pata trasera) sólo si es inyectado en la misma pata en la que se aplicó previamente la formalina. Estos resultados sugieren que S1RA también presenta sitios de acción periféricos (Vidal-Torres, Fernandez-Pastor et al. 2014).

Modelos de inflamación también han sido estudiados bajo los efectos de S1RA. Así, en 2014, Gris y colaboradores demostraron la capacidad de S1RA para revertir los síntomas inducidos por la inyección de carragenina (modelo de dolor de inflamación aguda) y CFA (modelo de dolor por inflamación crónica) (Gris, Merlos et al. 2014). El efecto antinociceptivo de S1RA también ha sido testado en modelos de dolor visceral con resultados prometedores. Por ejemplo, el comportamiento nocifensivo inducido por la aplicación de capsaicina en el colon se vio atenuado por la administración subcutánea de S1RA (Gonzalez-Cano, Merlos et al. 2013).

También existe evidencia que S1RA es eficaz en distintos modelos de dolor neuropático, como la neuropatía inducida por diabetes tipo 2. Así, Paniagua y colaboradores demostraron en 2017 que la administración intraperitoneal de S1RA revierte los síntomas de la neuropatía, específicamente la hiperalgesia mecánica y térmica al calor (Paniagua, Giron et al. 2017). Otro modelo de dolor neuropático y de gran interés para nuestro grupo de trabajo es la neuropatía inducida por quimioterapéuticos. Existe evidencia de que el efecto antinociceptivo de S1RA se observa en ratones tratados con paclitaxel. En 2012, Nieto y colaboradores demostraron que ratones deficientes para el $\sigma 1$ no desarrollan la alodinia al frío y mecánica comparado con los ratones silvestres (Nieto, Cendan et al. 2012). Adicionalmente la administración de S1RA subcutáneo 30 minutos previos a la inyección de paclitaxel previno el desarrollo de los síntomas antes mencionados.

Los efectos de S1RA han sido evaluados con otros quimioterapéuticos de la familia de los platinos. En 2016 Gris publicó que la alodinia al frío provocada por la administración de oxaliplatino se revierte con la administración de S1RA siendo este efecto dosis dependiente, como se ha observado en otros modelos de dolor. Adicionalmente, se demostró que la administración en simultáneo de S1RA con oxaliplatino previene el desarrollo de la alodinia al frío provocada por este quimioterapéutico (Gris, Portillo-Salido et al. 2016).

Recientemente, se Bravo-Caparrós y colaboradores han demostrado la vinculación de σ_1 y el proceso de neuroinflamación en DRG tras realizar una lesión en el nervio ciático. Los ratones deficientes para σ_1 desarrollaron menor alodinia mecánica y mostraron una menor infiltración de macrófagos, así como niveles más bajos de IL-B6 en cultivos de neuronas de DRG comparado con los ratones silvestres (Bravo-Caparrós, Ruiz-Cantero et al. 2020).

Además de las evidencias de S1RA como analgésico y antialodínico en diversos modelos de dolor animal, en 2018 Bruna y colaboradores publicaron resultados satisfactorios en ensayos clínicos con S1RA, realizados en el Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona. En ellos se evidencia que S1RA reduce parcialmente el dolor provocado por estímulos de frío y los signos de hiperexcitabilidad motora en pacientes con cáncer colorrectal tratados con oxaliplatino (Bruna, Videla et al. 2018). A nivel clínico se ha podido demostrar una buena tolerancia a dosis únicas de hasta 800 mg en hombres y mujeres o en dosis múltiples de hasta 400 mg, sin evidenciar rasgos de toxicidad limitante ni efectos secundarios completando así satisfactoriamente la fase I. Actualmente S1RA ha finalizado la fase II con ensayos clínicos en diferentes cuadros de dolor neuropático, como la neuropatía diabética dolorosa, el dolor postoperatorio y la neuralgia postherpética (Laboratorios ESTEVE).

En resumen, el estudio de los antagonistas de la chaperona σ_1 representa una prometedora estrategia analgésica. Sin embargo, aunque existe mucha evidencia conductual en diferentes modelos de dolor, poca es la información existente acerca de los posibles mecanismos por los cuales S1RA produce este efecto antinociceptivo.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel del canal iónico TRPA1 en la neuropatía periférica inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino en un modelo murino, así como su posible modulación por la chaperona sigma-1 ($\sigma 1$).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la sensibilidad mecánica y al frío en ratones silvestres tratados con oxaliplatino y la implicación de TRPA1 en esta neuropatía, caracterizando ratones carentes de este canal.
2. Estudiar el posible efecto preventivo del S1RA, antagonista de $\sigma 1$, sobre el desarrollo de la hipersensibilidad a estímulos mecánicos y de frío inducidos por la administración de oxaliplatino.
3. Estudiar el efecto del S1RA sobre el dolor producido por la inyección intraplantar de AITC, agonista de TRPA1, en ratones silvestres y en ratones carentes de TRPA1.
4. Caracterizar a nivel celular, utilizando técnicas biofísicas y de imagen, el efecto del S1RA sobre la activación de TRPA1 en células HEK293 y en células HEK293 carentes de $\sigma 1$.
5. Analizar el efecto de la incubación con S1RA de neuronas sensoriales, obtenidas de DRG de ratones tratados con oxaliplatino, sobre las respuestas mediadas por el canal TRPA1 activado por estímulos químicos y físicos.
6. Estudiar, en las neuronas sensoriales de DRG obtenidas de ratones tratados con oxaliplatino, el efecto de la administración intraperitoneal de S1RA sobre la respuesta a AITC.
7. Estudiar, mediante técnicas bioquímicas, la interacción entre el canal TRPA1 y $\sigma 1$.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen las técnicas experimentales utilizadas durante este estudio.

3.1 Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 y TRPA1^{-/-} machos y hembras de 8 a 15 semanas de edad. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 y a la directiva de la Comunidad Europea 2016/63/EU. El comité Ético de la Universidad Miguel Hernández, así como la Consellería de Presidencia y Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua de la Generalitat Valenciana aprobaron el procedimiento experimental. Los animales se estabularon en el animalario RMG de la Universidad Miguel Hernández, ubicado en el Instituto de Neurociencias UMH-CSIC. Se mantuvo a los animales en salas con la temperatura controlada, ciclos de luz y oscuridad adecuados y con comida y agua *ad libitum*.

Los ratones silvestres C57BL/6 (C57BL/6OlaHsd) se compraron a la compañía Harlan (Indianapolis, EEUU). Los ratones TRPA1^{-/-} (nomenclada como línea FV4 en nuestro laboratorio) fueron donados por el Dr. David Corey (Kwan, Allchorne et al. 2006).

3.1.1 Inducción del modelo de neuropatía por oxaliplatino en ratones

La administración de oxaliplatino en ratones da lugar a una neuropatía con características similares a la que se observa en pacientes tratados con este compuesto anticancerígeno. Para la inducción de la neuropatía por administración de oxaliplatino, se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 y TRPA1^{-/-}. Los animales fueron aclimatados en la zona experimental durante al menos 3 días previos a la realización de las pruebas de comportamiento para la obtención de datos basales (pruebas previas a la administración del oxaliplatino).

Se preparó un stock de oxaliplatino (Tocris Bioscience REF. 2623, 5 mM en agua destilada) que se mantuvo hasta 12 meses a -20 °C. La dosis de cada inyección de oxaliplatino fue de 6 mg/Kg. Para ello, se hizo una dilución del stock en glucosa 5 % y se inyectó el volumen correspondiente según el peso del ratón (10 ml/Kg). El oxaliplatino siempre fue preparado el mismo día de la inyección. El modelo consistió en la aplicación

de 3 inyecciones intraperitoneales de oxaliplatino 6 mg/Kg o su vehículo (glucosa 5 %), aplicados en días alternos (Fig. 3.1). La inyección del oxaliplatino o el vehículo fue realizada en ciego.

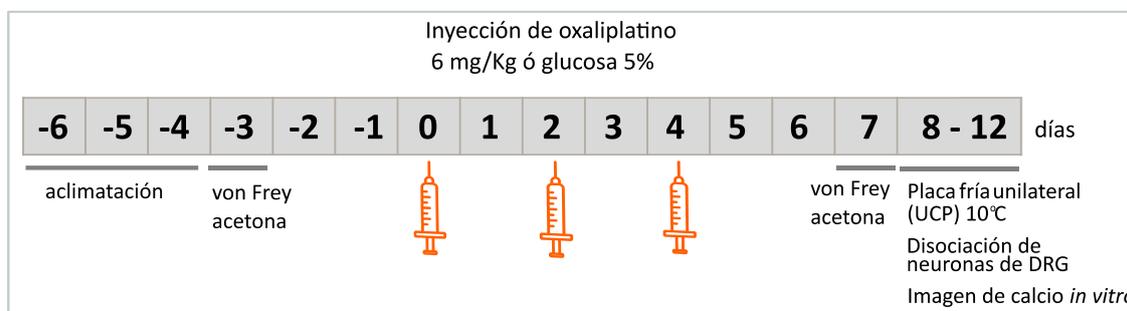


Figura 3.1. Protocolo de inducción de la neuropatía por administración de oxaliplatino. Los valores basales de las pruebas de comportamiento de von Frey y acetona se realizan a D-3 cuando los animales han tenido al menos dos o tres días de aclimatación en la zona experimental. En D0, D2 y D4 se realizaron las inyecciones intraperitoneales de oxaliplatino, 6 mg/Kg o glucosa 5 %. A D7 se evalúa la presencia de alodinia mecánica y al frío (en ese orden). Los días D8 a D12 se realiza la prueba de la placa fría unilateral (UCP) a 10 °C y la extracción de DRG para posterior disociación de sus neuronas y la realización de registros de imagen de calcio *in vitro*.

Datos previos indican que la máxima hipersensibilidad mecánica y al frío tras la administración de oxaliplatino se manifiesta 3-4 días posterior a una inyección del mismo (Descoeur, Pereira et al. 2011). Por esta razón, las pruebas conductuales (prueba de la acetona y von Frey) se realizaron tres días posteriores a la última inyección de oxaliplatino (D7). Por otro lado, en ocasiones (entre los días D8 y D12) se procedió a la extracción de los ganglios raquídeos (DRG) para posteriormente caracterizar las neuronas disociadas. Por ello, la prueba de la placa fría unilateral se aplicó el mismo día de la realización de la extracción de los ganglios y así poder así confirmar la presencia del fenotipo de dolor (Fig. 3.1).

3.1.2 Inyección de S1RA en ratones

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6. En este grupo experimental se ha trabajado solo con ratones machos por la falta de disponibilidad de ratones hembra en su momento.

El compuesto S1RA (E-52862), fue proporcionado por la empresa farmacéutica Laboratorios ESTEVE S.A. Se trata de un antagonista específico de la chaperona $\sigma 1$ con

alta afinidad ($K_i = 17 \text{ nM}$). En los estudios *in vivo*, se inyectó intraperitonealmente a una concentración final de 40 mg/Kg. La solución del compuesto se preparó el mismo día de la inyección, y fue disuelto en solución salina estéril (9 mg/ml, B. Braun Medical). El volumen de solución inyectado fue proporcional al peso del animal (10 ml/Kg). Los animales recibieron una inyección de S1RA durante once días consecutivos, tres días antes de la primera inyección de oxaliplatino y hasta tres días después de la última (Fig. 3.2). A partir del día 7 se realizaron las pruebas conductuales que se explican a continuación, para así evaluar el efecto antialodínico de la administración de S1RA (Gris, Portillo-Salido et al. 2016). La inyección de S1RA o su vehículo se realizó a ciegas.

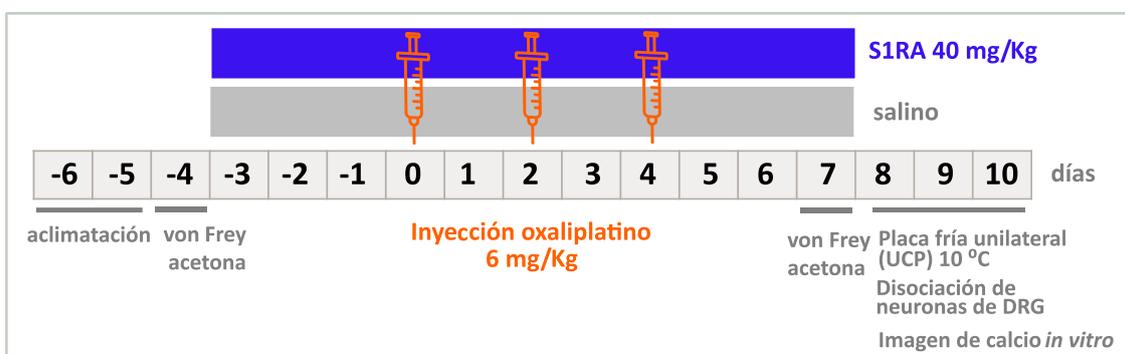


Figura 3.2. Modelo preventivo de la inducción de la neuropatía periférica por administración de S1RA. Desde el día posterior a la realización de las pruebas de von Frey y acetona basales, D-3, hasta D7 se realizaron inyecciones intraperitoneales matutinas de S1RA 40 mg/Kg o solución salina. Simultáneamente, a D0, D2 y D4 se realizan inyecciones vespertinas de oxaliplatino 6 mg/Kg o glucosa 5 %. A D7 se realizan las pruebas de von Frey y acetona. Los días D8-D10 se realiza la prueba de UCP 10 °C y la posterior extracción de DRG para la realización de registros de imagen de calcio *in vitro*. Las inyecciones se realizaron en ciego.

3.2 Pruebas de comportamiento

Para las pruebas de comportamiento se utilizaron ratones C57BL/6, TRPA1^{-/-} machos y hembras de 8 a 15 semanas de edad. La evaluación y análisis conductual se realizó en ciego.

3.2.1 von Frey

Los ratones fueron ubicados en cajas de metacrilato transparente sobre una malla metálica con perforaciones de 5x5 mm, al menos 2 horas antes de la evaluación

para lograr la habituación al lugar. La sensibilidad mecánica fue evaluada aplicando los filamentos de von Frey (BIO-VF-M model, Bioseb-In vivo Research Instruments, France), (Tabla 3.1). El filamento fue aplicado perpendicular a la superficie plantar y se ejerció presión hasta curvarlo formando un ángulo de 90°. El filamento se mantuvo en esta posición al menos 1 segundo, a menos que el animal mostrase una respuesta positiva antes de finalizar la aplicación del estímulo. En este trabajo se ha considerado como respuesta positiva la elevación o desplazamiento de la pata trasera inmediatamente posterior a la aplicación del estímulo (Fig. 3.3A).

El paradigma que se empleó es el llamado “up and down” (Dixon 1980, Chaplan, Bach et al. 1994) y para evaluar la presencia de alodinia mecánica se siguió el protocolo descrito por Llorián-Salvador M. y colaboradores (Llorian-Salvador, Gonzalez-Rodriguez et al. 2016) que menciono brevemente a continuación:

Los filamentos utilizados fueron los catalogados por Bioseb como 2.44, 2.83, 3.22, 3.61, 4.08, 4.56. En la Tabla 3.1 se puede consultar la fuerza que ejerce cada uno de estos filamentos. Se comenzó la evaluación con el filamento 3.61 que corresponde al valor medio del rango de fuerzas utilizadas. Una respuesta positiva fue seguida por la aplicación del filamento inmediatamente más fino (filamento 3.22), en caso de obtener una repuesta negativa se aplicó el pelo inmediatamente más grueso (filamento 4.08). Este procedimiento se aplicó hasta tener 6 respuestas consecutivas (positivas o negativas). Los resultados se expresan como el 50 % del umbral de respuesta. Para ello se calcula utilizando la siguiente fórmula matemática:

$$50\%(\text{umbral})g = \frac{10X_f + jd}{10.000}$$

Donde X_f es el valor del último filamento de von Frey aplicado, j es un factor de corrección basado en el patrón de respuestas y se obtiene de la tabla de calibración de Dixon (Dixon 1965) y d es la distancia media entre el tamaño de los estímulos (en este caso 0.39). El valor final para cada medida, se determinó como el promedio entre ambas patas traseras.

Tabla 3.1. Filamentos de von Frey utilizados como estímulos mecánicos. Información extraída de la casa comercial BIOSEB.

Según la casa comercial BIOSEB	
Tamaño del estímulo Log (10*fuerza(mg))	Fuerza (g)
2.44	0.04
2.83	0.07
3.22	0.16
3.61	0.40
4.08	1
4.56	4

3.2.2 Prueba de acetona

Para evaluar la sensibilidad al frío inocuo, se utilizó la prueba de evaporación de la acetona. Esta prueba es utilizada para medir los comportamientos aversivos provocados por el enfriamiento por evaporación. Generalmente es utilizada como una medida de alodinia al frío (Deuis, Dvorakova et al. 2017). Los animales fueron colocados en cajas transparentes sobre una rejilla metálica (perforaciones de 5x5 mm). Con una jeringa de 1 ml (J. T. Baker REF. 67-64-1) se aplicó una gota de aproximadamente 50 μ l de acetona sobre la superficie plantar de la pata trasera. Durante los 60 segundos posterior a la aplicación se contabilizaron comportamientos como la elevación de la pata, la apertura de los dedos y la lamida o sacudida de la pata. El valor final se obtuvo como el promedio de la evaluación de ambas patas traseras. Se evaluó cada extremidad por separado y se calculó el valor promedio del número de comportamientos observados en cada una de ellas (Fig. 3.3B).

3.2.3 Prueba de placa fría unilateral a 10 °C

Para el estudio de la hipersensibilidad al frío se utilizó la prueba de la placa fría unilateral (Menéndez, Lastra et al. 2002). Los animales fueron cuidadosamente inmovilizados, apretando suavemente con dos dedos la piel de la región interescapular. Una vez inmovilizados, se colocó una sola pata trasera en la placa a 10 °C (IITC Life Science, modelo PE34) y se cronometró la latencia de elevación o retirada de la pata. En

esta prueba es esencial que el animal mantenga la extremidad evaluada en contacto permanente con la superficie de la placa para evitar falsos positivos. El valor final fue obtenido de calcular el promedio de las latencias de ambas patas traseras (Fig. 3.3C).

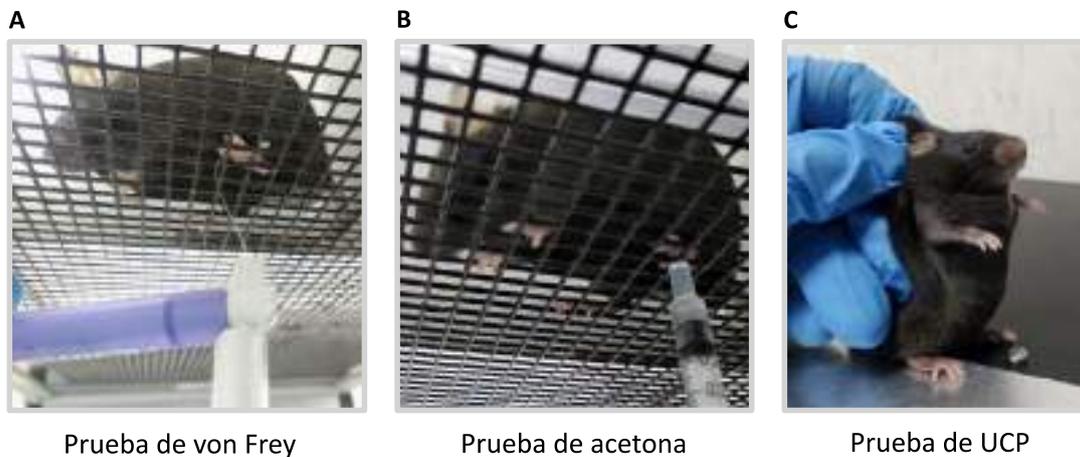


Figura 3.3. Pruebas de conducta aplicados. A) prueba de von Frey para evaluar alodinia mecánica. **B)** Prueba de acetona para evaluar alodinia al frío. **C)** Prueba de placa fría unilateral (Unilateral Cold Plate, UCP) a 10 °C para evaluación de la hiperalgesia al frío.

3.2.4 Inyección intraplantar de AITC

Para el estudio del comportamiento aversivo provocado tras la activación del canal TRPA1 se realizó una inyección subcutánea en la superficie plantar de 10 μ l de AITC 10 mM. Los animales fueron inmovilizados e inyectados con una jeringa de insulina (29G) en la pata trasera derecha, inmediatamente posterior a la inyección fueron colocados en cajas transparentes sobre una rejilla metálica (perforaciones de 5x5 mm) donde se realizó la grabación del comportamiento durante 5 minutos. La respuesta aversiva fue medida como la cuantificación del tiempo de lamida (segundos) de la pata inyectada.

3.3 Cultivos celulares, transfección y disociación de neuronas

En este trabajo se han utilizado células embrionarias de riñón humano (células HEK293) obtenidas a través de ECACC (European Collection of Cell Cultures). Estas células se han utilizado como sistema de expresión transitoria del canal hTRPA1-tGFP, también se han utilizado para obtener la línea estable HEK293-hTRPA1-tGFP y para obtener la línea en la que se silenció la chaperona sigma 1 (σ 1).

3.3.1 Medios de cultivo

Medio completo para células **HEK293 (DMEMc)**: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con Glutamax (Gibco™ REF. 61965-026 Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10 % de suero bovino fetal y 1 % de penicilina-estreptomicina.

Medio completo para células **HEK293-σ1KO (DMEMc-σ1KO)**: medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con glucosa (D-6546 Sigma-Aldrich) con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Gibco™ REF. 16000-044 Thermo Fisher Scientific), 1,1 % L-glutamina-penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich REF. G6784) y 0.06 % diclorhidrato de puromicina (Sigma-Aldrich REF. P9620).

Medio completo sin Ca²⁺ para **neuronas**: Medio HBSS sin CaCl₂ y sin MgCl₂ (Gibco™ REF.14170-088 Thermo Fisher Scientific) suplementado al 1 % con medio MEM-vit (Gibco™ REF. 11120-037 Thermo Fisher Scientific), al 10 % con suero fetal bovino (FBS, Gibco™ REF. 16000-044) y al 1 % con penicilina/estreptomicina (Gibco™ REF. PL15140122 Thermo Fisher Scientific).

Medio completo para **neuronas (MEMc)**: Medio MEM con L-glutamina (Gibco™ REF. 11095-080 Thermo Fisher Scientific) suplementado al 1 % con medio MEM-vit (Gibco™ REF. 11120-037 Thermo Fisher Scientific), al 10 % con suero fetal bovino (FBS, Gibco™ REF. 16000-044 Thermo Fisher Scientific) y al 1 % con penicilina/estreptomicina (Gibco™ REF. PL15140122 Thermo Fisher Scientific).

Medio **INCmix** (para disociación enzimática de neuronas): NaCl 155 mM, K₂HPO₄ 1.5 mM, HEPES 5.6 mM, NaHEPES 4.8 mM, glucosa 5 mM y penicilina/streptomicina 1 µl/ml, en agua destilada autoclavada, pH: 7.4.

3.3.2 Línea celular HEK293

Se utilizaron células HEK293 como sistema de expresión heteróloga. Este sistema confiere la ventaja de poder expresar la o las proteínas de interés en un sistema biológico menos complejo y con un mayor control de las condiciones experimentales.

Las células HEK293 (ECACC, Salisbury, Reino Unido) se mantuvieron en medio completo DMEMc incubadas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

Semanalmente se realizó un pase celular como parte de su mantenimiento, limitando el uso del mismo lote celular hasta el pase número 30. Además, mensualmente, las células fueron analizadas con la prueba de micoplasma, descartándose las mismas en caso de dar positivo. Este proceso de mantenimiento se realizó con todas las líneas celulares utilizadas.

3.3.3 Células HEK293- σ 1KO

La línea celular HEK293 en la cual la chaperona σ 1 se encuentra silenciada fue suministrada por los Laboratorios ESTEVE (Ciudad de Barcelona, España). Para su generación, se realizó el silenciamiento genético de la chaperona σ 1 mediante la tecnología CRISPR-Cas9. En los Laboratorios ESTEVE, verificaron la ausencia de σ 1 mediante estudios de unión (binding) utilizando como radioligando la [3H]-(+)-pentazocina, un agonista de σ 1, siendo el valor de la constante de disociación obtenida mayor a 1000 nM ($K_d > 1000$ nM). Además, comprobaron mediante western blot que en muestras de esta línea no existe expresión de la proteína. Este último control también fue realizado en nuestro laboratorio para verificar la ausencia de la chaperona σ 1 una vez recibidas las células.

Las células HEK293- σ 1KO se mantuvieron en medio completo DMEMc- σ 1KO incubadas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

3.3.4 Transfección transitoria

3.3.4.1 Protocolo de transfección

La introducción de ácidos nucleicos en las células HEK293 se realizó por el método de lipofección. El protocolo de transfección transitoria consistió en los siguientes pasos:

Las células HEK293 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^5 células / pocillo. Dependiendo del experimento, se (co) transfectó 1 o 2 plásmidos simultáneamente, manteniendo la cantidad total de ADN en 1 - 1.5 μg por pocillo. La transfección consistió en la combinación de dos soluciones previamente preparadas:

1. 50 μl de OptiMem (Gibco™ REF. 11058-021 Thermo Fisher Scientific) + ADN
2. 50 μl de OptiMem + 2 μl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen REF.1168-019).

Este volumen final fue incubado a temperatura ambiente durante 20 minutos y fue agregado por goteo al pocillo con células que se encontraban en 400 μl de DMEMc. Después de 4-6 horas, el medio celular se reemplazó por 0.5 ml de DMEMc previamente atemperado a 37 °C. Los experimentos de registro de calcio intracelular y registro electrofisiológicos tuvieron lugar 24 horas después de la transfección. La noche anterior al experimento, las células se tripsinizaron (0,25 % de tripsina-EGTA) y se sembraron a una densidad más baja en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro (Thermo Fisher Scientific) previamente tratados con poli-Lisina al 0,01 % (P-4707 Sigma-Aldrich).

3.3.4.2 Plásmidos utilizados

Para la realización de este trabajo se utilizaron diferentes plásmidos de expresión en mamífero, donados por diferentes laboratorios, y otro generado en el nuestro (Tabla 3.2). En estos plásmidos se encuentra el gen que codifica para la proteína TRPA1 fusionado a una molécula fluorescente turbo GFP (Green Fluorescent Protein) o el gen que codifica para la proteína $\sigma 1$ fusionado a una molécula EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) o mCherry (miembro de las proteínas fluorescentes rojas).

Tabla 3.2. Resumen de plásmidos utilizados.

Plásmido	Gen	Procedencia	Observaciones	Referencia
hTRPA1-tGFP	TRPA1 humano fusionado con turbo GFP	Dr. Viktorie Vlachova	Proteína de fusión Variedad turbo GFP en extremo C-terminal de TRPA1 Excitación: 470 nm	(Sura, Zima et al. 2012)
mσ1R-EYFP	σ1R ratón fusionado con EYFP	Dr. Tsung-Ping Su	Proteína de fusión EYFP en extremo C-terminal de σ1R Excitación: 514 nm	(Hayashi and Su 2003)
hσ1R-mCherry	σ1R humano fusionado con mCherry	Laboratorio Dr. Viana Dra. Gomis	Proteína de fusión mCherry en extremo C-terminal de σ1R Excitación: 590 nm	

3.3.4.3 Generación línea celular estable HEK293-hTRPA1-tGFP

La línea celular HEK293 con expresión estable del canal iónico TRPA1-tGFP humano fue generada en nuestro laboratorio, utilizando el método de selección con antibiótico. Originalmente se realizó la transfección transitoria en células HEK293 con el ADN de hTRPA1-tGFP utilizando el protocolo de lipofectamina descrito previamente. Transcurridas 48 horas posterior a la transfección y verificado el nivel de fluorescencia, las células fueron cuidadosamente lavadas con PBS y despegadas de la superficie con 100 µl de tripsina a 37 °C. Posteriormente, se realizó el traslado de estas células a una botella de 25 cm² (área de cultivo) con 4 ml de DMEMc. Una vez en la botella, las células fueron tratadas con el antibiótico geneticina (G418, Roche REF. 0427878001). La dosis de G418 fue incrementándose gradualmente de 250 µg/ml a 1000 µg/ml en un período de dos semanas, realizando los pases correspondientes. Finalmente, tras el tratamiento con G418, las células separadas por fluorescencia utilizando un citómetro de flujo. Las células verdes recolectadas se pasaron nuevamente a una botella con DMEMc y geneticina (1000 µg/ml) para su mantenimiento y utilización.

3.3.5 Disociación de neuronas sensoriales obtenidas de (DRG)

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de las neuronas sensoriales periféricas, se realizaron cultivos primarios de neuronas obtenidas de ganglios raquídeos de ratones macho y hembra adultos (8-15 semanas de edad) de la cepa C57BL/6 y TRPA1^{-/-} que se encontraban estabulados en el animalario RMG del Instituto de Neurociencias UMH-CSIC.

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y a continuación, una vez inconscientes y arrefléxicos, se sacrificaron por decapitación. Una vez extraída la columna vertebral, los DRG fueron separados de la médula espinal y colocados en una placa Petri de 60 mm con 2 ml de HBSS sin CaCl₂ y sin MgCl₂, (Gibco™ REF.14170-112 Thermo Fisher Scientific) para la extracción de las raíces de los nervios raquídeos. Posteriormente, los ganglios ya axotomizados, se colocaron en un Eppendorf con 0,07 % colagenasa tipo XI (Sigma-Aldrich REF. C7657) y 0,3 % de dispasa (Gibco™ REF.17105-041 Thermo Fisher Scientific) en medio INCMix para su digestión enzimática. Los ganglios se mantuvieron en esta solución durante 45 minutos a 37 °C y con 5 % de CO₂. Posteriormente, se disociaron mecánicamente con el objetivo de obtener una suspensión celular de neuronas sensoriales. La disociación mecánica consistió en pasar cuidadosamente la suspensión a través de una punta de pipeta de 1 ml (10-12 veces), seguido de una filtración a través de un filtro de nailon de 70 µm de tamaño de poro (Falcon). Las neuronas se recogieron por centrifugación a 1250 rpm durante 5 minutos. en medio completo sin calcio. Finalmente, el sedimento resultante fue resuspendido en MEMc. Las neuronas se sembraron sobre cristales de vidrio de 0.6 mm (10 µl/cristal) de diámetro tratados con poli-L-lisina al 0.01 % (Sigma) (Thermo Fisher Scientific). No se añadieron factores de crecimiento al medio de cultivo. Una vez sembradas las células en los cristales, se las mantuvo en el incubador durante 1 hora, para favorecer la fijación a los mismos, y luego se agregó MEMc hasta cubrir completamente el pocillo que las contenía. Los experimentos de imagen de calcio se realizaron de manera aguda, entre 4 y 6 horas posteriores a la realización del cultivo primario.

3.4 Sistemas de Registro

Se realizaron registros de imagen de calcio y registros electrofisiológicos, ambos utilizando células sembradas sobre cristal. El cristal con las células fue colocado en una cámara de registro construida en metacrilato y con un volumen de aproximadamente 0.5 ml, con perfusión constante de solución extracelular (1 ml/min) a una temperatura de 33 ± 1 °C cuando se registraron neuronas sensoriales y 26 ± 1 °C cuando se registraron células HEK293 y sus variaciones. La temperatura de la solución de perfusión se mantuvo mediante un sistema Peltier, fabricado por el taller electrónico del Instituto de Neurociencias, a la entrada de la cámara de registro. La temperatura de la solución dentro de la cámara de registro estuvo monitorizada constantemente a través de un sensor de temperatura conectado a un termómetro digital (Physytemp modelo BAT-12). El sensor de temperatura se mantuvo inmediatamente adyacente al campo celular estudiado. La solución de perfusión se mantuvo en circulación por gravedad. Los diferentes estímulos químicos se aplicaron mediante un sistema de paso de vías manual permitiendo cambiar de solución sin interrumpir el flujo de perfusión. El sistema de vaciado de la cámara de registro fue mediante goteo por gravedad. La cámara de registro fue colocada sobre el objetivo de un microscopio (en el caso de los experimentos de imagen de calcio, microscopio invertido) o por debajo del objetivo (registros de electrofisiología, microscopio vertical). El sistema de registro estaba dotado de los componentes necesarios para realizar medidas de cambios de concentración de calcio intracelular y registros electrofisiológicos de la corriente de membrana, detallándose los componentes en las secciones correspondientes.

3.4.1 Soluciones extracelulares e intracelulares

La composición de la solución extracelular utilizada para los experimentos de imagen de calcio *in vitro* y los registros de electrofisiología se detalla en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Soluciones utilizadas para registros de imagen de calcio *in vitro* y registros de electrofisiología.

Solución extracelular	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	3
CaCl ₂	2.4
MgCl ₂	1.3
Glucosa	10
HEPES	10

pH 7.4 ajustado con NaOH

Osmolaridad: 290-300 mOsm/L

Solución intracelular	
Compuesto	Concentración (mM)
CsCl	135
MgCl ₂	2
HEPES	10
EGTA	1
Na ₂ ATP	5
NaGTP	0.1

pH 7.3 ajustado con CsOH

Osmolaridad: 282 mOsm/L

3.4.2 Sustancias químicas aplicadas a las células durante los registros

En los bloques experimentales de imagen de calcio *in vitro* (células HEK293 y neuronas de DRG) para la activación del canal TRPA1 se utilizó un agonista electrófilo, **AITC**, a la concentración de 50 μM y un agonista no electrófilo, **carvacrol**, a la concentración de 100 μM . En ambos casos la solución final de estos compuestos fue preparada en solución extracelular y aplicados a través del sistema de perfusión. La solución stock de ambos compuestos fue preparada a una concentración de 100 mM en DMSO (Tabla 3.4).

En el caso de las células HEK293 también se aplicó **carbacol (Cch)** 20 μM como activador de los receptores muscarínicos, utilizándose la respuesta a este compuesto como control de viabilidad celular. La solución stock de Cch fue preparada a 10 mM agua destilada (Tabla 3.4).

En el bloque experimental de registros de electrofisiología se utilizó AITC 50 μM para evaluar los cambios de corriente dependiente de TRPA1.

En ambos tipos de registros, tanto las células HEK293 como las neuronas de DRG fueron incubadas a diferentes concentraciones y tiempos de incubación con los antagonistas de la chaperona σ 1: **S1RA** y **BD1063**. Las concentraciones utilizadas y detalles de los compuestos se pueden encontrar en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Compuestos utilizados en los bloques experimentales de imagen de calcio in vitro y

Compuesto	Concentración de almacenamiento (mM) y solvente	Concentración de trabajo (μM)	Observación	Procedencia
AITC 95 % (isotiocianato de alilo)	100 - DMSO	50	Agonista electrófilo del canal TRPA1	Sigma Aldrich REF: 377430
Carvacrol 98% (5-Isopropil-2-metilfenol)	100 - DMSO	100	Agonista no electrófilo del canal TRPA1	Sigma Aldrich REF: 282197
Carbacil (cloruro de carbamocolina)	10 - agua destilada	20	agonista de receptores muscarínicos	Sigma Aldrich REF: C4382
51RA	50 - DMSO	10, 25, 30, 50 y 100	Antagonista de $\alpha 1$	Laboratorios ESTEVE
BD1063	50 - agua destilada	10, 25, 30, 50 y 100	Antagonista de $\alpha 1$	Laboratorios ESTEVE

3.4.3 Registro del cambio de la concentración de Ca^{2+} intracelular

La técnica de registro de imagen de calcio se basa en el uso de indicadores de calcio fluorescentes para monitorizar los cambios en los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular.

En este trabajo, los niveles de Ca^{2+} intracelular se determinaron mediante el uso de la sonda fluorimétrica Fura-2, en su variedad Fura-2-acetoximetil éster (Fura-2AM). El Fura-2AM es capaz de atravesar la membrana plasmática y penetrar en el interior celular. Una vez en su interior, las esterasas citosólicas hidrolizan el grupo acetoximetil éster (AM), permitiendo que el Fura-2 se mantenga en el interior celular para unirse al calcio libre en el citoplasma. A continuación, se muestra el espectro de emisión del Fura-2 a 510 nm cuando se excita utilizando diferentes longitudes de onda y a diferentes concentraciones de calcio libre (Fig. 3.4).

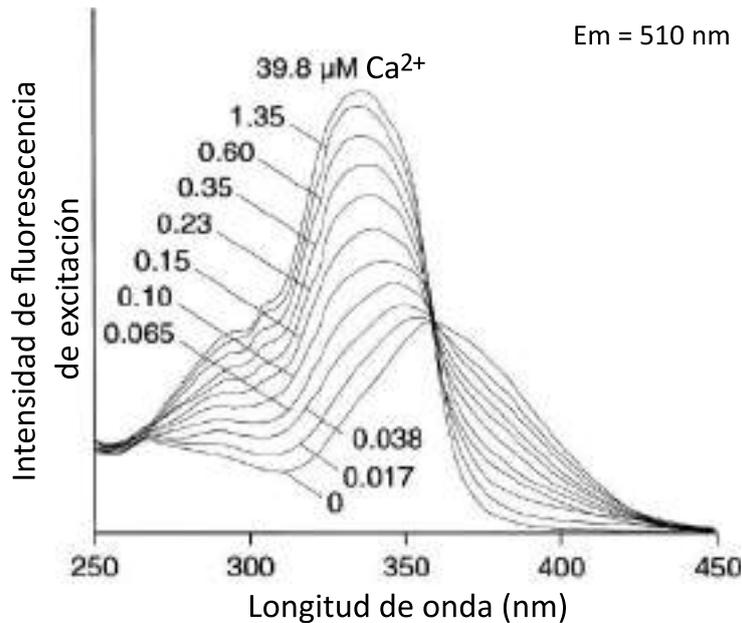


Figura 3.4. Espectro de excitación de la molécula Fura-2 en soluciones con una concentración de calcio libre que van de 0 a 39,8 μM. Modificado de las especificaciones de producto del Fura-2AM (Invitrogen™ REF. F1221).

Cuando el Fura-2 no está unido al calcio intracelular, presenta un pico de excitación de aproximadamente 362 nm (Fig. 3.4) que cambia a longitudes de onda más cortas cuando se encuentre unido a los iones de calcio intracelular. Se ha visto que la excitación de Fura-2 a 340 nm y 380 nm emite una intensidad de fluorescencia máxima (510 nm) y que esta es directamente proporcional a la concentración de calcio intracelular (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985). Así, los cambios en la concentración de calcio intracelular se representan como el cociente obtenido entre la fluorescencia emitida en las dos longitudes de onda $R = (F_{340}/F_{380})$ mediante la siguiente fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right)$$

Donde K_d es la constante de disociación entre el Fura-2 y el Ca^{2+} , R_{min} y R_{max} los valores de la razón de fluorescencia (F_{340}/F_{380}) que se obtienen al utilizar soluciones de concentración de calcio conocidas, siendo una de ellas saturante (R_{max}) y la otra a cero calcio (R_{min}). Por tanto, los cambios en el cociente (F_{340}/F_{380}) están directamente relacionados con los cambios de calcio intracelular. Los resultados en este trabajo se presentan como razón de fluorescencia (F_{340}/F_{380}).

3.4.3.1 Medidas de la razón de fluorescencia (F340/F380)

Las células se incubaron a 37 °C durante 45 minutos en la solución extracelular con la forma permeable, Fura-2AM (Invitrogen™ REF. F1221) a una concentración 5 μ M junto con 2 μ l de Pluronic F-127 al 0.2 % (P6867-2G, Invitrogen) para facilitar la penetración del Fura-2AM en el interior celular. Una vez incubadas las células, los cristales se lavaron con solución extracelular y se colocaron en la cámara de registro montada en el microscopio.

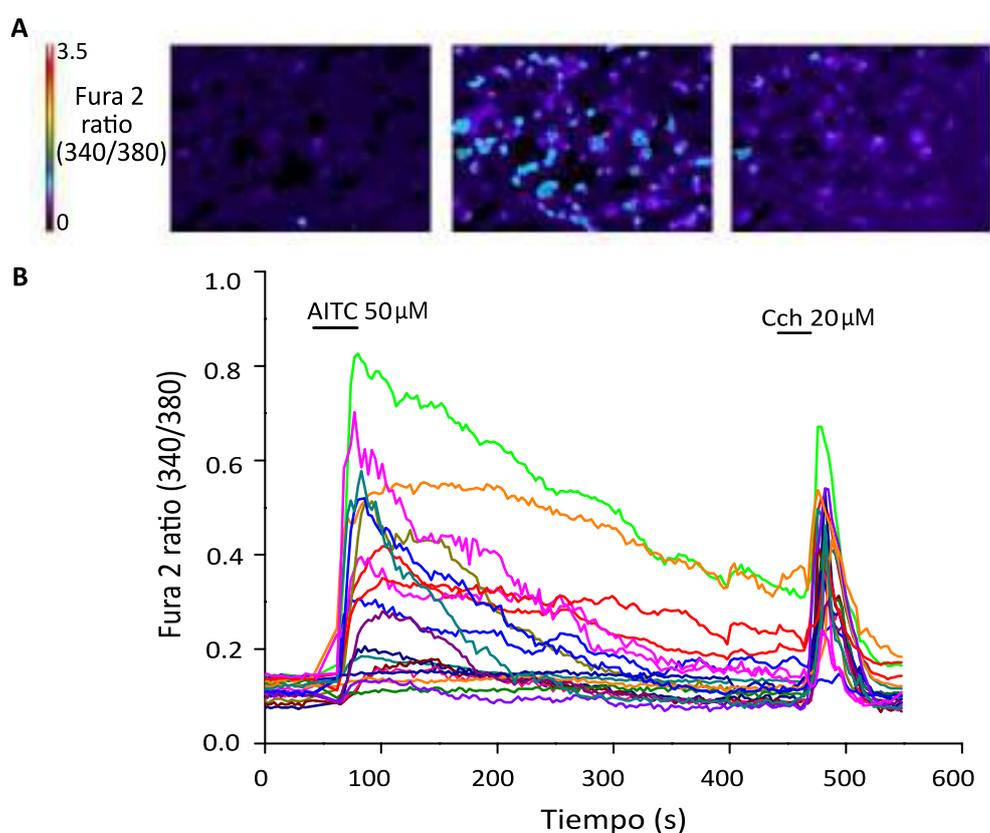


Figura 3.5. Variación del calcio intracelular en células HEK293 expresando hTRPA1-tGFP. A) La primera imagen muestra el nivel basal de calcio (F340/F380) de un cultivo de células HEK293 que expresan hTRPA1-tGFP. Para esta imagen el nivel de calcio en la escala de pseudocolor viene marcado por colores azul oscuro. En la imagen central se muestra el nivel de calcio intracelular de las células durante la estimulación con AITC 50 μ M y se observa un avance en la escala de pseudocolor en dirección al rojo según aumenta la concentración de calcio intracelular. La tercera imagen se muestra la recuperación de los niveles de calcio intracelular hacia el valor basal una vez retirado el estímulo de AITC. **B)** En el gráfico se muestran los datos del curso temporal de las variaciones en la concentración de calcio intracelular representados con el programa OriginPro 8.0 (OriginLab) donde cada trazo corresponde a una célula seleccionada y los niveles de F340/F380 para los estímulos de AITC y Cch.

Las células cargadas con Fura-2AM se excitaron de forma alterna con luz a las longitudes de onda de 340 y 380 nm, utilizando una rueda de filtros (Lambda 10-2; Sutter

Instruments) y una lámpara de xenón (Sutter Instruments) a través del objetivo 20x de un microscopio invertido (Leica DMI 3000B). La fluorescencia emitida fue posteriormente filtrada con un filtro de paso de longitud de onda larga de 510 nm para ser detectada por una cámara CCD Orca ER (Hamamatsu Photonics K.K.).

Las imágenes fueron adquiridas con una frecuencia de 1 cada 3 segundos con el programa Metafluor (Molecular Devices), visualizándose los cambios de la razón de fluorescencia (F380/F340) en tiempo real. Posteriormente, los registros se representaron utilizando el programa OriginPro 8.0 (OriginLab). En la figura 3.5 se muestra un ejemplo de la visualización de los cambios de razón de fluorescencia utilizando el programa Metafluor.

El análisis de datos se detalla en el apartado correspondiente.

3.4.3.2 Protocolo de estimulación con sustancias químicas

Como estímulos químicos se utilizaron agonistas del canal iónico TRPA1 expresado de manera estable o transitoria en las diferentes líneas celulares mencionadas previamente en el apartado 3.3. Todos los experimentos han sido realizados con la aplicación de un único estímulo de AITC 50 μM o carvacrol 100 μM (sólo en células HEK293), un período de lavado con solución extracelular (hasta reestablecer los valores de calcio intracelular a niveles basales) y un último estímulo de carbacol 20 μM como control de viabilidad celular en células HEK293 y KCl 30 mM en neuronas de DRG como control de viabilidad y como estímulo discriminativo entre neuronas y otro tipos celulares presentes en los cultivos (Fig. 3.6).

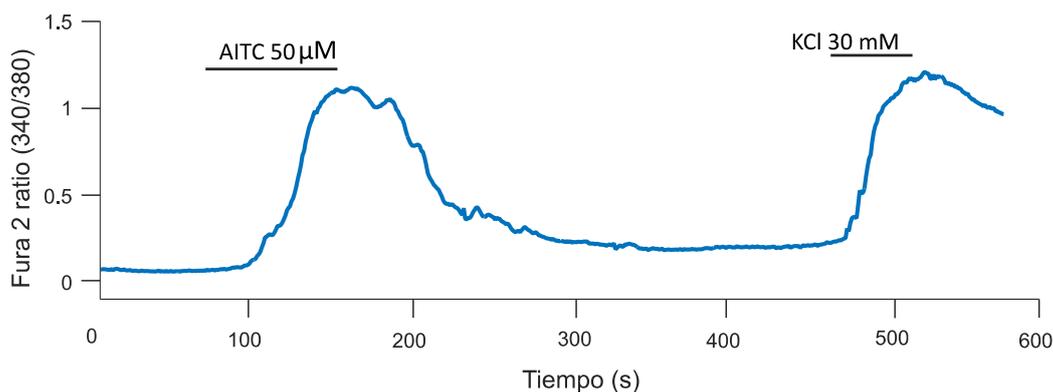


Figura 3.6. Ejemplo de protocolo de estimulación química en experimentos de imagen de calcio *in vitro*. El trazo que se visualiza corresponde a la respuesta de una neurona de DRG en el que se aplicó como primer estímulo AITC 50 μ M, agonista del canal TRPA1. Después de un período de lavado con solución extracelular se aplicó un estímulo de KCl 30 mM.

3.4.3.3 Protocolo de estimulación con rampa de frío en neuronas sensoriales

Además de los estímulos químicos mencionados previamente, en un grupo experimental de cultivos de neuronas de DRG, se llevó a cabo la estimulación de éstas enfriando la solución extracelular con una rampa de frío, siendo este el primer estímulo de la serie. Posterior a la rampa de frío se aplicó AITC 50 μ M y finalmente KCl 30 mM como se ha mencionado previamente (Fig. 3.7).

El estímulo térmico consistió en la aplicación de una rampa de frío desde 35 ± 1 °C hasta 10 ± 2 °C, utilizando un módulo Peltier que enfriaba la solución extracelular antes de su entrada en la cámara de registro. Una vez alcanzada la menor temperatura, esta se mantuvo durante aproximadamente 15 y 20 segundos, recuperándose a continuación hasta los valores basales.

Este bloque experimental fue realizado en un sistema de registro con un sistema de refrigeración más potente, lo que permitió realizar cambios rápidos de temperatura en la solución. En este sistema de registro las células cargadas con Fura-2AM se excitaron de forma alterna con las longitudes de onda, 340 nm y 380 nm, utilizando un monocromador (Polychrome V, Till Photonics). La fluorescencia emitida fue filtrada con un filtro de paso de longitud de onda larga de 510 nm para ser detectada por una cámara Andor888 (Andor Oxford Instruments). Las imágenes fueron adquiridas y guardadas cada un segundo con el programa Life Acquisition (TILL Photonics). Los datos fueron representados con el programa OriginPro 8.0 (OriginLab).

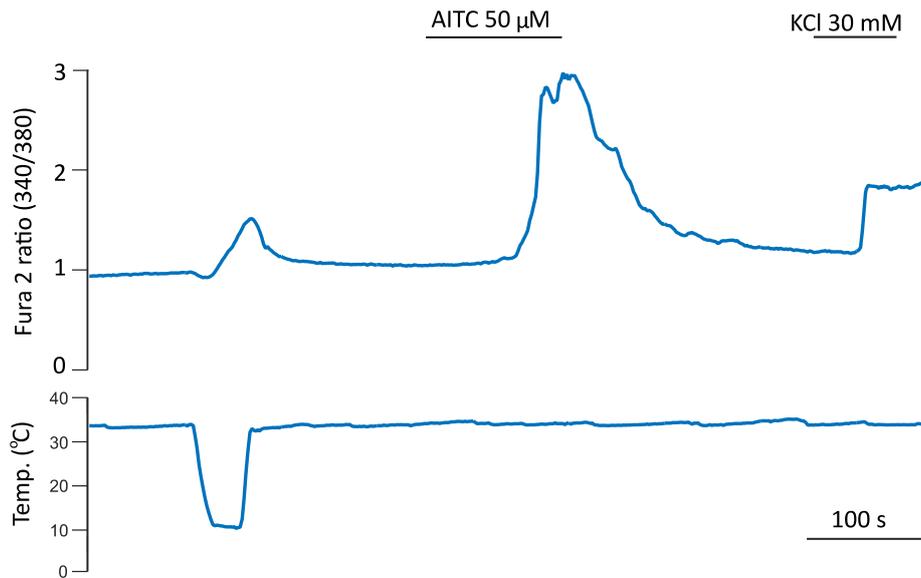


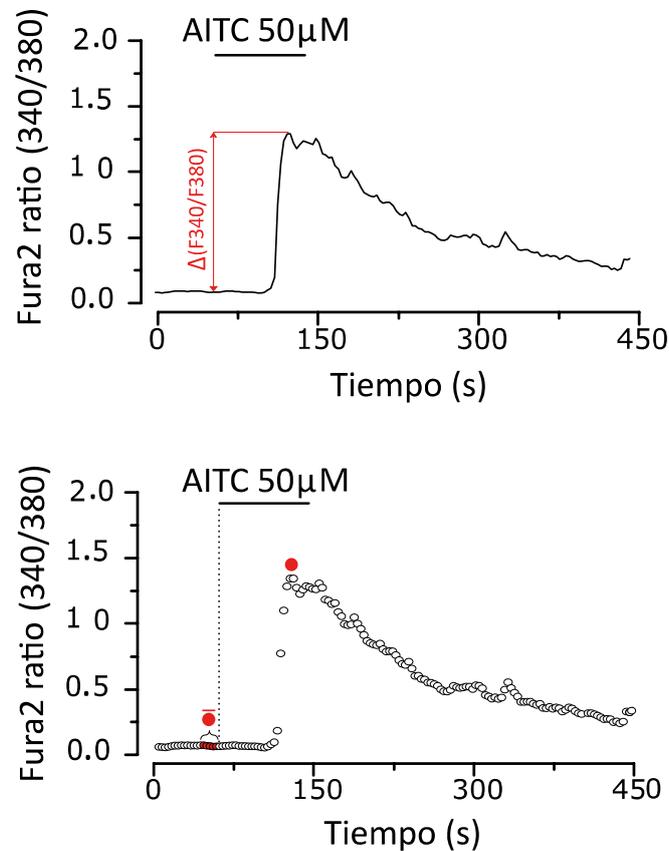
Figura 3.7. Protocolo aplicado en los cultivos de neuronas de DRG para el estudio de las respuestas a frío. Se aplicó como primer estímulo una rampa de frío desde 35 ± 1 °C hasta 10 ± 2 °C. Como segundo estímulo se aplicó AITC 50 μ M. Posterior a un período de lavado se aplicó como último estímulo KCl 30 mM.

3.4.3.4 Análisis de datos de imagen de calcio in vitro

Para el análisis de los registros de calcio intracelular, inicialmente se asignó una región de interés (ROI) a cada célula TRPA1-tGFP positiva (en el caso de cultivos de células HEK293) y a cada neurona del campo de experimentación (en el caso de cultivos primarios de neuronas de DRG). Definidas las ROIs, se obtuvo un trazo de los cambios de la razón de fluorescencia F340/F380 para cada una de ellas y posteriormente se continuó con el análisis numérico sobre cada trazo. Se analizaron los siguientes parámetros: la amplitud de la respuesta, el porcentaje de células que respondían a un determinado estímulo y los umbrales de respuesta a estímulo de frío.

Para el cálculo de la amplitud de la respuesta, se detectó el punto máximo (max) de la razón de fluorescencia (F340/F380) en el rango de tiempo en que cada estímulo fue aplicado ($(F340/F380)_{max}$). Luego, se calculó el valor basal de $(F340/F380)_{basal}$ para cada estímulo. Para obtener $(F340/F380)_{basal}$, se promediaron los valores de F340/380 durante los 15 segundos previos a la aplicación del estímulo (Fig. 3.8). Obtenidos los valores max y basal de (F340/F80) se calculó el incremento de calcio (amplitud) como la sustracción: $(F340/F80)_{max} - (F340/F380)_{basal}$.

El resultado de amplitud de respuesta para un determinado estímulo se expresa como el valor promedio de los trazos analizados y su error estándar (s.e.m).



$$\text{Amplitud} = \Delta(F340/F380) = F(340/380)_{\text{max}} - F(340/380)_{\text{basal}}$$

$$F(340/380)_{\text{basal}} = \bar{\bullet} = \text{promedio de } F340/F380 \text{ en los 15 s previos a la aplicación del estímulo}$$

$$F(340/380)_{\text{max}} = \bullet = \text{valor máximo de } F340/F380 \text{ durante la aplicación de un estímulo}$$

Figura 3.8. Cálculo de la amplitud de la respuesta a un determinado estímulo: la amplitud de la respuesta fue calculada como la diferencia de la variación del cociente (F340/F380) entre el punto máximo y el valor basal.

Se consideraron respuestas positivas aquellas en las que el incremento de la razón de fluorescencias fue mayor o igual a 0.04. El cálculo del incremento de F340/F380 se realizó con un algoritmo de automatización creado con el programa Matlab (MathWorks versión R2015a). Sin embargo, posteriormente, los registros de cada célula fueron verificados manualmente para evitar incluir falsos positivos o negativos (por interpretación errónea del algoritmo aplicado) y para incluir incrementos que estuvieran

muy cercanos al valor umbral (0.04) y que de acuerdo a la forma del trazado adquirido se consideraron como una respuesta positiva.

Se tomó como población HEK293 TRPA1-tGFP total (100 %), a la suma de células que emitían fluorescencia al excitarse con una longitud de onda de 480 nm y que respondieron a cch (estímulo utilizado como control de viabilidad). A partir de este valor se calcularon los porcentajes de respuesta para cada uno de los estímulos aplicados.

En el caso de los cultivos de DRG, el 100 % de respuesta estuvo definido por aquellas neuronas que respondieron a KCl 30 mM, o a otro estímulo específico para la población de neuronas evaluadas.

Cuando se aplicó el estímulo de frío, también se calculó el umbral de temperatura al que las células comenzaron a responder. Para ello, primero se alineó el trazo de cambio de calcio de cada célula con la rampa de frío aplicada. Una vez definidas las respuestas positivas para este estímulo (aquellas cuya amplitud de respuesta fue ≥ 0.07), se calculó la temperatura a la que comenzó la respuesta. Para ello se buscó el valor de temperatura correspondiente al punto F340/F380 previo a cuando éste comenzó a incrementar (Fig.3. 9).

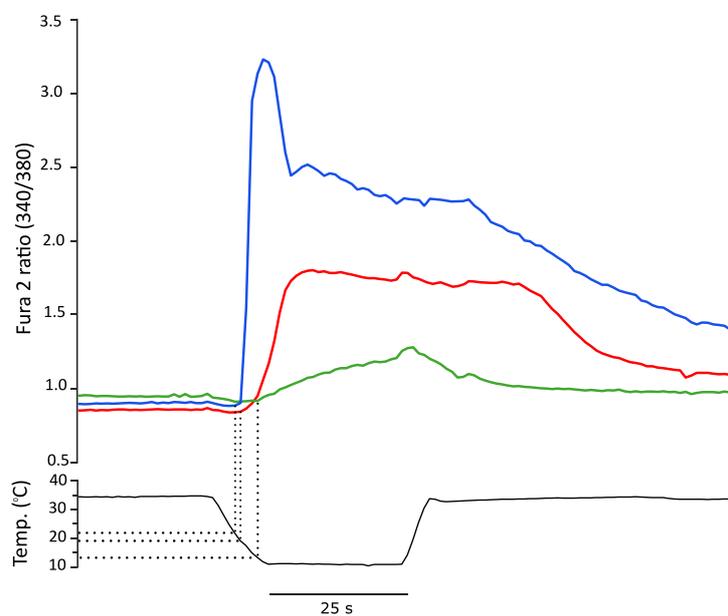


Figura 3.9. Determinación de los umbrales de respuesta de temperatura cuando se aplica un estímulo de frío. En el gráfico se muestran los datos del curso temporal de las variaciones en la concentración de calcio intracelular representados con el programa OriginPro 8.0 (OriginLab). Cada trazo corresponde a una neurona de DRG y los niveles de F340/F380 cuando se aplica una rampa de frío como estímulo. Las líneas de puntos indican el comienzo de la respuesta y el umbral de temperatura correspondiente.

Excepciones pertinentes:

Cultivos de HEK293: en algunas situaciones, cuando las células respondieron de manera clara a un estímulo, pero no respondieron a cch también fueron contabilizadas para el cálculo de amplitud promedio y porcentaje de respuesta.

Cultivos de neuronas de DRG: las células que no respondieron a KCl pero respondieron claramente a otros estímulos, considerados estos específicos para los canales iónicos que nos interesa estudiar, también fueron incluidas en el cálculo de amplitud y porcentaje de respuesta.

Criterio de exclusión en los registros de calcio intracelular:

Las células que presentaron el valor promedio de la razón de fluorescencia basal (F340/F380)_{basal} superior a 0.4 al comienzo del registro se eliminaron del análisis, por considerarse anómalo y fuera del rango normal. También se excluyeron células que no respondieron a cch (en HEK293) o KCl (en cultivos de DRG) y a ningún otro estímulo aplicado.

3.4.4 Registros de corriente de membrana

El registro electrofisiológico con la técnica de patch-clamp permite el estudio de las propiedades electrofisiológicas de las membranas celulares (Hamill, Marty et al. 1981). En este trabajo la hemos utilizado en la modalidad de célula entera, la cual permite el registro de las corrientes macroscópicas que fluyen a través de los canales iónicos TRPA1 presentes en toda la célula.

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron de células sembradas sobre cristal, las cuales se colocaron en la cámara de registro con la solución extracelular, indicada en la Tabla 3.3. Se utilizó un microscopio vertical Olympus FV500 que incorporaba un sistema de fluorescencia compuesto de un monocromador Polychrome V y una cámara Imago 382KL 3719 (Till Photonics). El monocromador y la cámara se controlaron a través del programa de imagen Imaging Workbech (INDEC Systems. Inc).

Las células para registro se seleccionaron por la presencia de fluorescencia al iluminarse con un haz de longitud de onda de 480 nm, indicando que el plásmido había

sido transfectado y la proteína de interés expresada. Los experimentos se hicieron usando un objetivo de inmersión de 40 aumentos. Los electrodos de registro se obtuvieron utilizando capilares de borosilicato con un filamento interno (Harvard Apparatus GC150F-7.5) y un estirador Sutter P-2000 (Sutter Instruments). La resistencia de los electrodos osciló entre 4 - 7 M Ω y fueron rellenados a 1/3 de su capacidad con la solución intracelular descrita en la Tabla 3.3. El valor de la resistencia se obtuvo cuando el electrodo fue sumergido en la solución extracelular y con la posterior aplicación de un pulso cuadrado de voltaje.

El registro electrofisiológico de patch-clamp en la configuración de célula entera se realizó en el modo de fijación de voltaje mediante un amplificador Multiclamp 700B y digitalizando las señales mediante una tarjeta Digidata 1322A (Molecular Devices Corp.). La adquisición y análisis de los datos se realizó con el programa pClamp 10.1 (Molecular Devices Corp.).

Para lograr la configuración de célula entera primero se puso en contacto el electrodo con la membrana celular y se aplicó presión negativa para la formación de un sello hasta obtener una resistencia de aproximadamente 1G entre la pipeta y la membrana celular. Llegado a este punto, se procedió a aplicar un último pulso de presión negativa (mediante succión) para romper el parche de membrana.

Debido a que la membrana celular se comporta como un condensador en paralelo con una resistencia, inmediatamente posterior a ingresar en la célula aparecen corrientes capacitivas transitorias que fueron compensadas digitalmente hasta minimizarlas. Tras la compensación de la corriente capacitiva, se obtuvo un valor estimado de la capacitancia celular (entregado por el amplificador) la cual es indicativa del área de la membrana plasmática. Los registros electrofisiológicos se analizaron utilizando el programa Clampfit 10.1 (Molecular Devices Corp.) y WinAscd software (Prof. G. Droogmans, Laboratory of Physiology, KU Leuven). Para su representación gráfica se utilizó el programa Origin8.0 (OriginLab). Los detalles se explican en el apartado análisis de datos.

3.4.4.1 Protocolos de estimulación

Se utilizaron dos protocolos de registro y estimulación:

1. Registro de la corriente de membrana de entrada evocada por la aplicación de AITC manteniendo constante el potencial de membrana a un valor de -60 mV.

De este bloque experimental se extrajeron los valores de la amplitud máxima de la corriente de entrada (pA) evocada por AITC 50 μ M. El valor obtenido fue dividido por la capacitancia de la célula registrada (pF) para así obtener la densidad de corriente (pA/pF). También se calculó el tiempo en alcanzar la máxima corriente o tiempo al pico (t_p) (segundos), después de la aplicación del agonista.

2. Aplicación de rampas de voltaje desde -100 mV hasta +100 mV.

Partiendo de un potencial de reposo igual a -60 mV, la célula fue fijada a -100 mV durante 120 ms y posteriormente se aplicaron rampas despolarizantes hasta +100 mV. La rampa de voltaje presentó una duración de 600 ms y se aplicó repetidamente a una frecuencia de 0.33 Hz. Al finalizar la rampa, el potencial de membrana volvió al valor de reposo inicial (Fig. 3.10). Del registro de rampas de voltaje se tomaron los valores de las corrientes a -60 mV y +60mV. Los valores de corriente se analizaron con el programa WinAscd software (Prof. G. Droogmans, Laboratory of Physiology, KU Leuven).

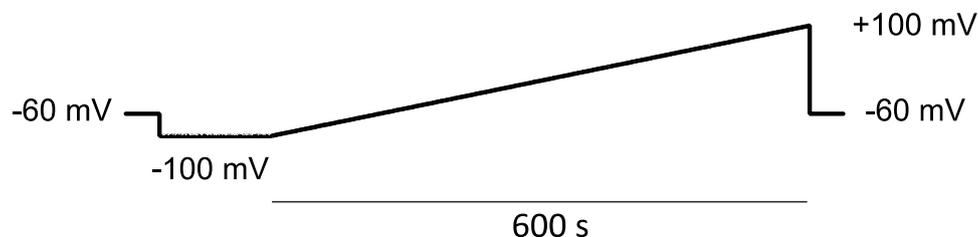


Figura 3.10. Ejemplo de la rampa de voltaje aplicada en los registros de patch-clamp.

3.4.4.2 Análisis de datos de registros de electrofisiológicos

Para el cálculo de la amplitud se identificó el punto de corriente máxima (I_{max}) y el punto previo al comienzo del aumento de la corriente (I_{basal}). La amplitud de la corriente (ΔI) se calculó como la diferencia entre I_{max} y I_{basal} .

Se obtuvo el valor de la capacitancia (C) directamente desde el amplificador. Los datos se expresan como valores medios de densidad de corriente I(pA/pF) para todas las células y su error estándar, s.e.m. (Fig. 3.11).

Densidad de corriente: $I \text{ (pA/pF)} = \Delta I / C = (I_{\text{max}} - I_{\text{basal}}) / C$

El tiempo al pico (t_p) fue calculado como la variación entre el tiempo correspondiente a la corriente máxima y el tiempo en el que comenzó a aumentar la corriente (t_0) (Fig. 3.11).

Tiempo al pico: $t_p \text{ (s)} = t_{\text{imax}} - t_0$

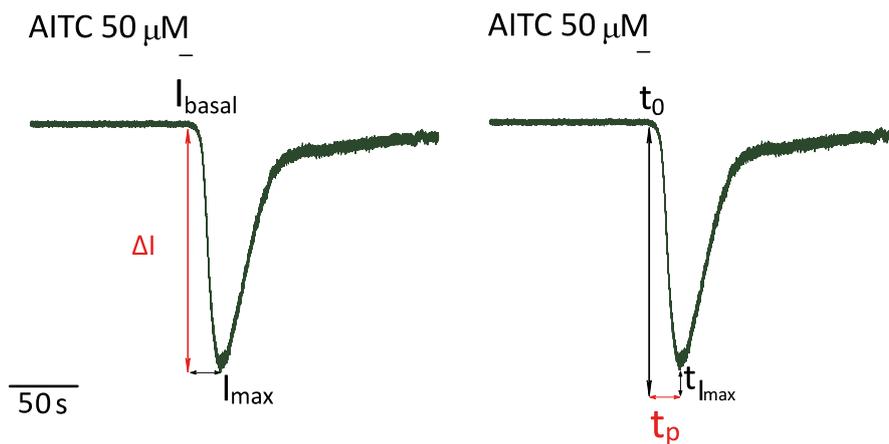


Figura 3.11. Cálculo de corriente de entrada máxima y cálculo de tiempo al pico por aplicación de AITC 50 μM.

3.5 Técnicas Bioquímicas

3.5.1 Co-inmunoprecipitación

Las células HEK293 se sembraron en placas Petri de 35 mm y se mantuvieron hasta que estuvieran lo suficientemente confluentes para poder ser transfectadas (70 - 80 % de confluencia). La extracción de proteína e inmunoprecipitación (IP) se realizó a las 48 horas posteriores a la transfección. Las placas con las células se colocaron en un recipiente con hielo, posteriormente, se recogieron en PBS 0.1 M atemperado a 4 °C y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos a 800 g. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 500 μl de tampón de lisado (Tris 50 mM, NaCl 120 mM, EDTA 0.5 mM, nonidet P-40 0.5 %, pH: 7.5) previamente enfriado en hielo y al que se le había añadido inhibidores de proteasas (pastillas Complete Mini, Roche). Posteriormente, se pasó cuidadosamente la muestra 5-6 veces, por una jeringa de insulina (29G). Se

mantuvo la muestra durante 30 minutos en agitación por rotación (noria) a 4 °C y luego se centrifugó a 20.000 g y 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se incubó con 100 µl de la resina G-sefarosa (Sigma P3296) previamente lavada (3 veces) con PBS 0.1 M durante 1 hora en la noria a 4 °C. La proteína G-sefarosa se utilizó para evitar posibles uniones inespecíficas en el proceso de inmunoprecipitación. Tras la incubación del sobrenadante con la resina G-sefarosa, se centrifugó a 12.000 g durante 2 minutos. Del sobrenadante se separaron 50 µl (40 µl utilizados como muestra inicial, llamada "Input" y 10 µl se utilizaron para la medición de proteína total). La muestra restante se utilizó para la inmunoprecipitación, que se llevó a cabo utilizando el sistema GFP-Trap (Chromotek), que consiste en inmunoesferas que reconocen diferentes moléculas GFP y la EYFP. La muestra se incubó con 50 µl de inmunoesferas GFP-Trap previamente lavada (3 veces) con el tampón de lisado descrito anteriormente. La incubación de la muestra con las inmunoesferas GFP-Trap se mantuvo durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra fue centrifugada a 20.000 g 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se conservó como muestra sin unir al precipitado, llamado "Post", y 10 µl se utilizaron para la medición de la concentración de proteína. Las mediciones de concentración de proteína se realizaron por quimioluminiscencia utilizando el KIT de Pierce™ BCA™ (REF. 23225 Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, se procedió a eluir la proteína inmunoprecipitada. Para ello, se lavaron las inmunoesferas GFP-Trap con la proteína inmunoprecipitada 3 veces utilizando el tampón de lisado al que se le agregó inhibidores de proteasas. Después del último lavado, se procedió a una desnaturalización química (tampón de desnaturalización) y física (95 °C) que permite finalmente la extracción de la proteína inmunoprecipitada. Para ello, se agregaron 50 µl del tampón desnaturante 2X (0,5 M Tris pH 6.8, SDS 10 %, glicerol, mercaptoetanol, agua, bromofenol blue), se calentó a 95 °C durante 10 minutos y se centrifugó durante 2 minutos a temperatura ambiente y a 2500 g. Se conservó el sobrenadante con la proteína inmunoprecipitada y se desechó el precipitado. Luego, se cargaron 20 µl de esta muestra en un gel de acrilamida y en calles adyacentes el volumen correspondiente a 10-15 µg de proteína de las muestras "Input" y "Post" como control. Finalmente se realizó la inmunodetección por western blot (Fig. 3.12).

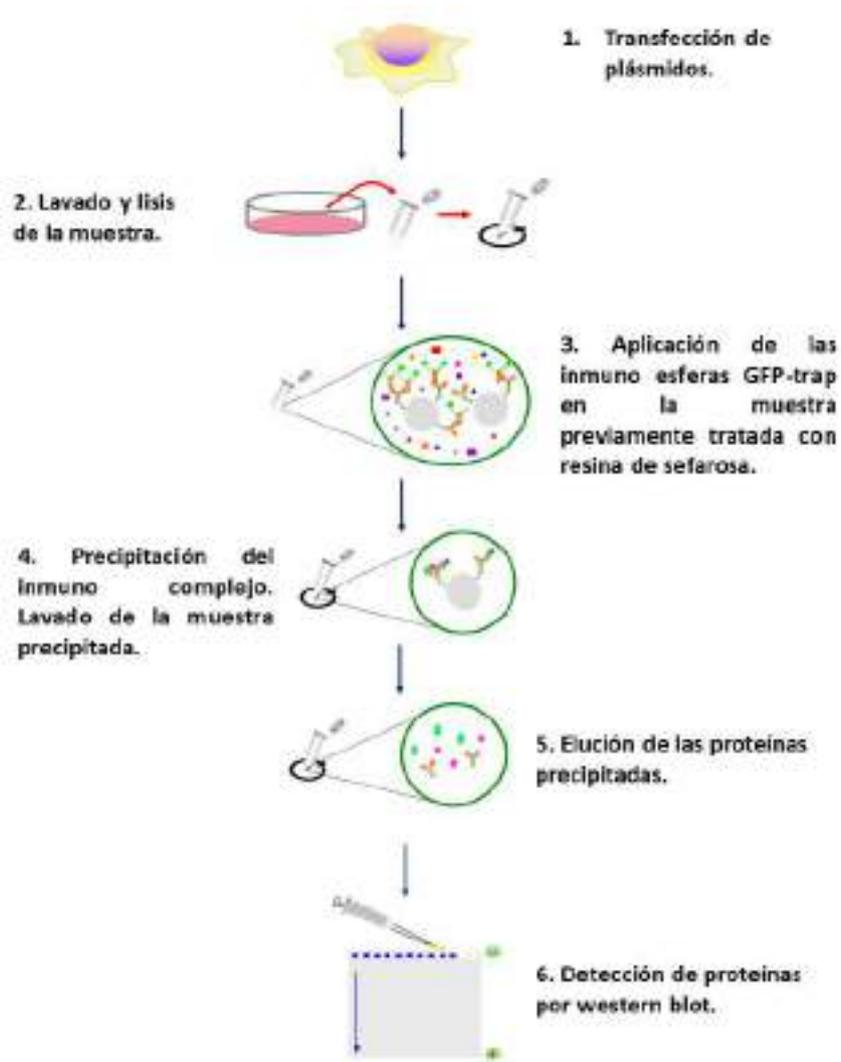


Figura 3.12. Esquema simplificado del protocolo de co-inmunoprecipitación utilizando las inmuno esferas GFP-trap. Modificado de Principle and Protocol of Co-Immunoprecipitation.

3.6 Western blot

Para detectar la presencia de las proteínas en la muestra precipitada, se utilizó la técnica de western blot (WB).

Inicialmente, se prepararon los gels de acrilamida (gel de migración y gel de apilamiento) para la posterior carga de muestras. El gel de migración o resolución fue preparado con una densidad de entramado del 9 % y para ello se utilizaron los siguientes componentes: agua destilada, TRIS 1.5 M pH 8.8, SDS 10 %, acrilamida, PSA 10 % y TEMED. El gel de apilamiento, con un entramado del 4 %, fue preparado con agua

destilada, TRIS 0.5 M pH 6.8, SDS 10 %, acrilamida, PSA y TEMED (cantidades en la Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Composición de geles de migración y apilamiento. Cantidades para la preparación de un gel.

Gel de migración		Gel de apilamiento	
Compuesto	Cantidad (ml)	Compuesto	Cantidad (ml)
Agua destilada	4.3	Agua destilada	3.05
TRIS 1.5 M	2.5	TRIS 0.5 M	1.25
SDS 10%	0.1	SDS 10%	0.05
Acrilamida	3	Acrilamida	0.65
PSA 10%	0.07	PSA 10%	0.06
TEMED	0.007	TEMED	0.007

Transcurridos 30 minutos, una vez que el gel polimerizó, fue colocado en el soporte correspondiente y posteriormente en la cubeta específica con electrodos. La cubeta se rellenó con tampón de migración (Tabla 3.6) y posterior a ello se realizó la carga de las muestras previamente desnaturalizadas.

El paso siguiente fue comenzar con la electroforesis (Fig. 3.13) que consistió en la aplicación de voltaje en dos etapas. En la primera etapa se aplicaron 100 V durante 10 minutos y luego, una segunda etapa a 120 V durante 1 hora.

Tabla 3.6. Composición de los tampones de migración y transferencia. Las cantidades que se detallan son las correspondientes a 1 litro de agua destilada.

Tampón de migración		Tampón de transferencia	
Compuesto	Cantidad (g/L)	Compuesto	Cantidad
Glicina	14.5	Glicina	14.5 g
TRIS	3	TRIS	3 g
SDS	1	Metanol	200 ml

El detergente que se añade a la muestra precipitada para luego ser desnaturalizada, confiere cargas negativas a las proteínas. En el proceso de electroforesis las proteínas migraron en el gel debido a la aplicación de la diferencia de potencial mencionada desde el polo negativo hacia el polo positivo (Fig. 3.12). Además, debido a la desnaturalización, las proteínas pierden su estructura terciaria y cuaternaria haciendo que la migración sea directamente proporcional a su peso molecular. Así, las

proteínas más pequeñas migran más rápido que las de mayor tamaño, quedando en la parte inferior del gel. Finalizada la electroforesis, el gel fue colocado en una cubeta con tampón de transferencia (Tabla 3.6) durante 10 minutos, (Fig. 3.13) para luego comenzar con el proceso de transferencia que, en este caso, fue de tipo húmeda.

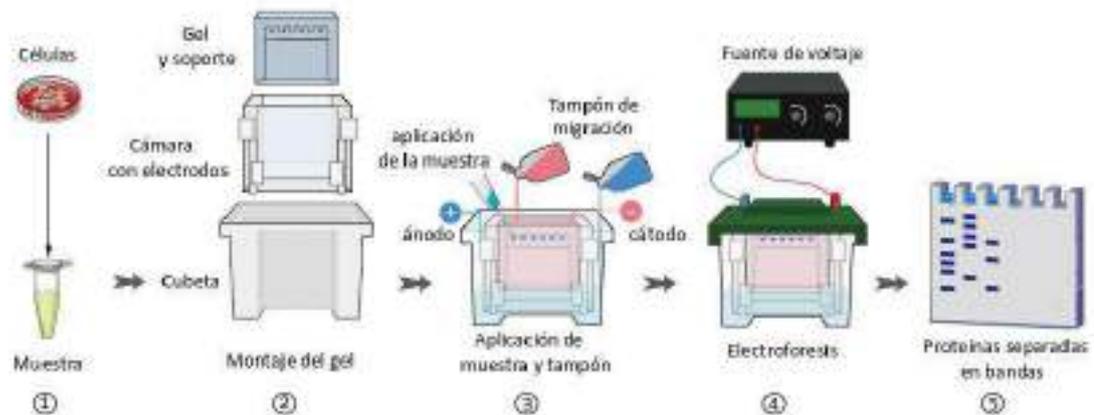


Figura 3.13. Etapas experimentales de WB. 1. Obtención de la muestra a estudiar. 2. Preparación y montaje de los geles de acrilamida. 3. Colocación del gel y su soporte en la cubeta con el tampón de migración. Carga de la muestra con las proteínas de interés. 4. Electroforesis, migración de proteínas por la aplicación de voltaje. 5. Obtención de proteínas separadas por bandas de diferentes pesos moleculares. Adaptado de creative-diagnostics/protocols.

Las proteínas separadas por pesos moleculares en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Sciences, Whatman) por efecto de trasmisión de cargas. Para ello, el gel se puso en contacto con una pieza de membrana de las mismas dimensiones que el gel, colocándose un par de papeles absorbentes y una esponja a ambos lados del conjunto gel-membrana formando lo que suele denominarse un “sandwich”. Éste se colocó en un casete específico para comprimirlo y evitar movimientos entre el gel y la membrana. Posteriormente, se colocó el sándwich en una cubeta específica, cubriéndose con tampón de transferencia para comenzar con dicho proceso que tuvo una duración de 2 horas, donde el gel y la membrana se mantuvieron a 4 °C y 70 V (Fig.3.14).

Tras 2 horas de trasferencia, se colocó la membrana en una cubeta con rojo Ponceau (0.66 g de rojo punzó en 6 ml de ácido acético) durante un par de minutos hasta visualizar la presencia de bandas en la membrana de nitrocelulosa. Una vez verificado el

éxito de la transferencia, se procedió a lavar la membrana con tampón TBS (TRIS 20 mM, NaCl 137 mM pH: 7.6 ajustado con HCl).



Figura 3.14. Esquema del procedimiento de una transferencia húmeda. Colocación del gel en contacto con una membrana de nitrocelulosa en la cual se transferirán las proteínas presentes en el gel. Colocación de papel de filtro a ambos lados del conjunto gel-membrana y como última capa esponjas de compresión. Todos ellos embebidos en tampón de transferencia. Este último conjunto se coloca en un casete compresor que se introduce en la cubeta y se lo recubre con tampón de transferencia. Aplicación de 70 V durante 2 horas. Adaptado de creative-diagnostics/protocols.

Se realizaron entre 3-6 lavados de 10 minutos, hasta eliminar todo el rojo punzó de la membrana. Posteriormente, se procedió al bloqueo de la membrana. Este proceso se realiza para cubrir los espacios que han quedado libres (sin proteína) en la membrana. Así, se bloquean estos sitios y se evita que los anticuerpos se unan a ellos de manera inespecífica. Se colocó la membrana en una cubeta con TBS + leche en polvo (Central Lechera Asturiana desnatada) al 5 %. El bloqueo se realizó durante una hora a temperatura ambiente en agitación.

Finalizado el bloqueo, se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios a las concentraciones recomendadas para cada caso (Tabla 3.7) durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se realizó el lavado de la membrana con tampón TBS al que se le añadió el detergente Tween al 0.05 % (TBS-T). Este lavado se realizó 4 veces, 10 minutos por lavado. Posterior a ello, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 3.7) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, la membrana fue lavada con TBS-T 4 veces, 10 min por lavado. Un último lavado fue realizado con tampón TBS para eliminar el Tween presente. Luego, se incubó la membrana con el sustrato ECL Plus (Thermo Fisher Scientific) durante un minuto e inmediatamente se realizó la detección de proteína utilizando el método de quimioluminiscencia (Fig. 3.15).

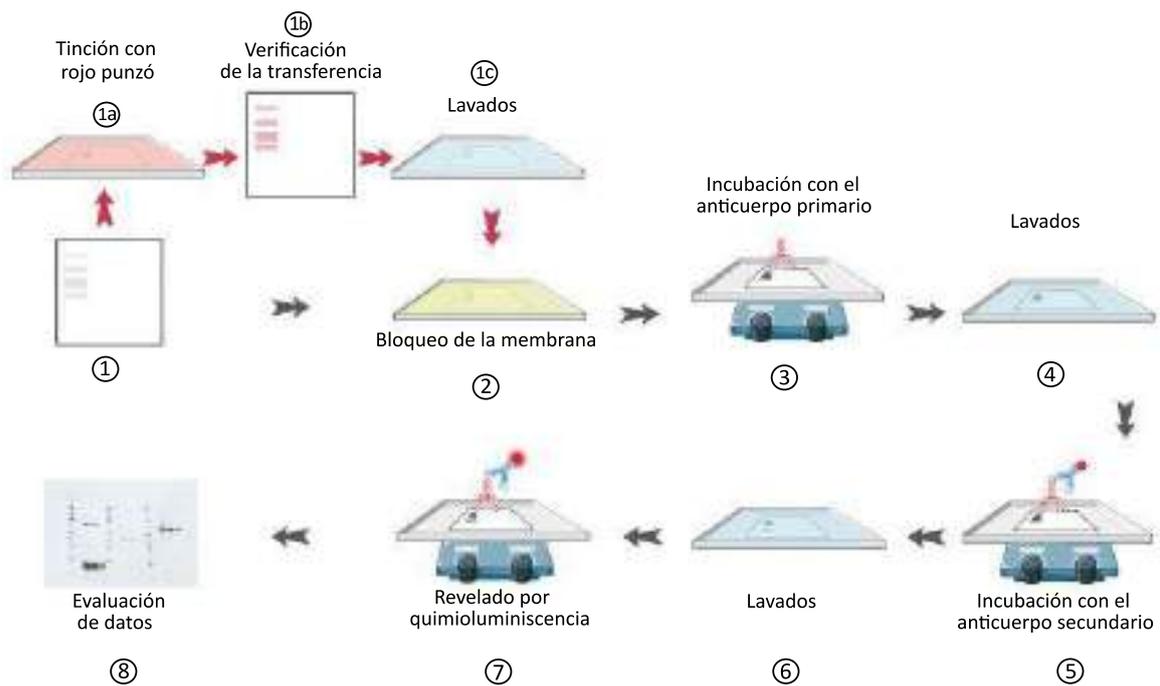


Figura 3.15. Esquema de incubación con anticuerpos y visualización de proteínas por quimioluminiscencia. Adaptado de creative-diagnostics/protocols.

Tabla 3.7. Anticuerpos utilizados para IP y detección por WB. Los anticuerpos fueron preparados en solución de bloqueo.

Diana	Especie	Referencia	Dilución
Anticuerpos primarios			
TRPA1	conejo	NOVUS NB110-040763	1:500
$\sigma 1$	ratón	Santa Cruz sc-137075	1:100
EYFP , GFP	conejo	Thermo Fisher A6455	1:2000
Turbo GFP	cabra	Origene TA150096	1:2000
GAPDH	conejo	Sigma-Aldrich G9545	1:5000
Anticuerpos secundarios			
Conejo	cabra	Sigma-Aldrich A9169	1:2000
Ratón	conejo	Sigma-Aldrich A9044	1:2000

3.6.1 Procesamiento de imágenes

Las imágenes con los datos crudos obtenidas del revelado con la técnica de quimioluminiscencia fueron procesadas con el programa Image Quant TL.

3.7 Análisis estadístico y programas de análisis

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5 para Windows (GraphPad Software Inc.). Se consideraron valores significativos aquellos con $p \leq 0.05$. Los resultados se expresan como el valor de la media \pm s.e.m.

Para la comparación de valores de amplitudes de respuesta (cambio de calcio intracelular o corrientes de membrana) de dos muestras independientes se utilizó la prueba t-Student no pareada.

Cuando los grupos a comparar fueron tres o más se realizó el análisis de varianza ANOVA y prueba post hoc Bonferroni o Dunnett. Si la distribución de datos no se ajustaba a una distribución normal, el propio programa presentaba la opción de realizar un test no paramétrico que comparaba las medianas.

Los cálculos de porcentajes de respuestas fueron analizados con las pruebas de Fisher o Chi-cuadrado dependiendo el tamaño muestral.

Los resultados de la prueba de comportamiento de von Frey se analizaron con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Cuando se analizaron muestras independientes se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Los resultados de la prueba de acetona fueron analizados con la prueba t-Student pareada y no pareada, dependiendo del caso.

Los resultados de la prueba de placa fría unilateral fueron analizados con la prueba t-Student no pareada (siempre fueron análisis de muestras independientes).

Previo a la aplicación de cada prueba mencionada, el programa utilizado realizó la evaluación de la normalidad de la distribución y la igualdad de varianzas para cada grupo muestral, aplicando pruebas como Kolmogórov-Smirnov o Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de la distribución y la prueba de Bartlett para analizar si las muestras presentaban varianzas similares.

3.8 Tablas, gráficas y figuras

Para la generación de tablas se utilizó el programa PowerPoint (Microsoft©). Los gráficos fueron realizados con los programas OriginPro8 (OriginLab©) y GraphPad versión 5 para Windows (GraphPad Software Inc.).

El montaje de las figuras finales fue realizado mediante el programa Inkscape versión 0.92 (Equipo Inkscape).

4. RESULTADOS

4.1 Efecto del S1RA sobre la neuropatía inducida por oxaliplatino y su relación con TRPA1

En este bloque de experimentos se ha estudiado, mediante evaluaciones de la conducta animal, el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica y al frío por efecto del tratamiento con oxaliplatino, el posible papel del canal iónico TRPA1 sobre dicha hipersensibilidad y cómo el S1RA es capaz de atenuar esta neuropatía.

Previo a la inducción de la neuropatía se compararon los valores basales de ratones machos y hembras donde encontramos que las diferencias entre ellos no resultaron significativas para la prueba de von Frey y acetona. Estos resultados fueron similares tanto en ratones silvestres (WT) como en los ratones deficientes para TRPA1 (TRPA1^{-/-}). Por lo que se procedió a formar grupos mixtos (Fig. 4.1).

El promedio de los umbrales mecánicos de ratones machos y hembras silvestres fue de 1.05 ± 0.19 g vs 0.91 ± 0.26 g respectivamente; (n = 5, p = 0.60 n.s., prueba no paramétrica de Mann Whitney) (Fig. 4.1A). En la evaluación de la prueba de acetona el valor promedio de la cantidad de movimientos aversivos en machos y hembras no cambió significativamente siendo 3.81 ± 0.25 vs 4.23 ± 0.12 respectivamente (n = 5, p = 0.20 n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.1B).

Siguiendo la misma tendencia, ratones machos y hembras TRPA1^{-/-} mostraron un umbral mecánico promedio de 1.04 ± 0.10 g vs 0.97 ± 0.14 g respectivamente (n= 9, p = 0.68 n.s., prueba no paramétrica de Mann Whitney) (Fig.4.1C). En la prueba de acetona las hembras fueron un 24 % más sensibles a la prueba, pero estos cambios no resultaron estadísticamente significativos. El promedio del valor fue de 3.82 ± 0.30 vs 4.71 ± 0.30 para machos y hembras respectivamente (n = 9, p = 0.053 n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig.4.1D).

Posteriormente, se evaluó si, en condiciones fisiológicas, los ratones TRPA1^{-/-} presentaban cambios en la sensibilidad mecánica y al frío respecto a los ratones silvestres. Así, el promedio de los umbrales mecánicos en ratones WT vs TRPA1^{-/-} no presentó cambios significativos cuando fueron evaluados con la prueba de von Frey. El promedio del umbral obtenido en ratones WT fue de 0.79 ± 0.10 (n = 20) vs 1.01 ± 0.11

(n = 12) en ratones TRPA1^{-/-} (p = 0.14 n.s., prueba no paramétrica de Mann Whitney) (Fig. 4.1E).

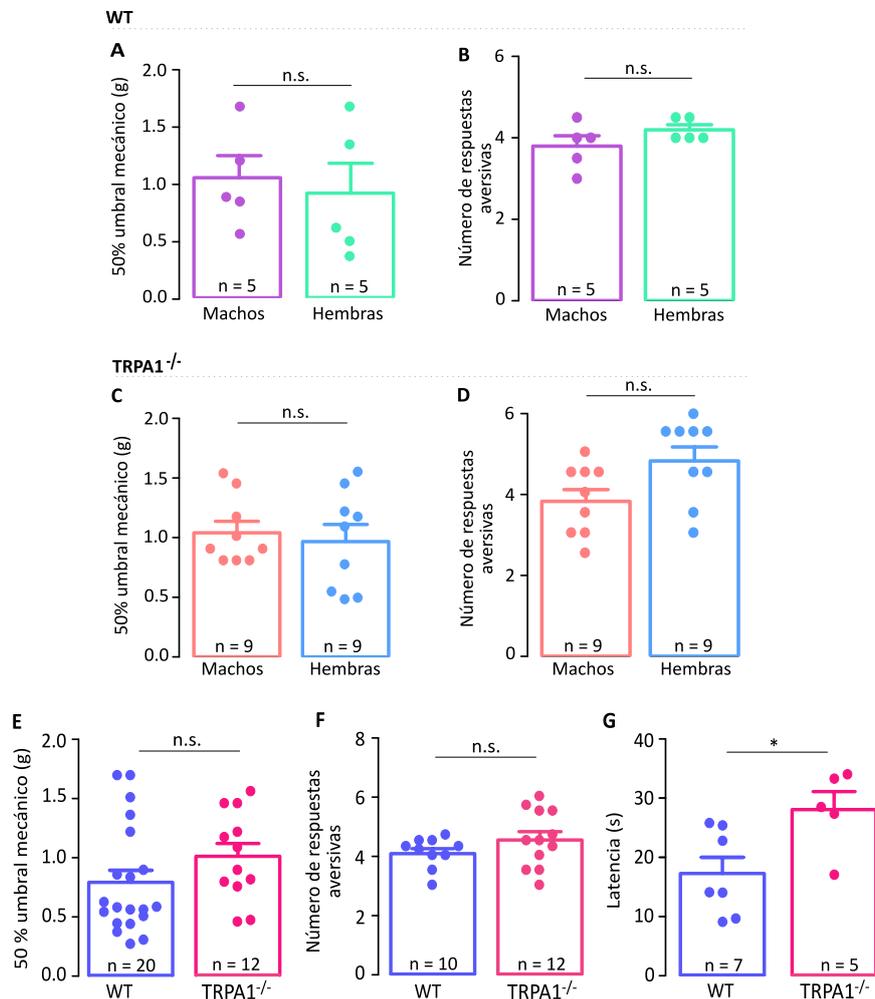


Figura 4.1. Comparación de sensibilidad mecánica y al frío entre ratones machos y hembras. A) Umbral de sensibilidad mecánica (prueba de von Frey) en ratones silvestres (WT). Ratones machos y hembras no mostraron cambios significativos en el umbral mecánico (n = 5, p = 0.60 n.s., prueba no paramétrica de Mann Whitney). **B)** Prueba de acetona en ratones silvestres (WT). Ratones machos y hembras no mostraron cambios significativos en el número de respuestas aversivas por aplicación de acetona (n = 5, p = 0.20 n.s., prueba t-Student no pareada). **C)** Umbral de sensibilidad mecánica (prueba de von Frey) en ratones deficientes para TRPA1 (TRPA1^{-/-}). Ratones machos y hembras no mostraron cambios significativos en el umbral mecánico (n = 9, p = 0.68 n.s., prueba no paramétrica de Mann Whitney). **D)** Prueba de acetona en ratones deficientes para TRPA1^{-/-}. Ratones machos y hembras no mostraron cambios significativos en el número de respuestas aversivas por aplicación de acetona (n = 9, p = 0.054 n.s., prueba t-Student no pareada). **E)** Umbral de sensibilidad mecánica (prueba de von Frey). Ratones machos y hembras WT vs TRPA1^{-/-} no mostraron cambios significativos en el umbral mecánico (WT n = 20, TRPA1^{-/-} n = 12, p = 0.14 n.s., prueba no paramétrica de Mann Whitney). **F)** Prueba de acetona. Ratones machos y hembras WT vs TRPA1^{-/-} no mostraron cambios significativos en el número de respuestas aversivas (WT n = 10, TRPA1^{-/-} n = 12, p = 0.19 n.s., prueba t-Student no pareada). **G)** Prueba de placa fría unilateral (UCP) a 10 °C. Ratones machos y hembras WT vs TRPA1^{-/-} mostraron diferencias significativas en el tiempo de latencia (WT n = 7, TRPA1^{-/-} n = 5, p = 0.03*, prueba t-Student no pareada).

En la prueba de acetona tampoco se observaron diferencias significativas entre ratones WT y TRPA1^{-/-}. El valor promedio de las respuestas aversivas en ratones WT fue de 4.10 ± 0.16 (n = 10) vs 4.56 ± 0.29 (n = 12) en ratones TRPA1^{-/-} (p = 0.19 n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.1F).

Finalmente, en la prueba de la placa fría unilateral a 10 °C, encontramos diferencias significativas en la latencia promedio de respuesta a este estímulo, en la cual los ratones TRPA1^{-/-} se mostraron menos sensibles respecto de los ratones WT. El promedio de la latencia fue de 28.07 ± 3.04 (n = 5) vs 17.29 ± 2.73 (n = 7) en ratones WT, (p = 0.03, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.1G).

4.1.1 Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad a estímulos mecánicos y estímulos de frío en ratones silvestres

Está descrito que la inyección sistémica de oxaliplatino en ratones replica muchos síntomas de la neuropatía secundaria a los tratamientos con este fármaco. Se comenzó estudiando cómo afectaba el oxaliplatino a la sensibilidad mecánica y térmica de los ratones silvestres. Para inducir la neuropatía, se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) 3 dosis de 6 mg/kg de oxaliplatino en ratones hembras y machos adultos de la cepa C57BL/6J y TRPA1^{-/-} los días 0, 2 y 4 (para más detalles ver el protocolo extendido en el apartado 3.1.1 de materiales y métodos). A los animales control se les inyectó vehículo (glucosa 5%). Siete días después (D7) de la primera inyección, se realizaron las pruebas de conducta de von Frey y acetona. La prueba de placa fría unilateral se realizó entre los días 8 y 12 (Fig.4.2A).

Los animales tratados con oxaliplatino mostraron un descenso significativo en el umbral mecánico, confirmando el desarrollo de alodinia mecánica. Los valores del grupo oxaliplatino pasaron de un promedio de 0.64 ± 0.11 g (valores basales) a 0.10 ± 0.04 g (D7) siendo éstos la media de un grupo de 11 ratones machos y hembras (Fig. 4.2B), lo que supone una reducción del umbral del 84 %, mostrando que los animales tratados con oxaliplatino fueron muy sensibles al estímulo mecánico y cuyos cambios resultaron estadísticamente significativos (p < 0.01, prueba no paramétrica de Wilcoxon). Por el contrario, el grupo control, aunque mostró un descenso del 32 % en los umbrales mecánicos respecto a los valores basales, este descenso no resultó estadísticamente

significativo. El valor promedio basal fue de 0.98 ± 0.16 g vs el valor promedio a D7 0.67 ± 0.11 g n= 9 ($p = 0.8$, prueba no paramétrica de Wilcoxon) (Fig. 4.2B). La comparación de los umbrales a D7 del grupo control (verde) vs el grupo oxaliplatino (naranja), 0.67 ± 0.11 g vs 0.10 ± 0.04 g, resultó en una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$, prueba no paramétrica de Mann-Whitney). Estos resultados constatan la presencia de la alodinia mecánica esperada (Fig. 4.2B).

Respecto a las pruebas con estímulos de frío, los ratones tratados con oxaliplatino presentaron un incremento en la cantidad de respuestas aversivas (elevación, lamida y sacudida de la pata, así como apertura de dedos) en la prueba de acetona. El valor promedio basal fue de 4.1 ± 0.3 respuestas y posterior a la administración de oxaliplatino (D7) incrementó a 6.9 ± 0.1 respuestas n = 5 ($p < 0.001$, prueba t-Student pareada). Este incremento representó un 68 % respecto a la condición basal (Fig. 4.2C). En el grupo de ratones tratados con vehículo no se observaron cambios significativos.

Si se comparan los valores obtenidos a D7 con vehículo (verde) y oxaliplatino (naranja) encontramos un incremento significativo ($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada). Estos resultados muestran el desarrollo de la alodinia al frío en el grupo de ratones tratados con oxaliplatino (Fig. 4.2C).

En la prueba de la placa fría unilateral que se encontraba a 10°C , el tratamiento con oxaliplatino indujo un descenso en la latencia de la respuesta. El valor promedio en el grupo control fue de 17.29 ± 2.73 segundos (n = 7) y en el grupo oxaliplatino 7.82 ± 0.59 segundos (n = 11) ($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada). Esta diferencia en las latencias de respuesta representa el desarrollo de la hiperalgesia al frío en el grupo de ratones inyectados con oxaliplatino (Fig. 4.2D).

En conjunto, estos resultados muestran la aparición de un fenotipo de dolor robusto en los ratones tras el tratamiento con oxaliplatino.

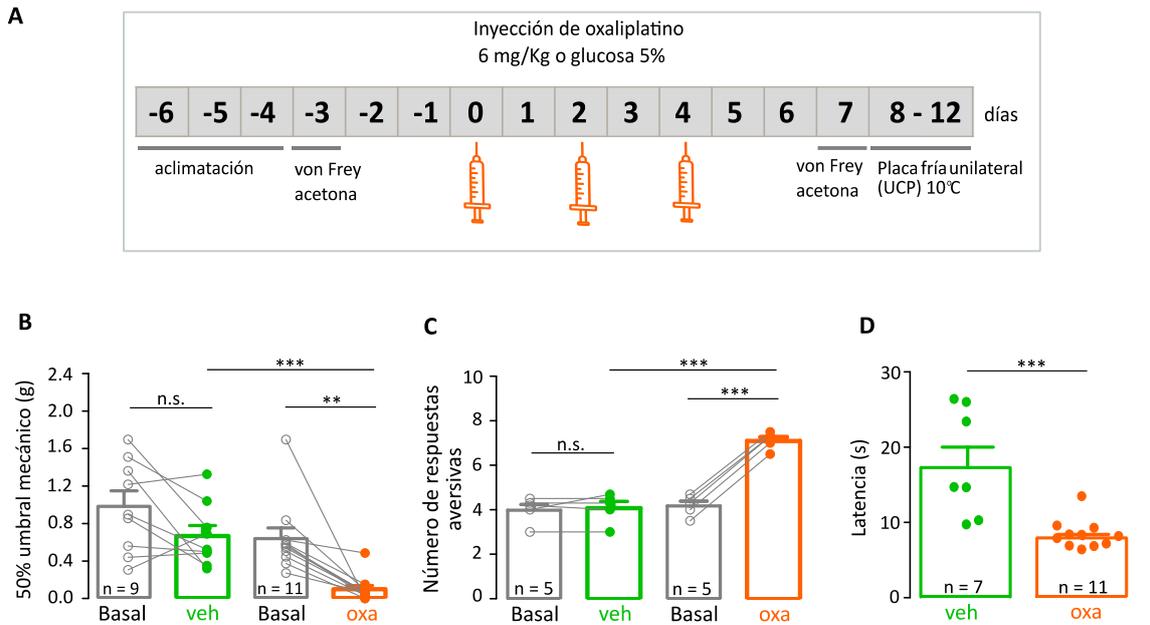


Figura 4.2. Cambios conductuales por del tratamiento con oxaliplatino en ratones silvestres. A) Protocolo de inducción de la neuropatía periférica por oxaliplatino. Posterior al período de aclimatación y a las pruebas conductuales se realizan las inyecciones de oxaliplatino 6 mg/Kg o glucosa al 5 % los días 0, 2 y 4 (D0, D2 y D4). Tres días posteriores a la última inyección (D7) se realiza la prueba de von Frey y acetona (en ese orden). La prueba de placa fría unilateral a 10 °C se realiza entre D8 y D12. **B)** Umbral de sensibilidad mecánica (prueba de von Frey) a D7. El tratamiento con oxaliplatino (oxa) induce alodinia mecánica (naranja) $n = 11$ ($p < 0.01^{**}$, prueba no paramétrica de Wilcoxon). Cambios no significativos en el grupo control (verde). Los cambios a D7 entre el grupo control (verde) y el grupo oxa (naranja) resultan significativos ($p < 0.001^{***}$, prueba no paramétrica de Mann Whitney). **C)** Prueba de acetona a D7. El tratamiento con oxa induce alodinia al frío (naranja) $n = 5$ ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student pareada). Cambios no significativos en el grupo control. Los cambios a D7 entre el grupo control (verde) y el grupo oxa (naranja) resultan significativos ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada). **D)** Prueba de placa fría unilateral (UCP) a 10 °C. D8-D12. El tratamiento con oxa induce hipersensibilidad al frío nocivo ($n = 7$ oxa; $n = 11$ veh $p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada).

4.1.2 Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad a estímulos mecánicos y estímulos de frío en ratones deficientes para el canal iónico TRPA1

Puesto que el canal iónico TRPA1 está involucrado en respuestas a estímulos dañinos y estrés celular, nos propusimos estudiar su posible participación en la neuropatía inducida por oxaliplatino. Para ello, observamos el efecto del tratamiento sobre la conducta de ratones TRPA1^{-/-} y la comparamos con la observada en los ratones silvestres.

Encontramos que los ratones deficientes para el canal TRPA1 también desarrollaron alodinia mecánica. Los umbrales mecánicos basales y a D7 en el grupo de animales tratados con oxaliplatino fueron de 1.07 ± 0.13 g vs 0.56 ± 0.08 g siendo esta

diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.03$, prueba no paramétrica de Wilcoxon). El descenso en el umbral representó una disminución del 48 % (Fig. 4.3A). Sin embargo, este descenso en el umbral mecánico es menor que el observado en los ratones silvestres tratados con oxaliplatino (84 %). Esto sugiere que el canal TRPA1, está implicado en el desarrollo de la alodinia mecánica por el tratamiento con oxaliplatino. Cuando se comparan los valores obtenidos a D7 entre el grupo vehículo (verde claro) y el grupo oxaliplatino (naranja) no se encontraron diferencias en los umbrales mecánicos ($p = 0.75$ n.s., prueba no paramétrica de Mann-Whitney) (Fig. 4.3A).

En la prueba de acetona los ratones TRPA1^{-/-} no desarrollaron alodinia al frío tras el tratamiento con oxaliplatino. El valor promedio de las respuestas aversivas basal y a D7, cambió de 4.2 ± 0.3 a 5.4 ± 0.5 respectivamente ($n = 7$, $p = 0.07$ n.s., prueba t-Student pareada). Los ratones tratados con vehículo también mostraron valores similares, 5.0 ± 0.5 (basal) vs 6.1 ± 0.6 (D7) ($n = 5$, $p = 0.15$ n.s., prueba t-Student pareada) (Fig. 4.3B).

Finalmente, cuando los animales TRPA1^{-/-} fueron evaluados con la prueba de placa fría unilateral a 10 °C, los cambios en las latencias de respuesta no fueron significativos entre el grupo control y el tratado con oxaliplatino, 28.07 ± 3.3 segundos ($n = 5$) vs 27.50 ± 2.3 segundos ($n = 7$) respectivamente ($p = 0.88$ n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.3C).

En la figura 4.3 se han añadido los resultados obtenidos en ratones silvestres ya mostrados en la figura 4.2 para facilitar la comparación entre los fenotipos de los animales.

En resumen, los ratones machos y hembras TRPA1^{-/-} tratados con oxaliplatino desarrollaron una alodinia mecánica menor a la que presentaron los animales silvestres, mientras que no mostraron alodinia ni hiperalgesia al frío. Estos resultados sugieren que el canal TRPA1 determina la hipersensibilidad al frío y participa en el desarrollo de la sensibilidad mecánica que desarrollan los ratones silvestres por el tratamiento con oxaliplatino.

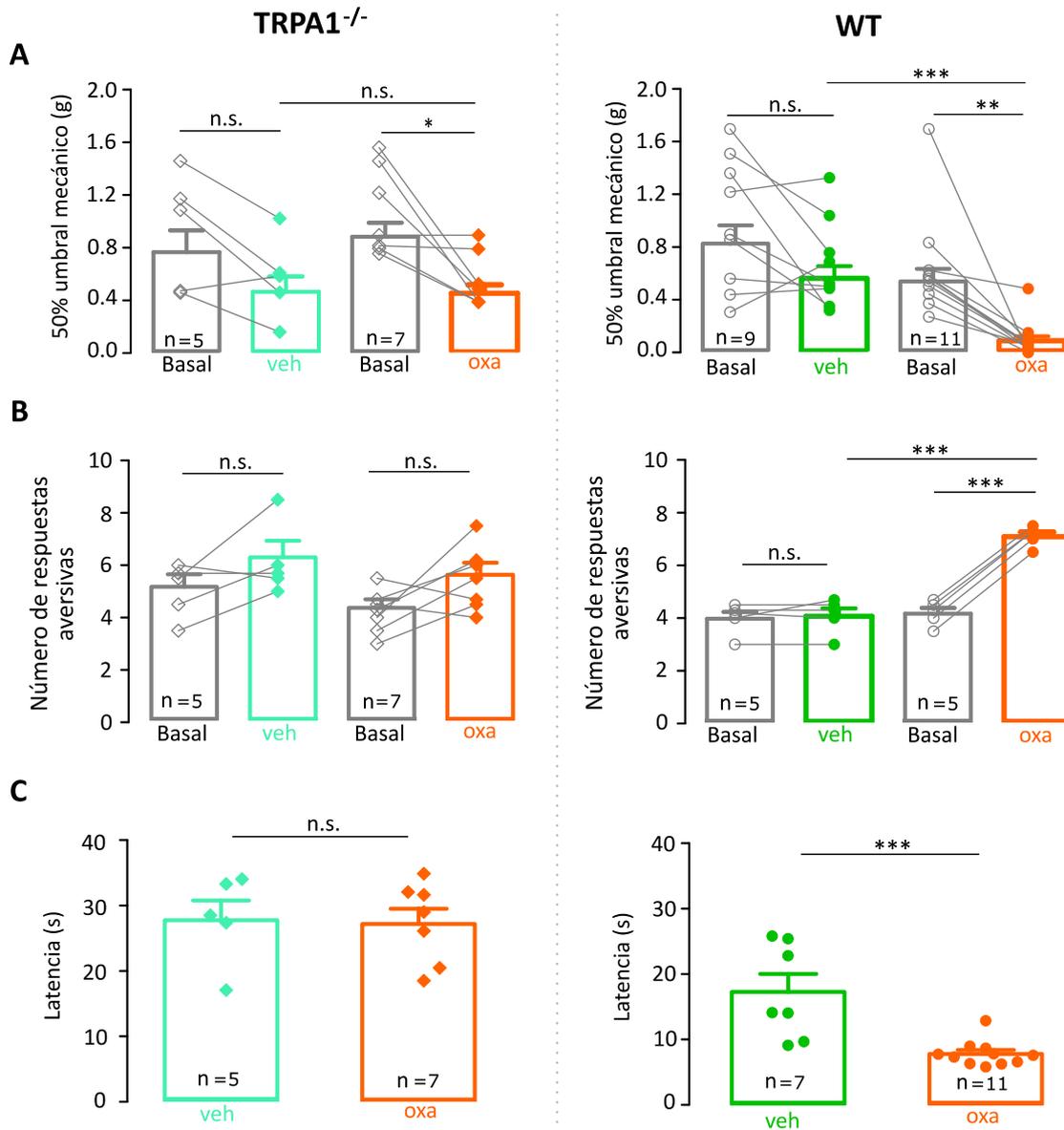


Figura 4.3. Efecto de la administración de oxaliplatino sobre la sensibilidad mecánica y al frío en ratones silvestres y ratones TRPA1^{-/-}: **A)** Umbral de sensibilidad mecánica (prueba de von Frey) a D7. Los ratones TRPA1^{-/-} (panel de la izquierda) desarrollan menos alodinia mecánica ($p = 0.03^*$) que los ratones silvestres (panel de la derecha) ($p < 0.01^{**}$) tras el tratamiento con oxaliplatino. Prueba no paramétrica de Wilcoxon. **B)** Número de respuestas aversivas (prueba de acetona) a D7. El oxaliplatino no induce cambios en la sensibilidad al frío inocuo en ratones TRPA1^{-/-} ($p = 0.07$ n.s.). Ratones silvestres desarrollan alodinia al frío (panel de la derecha) ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student pareada). **C)** Latencia de respuesta al frío nocivo (placa fría unilateral). Ratones TRPA1^{-/-} no muestran cambios en las latencias por el tratamiento con oxaliplatino ($p = 0.88$ n.s.). Ratones silvestres (panel de la derecha) desarrollan hiperalgesia al frío ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada).

4.1.3 Efecto del S1RA, bloqueante de la chaperona $\sigma 1$, en ratones silvestres y ratones TRPA1^{-/-}, sobre la respuesta de dolor inducida por AITC intraplantar

Con el fin de estudiar posteriormente el posible efecto del S1RA, antagonista selectivo de la chaperona $\sigma 1$, sobre la neuropatía inducida por el oxaliplatino, y a la vista de que el canal TRPA1 está implicado en el desarrollo de esta neuropatía, nos propusimos evaluar qué efecto tendría el S1RA inyectado intraperitoneal en ratones, sobre la respuesta a la inyección intraplantar de AITC, agonista específico de TRPA1. Para ello se realizaron pruebas conductuales en ratones (machos y hembras) silvestres y deficientes para TRPA1 (TRPA1^{-/-}). La prueba conductual consistió en realizar una inyección intraplantar de 10 μ l de AITC 10 mM y cuantificar el tiempo de lamida en un período de observación total de 5 minutos. La inyección de AITC 10 mM se realizó 24 horas posteriores a una inyección intraperitoneal de S1RA 40 mg/Kg o su vehículo (salino).

Los ratones silvestres (WT) que recibieron previamente una inyección intraperitoneal de S1RA mostraron un comportamiento nocifensivo atenuado en respuesta a la inyección intraplantar de AITC (10 mM) respecto a los que recibieron una inyección intraperitoneal de salino.

Así, en ratones silvestres, el tiempo de lamida de la pata inyectada fue de 15.19 ± 1.53 segundos (n = 10) en ratones control (WT- salino) vs 8.16 ± 1.32 segundos (n = 10) en ratones tratados con S1RA (WT-S1RA), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$, prueba ANOVA a una vía y análisis post-hoc Bonferroni) (Fig.4.4).

En los ratones TRPA1^{-/-} el tiempo de lamida fue significativamente menor que el obtenido en ratones WT ($p < 0.01$). Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de lamida posterior al tratamiento con S1RA. Los valores promedios fueron de 7.04 ± 1.02 segundos (n = 6) en el grupo TRPA1^{-/-} - salino vs 7.46 ± 0.89 segundos (n =9) en grupo TRPA1^{-/-} - S1RA ($p = 0.76$ n.s. prueba ANOVA a una vía y análisis post-hoc Bonferroni) (Fig.4.4).

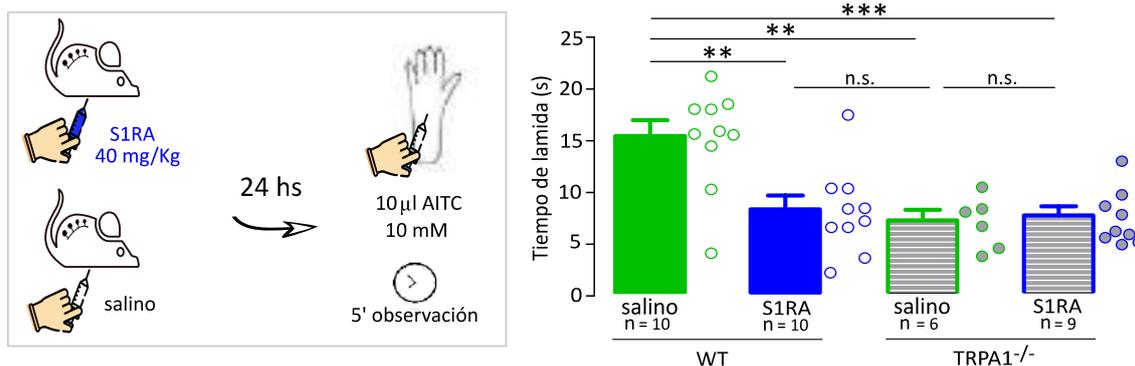


Figura 4.4 S1RA modula el comportamiento nocifensivo inducido por la inyección intraplantar de AITC. Protocolo experimental (panel de la izquierda): ratones silvestres y TRPA1^{-/-}, machos y hembras, reciben una inyección intraperitoneal de S1RA 40 mg/Kg o salino. Transcurridas 24 horas se realiza una inyección intraplantar de 10 μ l de AITC 10 mM y se contabiliza el tiempo de lamida durante 5 minutos de observación. El tiempo de lamida de los ratones WT-salino es significativamente menor que los WT-S1RA y los grupos de ratones TRPA1^{-/-} ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Bonferroni).

Debido a que el AITC es un agonista específico del canal TRPA1, estos resultados sugieren que el tratamiento con S1RA reduce el comportamiento nocifensivo (tiempo de lamida) provocado por la inyección de AITC a través de la modulación del canal TRPA1.

4.1.4 La administración intraperitoneal de S1RA reduce el desarrollo de la neuropatía inducida por oxaliplatino

Los resultados anteriores (Fig. 4.3) muestran que el canal TRPA1 está implicado en el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica y al frío en los ratones silvestres tratados con oxaliplatino. Por otro lado, la respuesta nocifensiva que mostraron los ratones inyectados con AITC (Fig. 4.4) se redujo con la administración de S1RA y estuvo ausente en los ratones TRPA1^{-/-}. Estos resultados nos llevaron a estudiar si el S1RA podía evitar el desarrollo de la neuropatía por oxaliplatino. Dado que la administración de agentes quimioterapéuticos a pacientes con cáncer es un procedimiento planificado y programado, es posible anticiparse al previsible desarrollo de la neuropatía.

Para caracterizar el posible aspecto preventivo del S1RA, se trataron ratones silvestres machos de 8-12 semanas de edad con una inyección intraperitoneal diaria de S1RA, 40 mg/Kg o su vehículo (salino), durante 11 días (desde D-3 hasta D7). Los días 0, 2 y 4 se inyectó adicionalmente una dosis de oxaliplatino 6 mg/Kg (Fig. 4.5A).

Los animales tratados simultáneamente con salino y oxaliplatino ($n = 12$) presentaron un descenso significativo en el umbral mecánico posterior al tratamiento (D7), confirmando el desarrollo de la alodinia mecánica. El cambio en los umbrales fue de 1.61 ± 0.13 g (basal) a 0.32 ± 0.09 g (D7) y representaron una disminución del 80 %, ($p < 0.001$, prueba no paramétrica de Wilcoxon).

Los animales que recibieron repetidas administraciones de S1RA durante el tratamiento con oxaliplatino ($n = 12$) mostraron un descenso menor en el umbral mecánico que aquellos tratados con su vehículo (salino). Los umbrales de 1.51 ± 0.12 g (basal) vs 0.72 ± 0.12 (D7) representaron una disminución del 53 %, ($p < 0.001$, prueba no paramétrica de Wilcoxon). Estos datos sugieren que el S1RA, antagonista de σ_1 , atenúa el desarrollo de la hipersensibilidad al estímulo mecánico.

Si se comparan los umbrales mecánicos a D7 de ambos grupos, salino + oxaliplatino 0.32 ± 0.09 g vs S1RA + oxaliplatino 0.7 ± 0.12 g, se observa que el S1RA evita el desarrollo de la alodinia mecánica en aproximadamente un 50 %, siendo estos cambios estadísticamente significativos ($p = 0.03$, prueba no paramétrica de Mann-Whitney) (Fig. 4.5B).

Respecto a la sensibilidad al frío inocuo, en la prueba de acetona, los animales tratados con salino + oxaliplatino duplicaron la cantidad de respuestas aversivas respecto a los valores basales, 3.31 ± 0.40 vs 6.81 ± 0.92 ($p = 0.0013$, prueba t-Student pareada). Sin embargo, en los ratones tratados con S1RA + oxaliplatino, el aumento representó menos de un tercio de los valores basales, 3.75 ± 0.23 vs 4.31 ± 0.43 ($p = 0.02$, prueba t-Student pareada) (Fig. 4.5C).

Si se comparan los resultados obtenidos a D7 en ambos grupos experimentales, salino + oxaliplatino 6.81 ± 0.92 vs S1RA + oxaliplatino 4.31 ± 0.43 , el S1RA previno en parte el desarrollo de la sensibilidad a estímulos de frío no nocivos como es el caso de la acetona, ($p < 0.04$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.5C).

En la prueba de la placa fría unilateral (10°C), los animales que recibieron S1RA en simultáneo con oxaliplatino desarrollaron una menor hiperalgesia al frío nocivo respecto de los animales que recibieron salino + oxaliplatino. Los animales tratados con S1RA mostraron latencias significativamente mayores que los animales que recibieron

salino, 14.71 ± 1.27 segundos vs 10.32 ± 1.45 segundos respectivamente, ($p = 0.03$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.5D).

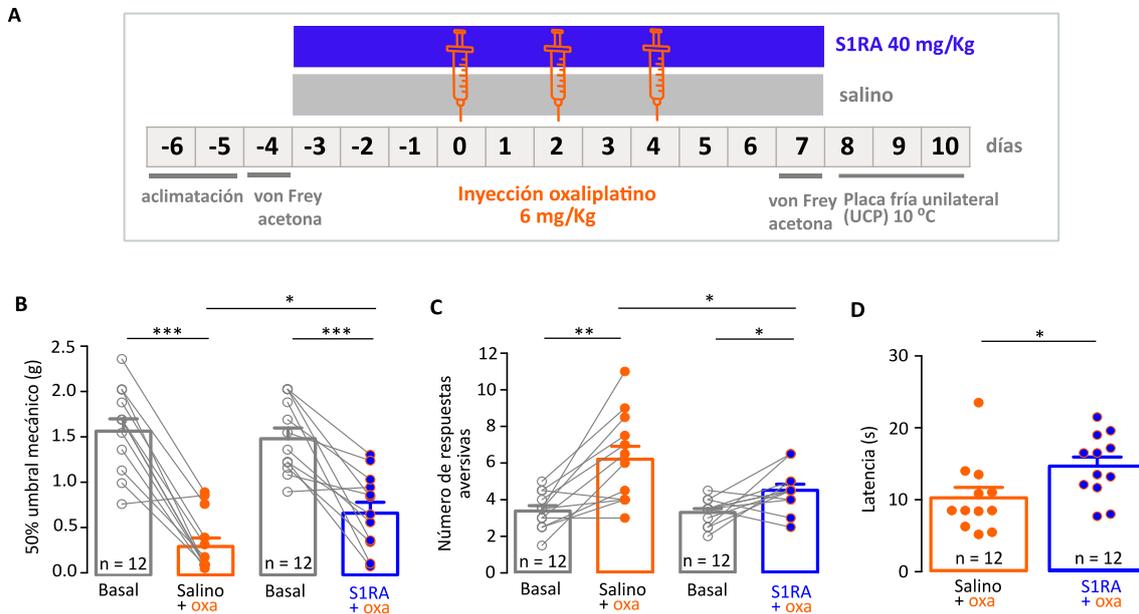


Figura 4.5. Efecto de la administración repetida de S1RA en la neuropatía inducida por oxaliplatino. A) Protocolo experimental. Tras el período de aclimatación y obtención de valores basales en las pruebas conductuales, los animales reciben durante 11 días una inyección diaria de S1RA 40 mg/Kg o su vehículo (solución salina). Los días 0, 2 y 4 se administra oxaliplatino 6 mg/Kg. El día 7 se realiza la prueba de von Frey y acetona (en ese orden) y posteriormente los días 8, 9 y 10 se realiza la prueba de placa fría unilateral (UCP). Cualquier procedimiento posterior, como cultivos neuronales, se realiza el mismo día de la UCP. **B) Prueba de von Frey.** Tratamiento con salino + oxa (naranja) $n = 12$ ($p < 0.001^{***}$). Tratamiento con S1RA 40 mg/Kg + oxa (azul) $n = 12$ ($p < 0.001^{***}$, prueba no paramétrica de Wilcoxon). Umbrales mecánicos a D7 en salino + oxa (naranja) vs S1RA + oxa (azul) ($p = 0.03^*$, prueba no paramétrica de Mann Whitney). **C) Prueba de acetona.** Tratamiento con salino + oxa (naranja) $n = 12$ ($p = 0.0013^{**}$). Tratamiento S1RA + oxa (azul) $n = 12$ ($p = 0.02^*$, prueba t-Student pareada). Sensibilidad a frío inocuo a D7 en salino + oxa (naranja) vs S1RA + oxa (azul) ($p = 0.04^*$, prueba T-Student no pareada). **D) Placa fría unilateral.** El grupo salino + oxa (naranja) presenta mayor sensibilidad al frío nocivo que el grupo S1RA + oxa (azul) $n = 12$ ($p = 0.03^*$, prueba t-Student no pareada).

En resumen, estos resultados sugieren que el tratamiento con S1RA mitiga el desarrollo de la neuropatía inducida por oxaliplatino.

Dado que el S1RA, antagonista de la chaperona $\sigma 1$, es capaz de reducir la respuesta a AITC, agonista específico de TRPA1, los resultados de este bloque en su conjunto sugieren que el efecto del S1RA en la neuropatía inducida por oxaliplatino, podría estar mediado por la modulación del canal TRPA1 a través de la chaperona $\sigma 1$.

4.2 Caracterización del efecto del S1RA sobre la actividad de TRPA1 en células HEK293 transfectadas

Los resultados del bloque anterior nos sugieren que el efecto analgésico del S1RA podría estar mediado por la modulación del canal TRPA1 a través de la chaperona $\sigma 1$. El objetivo de este bloque de experimentos fue estudiar *in vitro*, con experimentos de medidas de calcio intracelular y electrofisiología, la posible modulación funcional del canal TRPA1 por la chaperona $\sigma 1$ en un sistema de expresión heteróloga.

4.2.1 Evaluación del efecto de S1RA sobre los cambios de la concentración de calcio intracelular en células HEK293-hTRPA1-tGFP

En este bloque experimental se testó la actividad del canal TRPA1, utilizando la técnica de imagen de calcio *in vitro*, en células HEK293 que expresan de manera endógena la chaperona $\sigma 1$ y que sobre-expresaban hTRPA1-tGFP. Las células se cargaron con Fura-2AM y se estudiaron sus respuestas a la aplicación de AITC. Así, se analizaron los cambios de calcio intracelular a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 μM) y tiempos (1, 3 y 4h) de incubación con S1RA en células que expresaban hTRPA1-tGFP, de manera transitoria (a partir de ahora denominadas HEK293-hTRPA1-tGFP).

Se observó que la incubación con S1RA produjo una disminución en la amplitud de la razón de fluorescencia (F340/F380) y en el número de células que respondían a AITC, siendo esta disminución dependiente de la concentración y del tiempo de incubación con S1RA (Fig. 4.6).

Inicialmente se estudió la incubación las células durante un tiempo fijo de 4 horas, a las distintas concentraciones de S1RA, obteniendo la máxima inhibición de la respuesta tras la incubación con S1RA a una concentración de 100 μM . El valor promedio de la amplitud (F340/F380) en respuesta a AITC (50 μM) cuando las células se incubaron con el vehículo del S1RA (situación control) fue de 0.86 ± 0.03 , que después de incubar con S1RA 100 μM durante 4 horas se redujo a 0.19 ± 0.02 , representando una disminución del 81 % ($p < 0.001$, análisis de varianza ANOVA a una vía y prueba post-hoc Dunnett) (Fig. 4.6A).

La incubación con S1RA (100 μM) durante 4 horas produjo un descenso significativo en el porcentaje de células que respondieron a AITC. En situación control se obtuvo un 97 % (255/262) de respuesta, que descendió a 45 % (64/143) con la incubación de S1RA 100 μM -4 h ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher). En situación control las células fueron incubadas con solución extracelular 0.2 % DMSO 4 horas.

En otras palabras, las células incubadas con S1RA respondieron un 54 % menos que en situación control (Fig. 4.6B). En la figura 4.6G se muestran trazos del cambio de los niveles calcio intracelular representativos de estas condiciones. Respuesta a AITC en situación control (trazos a la izquierda) y células incubadas con S1RA 100 μM - 4 h (trazos a la derecha), el trazo más marcado representa en cada caso la media obtenida. El porcentaje de respuesta en cada condición se muestra en los gráficos de anillo.

Por otro lado, las células incubadas con S1RA 50 μM - 4 h respondieron elevando su calcio intracelular con una amplitud media de 0.45 ± 0.04 , obteniéndose este valor del 60 % (90/152) del total de las células analizadas.

De la incubación con 25 μM S1RA - 4 h, se obtuvo un 86 % (68/82) de células que respondieron con una amplitud de 0.68 ± 0.05 al estímulo de AITC. En ambas condiciones de incubación, la reducción en la amplitud y el porcentaje de respuesta fueron significativos respecto a la situación control ($p < 0.001$, análisis de varianza ANOVA a una vía y prueba post-hoc Dunnett en el caso del análisis de amplitudes y prueba exacta de Fisher en el caso de los porcentajes) (Fig. 4.6 A y C).

Una vez obtenidos estos resultados a diferentes concentraciones, se calculó la IC_{50} , concentración a la cual se obtiene el 50 % de la inhibición de la respuesta máxima, para el compuesto S1RA y cuyo valor fue de 47 μM y cuyo coeficiente de determinación fue $R^2 = 0.99$ indicando un buen ajuste para el cálculo de la IC_{50} obtenido (Fig. 4.6B).

Utilizando la máxima concentración de S1RA (100 μM), se testaron tiempos de incubación menores a 4 horas. Para ello, se realizaron experimentos a 1 y 3 horas de incubación con S1RA. Como puede observarse en la figura 4.6 D y E, midiendo la amplitud de la razón F340/F380 en respuesta a AITC y el número de células que respondieron, el máximo efecto del S1RA se obtuvo tras incubar las células 4 horas a la concentración de 100 μM . La incubación con S1RA 100 μM durante 1 hora no induce cambios significativos en el número de células que responden a AITC 50 μM . En situación

control 97 % (37/38) vs 95 % (21/22) posterior a 1 hora de incubación. Posterior a 3 y 4 horas de incubación con S1RA 100 μ M, el porcentaje de respuesta cambi6 significativamente a 55 % (77/139) y 45 % (64/143) respectivamente ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.6D).

La incubaci6n con S1RA 100 μ M redujo significativamente la amplitud de la respuesta a AITC 50 μ M tras la incubaci6n durante 1, 3 y 4 h cuando se compararon con la situaci6n control. Los valores promedio fueron de 0.52 ± 0.06 , 0.25 ± 0.04 , 0.16 ± 0.02 y 0.91 ± 0.10 respectivamente ($p < 0.001$, an6lisis de varianza ANOVA a una v6a y prueba post-hoc Dunnett) (Fig. 4.6E).

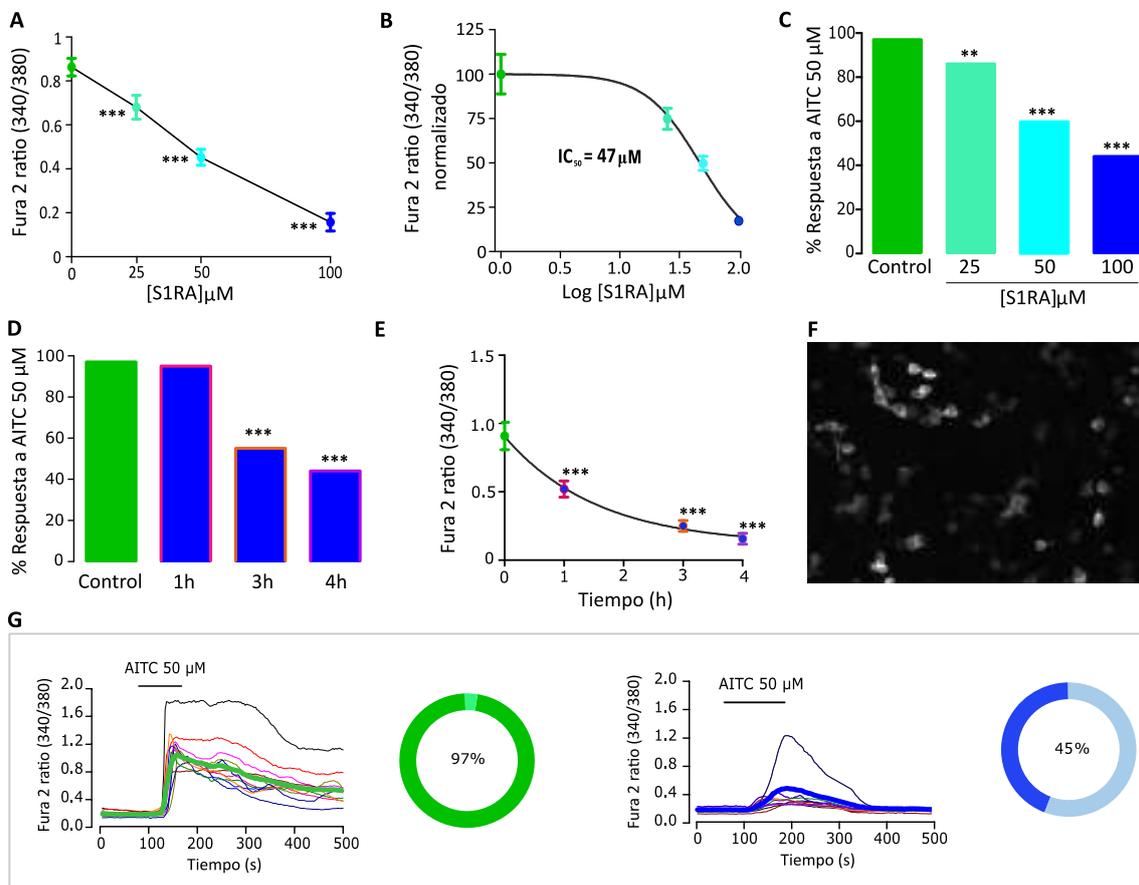


Figura 4.6. La incubaci6n con S1RA inhibe la respuesta a AITC en c6lulas HEK293 transfectadas con hTRPA1-tGFP: A) Amplitud (F340/F380) de la respuesta a AITC 50 μ M en c6lulas incubadas con distintas concentraciones de S1RA durante 4 horas. La incubaci6n con S1RA 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M durante 4 horas ($p < 0.001$ ***, ANOVA-Dunnett). **B)** Concentraci6n inhibitoria media (IC_{50}) para S1RA. Cambio de la amplitud a diferentes concentraciones de S1RA normalizada a la situaci6n control. $IC_{50} = 47 \mu M$. **C)** Cambio en el porcentaje de respuesta a AITC 50 μ M en c6lulas incubadas con distintas concentraciones de S1RA durante 4 horas ($p < 0.01$ ** y $p < 0.001$ **, prueba exacta de Fisher). **D)** Cambio en el porcentaje de respuesta a AITC 50 μ M cuando se incubaba con S1RA 100 μ M a durante 1, 3 y 4 horas. Cambios significativos a 3 y 4 horas de incubaci6n con S1RA ($p < 0.001$ ***, prueba exacta de Fisher). **E)** Cambio en la amplitud de la respuesta a AITC 50 μ M a diferentes tiempos de incubaci6n con S1RA 100 μ M. cambios significativos

a 1,3 y 4 horas ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Dunnett). **F**) Imagen de células HEK293 transfectadas con hTRPA1-tGFP de manera transitoria. **G**) Trazos de cambio de calcio intracelular y porcentaje de respuesta en situación control (trazos izquierda) y posterior a la incubación con S1RA 100 μM durante 4 h (trazos derecha). Los trazos más gruesos representan el promedio de las respuestas del gráfico. Porcentajes de respuesta a AITC 50 μM en control (97 %) y S1RA 100 μM (45 %) se representan en los anillos verde y azul respectivamente.

En todas las condiciones experimentales, se realizó el control pertinente. Las células fueron incubadas el tiempo especificado en solución extracelular con el vehículo del S1RA, DMSO, a la concentración correspondiente: 0.05, 0.1 y 0.2 %, dependiendo de la concentración de S1RA. Finalmente, como se no observaron cambios con las diferentes concentraciones de DMSO, se agruparon los datos en un único grupo control.

En resumen, los resultados de este bloque muestran una disminución de la actividad del canal TRPA1, la cual es dependiente de la concentración de S1RA y del tiempo de incubación, siendo las condiciones óptimas una concentración de 100 μM y 4 horas de incubación.

Además, se analizó el efecto de 25 μM S1RA, la concentración más baja testada, incubado durante 24 horas. Para ello, las células que expresaban de manera estable el canal hTRPA1-tGFP fueron incubadas en medio de cultivo completo (DMEMc). Simultáneamente, se incubaron células con 100 μM S1RA durante 4 horas como control positivo.

Se pudo observar que la incubación con S1RA 25 μM -24 h induce una inhibición en la amplitud de la respuesta a 50 μM AITC de 68 % respecto a la situación control. Así, el promedio de la amplitud de la respuesta de (F340/F380) en situación control fue de 1.66 ± 0.05 ($n = 397$), mientras que, tras la incubación con S1RA 25 μM -24 h, el promedio de la respuesta se vio disminuida a 0.53 ± 0.02 ($n = 574$). Los cambios en la amplitud de la respuesta a AITC 50 μM resultaron estadísticamente significativos ($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada). Adicionalmente, las células incubadas con la condición S1RA 100 μM -4 h, mostraron un descenso en la amplitud de la respuesta a AITC 50 μM del 66 % respecto a la situación control, siguiendo la misma tendencia, como se ha demostrado anteriormente (Fig. 4.7).

Tras la incubación con S1RA 25 μM -24 h, las células respondieron un 16 % menos a AITC 50 μM respecto a la situación control, siendo estos cambios estadísticamente significativos ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher). En situación control hubo un 98 %

(397/406) de respuestas, mientras que, con S1RA 25 μ M-24 h, un 82 % (574/696), representando una inhibición del 16 %.

Sin embargo, la incubación con S1RA 100 μ M-4 h, las células respondieron un 55 % (108/197) mientras que en situación control el valor fue de 98 % (231/240) ($p < 0.0001$, prueba exacta de Fisher). Estos cambios representan una inhibición del 47 %.

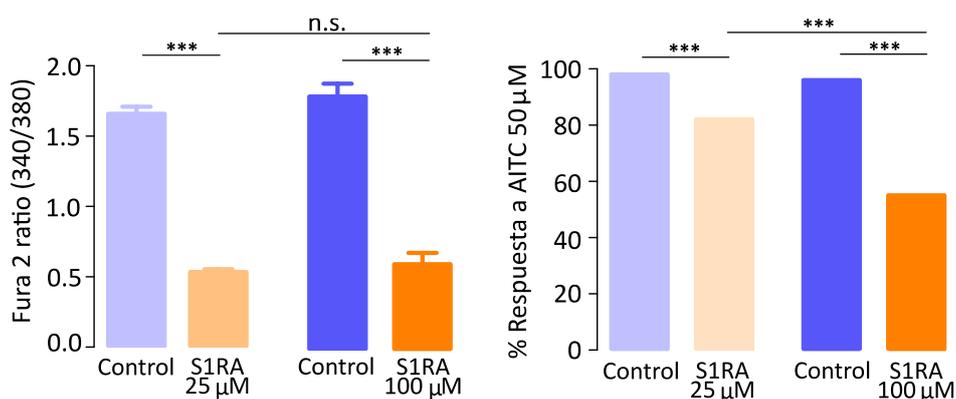


Figura 4.7. La incubación con S1RA 25 μ M durante 24 horas inhibe la respuesta a AITC en células que expresan de manera estable el canal hTRPA1-tGFP. La incubación con S1RA 25 μ M-24 h induce una inhibición de la amplitud de la respuesta a AITC 50 μ M de igual magnitud que la incubación con S1RA 100 μ M-4h ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada). La incubación con S1RA 25 μ M-24 h induce un descenso en el número de células que responden a AITC 50 μ M menor que la incubación con S1RA 100 μ M-4h ($p < 0.001^{***}$, prueba Exacta de Fisher).

En resumen, estos datos sugieren que la incubación con S1RA 25 μ M-24 h induce resultados equivalentes a los observados con S1RA 100 μ M-4 h en la inhibición de la amplitud de la respuesta a AITC 50 μ M, sin embargo, el descenso en el número de células que responden a este estímulo es menor cuando se las incuba con S1RA 25 μ M-24 h.

4.2.2 Evaluación del efecto del S1RA sobre las corrientes de membrana a través del canal TRPA1

Para estudiar cómo afecta el S1RA a las corrientes de membrana producidas por la activación del canal TRPA1 con AITC, se planificó un bloque experimental de registros electrofisiológicos de patch-clamp, utilizando la modalidad de célula completa. Estos experimentos se realizaron en la línea celular que expresa de manera estable el canal hTRPA1-tGFP (ver apartado 3.3.4.3 de materiales y métodos).

Las células fueron incubadas durante 4 horas a distintas concentraciones de S1RA: 10, 30 y 100 μM . El grupo control se incubó el mismo tiempo con solución extracelular 0.2 % de DMSO.

De los registros de patch-clamp (en la modalidad fijación de voltaje) se obtuvo información de la corriente de entrada activada por AITC 50 μM a un potencial de -60 mV de la cual se tomaron los valores de la corriente máxima y el tiempo al pico. Simultáneamente se aplicaron, cada 3 segundos, rampas de voltaje (desde -100 a +100 mV) durante la aplicación de AITC y se estudiaron los cambios en las corrientes de membrana obtenidos.

En la figura 4.8A se muestran ejemplos representativos de la corriente de entrada a -60 mV activada por AITC a las diferentes concentraciones de S1RA exploradas. Se observó una inhibición de la amplitud de la corriente de entrada, así como un incremento del tiempo al pico, siendo estos cambios dependientes de la concentración de S1RA. Cuanto mayor es la concentración de S1RA menor es la corriente de entrada y más lenta su llegada al pico máximo. Respecto a la amplitud de la densidad de corriente, como se puede observar en la figura 4.8B, la máxima inhibición se obtiene tras la incubación con S1RA 100 μM , valor promedio de 9.32 ± 2.35 pA/pF ($n = 18$) mientras que los valores en condición control fueron 51.01 ± 5.52 pA/pF ($n = 20$) ($p < 0.001$ ***, análisis de varianza ANOVA a una vía y prueba post-hoc Dunnett). El cambio en la corriente tras la incubación con S1RA 100 μM -4 h representa una inhibición del 80 % (Fig. 4.8B panel izquierda). La incubación con 10 μM y 30 μM S1RA indujo una disminución de la densidad de corriente de entrada dosis dependiente, con valores promedio de 43.7 ± 6.5 pA/pF ($n = 6$) y 30.8 ± 3.0 pA/pF ($n = 6$) respectivamente que no resultaron significativos respecto a la condición control (Fig. 4.8B panel izquierda).

Respecto al tiempo al pico, se observó un incremento directamente proporcional al aumento de la concentración de S1RA utilizada. Así, en la condición control el tiempo al pico promedio fue 25.0 ± 1.9 segundos ($n = 20$), mientras que en las células incubadas con S1RA 100 μM éste se vio incrementado significativamente hasta 64.8 ± 10.4 segundos ($n = 18$) ($p < 0.001$, análisis de varianza ANOVA a una vía, prueba post-hoc Dunnett). Tras la incubación con S1RA 100 μM 4 h fue necesario 2,6 veces más tiempo para llegar a los valores máximos de corriente (Fig. 4.8B panel derecha). El tiempo al

pico en las condiciones de incubación restantes, S1RA 10 μM y 30 μM no mostraron cambios significativos respecto a la situación control, los valores promedio obtenidos fueron 26.1 ± 5.9 segundos ($n = 6$) y 28.9 ± 4.2 segundos ($n = 6$) respectivamente (Fig. 4.8B panel derecha).

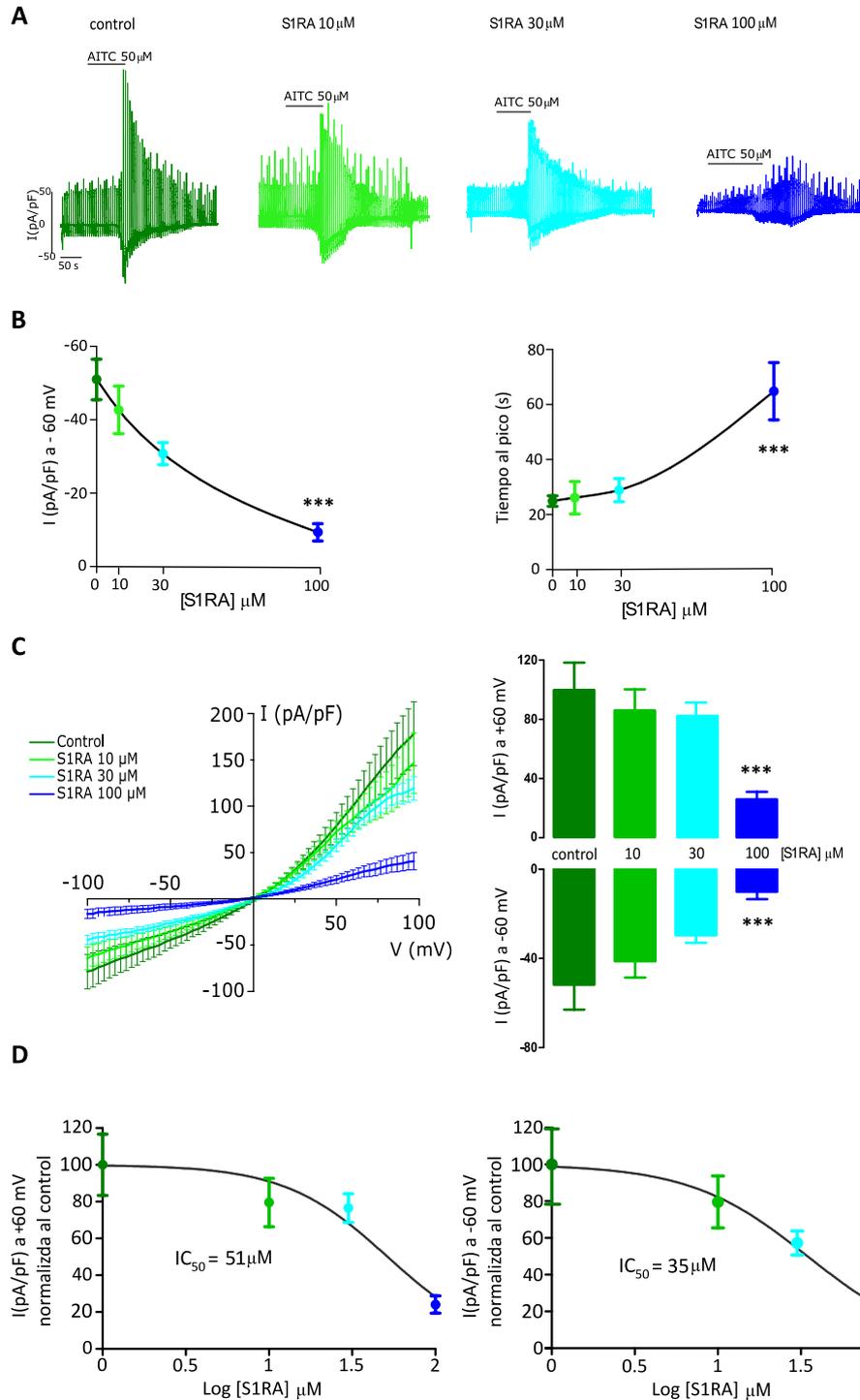


Figura 4.8. La incubación con S1RA inhibe la corriente de TRPA1 de forma dependiente a la concentración. Línea celular HEK293-hTRPA1-tGFP. **A)** Ejemplos representativos de registros de patch-

clamp voltage-clamp modalidad célula entera. Corrientes de entrada activadas por AITC 50 μM cuando la célula está fijada a -60 mV. Situación control (verde oscuro), célula incubada con S1RA 10 μM 4 h (verde claro), célula incubada con S1RA 30 μM 4 h (celeste) y S1RA 100 μM 4 h (azul). **B)** Promedio de la amplitud de la corriente de entrada en respuesta a AITC 50 μM y tiempo al pico para cada una de las concentraciones indicadas en el punto A. La condición experimental S1RA 100 μM 4 h (azul) es la única que genera cambios significativos respecto a la situación control en la amplitud de la corriente y el tiempo al pico. ($p < 0.001$ ***, ANOVA-Dunnett). **C)** Relación corriente-voltaje en la configuración de célula entera en presencia de AITC 50 μM cuando se aplican rampas de voltaje de -100 mV A + 100 mV. A diferentes concentraciones de S1RA (izquierda) Situación control (verde oscuro), células incubadas 4 horas con S1RA 10 μM (verde claro), S1RA 30 μM (celeste) y S1RA 100 μM (azul), $n = 10$ en todos los grupos. Corriente evocada a +60 mV y -60 mV en presencia de AITC 50 μM en células incubadas en las concentraciones mencionadas. Cambios significativos para S1RA 100 μM ($p < 0.001$ ***, ANOVA-Dunnett). Panel de la derecha. **D)** Concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) para S1RA. Para potenciales positivos y negativos, 51 μM y 35 μM y respectivamente.

En la figura 4.8C se muestra la densidad de corriente promedio en función del voltaje de células incubadas a diferentes concentraciones de S1RA, obtenidas al aplicar una rampa de voltaje de -100 mV a +100 mV y AITC 50 μM . Como se observa, la aplicación de S1RA produjo una inhibición de las corrientes, tanto a voltajes negativos como positivos, siendo esta disminución dependiente de la concentración de S1RA, y máxima a 100 μM ($n = 10$) ($p < 0.001$, ANOVA a una vía y prueba post-hoc Dunnett). En esta inhibición no se observa voltaje dependencia ya que todos los voltajes presentan un comportamiento similar (Fig. 4.8C panel izquierda).

Calculando el valor promedio de la corriente a +60 mV y a -60 mV la inhibición de la corriente dependiente de TRPA1, resultó similar al observado previamente (Fig. 4.8C panel derecho). Las concentraciones de 10 y 30 μM de S1RA ($n = 10$ en ambos grupos) no mostraron cambios significativos respecto a la situación control. Con los valores obtenidos a diferentes concentraciones se calculó la IC_{50} para para la densidad de corriente a +60 mV y -60 mV, cuyo valor resultó 35 μM ($R^2 = 0.99$) y 51 μM ($R^2 = 0.93$) respectivamente (Fig. 4.8D).

En resumen, este bloque de resultados, obtenidos mediante experimentos de electrofisiología, demuestran que el S1RA reduce la amplitud de la corriente de membrana a través de TRPA1 evocada por AITC 50 μM de forma dosis dependiente, obteniendo la máxima inhibición a la concentración de 100 μM incubando las células 4 horas.

4.2.3 Estudio del efecto del S1RA en la respuesta de TRPA1 al agonista carvacrol

Como se ha mencionado en el apartado de introducción, el canal TRPA1 se puede activar por distintos compuestos, siendo muchos de ellos de naturaleza electrofílica como el AITC utilizado en los experimentos anteriores. Quisimos comprobar si el efecto del S1RA, antagonista de la chaperona $\sigma 1$, sobre TRPA1 podría estar influenciado por el tipo de agonista químico que activa el canal. Para ello, se realizaron experimentos de medida de calcio intracelular estimulando TRPA1 con carvacrol, un agonista no electrófilo cuya interacción con el canal TRPA1 es diferente a la que establece el AITC (ver apartado 1.4.6 de introducción).

Para llevar a cabo este bloque experimental, se transfectaron transitoriamente células HEK293 con hTRPA1-tGFP y se conformaron 4 grupos experimentales de células incubadas durante 4 horas con diferentes concentraciones de S1RA, 10, 30 μM , 100 μM y situación control.

Los experimentos de medida de calcio intracelular dieron como resultado que la incubación con las concentraciones más bajas de S1RA (10 y 30 μM) no producían cambios significativos en la amplitud de la respuesta inducida por la aplicación de 100 μM carvacrol respecto a la situación control (solución extracelular y 0.2 % DMSO). Sin embargo, la incubación con 100 μM S1RA indujo una reducción significativa de la amplitud de la respuesta a carvacrol desde 0.96 ± 0.07 a 0.43 ± 0.18 representando una inhibición del 55 % respecto a la situación control ($p < 0.001$, análisis de varianza ANOVA a una vía y prueba post-hoc Dunnett) (Fig. 4.9A).

En cuanto al porcentaje de células que respondieron, solo la incubación con S1RA 100 μM produjo cambios significativos. En situación control, el carvacrol 100 μM activó al 90 % (45/50) de las células hTRPA1-tGFP positivas, mientras que cuando las células se incubaron con S1RA 100 μM solo respondió el 31 % (11/36) ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.9B). En la figura 4.9C se muestran trazos representativos de cambios en los valores de (F340/F380) para la situación control y tras la incubación con S1RA 100 μM durante 4 horas.

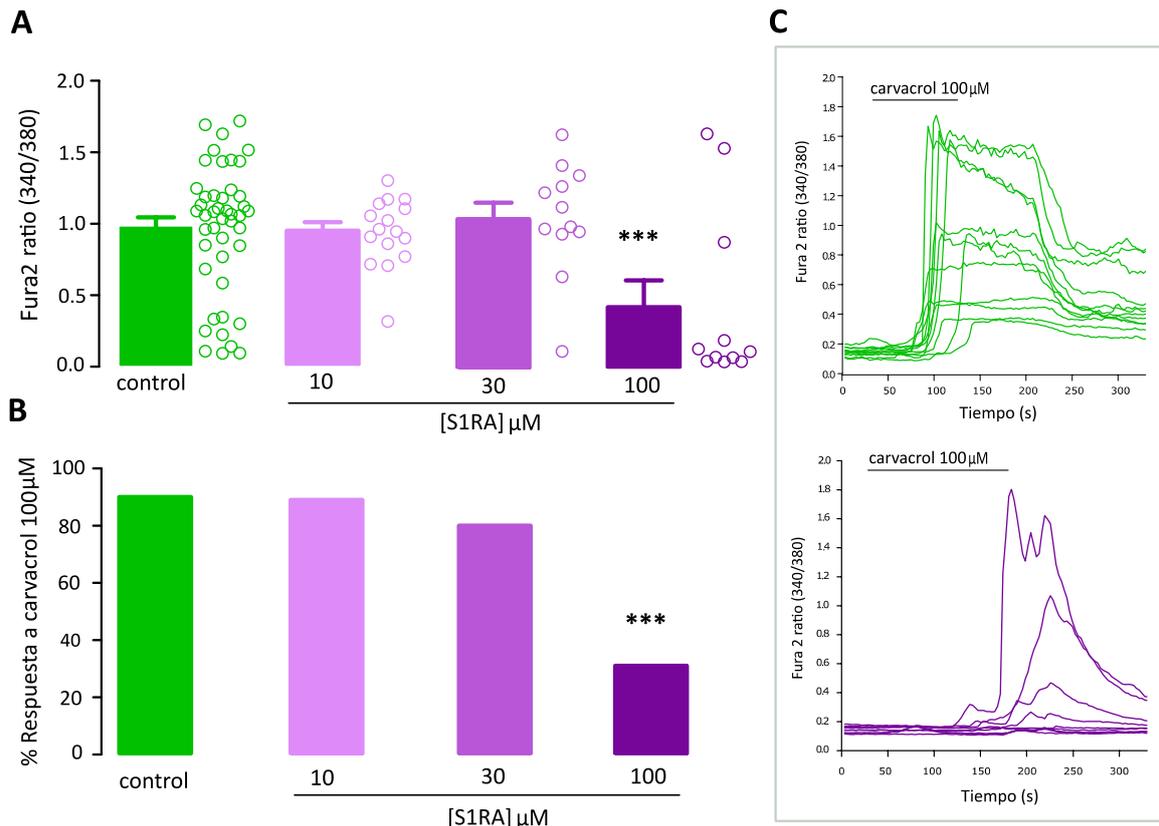


Figura 4.9. Efecto de la incubación con S1RA en la respuesta a carvacrol. Células HEK 293 transfectadas con hTRPA1-tGFP. A) Cambio de la amplitud de la respuesta a carvacrol 100 μM en células incubadas con S1RA 10 μM , 30 μM y 100 μM durante 4hs. Sólo la incubación con S1RA 100 μM indujo un cambio significativo en la amplitud de la respuesta ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Dunnett). **B)** Comparación de porcentaje de células que responden a carvacrol 100 μM tras ser incubadas con las concentraciones de S1RA mencionadas en A. La incubación con S1RA 100 μM produjo un cambio significativo en el porcentaje de células que responden respecto a la situación control ($p < 0.001^{***}$, prueba exacta de Fisher). **C)** Trazos representativo del curso temporal del cambio en la concentración del calcio intracelular durante la aplicación de carvacrol 100 μM en condiciones control (imagen superior) y en células incubadas con S1RA 100 μM 4 h (imagen inferior).

4.2.4 Comparación del efecto de S1RA en la respuesta a un agonista electrófilo y un agonista no electrófilo del canal TRPA1

El efecto inhibitorio encontrado tras la incubación con S1RA 100 μM cuando se activa el canal TRPA1 con AITC mantiene la tendencia cuando el canal TRPA1 es activado por agonistas de diferente naturaleza. Como se puede observar, la inhibición en la amplitud de la respuesta aumenta en función del aumento en la concentración de S1RA, mostrando un efecto dependiente de la dosis utilizada. Sin embargo, cuando se utiliza el carvacrol como agonista no electrófilo de TRPA1, la IC_{50} resultó el doble de la obtenida

con AITC, 98 μM ($R^2 = 0.97$) vs 47 μM ($R^2 = 0.99$) respectivamente (Fig. 4.10A). Cabe destacar que los grupos de células estimuladas con carvacrol presentan mayor variabilidad en las respuestas ya que un menor número de células fueron analizadas.

Sin embargo, en ambos casos, utilizando la máxima concentración de S1RA (100 μM), el porcentaje de células que responden a cada agonista fue similar: 45 % de respuesta a AITC 50 μM y 31 % de respuesta a carvacrol 100 μM . En cuanto a la amplitud de la respuesta, la reducción cuando se activa TRPA1 por AITC representó un 81 % mientras que cuando se estimularon las células con carvacrol éste fue de un 55 % (Fig. 4.10B).

Utilizando la línea que expresa de manera estable el canal hTRPA1-tGFP, se incubaron células con S1RA 100 μM durante 4 horas y se evaluó la respuesta a AITC 50 μM y carvacrol 100 μM . Se observó un descenso similar en la amplitud de la respuesta para ambos agonistas de TRPA1, siendo estos cambios estadísticamente significativos ($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada en ambos casos.) La inhibición con ambos agonistas representó un descenso del 50 % respecto a su condición control (Fig. 4.10C).

Respecto al porcentaje de respuestas, la incubación con S1RA produjo el mismo descenso para ambos agonistas de TRPA1, de 97 % (control) a 88 % (S1RA 100 μM) aunque la significancia varió debido al tamaño muestral en cada grupo experimental. La respuesta a AITC cambió de 97 % (184/189) control a 88 % (187/211) con S1RA 100 μM -4 h ($p = 0.0003$, prueba exacta de Fisher). Sin embargo, la respuesta a carvacrol cambió de 97 % (109/112) control a 88 % (96/109) S1RA 100 μM -4 h ($p = 0.009$, prueba exacta de Fisher).

Estos resultados indican que el efecto inhibitorio del antagonista S1RA a 100 μM -4h sobre TRPA1, es independiente del tipo de interacción química entre el canal TRPA1 y su agonista. En ambos casos (agonistas electrófilos y no electrófilos) el S1RA produjo un efecto inhibitorio similar.

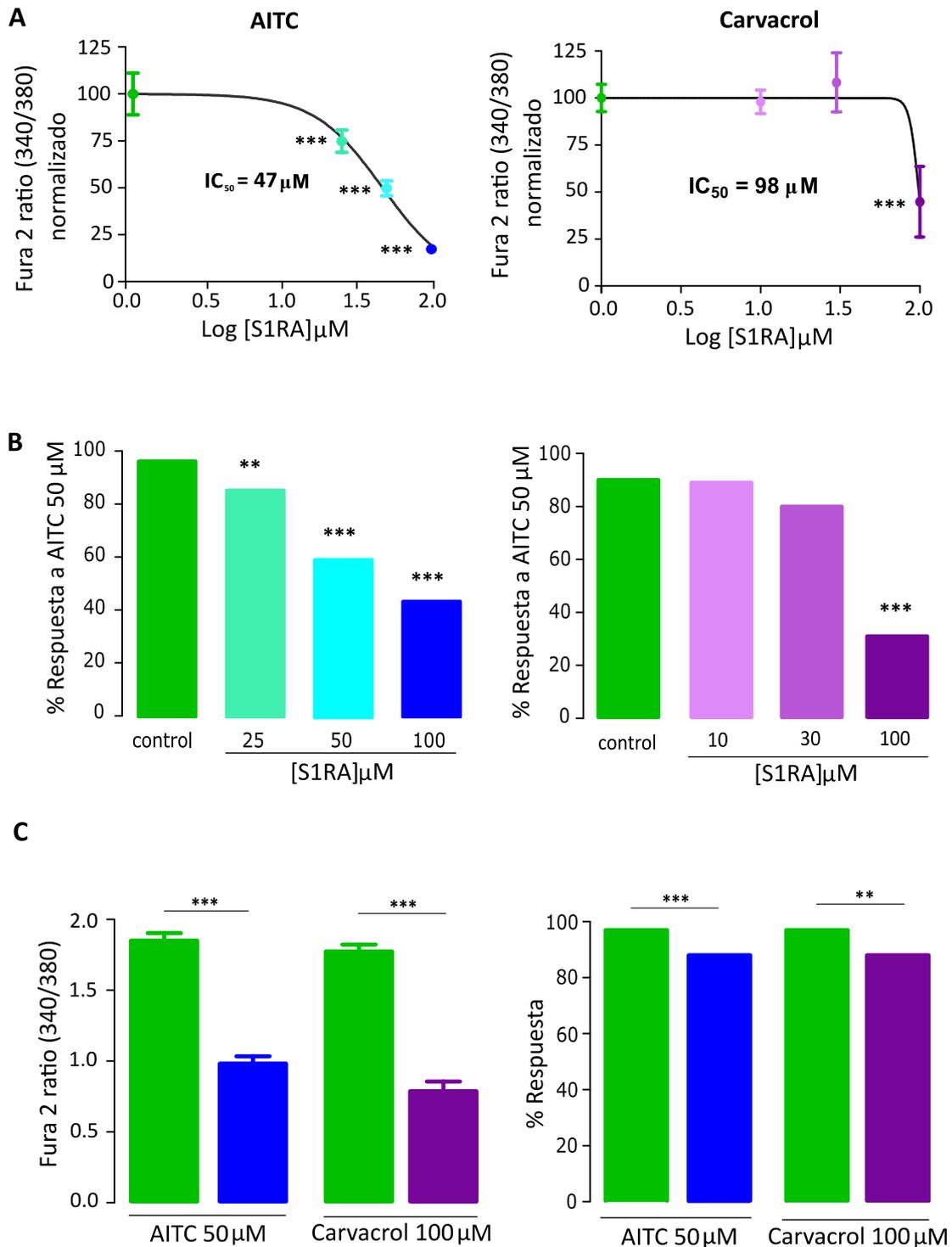


Figura 4.10. La inhibición de la actividad de TRPA1 por S1RA es independiente del agonista de TRPA1 utilizado. A) Curvas dosis respuesta para AITC 50 μM (panel de la izquierda) y carvacrol 100 μM (panel de la derecha) valores normalizados a la situación control ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Dunnett). $IC_{50} = 47 \mu M$ y $98 \mu M$ **B)** Cambios en el porcentaje de respuesta a AITC 50 μM (panel de la izquierda) y carvacrol 100 μM (panel de la derecha) ($p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$, prueba exacta de Fisher). **C)** La incubación con S1RA 100 μM-4h en células que expresan de manera estable el canal TRPA1 produjo el mismo efecto inhibitorio cuando el canal es activado con AITC 50 μM o carvacrol 100 μM. La inhibición en la amplitud fue de 50 % ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada). El porcentaje de respuesta a AITC y carvacrol descendió de 97 % a 88 % ($p < 0.01^{**}$, prueba exacta de Fisher).

4.2.5 Estudio del efecto del BD1086, otro antagonista de la chaperona $\sigma 1$, sobre las respuestas de TRPA1

Siguiendo con el mismo abordaje, este bloque de experimentos tuvo como objetivo evaluar si el BD1063, otro antagonista de la chaperona $\sigma 1$, tiene el mismo efecto sobre la respuesta a AITC mediada por TRPA1 que el obtenido con S1RA. En células HEK293 transfectadas transitoriamente con hTRPA1-tGFP, se realizaron experimentos de imagen de calcio *in vitro* y experimentos de medidas de corriente de membrana.

En primer lugar, se incubaron células durante 4 horas a 25, 50 y 100 μM de BD1063. En los experimentos de imagen de calcio se observó que la amplitud de la respuesta a 50 μM de AITC se vio disminuida con el aumento de la concentración de BD1063, aunque sólo se observaron cambios significativos con la concentración más alta. A partir de esta información se calculó la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) cuyo valor fue de 76 μM ($R^2 = 0.93$) (Fig. 4.11A).

La incubación con BD1063 100 μM -4 h produjo una reducción de la amplitud de la respuesta a AITC 50 μM del 64 %, siendo los valores promedio obtenidos de 0.86 ± 0.03 ($n= 255$) vs 0.31 ± 0.06 ($n= 36$) para la situación control (solución extracelular) y BD1063 100 μM respectivamente ($p < 0.001$, t-Student no pareada) (Fig. 4.11B).

El porcentaje de células que respondieron tras la incubación con BD1063 100 μM -4 h fue significativamente menor que en la condición control. En situación control respondieron el 97 % (255/263) de las células a AITC, mientras que tras la incubación con BD1063 solo respondieron el 47 % (36/77), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$, prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.11B).

A continuación, se realizaron registros electrofisiológicos para estudiar el efecto del BD1063 sobre la corriente de membrana en las células transfectadas con hTRPA1-tGFP, en respuesta a 50 μM de AITC. Se realizaron registros de patch-clamp en la modalidad de fijación de voltaje en célula entera donde y se midió la amplitud de la corriente y el tiempo al pico a un potencial fijo de -60 mV. Además del grupo de células incubadas con BD1063 100 μM -4 h, se registraron alternadamente células incubadas

con S1RA 100 μ M-4 h como control del efecto el mismo día de registro, y también células incubadas en solución control (solución extracelular).

En el grupo de células incubadas con BD1063 100 μ M-4 h el promedio de la densidad de corriente fue igual a 25.69 ± 3.62 pA/pF (n=12), mostrando una inhibición del 48 % respecto al grupo de control, cuya corriente de entrada promedio fue de 49.9 ± 5.7 pA/pF (n=21), la diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0.003$, prueba t-Student no pareada). (Fig. 4.11D).

A su vez, se analizó el tiempo en el que se alcanzan los valores máximos de corriente (tiempo al pico). Las células incubadas con BD1063 y en solución control alcanzaron el máximo de corriente en un tiempo similar control, así los valores promedios fueron de 23.36 ± 2.07 segundos (n = 21) vs 24.84 ± 1.92 segundos (n = 12) respectivamente ($p = 0.62$ n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.11E). Trazos representativos de la corriente de entrada evocada por AITC 50 μ M en ambas condiciones experimentales se muestran en la figura 4.11C.

En los resultados obtenidos de rampas de voltaje (-100 mV a +100 mV) se observó que la incubación con BD1063 100 μ M-4 h produjo inhibición de la corriente a potenciales negativos y positivos cuando estas rampas se aplicaron en simultáneo con AITC 50 μ M. Así, los valores de densidad de corriente obtenidos a -60 mV para el grupo BD1063 fue de -24.01 ± 4.33 pA/pF (n = 9) siendo estos cambios estadísticamente significativos respecto a la situación control, -51.79 ± 11.21 pA/pF (n = 10) ($p = 0.03$, prueba t-Student no pareada). Para potenciales positivos, +60 mV, el promedio de la densidad de corriente en las células incubadas con BD1063 fue de 51.91 ± 7.49 pA/pF (n = 9) mientras que en la situación control fue de 99.84 ± 18.46 pA/pF (n = 10) ($p = 0.04$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.11G). Trazos del promedio de la relación corriente-voltaje en la configuración de célula entera en presencia de AITC (50 μ M) cuando se aplican rampas de voltaje de -100 mV A + 100 mV en situación control y tras la incubación con BD1063 100 μ M-4h se muestran en la figura 4.11F.

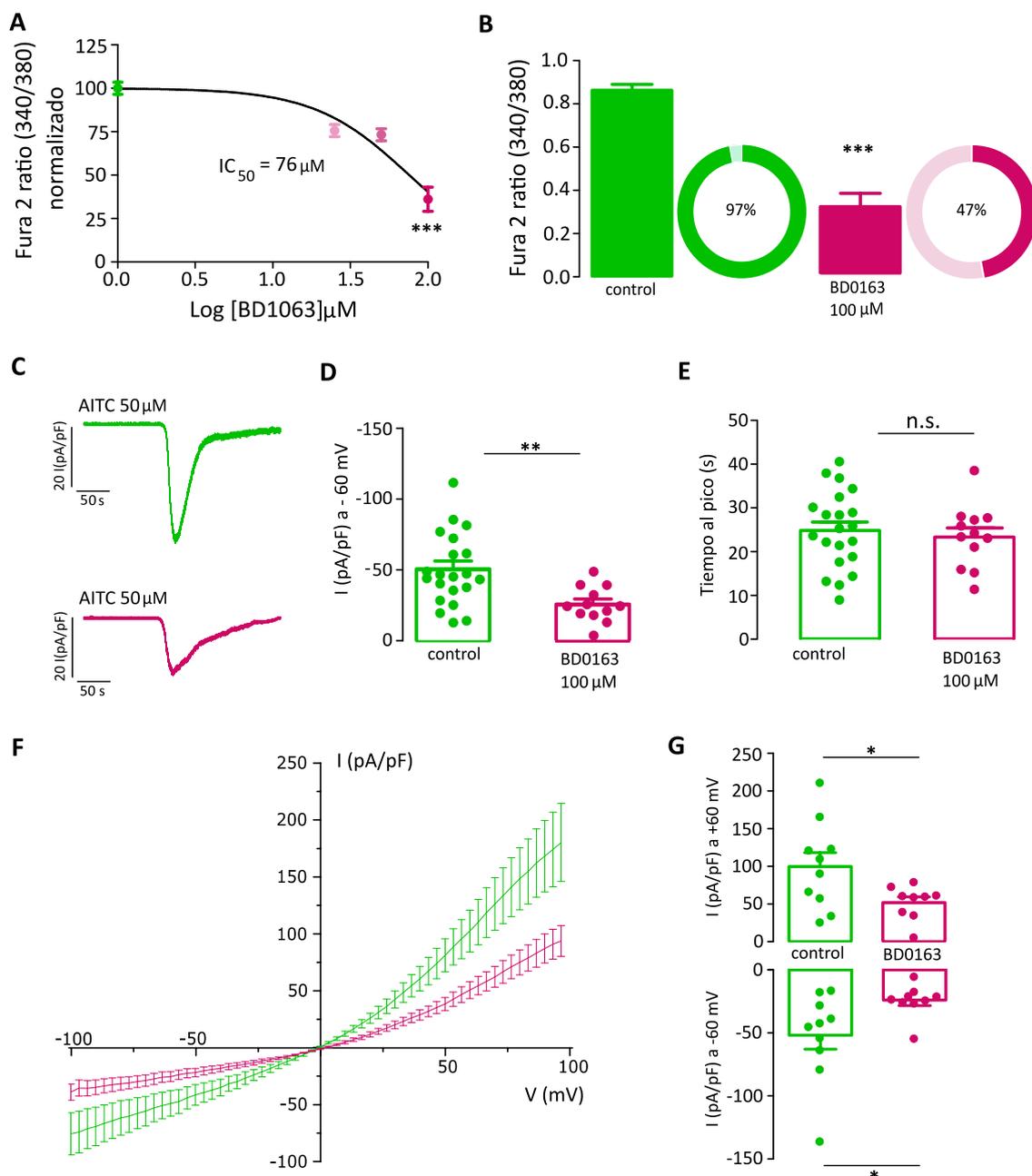


Figura 4.11. La incubación con BD1063 inhibe la actividad del canal TRPA1 en células HEK293 cuando se lo estimula con AITC 50 μ M. **A)** Curvas dosis respuesta para diferentes concentraciones de BD1063 (25, 50 y 100 μ M) ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Dunnett). $IC_{50} = 76 \mu$ M. **B)** Inhibición de la respuesta a AITC tras la incubación con BD1063 100 μ M ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada y prueba exacta de Fisher). **C)** Registros representativos del cambio de corriente de entrada activada por AITC μ M en situación control (verde) y tras la incubación con BD1063 100 μ M 4-h (magenta) **D)** Densidad de corriente máxima en situación control (verde $n=21$) y tratadas con BD1063 100 μ M 4-h (magenta $n=12$) ($p < 0.01^{**}$, prueba t-Student no pareada). **E)** Tiempo al pico en situación control (verde $n=21$) y tratadas con BD1063 100 μ M 4-h (magenta $n=12$) ($p = 0.62$ n.s., prueba t-Student no pareada). **F)** Relación corriente-voltaje en la configuración de célula entera en presencia de AITC 50 μ M cuando se aplican rampas de voltaje de -100 mV a +100 mV en situación control (verde) y tras la incubación con BD1063 100 μ M 4-h (magenta). **G)** Densidad de corriente a +60 mV y -60 mV en situación control e incubadas con BD1063 100 μ M 4-h ($p \leq 0.5$, prueba t-Student no pareada).

4.2.6 Comparación del efecto de dos antagonistas de la chaperona $\sigma 1$, S1RA y BD1063 en la respuesta a AITC del canal TRPA1

Con el objetivo de comparar el efecto de ambos antagonistas de la chaperona $\sigma 1$, en este apartado se resumen valores ya mencionados en los apartados previos enfatizando las diferencias de los efectos obtenidos con S1RA y BD1063.

El estudio de los cambios de calcio intracelular, utilizando imagen de calcio *in vitro* en células incubadas con Fura2-AM, la incubación con BD1063 100 μ M-4h produjo una reducción de la amplitud de respuesta a AITC 50 μ M del 64 %, mientras que el S1RA en las mismas condiciones de incubación redujo la amplitud de la respuesta en un 81 % respecto a la situación control.

El porcentaje de células que respondieron fue similar tras la incubación con ambos antagonistas de $\sigma 1$. Las células tratadas con S1RA 100 μ M-4 h respondieron un 45 % a la estimulación con AITC y aquellas incubadas con BD1063 en las mismas condiciones un 47 % respecto a su correspondiente control. La IC_{50} para cada uno de los compuestos se observa en la figura 4.12A, siendo de 47 μ M para el S1RA y 76 μ M para el compuesto BD1063.

De los registros de electrofisiología, como se ha mencionado previamente, se obtuvo información de la corriente de entrada activada por AITC (50 μ M) a un potencial de -60 mV. En el grupo incubado con S1RA (100 μ M) la máxima corriente de entrada fue 11.10 ± 2.8 pA/pF (n=18) representando este valor, un 78 % de inhibición respecto al control, mientras que en el grupo de células incubadas con BD1063 (100 μ M) la máxima corriente de entrada fue 25.69 ± 3.6 pA/pF (n = 12) mostrando una inhibición del 48 % respecto al grupo de células incubadas con solución control cuya corriente de entrada promedio fue de 49.87 ± 5.7 pA/pF (n = 21), la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$, prueba t-Student no pareada). El S1RA redujo la amplitud de la corriente de entrada 1.6 veces más que el BD1086 (Fig. 4.12B).

A su vez, se analizó el tiempo en el que se alcanzan los valores máximos de corriente (tiempo al pico) tras la incubación con S1RA y BD1063. Las células incubadas con S1RA fueron 3 veces más lentas que las incubadas con BD1063. Así, los valores promedio de tiempo al pico para cada condición resultaron 79.02 ± 21.3 segundos (n = 13) y 23.36 ± 2.07 segundos (n = 12) respectivamente, estas diferencias resultaron

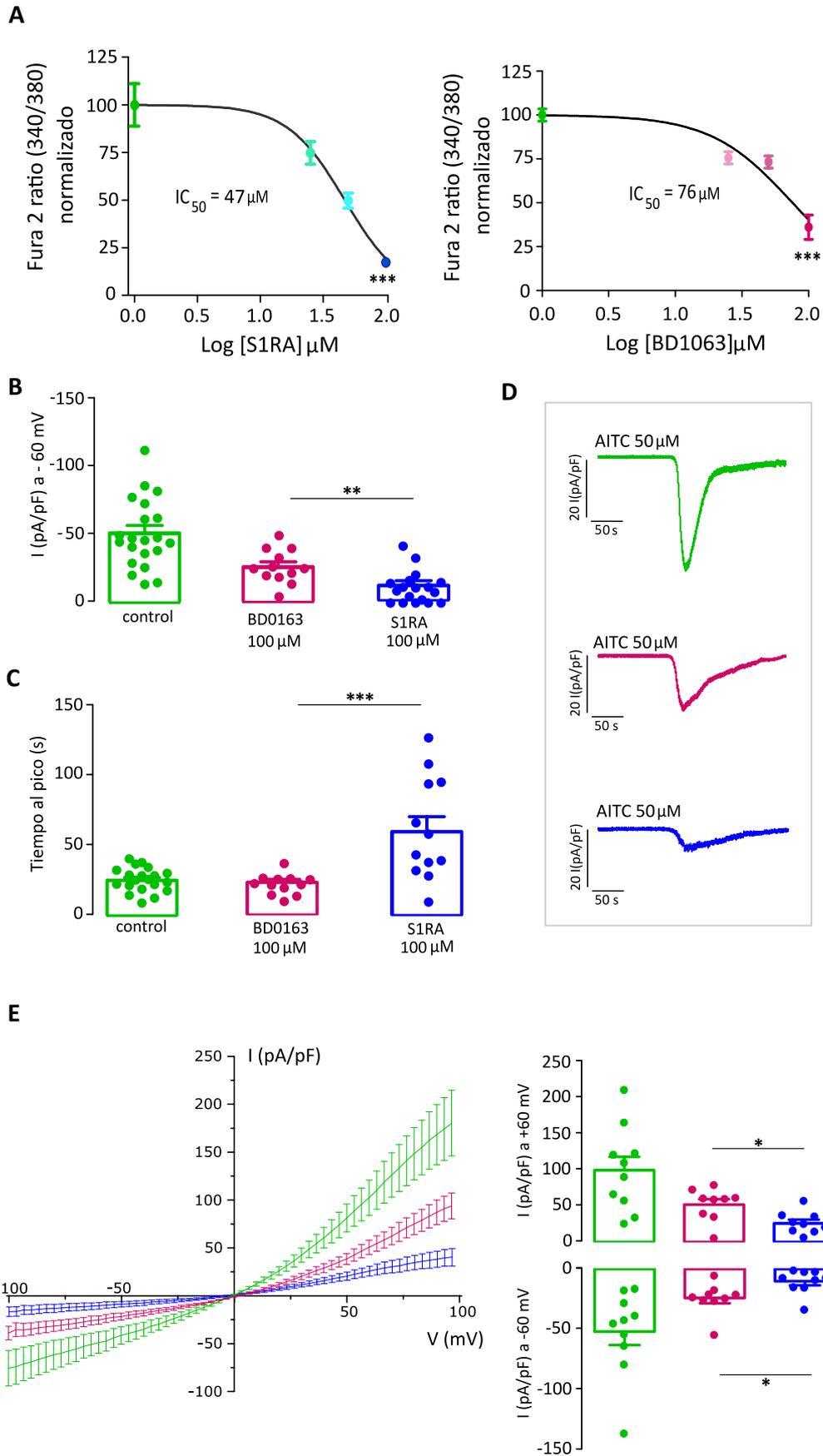


Figura 4.12. Comparación del efecto de la incubación con S1RA y BD1063 en la respuesta a AITC. La incubación con S1RA inhibe en mayor medida la actividad del canal TRPA1. A) Imagen de calcio in vitro.

Curvas dosis respuesta para AITC 50 μM . Valores normalizados a la situación control. $\text{IC}_{50} = 47 \mu\text{M}$ para el S1RA (panel de la izquierda), $\text{IC}_{50} = 76 \mu\text{M}$ para el BD1063 (panel de la derecha). **B)** Registros electrofisiológicos. Corrientes de entrada activadas por AITC 50 μM cuando la célula está fijada a -60 mV. Promedio de la amplitud de la corriente de entrada en situación control (verde, $n = 21$), incubadas con BD1063 100 μM -4h (magenta $n = 12$) y S1RA 100 μM -4h (azul $n = 18$). **C)** Registros electrofisiológicos. Promedio del tiempo al que se alcanza el valor máximo de corriente en situación control (verde, $n = 21$), incubadas con BD1063 100 μM 4 h (magenta, $n = 12$) y S1RA 100 μM 4 h (azul). **D)** Ejemplos representativos de las corrientes de entrada activadas por AITC 50 μM en situación control (verde), BD1063 100 μM -4h (magenta) y S1RA 100 μM -4h (azul). **E)** Relación corriente-voltaje en presencia de AITC 50 μM cuando se aplican rampas de voltaje de -100 mV a +100 mV. Medias de las corrientes evocadas por las rampas de voltaje. Situación control $n = 10$ (verde oscuro), células incubadas con BD1063 100 μM -4h $n = 9$ (magenta) y S1RA 100 μM -4h $n = 9$ (azul). En el panel de la derecha se observa la la densidad de corriente promedio evocada a +60 mV y -60 mV en presencia de AITC 50 μM en células incubadas con los compuestos y a las concentraciones mencionadas.

estadísticamente significativas ($p = 0.02$, prueba t-Student no pareada). En situación control este valor fue de 24.84 ± 1.9 segundos ($n = 21$) (Fig. 4.12C). Trazos representativos de cada grupo experimental se muestran en la figura 4.12D.

En los registros obtenidos con rampas de voltaje (-100 mV a +100 mV), se observó que tanto la incubación con S1RA como con BD1063 produce inhibición de la corriente a potenciales negativos y positivos cuando estas rampas se aplican en simultáneo con AITC (50 μM). Así, los valores de densidad de corriente obtenidos a -60 mV para el grupo S1RA fue de -10.05 ± 3.4 pA/pF ($n = 9$) mientras que, para BD1063 fue de -24.07 ± 4.3 pA/pF ($n = 9$), siendo estos cambios estadísticamente significativos ($p = 0.02$, prueba t-Student no pareada). Para potenciales positivos, +60 mV, el promedio de la densidad de corriente en las células incubadas con S1RA fue de 26.06 ± 5 pA/pF ($n = 9$), mientras que con el BD1063 este valor fue de 51.92 ± 7.4 pA/pF ($n = 9$) ($p = 0.01$, prueba t-Student no pareada). La incubación con S1RA causó el doble de inhibición que con BD1063 tanto a potenciales negativos como positivos (Fig. 4.12E). La densidad de corriente en la situación control a -60 mV fue de -51.66 ± 11 pA/pF ($n = 10$) y a potenciales positivos, +60 mV, la densidad de corriente del grupo control fue de 99.84 ± 18.5 pA/pF ($n = 10$). El tratamiento con S1RA o BD1063 no producen cambios en la dependencia del voltaje, en la figura 4.12E se muestran las curvas I-V promedio en cada condición.

En resumen, los resultados de este bloque de experimentos indican que la actividad de TRPA1 se inhibe con distintos antagonistas de la chaperona $\sigma 1$, obteniéndose una mayor inhibición con S1RA que con BD1063. La amplitud de la corriente, evocada por AITC, con S1RA es la mitad de la corriente y 3 veces más lenta que la obtenida con BD1063.

4.2.7 Efecto del S1RA en la respuesta a AITC en células en las que la chaperona $\sigma 1$ se encuentra silenciada

Este bloque experimental tuvo como objetivo investigar si la presencia de la chaperona $\sigma 1$ es necesaria para la modulación negativa del canal TRPA1, que hemos descrito anteriormente, por parte del antagonista S1RA. Para ello, se realizaron experimentos de imagen de calcio *in vitro* en los cuales el plásmido hTRPA1-tGFP fue transfectado de manera transitoria en una línea celular HEK293 en la que previamente se ha silenciado $\sigma 1$ (ver apartado 3.3.3 de materiales y métodos) y que llamaremos HEK293- $\sigma 1$ KO. Como control se utilizó la línea HEK293 silvestre, que llamaremos HEK293-WT. En ambos casos se estudiaron los cambios en la concentración de calcio intracelular (F340/F380) en respuesta a AITC (50 μ M) tras 4 horas de incubación con S1RA (100 μ M).

En las células HEK293- $\sigma 1$ KO, la incubación con el antagonista S1RA no produjo cambios significativos en la amplitud de la respuesta a AITC respecto a la situación control, los valores promedio de F340/F380 fueron 1.04 ± 0.03 vs 1.11 ± 0.02 respectivamente ($p = 0.06$, prueba t-Student no pareada). Así mismo, el porcentaje de células que respondieron a este estímulo no presentó cambios significativos tras la incubación con S1RA: 93 % (261/279) S1RA vs 93 % control (218/234), ($p = 0.86$ n.s., prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.13A y 4.13B barras claras). Por el contrario, en las células HEK293-WT, en las cuales la chaperona se expresa de forma nativa, la incubación con S1RA 100 μ M, produjo una disminución estadísticamente significativa en la amplitud de la respuesta a AITC respecto a la situación control, 0.47 ± 0.03 vs 0.72 ± 0.03 respectivamente ($p < 0.0001$, prueba t-Student no pareada) tal como se ha mostrado en los apartados anteriores (Fig. 4.13A). En este grupo de experimentos, la incubación con S1RA no produjo cambios significativos en el número de células que respondieron a AITC

respecto a la condición control, 84 % (82/98) vs 86 % (157/182) respectivamente ($p = 0.6$ n.s., prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.13B).

También se realizaron registros electrofisiológicos en las mismas condiciones de incubación y en ambas líneas celulares con el objetivo de estudiar las corrientes de membrana dependientes de TRPA1. Los resultados obtenidos siguen la misma tendencia: en la línea silenciada, HEK293- σ 1KO, no se observan cambios significativos en la respuesta a AITC durante la aplicación de rampas de voltaje (de -100 a +100 mV) cuando las células se incubaron durante 4 horas con S1RA 100 μ M, en comparación con las células control. Los valores promedio de la densidad de corriente a +60 mV resultaron de 70.7 ± 11.6 pA/pF ($n = 6$) vs 66.9 ± 1.0 pA/pF ($n = 10$) en los grupos control e incubadas con S1RA 100 μ M respectivamente, ($p = 0.81$, n.s. prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.13C). Sin embargo, en las células HEK293-WT, se observó, como esperábamos, un efecto inhibitorio significativo en la corriente de TRPA1 a +60 mV, siendo el valor de la corriente en situación control 62.2 ± 12.3 pA/pF ($n = 5$) vs 26.9 ± 9.1 pA/pF ($n = 6$) incubadas con S1RA 100 μ M ($p = 0.04$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.13C). Curvas I-V promedio en cada condición experimental se observan en el panel de la izquierda de la figura 4.13C.

En resumen, estos resultados sugieren que la chaperona σ 1 es necesaria para que S1RA inhiba la actividad del canal TRPA1, lo cual apoya una modulación de la chaperona σ 1 sobre TRPA1.

Adicionalmente, realizamos una co-transfección del canal hTRPA1-tGFP y la chaperona h σ 1-mCherry en la línea silenciada HEK293- σ 1KO, con la intención de recuperar el efecto inhibitorio del S1RA sobre el canal TRPA1 al introducir a σ 1 en las células carentes de ésta. Para ello, se realizaron experimentos de medida de calcio intracelular, incubando las células con S1RA y su correspondiente control.

Los resultados obtenidos mostraron que cuando σ 1 está presente se recuperaba el efecto inhibitorio de S1RA sobre TRPA1. Así, en estos experimentos, cuando hTRPA1-tGFP se co-transfectó con h σ 1-mCherry, la amplitud de la respuesta a AITC en situación control vs S1RA 100 μ M fue en promedio de 0.99 ± 0.04 vs 0.67 ± 0.04 respectivamente.

Este cambio de amplitud representa una inhibición del 32 % siendo estadísticamente significativa ($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.14A).

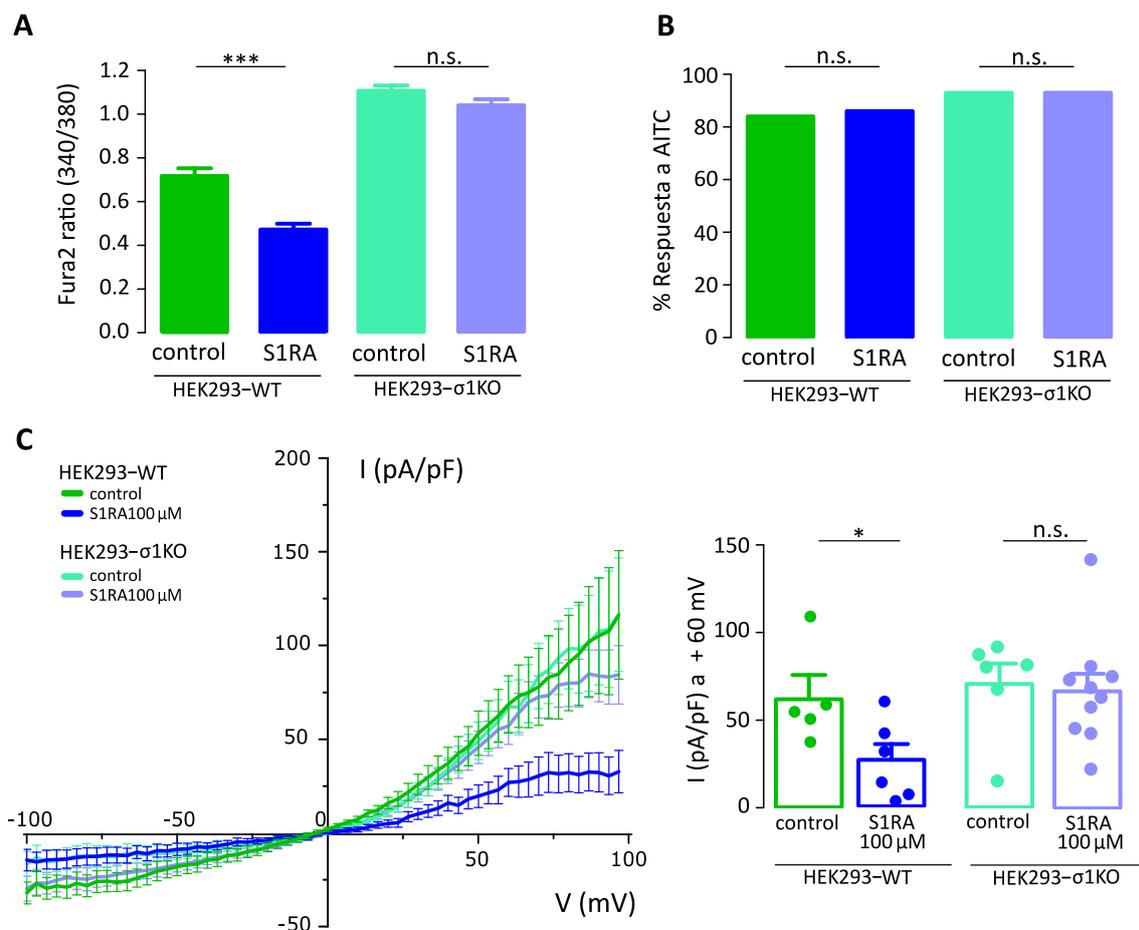


Figura 4.13. S1RA 100 μM no modifica la respuesta a AITC en la celular HEK 293-σ1KO. **A)** Imagen de calcio in vitro: Comparación de la amplitud de la respuesta a AITC 50 μM en línea HEK293-WT y HEK 293-σ1KO (barras claras) transfectadas con hTRPA1-tGFP. Situación control (verde) e incubadas con S1RA 100 μM 4hs (azul) ($p < 0.001^{***}$ y $p > 0.05$ n.s., prueba t-Student no pareada). **B)** Imagen de calcio in vitro: Porcentaje de células que responden a AITC 50 μM en situación control situación control e incubadas con S1RA 100 μM 4hs en HEK293-WT y en HEK293-σ1KO ($p > 0.05$ n.s., prueba exacta de Fisher). **C)** Relación corriente-voltaje en la configuración de célula entera (panel de la izquierda) en presencia de AITC 50 μM cuando se aplican rampas de voltaje de -100 mV A + 100 mV en las líneas celulares HEK293-WT y HEK293-σ1KO en situación control e incubadas con S1RA 100 μM 4hs. Densidad de corriente a + 60 mV trs la incubación con S1RA 100 μM en células HEK293-WT ($p \leq 0.05^*$, prueba t-Student) y en células HEK293-σ1KO ($p > 0.05$ n.s., prueba t-Student).

Por el contrario, cuando se expresa sólo el canal hTRPA1-tGFP en la línea HEK293-σ1KO, no se produjeron cambios significativos en la amplitud de la respuesta, 1.07 ± 0.02 vs 1.03 ± 0.02 , control y S1RA 100 μM respectivamente ($p = 0.17$ n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.14A), como hemos demostrado previamente. En ninguna de las condiciones experimentales el porcentaje de células que responden se ha visto modificado significativamente. En la línea HEK293-σ1KO expresando hTRPA1-tGFP y

hσ1-mCherry: 99 % (118/119) control vs 98 % (144/147) S1RA. En la línea HEK293-σ1KO expresando solo hTRPA1-tGFP: 96 % (312/325) control vs 91 % (276/303) S1RA (Fig. 4.14B).

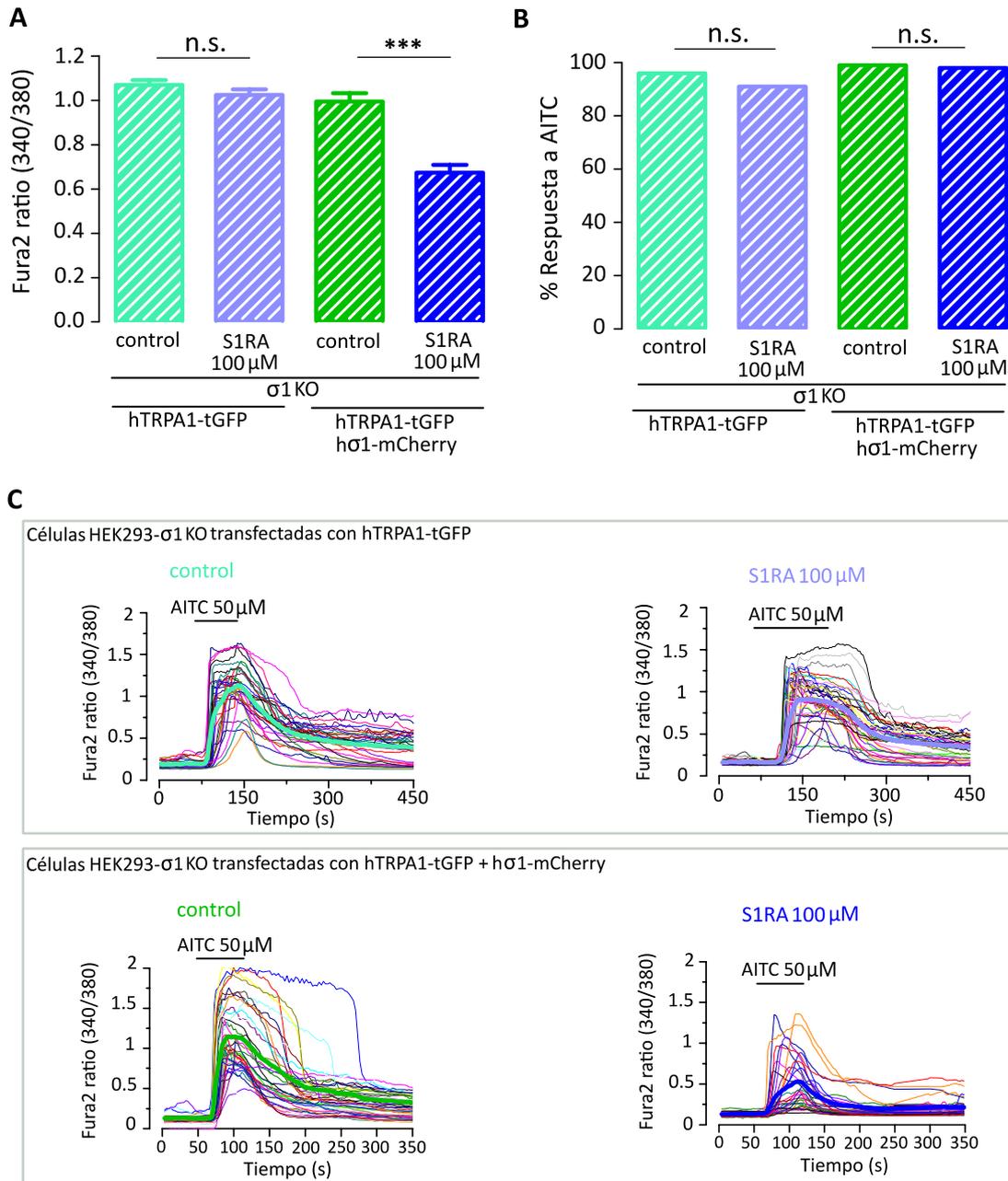


Figura 4.14. S1RA inhibe la respuesta a AITC solo en presencia de σ1R: Efecto de la incubación con S1RA en la respuesta a AITC. Línea celular HEK293-σ1KO. A) cambios en la amplitud de la respuesta tras la incubación con S1RA 100 μM, cuando se expresa hTRPA1-tGFP ($p > 0.05$ n.s., prueba t-Student no pareada) o hTRPA1-tGFP + hσ1-mCherry ($p < 0.001$ ***, prueba t-Student no pareada). **B)** Porcentaje de respuesta a AITC 50 μM cuando se expresa hTRPA1-tGFP o hTRPA1-tGFP + hσ1-mCherry ($p > 0.05$ n.s., prueba exacta de Fisher). **C)** Trazos de calcio en respuesta a AITC 50 μM en cada una de las condiciones experimentales. Panel superior: células HEK293-σ1KO que expresan hTRPA1-tGFP (situación control e incubadas con S1RA

100 μ M). Panel inferior: células HEK293- σ 1KO que expresan hTRPA1-tGFP + h σ 1-mCherry (situación control e incubadas con S1RA 100 μ M).

En la figura 4.14C panel superior se muestran trazos representativos de células HEK293- σ 1KO, que expresan solo el canal hTRPA1-tGFP. Se puede observar que la incubación con S1RA 100 μ M 4-h no produjo cambios en la amplitud de la respuesta a AITC μ M (gráfico derecha). Sin embargo, cuando las células HEK293- σ 1KO expresan hTRPA1-tGFP y h σ 1-mCherry (panel inferior) se recupera el efecto inhibitorio de S1RA sobre la respuesta a AITC (gráfico derecha). Los trazos más gruesos representan la media en cada condición.

En resumen, estos resultados apoyan la hipótesis que la chaperona σ 1 ejerce una modulación sobre el canal TRPA1 y no su ligando

4.3 Estudio del efecto del S1RA sobre la actividad de TRPA1 en neuronas sensoriales obtenidas de ratones que habían desarrollado neuropatía por tratamiento con oxaliplatino

Teniendo en cuenta los resultados de la modulación de la actividad de TRPA1 por la chaperona σ 1 en un sistema heterólogo, estudiamos si este efecto estaba presente en un sistema de expresión endógena como lo son neuronas de DRG de ratones.

Además, no preguntamos si los cambios conductuales encontrados tras en tratamiento con oxaliplatino y S1RA (*in vitro* e *in vivo*) generaban cambios a nivel celular en la población de neuronas TRPA1 positivas.

4.3.1 Efecto del S1RA *in vitro* sobre las respuestas a AITC en neuronas de DRG de ratones silvestres

Dado que los resultados anteriores nos sugieren que el efecto analgésico del S1RA puede deberse a la modulación de la actividad del canal TRPA1 por parte de la chaperona σ 1, nos propusimos estudiar si esta modulación también ocurre en las neuronas sensoriales que expresan de forma nativa el canal TRPA1. Para ello, se extrajeron los DRG de ratones adultos silvestres (C57BL/6J) y se disociaron las células.

Pasadas 2 horas desde la disociación, se incubaron con S1RA 100 μM durante 4 horas, se cargaron con Fura2-AM y se realizaron medidas de calcio intracelular: se comparó la amplitud y el porcentaje de respuesta a AITC 50 μM entre neuronas tratadas con S1RA y neuronas en situación control (solución extracelular 0.2 % DMSO).

La incubación con S1RA 100 μM -4 h produjo una disminución del 45 % en la amplitud de la respuesta a AITC. Los valores promedio fueron 0.25 ± 0.02 en neuronas tratadas con S1RA 100 μM vs 0.46 ± 0.02 en condición control ($p < 0.0001$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.15). Se observó también una disminución significativa en el porcentaje de neuronas que respondieron al AITC, 47 % (314/672) en solución control vs 32 % (195/616) cuando las neuronas se trataron con S1RA, ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.15).

Se confirmó por tanto que, en las neuronas sensoriales el S1RA 100 μM -4 h, reducía la respuesta a AITC, agonista específico del canal TRPA1, como se había observado en las células hTRPA1-HEK293-tGFP.

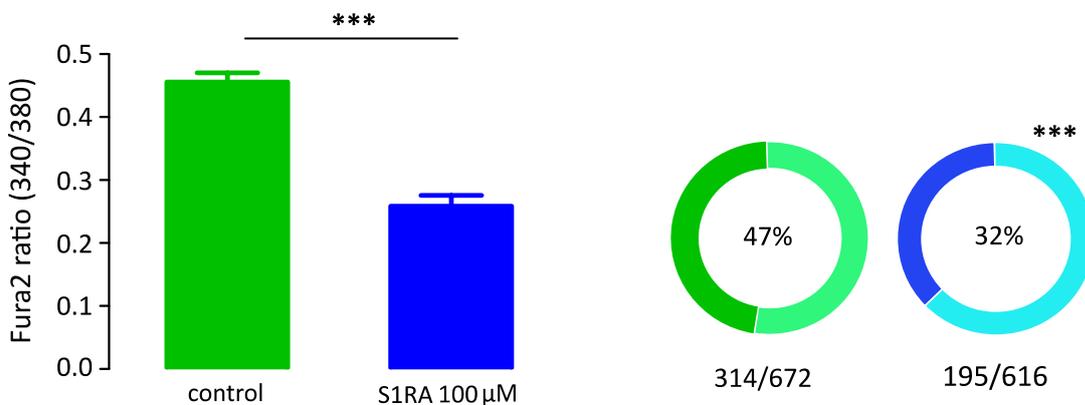


Figura 4.15. La incubación con S1RA 100 μM reduce la respuesta a AITC en neuronas sensoriales de DRG. Amplitud media de la respuesta a AITC 50 μM en situación control (verde) e incubadas con S1RA 100 μM -4h (azul) ($p < 0.001^{**}$, prueba t-Student no pareada). Los anillos verde y azul representan el porcentaje de células que responde a AITC 50 μM en situación control e incubadas con S1RA 100 μM -4h respectivamente ($p < 0.001^{***}$, prueba exacta de Fisher).

4.3.2 Efecto in vitro del S1RA sobre las respuestas a AITC en neuronas de DRG de ratones silvestres tratados con oxaliplatino

A la vista de los resultados previos, en los que observamos que el oxaliplatino provoca una neuropatía mecánica y al frío en ratones (apartado 4.1.1) y que, en el

desarrollo de esta neuropatía está implicado el canal TRPA1, nos propusimos estudiar a nivel celular si el S1RA era capaz de disminuir la actividad de TRPA1 en neuronas sensoriales obtenidas de DRG de ratones tratados con oxaliplatino.

Por ello, el siguiente bloque de experimentos, tuvo por objeto estudiar, mediante imagen de calcio *in vitro*, el efecto del S1RA sobre la actividad TRPA1 en las neuronas sensoriales obtenidas de DRG de ratones tratados con oxaliplatino. Se escogieron ratones que presentaban hipersensibilidad mecánica (bajos umbrales de von Frey) y al frío (respuesta alta al test de acetona y latencias cortas en el test de placa fría 10 °C). El mismo día de la extracción de los ganglios y disociación de las neuronas (D8 – D12) se realizó la prueba de placa fría unilateral (UCP) a 10 °C como parámetro de presencia de la neuropatía (Fig. 4.16A). La incubación, con S1RA 100 µM-4h o 0.2 % DMSO como control, se realizó dos o tres horas posterior a la disociación de las neuronas (ver paradigma en Fig. 4.16B).

En las neuronas de DRG obtenidas de los animales tratados con oxaliplatino no se observó un cambio significativo en el número de células que respondieron a AITC respecto a la situación control (neuronas provenientes de animales tratados con vehículo del oxaliplatino). Además, la incubación con S1RA 100 µM 4 h, tampoco afectó al número de neuronas que respondieron a AITC. Así, los porcentajes de respuesta obtenidos en situación control, oxaliplatino y oxaliplatino + S1RA fueron 57 % (149/258), 55 % (118/214) y 54 % (172/319) respectivamente (Fig. 4.16D).

Sin embargo, la amplitud de la respuesta a AITC 50 µM fue significativamente mayor en las neuronas provenientes de ratones tratados con oxaliplatino respecto a las neuronas de animales tratados con vehículo. Así, los valores promedio de la amplitud de la ratio (F340/F380) fueron de 0.37 ± 0.02 vs 0.55 ± 0.04 en situación control y oxaliplatino respectivamente, representando un incremento del 49 % de la amplitud de la respuesta. Además, el tratamiento de incubación *in vitro* con S1RA 100 µM-4h en neuronas disociadas de ratones tratados con oxaliplatino, produjo un restablecimiento de la amplitud de la respuesta a AITC, hacia los valores obtenidos en condición control. Así, se obtuvo un descenso significativo en la amplitud de la respuesta a AITC, siendo el valor promedio 0.35 ± 0.02 , lo que supone una reducción del 36 % respecto a las

neuronas expuestas a oxaliplatino ($p < 0.001$, análisis de varianza ANOVA a una vía y prueba post hoc de Bonferroni (Fig. 4.16D histograma).

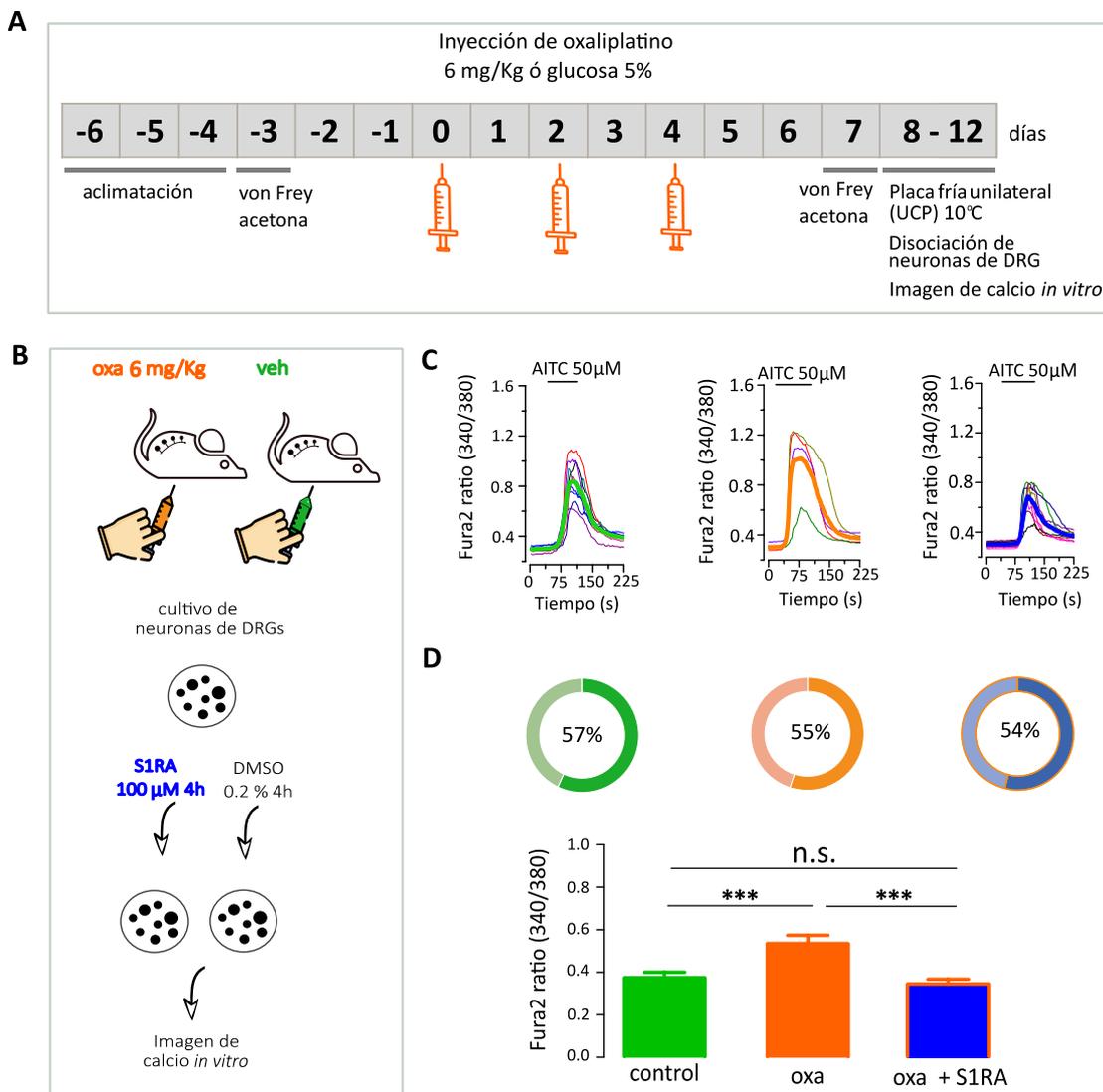


Figura 4.16. Respuesta a AITC en neuronas de DRG en el modelo de neuropatía inducida por oxaliplatino. A) Esquema de la inducción del modelo de dolor. La disociación de neuronas sensoriales de DRG se realizó entre los días D8-D12 posterior a la primera inyección de oxaliplatino. Los experimentos de imagen de calcio *in vitro* se realizaron en agudo (mismo día de disociación de neuronas). **B)** Protocolo de obtención de las neuronas de DRG y su tratamiento con S1RA 100 μM. Los DRG se extrajeron de una pareja de animales (1 veh, 1 oxa), se disociaron sus neuronas y posterior a 3 h se incubaron con S1RA 100 μM o su vehículo (sol. extracelular al 0.2 % de DMSO) durante 4 h. **C)** Trazos del cambio del nivel de calcio intracelular en respuesta a AITC 50 μM en neuronas de animales tratados con vehículo, oxaliplatino y neuronas provenientes de animales tratados con oxaliplatino y S1RA 100 μM-4h *in vitro*. **D)** Comparación del porcentaje de células que responden a AITC 50 μM en neuronas de DRG de animales tratados con vehículo (anillo verde), neuronas de animales tratados con oxaliplatino (anillo naranja) y en neuronas de animales tratados con oxaliplatino que fueron incubadas *in vitro* con S1RA 100 μM-4h (anillo azul). El tratamiento con oxaliplatino induce un incremento en la amplitud de la respuesta a AITC 50 μM (barra naranja) respecto a la condición control (barra verde). La incubación con S1RA 100 μM-4h restablece los

valores de la amplitud de la respuesta en neuronas provenientes de animales tratados con oxaliplatino ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Bonferroni y $p > 0.05$ n.s., prueba exacta de Fisher).

En la figura 4.16C se muestran trazos representativos de los grupos experimentales control, oxaliplatino y oxaliplatino con S1RA 100 μM . Los trazos representan la respuesta de varias neuronas al aplicar AITC. El trazado grueso corresponde al promedio del grupo representado.

Parte de las neuronas tratadas con el vehículo del oxaliplatino fueron incubadas con S1RA 100 μM -4h como control positivo y también se observó una disminución significativa en la amplitud de la respuesta a AITC (datos no mostrados).

4.3.3 Estudio de la respuesta a AITC en las neuronas de DRG obtenidas de ratones tratados con S1RA y oxaliplatino en simultáneo: efecto preventivo del S1RA

Puesto que, en los experimentos conductuales se había observado que el S1RA era capaz de reducir la hipersensibilidad mecánica y al frío producida por el oxaliplatino (apartado 4.1.4), nos propusimos estudiar a nivel celular la actividad del canal TRPA1 en las neuronas obtenidas de los DRG de ratones que habían estado expuestos en simultáneo al oxaliplatino y S1RA, y en los que se había observado el efecto preventivo en las manifestaciones conductuales. Con el objetivo de corroborar el fenotipo de los animales, el mismo día del cultivo, justo previo a la extracción de los DRG (D8-D9-D10), se realizó la prueba de placa fría unilateral a 10 °C (Fig. 4.17A). Posteriormente, se procedió a la disociación de las neuronas las cuales tras 2-3 se incubaron con Fura-2AM para así proceder a estudiar las respuestas a AITC, utilizando la técnica de medidas de cambios de calcio intracelular *in vitro* (Fig. 4.17B).

En la figura 4.17 C se muestran trazos representativos de cambios del nivel calcio intracelular de cada grupo experimental, salino + oxaliplatino y S1RA + oxaliplatino. Los trazos representan la respuesta de varias neuronas, registradas simultáneamente, al aplicar AITC. El trazado grueso corresponde al promedio del grupo representado.

Considerando los días D8, D9 y D10 en conjunto, observamos que la amplitud de la respuesta a AITC (50 μM), en las neuronas del grupo de animales tratados con S1RA + oxaliplatino se vio significativamente disminuida respecto al grupo salino + oxaliplatino,

($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada). El cociente (F340/F380) promedio fue de 0.26 ± 0.01 y 0.32 ± 0.01 respectivamente. Este descenso representa una inhibición de la amplitud de la respuesta a AITC del 19 % inducida por el tratamiento con el S1RA (Fig. 4.17C).

El porcentaje de neuronas que respondió a AITC en el grupo tratado con oxaliplatino + S1RA no cambió significativamente respecto al grupo que recibió salino + oxaliplatino. Los valores fueron 40.5 %, (1208/2990) vs 42 % (787/1857) respectivamente ($p = 0.17$ n.s., prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.17C).

Cuando analizamos el resultado del efecto a los días D8, D9 y D10 por separado, (Fig. 4.17D), observamos que la inhibición por S1RA se mantuvo en cada día individualmente, pero variando la potencia. La amplitud de la respuesta a AITC en el grupo estudiado a D8 fue significativamente menor (29 %) que su grupo control, 0.25 ± 0.01 vs 0.35 ± 0.02 ($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada). En el grupo estudiado a día D9, vimos una pequeña disminución (6 %) por S1RA y esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p = 0.24$ n.s., prueba t-Student no pareada), 0.29 ± 0.01 vs 0.31 ± 0.02 . Finalmente, los resultados obtenidos a D10 (3 días después de finalizado el tratamiento con S1RA), mostraron una disminución en la amplitud de la respuesta (17 %) estadísticamente significativa, pero menor que la obtenida a D8. El valor a D10 obtenido en el grupo S1RA+oxaliplatino fue 0.24 ± 0.02 vs 0.29 ± 0.02 para el grupo salino + oxaliplatino ($p < 0.05$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.17D).

Resumiendo, estos resultados indican que el tratamiento sistémico con S1RA evita en parte el incremento de la actividad del canal TRPA1 provocada por la administración de oxaliplatino. Además, esta inhibición se conserva hasta tres días después de la última administración intraperitoneal de S1RA.

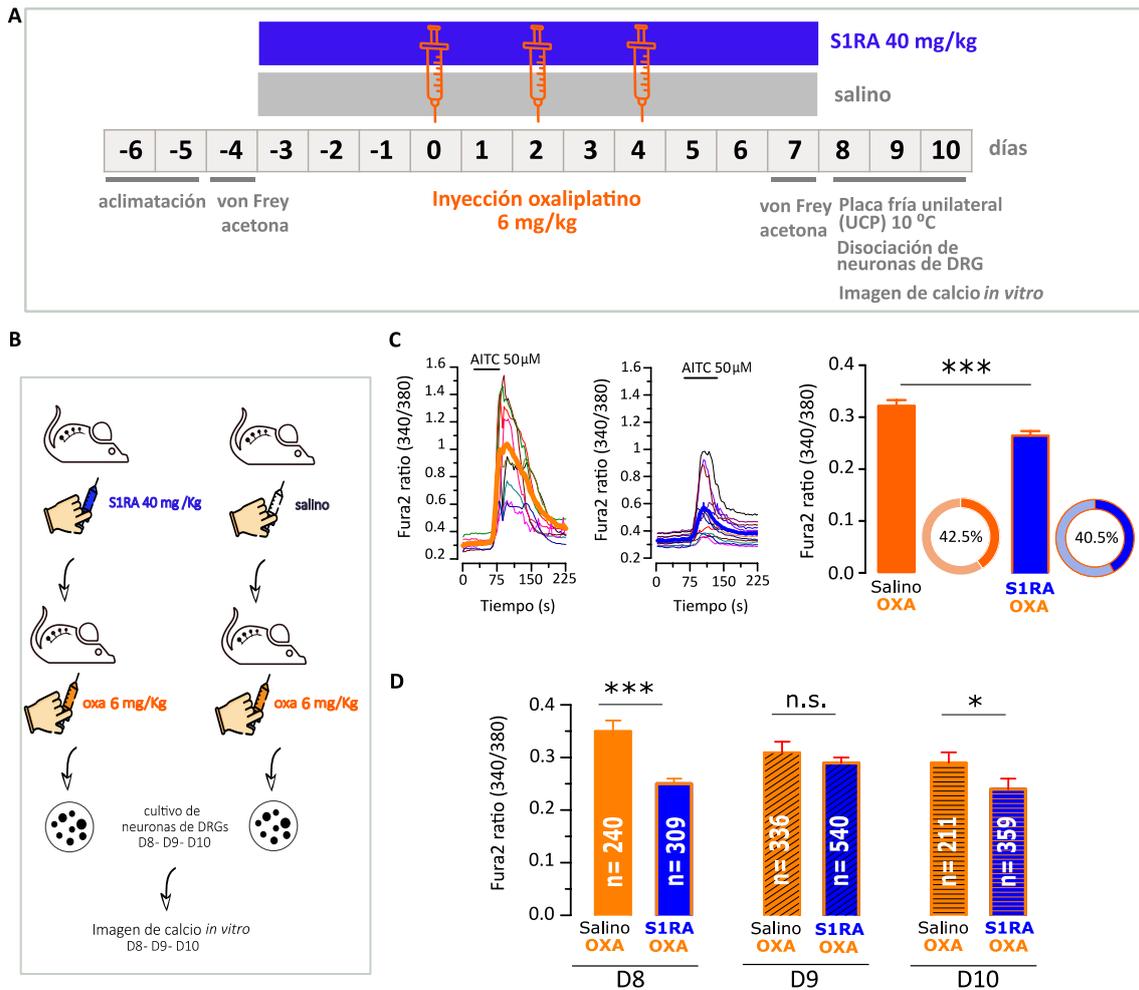


Figura 4.17. Efecto de la administración repetida de S1RA sobre la respuesta a AITC en neuronas de DRG en un modelo de dolor neuropático inducido por oxaliplatino. **A)** Esquema simplificado del protocolo aplicado. La administración de S1RA 40 mg/Kg o salino comienza 3 días antes de administrar la primera dosis de oxaliplatino y hasta 3 días después de la última. Los días 8, 9 y 10 posterior a la primera dosis de oxaliplatino se realiza la disociación de neuronas sensoriales primarias y posteriormente su estudio por imagen de calcio *in vitro*. **B)** Protocolo simplificado de obtención de las neuronas de DRG para la realización de experimentos de imagen de calcio *in vitro*. Los DRG se extraen de una pareja de animales (1 salino + oxa, 1 S1RA + oxa) y posterior a 3 h de la disociación de neuronas se realiza la adquisición de imagen de calcio *in vitro*. **C)** Trazos del cambio de calcio intracelular en respuesta a AITC 50 μM en el grupo salino + oxa (naranja) y S1RA + oxa (azul). El promedio de la amplitud de la respuesta a AITC 50 μM de los días 8, 9 y 10 en conjunto de cada uno de los grupos experimentales se muestra en el histograma ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada). Cambios en el porcentaje de respuesta en cada condición se muestran en los anillos ($p > 0.05$ n.s., prueba exacta de Fisher). **D)** Evaluación del efecto de S1RA 40 mg/Kg por día. En D8, D9 y D10 individualmente Amplitudes de respuesta a AITC analizadas con la prueba t-Student. Porcentajes de respuesta con la prueba exacta de Fisher.

4.3.4 Estudio de la respuesta a frío en las neuronas de DRG obtenidas de ratones silvestres y deficientes para TRPA1 tratados con oxaliplatino

Dado que los ratones tratados con oxaliplatino mostraron hipersensibilidad a los estímulos de frío en los experimentos de comportamiento, se estudió, con imagen de calcio *in vitro*, la respuesta al descenso de temperatura de las neuronas que expresan

TRPA1 obtenidas de ratones tratados con oxaliplatino y, además, el posible efecto de la incubación con S1RA 100 μ M-4h sobre estas respuestas. Para ello, se inyectó oxaliplatino en ratones silvestres y deficientes para TRPA1 como se ha descrito anteriormente y los días 8, 9 y 10 (D8-D10) se realizó la disociación de las neuronas en ratones que mostraron sensibilidad mecánica y al frío a D7 con su correspondiente control (ratón tratado con glucosa 5 %). Los resultados que se muestran a continuación provienen de 3 ratones en total para cada condición (oxaliplatino y vehículo).

Para el estudio de las respuestas a frío in vitro se aplicó una rampa de temperatura desde 34 ± 1 °C a 10 ± 2 °C en 10 -15 segundos (~ 2 - 2.5 °C/s) (ver apartado 3.4.3.3 de materiales y métodos para más detalle).

El tratamiento con oxaliplatino de los ratones silvestres indujo un incremento significativo en el porcentaje de las neuronas que responden a frío, el cual cambió de 14 % (69/481) a 20 % (88/435) ($p = 0.02$, prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.18A). En cuanto al umbral de temperatura de respuesta al estímulo de frío, las neuronas individuales mostraron umbrales muy diversos, abarcado casi completamente el rango de temperaturas explorado. Al calcular el valor promedio, encontramos que, contrario a lo que esperábamos, en el grupo de neuronas tratadas con oxaliplatino el umbral de respuesta promedio fue significativamente menor respecto al umbral de temperatura promedio en el grupo vehículo, 14 ± 0.70 °C ($n = 88$) y 19 ± 0.84 °C ($n = 69$) ($p < 0.001$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.18B).

Sin embargo, la amplitud de la respuesta al estímulo de frío no se vio modificada. Así, el promedio de los valores de la razón (F340/F380) fue de 0.41 ± 0.06 ($n = 69$) en vehículo y 0.47 ± 0.07 ($n = 88$) en oxaliplatino (Fig. 4.18C).

En la figura 4.18 D se representan trazos del cambio de calcio intracelular cuando neuronas de DRG son estimuladas con una rampa de frío. Estas respuestas presentan características morfológicas y cinéticas diferentes. En la figura 4.18 D se muestra una población heterogénea en cuanto al umbral de respuesta al responden. Los trazos corresponden a neuronas provenientes de un ratón tratado con vehículo. Sin embargo, neuronas con comportamiento similar fueron estudiadas en la condición de oxaliplatino.

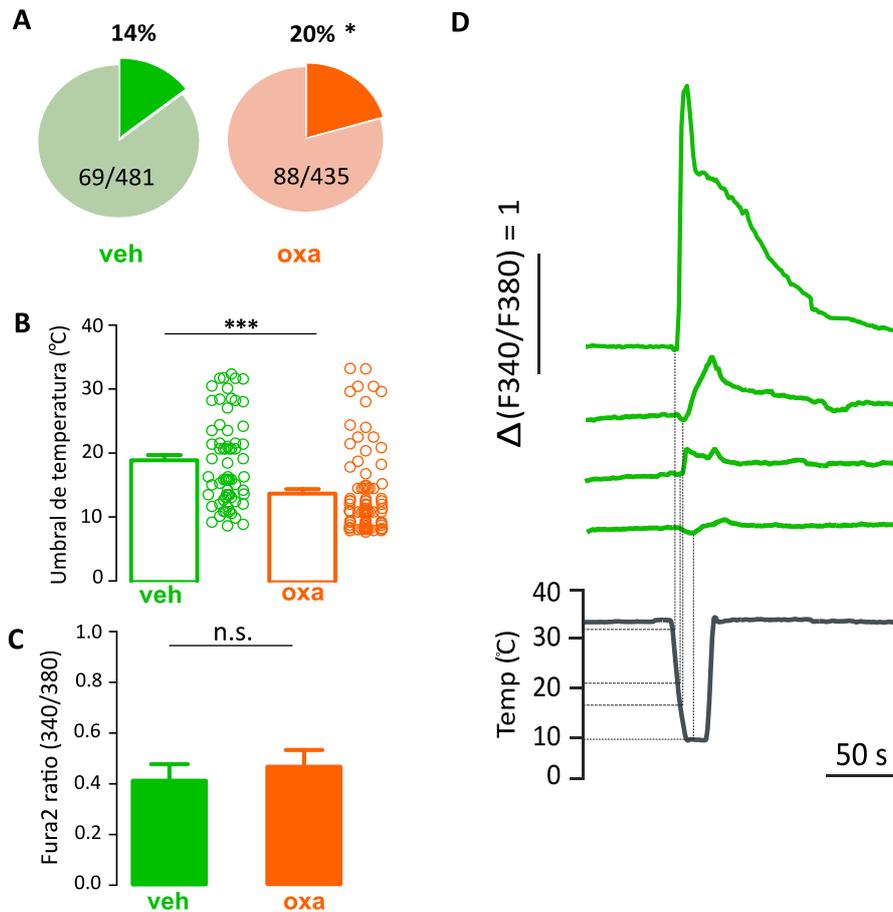


Figura 4.18. El tratamiento con oxaliplatino modifica la respuesta a frío en cultivos de neuronas de DRG de ratones silvestres. **A)** El grupo de neuronas de animales previamente tratados con oxaliplatino presentaron un incremento significativo en el porcentaje de respuestas a frío ($p = 0.02^*$, prueba exacta de Fisher). **B)** El promedio del umbral de temperatura es significativamente menor en el grupo de neuronas tratadas con oxaliplatino ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada). **C)** La amplitud de la respuesta al estímulo de frío, no se vio modificada por el tratamiento con oxaliplatino ($p > 0.05$ n.s., prueba t-Student no pareada). **D)** Trazos del cambio de (F340/F380) cuando se aplica un estímulo de frío en neuronas de DRG. Se observa una población heterogénea que responde con diferentes umbrales de temperatura. El ejemplo proviene de neuronas de DRG en situación control (veh).

En el protocolo de estimulación utilizado para este bloque experimental, se aplicó un estímulo de AITC ($50 \mu\text{M}$), posterior al estímulo de frío, con el fin de clasificar las neuronas por la expresión del canal TRPA1. Esto nos permitió distinguir las respuestas a frío en dos subpoblaciones de neuronas, las AITC+ y las AITC-.

En ratones silvestres, el porcentaje de neuronas que respondieron a frío y a AITC (frío+ AITC+) respecto del total de neuronas estudiadas no cambió significativamente

por el tratamiento con oxaliplatino. Los porcentajes fueron del 5 % (23/481) en el grupo vehículo y 6.5 % (28/435) en el grupo oxaliplatino. Sin embargo, el porcentaje de neuronas que respondieron a frío, pero no a AITC (frío+ AITC-) aumentó significativamente de 9.5 % (46/481) a 14 % (60/435) ($p = 0.049$, prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.19A).

El tratamiento con oxaliplatino indujo un descenso en el promedio del umbral de temperatura al que respondieron las neuronas, independientemente si éstas respondieron o no a AITC. Así, el promedio del umbral de temperatura para las neuronas de frío AITC+ fue de 15.6 ± 1.1 °C (23/481) vehículo vs 11.2 ± 0.5 °C (28/435) oxaliplatino ($p = 0.0003$, prueba t-Student no pareada). En el grupo de las neuronas de frío AITC- el promedio del umbral de temperatura fue de 20.5 ± 1.0 °C (46/481) en el grupo vehículo vs 15.0 ± 1.0 °C (60/435) en el grupo oxaliplatino ($p = 0.0002$, prueba t-Student no pareada) (Fig.4.19B).

La amplitud de la respuesta al estímulo de frío se vio incrementada solo en las neuronas AITC+ tras al tratamiento con oxaliplatino. El promedio del valor de la amplitud de la respuesta a frío fue de 0.19 ± 0.04 ($n = 23$) en el grupo vehículo y 0.38 ± 0.09 ($n = 28$) aunque este incremento no resultó estadísticamente significativo ($p = 0.08$ n.s., prueba t-Student no pareada). El valor de la amplitud de la respuesta a frío en las neuronas AITC- se mantuvo en valores similares luego del tratamiento con oxaliplatino, 0.51 ± 0.09 ($n = 46$) en el grupo vehículo vs 0.48 ± 0.08 ($n = 60$) en el grupo oxaliplatino ($p = 0.8$ n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig.4.19C).

En la figura 4.19D se muestran trazos del cambio de calcio intracelular en respuesta al estímulo de frío en la población de neuronas AITC+ y AITC-. Los umbrales de respuesta de las neuronas AITC+ (panel de la izquierda) normalmente fueron más bajos que los umbrales de respuesta de las neuronas AITC- (panel de la derecha).

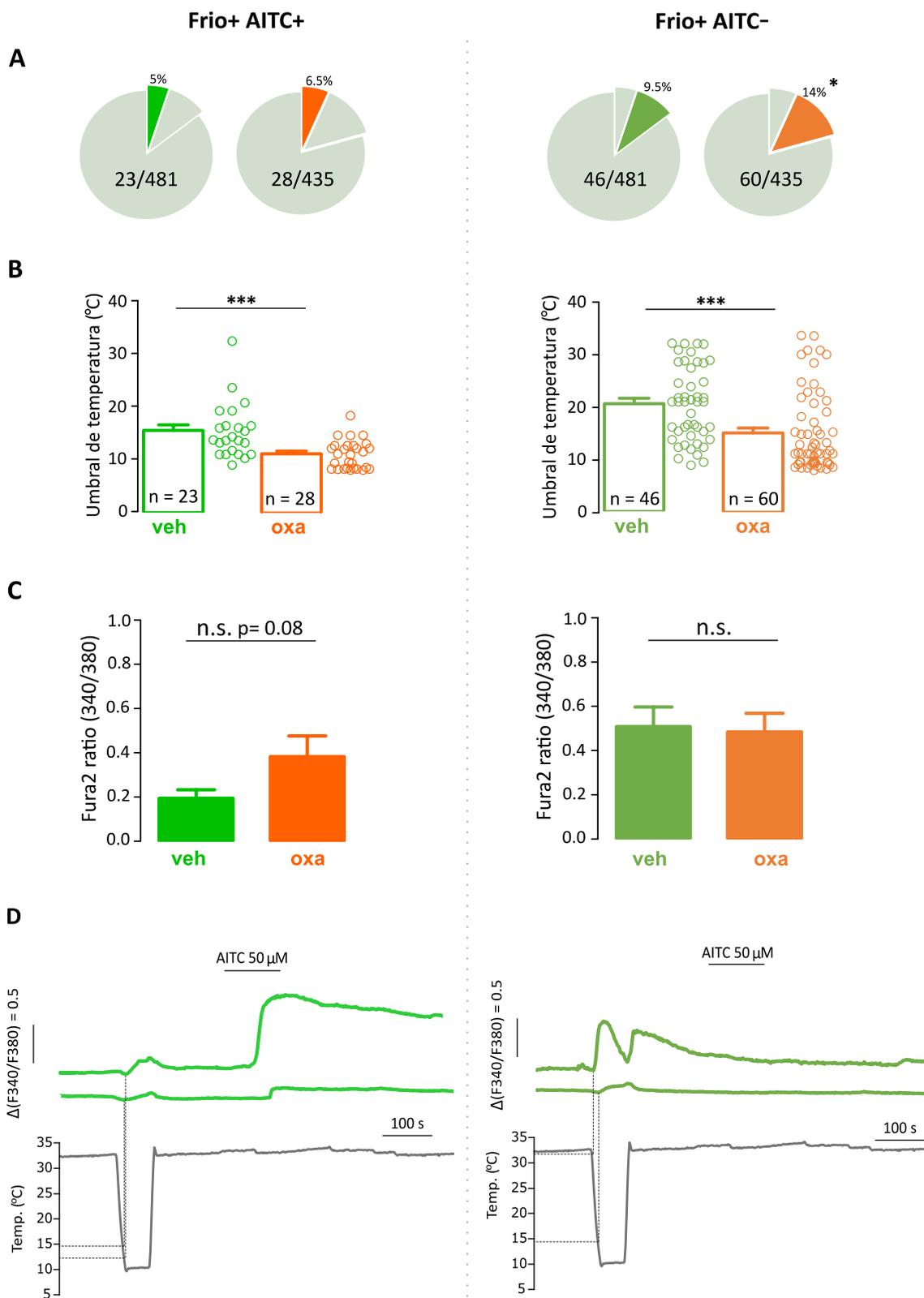


Figura 4.19. El tratamiento con oxaliplatino modifica la respuesta a frío en cultivos de neuronas de DRG, AITC+ y AITC- de ratones silvestres. **A)** El porcentaje de neuronas frío+ AITC+ no se afecta por el tratamiento de oxaliplatino. El porcentaje de neuronas frío+ AITC- cambia significativamente con la administración de oxaliplatino ($p = 0.049^*$, prueba exacta de Fisher). **B)** El tratamiento con oxaliplatino produce un descenso significativo en el umbral promedio de la respuesta a frío, en células AITC+ y AITC- ($p = 0.0003^{***}$ y $p = 0.0002^{***}$ respectivamente, prueba t-Student no pareada). **C)** Cambios en la

amplitud de la respuesta a frío en las neuronas AITC+ y AITC- ($p > 0.05$ n.s., prueba t-Student no pareada). **D)** Trazos del cambio de calcio intracelular en respuesta a frío en la población AITC+ y AITC-. Los umbrales de respuesta de cada neurona se señalan con una línea punteada.

Siguiendo con el mismo protocolo de estimulación aplicado en el apartado previo (aplicación de una rampa de frío de 34 ± 1 °C a 10 ± 2 °C, estimulación con AITC 50 μ M y un estímulo de KCl 30 mM), se continuó con el estudio *in vitro* de neuronas de DRG de ratones TRPA1^{-/-} previamente tratados con oxaliplatino y su vehículo. Los experimentos fueron realizados con el procedimiento descrito para ratones silvestres los días D8, D9 y D10 (cada día se realizó el cultivo de 1 ratón tratado con oxaliplatino y 1 con vehículo). Los resultados que se muestran a continuación provienen de 3 ratones en total para cada condición.

Cuando realizamos el análisis de datos encontramos que el porcentaje de neuronas que respondieron a frío no cambió significativamente en el grupo oxaliplatino. Los valores fueron de 8 % (28/347) en el grupo vehículo y 12 % (54/459) en el grupo oxaliplatino ($p = 0.09$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.20A). Como cabría esperar, al tratarse de animales TRPA1^{-/-}, apenas se observaron respuestas a AITC 50 μ M: 0.2 % (1/347) en el grupo vehículo y 0.9 % (4/459) en el grupo oxaliplatino. Ninguna de estas neuronas respondió a la aplicación del estímulo de frío.

En cuanto a los umbrales de respuesta al estímulo de frío, el valor promedio en el grupo vehículo fue de 21 ± 2 °C ($n = 28$) y en el grupo oxaliplatino de 16 ± 1 °C ($n = 54$), siendo este descenso estadísticamente significativo ($p = 0.02$, prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.20B). Sin embargo, esta disminución en el umbral promedio de respuesta fue menor al observado en ratones silvestres.

La amplitud de la respuesta a frío no varió significativamente entre el grupo vehículo y oxaliplatino, los valores fueron de 0.40 ± 0.11 ($n = 28$) y 0.48 ± 0.12 ($n = 54$) respectivamente ($p = 0.6$ n.s., prueba t-Student no pareada) (Fig. 4.20C).

En la figura 4.20 se muestran los valores obtenidos en ratones silvestres para facilitar la comparación con los resultados encontrados en los ratones deficientes para TRPA1.

En resumen, estos resultados sugieren que el tratamiento con oxaliplatino induce un incremento en el número de neuronas que responden a frío. Este incremento se debe a un aumento en el número de neuronas de alto umbral, es decir aquellas que

responden a temperaturas bajas nocivas. Además, este patrón se observa tanto en las neuronas AITC+ y AITC- provenientes de ratones silvestres, resultado que fue observado también en las neuronas de frío provenientes de ratones TRPA1^{-/-}. Sin embargo, los efectos encontrados en las neuronas TRPA1^{-/-} producto del tratamiento con oxaliplatino son menos drásticos que los observados en neuronas de ratones silvestres.

En conjunto estos resultados sugieren que el tratamiento con oxaliplatino altera la respuesta a frío y que esta alteración no es dependiente del canal TRPA1.

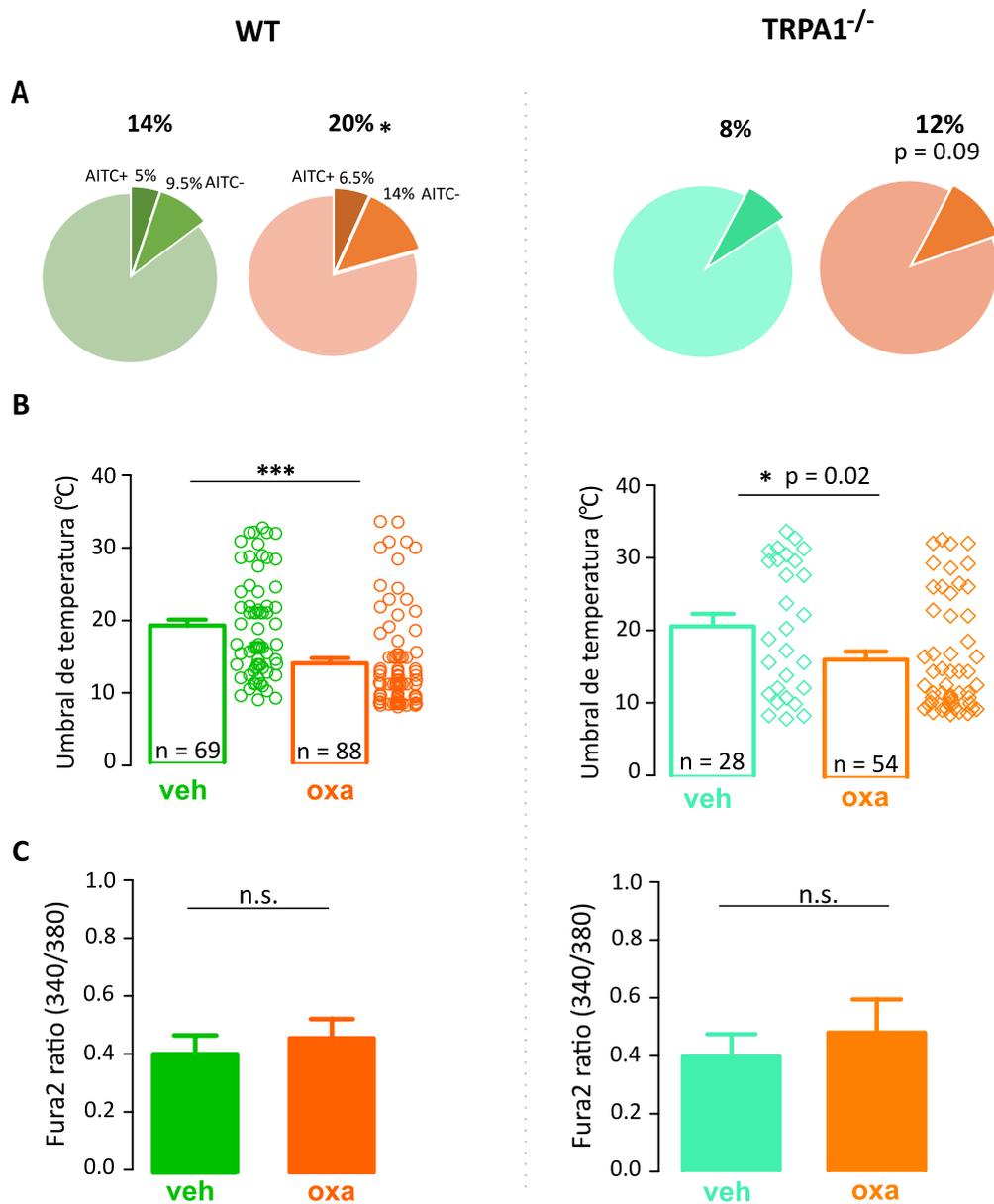


Figura 4.20. El tratamiento con oxaliplatino afecta en menor medida la respuesta a frío en cultivos de neuronas de DRG de ratones TRPA1^{-/-}. **A)** Porcentaje de respuestas a frío en neuronas silvestres (WT izquierda) (p = 0.02*, prueba exacta de Fisher) y en neuronas TRPA1^{-/-} de animales previamente tratados con oxaliplatino (p = 0.09 n.s., prueba exacta de Fisher). **B)** Umbrales de respuesta a frío individuales y

promedio para cada condición (veh y oxa) en neuronas WT ($p < 0.001^{***}$, prueba t-Student no pareada) y neuronas TRPA1^{-/-} ($p = 0.02^*$, prueba t-Student no pareada). **C)** Cambio de la amplitud de la respuesta a frío en neuronas WT y neuronas TRPA1^{-/-} de animales previamente tratados con oxaliplatino ($p > 0.05$ n.s., prueba t-Student no pareada).

4.3.5 Efecto *in vitro* del S1RA sobre las respuestas a frío en neuronas de DRG de ratones silvestres y deficientes para TRPA1 previamente tratados con oxaliplatino

Dado que el tratamiento simultáneo con oxaliplatino y S1RA mostró mejorías cuando los animales fueron evaluados conductualmente en la sensibilidad a estímulos de frío, se estudió el efecto de la incubación con S1RA 100 μ M-4h en respuesta al descenso de temperatura de neuronas obtenidas de ratones tratados con oxaliplatino. De la misma manera que en los bloques experimentales anteriores, los registros se realizaron los días D8, D9 y D10. Las neuronas disociadas de los DRG se incubaron con S1RA 100 μ M-4h o su correspondiente control (solución extracelular con 0.2 % DMSO) y luego se cargaron con Fura-2AM.

En ratones silvestres, se observó que la incubación con S1RA 100 μ M-4h no produce cambios significativos en el porcentaje de células que responden al estímulo de frío cuando se comparan neuronas provenientes de ratones tratados con oxaliplatino (oxa+S1RA) y su grupo control (oxa). Los valores fueron de 14 % (69/481) en el grupo control, 20 % (88/435) en el grupo oxaliplatino (datos mostrados en apartado 4.3.4) y 18 % (72/402) en el grupo oxaliplatino incubado con S1RA. La comparación del efecto del S1RA (grupos oxa y oxa+S1RA) no resultó significativa ($p = 0.43$ n.s., prueba exacta de Fisher) (Fig. 4.21A).

La incubación con S1RA reestablece el valor promedio del umbral de temperatura de neuronas provenientes de ratones tratados con oxaliplatino a valores similares a los obtenidos en el grupo vehículo. Como se mencionó en el apartado anterior, el valor promedio en el grupo vehículo fue de 19 ± 0.8 °C ($n = 69$) y en el grupo oxaliplatino de 14 ± 0.7 °C ($n = 88$), mientras que, en el grupo oxaliplatino+S1RA fue 18 ± 0.8 °C ($n = 72$) ($p < 0.001$, ANOVA a una vía y prueba post hoc de Bonferroni) (Fig. 4.21B).

Los valores de la amplitud de la respuesta al estímulo de frío no se vieron modificados significativamente por la incubación con S1RA 100 μ M-4h (Fig. 4.21C)

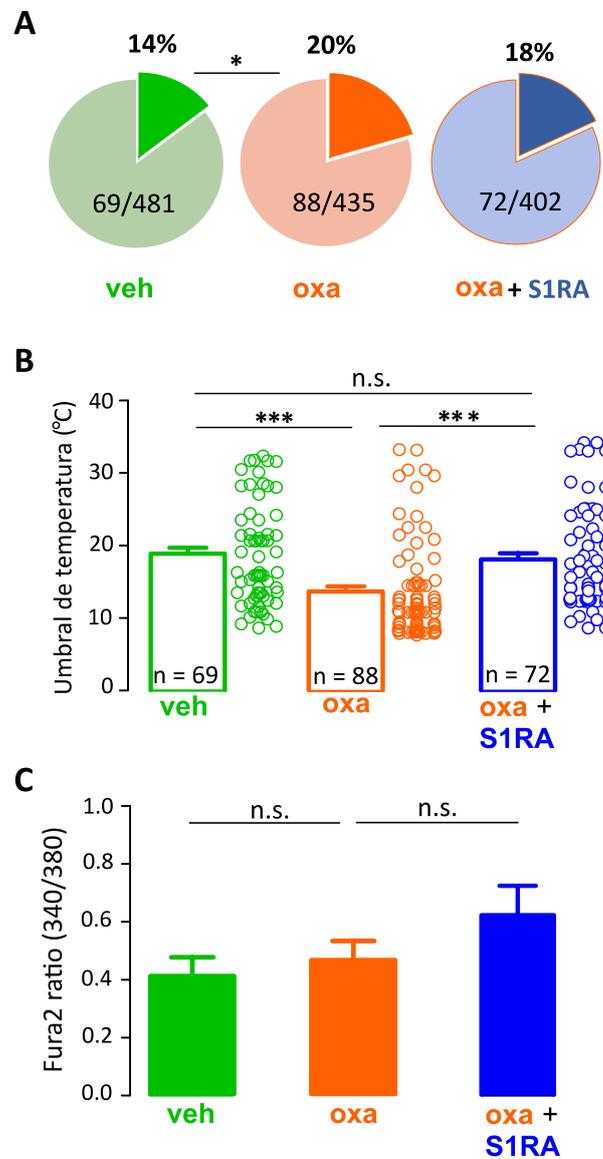


Figura 4.21. La incubación con S1RA 100 μ M-4h restablece el umbral de respuesta a un estímulo de frío hacia valores basales. A) El porcentaje de respuestas a frío en las neuronas previamente incrementado (14 % a 20 %) por el tratamiento con oxaliplatino no se modifica tras la incubación con S1RA 100 μ M-4h **B)** La incubación con S1RA 100 μ M-4h reestablece el valor promedio del umbral de respuesta al estímulo de frío en las neuronas previamente tratadas con oxaliplatino hacia el valor obtenido en situación control ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Bonferroni). **C)** La incubación con S1RA 100 μ M-4h no produjo cambios significativos en la amplitud de la respuesta al estímulo de frío en neuronas previamente tratadas con oxaliplatino ($p > 0.05$ n.s., ANOVA-Bonferroni).

Come se ha mencionado previamente, posterior al estímulo de frío se aplicó AITC para estudiar el efecto del S1RA en la población de frío dependiente de TRPA1.

El porcentaje de respuesta a frío, cuando se divide el total de neuronas del grupo oxaliplatino en la población AITC+ y AITC-, no se vio modificado significativamente por la incubación con S1RA 100 μ M-4h (Fig. 4.22A).

El restablecimiento del umbral promedio a valores basales posterior a la incubación con S1RA 100 μ M también se observó cuando se realizó la subdivisión de la población de neuronas de frío en función de su respuesta a AITC. Así, tanto en el grupo AITC+ como en el grupo AITC- el promedio del umbral de temperatura fue similar a los valores obtenidos en situación control (veh), tras su incubación con S1RA ($p < 0.001$, ANOVA una vía y prueba post hoc de Bonferroni) (Fig.4.22B).

La amplitud de la respuesta a frío, en las neuronas AITC+ y AITC- no se vio modificado significativamente tras la incubación con S1RA (Fig. 4.22C).

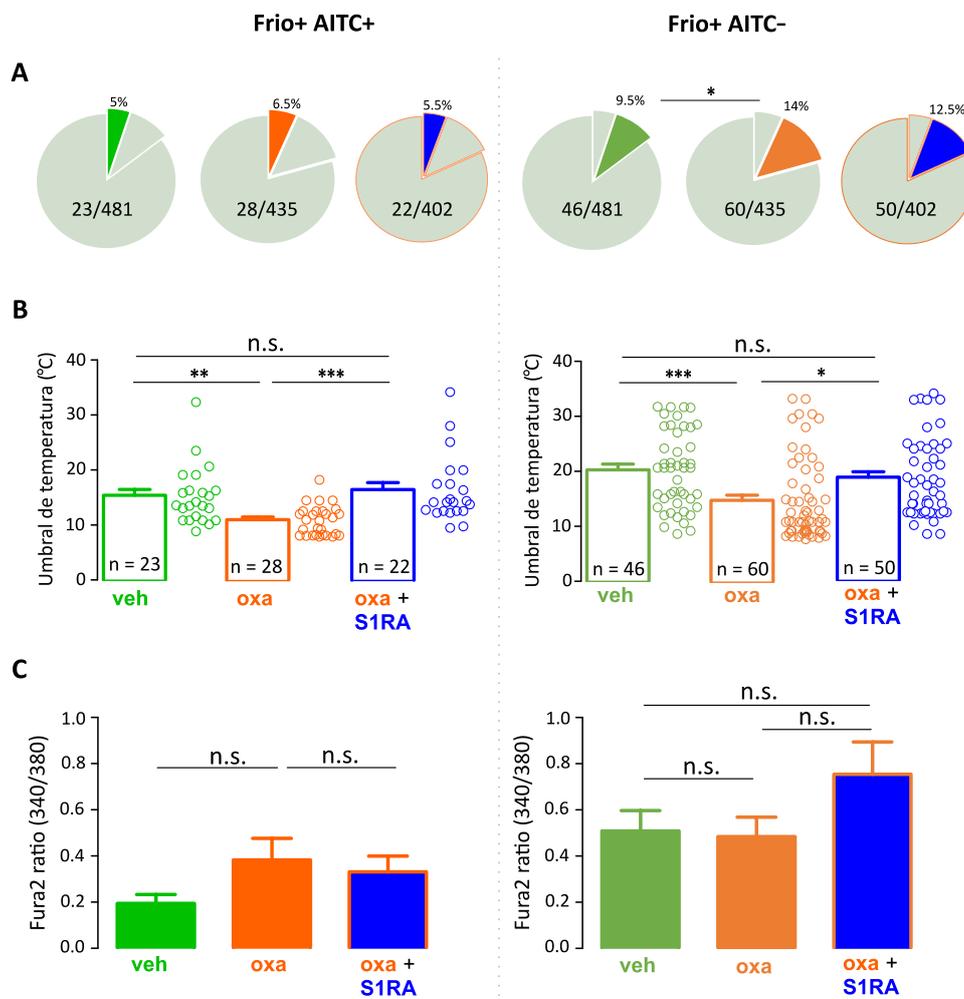


Figura 4.22. La incubación con S1RA 100 μ M-4h restablece el umbral de respuesta a un estímulo de frío en las neuronas de frío AITC+ y AITC- previamente tratadas con oxaliplatino a condiciones basales. A) La incubación con S1RA 100 μ M-4h no produjo cambios significativos en el porcentaje de respuesta a frío

de las neuronas previamente tratadas con oxaliplatino en las neuronas AITC+ ni AITC- ($p > 0.05$ n.s., prueba exacta de Fisher). **B)** La incubación con S1RA reestablece los valores promedio del umbral de temperatura en neuronas de ratones previamente tratados con oxaliplatino, tanto en la población de neuronas AITC+ como AITC- ($p < 0.001^{***}$, ANOVA-Bonferroni). **C)** La incubación con S1RA 100 μM -4h no produjo cambios significativos en la amplitud de respuesta a frío de las neuronas previamente tratadas con oxaliplatino en la población de neuronas AITC+ ni AITC- ($p > 0.05$ n.s., ANOVA-Bonferroni).

A continuación, se estudió el efecto de la incubación con S1RA 100 μM -4h en las respuestas a frío provenientes de ratones TRPA1^{-/-} tratados con oxaliplatino.

El porcentaje de neuronas de frío que originalmente se vio incrementado en el grupo oxaliplatino, (8 % (28/347) en el grupo veh vs 12 % (54/459) en el grupo oxa (Fig. 4.20A)), tras la incubación con S1RA descendió a un 5 % (4/81). Estos cambios no resultaron significativos. Si bien se observa una tendencia similar con las neuronas de ratones silvestres, el tamaño muestral es muy pequeño. (Fig. 4.23A).

Respecto al umbral de temperatura de respuesta al estímulo de frío, las neuronas del grupo oxaliplatino no cambiaron significativamente el promedio tras la incubación con S1RA. Como se mencionó previamente, el valor promedio del umbral de temperatura en el grupo vehículo fue de 21 ± 2 °C ($n = 28$), en el grupo oxaliplatino de 16 ± 1 °C ($n = 54$) (Fig. 4.20B) y en el grupo incubado con S1RA (oxa + S1RA) 21 ± 3 °C ($n = 4$) (Fig. 23B).

De la misma manera, la incubación con S1RA no produjo cambios significativos en la amplitud de la respuesta a frío en el grupo oxaliplatino. El promedio de la amplitud fue de 0.43 ± 0.12 ($n = 28$) en el grupo vehículo, 0.48 ± 0.11 ($n = 54$) en el grupo oxaliplatino (Fig. 4.20C) y 0.28 ± 0.14 ($n = 4$) en el grupo oxaliplatino + S1RA. (Fig. 4.23C).

En resumen, considerando la información proveniente de los ratones silvestres (debido al bajo número de neuronas de TRPA1^{-/-}), los resultados sugieren que S1RA modula la respuesta a frío, reestableciendo los valores hacia condiciones basales. Debido a que este efecto se observó en la población de neuronas AITC+ y AITC-, se sugiere que existe una modulación de S1RA sobre otro tipo de canales iónicos contribuyentes en la respuesta a frío.

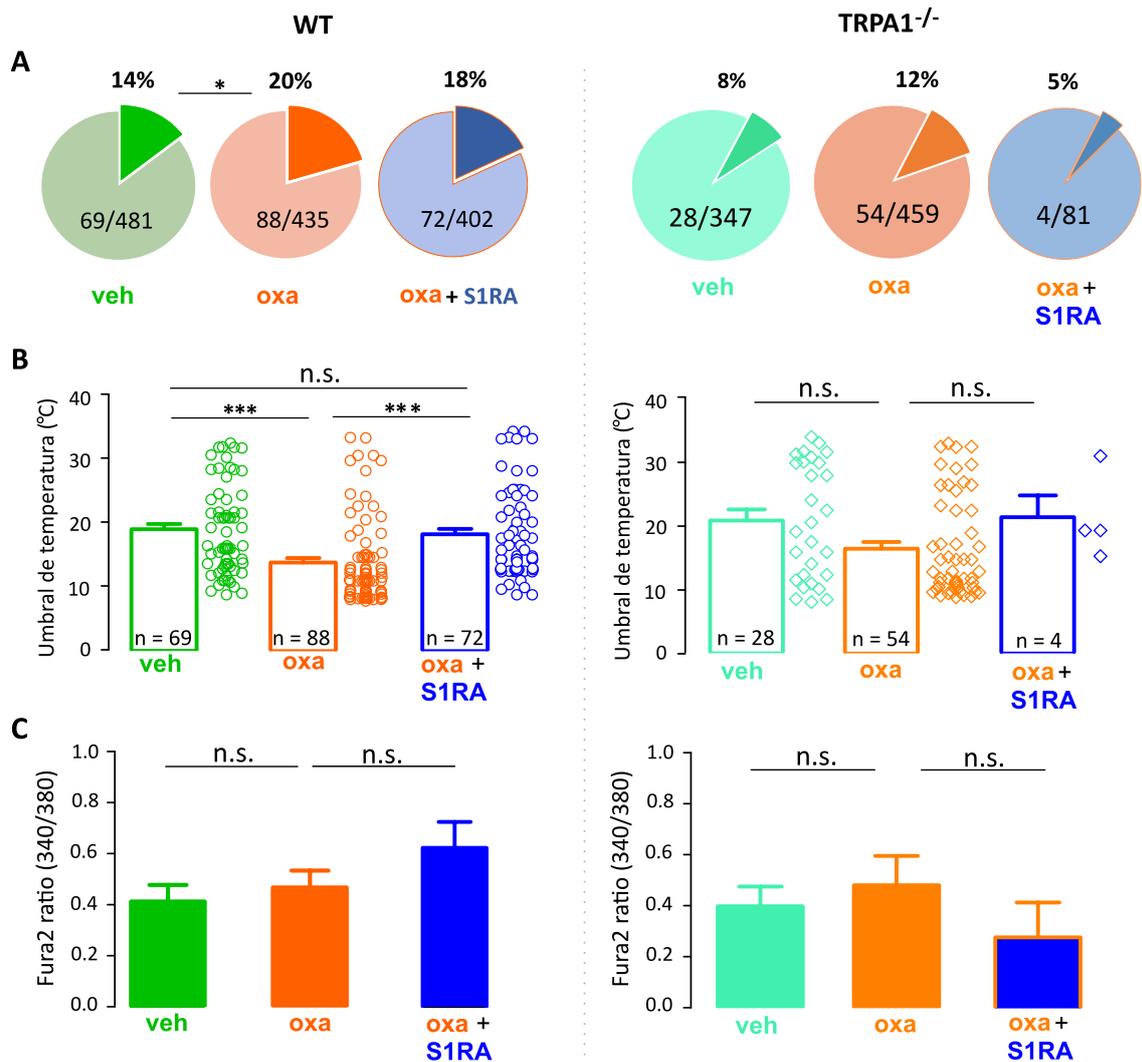


Figura 4.23. La incubación con S1RA 100 μ M-4h restablece el comportamiento de las neuronas de frío de ratones TRPA1^{-/-} a condiciones basales. A) Porcentaje de respuesta al estímulo de frío en neuronas provenientes de ratones tratados con vehículo (verde), oxaliplatino (naranja) y oxaliplatino incubadas con S1RA 100 μ M-4h (azul), WT (izquierda) y TRPA1^{-/-} (derecha) comparaciones entre pares con la prueba exacta de Fisher). **B)** Umbrales de respuesta al estímulo de frío y promedio de la respuesta en las condiciones experimentales mencionadas en A (WT: $p < 0.001^{**}$, TRPA1^{-/-}: $p > 0.05$ n.s., ANOVA-Bonferroni). **C)** Promedio de la amplitud de la respuesta al estímulo de frío en las condiciones experimentales mencionadas en A ($p > 0.05$ n.s., ANOVA-Bonferroni).

4.4 Interacción entre el canal TRPA1 y la chaperona σ 1

Los resultados funcionales que se han mostrado, sugieren una clara modulación del canal TRPA1 por la chaperona σ 1. Esto, nos llevó a comprobar si las dos proteínas están interactuando físicamente. Para ello implementamos la técnica de inmunoprecipitación (IP) utilizando un sistema de sobreexpresión de TRPA1 y σ 1 en células HEK293. Para ello, expresamos por transfección transitoria hTRPA1-tGFP y $m\sigma$ 1-EYFP, en ambos casos proteínas de fusión, en la línea celular HEK293.

La precipitación del complejo se realizó a través de la molécula de EYFP, utilizando las inmunoesferas GFP-trap de la casa Chromotek. Estas inmunoesferas inmunoprecipitan diferentes variantes de GFP entre las que se incluye la proteína EYFP, aunque no es capaz de inmunoprecipitar la variedad turbo GFP (t-GFP) (ver apartado 3.5.1 de materiales y métodos).

Los resultados muestran la presencia de ambas proteínas, hTRPA1-tGFP y σ 1-EYFP en la muestra resultante al proceso de precipitación a través de GFP-trap (Fig. 24A línea 1). Esta figura es un experimento representativo de un total de cuatro realizados en las mismas condiciones. Para detectar hTRPA1-tGFP se utilizó el anticuerpo anti-TRPA1 de la casa Novus a una dilución 1:500 y para detectar σ 1-EYFP se utilizó el anticuerpo anti-EYFP de la casa comercial Thermo Fisher a una dilución 1:2000.

En paralelo, se realizó la inmunoprecipitación control con células que expresan hTRPA1-tGFP y EYFP. Como se puede observar, en ausencia de σ 1 no hay detección de TRPA1 (Fig. 24A línea 2), mientras que la proteína fue detectada en la muestra inicial (input). La IP hTRPA1-tGFP + σ 1-EYFP fue realizada tres veces (Fig. 24A panel izquierdo. Resultado representativo).

Debido a que el método utilizado para precipitar el complejo σ 1-EYFP/hTRPA1-tGFP se realiza a través de la molécula fluorescente fusionada a σ 1 (EYFP), y aunque la casa comercial indica que las inmunoesferas no precipitan la proteína fluorescente tGFP, se realizó un control para confirmar que la señal considerada como TRPA1 no representaba un falso positivo por precipitación a través de la tGFP fusionada a TRPA1. Para ello se transfectaron células con hTRPA1-tGFP y se incubaron siguiendo el protocolo de inmunoprecipitación con las inmuno esferas GFP-trap. La membrana se reveló con el anticuerpo anti-tGFP de la casa comercial Origene y contra anti-TRPA1 de la casa comercial Novus. Los resultados mostrados en el panel de la figura 24B, indican que la proteína TRPA1 no se detectó en la muestra inmunoprecipitada (línea IP) y ésta si fue detectada en la muestra inicial (input) y en la muestra posterior a la precipitación (post). Este experimento se realizó dos veces, con resultados similares, demostrando que la proteína hTRPA1-tGFP no inmunoprecipita con las inmuno esferas anti-EYFP (Fig.24B).

Finalmente, con este bloque experimental se demuestra que TRPA1 y el σ 1R forman un complejo físico.

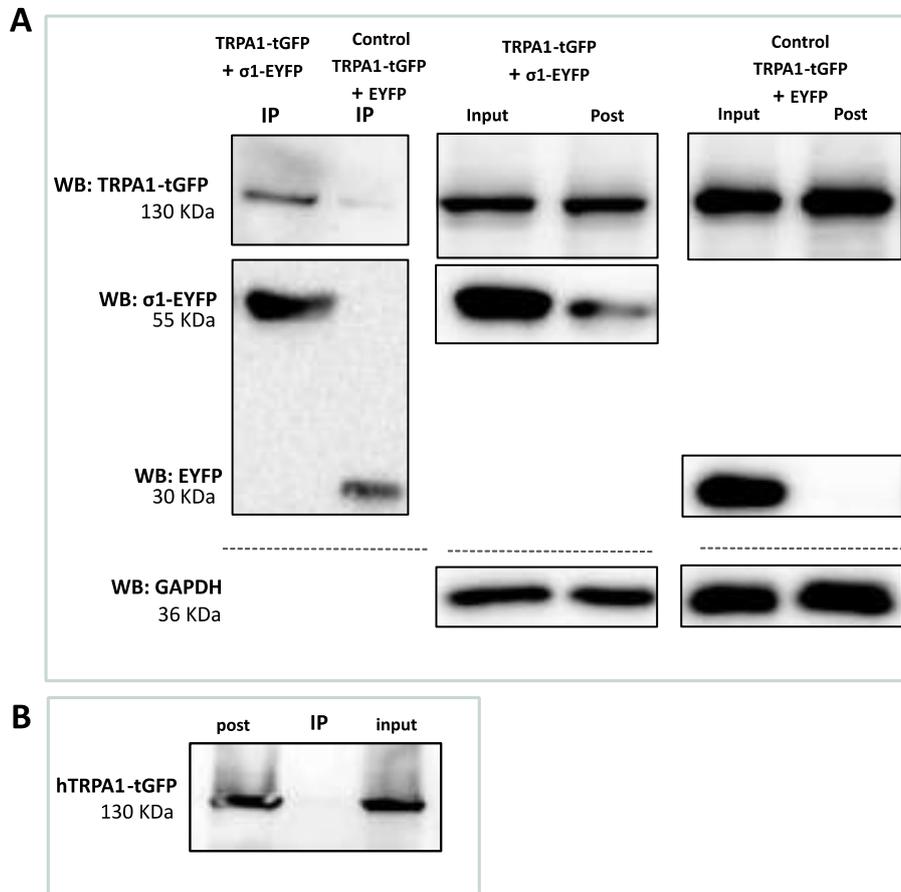


Figura 4.24. Interacción entre TRPA1 y σ 1. **A) Inmunoprecipitación de hTRPA1-tGFP y $m\sigma$ 1R-EYFP.** Co-transfección de $m\sigma$ 1R-EYFP y hTRPA1-tGFP en células HEK293 WT. El extracto celular fue precipitado usando GFP-trap (Chromotek). La detección de proteínas se realizó por western blot. Tras la inmunoprecipitación se detecta hTRPA1-tGFP y $m\sigma$ 1R-EYFP (línea 1). En paralelo se transfeció EYFP y hTRPA1-tGFP (IP control). Tras la inmunoprecipitación se detecta EYFP, pero no hTRPA1-tGFP (línea 2). Las líneas 3-6 representan la muestra antes (input) y después (post) de la inmunoprecipitación en ambas condiciones. En cada una de las condiciones se han utilizado 10-15 μ g de proteína. El input corresponde a 1/10 de la muestra total en cada experimento (n=3). Se utilizó GAPDH como control de carga en todos los grupos. **B) Las inmuno esferas GFP-trap no precipitan hTRPA1-tGFP.** Se realizó la transfección de hTRPA1-tGFP en células HEK293 WT. El extracto celular fue precipitado usando GFP-trap (Chromotek). La detección de proteínas se realizó por western blot. Tras la inmunoprecipitación no se detecta hTRPA1-tGFP utilizando anti TRPA1.

5. DISCUSIÓN

El oxaliplatino es un quimioterapéutico utilizado en el tratamiento de algunos tipos de tumores, especialmente en estadios avanzados del cáncer colorrectal. Durante el tratamiento con este compuesto, un alto porcentaje de pacientes, cerca del 90 %, desarrolla una neuropatía periférica (Yin, Zimmermann et al. 2015), conocida en la literatura como neuropatía periférica inducida por oxaliplatino (NPIO). Esta neuropatía se caracteriza por la afectación orofacial donde los pacientes describen una marcada sensibilidad al frío cuando el aire ingresa por la cavidad bucal y, principalmente, por una afectación de las extremidades superiores e inferiores con una marcada hipersensibilidad mecánica y al frío impidiendo, en algunos casos, continuar con el tratamiento quimioterapéutico, o limitando la dosis del mismo (Argyriou, Cavaletti et al. 2013).

La NIPO afecta principalmente al sistema somatosensorial, por lo que, en los últimos años, se ha comenzado a incluir la frase “neurotoxicidad periférica” debido a la afectación producida por los quimioterapéuticos de las terminales nerviosas, los somas neuronales, gliales, así como en las células satélite (Cavaletti and Marmiroli 2018). Las investigaciones realizadas hasta ahora, fundamentalmente en modelos murinos, muestran un cierto grado de reproducibilidad en cuanto al fenotipo desarrollado tras la administración de oxaliplatino, el cual se asemeja a la sintomatología observada en humanos. Sin embargo, los mecanismos biológicos que subyacen a la sensibilización conductual permanecen sin clarificarse, resultando, indefectiblemente, en una gran cantidad de terapias fallidas.

En este trabajo nos hemos centrado en estudiar la posible implicación del canal iónico TRPA1 en la NIPO y si dicho canal es modulado por la chaperona σ 1 en condiciones patológicas y fisiológicas. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

5.1 El canal TRPA1 contribuye en el desarrollo de la neuropatía periférica por administración de oxaliplatino

En este trabajo se desarrolló un modelo de neuropatía en ratones mediante la administración sistémica de tres inyecciones de oxaliplatino 6 mg/Kg (a los días D0, D2 y D4). En la bibliografía existen diferentes métodos para la inducción del modelo de dolor, así como diferentes dosis y concentraciones utilizadas (Descoeur, Pereira et al. 2011, Deuis, Zimmermann et al. 2013, Gris, Portillo-Salido et al. 2016). Normalmente los modelos en los cuales los síntomas son evaluados pocas horas después de una inyección de oxaliplatino se los considera como modelos de neuropatía aguda. Cuando la evaluación de síntomas se realiza varios días o semanas posteriores a la administración de oxaliplatino suele considerarse como un modelo subagudo o crónico respectivamente (Zhao, Isami et al. 2012, Nakagawa and Kaneko 2017). En nuestro modelo, la evaluación conductual se realizó entre los días 7 y 12 desde la primera inyección con un protocolo similar al publicado por (Gris, Portillo-Salido et al. 2016) en el cual se aplican dosis repetidas de oxaliplatino, y donde la dosis final acumulada resulta similar a la administrada en nuestro modelo, 21 mg/Kg y 18 mg/Kg respectivamente.

Consistente con los síntomas clínicos, la administración de oxaliplatino en ratones produjo el desarrollo de alodinia mecánica, así como alodinia e hiperalgesia al frío en las extremidades traseras, cuando los animales fueron evaluados a partir de 3 días posteriores a la última administración de oxaliplatino (Fig. 4.2 y 4.3). Los síntomas observados fueron similares a los que relatan los pacientes tratados con oxaliplatino (Extra, Marty et al. 1998, Cersosimo 2005, Forstenpointner, Oberlojer et al. 2018).

En el campo de la experimentación animal, la presencia de alodinia al frío se ha estudiado de diversas maneras. Entre ellas, se encuentra la implementación de pruebas de preferencia de temperatura donde se ha visto que los animales tratados con oxaliplatino invierten menos tiempo en zonas con temperaturas frías respecto a los animales no tratados (Descoeur, Pereira et al. 2011). Otra de las pruebas para evaluar alodinia al frío, quizás la más utilizada por su fácil implementación, es la prueba de acetona. Así, los animales tratados con oxaliplatino mostraron un comportamiento aversivo significativamente mayor, cuando la extremidad evaluada entró en contacto

con la acetona, que aquellos considerados controles. En este sentido, nuestros resultados (Fig. 4.2C, 4.5C) son coherentes con los publicados por otros laboratorios (Gris, Portillo-Salido et al. 2016, Chukyo, Chiba et al. 2018).

Curiosamente, cuando realizamos esta prueba en ratones deficientes para el canal iónico TRPA1, no se vieron diferencias significativas tras el tratamiento con oxaliplatino (Fig. 4.3B). Cabe destacar que la comparación de los valores basales obtenidos en la prueba de acetona, entre ratones silvestres y TRPA1^{-/-} no mostraron diferencias significativas, sugiriendo que TRPA1 tendría un papel relevante en un escenario patológico exclusivamente (Fig. 4.1F). Si bien se sabe que en mamíferos el canal TRPA1 es un sensor de temperaturas nocivas, estos resultados sugieren que también podría participar en el mecanismo necesario para el desarrollo de la alodinia al frío tras el tratamiento con oxaliplatino, ya sea de manera directa o indirecta.

Nassini y colaboradores, en el año 2011, demostraron que en ratas, la alodinia al frío inducida por oxaliplatino se veía revertida tras la aplicación intragástrica del antagonista del canal TRPA1, HC-030031 (Nassini, Gees et al. 2011). Sin embargo, en el trabajo de Descoeur del mismo año, la administración intraperitoneal de HC-030031 en ratones no indujo cambios en la sensibilidad al frío.

Por otro lado, Nativi y colaboradores en el año 2013, describieron un nuevo antagonista de TRPA1 con propiedades antioxidantes que denominaron ADM_09 y demostraron que administrado oralmente era capaz de revertir de forma aguda la alodinia al frío en ratas tratadas con oxaliplatino (Nativi, Gualdani et al. 2013).

Clásicamente se considera al canal TRPM8 como el sensor por excelencia de temperaturas de frío inocuas, por lo que ha sido muy relacionado en la respuesta exagerada por aplicación de acetona observada en los animales tratados con oxaliplatino. Así, en 2009 Gauchan y colaboradores demostraron mediante la administración de capsacepina, un inhibidor no selectivo de TRPM8 (Malkia, Pertusa et al. 2009), que ésta producía una inhibición del comportamiento nocifensivo producido por la aplicación de acetona en ratones previamente tratados con oxaliplatino. Además, encontraron un incremento significativo en la expresión de ARNm de TRPM8 tres días posteriores a una inyección de oxaliplatino (6 mg/Kg) (Gauchan, Andoh et al. 2009). Sin embargo, Knowlton en el año 2011 demostró que el uso de un antagonista específico

para el canal TRPM8, como lo es el PBMC (Ongun, Sarkisian et al. 2018), no producía cambios significativos en la prueba de acetona en ratones tratados con oxaliplatino (Knowlton, Daniels et al. 2011).

Adicionalmente, Fernández Peña en el año 2015 demostró que tanto la ausencia del canal iónico TRPM8, así como la aplicación de un antagonista del mismo, BCTC, no afectaron el desarrollo de la alodinia al frío en ratones tratados con oxaliplatino. Sin embargo, la inhibición del canal TRPA1 por administración del antagonista AP18 resultó suficiente para revertir transitoriamente las respuestas exacerbadas al estímulo de frío inocuo (prueba de acetona) (Fernández-Peña 2015).

En los resultados mostrados en la figura 4.3C puede observarse como tras el tratamiento con oxaliplatino, los ratones silvestres mostraron una marcada hiperalgesia al frío en comparación con los ratones TRPA1^{-/-}. Así, cuando una de las patas traseras fue colocada en una placa fría a 10 °C, los animales silvestres que previamente habían recibido oxaliplatino mostraron latencias de respuesta significativamente menores que los ratones inyectados con vehículo, mostrando mayor sensibilidad al estímulo. Sin embargo, los ratones TRPA1^{-/-} no se vieron afectados por el tratamiento con oxaliplatino, mostrando latencias similares a las obtenidas en los ratones TRPA1^{-/-} tratados con el vehículo. Estos resultados van en concordancia con los publicados por Zhao y colaboradores en el año 2012, donde mostraron la presencia de hiperalgesia al frío cuando los ratones tratados con oxaliplatino fueron colocados en una placa fría a 5 °C, su reversión por la inyección de HC-030031, y la ausencia de dicha hiperalgesia en los animales deficientes para el canal TRPA1 (Zhao, Isami et al. 2012) Por otro lado, del Camino y colaboradores en el año 2010 demostraron con registros de patch-clamp *in vitro* que la estimulación de TRPA1 de rata con frío (inocuo y nocivo), expresado en células HEK293 así como en neuronas de DRG, producía pequeños cambios de corrientes que se vieron significativamente incrementados en presencia de AITC, agonista específico de TRPA1. Además, en el mismo trabajo demostraron con pruebas de conducta que la sensibilidad a la placa fría a 10 °C fue mayor en ratas a las que se les había producido una lesión nerviosa por ligación del nervio tibial y que la aplicación del antagonista de TRPA1, HC-030031, fue capaz de revertir esta hipersensibilidad. Sin embargo, en animales sin lesión nerviosa el antagonista HC-030031 no produjo cambios

en la latencia de la respuesta a la placa fría (del Camino, Murphy et al. 2010). En conjunto, estas evidencias sugieren una vinculación del canal TRPA1 en el desarrollo de la hiperalgesia al frío, aunque, de acuerdo a los resultados obtenidos por del Camino y colaboradores, TRPA1 se comportaría como sensor de frío únicamente en condiciones patológicas. En contraste con esto último, en nuestro trabajo encontramos que las latencias basales obtenidas en la prueba de placa fría unilateral a 10 °C resultan significativamente diferentes si comparamos ratones silvestres y deficientes para TRPA1 (Fig. 4.1G), sugiriendo un papel relevante de TRPA1 como sensor per sé de temperaturas nocivas en condiciones fisiológicas. Esta contraposición de resultados podría deberse a que las pruebas conductuales se han realizado en diferentes especies. En este trabajo hemos utilizado ratones y del Camino y colaboradores han desarrollado su investigación en ratas. Además, la prueba conductual difiere en cuanto a la metodología. Nosotros hemos utilizado la prueba de placa fría unilateral a 10 °C donde sólo una pata trasera está en contacto con la placa fría, diferente a la tradicionalmente utilizada, donde el animal es colocado en un cubículo y las cuatro extremidades están en contacto con la placa atemperada para luego contabilizar la latencia de la primera reacción nocifensiva.

También hemos observado que el tratamiento con oxaliplatino dio lugar al desarrollo de una marcada alodinia mecánica cuando ésta fue evaluada con la prueba de von Frey, como ha sido demostrado en otros trabajos (Nassini, Gees et al. 2011, Deuis, Zimmermann et al. 2013, Illias, Gist et al. 2018, McDonald, Luiz et al. 2020) y que en los ratones deficientes para TRPA1 ésta fue significativamente menor que la observada en los ratones silvestres (Fig. 4.2A, 4.3A). Estos resultados apoyan los encontrados por trabajos previos como el de Descoeur y colaboradores donde la administración intraperitoneal de HC-03001 fue capaz de revertir la alodinia mecánica provocada por una inyección de oxaliplatino (Descoeur, Pereira et al. 2011). En concordancia con estos resultados, Trevisan y colaboradores observaron una reducción significativa de la alodinia mecánica producida por una única inyección de oxaliplatino con una inyección intraplantar del antagonista HC-030031 (Trevisan, Materazzi et al. 2013). Previo a la inducción del modelo de dolor, la comparación de los umbrales mecánicos basales entre ratones silvestres y deficientes del canal TRPA1 no mostró

cambios significativos (Fig. 4.1E) sugiriendo un papel de TRPA1 como sensor mecánico en condiciones patológicas.

Recientemente se ha relacionado el desarrollo de hipersensibilidad mecánica en ratas por administración de una dosis de oxaliplatino con el incremento en la expresión del ligando de quimiocina 2 (CCL2) en neuronas de DRG lumbares (Illias, Gist et al. 2018). CCL2 y su receptor, el receptor de quimiocinas C-C tipo 2 (CCR2), han sido relacionados en el reclutamiento de monocitos hacia sitios de lesión e inflamación (Babcock, Kuziel et al. 2003, White and Miller 2010). Además, se ha visto que CCL2 aumenta la excitabilidad de las neuronas de DRG (Sun, Yang et al. 2006) y se lo ha relacionado con el reclutamiento de macrófagos. Concretamente, Illias y colaboradores observaron a través de técnicas de inmunohistoquímica que la expresión de CCL2 fue significativamente mayor en DRG lumbares (L4-L5) de ratas tratadas con oxaliplatino. Curiosamente, el incremento en la expresión de CCL2 tuvo lugar principalmente en las neuronas de DRG de pequeño tamaño y en neuronas que expresaban isolectina B4 (IB4) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Teniendo en cuenta que un alto porcentaje de las neuronas TRPA1 co-localizan con IB4 (Barabas, Kossyrev et al. 2012) y que la activación de TRPA1 induce la liberación de CGRP (Meseguer, Alpizar et al. 2014) se podría especular que el canal TRPA1 estaría involucrado en el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica en el modelo de oxaliplatino y en los mecanismos inflamatorios inducidos por la neuropatía. Estudios enfocados en el componente inflamatorio desarrollado por administración de oxaliplatino y su posible vinculación con el canal TRPA1 ayudarían a conseguir un mejor entendimiento de los mecanismos alterados en esta neuropatía.

En nuestro trabajo, los experimentos de comportamiento en ratones silvestres y TRPA1^{-/-} fueron realizados en grupos mixtos de machos y hembras, que fueron evaluados conductualmente por separado, previo a unificar los grupos. Tanto en los ratones silvestres como en los TRPA1^{-/-}, los ratones machos y hembras mostraron un nivel basal similar de sensibilidad mecánica (prueba de von Frey, Fig. 4.1A y C) y al frío (prueba de acetona, Fig. 4.1B y D). Estos resultados van en concordancia con los publicados por Sorge y colaboradores usando la misma cepa que en este trabajo (C57BL/6) (Sorge, Mapplebeck et al. 2015). Por otro lado, Bravo-Caparros en la cepa CD-

1 tampoco ha encontrado diferencias en el comportamiento basal de ratones silvestres (Bravo-Caparros, Perazzoli et al. 2019). Adicionalmente, la reciente publicación de Castellanos y colaboradores muestra que tanto en la evaluación de la sensibilidad mecánica como al frío los ratones machos y hembras silvestres presentan valores similares (Castellanos, Pujol-Coma et al. 2020).

En conjunto, nuestros resultados conductuales apoyan el papel del canal TRPA1 como sensor de estímulos de frío, así como de estímulos mecánicos *in vivo* en la neuropatía por oxaliplatino.

Sin embargo, existen otros canales iónicos implicados en el desarrollo de la sensibilidad al frío y mecánica. Recientemente, se ha demostrado que el canal de potasio TRESK presente en las neuronas sensoriales y considerado como un canal de freno para reducir la activación neuronal, está vinculado en el desarrollo de la alodinia e hiperalgesia al frío, pero también a la alodinia mecánica. Animales deficientes del canal TRESK presentan mayor sensibilidad a estímulos de frío (inocuos y nocivos) y a la estimulación mecánica en condiciones fisiológicas que ha sido correlacionada con un aumento en la activación de fibras C nociceptivas cuando se aplicaron estímulos mecánicos y de frío. Además, en el mismo trabajo, la alodinia al frío desarrollada en ratones deficientes de TRESK en condiciones basales no se vio modificada tras una inyección de oxaliplatino, y fue similar a la desarrollada en ratones silvestres, sugiriendo una vía de acción en común (Castellanos, Pujol-Coma et al. 2020).

Además de la evidencia conductual mencionada, varios trabajos han estudiado los cambios en los niveles de expresión de proteínas, así como los niveles de ARNm tras el tratamiento con oxaliplatino. Descoeur en el año 2011, contrario a una previa publicación por Gauchan en 2009, no observó cambios en la expresión del ARNm para TRPM8, mientras que los cambios observados para TRPA1 resultaron significativos. Adicionalmente, Yamamoto, en el año 2015, observó un incremento en el nivel de expresión del ARNm y de proteína de TRPA1 tras el tratamiento con oxaliplatino en neuronas de DRG de ratas (Yamamoto, Chiba et al. 2015). Cabe destacar que en los trabajos mencionados previamente los modelos utilizados para la inducción de la neuropatía difieren tanto en el número de dosis de oxaliplatino administradas como en la concentración de las mismas, siendo ésta una posible explicación de la discrepancia

de los resultados. Se ha demostrado que la neuropatía por oxaliplatino induce remodelación de canales iónicos pertenecientes a otras familias, como los son los canales de potasio K_v 1.1, K_v 1.2, TREK-1, TREK-2 y TRAAK que se han visto regulados negativamente y donde otros como el canal de sodio dependiente de voltaje Na_v 1.8 se ha visto incrementado (Descoeur, Pereira et al. 2011, Pereira, Busserolles et al. 2014, Poupon, Lamoine et al. 2018).

Respecto al canal de potasio, K_v 1.1, se sabe que controla el disparo de potenciales de acción como respuesta a estímulos mecánicos y de frío. Se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de K_v 1.1 con 4-aminopiridina (4-AP) en las terminales nerviosas de ratones, induce un incremento en las repuestas nocifensivas evocadas por estímulos de frío (Madrid, de la Peña et al. 2009). Además, se ha demostrado la vinculación de K_v 1.1 en condiciones de dolor neuropático. Concretamente, la administración intraplantar de 4-AP indujo hipersensibilidad al frío en ratones sin lesionar, mientras que, tras la ligación del nervio ciático la aplicación de 4-AP no incrementó drásticamente la hipersensibilidad previamente desarrollada por la lesión (Gonzalez, Ugarte et al. 2017). Estos resultados sugieren una similitud en la vía de acción del desarrollo de la hipersensibilidad al frío por administración de 4-AP y la provocada en condiciones de dolor neuropático. Teniendo en cuenta estas evidencias, no se puede excluir la posibilidad de una modulación de estos canales en la NIPO.

5.2 S1RA reduce el dolor producido por la inyección de AITC a través de TRPA1

Se ha demostrado que el AITC provoca comportamientos nocifensivos cuando es inyectado en la superficie plantar en ratas y ratones (Bandell, Story et al. 2004, Dai, Wang et al. 2007, Eid, Crown et al. 2008, Schmidt, Dubin et al. 2009). Con el objetivo de testar el posible efecto inhibitorio de S1RA, antagonista de la chaperona σ_1 , sobre la funcionalidad del canal TRPA1, se realizó una inyección intraplantar de AITC 1 % (10 mM) en ratones previamente inyectados con S1RA 40 mg/Kg intraperitoneal (Fig. 4.4). Los ratones silvestres que previamente recibieron S1RA mostraron un marcado descenso en el tiempo de lamida de la pata inyectada con AITC respecto a los que recibieron salino

(vehículo del S1RA). Los ratones deficientes para TRPA1 no mostraron cambios tras la aplicación de AITC. Además, el tiempo de lamida en los ratones silvestres tratados con S1RA fue similar a los obtenidos en los ratones TRPA1^{-/-}. Estos resultados sugieren que el S1RA, presumiblemente debido a su acción sobre la chaperona σ 1, modula la actividad del canal TRPA1 por lo que éste parece no estar disponible para su activación por la inyección intraplantar de AITC cuando σ 1 se encuentra antagonizado.

Si bien, hasta el momento no hay evidencias de la vinculación entre la función de σ 1 y el canal TRPA1, en el año 2018 se publicó por primera vez un trabajo describiendo la modulación de un miembro de la familia de canales TRP por σ 1. Así, Ortiz-Rentería y colaboradores mostraron que el tiempo de lamida producto de una inyección intraplantar de capsaicina, agonista específico del canal TRPV1, se vio disminuido en ratones pre-tratados con una inyección intraescapular de BD1063, otro antagonista de la chaperona σ 1 (Matsumoto, Bowen et al. 1995, Ortiz-Renteria, Juarez-Contreras et al. 2018). Los resultados obtenidos en el presente trabajo van en la misma dirección que los publicados por Ortiz-Rentería, lo que apoyaría la hipótesis de la modulación del canal TRPA1 por la chaperona σ 1. Como se ha mencionado previamente, en nuestros experimentos los ratones fueron inyectados con S1RA, 24 horas previas a la inyección de AITC. Desde el punto de vista farmacocinético, el S1RA ha mostrado un tiempo medio de eliminación de 14.8 a 19.7 horas en pruebas realizadas en humanos, cuando se administra una dosis única de S1RA (Abadias, Escriche et al. 2013). Sin embargo, el tiempo de vida media en ratones y ratas es de solo 1.4 horas (Romero, Zamanillo et al. 2012, Gris, Portillo-Salido et al. 2016). Recientemente, Bravo-Caparrós y colaboradores en su estudio realizado en ratones, mostraron a través de la técnica de espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) que, 12 horas posteriores a la última administración del compuesto, no se detectaron niveles apreciables de S1RA en muestras de plasma sanguíneo ni en tejido cerebral (Bravo-Caparros, Perazzoli et al. 2019). Teniendo en cuenta esta información, se podría especular que el efecto analgésico observado en los ratones silvestres, 24 horas posteriores a la inyección de S1RA puede provenir de modificaciones a largo plazo sobre el canal TRPA1 en vez de un efecto directo del fármaco sobre éste. Se podría hipotetizar que la chaperona σ 1 modula el tráfico y/o el correcto plegamiento del canal TRPA1 y por lo tanto cuando es antagonizada por S1RA

parte de este mecanismo se ve afectado, provocando déficits en la funcionalidad del canal. En los siguientes apartados se discutirá respecto a esta posibilidad.

5.3 La administración simultánea de S1RA y oxaliplatino ayuda a prevenir el desarrollo de la neuropatía periférica

El compuesto S1RA actualmente ha finalizado la fase II de ensayos clínicos realizados en pacientes con cáncer colorrectal bajo tratamiento con oxaliplatino, mostrando buenos resultados en la tolerancia del fármaco y con niveles de toxicidad aceptables (Bruna, Videla et al. 2018). Así, la perspectiva para su uso clínico es alentadora ya que además se ha demostrado que la administración en humanos de S1RA ayudó a reducir los síntomas de hipersensibilidad al frío, disminuyó la proporción de pacientes que desarrollaron una neuropatía crónica y permitió que los pacientes pudieran recibir una mayor dosis de oxaliplatino que aquellos que recibieron placebo (Bruna and Velasco 2018). Con lo cual, la comprensión del mecanismo de acción del S1RA en estados neuropáticos resulta primordial.

El tratamiento con agentes quimioterapéuticos es un proceso planificado. Esto brinda la posibilidad de implementar terapias preventivas con la intención de impedir o minimizar el desarrollo de la neuropatía periférica. Para testar esta posibilidad, adaptamos un protocolo publicado previamente por Gris y colaboradores en el año 2016 (Gris, Portillo-Salido et al. 2016) (Fig. 4.5A). En este bloque experimental, encontramos que los ratones silvestres, machos y hembras, que recibieron oxaliplatino y una dosis diaria de S1RA 40 mg/Kg intraperitoneal durante once días, mostraron una reducción en el desarrollo de la alodinia mecánica, así como menor hipersensibilidad al frío. Si bien, el tratamiento con S1RA no previene el desarrollo total de la neuropatía, mejora significativamente los síntomas antes mencionados, mostrando un efecto antinociceptivo. Adicionalmente, los resultados obtenidos cuando se evaluó la alodinia al frío (Fig. 4.5C) van en concordancia con los publicados por Gris 2016 donde también observaron una reducción en el número de respuestas aversivas en ratas tras el tratamiento repetido con S1RA. El efecto analgésico que hemos observado cuando los animales fueron evaluados en la placa fría, se realizaron entre uno y hasta tres días

posteriores a la última administración de S1RA. Teniendo en cuenta que entre 6 (Romero, Zamanillo et al. 2012) y 12 horas (Bravo-Caparros, Perazzoli et al. 2019) post S1RA no se detecta presencia del fármaco en muestras de suero, médula espinal y tejido cerebral, nuestros resultados antinociceptivos obtenidos de la placa fría indican de forma clara que el tratamiento repetido con S1RA podría generar alteraciones en los canales TRPA1 de las neuronas sensoriales primarias de forma que se modifiquen los umbrales de detección *in vivo* sensibilizados por la administración de oxaliplatino. Por otro lado, la rápida tasa de eliminación que presenta el S1RA excluiría la posibilidad de que se produzca una acumulación del fármaco a lo largo del tratamiento, lo cual apoyaría la hipótesis de la existencia de una modificación a largo plazo, en el sistema de detección de estímulos sensoriales, debido al antagonismo de la chaperona $\sigma 1$. Respecto a esto último, se sabe que $\sigma 1$ es capaz de translocarse desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática y modular la actividad de diversos canales iónicos (Su, Hayashi et al. 2010, Morales-Lázaro, González-Ramírez et al. 2019). Además, Ortiz-Rentería en su trabajo demostraron que $\sigma 1$ es necesaria para la adecuada síntesis del canal nociceptivo TRPV1 ya que cuando $\sigma 1$ fue antagonizado por el BD1063, se detectó menos proteína que en la situación control (Ortiz-Rentería, Juárez-Contreras et al. 2018). A su vez, Tsai y colaboradores en el año 2015 demostraron que $\sigma 1$ es capaz de translocarse desde el retículo endoplásmico hacia el núcleo celular y producir cambios transcripcionales (Tsai, Chuang et al. 2015).

Recientemente, Poupon y colaboradores han demostrado que la administración de riluzol (un fármaco utilizado en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica) induce efectos antinociceptivos cuando es administrado en simultáneo con el oxaliplatino. Los autores observaron que el riluzol previene en cierta medida el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica y al frío y que este efecto antialodínico es a través de la modulación del canal de potasio TREK-1. En ratones deficientes de éste, la administración de riluzol no evitó el desarrollo de la neuropatía (Poupon, Lamoine et al. 2018). Teniendo en cuenta que la chaperona $\sigma 1$ es capaz de modular la actividad de diversos canales iónicos incluidos canales de potasio, no se puede excluir que los efectos analgésicos del tratamiento con S1RA, provengan de la modulación sinérgica TRPA1 y

otros canales. Estudios funcionales a nivel celular serían necesarios para comprender los mecanismos subyacentes a las evidencias conductuales encontradas.

Muy recientemente, Bravo-Caparrós y colaboradores han propuesto que la chaperona $\sigma 1$ controla la infiltración de macrófagos en los ganglios raquídeos de ratones después de una lesión en el nervio ciático. Dentro de sus observaciones encontraron que neuronas de DRG de ratones lesionados presentaban altos niveles del ligando de quimiocina 2 (CCL2), infiltración de macrófagos y un gran aumento de la interleuquina IL-6. Además, en este escenario, $\sigma 1$ se vio translocada hacia la membrana plasmática. Por el contrario, las neuronas de ratones deficientes de $\sigma 1$ mostraron una reducción de CCL2, infiltración de macrófagos y los niveles de IL-6, mejorando también la alodinia mecánica desarrollada en comparación con en los ratones silvestres (Bravo-Caparrós, Ruiz-Cantero et al. 2020). Teniendo en cuenta que Illas y colaboradores han demostrado que una inyección de oxaliplatino induce un incremento en los niveles de CCL2 en neuronas de DRG de rata (Illas 2018), estos resultados sugieren que la chaperona $\sigma 1$ también podría tener un papel en el control de la respuesta inflamatoria provocada por oxaliplatino y se podría hipotetizar que esto tiene lugar a través de la modulación del canal TRPA1.

5.4 El oxaliplatino induce un incremento en la actividad del canal TRPA1 a nivel celular que se reduce con la administración de S1RA

Si bien el dolor neuropático en la clínica puede deberse a una lesión o enfermedad a nivel del sistema nervioso central o periférico, muchos de los modelos de dolor neuropático, como la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino, están fuertemente ligados a la afectación de los nervios espinales y los ganglios raquídeos (DRG) de la médula espinal (Kumar, Kaur et al. 2018). En este trabajo nos propusimos estudiar si existían cambios relacionados con el canal TRPA1 a nivel celular provocados por la administración de oxaliplatino y si el tratamiento con S1RA modulaba la actividad de estos. De acuerdo con nuestros resultados conductuales, el canal TRPA1 ha mostrado una fuerte vinculación con el desarrollo de la neuropatía, así como su modulación por $\sigma 1$.

Pero, ¿a nivel celular, TRPA1 se encuentra sensibilizado por la administración de oxaliplatino?, ¿el efecto antinociceptivo observado tras el tratamiento con S1RA implica un efecto directo sobre las neuronas TRPA1 positivas?

En los experimentos de imagen de calcio *in vitro*, encontramos que el tratamiento de los animales con oxaliplatino aumenta la sensibilidad de las neuronas de DRG cultivadas al estimularlas con AITC 50 μ M. En concreto, presentan respuestas de mayor amplitud, aunque no aumenta el número de neuronas que responden a dicho agonista (Fig. 4.16D). Si bien no existe evidencia bibliográfica de la caracterización *in vitro* de la respuesta mediada por TRPA1 tras la administración repetida de oxaliplatino, en el trabajo publicado por Zhao y colaboradores encontraron que en condiciones *in vitro*, la preincubación de neuronas de DRG con diferentes concentraciones de oxaliplatino (30, 100 y 300 μ M) durante dos horas produce un incremento en el número de neuronas que responden a AITC 10 μ M (Zhao, Isami et al. 2012). Para las concentraciones más altas de oxaliplatino, en dicho estudio se recluta un porcentaje de neuronas similar al que hemos observado en esta investigación. Adicionalmente, cuando las neuronas fueron incubadas con oxalato (uno de los metabolitos producidos por el oxaliplatino) también encontraron un incremento en la amplitud de la respuesta evocada por AITC. Si bien estos resultados no son comparables directamente, entre sí, debido a las distintas condiciones experimentales en las que se han obtenido, muestran que tanto el oxaliplatino como uno de sus metabolitos ejercen una modulación sobre la actividad del canal TRPA1.

Por otro lado, Anand y colaboradores en el año 2010, encontraron resultados similares, con experimentos en cultivos neuronales de ratas. Posterior a un primer estímulo de icilina (agonista no electrofílico de TRPA1) incubaron las células con oxaliplatino 20 μ g/ml durante 10 minutos y midieron los cambios de calcio intracelular de un segundo estímulo de icilina. Observaron que la incubación con oxaliplatino produjo un incremento en la amplitud de la respuesta del segundo estímulo de icilina además de reclutar neuronas adicionales. Estos resultados fueron similares cuando se utilizó como estímulo la capsaicina, agonista del canal TRPV1, pero no cuando las neuronas fueron estimuladas con WS12, agonista específico del canal TRPM8. Debido a que la icilina también es capaz de activar al canal TRPM8, pero utilizado un agonista

específico para éste (WS12) no observaron diferencias tras la incubación con oxaliplatino, sugieren que el efecto observado es a través del canal TRPA1 (Anand, Otto et al. 2010).

Nuestros experimentos realizados en los cultivos de neuronas de DRG de ratones TRPA1^{-/-} donde la neuropatía fue prácticamente ausente, como se esperaba no hubo respuestas al estímulo de AITC (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que las neuronas estudiadas *in vitro* provienen de ratones que mostraron un fenotipo marcado de alodinia mecánica, así como alodinia e hiperalgesia al frío, los resultados de imagen de calcio *in vitro* sugieren que al menos parte la hipersensibilidad desarrollada proviene, total o parcialmente, de una sensibilización del canal TRPA1.

Otros grupos de investigación han utilizado estrategias adicionales para testar la vinculación de diferentes canales TRP en la neuropatía por oxaliplatino. Así, muchos de ellos han demostrado que el tratamiento con oxaliplatino *in vivo* aumenta los niveles de ARNm de TRPA1 (Descoeur, Pereira et al. 2011, Nassini, Gees et al. 2011, Yamamoto, Chiba et al. 2015, Lee, Cho et al. 2017). Sin embargo otros trabajos también demuestran el aumento en ARNm de TRPM8 (Gauchan, Andoh et al. 2009, Kawashiri, Egashira et al. 2012, Mizuno, Kono et al. 2014). Por tanto, si bien hay mayor evidencia enfocada en el canal TRPA1, no es el único TRP que se ha visto afectado por el tratamiento con oxaliplatino.

Por otro lado, se sabe que un alto porcentaje de las neuronas de DRG que expresan el canal TRPA1 son positivas para la isolectina B4 (IB4) (Barabas, Kossyeva et al. 2012). Curiosamente, Joseph y colaboradores demostraron en el año 2008 que la administración de la neurotoxina para neuronas IB4+, saponina unida a IB4, eliminó selectivamente población IB4+ y evitó el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica por administración de oxaliplatino (Joseph, Chen et al. 2008).

Adicionalmente, se ha demostrado la existencia de una variante de splicing del canal TRPA1 (TRPA1b) de ratón (Zhou, Suzuki et al. 2013). La presencia de esta variante de splicing incrementa la actividad del canal TRPA1. Zhou y colaboradores mostraron mediante experimentos de calcio *in vitro* un aumento en la amplitud de la respuesta a AITC. Además, en el contexto de dolor neuropático, cuando realizaron una ligación parcial del nervio ciático en ratones, observaron que el desarrollo de la hipersensibilidad

mecánica aguda (un día posterior a la lesión) estaba relacionada con un incremento de los niveles de expresión de ARNm de TRPA1, mientras que el incremento en el ARNm de la variante de splicing fue observada a los 14 días de la lesión. Finalmente, los autores concluyen que la presencia de esta variante de splicing podría tener una función en el contexto patológico, específicamente en el desarrollo de la alodinia mecánica a largo plazo (Zhou, Suzuki et al. 2013). Si bien, no hay evidencias de que esto suceda en el modelo de dolor neuropático inducido por oxaliplatino, podría representar una explicación al incremento de la respuesta a AITC que hemos observado en los cultivos de neuronas de DRG obtenidas de ratones tratados con oxaliplatino (Fig. 4.16D). Sin embargo, esta especulación debe ceñirse a un modelo en ratón ya que la presencia de esta variante de empalme parece ser específica para esta especie. En conjunto, todos estos hallazgos sugieren un papel importante del canal TRPA1 en la neuropatía periférica desarrollada por oxaliplatino en condiciones *in vivo* e *in vitro*.

Parte de las neuronas sensoriales extraídas de los DRG de los grupos de ratones tratados con oxaliplatino y vehículo fueron incubadas con S1RA 100 μ M durante 4 horas (condiciones de incubación establecidas previamente) (Fig. 4.16 D). En el grupo incubado con S1RA se observó una reducción de la respuesta del calcio intracelular tras el estímulo de AITC, sin cambiar el porcentaje de neuronas que respondieron respecto a la situación control, lo que sugiere que la incubación con S1RA no afecta la viabilidad celular.

La inhibición en la respuesta dependiente de TRPA1 también se observó en las neuronas de ratones inyectados con vehículo, lo que sugiere que el efecto del S1RA sobre el canal TRPA1 está presente también en condiciones fisiológicas. No existe en la bibliografía información comparable con estos resultados, sin embargo, Ortiz-Rentería y colaboradores demostraron en un trabajo reciente, la inhibición de la corriente dependiente de la activación del canal TRPV1 en células incubadas con BD1063, otro antagonista de la chaperona σ 1 (Ortiz-Renteria, Juarez-Contreras et al. 2018). Así, podría especularse que la chaperona σ 1 module la actividad de otro miembro de la familia TRP, ya que además se ha visto involucrada en la modulación de otros tipos de canales, como por ejemplo los canales de sodio y potasio mencionados en el apartado introductorio 1.6.4 de este trabajo (revisado por Kourrich 2017).

El efecto encontrado con la incubación de S1RA *in vitro*, se observó también en las neuronas provenientes de ratones tratados de manera sistémica con S1RA 40 mg/Kg y oxaliplatino en simultáneo (Fig. 4.17 C y D). En este caso, también se observó una disminución del calcio intracelular en respuesta a AITC en las neuronas de ratones previamente tratados con S1RA respecto a los que recibieron solamente oxaliplatino. Este es, quizás uno de los hallazgos más importantes de este trabajo ya que confirma que el tratamiento con S1RA evita que el oxaliplatino altere las neuronas positivas para el canal TRPA1 (Fig. 4.17).

5.5 El tratamiento con oxaliplatino incrementa las respuestas a frío de neuronas de DRG *in vitro*

Si bien los resultados provenientes de la estimulación *in vitro* con AITC brindan información sobre la activación específica del canal TRPA1 y su vinculación con la neuropatía por oxaliplatino, nos propusimos aplicar un estímulo de frío en neuronas en cultivo, con el objetivo de correlacionar los cambios conductuales obtenidos en las pruebas de frío y la vinculación del canal TRPA1 ante este estímulo. De la aplicación de una rampa de frío observamos un incremento general en el porcentaje de neuronas activadas posterior al tratamiento con oxaliplatino, aunque la amplitud de esta respuesta no se vio modificada respecto a la situación control (Fig. 4.18A y C). Sin embargo, en contradicción con lo esperado, el promedio del umbral de temperatura de respuesta al estímulo de frío fue significativamente menor tras el tratamiento con oxaliplatino (Fig. 4.18B). En situación control las neuronas respondieron en todo el rango de temperaturas aplicado (desde 33 a 8 °C). Los umbrales de respuesta en los cultivos de animales tratados con oxaliplatino también abarcan todo el rango de temperaturas, pero se produce un aumento en el número de neuronas que responden con umbrales térmicos entre 15 y 8 °C.

Estos resultados son contradictorios con los publicados por Descoeur y colaboradores, donde si bien encuentran un incremento en el porcentaje de respuestas a frío, aunque estos son significativamente menores a los que se describen canónicamente en neuronas de DRG, este incremento es debido a un mayor número de

neuronas de bajo umbral posterior al tratamiento con oxaliplatino (Descoeur, Pereira et al. 2011). Muy recientemente, McDonald y colaboradores han utilizado la técnica de imagen de calcio *in vivo* para el estudio de los patrones de activación de la sonda GCaMP3 por estímulos térmicos en un modelo de neuropatía aguda por oxaliplatino, registrando directamente en el ganglio raquídeo L4. La evaluación funcional de la población neuronal se realizó tres horas tras la inyección intraplantar de oxaliplatino donde observaron un incremento en el porcentaje de respuestas a frío aunque los umbrales de respuesta a este estímulo no se vieron modificados respecto a los animales en situación control (McDonald, Luiz et al. 2020).

Las diferencias metodológicas en los modelos inducidos entre los autores previamente mencionados impiden una comparación directa con los resultados obtenidos en nuestras condiciones. La inducción de la neuropatía en nuestro trabajo se ha aplicado con tres dosis sistémicas de oxaliplatino mientras que, Descoeur aplica una única inyección. Aun así, debido a que, a nivel conductual observamos una clara sensibilización a los estímulos térmicos, se podría hipotetizar que el estudio *in vitro* de las respuestas a frío no resulta el escenario más apropiado para su caracterización. Podemos avanzar posibles explicaciones a estas diferencias:

Primero, aunque los experimentos de imagen de calcio fueron realizados de manera aguda (3-4 horas posterior a la disociación de los DRG) posiblemente algún metabolito del oxaliplatino se pierde en el proceso de disociación de los DRG impidiendo el estudio de la sensibilización a frío en neuronas en cultivo. Aunque McDonald y colaboradores han implementado registros *in vivo*, directamente sobre el ganglio L4, el modelo de neuropatía utilizado es diametralmente opuesto al que hemos desarrollado por lo que este aspecto también limita la comparación de los hallazgos.

Segundo, para llegar a conclusiones más robustas, deberíamos abordar el estudio de las respuestas a estímulos de frío con técnicas funcionales más directas como registros de electrofisiología, ya que el uso del calcio intracelular como medida de excitabilidad resulta una medición indirecta de los fenómenos observados teniendo en cuenta que el calcio intracelular es un segundo mensajero de los procesos intracelulares.

Tercero, los cambios observados en la respuesta a frío podrían deberse a otro mecanismo independiente del canal TRPA1 por ejemplo a cambios en los canales que

controlan la excitabilidad de las neuronas. Los cambios de excitabilidad en las neuronas sensoriales de frío también se han relacionado con la corriente de freno I_{KD} (Viana, de la Peña et al. 2002, Madrid, de la Peña et al. 2009, Gonzalez, Ugarte et al. 2017). Así, se ha visto que cuando la I_{KD} es bloqueada farmacológicamente con 4-AP hay un incremento en las respuestas al estímulo de frío. Neuronas que originalmente eran insensibles al frío, durante la aplicación de 4-AP se convierten en termosensibles. De acuerdo a sus propiedades biofísicas, un grupo de éstas neuronas reclutadas por la 4-AP, ha sido definido como neuronas nociceptoras. Además, las neuronas originalmente sensibles a frío mostraron un cambio del umbral de respuestas a temperaturas más altas durante el bloqueo de la I_{KD} (Viana, de la Peña et al. 2002, Madrid, de la Peña et al. 2009). Si bien, en esta investigación no hemos estudiado los cambios en las corrientes I_{KD} , el incremento de neuronas que responden a frío observadas post tratamiento con oxaliplatino, podría representar la activación de sensores de frío silentes (neuronas nociceptoras) debido a un desajuste de la I_{KD} por la neuropatía por oxaliplatino (Gonzalez, Ugarte et al. 2017).

Otro factor a tener en cuenta, es el estrés oxidativo que se genera por las NIPO. Se sabe que el tratamiento con oxaliplatino provoca un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jiao, Li et al. 2016) que son capaces de activar a TRPA1 (Miyake, Nakamura et al. 2016) y que la administración de antioxidantes mejora la hipersensibilidad al frío (Lee, Cho et al. 2017). En los experimentos de imagen de calcio *in vitro* no hemos estudiado la presencia de ROS por lo que éste es otro aspecto a profundizar. También es posible que la sensibilidad al frío desarrollada en los animales tratados con oxaliplatino provenga de modificaciones no sólo en las neuronas sensoriales sino también en otros tipos celulares o células satélite que sinérgicamente sean las responsables de aumentar la sensibilidad al frío.

Teniendo en cuenta los múltiples factores que pueden alterarse cuando se trabaja en escenarios *in vitro* y específicamente lo variable que puede ser el estudio de los cambios de las respuestas a frío provocadas por una neuropatía tan compleja como la inducida por oxaliplatino, creemos que implementar estudios en escenarios más fisiológicos como los registros de calcio *in vivo* permitirían obtener información

directamente comparable con la que se obtiene a nivel conductual y ayudaría a mejorar el entendimiento de los procesos biológicos afectados en escenarios patológicos.

Debido a que el canal TRPA1 es activado por frío nocivo (temperaturas ≤ 17 °C) (Karashima, Talavera et al. 2009) y que este estímulo también es capaz de activar a otros canales iónicos como el canal TRPM8 (Knowlton, Daniels et al. 2011), utilizamos AITC, agonista específico de TRPA1, para dividir la población de neuronas de frío entre AITC positivas y AITC negativas y estudiar la contribución del canal TRPA1 en el descenso del umbral promedio de temperatura observado en el grupo oxaliplatino. Encontramos que, de acuerdo a lo descrito en la bibliografía, en situación control las neuronas AITC positivas responden a temperaturas más bajas que las neuronas AITC negativas y que estas respuestas representan, generalmente, cambios en la amplitud de la respuesta de calcio intracelular menores que en las neuronas AITC negativas, resultados que también han sido observados en otras publicaciones (Memon, Chase et al. 2017) (Fig. 4.19 C). Sin embargo, el tratamiento con oxaliplatino afectó de igual manera al umbral de respuesta en ambas subpoblaciones de neuronas de frío (AITC+ y AITC-), demostrando que no es un efecto dependiente del canal TRPA1 (Fig. 4.19 B).

En nuestro trabajo, por estar interesados en el papel del canal TRPA1 en el sensado de frío, hemos aplicado un estímulo térmico en el cual la temperatura desciende a valores bajos (10 ± 2 °C) manteniéndolo al menos 10 segundos. Por el contrario, la gran mayoría de investigaciones han aplicado estímulos de corta duración y donde la temperatura no desciende a tales valores. Así, esta característica metodológica podría generar resultados diferentes y nuevas interpretaciones de las respuestas a frío obtenidas.

Otro aspecto a tener en cuenta, como he mencionado previamente, es que la gran mayoría de los estudios están realizados en condiciones *in vitro*, donde los estímulos se aplican directamente sobre el soma de las neuronas sensoriales en cultivo y, evidentemente, los efectos pueden ser distintos a los observados *in vivo*. Teniendo en cuenta este aspecto, Luiz y colaboradores publicaron en el año 2019 un estudio *in vivo* de las respuestas a frío en neuronas de DRG utilizando la tecnología GCaMP. Los autores, aplicaron rampas de frío prolongadas directamente sobre la superficie plantar de ratones y estudiaron los patrones de activación de las neuronas del DRG L4. Una de las

conclusiones a las que llegaron, es que existe una población de neuronas que expresa el canal de sodio dependiente de voltaje Na_v 1.8 el cual fue necesario para detección de estímulos de frío extremo prolongado pero que no para el sensado de frío agudo a temperaturas mayores o iguales a $1\text{ }^\circ\text{C}$ (Luiz, MacDonald et al. 2019). En una reciente publicación del mismo grupo de investigadores, mostraron que el incremento en el número de repuestas a frío provocado por una inyección intraplantar de oxaliplatino, se debe a la activación de un grupo de neuronas silentes, capaces de responder a frío. Además, estas neuronas de frío silentes presentaron un perfil nociceptivo y expresaron el canal Na_v 1.8 (McDonald, Luiz et al. 2020). Extrapolando esta información a nuestros resultados, se podría especular que el aumento de las neuronas de frío de alto umbral reclutadas con el tratamiento de oxaliplatino podría deberse a un incremento en la excitabilidad del canal Na_v 1.8. Cabe destacar que las temperaturas alcanzadas en nuestro trabajo ($10 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$) no son tan bajas como las aplicadas por Luiz y colaboradores ($t \geq 1\text{ }^\circ\text{C}$) pero, teniendo en cuenta la barrera de la piel, considerado uno de los mejores aislantes térmicos, se podría sugerir un efecto, hasta cierto punto, comparable. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que el incremento del porcentaje de respuestas a frío posterior al tratamiento de con oxaliplatino no afecta exclusivamente a las neuronas TRPA1 positivas ya que el aumento significativo se observó en la subpoblación AITC negativa.

Por otro lado, sabemos que el canal TRPM8 es el principal sensor de temperaturas no nocivas (Knowlton, Daniels et al. 2011), que la co-expresión con el canal TRPA1 es baja (Memon, Chase et al. 2017) y existen trabajos que lo vinculan con los cambios en la hipersensibilidad térmica post oxaliplatino (Gauchan, Andoh et al. 2009). En este trabajo no aplicamos agonistas específicos para el canal TRPM8 por lo que no podemos concluir que los cambios observados en la subpoblación AITC negativa signifiquen una afectación solo en la población de neuronas TRPM8 positiva.

Curiosamente, el aumento de la concentración de calcio intracelular provocado por la estimulación con frío se vio incrementada en la población AITC positiva, mostrando un cambio muy cercano a la significancia estadística, mientras que en las neuronas AITC negativas se mantuvo exactamente igual (Fig. 4.19C). En conjunto estos

resultados *in vitro* muestran que TRPA1 no es el responsable directo del incremento de neuronas sensibles a estímulos de frío.

En neuronas provenientes de ratones TRPA1^{-/-} tratados con oxaliplatino, el aumento en el porcentaje de respuestas a frío, no resultó significativo, respecto a la situación control (Fig. 4. 20A). Sin embargo, hubo una reducción del umbral medio de respuesta al estímulo de frío, pero significativamente menor que en las neuronas de ratones silvestres (Fig. 4.20B) indicando un papel importante del canal TRPA1 en el sensado de temperaturas de frío, aunque, una vez más, no exclusivo.

Las diferencias obtenidas sobre la vinculación del canal TRPA1 en el cambio de la respuesta a frío producida por oxaliplatino en ratones silvestres y TRPA1^{-/-} se podría explicar si consideramos la posibilidad de que, la detección de frío por el canal TRPA1 esté involucrado en el desarrollo de la hipersensibilidad al frío de manera indirecta, concepto que, ya ha sido sugerido por Miyake 2016, donde demuestran que la presencia de ROS potencia la capacidad de sensar frío del canal TRPA1 (Miyake, Nakamura et al. 2016). Así, cuando el canal TRPA1 se elimina genéticamente, las especies reactivas, capaces además de activarlo (Andersson, Gentry et al. 2008) no tienen su diana para producir la sensibilidad exagerada al frío.

Adicionalmente, el efecto de la incubación con S1RA 100 μ M en la respuesta a frío también se estudió en cultivos de neuronas. Observamos que la incubación con S1RA reestablece los umbrales de respuesta a las condiciones basales. Este efecto fue observado en todas las poblaciones y grupos neuronales, sugiriendo que la incubación con S1RA está actuando sobre TRPA1 (Fig. 4.21 y 4.22) y sobre otros canales iónicos implicados en la determinación de los umbrales de frío. Estudios específicos sobre canales involucrados en el sensado de estímulos de frío y en el control de la excitabilidad neuronal, bajo los efectos de S1RA son necesarios para mejorar el entendimiento de los resultados obtenidos con el antagonista de la chaperona σ 1.

5.6 La chaperona σ 1 modula la actividad del canal iónico TRPA1 en un sistema de expresión heteróloga

Los resultados conductuales, sugieren una modulación de la chaperona σ 1 sobre el canal iónico TRPA1. Los resultados obtenidos en las medidas de calcio intracelular en neuronas de DRG *in vitro* mostraron la misma tendencia. Para estudiar si la modulación observada era un efecto del antagonista de σ 1, S1RA, sobre la actividad de TRPA1, realizamos un estudio *in vitro* de la actividad del canal expresado en un sistema heterólogo.

En los experimentos de imagen de calcio realizados en HEK293 expresando el canal TRPA1, encontramos que la incubación con S1RA induce una inhibición en la respuesta de AITC dosis y tiempo dependiente, donde la máxima inhibición se obtuvo con la incubación durante 4 horas con S1RA 100 μ M (Fig. 4.6). La inhibición obtenida en las condiciones 100 μ M 4 horas, fue igual a la que se obtuvo con una incubación de 25 μ M durante 24 horas, lo cual resulta importante a nivel terapéutico ya que una dosis menor es mejor metabolizada, y resultará en menos efectos inespecíficos (Fig. 4.7). Los resultados de imagen de calcio se confirmaron con los registros electrofisiológicos de patch-clamp, en los cuales la corriente de entrada dependiente de TRPA1 inducida por la aplicación de AITC se vio inhibida de manera dosis dependiente por la incubación con S1RA (Fig. 4.8). Resultados similares fueron obtenidos a potenciales de voltaje positivos y negativos. Además, la cinética de la respuesta también se vio modificada tras la incubación con S1RA; con la máxima concentración, las corrientes obtenidas fueron en promedio 2,6 veces más lentas que en la situación control.

Debido a que la chaperona σ 1 ha sido involucrada en el tráfico y plegamiento de proteínas (Su, Su et al. 2016), estos resultados pueden sugerir que cuando σ 1 se encuentra antagonizada por el efecto del S1RA, no estaría disponible para regular correctamente el tráfico y/o el plegamiento del canal TRPA1 hacia la membrana plasmática.

También observamos que la incubación con BD1063, otro antagonista de la chaperona σ 1, provoca una inhibición en la actividad del canal TRPA1 cuando se realizaron medidas de calcio intracelular y registro de corrientes en patch-clamp en

células HEK293 expresando TRPA1-tGFP. Estos datos apoyan que la modulación de la actividad de TRPA1 está mediada por $\sigma 1$ y no es un efecto directo de sus ligandos.

Al comparar el efecto de S1RA y BD1063 sobre TRPA1, los resultados de las curvas dosis respuesta obtenidas con imagen de calcio *in vitro* mostraron que la IC_{50} para el BD1063 es un tercio más alta que la obtenida con S1RA, lo que indica una mayor potencia de este último (Fig. 4.11 y 4.12). Respecto a las corrientes evocadas por la aplicación de AITC, observamos una inhibición significativa tras la incubación con BD1063 respecto a la situación control, aunque con S1RA ésta fue el doble de potente; estos resultados fueron consistentes a potenciales positivos y negativos. Sin embargo, la incubación con BD1063 no produce cambios significativos en la cinética de la respuesta a AITC (Fig. 4.11 y 4.12). No se puede excluir la posibilidad de que a concentraciones más altas de BD1063 se obtuvieran cambios en la cinética de la respuesta.

Ortiz-Rentería y colaboradores demostraron que la incubación con BD1063 inhibe la corriente dependiente del canal TRPV1. Los autores atribuyen dicha deficiencia funcional a un menor número de canales disponibles tras la incubación con BD1063, ya que también observaron una disminución en los niveles de proteína total y de membrana de TRPV1 utilizando la técnica de western blot. Experimentos de detección de cantidad de proteína de TRPA1 deberían realizarse para considerar esta posibilidad.

Debido a que S1RA y BD1063 son ligandos sintéticos, nos preguntamos si un antagonista endógeno de la chaperona $\sigma 1$ era capaz de producir inhibición de la actividad del canal TRPA1.

La progesterona, aunque comúnmente se conoce por su papel como una hormona reproductiva femenina, es además un antagonista endógeno de $\sigma 1$ (Maurice, Su et al. 1998). Se ha demostrado que posee un papel neuroprotector, inhibiendo la actividad de canales de calcio, sodio y potasio dependientes de voltaje, principalmente durante procesos de traumatismo cerebral (Kelley and Mermelstein 2011, Wei and Xiao 2013) y que podría tener un papel en la regeneración mielínica en las células de Schwann (Schumacher, Hussain et al. 2012). Recientemente, Ortiz-Rentería ha demostrado que la progesterona es capaz de atenuar el comportamiento nocifensivo inducido por una

inyección intraplantar de capsaicina, debido a que evita la modulación del canal nociceptivo TRPV1 por la chaperona $\sigma 1$ (Ortiz-Renteria, Juarez-Contreras et al. 2018).

En base a esta evidencia, se realizaron experimentos de imagen de calcio en células que expresan de manera estable el canal hTRPA1-tGFP, incubadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de P4 (25, 50 y 100 μM) y estimuladas con AITC 50 μM . Como control positivo se incubaron células con S1RA 25 μM durante 24 horas. Experimentos de imagen de calcio realizados por Pablo Ros en nuestro laboratorio y que formaron parte de su Trabajo Final de Grado en Medicina, muestran que la incubación con P4 100 μM también induce una inhibición de la amplitud y del número de respuestas, TRPA1 dependiente cuando se estimula con AITC, comparable con la inhibición obtenida con S1RA 25 μM . La incubación con P4 50 μM también produjo una inhibición significativa de estas respuestas a AITC respecto a la condición control. Adicionalmente estos resultados fueron confirmados en neuronas sensoriales disociadas de DRG (Ros Arlanzón 2019).

En la reciente revisión publicada por Morales-Lázaro, se muestra la vinculación entre la chaperona $\sigma 1$, esteroides como la progesterona y canales iónicos como los pertenecientes a la familia de los TRP (específicamente el canal TRPV1) y su rol en la nocicepción (Morales-Lázaro, González-Ramírez et al. 2019). Adicionalmente, se ha demostrado que P4 es capaz de reducir los niveles de ARNm de TRPA1 y TRPV1 en células de endometrio en cultivo (Pohóczyk, Kun et al. 2016).

Así, los resultados de este trabajo aportan información novedosa acerca de la modulación funcional de $\sigma 1$ sobre la actividad del canal TRPA1, demostrando que tanto antagonistas endógenos como exógenos de la chaperona inhiben la actividad de este canal.

5.6.1 La inhibición de la actividad de TRPA1 es independiente del tipo de agonista químico con el que se le estimula

La mayor parte de este trabajo ha sido desarrollado utilizando AITC, un compuesto electrofílico, considerado un activador específico del canal TRPA1. Se sabe que los compuestos electrofílicos activan a TRPA1 formando uniones covalentes en los residuos de cisteínas presentes en su extremo N terminal, por lo que también se los

suele llamar agonistas covalentes (Story, Peier et al. 2003, Bandell, Story et al. 2004, Bautista, Jordt et al. 2006, Macpherson, Dubin et al. 2007). Sin embargo, los agonistas no electrófilos como el carvacrol, activan al canal TRPA1 sin causar modificaciones en sus cisteínas (Lee, Buber et al. 2008, Talavera, Gees et al. 2009); lo hacen por interacción con un sitio localizado dentro del quinto dominio transmembrana, siendo éste el mismo sitio de acción que el del mentol. Meents y colaboradores en el año 2016, demostraron que mutando los aminoácidos S873 y T874 presentes en el quinto dominio transmembrana de TRPA1 humano, eran capaces de abolir completamente la sensibilidad a carvacrol (Meents, Fischer et al. 2016).

Para comprobar que la reducción de la actividad de TRPA1 tras la incubación con S1RA es independiente del tipo de agonista que se utilice para su activación, desarrollamos un grupo de experimentos de imagen de calcio *in vitro* donde las células HEK293 que expresaban TRPA1 fueron estimuladas con carvacrol 100 μM posterior a la incubación de éstas a diferentes concentraciones (10, 30 y 100 μM) de S1RA durante 4 horas. Con la concentración más alta de S1RA (100 μM), la inhibición de la respuesta TRPA1 dependiente por activación con carvacrol fue significativamente menor que en la situación control y además similar a la inhibición obtenida cuando se estimuló con AITC (Fig. 4.9 y 4.10). Sin embargo, a concentraciones menores (10 y 30 μM) de S1RA no se observaron cambios significativos en la respuesta a carvacrol. Adicionalmente, es importante destacar que la IC_{50} del S1RA para estos agonistas es diferente (IC_{50} AITC 47 μM , IC_{50} carvacrol 98 μM). Aun así, en las células incubadas con 25 μM de S1RA y estimuladas con AITC, observamos que la producida por 30 μM de S1RA y estimuladas con carvacrol. Por un lado, esto podría sugerir que el extremo N-terminal, región de acción del AITC, esté más relacionado con el sitio de modulación de la chaperona $\sigma 1$ ya que además se ha demostrado que $\sigma 1$ es capaz de interactuar directamente con anquirinas, específicamente el isómero AKN220 (Hayashi and Su 2001, Cobos, Entrena et al. 2008), dominios proteicos que también se localizan en este extremo del canal. Sin embargo, se ha demostrado que la modificación del extremo N-terminal (específicamente modificación de las cisteínas donde actúan los componentes electrófilos) no modifica la sensibilidad del canal cuando se lo estimula con carvacrol (Meents, Fischer et al. 2016), por lo que la inhibición observada con ambos agonistas

podría sugerir un defecto en el plegamiento del canal o disminución del número de canales disponibles para su activación.

5.7 La chaperona σ 1 modula la actividad del canal TRPA1 en neuronas sensoriales de DRG

Además del estudio de la modulación de TRPA1 por σ 1 en el sistema heterólogo, mediante la técnica de imagen de calcio y los registros electrofisiológicos en la modalidad de patch-clamp, confirmamos los resultados funcionales en neuronas primarias disociadas de DRG. En estos experimentos observamos que el incremento de calcio intracelular en respuesta a AITC es menor en aquellas células que fueron incubadas con S1RA, siguiendo estos resultados la misma tendencia en el sistema heterólogo (Fig. 4.15).

Asimismo, datos obtenidos por el Dr. Alejandro González en nuestro laboratorio, en experimentos de registro electrofisiológico en neuronas de DRG de ratones, mostraron que tras ser incubadas con S1RA 100 μ M-4h, éstas presentaban menor grado de despolarización en la modalidad “whole-cell current-clamp” y menor frecuencia de disparo de potenciales de acción en la modalidad “cell-attached” cuando fueron estimuladas con AITC respecto de aquellas que no fueron incubadas con S1RA. Además, los registros en “whole-cell voltage-clamp” también mostraron una inhibición en la amplitud de la densidad de corriente en respuesta a AITC. Datos pendientes de publicación y presentados de en congreso de la Sociedad Americana de Neurociencias 2019 (De la Peña, Marcotti et al. 2019).

Estos resultados confirman a nivel electrofisiológico, en neuronas sensoriales primarias, el efecto del S1RA que se ha demostrado con registros de imagen de calcio *in vitro*, apoyando la modulación por parte de la chaperona σ 1 sobre el canal TRPA1 cuando éste se expresa en un sistema nativo.

5.8 La chaperona $\sigma 1$ es necesaria para que S1RA module la actividad del canal TRPA1

Para comprobar si la modulación observada por S1RA sobre TRPA1 depende de $\sigma 1$, incubamos células HEK293 en las cuales la chaperona $\sigma 1$ se encontraba silenciada (i.e. con niveles muy reducidos de $\sigma 1$) con S1RA, y en las cuales se expresó de manera transitoria TRPA1-tGFP.

En los experimentos de imagen de calcio *in vitro*, la incubación con S1RA no indujo inhibición de la respuesta a AITC. Este resultado se confirmó con los registros electrofisiológicos, en los cuales no hubo cambios significativos en las corrientes TRPA1 dependientes entre el grupo control y el incubado con S1RA (Fig. 4.13). Estos resultados sugieren que la inhibición producida por S1RA se produce por el antagonismo de $\sigma 1$ y no por un efecto directo del ligando de $\sigma 1$ sobre TRPA1. En otras palabras, es necesaria la presencia de $\sigma 1$ para modular la actividad de TRPA1.

Para confirmar esta hipótesis y utilizando la línea celular con $\sigma 1$ silenciada como punto de partida, se realizó la co-transfección del canal TRPA1 y la chaperona $\sigma 1$ y se procedió a incubar con S1RA. Los resultados obtenidos fueron los esperados; en las células que co-expresaban $\sigma 1$ y TRPA1, la incubación con S1RA indujo una inhibición del calcio intracelular en respuesta a AITC, tal y como como ha sido observado en las células silvestres que expresan de manera endógena la chaperona $\sigma 1$ (Fig. 4.14).

Además, observamos que el incremento de calcio intracelular por estimulación con AITC es mayor cuando $\sigma 1$ está silenciado que en células silvestres (Fig. 4.13 A), esto podría deberse a un desajuste en el control del tráfico desde el retículo endoplásmico hacia la membrana celular debido a la ausencia de la chaperona $\sigma 1$.

Considerando la posibilidad de que $\sigma 1$ esté involucrada en el control de calidad del transporte del canal TRPA1, estos experimentos sugieren que en ausencia de $\sigma 1$ no se evita el tráfico del canal y que un mecanismo paralelo estaría actuando de manera compensatoria para inducir el tráfico de TRPA1 la membrana. En este sentido se ha relacionado a las chaperonas XPORT-A y XPORT-B en el tráfico de los canales TRP en la mosca *Drosophila* (Chen, Chen et al. 2015). En su trabajo proponen que XPORT-A sirve como chaperona para facilitar la translocación de los canales TRP desde el retículo

endoplasmático hacia la membrana plasmática. Además, demostraron que la eliminación de XPORT-B induce la retención de TRP en el retículo endoplasmático y que la estimulación lumínica de este mostraba un patrón que no se puede distinguir del fenotipo mutante.

En base a esta evidencia, nos preguntamos si la disminución en la actividad de TRPA1 observada después de incubar las células con el antagonista de σ_1 , S1RA, fue debida a una modulación del tráfico de canales hacia la membrana plasmática.

Para ello, el Dr. Jorge Fernández-Trillo realizó experimentos de recuperación de fluorescencia posterior al foto-blanqueamiento (FRAP) en células HEK293 transfectadas con hTRPA1-GFP, restringiendo la visualización de foto-blanqueamiento y recuperación a la proximidad de la membrana plasmática utilizando la reflexión de la fluorescencia interna total (TIRF) (datos pendientes de publicación). El 80 % de la intensidad de fluorescencia cerca de la membrana plasmática se foto-blanqueó con iluminación TIRF sostenida durante 100 segundos y luego, la recuperación de fluorescencia debido al tráfico de canales hTRPA1-GFP desde regiones no blanqueadas se monitorizó durante 10 minutos. Los resultados obtenidos mostraron que el nivel FRAP observado fue menor en las células tratadas con S1RA 100 μ M 4 h (17.2 ± 1.4 %) que en las células incubadas con vehículo (DMSO) (21.0 ± 1.3 %). En otras palabras, esto sugiere que hay menos canales para repoblar la membrana plasmática y regiones cercanas a ella en las células donde σ_1 se encuentra antagonizado por S1RA. Esta primera aproximación apunta a que σ_1 podría estar involucrado en la modulación del tráfico de TRPA1 hacia la membrana plasmática. Al mismo tiempo, estos datos generan nuevas preguntas: ¿La menor recuperación de fluorescencia posterior al foto-blanqueo en las células tratadas con S1RA se debe a que originalmente había menos canales en la membrana celular?, ¿puede σ_1 estar afectando solo al correcto plegamiento de TRPA1, pero no a su translocación hacia la membrana plasmática o viceversa? Será necesario realizar más estudios para dilucidar el posible mecanismo molecular por el cual el σ_1 podría modular el tráfico del canal TRPA1.

A través de experimentación *in vitro*, se ha demostrado que la chaperona σ_1 está presente en diferentes niveles de oligomerización (Mishra, Mavlyutov et al. 2015, Hong, Yano et al. 2017). y que éstos son modulados por sus ligandos. Existe evidencia que el

extremo C terminal de $\sigma 1$ por sí mismo es capaz de actuar como chaperona (Hayashi and Su 2007, Wu and Bowen 2008), además de interactuar con BiP (otra chaperona presente en las MAM del RE). Además, se ha demostrado que la incubación de células COS, que expresan $\sigma 1$, con el agonista pentazocina promueve la formación de dímeros y monómeros, mientras que el tratamiento con haloperidol, antagonista de $\sigma 1$, favorece la formación de niveles de oligomerización más altos (Mishra, Mavlyutov et al. 2015). Teniendo en cuenta esta información, se ha propuesto que, los agonistas de $\sigma 1$ son capaces de disociar la chaperona en monómeros o dímeros exponiendo su región C terminal, mientras que los antagonistas mantienen a $\sigma 1$ en niveles mayores de oligomerización, donde el extremo C terminal estaría inhabilitado para interacciones con otras proteínas. Esto ha dado lugar a especular que los niveles de oligomerización más altos dan como resultado chaperonas $\sigma 1$ no funcionales (Fig. 5.1).

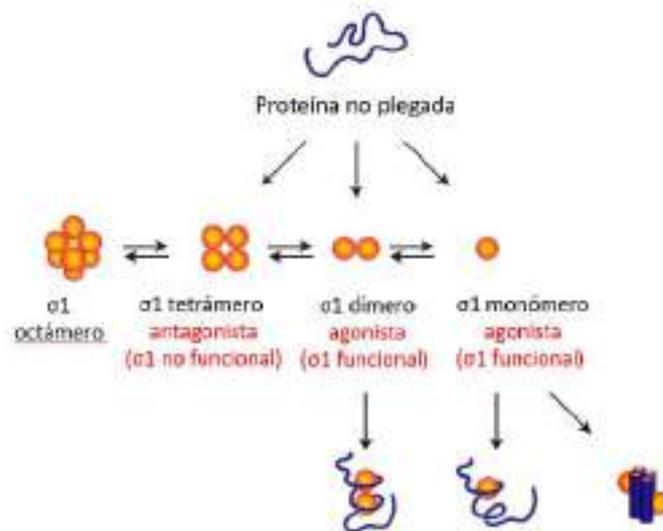


Figura 5.1: Modulación de la función de $\sigma 1$ por sus ligandos: mecanismo propuesto. En base a la evidencia *in vitro* e *in vivo* se ha propuesto que la chaperona $\sigma 1$ existe en diferentes niveles de oligomerización en donde los agonistas de $\sigma 1$ se unen o son capaces de crear dímeros o monómeros funcionales a partir de niveles de oligomerización más complejos, mientras que los antagonistas de $\sigma 1$ se unen a tetrameros o niveles más altos de oligomerización dando como resultado una chaperona no funcional. Modificada de (Chu and Ruoho 2016).

Si $\sigma 1$ es necesario para el correcto funcionamiento del canal TRPA1, tendría sentido pensar que el tratamiento con S1RA o BD1063 mantienen a $\sigma 1$ en un alto estado de oligomerización impidiendo, por ejemplo, el correcto plegamiento o adecuado transporte del canal TRPA1 y consecuentemente una inhibición a nivel funcional como

se ha observado en los experimentos del presente trabajo. Sin embargo, los estudios de modulación de estados de oligomerización de σ_1 por sus ligandos han sido realizado en condiciones *in vitro*, donde el contexto no refleja exactamente el escenario biológico, por ejemplo, en el uso de detergentes de purificación con características diferentes a las biológicas representando una limitación en los resultados (Ryskamp, Korban et al. 2019).

5.9 La chaperona σ_1 y el canal TRPA1 forman un complejo físico

Teniendo en cuenta la modulación funcional de σ_1 sobre TRPA1, nos preguntamos si además estas dos proteínas eran capaces de formar un complejo proteico, es decir, si existía una interacción física entre ellas. Puesto que se ha descrito que σ_1 forma complejos con diversos canales iónicos, como canales de sodio, potasio, ASIC (revisado por Kourrich 2017) y entre ellos el canal TRPV1 (Ortiz-Renteria, Juarez-Contreras et al. 2018), se implementó la técnica de inmunoprecipitación en un sistema de sobreexpresión, donde se observó que σ_1 y TRPA1 forman un complejo físico (Fig. 4.24). El hecho que tanto σ_1 (Hayashi and Su 2003, Hayashi and Su 2007, Palmer, Mahen et al. 2007) como TRPA1 (Startek, Boonen et al. 2019) se encuentran localizados en las balsas lipídicas de las membranas celulares apoya el resultado de que además estén físicamente en contacto. Las balsas lipídicas son microdominios de membrana que organizan espacialmente moléculas para vías de señalización específicas que regulan diversas funciones celulares (Palmer, Mahen et al. 2007). Se ha publicado que σ_1 puede modificar los componentes lipídicos de la membrana plasmática y como consecuencia afectar los niveles de las balsas lipídicas (Takebayashi, Hayashi et al. 2004). Esta remodelación de la membrana podría afectar la función de las proteínas que contiene, como canales iónicos. Así, no podemos descartar la posibilidad de que el antagonismo de σ_1 provoque cambios en las balsas lipídicas y afecte funcionalmente al canal TRPA1 (Startek, Boonen et al. 2019).

Sería interesante abordar con estrategias de mutagénesis la eliminación de sitios claves, como la eliminación de los dominios con residuos de anquirina del canal para evaluar si σ_1 aún es capaz de formar un complejo físico con el canal TRPA1 y modular su actividad ya que se ha demostrado que, la eliminación de estos dominios en el canal

TRPA1 humano, no modifican su funcionalidad siendo éste capaz de responder a estímulos de frío y estímulos químicos (AITC, cinamaldehído) (Moparthi, Survery et al. 2014). Adicionalmente, el Dr. Fernández-Trillo realizó experimentos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en células HEK293 transfectadas con hTRPA1-GFP y h σ 1-mCherry, para evaluar si ambas proteínas se encontraban dentro de una distancia compatible con una interacción física. Para ello, se utilizó una construcción en tándem que contenía una variante GFP y Cherry covalentemente unido (Rho-pCG) como control positivo de FRET. El nivel de FRET neto (nFRET) se tomó como el máximo observable en nuestras condiciones, este valor se utilizó como referencia para normalizar los niveles de nFRET observados con otras construcciones. Como resultado se obtuvo que el nivel de nFRET fue significativamente mayor cuando hTRPA1-GFP se co-transfectó con h σ 1-R-mCherry (16.22 ± 2.07 %, n = 17) que cuando hTRPA1-GFP fue co-transfectado con mCherry soluble libre (0 ± 1.86 %, n = 15). Estos datos sugieren que TRPA1 y σ 1 están ubicados lo suficientemente cerca como para formar complejo de proteínas, resultado que refuerza el obtenido con la técnica de inmunoprecipitación. Curiosamente, cuando las células se incubaron con S1RA 25 μ M durante 24 h, el nivel de nFRET (17.92 ± 2.14 %, n = 21) fue similar al nivel obtenido con las células no tratadas (16.22 ± 2.07 %, n = 17), lo que sugiere que el efecto antagonista de S1RA sobre la modulación de TRPA1 no se ejerce por un deterioro de la formación del complejo TRPA1- σ 1.

En conclusión, como he mencionado al comienzo de este apartado, la complejidad de la neuropatía por oxaliplatino y el poco conocimiento de los mecanismos de acción que subyacen en el desarrollo de la sintomatología descrita, dificulta el desarrollo de terapias efectivas. El antagonista de σ 1, S1RA, ha concluido la fase 2 de ensayos clínicos y se ha comprobado que presenta niveles de tolerancia y toxicidad aceptables (Bruna, Videla et al. 2018). Se ha demostrado que la administración de S1RA en humanos reduce los síntomas de hipersensibilidad al frío por administración de oxaliplatino, disminuye de la proporción de pacientes que desarrollaron una neuropatía crónica y además permitió que éstos pudieran recibir una mayor concentración de quimioterapéutico que aquellos que recibieron placebo (Bruna and Velasco 2018).

Teniendo en cuenta el impacto y los alentadores resultados obtenidos en la clínica, el presente trabajo representa la primera evidencia en la que se muestra que los efectos analgésicos tras el tratamiento con S1RA en la neuropatía por oxaliplatino provienen en parte por la modulación de la chaperona $\sigma 1$ sobre el canal TRPA1.

Como perspectiva a futuro, sería interesante profundizar en el estudio de la modulación del tráfico de TRPA1 por $\sigma 1$ e implementar registros de imagen de calcio *in vivo* para estudiar diferentes poblaciones neuronales involucradas en la neuropatía de oxaliplatino y el efecto del S1RA sobre estas.

6. CONCLUSIONES

1. En condiciones *in vitro*, el antagonismo de la chaperona $\sigma 1$ con los fármacos S1RA o BD1063, disminuye la actividad del canal TRPA1 humano y de ratón. Esta inhibición es dependiente del tiempo de incubación y de la dosis de fármaco utilizada e independiente de la naturaleza de los agonistas utilizados para la activación del canal. Por tanto, se sugiere una modulación de la chaperona $\sigma 1$ sobre el canal TRPA1.
2. Además de la interacción funcional observada, la chaperona $\sigma 1$ y el canal TRPA1 forman un complejo físico en un sistema de expresión heteróloga.
3. En células carentes de $\sigma 1$, el tratamiento *in vitro* con S1RA no produce cambios en la actividad de TRPA1. Concluimos que, la modulación de la actividad de TRPA1 es ejercida por la chaperona $\sigma 1$ y no por su ligando.
4. La inyección intraperitoneal repetida del agente quimioterapéutico oxaliplatino en ratones silvestres (hembras y machos) produce hipersensibilidad mecánica y al frío, en la cual el canal TRPA1 tiene una contribución relevante. En ratones deficientes de este canal, la sensibilidad mecánica fue significativamente menor y no desarrollaron hipersensibilidad al frío.
5. El tratamiento con oxaliplatino induce un incremento en la actividad de las neuronas sensoriales TRPA1 positivas y un incremento en el número de neuronas sensibles a frío el cual no parece estar asociado a la población de neuronas TRPA1. La incubación *in vitro* con S1RA restablece la actividad del canal TRPA1, así como las respuestas al estímulo de frío, hacia valores basales. Se concluye que, el tratamiento con oxaliplatino como la incubación con S1RA, modulan la funcionalidad del canal TRPA1 y la de otros canales iónicos sensores de frío.
6. La inyección intraperitoneal de S1RA simultánea con la inyección de oxaliplatino, reduce la sensibilidad mecánica y al frío en ratones silvestres. Además, la inyección intraperitoneal de S1RA disminuye la respuesta nocifensiva producida por la

aplicación intraplantar de AITC. Se concluye que la mejoría observada por el S1RA en la neuropatía por oxaliplatino, se debe, al menos en parte, a la modulación de la actividad del canal TRPA1 por la chaperona σ 1. Sin embargo, no se excluye un efecto sinérgico por la modulación de σ 1 sobre otros canales iónicos.

7. Las neuronas sensoriales primarias obtenidas de ratones tratados en simultáneo con S1RA y oxaliplatino muestran una menor actividad del canal TRPA1 respecto a las neuronas obtenidas de ratones tratados solo con oxaliplatino. Se concluye que la reducción en el desarrollo de la neuropatía se debe en parte al descenso de la actividad del canal TRPA1.
8. Debido a que, en nuestras condiciones experimentales *in vitro*, no se ha podido observar la sensibilización a estímulos de frío en neuronas sensoriales de DRG tras el tratamiento con oxaliplatino, consideramos que un estudio de imagen de calcio *in vivo* es la herramienta más apropiada para correlacionar las observaciones celulares con las conductuales.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abadias, M., M. Escriche, A. Vaque, M. Sust and G. Encina (2013). "Safety, tolerability and pharmacokinetics of single and multiple doses of a novel sigma-1 receptor antagonist in three randomized phase I studies." Br J Clin Pharmacol **75**(1): 103-117.

Abraham, M. J., K. L. Fleming, S. Raymond, A. Y. C. Wong and R. Bergeron (2019). "The sigma-1 receptor behaves as an atypical auxiliary subunit to modulate the functional characteristics of Kv1.2 channels expressed in HEK293 cells." Physiol Rep **7**(12): e14147.

Alon, A., H. R. Schmidt, M. D. Wood, J. J. Sahn, S. F. Martin and A. C. Kruse (2017). "Identification of the gene that codes for the $\sigma(2)$ receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(27): 7160-7165.

Alonso, G., V. Phan, I. Guillemain, M. Saunier, A. Legrand, M. Anoa and T. Maurice (2000). "Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system." Neuroscience **97**(1): 155-170.

Anand, U., W. R. Otto and P. Anand (2010). "Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons." Mol Pain **6**: 82.

Andersson, D. A., C. Gentry, S. Moss and S. Bevan (2008). "Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress." J Neurosci **28**(10): 2485-2494.

Andrade, E. L., F. C. Meotti and J. B. Calixto (2012). "TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs." Pharmacol Ther **133**(2): 189-204.

Antoniazzi, C. T. D., R. Nassini, F. K. Rigo, A. M. Milioli, F. Bellinaso, C. Camponogara, C. R. Silva, A. S. de Almeida, M. F. Rossato, F. De Logu, S. M. Oliveira, T. M. Cunha, P. Geppetti, J. Ferreira and G. Trevisan (2019). "Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain." Int J Cancer **144**(2): 355-365.

Argyriou, A. A., G. Cavaletti, A. Antonacopoulou, A. A. Genazzani, C. Briani, J. Bruna, S. Terrazzino, R. Velasco, P. Alberti, M. Campagnolo, S. Lonardi, D. Cortinovic, M. Cazzaniga, C. Santos, A. Psaromyalou, A. Angelopoulou and H. P. Kalofonos (2013). "Voltage-gated sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: results from a prospective multicenter study." Cancer **119**(19): 3570-3577.

Argyriou, A. A., G. Cavaletti, C. Briani, R. Velasco, J. Bruna, M. Campagnolo, P. Alberti, F. Bergamo, D. Cortinovic, M. Cazzaniga, C. Santos, K. Papadimitriou and H. P. Kalofonos (2013). "Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: a prospective study in 170 patients with colorectal cancer." Cancer **119**(2): 438-444.

Aydar, E., C. P. Palmer, V. A. Klyachko and M. B. Jackson (2002). "The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit." Neuron **34**(3): 399-410.

- Babcock, A. A., W. A. Kuziel, S. Rivest and T. Owens (2003). "Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS." J Neurosci **23**(21): 7922-7930.
- Balasuriya, D., A. P. Stewart, D. Crottes, F. Borgese, O. Soriani and J. M. Edwardson (2012). "The sigma-1 receptor binds to the Nav1.5 voltage-gated Na⁺ channel with 4-fold symmetry." J Biol Chem **287**(44): 37021-37029.
- Bandell, M., G. M. Story, S. W. Hwang, V. Viswanath, S. R. Eid, M. J. Petrus, T. J. Earley and A. Patapoutian (2004). "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin." Neuron **41**(6): 849-857.
- Bang, S. and S. W. Hwang (2009). "Polymodal ligand sensitivity of TRPA1 and its modes of interactions." J Gen Physiol **133**(3): 257-262.
- Bangaru, M. L., D. Weihrauch, Q. B. Tang, V. Zoga, Q. Hogan and H. E. Wu (2013). "Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury." Mol Pain **9**: 47.
- Barabas, M. E., E. A. Kossyeva and C. L. Stucky (2012). "TRPA1 is functionally expressed primarily by IB4-binding, non-peptidergic mouse and rat sensory neurons." PLoS one **7**(10): e47988-e47988.
- Baraldi, P. G., D. Preti, S. Materazzi and P. Geppetti (2010). "Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents." J Med Chem **53**(14): 5085-5107.
- Barriere, D. A., J. Rieusset, D. Chanteranne, J. Busserolles, M. A. Chauvin, L. Chapuis, J. Salles, C. Dubray and B. Morio (2012). "Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization." Pain **153**(3): 553-561.
- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer and D. Julius (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." Cell **139**(2): 267-284.
- Bautista, D. M., S.-E. Jordt, T. Nikai, P. R. Tsuruda, A. J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A. I. Basbaum and D. Julius (2006). "TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents." Cell **124**(6): 1269-1282.
- Bautista, D. M., P. Movahed, A. Hinman, H. E. Axelsson, O. Sterner, E. D. Hogestatt, D. Julius, S. E. Jordt and P. M. Zygmunt (2005). "Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12248-12252.
- Bautista, D. M., M. Pellegrino and M. Tsunozaki (2013). "TRPA1: A gatekeeper for inflammation." Annu Rev Physiol **75**: 181-200.

Bautista, D. M., J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S. E. Jordt and D. Julius (2007). "The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold." Nature **448**(7150): 204-208.

Benarroch, E. E. (2018). "Sigma-1 receptor and amyotrophic lateral sclerosis." Neurology **91**(16): 743-747.

Bermack, J. E. and G. Debonnel (2005). "The role of sigma receptors in depression." J Pharmacol Sci **97**(3): 317-336.

Bessac, B. F., M. Sivula, C. A. von Hehn, J. Escalera, L. Cohn and S. E. Jordt (2008). "TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons." J Clin Invest **118**(5): 1899-1910.

Boonen, B., Y. A. Alpizar, V. M. Meseguer and K. Talavera (2018). "TRP Channels as Sensors of Bacterial Endotoxins." Toxins (Basel) **10**(8).

Bouhassira, D. (2019). "Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology." Rev Neurol (Paris) **175**(1-2): 16-25.

Brailoiu, E., S. Chakraborty, G. C. Brailoiu, P. Zhao, J. L. Barr, M. A. Ilies, E. M. Unterwald, M. E. Abood and C. W. Taylor (2019). "Choline Is an Intracellular Messenger Linking Extracellular Stimuli to IP(3)-Evoked Ca(2+) Signals through Sigma-1 Receptors." Cell Rep **26**(2): 330-337.e334.

Bravo-Caparros, I., G. Perazzoli, S. Yeste, D. Cikes, J. M. Baeyens, E. J. Cobos and F. R. Nieto (2019). "Sigma-1 Receptor Inhibition Reduces Neuropathic Pain Induced by Partial Sciatic Nerve Transection in Mice by Opioid-Dependent and -Independent Mechanisms." Front Pharmacol **10**: 613.

Bravo-Caparrós, I., M. C. Ruiz-Cantero, G. Perazzoli, S. J. F. Cronin, J. M. Vela, M. F. Hamed, J. M. Penninger, J. M. Baeyens, E. J. Cobos and F. R. Nieto (2020). "Sigma-1 receptors control neuropathic pain and macrophage infiltration into the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury." Faseb j **34**(4): 5951-5966.

Brewster, M. S. and R. Gaudet (2015). "How the TRPA1 receptor transmits painful stimuli: Inner workings revealed by electron cryomicroscopy." Bioessays **37**(11): 1184-1192.

Bruna, J. and R. Velasco (2018). "Sigma-1 receptor: a new player in neuroprotection against chemotherapy-induced peripheral neuropathy." Neural Regen Res **13**(5): 775-778.

Bruna, J., S. Videla, A. A. Argyriou, R. Velasco, J. Villoria, C. Santos, C. Nadal, G. Cavaletti, P. Alberti, C. Briani, H. P. Kalofonos, D. Cortinovis, M. Sust, A. Vaque, T. Klein and C. Plata-Salaman (2018). "Efficacy of a Novel Sigma-1 Receptor Antagonist for Oxaliplatin-

Induced Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIa Clinical Trial." Neurotherapeutics **15**(1): 178-189.

Brune, S., S. Priel and B. Wunsch (2013). "Structure of the sigma1 receptor and its ligand binding site." J Med Chem **56**(24): 9809-9819.

Carnally, S. M., M. Johannessen, R. M. Henderson, M. B. Jackson and J. M. Edwardson (2010). "Demonstration of a direct interaction between sigma-1 receptors and acid-sensing ion channels." Biophys J **98**(7): 1182-1191.

Carozzi, V. A., A. Canta and A. Chiorazzi (2015). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms?" Neurosci Lett **596**: 90-107.

Castellanos, A., A. Pujol-Coma, A. Andres-Bilbe, A. Negm, G. Callejo, D. Soto, J. Noel, N. Comes and X. Gasull (2020). "TRESK background K(+) channel deletion selectively uncovers enhanced mechanical and cold sensitivity." J Physiol **598**(5): 1017-1038.

Caterina, M. J., T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake and D. Julius (1999). "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat." Nature **398**(6726): 436-441.

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

Cavaletti, G. and P. Marmiroli (2018). "Pharmacotherapy options for managing chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity." Expert Opin Pharmacother **19**(2): 113-121.

Cendan, C. M., J. M. Pujalte, E. Portillo-Salido, L. Montoliu and J. M. Baeyens (2005). "Formalin-induced pain is reduced in sigma(1) receptor knockout mice." Eur J Pharmacol **511**(1): 73-74.

Cersosimo, R. J. (2005). "Oxaliplatin-associated neuropathy: a review." Ann Pharmacother **39**(1): 128-135.

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

Chen, J. and D. H. Hackos (2015). "TRPA1 as a drug target--promise and challenges." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **388**(4): 451-463.

Chen, J., S. K. Joshi, S. DiDomenico, R. J. Perner, J. P. Mikusa, D. M. Gauvin, J. A. Segreti, P. Han, X. F. Zhang, W. Niforatos, B. R. Bianchi, S. J. Baker, C. Zhong, G. H. Simler, H. A. McDonald, R. G. Schmidt, S. P. McGaraughty, K. L. Chu, C. R. Faltynek, M. E. Kort, R. M. Reilly and P. R. Kym (2011). "Selective blockade of TRPA1 channel attenuates

pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation." Pain **152**(5): 1165-1172.

Chen, W., W. Lian, Y. Yuan and M. Li (2019). "The synergistic effects of oxaliplatin and piperlongumine on colorectal cancer are mediated by oxidative stress." Cell Death Dis **10**(8): 600.

Chen, Y., C. Yang and Z. J. Wang (2011). "Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain." Neuroscience **193**: 440-451.

Chen, Z., H. C. Chen and C. Montell (2015). "TRP and Rhodopsin Transport Depends on Dual XPORT ER Chaperones Encoded by an Operon." Cell Rep **13**(3): 573-584.

Chu, U. B. and A. E. Ruoho (2016). "Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor." Molecular Pharmacology **89**(1): 142.

Chukyo, A., T. Chiba, T. Kambe, K. Yamamoto, K. Kawakami, K. Taguchi and K. Abe (2018). "Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity." Neuropeptides **67**: 95-101.

Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-524.

Cobos, E. J., J. M. Entrena, F. R. Nieto, C. M. Cendan and E. Del Pozo (2008). "Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands." Curr Neuropharmacol **6**(4): 344-366.

Cohen, M., J. Quintner and S. van Rysewyk (2018). "Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain." Pain Rep **3**(2): e634.

Colburn, R. W., M. L. Lubin, D. J. Stone, Jr., Y. Wang, D. Lawrence, M. R. D'Andrea, M. R. Brandt, Y. Liu, C. M. Flores and N. Qin (2007). "Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice." Neuron **54**(3): 379-386.

Corey, D. P., J. García-Añoveros, J. R. Holt, K. Y. Kwan, S. Y. Lin, M. A. Vollrath, A. Amalfitano, E. L. Cheung, B. H. Derfler, A. Duggan, G. S. Géléoc, P. A. Gray, M. P. Hoffman, H. L. Rehm, D. Tamasauskas and D. S. Zhang (2004). "TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells." Nature **432**(7018): 723-730.

Cosens, D. J. and A. Manning (1969). "Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant." Nature **224**(5216): 285-287.

Dai, Y., S. Wang, M. Tominaga, S. Yamamoto, T. Fukuoka, T. Higashi, K. Kobayashi, K. Obata, H. Yamanaka and K. Noguchi (2007). "Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain." The Journal of clinical investigation **117**(7): 1979-1987.

Davies, K. J. (2000). "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." IUBMB Life **50**(4-5): 279-289.

Davis, M. P. (2015). "Sigma-1 receptors and animal studies centered on pain and analgesia." Expert Opin Drug Discov **10**(8): 885-900.

De la Peña, E., A. Marcotti, J. Fernández-Trillo, A. González, A. Gomis and F. Viana (2019). "Modulation of the TRPA1 ion channel by sigma-1 receptor". Program No.218.18 2019 Neuroscience Meeting Chicago, IL. Society for Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neurosciencie. Online."

de la Puente, B., X. Nadal, E. Portillo-Salido, R. Sanchez-Arroyos, S. Ovalle, G. Palacios, A. Muro, L. Romero, J. M. Entrena, J. M. Baeyens, J. A. Lopez-Garcia, R. Maldonado, D. Zamanillo and J. M. Vela (2009). "Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury." Pain **145**(3): 294-303.

de la Roche, J., M. J. Eberhardt, A. B. Klinger, N. Stanslowsky, F. Wegner, W. Koppert, P. W. Reeh, A. Lampert, M. J. Fischer and A. Leffler (2013). "The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6." J Biol Chem **288**(28): 20280-20292.

Defalco, J., D. Steiger, A. Gustafson, D. E. Emerling, M. G. Kelly and M. A. Duncton (2010). "Oxime derivatives related to AP18: Agonists and antagonists of the TRPA1 receptor." Bioorg Med Chem Lett **20**(1): 276-279.

del Camino, D., S. Murphy, M. Heiry, L. B. Barrett, T. J. Earley, C. A. Cook, M. J. Petrus, M. Zhao, M. D'Amours, N. Deering, G. J. Brenner, M. Costigan, N. J. Hayward, J. A. Chong, C. M. Fanger, C. J. Woolf, A. Patapoutian and M. M. Moran (2010). "TRPA1 contributes to cold hypersensitivity." J Neurosci **30**(45): 15165-15174.

Descoeur, J., V. Pereira, A. Pizzoccaro, A. Francois, B. Ling, V. Maffre, B. Couette, J. Busserolles, C. Courteix, J. Noel, M. Lazdunski, A. Eschalier, N. Authier and E. Bourinet (2011). "Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors." EMBO Mol Med **3**(5): 266-278.

Deuis, J. R., L. S. Dvorakova and I. Vetter (2017). "Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents." Front Mol Neurosci **10**: 284.

Deuis, J. R., K. Zimmermann, A. A. Romanovsky, L. D. Possani, P. J. Cabot, R. J. Lewis and I. Vetter (2013). "An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways." Pain **154**(9): 1749-1757.

Dhaka, A., A. N. Murray, J. Mathur, T. J. Earley, M. J. Petrus and A. Patapoutian (2007). "TRPM8 is required for cold sensation in mice." Neuron **54**(3): 371-378.

Diaz, J. L., R. Cuberes, J. Berrocal, M. Contijoch, U. Christmann, A. Fernandez, A. Port, J. Holenz, H. Buschmann, C. Laggner, M. T. Serafini, J. Burgueno, D. Zamanillo, M. Merlos,

J. M. Vela and C. Almansa (2012). "Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of sigma(1) receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yloxy]ethyl}morpholine (S1RA, E-52862)." J Med Chem **55**(19): 8211-8224.

Dixon, W. J. (1965). "The Up-and-Down Method for Small Samples." Journal of the American Statistical Association **60**(312): 967-978.

Dixon, W. J. (1980). "Efficient analysis of experimental observations." Annu Rev Pharmacol Toxicol **20**: 441-462.

Doerner, J.F., and Clapham, D.E. (2018). Transient Receptor Potential channels. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY webpage. Last modified on 26/02/2018.

Eid, S. R., E. D. Crown, E. L. Moore, H. A. Liang, K.-C. Choong, S. Dima, D. A. Henze, S. A. Kane and M. O. Urban (2008). "HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity." Molecular pain **4**: 48-48.

Eid, S. R., E. D. Crown, E. L. Moore, H. A. Liang, K. C. Choong, S. Dima, D. A. Henze, S. A. Kane and M. O. Urban (2008). "HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity." Mol Pain **4**: 48.

Entrena, J. M., E. J. Cobos, F. R. Nieto, C. M. Cendan, G. Gris, E. Del Pozo, D. Zamanillo and J. M. Baeyens (2009). "Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice." Pain **143**(3): 252-261.

ESTEVE, L. from <https://www.esteve.com/es/investigacion-desarrollo/pipeline>.

Extra, J. M., M. Marty, S. Brienza and J. L. Misset (1998). "Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin." Semin Oncol **25**(2 Suppl 5): 13-22.

Fajardo, O., V. Meseguer, C. Belmonte and F. Viana (2008). "TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence." J Neurosci **28**(31): 7863-7875.

Fernandes, E. S., M. A. Fernandes and J. E. Keeble (2012). "The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves." Br J Pharmacol **166**(2): 510-521.

Fernández-Peña (2015). Los canales iónicos termosensibles TRPM8 y TRPA1: papel en la termosensación y termorregulación en condiciones fisiológicas y en un modelo experimental de neuropatía inducida por el oxaliplatino, Universidad Miguel Hernández.

Ferrandiz-Huertas, C., S. Mathivanan, C. J. Wolf, I. Devesa and A. Ferrer-Montiel (2014). "Trafficking of ThermoTRP Channels." Membranes (Basel) **4**(3): 525-564.

Forstenpointner, J., V. C. Oberlojer, D. Naleschinski, J. Hoper, S. M. Helfert, A. Binder, J. Gierthmuhlen and R. Baron (2018). "A-Fibers Mediate Cold Hyperalgesia in Patients with Oxaliplatin-Induced Neuropathy." Pain Pract **18**(6): 758-767.

Fujita, F., K. Uchida, T. Moriyama, A. Shima, K. Shibasaki, H. Inada, T. Sokabe and M. Tominaga (2008). "Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice." J Clin Invest **118**(12): 4049-4057.

Fujita, F., K. Uchida, Y. Takayama, Y. Suzuki, M. Takaishi and M. Tominaga (2018). "Hypotonicity-induced cell swelling activates TRPA1." J Physiol Sci **68**(4): 431-440.

Gao, X. F., J. J. Yao, Y. L. He, C. Hu and Y. A. Mei (2012). "Sigma-1 receptor agonists directly inhibit Nav1.2/1.4 channels." PLoS One **7**(11): e49384.

Gauchan, P., T. Andoh, A. Kato and Y. Kuraishi (2009). "Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice." Neurosci Lett **458**(2): 93-95.

Gees, M., Y. A. Alpizar, B. Boonen, A. Sanchez, W. Everaerts, A. Segal, F. Xue, A. Janssens, G. Owsianik, B. Nilius, T. Voets and K. Talavera (2013). "Mechanisms of transient receptor potential vanilloid 1 activation and sensitization by allyl isothiocyanate." Mol Pharmacol **84**(3): 325-334.

Gees, M., G. Owsianik, B. Nilius and T. Voets (2012). "TRP channels." Compr Physiol **2**(1): 563-608.

Georgiadis, M. O., O. Karoutzou, A. S. Foscolos and I. Papanastasiou (2017). "Sigma Receptor (σ R) Ligands with Antiproliferative and Anticancer Activity." Molecules **22**(9).

Geppetti, P., N. A. Veldhuis, T. Lieu and N. W. Bunnett (2015). "G Protein-Coupled Receptors: Dynamic Machines for Signaling Pain and Itch." Neuron **88**(4): 635-649.

Glennon, R. A. (2005). "Pharmacophore identification for sigma-1 (sigma1) receptor binding: application of the "deconstruction-reconstruction-elaboration" approach." Mini Rev Med Chem **5**(10): 927-940.

Gonzalez-Cano, R., M. Merlos, J. M. Baeyens and C. M. Cendan (2013). "sigma1 receptors are involved in the visceral pain induced by intracolonic administration of capsaicin in mice." Anesthesiology **118**(3): 691-700.

Gonzalez, A., G. Ugarte, C. Restrepo, G. Herrera, R. Pina, J. A. Gomez-Sanchez, M. Pertusa, P. Orio and R. Madrid (2017). "Role of the Excitability Brake Potassium Current IKD in Cold Allodynia Induced by Chronic Peripheral Nerve Injury." J Neurosci **37**(12): 3109-3126.

Gris, G., M. Merlos, J. M. Vela, D. Zamanillo and E. Portillo-Salido (2014). "S1RA, a selective sigma-1 receptor antagonist, inhibits inflammatory pain in the carrageenan and complete Freund's adjuvant models in mice." Behav Pharmacol **25**(3): 226-235.

Gris, G., E. Portillo-Salido, B. Aubel, Y. Darbaky, K. Deseure, J. M. Vela, M. Merlos and D. Zamanillo (2016). "The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats." Sci Rep **6**: 24591.

Gromek, K. A., F. P. Suchy, H. R. Meddaugh, R. L. Wrobel, L. M. LaPointe, U. B. Chu, J. G. Primm, A. E. Ruoho, A. Senes and B. G. Fox (2014). "The oligomeric states of the purified sigma-1 receptor are stabilized by ligands." J Biol Chem **289**(29): 20333-20344.

Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.

Guitart, X., X. Codony and X. Monroy (2004). "Sigma receptors: biology and therapeutic potential." Psychopharmacology (Berl) **174**(3): 301-319.

Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.

Hanner, M., F. F. Moebius, A. Flandorfer, H. G. Knaus, J. Striessnig, E. Kempner and H. Glossmann (1996). "Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 8072-8077.

Hayashi, T. (2015). "Conversion of psychological stress into cellular stress response: roles of the sigma-1 receptor in the process." Psychiatry Clin Neurosci **69**(4): 179-191.

Hayashi, T. (2015). "Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotherapeutic drugs." J Pharmacol Sci **127**(1): 2-5.

Hayashi, T. and T. P. Su (2001). "Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 491-496.

Hayashi, T. and T. P. Su (2003). "Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export." J Pharmacol Exp Ther **306**(2): 718-725.

Hayashi, T. and T. P. Su (2007). "Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival." Cell **131**(3): 596-610.

Hellewell, S. B. and W. D. Bowen (1990). "A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain." Brain Res **527**(2): 244-253.

Herrera, Y., C. Katnik, J. D. Rodriguez, A. A. Hall, A. Willing, K. R. Pennypacker and J. Cuevas (2008). "sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel a (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca²⁺ influx in rat cortical neurons." J Pharmacol Exp Ther **327**(2): 491-502.

Hinman, A., H. H. Chuang, D. M. Bautista and D. Julius (2006). "TRP channel activation by reversible covalent modification." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(51): 19564-19568.
Hong, W. C., H. Yano, T. Hiranita, F. T. Chin, C. R. McCurdy, T. P. Su, S. G. Amara and J. L. Katz (2017). "The sigma-1 receptor modulates dopamine transporter conformation and cocaine binding and may thereby potentiate cocaine self-administration in rats." J Biol Chem **292**(27): 11250-11261.

Howard, J. and S. Bechstetd (2004). "Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors." Curr Biol **14**(6): R224-226.

Illias, A. M., A. C. Gist, H. Zhang, A. K. Kosturakis and P. M. Dougherty (2018). "Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the dorsal root ganglion contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity." Pain **159**(7): 1308-1316.

Jaquemar, D., T. Schenker and B. Trueb (1999). "An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts." J Biol Chem **274**(11): 7325-7333.

Jia, J., J. Cheng, C. Wang and X. Zhen (2018). "Sigma-1 Receptor-Modulated Neuroinflammation in Neurological Diseases." Front Cell Neurosci **12**: 314.

Jiang, Z., Z. Hu, L. Zeng, W. Lu, H. Zhang, T. Li and H. Xiao (2011). "The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria?" Free Radic Biol Med **50**(8): 907-917.

Jiao, L., D. D. Li, C. L. Yang, R. Q. Peng, Y. Q. Guo, X. S. Zhang and X. F. Zhu (2016). "Reactive oxygen species mediate oxaliplatin-induced epithelial-mesenchymal transition and invasive potential in colon cancer." Tumour Biol **37**(6): 8413-8423.

Johannessen, M., D. Fontanilla, T. Mavlyutov, A. E. Ruoho and M. B. Jackson (2011). "Antagonist action of progesterone at sigma-receptors in the modulation of voltage-gated sodium channels." Am J Physiol Cell Physiol **300**(2): C328-337.

Johannessen, M., S. Ramachandran, L. Riemer, A. Ramos-Serrano, A. E. Ruoho and M. B. Jackson (2009). "Voltage-gated sodium channel modulation by sigma-receptors in cardiac myocytes and heterologous systems." Am J Physiol Cell Physiol **296**(5): C1049-1057.

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

Joseph, E. K., X. Chen, O. Bogen and J. D. Levine (2008). "Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy." The journal of pain : official journal of the American Pain Society **9**(5): 463-472.

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

Jung, Y. and S. J. Lippard (2007). "Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage." Chem Rev **107**(5): 1387-1407.

Kandel, E. R. (2013). "Principles of neural science. 5th Edition. McGraw-Hill Medical."

Kang, K., V. C. Panzano, E. C. Chang, L. Ni, A. M. Dainis, A. M. Jenkins, K. Regna, M. A. Muskavitch and P. A. Garrity (2011). "Modulation of TRPA1 thermal sensitivity enables sensory discrimination in *Drosophila*." Nature **481**(7379): 76-80.

Karashima, Y., K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, K. Y. Kwan, R. Vennekens, B. Nilius and T. Voets (2009). "TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1273-1278.

Kawashiri, T., N. Egashira, K. Kurobe, K. Tsutsumi, Y. Yamashita, S. Ushio, T. Yano and R. Oishi (2012). "L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats." Mol Pain **8**: 7.

Kekuda, R., P. D. Prasad, Y. J. Fei, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1996). "Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1)." Biochem Biophys Res Commun **229**(2): 553-558.

Kelley, B. G. and P. G. Mermelstein (2011). "Progesterone blocks multiple routes of ion flux." Mol Cell Neurosci **48**(2): 137-141.

Kerstein, P. C., D. del Camino, M. M. Moran and C. L. Stucky (2009). "Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors." Mol Pain **5**: 19.

Kheradpezhoh, E., J. M. C. Choy, V. R. Daria and E. Arabzadeh (2017). "TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex." Open Biol **7**(4).

Kinoshita, M., Y. Matsuoka, T. Suzuki, J. Mirrieles and J. Yang (2012). "Sigma-1 receptor alters the kinetics of Kv1.3 voltage gated potassium channels but not the sensitivity to receptor ligands." Brain Res **1452**: 1-9.

Klionsky, L., R. Tamir, B. Gao, W. Wang, D. C. Immke, N. Nishimura and N. R. Gavva (2007). "Species-specific pharmacology of Trichloro(sulfanyl)ethyl benzamides as transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists." Mol Pain **3**: 39.

Knowlton, W. M., R. L. Daniels, R. Palkar, D. D. McCoy and D. D. McKemy (2011). "Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice." *PLoS One* **6**(9): e25894.

Koivisto, A., H. Chapman, N. Jalava, T. Korjamo, M. Saarnilehto, K. Lindstedt and A. Pertovaara (2014). "TRPA1: a transducer and amplifier of pain and inflammation." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **114**(1): 50-55.

Koivisto, A., N. Jalava, R. Bratty and A. Pertovaara (2018). "TRPA1 Antagonists for Pain Relief." *Pharmaceuticals (Basel)* **11**(4).

Kourrich, S. (2017). "Sigma-1 Receptor and Neuronal Excitability." *Handb Exp Pharmacol* **244**: 109-130.

Kourrich, S., T. Hayashi, J. Y. Chuang, S. Y. Tsai, T. P. Su and A. Bonci (2013). "Dynamic interaction between sigma-1 receptor and Kv1.2 shapes neuronal and behavioral responses to cocaine." *Cell* **152**(1-2): 236-247.

Kremeyer, B., F. Lopera, J. J. Cox, A. Momin, F. Rugiero, S. Marsh, C. G. Woods, N. G. Jones, K. J. Paterson, F. R. Fricker, A. Villegas, N. Acosta, N. G. Pineda-Trujillo, J. D. Ramírez, J. Zea, M. W. Burley, G. Bedoya, D. L. Bennett, J. N. Wood and A. Ruiz-Linares (2010). "A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome." *Neuron* **66**(5): 671-680.

Kumar, A., H. Kaur and A. Singh (2018). "Neuropathic Pain models caused by damage to central or peripheral nervous system." *Pharmacol Rep* **70**(2): 206-216.

Kurganov, E. and M. Tominaga (2017). "Dependence of heat-evoked TRPA1 activation on extracellular Ca²⁺." *Channels (Austin)* **11**(4): 271-272.

Kurganov, E., Y. Zhou, S. Saito and M. Tominaga (2014). "Heat and AITC activate green anole TRPA1 in a membrane-delimited manner." *Pflugers Arch* **466**(10): 1873-1884.

Kwan, K. Y., A. J. Allchorne, M. A. Vollrath, A. P. Christensen, D. S. Zhang, C. J. Woolf and D. P. Corey (2006). "TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction." *Neuron* **50**(2): 277-289.

Kwan, K. Y., J. M. Glazer, D. P. Corey, F. L. Rice and C. L. Stucky (2009). "TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons." *J Neurosci* **29**(15): 4808-4819.

Kwon, S. G., D. H. Roh, S. Y. Yoon, S. R. Choi, H. S. Choi, J. Y. Moon, S. Y. Kang, H. W. Kim, H. J. Han, A. J. Beitz, S. B. Oh and J. H. Lee (2016). "Role of peripheral sigma-1 receptors in ischaemic pain: Potential interactions with ASIC and P2X receptors." *Eur J Pain* **20**(4): 594-606.

Lee, M., S. Cho, K. Roh, J. Chae, J. H. Park, J. Park, M. A. Lee, J. Kim, C. K. Auh, C. H. Yeom and S. Lee (2017). "Glutathione alleviated peripheral neuropathy in oxaliplatin-treated mice by removing aluminum from dorsal root ganglia." Am J Transl Res **9**(3): 926-939.

Lee, S. P., M. T. Buber, Q. Yang, R. Cerne, R. Y. Cortes, D. G. Sprous and R. W. Bryant (2008). "Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel." Br J Pharmacol **153**(8): 1739-1749.

Leffler, A., R. M. Linte, C. Nau, P. Reeh and A. Babes (2007). "A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles TRPV2 and is blocked by gadolinium." Eur J Neurosci **26**(1): 12-22.

Lema, M. J., K. M. Foley and F. H. Hausheer (2010). "Types and epidemiology of cancer-related neuropathic pain: the intersection of cancer pain and neuropathic pain." Oncologist **15 Suppl 2**: 3-8.

Lewis, R., J. Li, P. J. McCormick, L. H. H. C and K. Jeevaratnam (2020). "Is the sigma-1 receptor a potential pharmacological target for cardiac pathologies? A systematic review." Int J Cardiol Heart Vasc **26**: 100449.

Liao, M., E. Cao, D. Julius and Y. Cheng (2013). "Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy." Nature **504**(7478): 107-112.

Lishko, P. V., E. Procko, X. Jin, C. B. Phelps and R. Gaudet (2007). "The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity." Neuron **54**(6): 905-918.

Liu, B., Y. Tai, A. I. Caceres, S. Achanta, S. Balakrishna, X. Shao, J. Fang and S. E. Jordt (2016). "Oxidized Phospholipid OxPAPC Activates TRPA1 and Contributes to Chronic Inflammatory Pain in Mice." PLoS One **11**(11): e0165200.

Llorian-Salvador, M., S. Gonzalez-Rodriguez, A. Lastra, M. T. Fernandez-Garcia, A. Hidalgo, L. Menendez and A. Baamonde (2016). "Involvement of CC Chemokine Receptor 1 and CCL3 in Acute and Chronic Inflammatory Pain in Mice." Basic Clin Pharmacol Toxicol **119**(1): 32-40.

Loeser, J. D. and R. D. Treede (2008). "The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology." Pain **137**(3): 473-477.

Logashina, Y. A., Y. V. Korolkova, S. A. Kozlov and Y. A. Andreev (2019). "TRPA1 Channel as a Regulator of Neurogenic Inflammation and Pain: Structure, Function, Role in Pathophysiology, and Therapeutic Potential of Ligands." Biochemistry (Mosc) **84**(2): 101-118.

Look, M. P. and E. Musch (1994). "Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients." Chemotherapy **40**(1): 8-15.

Louis, S. M., A. Jamieson, N. J. Russell and G. J. Dockray (1989). "The role of substance P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat." Neuroscience **32**(3): 581-586.

Luiz, A. P., D. I. MacDonald, S. Santana-Varela, Q. Millet, S. Sikandar, J. N. Wood and E. C. Emery (2019). "Cold sensing by Na(V)1.8-positive and Na(V)1.8-negative sensory neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **116**(9): 3811-3816.

Macpherson, L. J., A. E. Dubin, M. J. Evans, F. Marr, P. G. Schultz, B. F. Cravatt and A. Patapoutian (2007). "Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines." Nature **445**(7127): 541-545.

Madrid, R., E. de la Peña, T. Donovan-Rodriguez, C. Belmonte and F. Viana (2009). "Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels." J Neurosci **29**(10): 3120-3131.

Malik, B. and M. Stillman (2008). "Chemotherapy-induced peripheral neuropathy." Curr Neurol Neurosci Rep **8**(1): 56-65.

Malkia, A., M. Pertusa, G. Fernández-Ballester, A. Ferrer-Montiel and F. Viana (2009). "Differential role of the menthol-binding residue Y745 in the antagonism of thermally gated TRPM8 channels." Mol Pain **5**: 62.

Martin, W. R., C. G. Eades, J. A. Thompson, R. E. Huppler and P. E. Gilbert (1976). "The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog." J Pharmacol Exp Ther **197**(3): 517-532.

Matsumoto, R. R., W. D. Bowen, M. A. Tom, V. N. Vo, D. D. Truong and B. R. De Costa (1995). "Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism." Eur J Pharmacol **280**(3): 301-310.

Maurice, T., R. Martin-Fardon, P. Romieu and R. R. Matsumoto (2002). "Sigma(1) (sigma(1)) receptor antagonists represent a new strategy against cocaine addiction and toxicity." Neurosci Biobehav Rev **26**(4): 499-527.

Maurice, T., T. P. Su and A. Privat (1998). "Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism." Neuroscience **83**(2): 413-428.

McDonald, D. I., A. P. Luiz, Q. Millet, E. C. Emery and J. N. Wood (2020). "Silent cold-sensing neurons drive cold allodynia in neuropathic pain states." bioRxiv: 2020.2005.2002.073999.

McDonald, E. S. and A. J. Windebank (2002). "Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling." Neurobiol Dis **9**(2): 220-233.

McKemy, D. D., W. M. Neuhausser and D. Julius (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." Nature **416**(6876): 52-58.

McNamara, C. R., J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista, J. Siemens, K. L. Deranian, M. Zhao, N. J. Hayward, J. A. Chong, D. Julius, M. M. Moran and C. M. Fanger (2007). "TRPA1 mediates formalin-induced pain." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13525-13530.

Meents, J. E., M. J. Fischer and P. A. McNaughton (2016). "Agonist-induced sensitisation of the irritant receptor ion channel TRPA1." J Physiol **594**(22): 6643-6660.

Mei, J. and G. W. Pasternak (2001). "Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor." Biochem Pharmacol **62**(3): 349-355.

Memon, T., K. Chase, L. S. Leavitt, B. M. Olivera and R. W. Teichert (2017). "TRPA1 expression levels and excitability brake by K(V) channels influence cold sensitivity of TRPA1-expressing neurons." Neuroscience **353**: 76-86.

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

Merlos, M., L. Romero, D. Zamanillo, C. Plata-Salamán and J. M. Vela (2017). "Sigma-1 Receptor and Pain." Handb Exp Pharmacol **244**: 131-161.

Merskey H, A. F. D., Bonica JJ, Carmon A, Dubner R, Kerr FWL, Lindblom U, Mumford JM, Nathan PW, Noordenbos W, Pagni CA, Renner MJ, Sternbach RA, Sunderland S. (1979). "Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. ." PAIN **1979**;6:249–52.

Meseguer, V., Y. A. Alpizar, E. Luis, S. Tajada, B. Denlinger, O. Fajardo, J. A. Manenschijn, C. Fernández-Peña, A. Talavera, T. Kichko, B. Navia, A. Sánchez, R. Señarís, P. Reeh, M. T. Pérez-García, J. R. López-López, T. Voets, C. Belmonte, K. Talavera and F. Viana (2014). "TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins." Nat Commun **5**: 3125.

Meyer, R., M. Ringkamp, J. Campbell and S. Raja (2006). Peripheral mechanisms of cutaneous nociception: 3-34.

Minke, B., C. Wu and W. L. Pak (1975). "Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant." Nature **258**(5530): 84-87.

Mishra, A. K., T. Mavlyutov, D. R. Singh, G. Biener, J. Yang, J. A. Oliver, A. Ruoho and V. Raicu (2015). "The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands." Biochem J **466**(2): 263-271.

Miyake, T., S. Nakamura, M. Zhao, K. So, K. Inoue, T. Numata, N. Takahashi, H. Shirakawa, Y. Mori, T. Nakagawa and S. Kaneko (2016). "Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS." Nat Commun **7**: 12840.

Mizuno, K., T. Kono, Y. Suzuki, C. Miyagi, Y. Omiya, K. Miyano, Y. Kase and Y. Uezono (2014). "Goshajinkigan, a traditional Japanese medicine, prevents oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy by suppressing functional alteration of TRP channels in rat." J Pharmacol Sci **125**(1): 91-98.

Moehring, F., P. Halder, R. P. Seal and C. L. Stucky (2018). "Uncovering the Cells and Circuits of Touch in Normal and Pathological Settings." Neuron **100**(2): 349-360.

Monnet, F. P. and T. Maurice (2006). "The sigma1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects." J Pharmacol Sci **100**(2): 93-118.

Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-1323.

Moparthy, L., T. I. Kichko, M. Eberhardt, E. D. Hogestatt, P. Kjellbom, U. Johanson, P. W. Reeh, A. Leffler, M. R. Filipovic and P. M. Zygmunt (2016). "Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity." Sci Rep **6**: 28763.

Moparthy, L., S. Survery, M. Kreir, C. Simonsen, P. Kjellbom, E. D. Hogestatt, U. Johanson and P. M. Zygmunt (2014). "Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(47): 16901-16906.

Morales-Lázaro, S. L., R. González-Ramírez and T. Rosenbaum (2019). "Molecular Interplay Between the Sigma-1 Receptor, Steroids, and Ion Channels." **10**(419).

Moran, M. M. (2018). "TRP Channels as Potential Drug Targets." Annu Rev Pharmacol Toxicol **58**: 309-330.

Mori, T., T. Hayashi, E. Hayashi and T. P. Su (2013). "Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival." PLoS One **8**(10): e76941.

Mosavi, L. K., T. J. Cammett, D. C. Desrosiers and Z. Y. Peng (2004). "The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition." Protein Sci **13**(6): 1435-1448.

Mukhopadhyay, I., A. Kulkarni, S. Aranake, P. Karnik, M. Shetty, S. Thorat, I. Ghosh, D. Wale, V. Bhosale and N. Khairatkar-Joshi (2014). "Transient receptor potential ankyrin 1 receptor activation in vitro and in vivo by pro-tussive agents: GRC 17536 as a promising anti-tussive therapeutic." PLoS One **9**(5): e97005.

Nagata, K., A. Duggan, G. Kumar and J. Garcia-Anoveros (2005). "Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing." J Neurosci **25**(16): 4052-4061.

Nakagawa, T. and S. Kaneko (2017). "Roles of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 in Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy." Biological & pharmaceutical bulletin **40**(7): 947-953.

Nakatsuka, K., R. Gupta, S. Saito, N. Banzawa, K. Takahashi, M. Tominaga and T. Ohta (2013). "Identification of molecular determinants for a potent mammalian TRPA1 antagonist by utilizing species differences." J Mol Neurosci **51**(3): 754-762.

Nassini, R., M. Gees, S. Harrison, G. De Siena, S. Materazzi, N. Moretto, P. Failli, D. Preti, N. Marchetti, A. Cavazzini, F. Mancini, P. Pedretti, B. Nilius, R. Patacchini and P. Geppetti (2011). "Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation." Pain **152**(7): 1621-1631.

Nassini, R., S. Materazzi, S. Benemei and P. Geppetti (2014). "The TRPA1 channel in inflammatory and neuropathic pain and migraine." Rev Physiol Biochem Pharmacol **167**: 1-43.

Nativi, C., R. Galdani, E. Dragoni, L. Di Cesare Mannelli, S. Sostegni, M. Norcini, G. Gabrielli, G. la Marca, B. Richichi, O. Francesconi, M. R. Moncelli, C. Ghelardini and S. Roelens (2013). "A TRPA1 antagonist reverts oxaliplatin-induced neuropathic pain." Sci Rep **3**: 2005.

Naziroglu, M. and N. Braidy (2017). "Thermo-Sensitive TRP Channels: Novel Targets for Treating Chemotherapy-Induced Peripheral Pain." Front Physiol **8**: 1040.

Nguyen, L., B. P. Lucke-Wold, S. A. Mookerjee, J. Z. Cavendish, M. J. Robson, A. L. Scandinaro and R. R. Matsumoto (2015). "Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases." J Pharmacol Sci **127**(1): 17-29.

Nieto, F. R., C. M. Cendan, C. Sanchez-Fernandez, E. J. Cobos, J. M. Entrena, M. A. Tejada, D. Zamanillo, J. M. Vela and J. M. Baeyens (2012). "Role of sigma-1 receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain in mice." J Pain **13**(11): 1107-1121.

Nilius, B., G. Appendino and G. Owsianik (2012). "The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology." Pflugers Arch **464**(5): 425-458.

Nilius, B., J. Prenen and G. Owsianik (2011). "Irritating channels: the case of TRPA1." J Physiol **589**(Pt 7): 1543-1549.

Nilius, B. and A. Szallasi (2014). "Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine." Pharmacol Rev **66**(3): 676-814.

Oda, M., K. Saito, S. Hatta, Y. Kubo and O. Saitoh (2017). "Chemical and thermal sensitivity of medaka TRPA1 analyzed in heterologous expression system." Biochem Biophys Res Commun **494**(1-2): 194-201.

Oehler, B., K. Kistner, C. Martin, J. Schiller, R. Mayer, M. Mohammadi, R. S. Sauer, M. R. Filipovic, F. R. Nieto, J. Kloka, D. Pflucke, K. Hill, M. Schaefer, M. Malcangio, P. W. Reeh, A. Brack, R. Blum and H. L. Rittner (2017). "Inflammatory pain control by blocking oxidized phospholipid-mediated TRP channel activation." Sci Rep **7**(1): 5447.

Ogawa, H., K. Takahashi, S. Miura, T. Imagawa, S. Saito, M. Tominaga and T. Ohta (2012). "H(2)S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation." Neuroscience **218**: 335-343.

Olausson, H., J. Wessberg, I. Morrison, F. McGlone and A. Vallbo (2010). "The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents." Neurosci Biobehav Rev **34**(2): 185-191.

Ongun, S., A. Sarkisian and D. D. McKemy (2018). "Selective cold pain inhibition by targeted block of TRPM8-expressing neurons with quaternary lidocaine derivative QX-314." Commun Biol **1**: 53.

Ortiz-Renteria, M., R. Juarez-Contreras, R. Gonzalez-Ramirez, L. D. Islas, F. Sierra-Ramirez, I. Llorente, S. A. Simon, M. Hiriart, T. Rosenbaum and S. L. Morales-Lazaro (2018). "TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(7): E1657-e1666.

Owsianik, G., D. D'Hoedt, T. Voets and B. Nilius (2006). "Structure-function relationship of the TRP channel superfamily." Rev Physiol Biochem Pharmacol **156**: 61-90.

Pachman, D. R., R. Qin, D. K. Seisler, E. M. Smith, A. S. Beutler, L. E. Ta, J. M. Lafky, N. D. Wagner-Johnston, K. J. Ruddy, S. Dakhil, N. P. Staff, A. Grothey and C. L. Loprinzi (2015). "Clinical Course of Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Results From the Randomized Phase III Trial N08CB (Alliance)." J Clin Oncol **33**(30): 3416-3422.

Palmer, C. P., R. Mahen, E. Schnell, M. B. Djamgoz and E. Aydar (2007). "Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines." Cancer Res **67**(23): 11166-11175.

Pan, B., Y. Guo, W. M. Kwok, Q. Hogan and H. E. Wu (2014). "Sigma-1 receptor antagonism restores injury-induced decrease of voltage-gated Ca²⁺ current in sensory neurons." J Pharmacol Exp Ther **350**(2): 290-300.

Pan, Y. X., J. Mei, J. Xu, B. L. Wan, A. Zuckerman and G. W. Pasternak (1998). "Cloning and characterization of a mouse sigma1 receptor." J Neurochem **70**(6): 2279-2285.

Paniagua, N., R. Giron, C. Goicoechea, V. Lopez-Miranda, J. M. Vela, M. Merlos and M. I. Martin Fontelles (2017). "Blockade of sigma 1 receptors alleviates sensory signs of diabetic neuropathy in rats." Eur J Pain **21**(1): 61-72.

Panzano, V. C., K. Kang and P. A. Garrity (2010). "Infrared snake eyes: TRPA1 and the thermal sensitivity of the snake pit organ." Sci Signal **3**(127): pe22.

Park, S. B., C. S. Lin, A. V. Krishnan, D. Goldstein, M. L. Friedlander and M. C. Kiernan (2009). "Oxaliplatin-induced neurotoxicity: changes in axonal excitability precede development of neuropathy." Brain **132**(Pt 10): 2712-2723.

Paulsen, C. E., J. P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng and D. Julius (2015). "Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms." Nature **520**(7548): 511-517.

Peier, A. M., A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan and A. Patapoutian (2002). "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol." Cell **108**(5): 705-715.

Peier, A. M., A. J. Reeve, D. A. Andersson, A. Moqrich, T. J. Earley, A. C. Hergarden, G. M. Story, S. Colley, J. B. Hogenesch, P. McIntyre, S. Bevan and A. Patapoutian (2002). "A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes." Science **296**(5575): 2046-2049.

Penke, B., L. Fulop, M. Szucs and E. Frecska (2018). "The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases." Curr Neuropharmacol **16**(1): 97-116.

Pereira, A. F., F. F. B. de Oliveira, B. W. de Freitas Alves, K. L. S. de Menezes, A. K. V. de Mesquita, M. R. P. Lisboa, K. K. O. de Sousa and M. L. Vale (2018). "Neurotoxic effect of oxaliplatin: Comparison with its oxalate-free analogue cis-[PtII(1R,2R-DACH)(3-acetoxy-1,1-cyclobutanedicarboxylato)] (LLC-1402) in mice." Toxicol Appl Pharmacol **340**: 77-84.

Pereira, V., J. Busserolles, M. Christin, M. Devilliers, L. Poupon, W. Legha, A. Alloui, Y. Aissouni, E. Bourinet, F. Lesage, A. Eschalier, M. Lazdunski and J. Noël (2014). "Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception." Pain **155**(12): 2534-2544.

Petrus, M., A. M. Peier, M. Bandell, S. W. Hwang, T. Huynh, N. Olney, T. Jegla and A. Patapoutian (2007). "A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition." Mol Pain **3**: 40.

Phan, V. L., Y. Miyamoto, T. Nabeshima and T. Maurice (2005). "Age-related expression of sigma1 receptors and antidepressant efficacy of a selective agonist in the senescence-accelerated (SAM) mouse." J Neurosci Res **79**(4): 561-572.

Pinheiro Fde, V., J. G. Villarinho, C. R. Silva, S. M. Oliveira, V. Pinheiro Kde, D. Petri, M. F. Rossato, G. P. Guerra, G. Trevisan, M. Antonello Rubin, P. Geppetti, J. Ferreira and E. André (2015). "The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain." Eur J Pharmacol **747**: 105-113.

Pohóczky, K., J. Kun, B. Szalontai, É. Szőke, É. Sággy, M. Payrits, B. Kajtár, K. Kovács, J. L. Környei, J. Garai, A. Garami, A. Perkecz, L. Czeglédi and Z. Helyes (2016). "Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium." J Mol Endocrinol **56**(2): 135-149.

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

Prasad, P. D., H. W. Li, Y. J. Fei, M. E. Ganapathy, T. Fujita, L. H. Plumley, T. L. Yang-Feng, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1998). "Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene." J Neurochem **70**(2): 443-451.

Preti, D., G. Saponaro and A. Szallasi (2015). "Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists." Pharm Pat Anal **4**(2): 75-94.

Purves, D. (2018). "Neuroscience. 6th Edition. Sinauer Associates, Inc."

Romero, L., M. Merlos and J. M. Vela (2016). "Antinociception by Sigma-1 Receptor Antagonists: Central and Peripheral Effects." Adv Pharmacol **75**: 179-215.

Romero, L., D. Zamanillo, X. Nadal, R. Sanchez-Arroyos, I. Rivera-Arconada, A. Dordal, A. Montero, A. Muro, A. Bura, C. Segales, M. Laloya, E. Hernandez, E. Portillo-Salido, M. Escriche, X. Codony, G. Encina, J. Burgueno, M. Merlos, J. M. Baeyens, J. Giraldo, J. A. Lopez-Garcia, R. Maldonado, C. R. Plata-Salaman and J. M. Vela (2012). "Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization." Br J Pharmacol **166**(8): 2289-2306.

Ros Arlanzón, P. (2019). Estudio de la modulación del canal nociceptivo TRPA1 por progesterona.

Rosasco, M. G. and S. E. Gordon (2017). TRP Channels: What Do They Look Like? Frontiers in Neuroscience Neurobiology of TRP Channels. T. L. R. Emir. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis© 2018 by Taylor & Francis Group, LLC.: 1-9.

Ryskamp, D. A., S. Korban, V. Zhemkov, N. Kraskovskaya and I. Bezprozvanny (2019). "Neuronal Sigma-1 Receptors: Signaling Functions and Protective Roles in Neurodegenerative Diseases." **13**(862).

Sadofsky, L. R., A. N. Boa, S. A. Maher, M. A. Birrell, M. G. Belvisi and A. H. Morice (2011). "TRPA1 is activated by direct addition of cysteine residues to the N-hydroxysuccinyl esters of acrylic and cinnamic acids." Pharmacol Res **63**(1): 30-36.

Saif, M. W. and J. Reardon (2005). "Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy." Ther Clin Risk Manag **1**(4): 249-258.

Sakurai, M., N. Egashira, T. Kawashiri, T. Yano, H. Ikesue and R. Oishi (2009). "Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia." Pain **147**(1-3): 165-174.

Sanchez-Fernandez, C., J. M. Entrena, J. M. Baeyens and E. J. Cobos (2017). "Sigma-1 Receptor Antagonists: A New Class of Neuromodulatory Analgesics." Adv Exp Med Biol **964**: 109-132.

Sangeetha, P., U. N. Das, R. Koratkar and P. Suryaprabha (1990). "Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer." Free Radic Biol Med **8**(1): 15-19.

Sawada, Y., H. Hosokawa, A. Hori, K. Matsumura and S. Kobayashi (2007). "Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels." Brain Res **1160**: 39-46.

Schmidt, H. R. and A. C. Kruse (2019). "The Molecular Function of σ Receptors: Past, Present, and Future." Trends Pharmacol Sci **40**(9): 636-654.

Schmidt, H. R., S. Zheng, E. Gurpinar, A. Koehl, A. Manglik and A. C. Kruse (2016). "Crystal structure of the human sigma1 receptor." Nature **532**(7600): 527-530.

Schmidt, M., A. E. Dubin, M. J. Petrus, T. J. Earley and A. Patapoutian (2009). "Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane." Neuron **64**(4): 498-509.

Schumacher, M., R. Hussain, N. Gago, J. P. Oudinet, C. Mattern and A. M. Ghoumari (2012). "Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair." Front Neurosci **6**: 10.

Schwarz, S., P. Pohl and G. Z. Zhou (1989). "Steroid binding at sigma-"opioid" receptors." Science **246**(4937): 1635-1638.

Seth, P., Y. J. Fei, H. W. Li, W. Huang, F. H. Leibach and V. Ganapathy (1998). "Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain." J Neurochem **70**(3): 922-931.

Sherrington, C. S. (1906). "The integrative action of the nervous system." New Haven: Yale University Press.

Sisignano, M., R. Baron, K. Scholich and G. Geisslinger (2014). "Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain." Nat Rev Neurol **10**(12): 694-707.

Sittl, R., A. Lampert, T. Huth, E. T. Schuy, A. S. Link, J. Fleckenstein, C. Alzheimer, P. Grafe and R. W. Carr (2012). "Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(17): 6704-6709.

Sorge, R. E., J. C. S. Mapplebeck, S. Rosen, S. Beggs, S. Taves, J. K. Alexander, L. J. Martin, J.-S. Austin, S. G. Sotocinal, D. Chen, M. Yang, X. Q. Shi, H. Huang, N. J. Pillon, P. J. Bilan, Y. Tu, A. Klip, R.-R. Ji, J. Zhang, M. W. Salter and J. S. Mogil (2015). "Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice." Nature neuroscience **18**(8): 1081-1083.

Startek, J. B., B. Boonen, A. López-Requena, A. Talavera, Y. A. Alpizar, D. Ghosh, N. Van Ranst, B. Nilius, T. Voets and K. Talavera (2019). "Mouse TRPA1 function and membrane localization are modulated by direct interactions with cholesterol." Elife **8**.

Startek JB, Talavera K. "Lipid Raft Destabilization Impairs Mouse TRPA1 Responses to Cold and Bacterial Lipopolysaccharides". Int J Mol Sci. 2020;21(11):3826.

Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan and A. Patapoutian (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." Cell **112**(6): 819-829.

Su, T.P. (1982). "Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain." J Pharmacol Exp Ther **223**(2): 284-290.

Su, T. P., T. Hayashi, T. Maurice, S. Buch and A. E. Ruoho (2010). "The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator." Trends Pharmacol Sci **31**(12): 557-566.

Su, T. P., E. D. London and J. H. Jaffe (1988). "Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems." Science **240**(4849): 219-221.

Su, T. P., T. C. Su, Y. Nakamura and S. Y. Tsai (2016). "The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems." Trends Pharmacol Sci **37**(4): 262-278.

Sun, J. H., B. Yang, D. F. Donnelly, C. Ma and R. H. LaMotte (2006). "MCP-1 enhances excitability of nociceptive neurons in chronically compressed dorsal root ganglia." J Neurophysiol **96**(5): 2189-2199.

Sura, L., V. Zima, L. Marsakova, A. Hynkova, I. Barvik and V. Vlachova (2012). "C-terminal acidic cluster is involved in Ca²⁺-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel." J Biol Chem **287**(22): 18067-18077.

Tagashira, H., M. S. Bhuiyan, N. Shioda and K. Fukunaga (2014). "Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through sigma(1)-receptor in hypertrophic cardiomyocytes." Life Sci **95**(2): 89-100.

Takahashi, N., D. Kozai and Y. Mori (2012). "TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals." Front Physiol **3**: 324.

Takahashi, N., Y. Mizuno, D. Kozai, S. Yamamoto, S. Kiyonaka, T. Shibata, K. Uchida and Y. Mori (2008). "Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators." Channels (Austin) **2**(4): 287-298.

Takebayashi, M., T. Hayashi and T. P. Su (2004). "Sigma-1 receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuritogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution." Synapse **53**(2): 90-103.

Talavera, K., M. Gees, Y. Karashima, V. M. Meseguer, J. A. Vanoirbeek, N. Damann, W. Everaerts, M. Benoit, A. Janssens, R. Vennekens, F. Viana, B. Nemery, B. Nilius and T. Voets (2009). "Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1." Nat Neurosci **12**(10): 1293-1299.

Talavera, K., J. B. Startek, J. Alvarez-Collazo, B. Boonen, Y. A. Alpizar, A. Sanchez, R. Naert and B. Nilius (2019). "Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: from structure to disease." Physiol Rev.

Tan, C. H. and P. A. McNaughton (2016). "The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth." Nature **536**(7617): 460-463.

Taylor-Clark, T. E., M. A. McAlexander, C. Nassenstein, S. A. Sheardown, S. Wilson, J. Thornton, M. J. Carr and B. J. Udem (2008). "Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal." J Physiol **586**(14): 3447-3459.

Tchedre, K. T., R. Q. Huang, A. Dibas, R. R. Krishnamoorthy, G. H. Dillon and T. Yorio (2008). "Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(11): 4993-5002.

Trevisan, G., S. Materazzi, C. Fusi, A. Altomare, G. Aldini, M. Lodovici, R. Patacchini, P. Geppetti and R. Nassini (2013). "Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade." Cancer Res **73**(10): 3120-3131.

Trevisani, M., J. Siemens, S. Materazzi, D. M. Bautista, R. Nassini, B. Campi, N. Imamachi, E. Andre, R. Patacchini, G. S. Cottrell, R. Gatti, A. I. Basbaum, N. W. Bunnett, D. Julius and P. Geppetti (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.

Tsai, S.-Y. A., J.-Y. Chuang, M.-S. Tsai, X.-F. Wang, Z.-X. Xi, J.-J. Hung, W.-C. Chang, A. Bonci and T.-P. Su (2015). "Sigma-1 receptor mediates cocaine-induced transcriptional regulation by recruiting chromatin-remodeling factors at the nuclear envelope." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**(47): E6562-E6570.

Tsantoulas, C. and S. B. McMahon (2014). "Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain." Trends Neurosci **37**(3): 146-158.

Tsumura, M., U. Sobhan, M. Sato, M. Shimada, A. Nishiyama, A. Kawaguchi, M. Soya, H. Kuroda, M. Tazaki and Y. Shibukawa (2013). "Functional expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts." PLoS One **8**(12): e82233.

Vaupel, D. B. (1983). "Naltrexone fails to antagonize the sigma effects of PCP and SKF 10,047 in the dog." Eur J Pharmacol **92**(3-4): 269-274.

Viana, F. (2011). "Chemosensory properties of the trigeminal system." ACS Chem Neurosci **2**(1): 38-50.

Viana, F. (2016). "TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage." J Physiol **594**(15): 4151-4169.

Viana, F. (2018). "Nociceptors: thermal allodynia and thermal pain." Handb Clin Neurol **156**: 103-119.

Viana, F., E. de la Peña and C. Belmonte (2002). "Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression." Nature neuroscience **5**(3): 254-260.

Viana, F. and A. Ferrer-Montiel (2009). "TRPA1 modulators in preclinical development." Expert Opin Ther Pat **19**(12): 1787-1799.

Vidal-Torres, A., B. Fernandez-Pastor, A. Carceller, J. M. Vela, M. Merlos and D. Zamanillo (2014). "Effects of the selective sigma-1 receptor antagonist S1RA on formalin-induced pain behavior and neurotransmitter release in the spinal cord in rats." J Neurochem **129**(3): 484-494.

Vriens, J., G. Owsianik, T. Hofmann, S. E. Philipp, J. Stab, X. Chen, M. Benoit, F. Xue, A. Janssens, S. Kerselaers, J. Oberwinkler, R. Vennekens, T. Gudermann, B. Nilius and T. Voets (2011). "TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat." Neuron **70**(3): 482-494.

Watanabe, H., J. Vriens, S. H. Suh, C. D. Benham, G. Droogmans and B. Nilius (2002). "Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells." J Biol Chem **277**(49): 47044-47051.

Wei, H., M. M. Hamalainen, M. Saarnilehto, A. Koivisto and A. Pertovaara (2009). "Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals." Anesthesiology **111**(1): 147-154.

Wei, J. and G. M. Xiao (2013). "The neuroprotective effects of progesterone on traumatic brain injury: current status and future prospects." Acta Pharmacol Sin **34**(12): 1485-1490.

Weijl, N. I., F. J. Cleton and S. Osanto (1997). "Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity." Cancer Treat Rev **23**(4): 209-240.

White, F. A. and R. J. Miller (2010). "Insights into the regulation of chemokine receptors by molecular signaling pathways: functional roles in neuropathic pain." Brain Behav Immun **24**(6): 859-865.

Windebank, A. J. and W. Grisold (2008). "Chemotherapy-induced neuropathy." J Peripher Nerv Syst **13**(1): 27-46.

Wu, Z. and W. D. Bowen (2008). "Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation: constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells." J Biol Chem **283**(42): 28198-28215.

Xu, H., N. T. Blair and D. E. Clapham (2005). "Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism." J Neurosci **25**(39): 8924-8937.

Yamamoto, K., N. Chiba, T. Chiba, T. Kambe, K. Abe, K. Kawakami, I. Utsunomiya and K. Taguchi (2015). "Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration." Molecular pain **11**: 69-69.

Yarmolinsky, D. A., Y. Peng, L. A. Pogorzala, M. Rutlin, M. A. Hoon and C. S. Zuker (2016). "Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System." Neuron **92**(5): 1079-1092.

Yin, K., K. Zimmermann, I. Vetter and R. J. Lewis (2015). "Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways." Biochem Pharmacol **93**(2): 125-140.

Zamanillo, D., L. Romero, M. Merlos and J. M. Vela (2013). "Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain." Eur J Pharmacol **716**(1-3): 78-93.

Zhang, H. and J. Cuevas (2002). "Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons." J Neurophysiol **87**(6): 2867-2879.

Zhang, K., Z. Zhao, L. Lan, X. Wei, L. Wang, X. Liu, H. Yan and J. Zheng (2017). "Sigma-1 Receptor Plays a Negative Modulation on N-type Calcium Channel." Front Pharmacol **8**: 302.

Zhang, W., Y. Liu, X. Zhao, X. Gu and Z. Ma (2014). "The effect of intrathecal administration TRPA1 antagonists in a rat model of neuropathic pain." Anesth Analg **119**(1): 179-185.

Zhang, X. F., J. Chen, C. R. Faltynek, R. B. Moreland and T. R. Neelands (2008). "Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel." Eur J Neurosci **27**(3): 605-611.

Zhao, M., K. Isami, S. Nakamura, H. Shirakawa, T. Nakagawa and S. Kaneko (2012). "Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice." Mol Pain **8**: 55.

Zhao, X., Z. Tang, H. Zhang, F. E. Atianjoh, J. Y. Zhao, L. Liang, W. Wang, X. Guan, S. C. Kao, V. Tiwari, Y. J. Gao, P. N. Hoffman, H. Cui, M. Li, X. Dong and Y. X. Tao (2013). "A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing Kcna2 in primary afferent neurons." Nat Neurosci **16**(8): 1024-1031.

Zhou, Y., Y. Suzuki, K. Uchida and M. Tominaga (2013). "Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity." Nat Commun **4**: 2399.

Zubcevic, L., M. A. Herzik, Jr., B. C. Chung, Z. Liu, G. C. Lander and S. Y. Lee (2016). "Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel." Nat Struct Mol Biol **23**(2): 180-186.

Zurborg, S., B. Yurgionas, J. A. Jira, O. Caspani and P. A. Heppenstall (2007). "Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺." Nat Neurosci **10**(3): 277-279.

Zygmunt, P. M. and E. D. Hogestatt (2014). "TRPA1." Handb Exp Pharmacol **222**: 583-630.

8. ANEXO: PUBLICACIÓN

Joint nociceptor nerve activity and pain in an animal model of acute gout and its modulation by intra-articular hyaluronan

Aida Marcotti^a, Ana Miralles^a, Eduardo Dominguez^a, Eliseo Pascual^{b,c}, Ana Gomis^a, Carlos Belmonte^a, Elvira de la Peña^{a,*}

a. Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante, Spain.

b. Sección de Reumatología, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain.

c. Departamento de Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain.

* Corresponding author. Address: Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain. Tel.: 135 965919533. E-mail address: elvirap@umh.es (E. de la Peña).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.painjournalonline.com).

PAIN 159 (2018) 739–748 Copyright© 2018 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the International Association for the Study of Pain. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001137>

Abstract

The mechanisms whereby deposition of monosodium urate (MSU) crystals in gout activates nociceptors to induce joint pain are incompletely understood. We tried to reproduce the signs of painful gouty arthritis, injecting into the knee joint of rats suspensions containing amorphous or triclinic, needle MSU crystals. The magnitude of MSU-induced inflammation and pain behavior signs were correlated with the changes in firing frequency of spontaneous and movement-evoked nerve impulse activity recorded in single knee joint nociceptor saphenous nerve fibers. Joint swelling, mechanical and cold allodynia, and hyperalgesia appeared 3 hours after joint injection of MSU crystals. In parallel, spontaneous and movement-evoked joint nociceptor impulse activity raised significantly. Solutions containing amorphous or needle-shaped MSU crystals had similar inflammatory and electrophysiological effects. Intraarticular injection of hyaluronan (HA, Synvisc), a high-MW glycosaminoglycan present in the synovial fluid with analgesic effects in osteoarthritis, significantly reduced MSU-induced behavioral signs of pain and decreased the enhanced joint nociceptor activity. Our results support the interpretation that pain and nociceptor activation are not triggered by direct mechanical stimulation of nociceptors by MSU crystals, but are primarily caused by the release of excitatory mediators by inflammatory cells activated by MSU

crystals. Intra-articular HA decreased behavioral and electrophysiological signs of pain, possibly through its viscoelastic filtering effect on the mechanical forces acting over sensitized joint sensory endings and probably also by a direct interaction of HA molecules with the transducing channels expressed in joint nociceptor terminals.

Keywords: Gout, Arthritis, Hyaluronan, Nociceptors, Knee-joint inflammation, TRP channels.

1. Introduction

Gout is a disease caused by the deposition of monosodium urate (MSU) crystals on the surface of the joint cartilage and periarticular structures, leading to acute attacks of usually very painful arthritis. Notably, at intercritical periods, the disease is asymptomatic, despite the regular presence of needle-shaped urate crystals in the joint structures and synovial fluid (SF).^{38,40} This observation raises questions about the mechanisms whereby sodium urate induces the intense joint pain observed during gout flares and the contribution to this pain of a direct mechanical stimulation of synovial nociceptor sensory nerve terminals by the MSU crystals, besides the well-established interactions of MSU crystals with mononuclear phagocytes and neutrophils.^{10,45} These interactions activate the inflammasome, with the production of multiple proinflammatory products such as lysosomal enzymes, oxygen-derived free radicals, eicosanoids and cytokines, as well as oxidative stress and cell damage.^{29,31,53} Proinflammatory substances act on the various ion channel types involved in stimulus transduction and impulse coding by joint nociceptors,²² either opening them directly or modulating their opening probability.^{21,24,32,54,55} The final consequence is augmented impulse firing by joint nociceptors leading to spontaneous pain and mechanical and thermal hyperalgesia.^{33,49,50} However, the translation of the complex response triggered by MSU crystals in the joint into an excitation of joint nociceptor nerve terminals evoking gouty pain is still incompletely understood.

Hyaluronan (sodium hyaluronate, HA), a glycosaminoglycan polymer present in synovial membranes and SF, has been postulated as a lubricating agent and protective rheological buffer, reducing the force transmitted by movements to joint nociceptor nerve endings.^{3,19,20,46} In osteoarthritis and in joint inflammatory processes, the viscosity, concentration, and molecular weight (MW) of HA contained in the SF seem to be markedly reduced.³ This is also the case for the HA present in the SF of symptomatic gout patients.⁴⁷ Notably, restoration in osteoarthritic patients of SF rheological properties by intra-articular injection of high molecular weight hyaluronan (HMW-HA) alleviates pain.^{1,4,12} This pain reduction is apparently due to the attenuation by HA of the augmented nerve impulse discharges generated at sensitized joint nociceptor

fibers.^{3,19,20,46} There is experimental evidence that HMW-HA molecules dampen the transmission of external mechanical forces to stretch-activated channels of the cell membrane,⁴³ but recent data also indicate that HA reduces directly the opening probability of TRPV1 channels of joint nociceptor fibers,⁸ thus acting on the main final molecular target for many of the inflammatory mediators released in gout.^{9,14,26,27} In this study, we analyzed the time course and characteristics of knee joint pain behavior associated with knee-joint inflammation evoked by intra-articular injection of MSU crystals of different size and shape in rats, and studied the correlation between inflammatory signs and the changes in spontaneous and movement-evoked nerve impulse activity in knee-joint nociceptor fibers. We also used this experimental model of gouty arthritis to explore whether intra-articular injection of HMW-HA attenuates MSU-induced enhancement of joint nociceptor activity as occurs in osteoarthritis.

2. Methods

2.1. Animals

The study was performed in adult male Wistar rats weighing 300 to 350 g, housed singly in cages in sanitary ventilated animal rooms with controlled temperature (20°C), humidity (45%), and maintained on ad libitum food and water supply with 12 hours of light/dark cycles. All experimental procedures were performed according to the Spanish Royal Decree 53/2013 and the European Community Council directive 2010/63/EU. The Ethics Committee from Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain, approved this study.

2.2. Reagents

4.5 mg of MSU, purchased from Sigma (C₅H₃N₄O₃Na, MW 5 190.1 g/mol; St Louis, MO), was sterilized by UV light exposition during 1 hour and suspended afterward in sterile phosphate buffered saline (PBS) from Sigma (St Louis, MO). Monosodium urate suspensions prepared using Sigma's product appeared under the microscope as aggregates of amorphous, small crystals. Monosodium urate triclinic crystals were purchased from InvivoGen (C₅H₃N₄O₃Na, MW 5 190.1 g/mol; San Diego, CA). Suspensions of these crystals from InvivoGen were prepared in sterile PBS. Under the microscope, the appearance of these crystals is, as the conventional, large needle-shaped crystals seen in gouty SF. A sterile HMW-HA solution, commercially manufactured for human use as Synvisc (Sanofi Genzyme Biosurgery, Cambridge, MA) was purchased. Synvisc contains 80% (vol/vol) of Hylan A (MW ;6 3 106) and 20% (vol/vol) of Hylan B (vinyl sulfone crosslinked Hylan A) in 0.9% NaCl.

2.3. Inflammation of the knee joint

Sterile suspensions of MSU (4.5 mg in 50 mL PBS) containing either small and amorphous crystals (Sigma) or needle, aciculate, triclinic crystals (InvivoGen) were injected into the right knee joint of isoflurane-anesthetized rats. Rats of control groups received an intra-articular injection of the vehicle alone (50 mL of PBS).

2.4. Measurement of knee diameter

The mediolateral diameter of the knee joints was measured using an electronic digital micrometer. The relationship between the diameter values of treated joints, related to their value before treatment was used as an index of knee-joint edema.

2.5. Behavioral assays

Rats were habituated to the behavior room for a minimum of 3 hours before testing, and to the testing chamber for at least 1 hour before testing. The same investigator performed the scoring in all behavioral tests, which were blind in respect to the type of intraarticular solution injected. Animal's groups were also randomized.

2.5.1 Weight-bearing measurements

Pain related to knee-joint inflammation was assessed measuring right and left hind limb weight distribution using an incapitance tester device (Bioseb In vivo Research Instruments, Vitrolles, France). Rats were placed in an angled chamber positioned so that each hind paw rested on a horizontal force-transducing plate. The weight (g) borne by each hind limb was averaged over 5 seconds; 3 readings were taken and mean values then calculated. The hind limb weight-bearing behavior was measured on the same animals repeatedly along the course of the study. Results are expressed as % of asymmetry $\frac{\text{weight in contralateral limb} - \text{weight in ipsilateral limb}}{\text{total weight on both limbs}} \times 100$. Presence of asymmetry was considered a sign of hyperalgesia.

2.5.2. Mechanical threshold

Changes in hind paw withdrawal thresholds were assessed using mechanical stimulation with calibrated von Frey filaments BIOVF-M model from Bioseb (Bioseb In vivo Research Instruments, France). Thresholds were determined using a modified version of Dixon up-down method.¹¹ Rats were placed in transparent plastic cylinders on a metal mesh platform (23 × 1.5 mm) and von Frey filaments were applied to the plantar surface of a hind paw for up to 1 second. Brisk withdrawal of the hind paw during or immediately after application was considered a positive response. The threshold force required to

elicit withdrawal (50% hind paw withdrawals) was determined for left and right hind paws. The threshold force data are presented as the difference with baseline values, with negative value indicating mechanical allodynia. Threshold values were assessed in rats before (baseline) and 3, 5, and 8 hours after injection in the right knee joint of MSU or vehicle (PBS) solutions. In a different group of rats, after baseline values were obtained, the corresponding MSU solution was injected in the right knee joint and mechanical threshold evaluated 3 hours later. Immediately afterward, an injection of Synvisc was performed and mechanical threshold evaluated again 2 and 5 hours later. In these animals, change in the von Frey threshold is expressed as the difference between threshold values after treatment minus baseline threshold.

2.5.3. Acetone testing

To test acetone-evoked evaporative cooling-induced sensations, rats were placed within a round plastic chamber on a metal mesh platform. A drop (100 μ L) of acetone was applied sequentially onto the plantar surface of both left and right hind paws, and the number of lifting, licking, biting, shaking, and guarding nocifensive events was counted over the next 60 seconds. The number of events counted after treatment was divided by the number before treatment (baseline value); thus, a quotient value close to 1 indicates no difference with the baseline situation, whereas a higher value reflected cold allodynia.

2.6. Air pouch model

The rat air pouch model of synovial cavity was used.⁶ Male Wistar rats (300 g) were anaesthetized using isoflurane and injected subcutaneously with 20 μ L of sterile air (gauge syringe with 0.22- mm filter) on the dorsal surface, just behind the scapula. The procedure was repeated 3 and 6 days after the first air injection. Then, rats with air pouches were anaesthetized using isoflurane and an 18-G cannula was inserted into the air pouch to inject 5 μ L of a 1-mg/mL solution of amorphous or needle-shaped MSU crystals, or PBS alone. A 400- μ L sample of air pouch fluid was removed immediately and 5 hours after injection, and collected into ethylenediaminetetraacetic acid (10 mM final concentration). Fifty microliters of this sample were used for flow cytometry.

2.7. Analysis of exudate cells by flow cytometry.

Flow cytometry was performed using a FACSAria II flow cytometer. CD45 antibody (FITC Mouse Anti-Rat CD45; BD Pharmingen, San Jose, CA) was used to identify leukocyte population. From samples collected at 0 and 5 hours, 50 μ L were centrifuged for 10 minutes at 3303g and then resuspended in 99 μ L of FACS buffer (PBS 10.5% bovine

serumalbumin12-mMethylenediaminetetraacetic acid). Cells were treated for 10 minutes at 4°C with 1-mL CD45-antibody (0.5 mg/mL). Then, 1 mL of FACS buffer was added and the suspension centrifuged for 10 minutes at 330 3 g. The supernatant was removed and cells resuspended in 200 mL of FACS buffer for the analysis by flow cytometry. CD45 (leukocyte common antigen) is ubiquitously expressed in all nucleated hematopoietic cells excluding erythrocytes.

2.8. Electrophysiological recordings in rat knee-joint afferent fibers

The detailed procedure for recording of joint nociceptor fibers in vivo has been reported previously.¹⁸ Animals were initially anaesthetized using ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) (intraperitoneally) followed by an injection of 40 mg/kg (i.p.) of sodium pentobarbital for deep anesthesia. Supplementary doses of sodium pentobarbital were injected intraperitoneally when required. The trachea, the left femoral vein, and femoral artery were cannulated. Body temperature was maintained at physiological levels. Heart frequency and blood pressure values were continuously monitored to evaluate the anesthesia level. The right femur was fixed by a special grip, and a pool was formed by skin flaps and filled with warm paraffin oil. The saphenous nerve from the right leg was cut and dissected. Fine filaments were split from the peripheral end and placed over a silver wire electrode for extracellular recording, until a functional single unit was obtained. The receptive fields of knee-joint afferent units were identified and located by probing the tissue over the knee joint and its surroundings with a hand-held glass rod. Thereafter, the receptive field of the nerve fiber was electrically stimulated (5-15 V for 0.5 ms) to calculate the conduction velocity from the latency of the evoked impulse and the distance measured between the stimulating and recording electrodes. Mechanical stimulation was performed every 5 minutes and started from the middle flexed (resting) position of the joint and consisted of a passive, manually performed 10-second outward rotation (OR) within the working range of the joint (10-20 mNm, innocuous OR) followed by an OR of 10-second duration, which exceeded the normal working range of the joint (40-60 mNm, noxious outward rotation, NOR). Thereafter, the joint was returned to the resting position for 10 seconds and the same 2 steps were performed using inward rotations (innocuous, IR and noxious, NIR). Rotation to 10 to 20 mN was considered innocuous because at this intensity, the hind limb could be rotated to the end of the normal movement range without appreciable force. Rotation to 40 mNm was considered noxious because these rotations were performed against the resistance of the joint structures.^{18-20,51,52} The discharges recorded during the movements were analyzed by counting the total number of impulses obtained during the complete cycle ie, OR1NOR1IR1NIR. Also, the number of impulses evoked by each of these 4 movements was counted separately. The impulses recorded during the nonnoxious and noxious movements (outward and inward

movements) were added separately (OR 1 IR and NOR 1 NIR). Movement-evoked activity varied widely among individual fibers because of their different exposure to mechanical stress depending on the location of the receptive field in the joint. For this reason, impulse responses were normalized taking the preinjection values of activity as 100% response (control) and expressing the effects of experimental maneuvers as percentage of this value.

2.9. Statistical analysis

Statistical comparisons were made using GraphPad Prism. We used the paired t test to compare changes in the animals before and after treatments and unpaired t test for comparison between animal groups, as indicated.

3. Results

3.1. *Intra-articular injection of monosodium urate crystals induces knee-joint inflammation and behavioral signs of pain*

Three hours after intra-articular injection of MSU solutions containing either amorphous (n = 10) or needled crystals (n = 7), the joint volume had increased, as reflected in the significantly larger joint diameter that persisted 5 and 8 hours later, in contrast with rats injected with PBS (n = 12) where no joint diameter change was observed (Figs. 1B and C). Amorphous crystals produced a significantly larger diameter increase than needle crystals ($\Delta = 1.9 \pm 0.3$, n = 10 and $\Delta = 1.01 \pm 0.3$, n = 8, respectively, Student t test P = 0.04*). Weight-bearing asymmetry between hind limbs was significantly larger in MSU-traded animals but did not differ with the type of crystals injected (Fig.1D). Before MSU injection, body weight distribution between legs was very similar (mean baseline asymmetry $2 \pm 1\%$ n 5 10), whereas 3 hours after injection of both types of MSU crystals, asymmetry raised around 30%, ie, approximately 70% of the weight was now supported by the noninjected hind limb (see methods); a modest recovery was observed 5 and 8 hours later (Fig. 1D). In Supplementary Figure 1, results were represented using the raw data (available online as supplemental digital content at <http://links.lww.com/PAIN/A524>).

In the same groups of rats, von Frey mechanical threshold was measured in the paw of the injected limb. Three hours after intra-articular injection of urate crystals, mechanical threshold was significantly lower, but not influenced by the type of crystal (amorphous crystals 1.4 ± 0.5 g, baseline value = 5.5 ± 1.1 g, n = 7, needle crystals 1.0 ± 0.2 , baseline value = 4.8 ± 0.5 , n = 7), and it was smaller than in rats injected with PBS alone (Fig.1E).

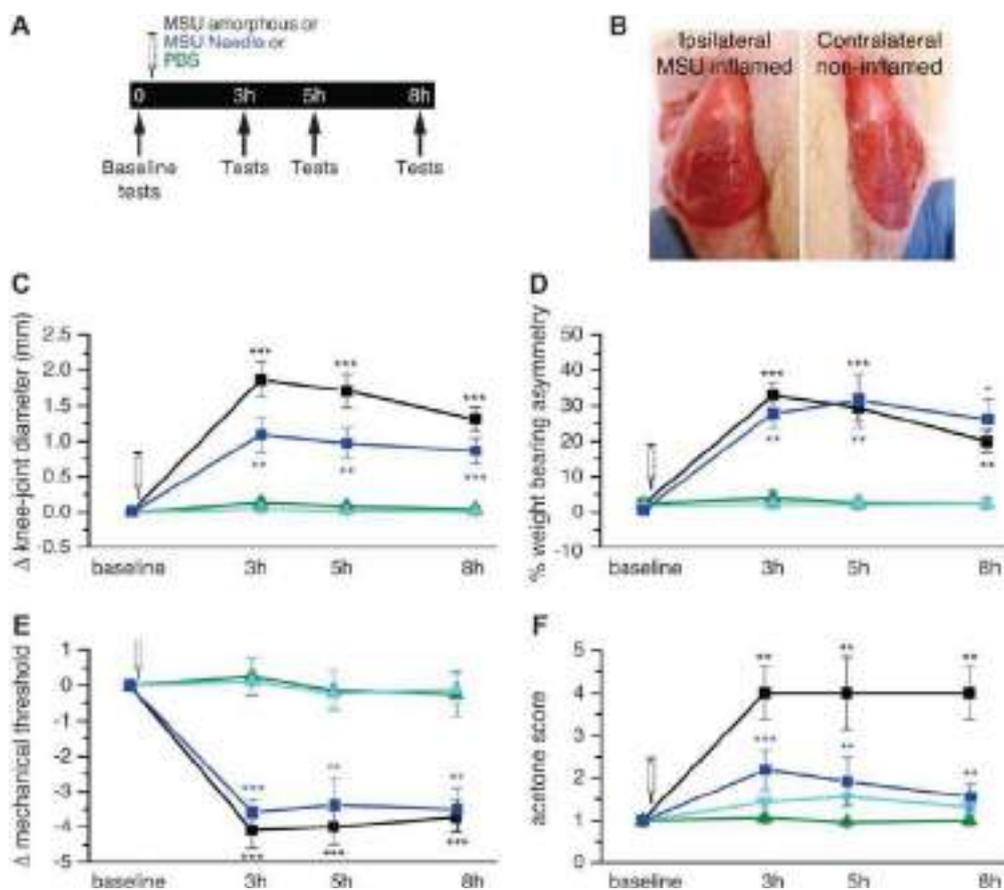


Figure 1. Nocifensive responses in rats evoked by intra-articular injection of MSU crystals. (A) Timeline of behavioral experiments after injection of amorphous or needle MSU crystals or PBS into the right knee joint; arrows signal the time at which experimental measures were performed. (B) Images of the knee joints exposed by removal of the skin, in the MSU-injected (left panel) and the contralateral, non-injected (right panel) hind limb. (C-F) Change in knee-joint diameter (C), % weightbearing asymmetry (D), von Frey mechanical threshold (E) and cold (acetone) sensitivity (F), measured 3, 5, and 8 hours after ipsilateral injection of: amorphous MSU (black, n = 10); needle MSU (blue, n = 7); PBS (green, n = 12), and in untreated joint (cyan, n = 12). Paired t test ***P < 0.001, **P < 0.01 with baseline values. MSU, monosodium urate; PBS, phosphate buffered saline.

The reduction in mechanical threshold reflecting mechanical allodynia persisted 5 and 8 hours after MSU injection. These rats also exhibited an enhanced sensibility to acetone-induced cooling evoked in the paw of the injected side (cold allodynia). Three hours after MSU injection, the response was 2 (needle) and 4 (amorphous) times higher than before MSU, or than after injection of PBS (Fig. 1F). Sensitization to cold persisted 8 hours after injection of MSU amorphous crystals, whereas when needle crystals were injected, a modest recovery was observed 5 and 8 hours later. Mechanical and thermal sensitivity at the untreated, contralateral hind limb did not change after the ipsilateral MSU injection (data not shown).

The level of inflammation induced by MSU amorphous and needle crystals was evaluated as the number and profile of leukocytes measured by flow cytometry in the exudate recruited in the air pouch gout model. Five hours after injection of either amorphous or needle-shaped MSU crystals, forward scatter and side scatter revealed

the appearance of the 3 CD45 positive cell populations corresponding to lymphocyte, macrophage, and granulocyte. PBS evoked a much smaller cellular recruitment response, in which granulocytes were absent (Supplementary Figure 2, available online as supplemental digital content at <http://links.lww.com/PAIN/A524>).

3.2. Movement-evoked nerve impulse activity in knee-joint sensory fibers increases after monosodium urate injection

Activity in 25 single units obtained from saphenous nerve filaments of 24 rats was recorded. All units included in this study responded in a variable degree to both non noxious and noxious movements of the knee joint (see methods). Conduction velocity measured at the end of the experiment in 10 units ranged between 0.7 and 5.25 m/s, (average 2.16 ± 0.39 m/s).

Figure 2A shows an example of the nerve impulse firing and the corresponding instantaneous frequency change in a single joint nerve fiber, evoked by mechanical stimulation before (control) and 3 hours after intra-articular injection of a MSU amorphous crystals solution (intra-articular MSU). Rotations within the normal working range (nonnoxious OR and IR) generated an impulse activity that increased markedly when rotation exceeded the working range (noxious outward rotation, NOR and noxious inward rotation, NIR). The firing responses to movement were clearly enhanced 3 hours after intra-articular MSU crystals injection.

Figure 2B represents the values of movement-evoked impulse responses, obtained by pooling the data of all the explored units, after injection of amorphous (n = 5, black symbols) and needle (n = 8, blue symbols) crystals or PBS (n = 7, green symbols), to illustrate the gradual rise with time of the movement-evoked mean impulse activity in MSU-treated rats in contrast with PBS injected animals. In Figure 2C, we represented the mean values of the impulse activity evoked by 12 movements (60 minutes), measured 1, 2, and 3 hours after PBS (green bars), amorphous (black bars), and needle MSU crystals (blue bars), and expressed as percent of the response obtained during the respective preinjection, control periods. The actual values in number of impulses/movement are presented in Supplementary Table 1 (available online as supplemental digital content at <http://links.lww.com/PAIN/A524>). Comparison between the effects on the firing response of MSU crystals and PBS 3 hours after injection confirmed that the impulse activity was significantly higher (155% in average) in MSU-treated rats (Fig. 2C), whereas the morphology of the injected crystals did not affect the magnitude of the nerve impulse discharges.

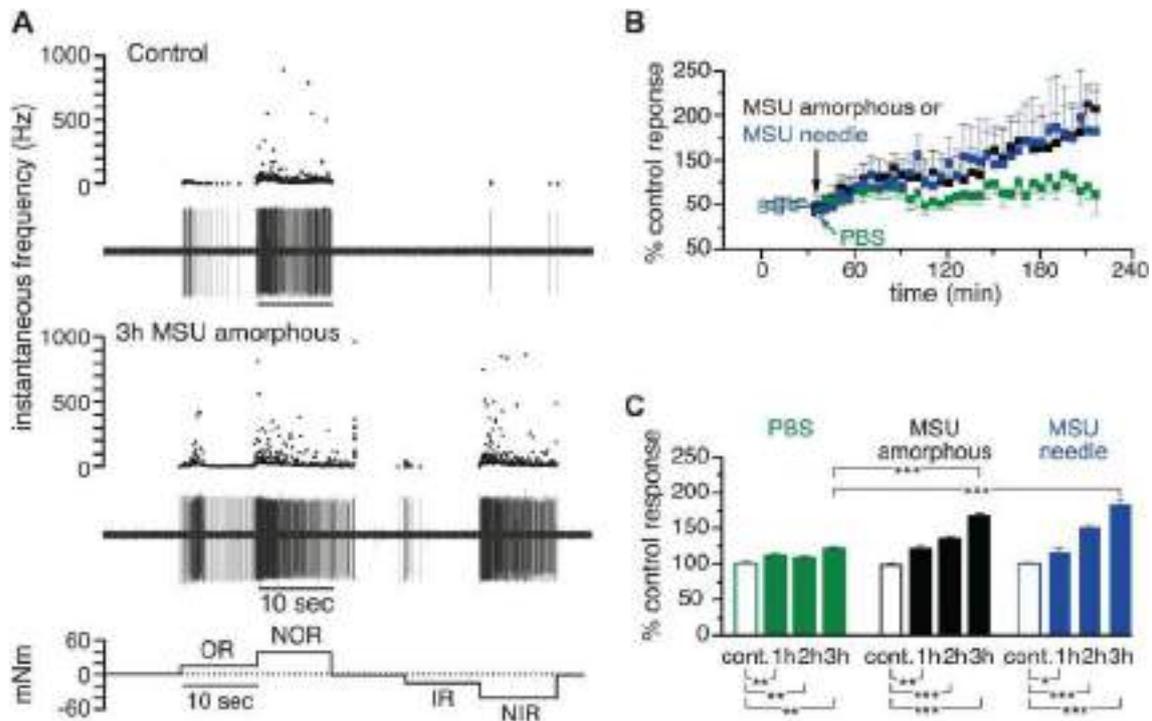


Figure 2. Sensitization of knee-joint sensory fibers by MSU-evoked inflammation. (A) Sample recordings of nerve impulse activity produced by a single fiber innervating the knee joint, before (upper panel) and after (middle panel) intra-articular amorphous MSU injection. Impulse activity is displayed as instantaneous frequency (dots, top) and as the original nerve impulse records (spikes, bottom). The lower panel depicts the sequence of nonnoxious (OR and IR) and noxious (NOR and NIR) knee-joint rotations. (B) Mean value of the total number of movement-evoked impulses (OR 1 NOR 1 IR 1 NIR) measured before and after intra articular injection of amorphous MSU (black symbols, $n = 5$), MSU needle crystals (blue symbols, $n = 8$), or PBS (green symbols, $n = 7$). Values are expressed as percentage of the average control response (mean of the 6 movements, before injection, indicated by the arrows). (C) Mean values of movement-evoked impulse activity in joints injected with PBS (green columns), needle MSU (blue columns), or amorphous MSU (black columns). The first column (control) shows the mean value of the 6 consecutive movements preceding intra-articular injections; the remaining columns show the mean value of impulse discharges evoked by 12 consecutive movements measured 1, 2, and 3 hours after intra-articular injection of PBS or MSU. Paired and unpaired t test, * $P,0.05$, ** $P,0.01$, *** $P,0.001$. IR, inward rotation; MSU, monosodium urate; NIR, noxious inward rotation; NOR, noxious outward rotation; OR, outward rotation; PBS, phosphate buffered saline.

A similar analysis was applied, separating the firing discharges that occur during the movements performed within the working range (OR and IR), from those obtained during movements into the noxious range (NOR and NIR, Fig. 2C). As illustrated in Figures 3A and B, the gradual increase in movement-evoked firing after injection of MSU amorphous (black symbols) or needled (blue symbols) crystal solutions was present both in the response to nonnoxious and to noxious stimuli. In both cases, this increase developed gradually along the time of recording (3 hours). By contrast, changes observed in the group of rats where PBS was injected were negligible (green symbols). In Figures 3C and D, we summarized the mean increase in movement-evoked responses to nonnoxious and noxious movements, at different times after the injection 3 hours earlier of both types of MSU crystals or PBS. The data evidence that 3 hours after MSU

amorphous and needle crystals injection, the mean impulse response to nonnoxious movements had increased strikingly, being respectively 136% and 110% of the response obtained with PBS injection alone. For noxious movements, firing was respectively 43% and 52% higher than after PBS; differences were, in all cases, significant. The actual values of number of impulses/movement during nonnoxious and noxious movements under the different treatments are presented in Supplementary Table 2 (available online as supplemental digital content at <http://links.lww.com/PAIN/A524>).

3.3. Background impulse activity on knee-joint sensory fibers at rest also increases during MSU-evoked inflammation

We also measured whether the incidence of spontaneous impulses, occasionally fired during the intervals between joint rotations, changed after intra-articular injection of amorphous or aciculate crystals. During the control recording period (first 6 movements in 30 min) detectable ongoing activity (defined as a mean firing frequency value $.01$ imps/s) explored in 12 fibers was detected in 5 of them, with an average value of 0.03 ± 0.02 imps/s ($n = 5$). In a group of rats that had received 3 hours earlier an injection of solution of amorphous MSU crystals, ongoing activity was present in 7 of 14 fibers, with a mean firing frequency of 0.36 ± 0.1 imps/s ($n = 7$), a value that was 10 times higher than before MSU treatment (Student t test $**P < 0.01$). When MSU needle crystals were intra-articularly injected at 3 hours, the ongoing activity was present in 4 of 9 fibers, with a mean frequency of 0.12 ± 0.01 imps/s ($n = 4$), 4 times higher than in control conditions in this occasion (Student t test $**P < 0.01$). There were no statistically significant differences between amorphous and needle crystals. Eight hours after injection of MSU amorphous crystals, ongoing activity, measured in 7 fibers during the second and fourth hour recording periods, was present in 5 fibers (mean firing frequency 0.56 ± 0.1 imps/s; $n = 5$, $P < 0.01$). Altogether, these data confirm that MSU-evoked inflammation produced sensitization in a significant number of movement-sensitive joint sensory nerve fibers.

3.4. High molecular weight hyaluronan (Synvisc) attenuates the behavioral signs of pain and the increased impulse firing caused by monosodium urate-evoked inflammation

Ten rats treated with MSU amorphous and 8 treated with MSU needle crystals received 3 hours later an injection (50 mL) of Synvisc within the inflamed knee joint. Pain behavioral tests were performed 5 hours and 8 hours after the initial MSU injection. Figure 4 shows the changes in knee-joint diameter, weightbearing asymmetry, and mechanical and cold sensitivity expressed as percent of the peak values measured at various times after injection of amorphous (black, $n = 10$) or needle MSU crystals (blue, $n = 8$), in rats additionally injected with Synvisc (red bars) and in untreated rats (black, $n = 7$ or blue bars, $n = 7$). Five hours after Synvisc treatment, pain behavior parameters

were significantly lower in comparison with Synvisc-untreated animals (black bars for amorphous or blue bars for needle MSU); weightbearing asymmetry was respectively 53% and 79% lower, mechanical allodynia 52% and 62%, and cold allodynia 30% and 50%.

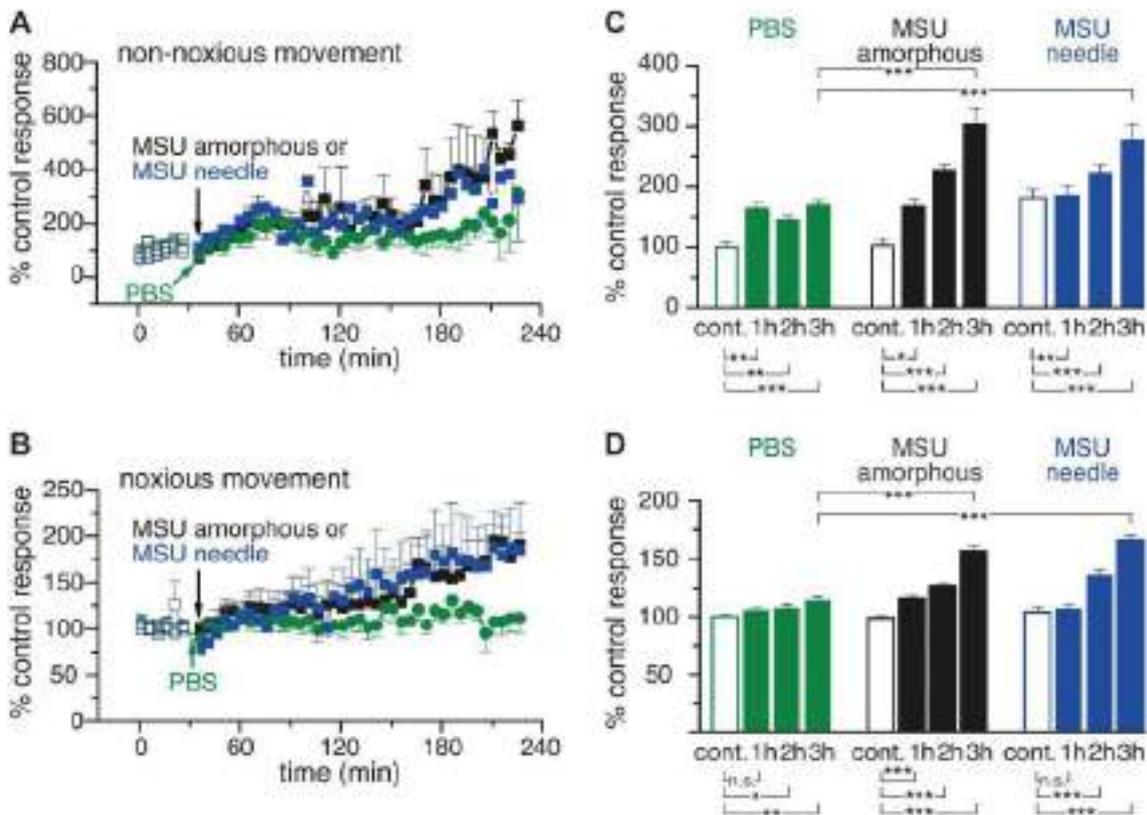


Figure 3. Sensitization by MSU-driven inflammation of the response of knee-joint sensory fibers to nonnoxious and noxious rotations. (A and B) Time course of the change in mean number of movement-evoked impulses evoked by nonnoxious (OR 1 IR) and noxious (NOR 1 NIR) rotations after intra-articular injection of amorphous MSU (black symbols, $n = 5$), MSU needle crystals (blue symbols, $n = 8$), or PBS (green symbols, $n = 7$); values are expressed as percentage of the average control response (mean of the 6 movements before intra-articular injection of the tested solution, which is indicated by the arrows). (C and D) Mean values of nonnoxious (C) and noxious (D) movement-evoked impulse activity in joints injected with PBS (green columns), needle MSU crystals (blue columns), or amorphous MSU (black columns). The first column (control) shows the mean value of the 6 consecutive movements preceding intra-articular injections; the remaining columns show the mean value of impulse discharges evoked by 12 consecutive movements measured 1, 2, and 3 hours after intra-articular injection of PBS or MSU. Paired and unpaired t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. IR, inward rotation; MSU, monosodium urate; NIR, noxious inward rotation; NOR, noxious outward rotation; OR, outward rotation; PBS, phosphate buffered saline.

In a separate group of 23 rats, we also explored the possibility that hyaluronan influenced the increase in nociceptor impulse activity observed after MSU injection. For this purpose, an amorphous MSU crystal solution was injected intra-articularly and 3 hours later (the time to reach the inflammation peak, Figs. 1C–F), nerve impulse activity was recorded during 1 hour while performing complete movement cycles every 5 minutes. At the end of this period, Synvisc ($n = 7$) or NaCl 0.9% solution (the vehicle of Synvisc, $n = 9$) were injected into the MSU-inflamed joint, maintaining the recording of

movement-evoked impulse activity along the following 4 hours and alternating 1 hour of movement application with a pause of 1 hour to reduce the risk of mechanical injury of the joint caused by the repeated stimulation. In an additional group of 7 rats, the same protocol was followed but no Synvisc injection was performed.

Figure 5A shows that the magnitude of the firing response to repeated, complete joint movement cycles raised gradually (black squares). In rats receiving Synvisc (whose control response values are represented by empty red circles), mean movement-evoked impulse activity was lower (solid red circles) 2 and 4 hours after hyaluronan treatment while activity did not change in rats receiving saline (purple triangles). The effect of Synvisc is illustrated in the sample recordings of the impulse firing of a single nociceptor unit previously sensitized by a MSU injection, before and 2 hours after Synvisc (Fig. 5B). The decrease produced by Synvisc in total movement-evoked firing activity affected the impulse discharge produced both by the innocuous (230%, n = 6) and the noxious (240%, n = 7) components of the movement (Figs. 5C and D, red bars). By contrast, impulse activity did not change significantly in MSU inflamed animals that were not injected or that received an injection of saline instead of Synvisc (Figs. 5C and D, black and purple bars). Supplementary Table 3 presents the mean number of impulses/movement measured during the different recording periods shown in Figure 5 (available online as supplemental digital content at <http://links.lww.com/PAIN/A524>).

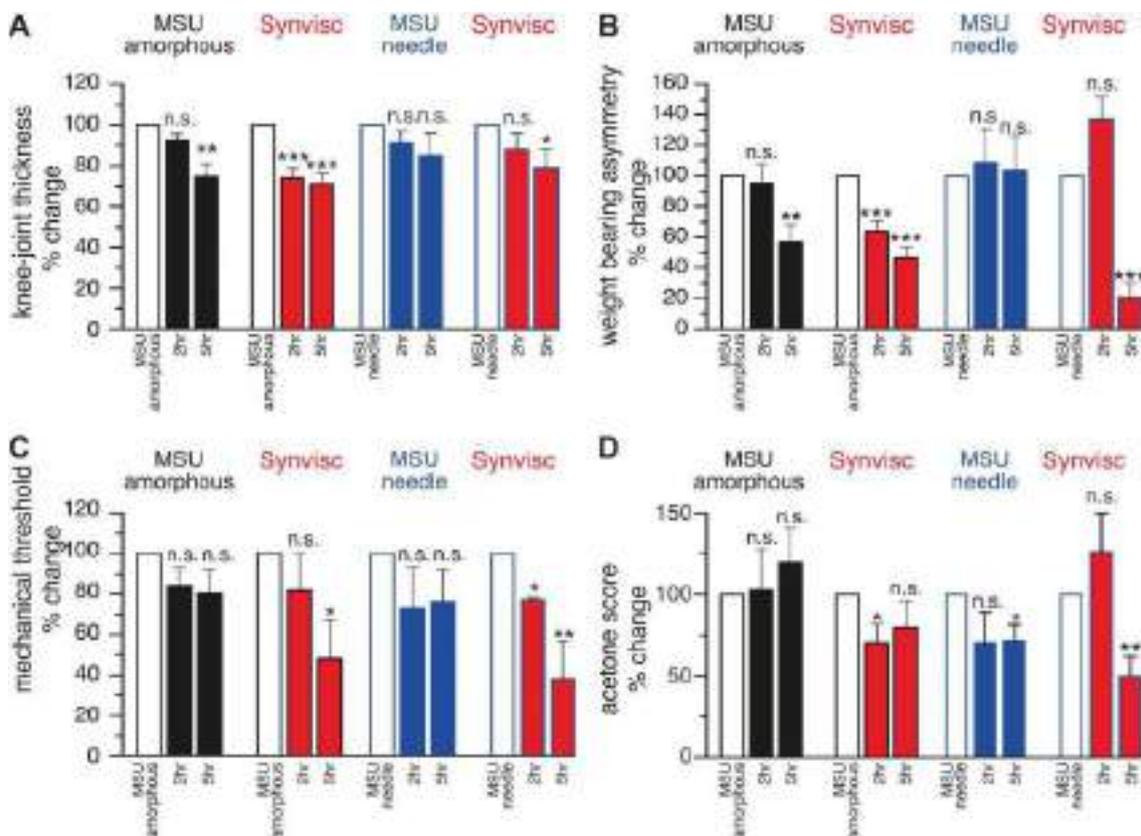


Figure 4. Effect of hyaluronan (Synvisc) on nocifensive responses developed after MSU-evoked inflammation. Data of all parameters are expressed as % of the values measured 3 hours after amorphous

(black, n = 17) or needle MSU (blue, n = 15) injection, represented by the empty bars. (A) Joint diameter, (B) weightbearing asymmetry, (C) mechanical threshold, and (D) acetone (cold) sensitivity. Values were measured 2 and 5 hours after Synvisc injection (red bars n = 10, after amorphous MSU, n = 7, after needle MSU). Paired t test ****P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05. MSU, monosodium urate.

We also analyzed the effect of Synvisc on the ongoing activity developing in nociceptor fibers of MSU-inflamed joints. In untreated animals, noticeable spontaneous impulse activity during the last recording period (4-5 hours in the experiments shown in Fig. 5A, 8 hours after amorphous MSU crystals injection) was present in 5 of 7 fibers (mean 5.06 ± 0.3 imps/s; n = 5). Notably, after MSU injection, the firing frequency of spontaneously active fibers becomes more variable, with a tendency of mean frequency values to increase with time (Fig. 5E, black squares). By contrast, in Synvisc-injected joints, this tendency to display an increased ongoing activity 8 hours after MSU was absent (red circles), a neutralizing effect that did not appear when NaCl 0.9% instead of Synvisc was injected (purple triangles). These results suggest that spontaneous activity values stabilized after Synvisc, which also moderated the augmented impulse activity with time underlying the development of movement-evoked allodynia and hyperalgesia observed in MSU-injected rats.

4. Discussion

In this study, we describe for the first time in mammals that injection of MSU crystals in the rat knee joint evokes an augmented joint nociceptor activity that evolves in parallel with the local inflammation and behavioral signs of pain, closely resembling those observed in human gouty attacks and thus appearing as a potentially useful animal model of gout arthritis. Our data further show that intra-articular injection of sodium hyaluronate of HMW reduces joint nociceptor impulse activity elicited by movements that likely cause joint pain, thus demonstrating that the analgesic action of HMW-HA, previously observed in osteoarthritis, also occurs in gouty arthritis.

4.1. Mechanisms for augmented joint nociceptor activity, local inflammation, and pain induced by monosodium urate crystals

In human gout and pseudogout arthritis, it has been proposed that deposition of MSU or calcium pyrophosphate crystals in joint SF and tissues mechanically harms joint surfaces contributing to acute inflammation and pain.³⁷ Several other mechanisms possibly determine the reaction to intra-articular crystals, and many lines of evidence support the central role of immune cell activation as the main triggering mechanism. Our observation in rats that larger, needle-shaped MSU crystals were not more effective than the small, amorphous ones in causing inflammation, nocifensive behavior, and enhancement of joint nociceptor activity speaks against direct mechanical injury by crystals as the mechanism for stimulation of sensory nerve terminals in gout pain. This confirms previous clinical data showing that signs of gout were not influenced by the

size or shape of SF crystals.^{7,10} The apparently minor contribution to gout pain of mechanical stimulation of nociceptors by crystals also explains the absence of pain in patients during asymptomatic periods between acute gout attacks, despite the presence of abundant aciculate MSU crystals on the cartilage surface and SF.³⁹⁻⁴¹

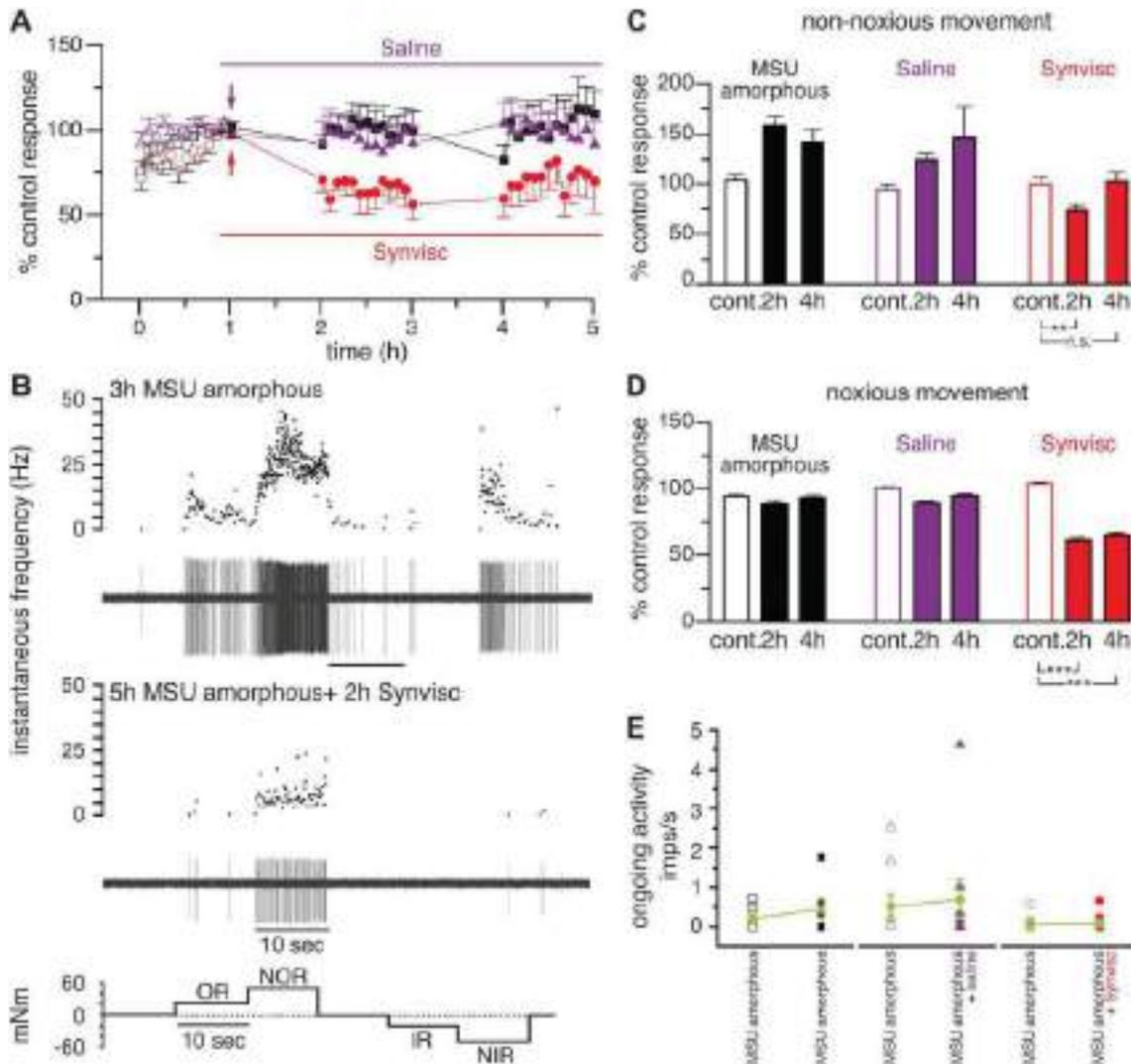


Figure 5. Effect of hyaluronan (Synvisc) on movement-evoked nerve impulse activity in MSU-inflamed joints. (A) Time course of the change in nerve impulse discharges evoked by complete movement cycles (OR 1 NOR 1 IR 1 NIR) measured in 23 single nerve fibers of joints injected with amorphous MSU 3 hours before, expressed as % of the mean \pm SEM of the control response value. Black symbols show the data in MSU-inflamed knee joints that did not receive additional treatment (n 5 7), red filled circles in MSU-inflamed knee joints that additionally received an intra-articular injection of Synvisc (red arrow, n 5 7), and purple symbols represent the data in joints receiving an intra-articular injection of NaCl 0.9% (vehicle of Synvisc, purple arrow, n 5 9). The response values of these fibers previous to treatments are represented as empty symbols. (B) Example of the impulse activity recorded in a single fiber innervating a knee joint inflamed 3 hours earlier by MSU injection (upper panel) to illustrate the firing frequency reduction observed 2 hours after intra-articular injection of Synvisc (middle panel). In both cases, the upper traces represent the instantaneous frequency and the lower traces the original recordings of nerve impulse activity. The bottom panel depicts the sequence of nonnoxious and noxious rotations applied as stimuli. (C and D) Mean nerve impulse activity in joints injected 3 hours earlier with MSU, expressed as percentage of the activity evoked by the movements performed during the first hour (control period, taken as 100%).

Empty columns represent the mean values of the last 3 movements of the control period, before any experimental maneuver. The remaining columns show the mean value of the 12 movements performed during each of the indicated periods, for the nonnoxious (OR 1 IR) (C) and the noxious (NOR 1 NIR) (D) components of the movement. Unpaired t test, ***P ,0.001, **P,0.01, *P,0.05. (E) Ongoing activity frequency values of joint nerve fibers (n57) 3 hours after intra-articular injection of MSU (open black squares) and 8 hours after intra-articular injection of MSU (filled black squares); in nerve fibers (n 5 8) 3 hours after intra-articular injection of MSU (empty purple triangles) and 8 hours after MSU injection but receiving also 4 hours after MSU an intra-articular injection of saline (NaCl 0.9%, filled purple triangles); and in joint nerve fibers (n58) 3 hours after i.a. injection of amorphous MSU (empty red circles) and 8 hours after amorphous MSU injection but receiving also 4 hours after MSU an i.a. injection of Synvisc (red filled circles). Green circles correspond to mean values in each case. IR, inward rotation; MSU, monosodium urate; NIR, noxious inward rotation; NOR, noxious outward rotation; OR, outward rotation.

In our experimental model of gout in rats, we provide evidence that joint inflammatory signs evolved in parallel with the appearance of strong excitation of nociceptors and parallel behavioral signs of nociceptor sensitization. As with mechanical force, there is no experimental proof of direct chemical interaction of MSU molecules with membrane receptor proteins of nociceptor endings such as TRPV1 and TRPA1, the main ion channels mediating nociceptor's depolarization by endogenous or exogenous chemicals.^{22,57,58} In fact, it is well established that crystals are first detected by innate immune cells such as macrophages, monocytes, or neutrophils that respond and produce active IL-1 b. This ultimately activates NF-kB which turns on the transcription of cytokines and chemokines, initiating the release of inflammatory mediators, which finally act of nociceptor endings, opening TRPV1 and TRPA1 channels either directly or through intracellular signaling cascades. This leads to nociceptor's membrane depolarization, the canonical mechanism for their sensitization in joints and other tissues.^{16,22,24,42,57,58} Antidromic firing of articular nociceptors releases neuropeptides from peripheral nerve terminals,⁵ thereby potentiating the local inflammatory response (neurogenic inflammation).²⁵

Collectively, our study provides new experimental evidence confirming that interaction with inflammatory mediators released by innate immune cells after their contact with MSU crystals is the principal mechanism whereby joint nociceptor terminals are excited in gout and develop the spontaneous ongoing activity and enhanced responsiveness to innocuous and noxious stimuli underlying the strong pain characteristic of gouty attacks.

4.2. Correlation between nocifensive behavior and joint nociceptor impulse activity in monosodium urate-injected rats

Previous studies in the rat had shown that intra-articular injection of MSU evokes nocifensive behaviors resembling painful acute gouty attacks in humans.^{33,34,36,57,58} In chicken, augmented joint nerve afferent activity evoked by intra-articular MSU crystals was also reported.¹⁷ However, this is the first evidence in mammals linking directly the time course and amplitude of increased spontaneous and movement-evoked nociceptor

activity in joint nociceptors caused by MSU crystals, with the appearance of weight-bearing asymmetry, lower cutaneous mechanical threshold, and larger nocifensive responses to cold, all of them behavioral signs of peripheral and central sensitization and pain.^{28,50} The observed increases in spontaneous activity, albeit discrete, seem to be sufficient to evoke mechanical and cold allodynia, 2 typical behavioral indicators of sensitization.⁵¹ This also occurs in cutaneous nociceptors, where the rise of the proportion of spontaneously active nociceptor fibers from 7% to 38% during inflammation sustains spontaneous pain.¹³

4.3. Hyaluronan effects on monosodium urate–sensitized joint nociceptor nerve fibers

Hyaluronan is an important chemical component of the SF.³ Although HA does not contribute to urate crystal deposition in gout^{30,39,56}, it regulates a variety of general cellular and molecular processes associated with inflammation, including expression of inflammatory genes²³, immune cell infiltration,³⁵ phagocytosis of urate crystals by macrophages,¹⁵ macrophage transition from proinflammatory to anti-inflammatory states, and release of inflammatory cytokines.⁴⁴ These effects are critically dependent on HA's molecular weight, with HMW-HA having a predominant inhibitory effect and Low Molecular Weight Hylan (LMW-HA) fragments a proinflammatory action.⁴⁸ Modulation by HMW-HA molecules of the production and release of inflammatory mediators by inflammatory cells is one of the potential mechanisms contributing to the attenuation by Synvisc of MSU-induced joint nociceptor activity and nocifensive behavior. However, direct reduction by HA molecules of nociceptor excitation possibly plays a more significant role. Synovial HMW-HA behaves as an elastoviscous filter that attenuates the transmission of external mechanical forces to nociceptor endings in joint tissues,² thereby reducing the effective mechanical energy reaching the stretchactivated channels located in the membrane of these nerve terminals.⁴³ This buffering action on nociceptor excitation is closely dependent on the rheological properties of HA and explains the efficacy of HMW-HA in decreasing the firing response of nociceptors in various experimental models of inflamed joints.^{19,20,46} But in addition, HMW-HA interacts directly with TRPV1 reducing its higher opening probability generated by natural stimuli, including endogenous inflammatory mediators.⁸ Both mechanisms may contribute to the inhibitory effects of Synvisc on nociceptor activation and nocifensive responses that we observed in experimental gout.

Whether HA molecules naturally present in joints counteract the onset of inflammation and pain in human gout has not been determined. Notably, the viscosity, concentration, and MW of HA in the SF of acute gout are low.⁴⁷ This is also the case in OA, a form of arthritis that frequently co-occurs with gout in which injection of HMW-HA decreases pain.^{1,4,12} Although the pathogenic link between OA and human gout has not been established yet, it is tempting to speculate that in both diseases, endogenous

SF HA may play a role in delimiting the intensity of joint inflammation and pain, depending on its concentration and viscosity.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare. This work was supported by funds from Matrix Biology Institute (EE.UU), and by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness SAF2014-545.18-C3-2-R, SAF2013-45608-R, SAF2016-77233-R co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), and the “Severo Ochoa” Program for Centers of Excellence in R&D SEV-2013-0317 and a fellowship from the Generalitat Valenciana to A. Marcotti (GRISOLIA/2015/034).

Acknowledgments

The authors thank E. Quintero, A. Caler, and V. J. Rodriguez for technical assistance, S. Ingham for illustrations, and Dr. E. Caparro's and A. Caler for their advice on flow cytometry experiments.

Appendix A. Supplement digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/A524>.

Article history:

Received 28 July 2017

Received in revised form 1 December 2017

Accepted 18 December 2017

Available online 9 January 2018

References

- [1] Ayhan E, Kesmezacar H, Akgun I. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J Orthop* 2014;5:351–61.
- [2] Balazs EA. The viscoelastic intercellular matrix and control of cell function by hyaluronan. In: Laurent T, editor. *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*. London: Portland Press, 1998. p. 185–204.

- [3] Balazs EA, Watson D, Duff IF, Roseman S. Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritis human fluids. *Arthritis Rheum* 1967;10:357–76.
- [4] Bert JM, Waddell DD. Viscosupplementation with hylan g-f 20 in patients with osteoarthritis of the knee. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2010;2:127–32.
- [5] Bjurholm A, Kreicbergs A, Ahmed M, Schultzberg M. Noradrenergic and peptidergic nerves in the synovial membrane of the Sprague-Dawley rat. *Arthritis Rheum* 1990;33:859–65.
- [6] Brooks PM, Burton D, Forrest MJ. Crystal-induced inflammation in the rat subcutaneous air-pouch. *Br J Pharmacol* 1987;90:413–19.
- [7] Busso N, So A. Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Res Ther* 2010;12:206.
- [8] Caires R, Luis E, Taberner FJ, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A, Balazs EA, Gomis A, Belmonte C, de la Pena E. Hyaluronan modulates TRPV1 channel opening, reducing peripheral nociceptor activity and pain. *Nat Commun* 2015;6:8095.
- [9] Constantin CE, Mair N, Sailer CA, Andratsch M, Xu ZZ, Blumer MJ, Scherbakov N, Davis JB, Bluethmann H, Ji RR, Kress M. Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. *J Neurosci* 2008; 28:5072–81.
- [10] Crisan TO, Cleophas MC, Oosting M, Lemmers H, Toenhake-Dijkstra H, Netea MG, Jansen TL, Joosten LA. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann Rheum Dis* 2016;75:755–62.
- [11] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53:55–63.
- [12] Chevalier X, Jerosch J, Goupille P, van Dijk N, Luyten FP, Scott DL, Bailleul F, Pavelka K. Single, intra-articular treatment with 6 ml hylan G-F 20 in patients with symptomatic primary osteoarthritis of the knee: a randomised, multicentre, double-blind, placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2010;69:113–19.
- [13] Djouhri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci* 2006;26:1281–92.

- [14] Fang D, Kong LY, Cai J, Li S, Liu XD, Han JS, Xing GG. Interleukin-6- mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. *PAIN* 2015;156:1124–44.
- [15] Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 1980;40:435–46.
- [16] Gangadharan V, Kuner R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Dis Model Mech* 2013;6:889–95.
- [17] Gentle MJ. Sodium urate arthritis: effects on the sensory properties of articular afferents in the chicken. *PAIN* 1997;70:245–51.
- [18] Gomis A, Meini S, Miralles A, Valenti C, Giuliani S, Belmonte C, Maggi CA. Blockade of nociceptive sensory afferent activity of the rat knee joint by the bradykinin B2 receptor antagonist fasinabant. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21:1346–54.
- [19] Gomis A, Miralles A, Schmidt RF, Belmonte C. Nociceptive nerve activity in an experimental model of knee joint osteoarthritis of the Guinea pig: effect of intra-articular hyaluronan application. *PAIN* 2007;130:126–36.
- [20] Gomis A, Pawlak M, Balazs EA, Schmidt RF, Belmonte C. Effects of different molecular weight elastoviscous hyaluronan solutions on articular nociceptive afferents. *Arthritis Rheum* 2004;50:314–26.
- [21] Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, Le Gall-Ianotto C, Sakka M, Buhe V, Plee-Gautier E, Carre JL, Lefeuvre L, Misery L, Le Garrec R. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* 2017;8:644–61.
- [22] Hoffmeister C, Silva MA, Rossato MF, Trevisan G, Oliveira SM, Guerra GP, Silva CR, Ferreira J. Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:240–9.
- [23] Horton MR, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN γ in mouse macrophages. *J Immunol* 1998;160:3023–30.

- [24] Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 2006;4:197–206.
- [25] Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:533–48.
- [26] Jin X, Gereau RW IV. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci* 2006;26:246–55.
- [27] Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2013;29:355–84.
- [28] Kelly S, Dunham JP, Murray F, Read S, Donaldson LF, Lawson SN. Spontaneous firing in C-fibers and increased mechanical sensitivity in A-fibers of knee joint-associated mechanoreceptive primary afferent neurons during MIA-induced osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:305–13.7.
- [29] Malawista SE, de Boisfleury AC, Naccache PH. Inflammatory gout: observations over a half-century. *FASEB J* 2011;25:4073–8.
- [30] Martillo MA, Nazzari L, Crittenden DB. The crystallization of monosodium urate. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16:400.
- [31] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237–41.
- [32] Meng J, Wang J, Steinhoff M, Dolly JO. TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Sci Rep* 2016;6:21226.
- [33] Moilanen LJ, Hamalainen M, Lehtimaki L, Nieminen RM, Moilanen E. Urate crystal induced inflammation and joint pain are reduced in transient receptor potential ankyrin 1 deficient mice—potential role for transient receptor potential ankyrin 1 in gout. *PLoS One* 2015;10:e0117770.
- [34] Moilanen LJ, Hamalainen M, Nummenmaa E, Ilmarinen P, Vuolteenaho K, Nieminen RM, Lehtimaki L, Moilanen E. Monosodium iodoacetate-induced inflammation and joint pain are reduced in TRPA1 deficient mice—potential role of TRPA1 in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:2017–26.
- [35] Monslow J, Govindaraju P, Pure E. Hyaluronan—a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Front Immunol* 2015;6:231.

- [36] Otsuki T, Nakahama H, Niizuma H, Suzuki J. Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. *Brain Res* 1986; 365:235–40.
- [37] Pang L, Hayes CP, Buac K, Yoo DG, Rada B. Pseudogout-associated inflammatory calcium pyrophosphate dihydrate microcrystals induce formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2013;190:6488–500.
- [38] Pascual E. Persistence of monosodium urate crystals and low-grade inflammation in the synovial fluid of patients with untreated gout. *Arthritis Rheum* 1991;34:141–5.
- [39] Pascual E, Addadi L, Andres M, Sivera F. Mechanisms of crystal formation in gout—a structural approach. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:725–30.
- [40] Pascual E, Batlle-Gualda E, Martinez A, Rosas J, Vela P. Synovial fluid analysis for diagnosis of intercritical gout. *Ann Intern Med* 1999;131:756–9.
- [41] Pascual E, Doherty M. Aspiration of normal or asymptomatic pathological joints for diagnosis and research: indications, technique and success rate. *Ann Rheum Dis* 2009;68:3–7.
- [42] Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:55–68.
- [43] Peña Ede L, Sala S, Rovira JC, Schmidt RF, Belmonte C. Elastoviscous substances with analgesic effects on joint pain reduce stretch-activated ion channel activity in vitro. *PAIN* 2002;99:501–8.
- [44] Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol* 2014;5:101.
- [45] Popa-Nita O, Naccache PH. Crystal-induced neutrophil activation. *Immunol Cell Biol* 2010;88:32–40.
- [46] Pozo MA, Balazs EA, Belmonte C. Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative. *Exp Brain Res* 1997;116:3–9.
- [47] Praest BM, Greiling H, Kock R. Assay of synovial fluid parameters: hyaluronan concentration as a potential marker for joint diseases. *Clin Chim Acta* 1997;266:117–28.

- [48] Rayahin JE, Buhrman JS, Zhang Y, Koh TJ, Gemeinhart RA. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater Sci Eng* 2015;1:481–93.
- [49] Richter F, Natura G, Loser S, Schmidt K, Viisanen H, Schaible HG. Tumor necrosis factor causes persistent sensitization of joint nociceptors to mechanical stimuli in rats. *Arthritis Rheum* 2010;62:3806–14.
- [50] Schaible HG. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014;16:470.
- [51] Schaible HG, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *PAIN* 1993;55:5–54.
- [52] Schaible HG, Schmidt RF. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J Neurophysiol* 1985;54:1109–22.
- [53] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:821–32.
- [54] Spicarova D, Palecek J. Tumor necrosis factor alpha sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine. *J Neuroinflammation* 2010;7:49.
- [55] Studer M, McNaughton PA. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *J Physiol* 2010;588:3743–56.
- [56] Tak HK, Cooper SM, Wilcox WR. Studies on the nucleation of monosodium urate at 37 degrees c. *Arthritis Rheum* 1980;23:574–80.
- [57] Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Ineu RP, Guerra GP, Materazzi S, Fusi C, Nassini R, Geppetti P, Ferreira J. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents. *Arthritis Rheum* 2013;65:2984–95.
- [58] Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Silva CR, Fusi C, Tonello R, Minocci D, Guerra GP, Materazzi S, Nassini R, Geppetti P, Ferreira J. TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med* 2014;72:200–9.