



## Agradecimientos

|   | Canción  | ▲ Descargar | Artista   |
|---|--|-------------|---|
| ★ | 🔗 At Home  |             | Crystal Fighters & Cora   |
| ★ | 🔗 Black Or White                                   | ⬇           | Michael Jackson & Félix Viana                                     |
| ★ | 🔗 Call Me  | ⬇           | Blondie & Ana M.  |
| ★ | 🔗 Chicos Malos                                     | ⬇           | La Casa Azul & Edu, Enoch, Hugo, Jan-Albert, Jordi, Jose, Víctor  |
| ★ | 🔗 Dancing Queen                                    | ⬇           | Abba & María P.   |
| ★ | 🔗 El Cielo De Madrid                               | ⬇           | Deluxe & Jaska, José Luís, Maríbel, Ana, María                    |
| ★ | 🔗 Float On   |             | Modest Mouse & Sonia y la banda de los técnicos y ratones del SEA |
| ★ | 🔗 Forever Vicenta                                  | ⬇           | P-Square & Ales, Ana, Beatriz, Laura, Lucía, Vero                 |
| ★ | 🔗 Gimme Hope Jo'anna                               | ⬇           | Eddy Grant & Deisy, Giovanna, Isa, Valentina                      |
| ★ | 🔗 Non, je ne regrette rien                         | ⬇           | Edith Piaf & Bordeaux Neuroscience Band                           |
| ★ | 🔗 Perfect Day                                      | ⬇           | Lou Reed & the mama & the papa                                    |
| ★ | 🔗 Playas De Barbate                                | ⬇           | Chambao & Antonia, Antonio, Juan, Lola, María, María José         |
| ★ | 🔗 Que Hace Una Chica Como Tu En Un Sitio Como Este | ⬇           | Loquillo & AnnaLú, Clara, Estela, Eva, Mireille, Rosa, Vero       |
| ★ | 🔗 Safe and Sound                                   | ⬇           | Capital Cities & Amaia, Asun, Biola, Sandra                       |
| ★ | 🔗 Tanti Auguri                                     | ⬇           | Raffaella Carrà & NBS Band from Trento                            |
| ★ | 🔗 Viva La Vida                                     |             | Coldplay & Win y Oli  |
| ★ | 🔗 We Are Family                                    | ⬇           | Sister Sledge & Alaá, Gato, Laura, Patricia, Rebeca               |
| ★ | 🔗 You Are My Sister                                | ⬇           | Antony & The Johnsons & Marimar                                   |

Un agradecimiento especial a mis padres, de los que aprendo cada día.

| <b>Índice</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Abreviaturas .....  | 1             |
| Abstract .....  | 4             |
| Introducción .....  | 7             |
| Transducción sensorial .....  | 7             |
| 1. Anatomía del sistema somatosensorial .....   | 7             |
| 1.1. Vía dorsal lemniscal medial .....  | 8             |
| 1.2. Vía espinotalámica .....   | 8             |
| 2. Dolor y nocicepción .....  | 9             |
| 3. Superfamilia de los canales TRP .....  | 12            |
| 3.1. Clasificación de los canales TRP .....   | 13            |
| 3.2. Estructura de los canales TRP .....  | 14            |
| 3.3. Distribución de los canales TRP .....  | 15            |
| 3.4. Canales TRP y percepción de la temperatura .....   | 16            |
| 3.5. El canal iónico TRPA1 .....  | 17            |
| 3.5.1. Estructura del canal TRPA1 .....   | 19            |
| 3.5.2. Relevancia fisiopatológica del canal TRPA1 .....   | 21            |
| 3.5.2.1. El canal TRPA1 como posible mediador del agrandamiento<br>gingival inducido por fármacos ..... | 22            |
| 3.5.2.2. El canal TRPA1 como mediador del dolor neuropático<br>producido por oxaliplatino .....         | 25            |
| Objetivos .....   | 30            |
| Materiales y Métodos .....  | 31            |
| 1. Experimentación con animales .....   | 31            |
| 1.1. Tipo de animales de experimentación .....  | 31            |
| 1.2. Tratamiento de ratones con oxaliplatino .....  | 31            |
| 2. Técnicas de conducta .....   | 31            |

---

|   |    |
|---|----|
| 2.1. Test de peso dinámico .....  | 31 |
| 3. Cultivos Celulares .....   | 32 |
| 3.1. HEK 293 .....  | 32 |
| 3.2. HGF .....  | 32 |
| 3.3. CHO .....  | 33 |
| 3.4. CHO – TRPA1 .....  | 33 |
| 3.5. Transfección transitoria de células HEK 293 .....  | 34 |
| 3.6. Transfección transitoria de células HGF .....  | 34 |
| 3.7. Tripsinización .....   | 34 |
| 3.8. Congelación de células .....   | 35 |
| 3.9. Descongelación de células .....  | 35 |
| 3.10. Cultivo primario de neuronas del ganglio raquídeo .....   | 35 |
| 4. Métodos de Biología Celular .....  | 36 |
| 4.1. Ensayo de proliferación celular .....  | 36 |
| 4.2. Imagen dinámica de calcio .....  | 38 |
| 5. Técnicas de Biología Molecular .....   | 39 |
| 5.1. Western-blot .....   | 39 |
| 5.2. RT-PCR .....   | 42 |
| 5.3. qPCR .....   | 43 |
| 5.4. Rastreo de micro ARN .....   | 45 |
| 6. Análisis estadístico .....   | 46 |
| Resultados .....  | 47 |
| 1. El canal TRPA1 como posible mediador del agrandamiento gingival<br>inducido por fármacos .....                 | 47 |
| 1.1. Los fibroblastos gingivales humanos (HGF) expresan TRPA1 y TRPV1,<br>pero no TRPM8 .....                     | 47 |
| 1.2. Los Fibroblastos gingivales humanos expresan TRPV1b, la isoforma<br>dominante negativa del canal TRPV1 ..... | 48 |
| 1.3. La proteína TRPV1 se expresa en los fibroblastos gingivales humanos  | 50 |
| 1.4. La sobreexpresión de TRPV1 en células HGF produce la respuesta a<br>capsaicina .....                         | 51 |

---

|  |    |
|--|----|
| 1.5. Los fármacos que inducen el agrandamiento gingival activan TRPA1 expresado en sistema heterólogos .....   | 52 |
| 1.6. La fenitoína, la carbamazepina y la nifedipina activan TRPA1 expresado en fibroblastos gingivales humanos .....                                     | 56 |
| 1.7. La fenitoína activa TRPA1 expresado en células HEK 293, pero no activa ni a TRPM8 ni TRPV1 .....  | 62 |
| 1.8. El LPS activa TRPA1 en células HGF .....  | 63 |
| 1.9. La transfección de ARN de interferencia en células HGF disminuye la expresión de TRPA1 y la amplitud de su respuesta a fenitoína y nifedipina ..... | 67 |
| 1.10. Las vitaminas antioxidantes reducen la respuesta a fenitoína en los fibroblastos gingivales humanos .....  | 69 |
| 1.11. Las vitaminas antioxidantes, a excepción del $\alpha$ -tocoferol, reducen la respuesta a nifedipina en los fibroblastos gingivales humanos .....   | 73 |
| 1.12. Los fármacos que inducen el agrandamiento gingival no inducen la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos en cultivo .....             | 76 |
| 2. TRPA1 como mediador del dolor neuropático inducido por oxaliplatino   |    |
| 2.1. El oxaliplatino activa el canal TRPA1 expresado en células CHO .....  | 78 |
| 2.2. El oxaliplatino produce la liberación de especies reactivas de oxígeno que activan TRPA1 .....  | 81 |
| 2.3. Los efectos del oxaliplatino sobre la amplitud de respuesta a frío varían con la concentración .....  | 81 |
| 2.4. El oxaliplatino aplicado sobre la respuesta a frío cambia la temperatura umbral de TRPA1 .....  | 83 |
| 2.5. El oxaliplatino no activa TRPM8 expresado en células HEK 293 .....  | 85 |
| 2.6. La amplitud de respuesta de TRPM8 a frío y mentol disminuye en presencia de oxaliplatino .....  | 86 |
| 2.7. Las neuronas del ganglio raquídeo no responden a oxaliplatino .....   | 89 |
| 2.8. El oxaliplatino disminuye las respuestas a cloruro de potasio de las neuronas del ganglio raquídeo .....  | 91 |
| 2.9. Los animales tratados con oxaliplatino presentan un comportamiento nociceptivo en el test de peso dinámico .....                                    | 94 |
| 2.10. Los ratones tratados con oxaliplatino sobreexpresan TRPA1 y TRPM8 en el ganglio raquídeo .....   | 97 |

---

|   |    |
|---|----|
| 2.11. El rastreo de los microARN que varían en los ratones tratados con oxaliplatino sugiere la participación de otros canales iónicos en la hiperalgesia ..... | 98 |
|---|----|

## Discusión

|   |     |
|---|-----|
| 1. TRPA1 como mediador del agrandamiento gingival inducido por fármacos .....   | 101 |
| 1.1. Los fibroblastos gingivales humanos (HGF) expresan TRPA1 y TRPV1, pero no TRPM8 .....                                    | 101 |
| 1.2. Los fármacos que inducen el agrandamiento gingival, a excepción de la ciclosporina A, activan TRPA1 .....                | 102 |
| 1.3. El LPS, cofactor del desarrollo del agrandamiento gingival, también activa TRPA1 en células HGF .....                    | 104 |
| 1.4. Los fármacos que inducen agrandamiento gingival no inducen la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos ..... | 105 |
| 2. TRPA1 como mediador del dolor neuropático inducido por oxaliplatino .....  | 107 |
| Conclusions .....   | 110 |
| Bibliografía .....  | 112 |

## Abreviaturas

*15d-PGJ<sub>2</sub>*: 15-Deoxi-Delta12,14-Prostaglandina J2

*4-HNE*: 4-hidroxinonenal

*4-HHE*: 4-hydroxi-2- hexenal

*4-ONE*: 4-oxonon-2-enal

*ADN*: Ácido desoxiribonucleico

*ADNc*: Ácido desoxiribonucleico complementario

*AITC*: Alil Isotiocianato

*ARN*: Ácido ribonucleico

*ARNm*: Ácido ribonucleico mensajero

*ARNr*: Ácido ribonucleico ribosómico

*ASICs*: Canales iónicos sensibles al ácido

*Cacna1c*: Gen que codifica para el canal Ca<sub>v</sub> 1.2

*Ca<sub>v</sub> 1.2*: Canal de calcio dependiente de voltaje 1.2

*CGRP*: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

*CHO – TRPA1*: Células de ovario de hámster chino que expresan TRPA1

*CHO*: Células de ovario de hámster chino

*CTGF*: Factor de crecimiento del tejido conectivo

*DMEM*: Medio modificado Eagle de Dulbecco

*DMSO*: Dimetil sulfóxido

*dNTPs*: Desoxirribonucleótidos trifosfato

*DRG*: Ganglio raquídeo

*EDTA*: ácido etilendiaminotetraacético

*ENaC*: Canal de sodio epitelial

*FBS*: Suero fetal bovino

*FDA*: Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos

*GSH*: Glutación

*HaCaT*: Línea celular de keratinocitos humanos

*HBSS*: Solución salina balanceada de Hank

*HEK 293*: Células de riñón embrionario humano

*HGF*: Fibroblastos gingivales humanos

*IASP*: Asociación Internacional para el Estudio del Dolor

*KCNQ3*: Gen que codifica para el canal  $K_v$  7.3

$K_v$  7.3: Canal de potasio dependiente de voltaje 7.3

*LPS*: Lipopolisacárido

*MEM*: Medio mínimo esencial

*microARN*: Micro Ácido Ribonucleico

*MTT*: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

*NAPDH*: Nicotinamida adenín dinucleótido

$Na_v$  1.4: Canal de sodio dependiente de voltaje 1.4

$Na_v$  1.6: Canal de sodio dependiente de voltaje 1.6

$Na_v$  1.7: Canal de sodio dependiente de voltaje 1.7

*NKA*: Neuroquinina A

*P2X*: Receptor purinérgico sensible a ATP

*PBS*: Tampón fosfato salino

*PCR*: Reacción en cadena de la polimerasa



*qPCR*: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

*RT-PCR*: Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

*SDS*: Dodecilsulfato sódico

*shRNA*: Hebilla corta de ARN

*TG*: Ganglio trigémino

*TRPA1*: Receptor de potencial transitorio Anquirina 1

*TRPM8*: Receptor de potencial transitorio Melastatina 8

*TRPV1*: Receptor de potencial transitorio Vaniloide 1

*TRPV2*: Receptor de potencial transitorio Vaniloide 2

*TRPV4*: Receptor de potencial transitorio Vaniloide 4

## Abstract

### **TRPA1 channel as a potential mediator of drug-induced gingival overgrowth**

Gingival enlargement is a common side effect observed in patients treated with antiepileptic (phenytoin and carbamazepine), immunosuppressant (cyclosporine A) and some antihypertensive (nifedipine) drugs. However, the molecular mechanisms behind gingival overgrowth by these agents are still unknown.

In a recent study, it was demonstrated that 1,4 dihydropyridines, including nifedipine, can activate TRPA1 channel, a cationic channel expressed in nociceptors, which is activated by many irritant compounds. Hence, we hypothesized that TRPA1 could be the molecular target involved in drug-induced gingival overgrowth.

In our studies, phenytoin, carbamazepine and nifedipine increased the intracellular calcium levels in CHO cells expressing mouse TRPA1, and in HEK cells expressing human TRPA1. Interestingly, these responses were not observed in cells lacking TRPA1 or expressing TRPM8 or TRPV1. No such effect was observed with cyclosporine A. By RT-PCR, we demonstrated that TRPA1, TRPV1 and its capsaicin-insensitive isoform TRPV1b are expressed in cultured human gingival fibroblasts (HGF). Calcium imaging showed that HGF cells responded to TRPA1 agonists (e.g. mustard oil) and drugs producing gingival enlargement. Moreover, activation of TRPA1 by phenytoin was blocked by HC030031, a specific blocker for this channel. Similarly, the use of shRNAs against hTRPA1 in HGF cells reduced TRPA1 expression and activation by phenytoin. Finally, this activation was markedly reduced in the presence of ascorbic acid, folic acid and  $\alpha$ -tocopherol, antioxidants that are reduced in blood samples from patients with gingival enlargement.

Gingival enlargement may be caused by fibroblast proliferation or higher synthesis and secretion of collagen by fibroblasts. By performing MTT cell proliferation assay, we showed that none of these drugs induced proliferation of HGFs. These results indicate that phenytoin, nifedipine and carbamazepine can activate TRPA1 in native gingival fibroblasts increasing intracellular calcium, this

increase in calcium could induce overexpression of cytokines and connective tissue growth factor (CTGF) leading to gingival enlargement by increasing collagen deposits.

---

## **TRPA1 channel is a mediator of oxaliplatin-induced neuropathic pain:**

Oxaliplatin is a chemotherapeutic drug used in the treatment of colorectal cancer. This treatment can induce acute side effects, such as cold hypersensitivity and paraesthesia, in 80% of the patients, and can evolve to a long-term neuropathy in a fraction of the affected patients (around 15-20%).

The mechanism responsible for the peripheral neuropathy induced by oxaliplatin is poorly understood. Oxaliplatin affects different ionic channels expressed in peripheral sensory neurons, including reductions in sodium and potassium currents leading to a decrease in the action potential amplitude. We found that oxaliplatin reduces the response to elevated potassium chloride in Dorsal Root Ganglia neurons and induces calcium channel  $Ca_v1.2$  overexpression. These changes in voltage-gated channel expression could modify the sensory neuron biophysics perpetuating long-term neuropathy symptoms. As these symptoms, such as cold hypersensitivity, are triggered by cold exposure, we hypothesized that cold-sensing TRP channels TRPA1 and/or TRPM8 could be mediating cold hypersensitivity in oxaliplatin-induced neuropathy.

In the present work, we demonstrated that oxaliplatin activates TRPA1 channels expressed in heterologous systems (HEK 293 and CHO-TRPA1). This activation was blocked by the specific TRPA1 antagonist HC030031, and also by the reactive oxygen species chelator GSH. These results suggest that TRPA1 activation by oxaliplatin depends on oxidative stress. Moreover, we described how oxaliplatin increased cold response and temperature threshold in TRPA1, and reduced cold and menthol responses in TRPM8. At the molecular level, oxaliplatin treatment induces overexpression of TRPA1, but not TRPM8. Taking all this into account, we demonstrated that cold hypersensitivity in oxaliplatin-induced neuropathy could be mediated by TRPA1 cold activation at warm temperatures, but also by TRPM8 cold response inhibition. These results suggest that at the chronic phase, TRPA1 overexpression would extend cold hypersensitivity in oxaliplatin treated patients.

# Introducción

## Transducción sensorial

La transducción sensorial engloba la traducción y codificación de la información generada tanto por estímulos externos como del propio cuerpo. La detección de estímulos sensoriales se lleva a cabo mediante estructuras nerviosas especializadas llamadas receptores sensoriales, que se encuentran ubicadas en los órganos sensoriales y proporcionan al individuo la capacidad de obtener información de las condiciones ambientales que lo rodean. Así, estos receptores sensoriales están especializados en la detección de la naturaleza e intensidad de los diferentes estímulos físicos y químicos a los que un organismo se enfrenta. Los receptores sensoriales permiten la interacción del organismo con el medio y son clave para su adaptación al entorno inmediato.

### 1. Sistema somatosensorial

El sistema somatosensorial se encarga de la codificación de la información sobre el tacto, la presión, el dolor y la temperatura de la piel, articulaciones y músculos. En los mamíferos existen dos grandes vías somatosensoriales: la vía dorsal-lemniscal medial y la vía espinotalámica (Figura 1).

Cada una de estas vías consta de tres neuronas que forman una cadena sináptica desde los receptores periféricos hasta la corteza cerebral:

- La neurona sensorial primaria, cuyo soma se encuentra ubicado en un ganglio espinal o en el ganglio de un nervio craneal.
- La neurona sensorial secundaria, cuyo soma se encuentra en la materia gris de la médula espinal o del mesencéfalo, con un axón que proyecta hacia el tálamo.
- La neurona sensorial terciaria, cuyo soma se encuentra en el tálamo y proyecta hacia la corteza sensorial primaria.

Una de las diferencias entre estas dos vías somatosensoriales radica en el lugar en el que los axones cruzan la línea media; la vía dorsal-lemniscal medial no cruza la línea media hasta que la vía alcanza el bulbo raquídeo, mientras que la vía espinotalámica cruza la línea media tras entrar en la médula espinal.

Este cruce de axones en la línea media hace que la información sensorial de un lado del cuerpo sea procesada por el hemisferio cerebral opuesto.

### **1.1. Vía dorsal-lemniscal medial:**

La vía dorsal-lemniscal medial se encarga de la propiocepción y de transmitir la información de mecanorreceptores de bajo umbral localizados en piel, músculos y articulaciones. Las neuronas sensoriales primarias de esta vía se localizan en el ganglio raquídeo. Los axones ascienden por la médula espinal y terminan en los núcleos *gracilis* y *cuneatus* del bulbo raquídeo donde se encuentran las neuronas sensoriales secundarias. Los axones de estas neuronas cruzan la línea media y se agrupan formando el lemnisco medial que asciende hasta el núcleo ventroposterior del tálamo donde hacen sinapsis con las neuronas sensoriales terciarias. Estas neuronas proyectan sus axones a la corteza somatosensorial en el giro post-central (Figura 1).

### **1.2. Vía espinotalámica:**

Las fibras de esta vía transmiten información sobre dolor y temperatura. Los axones de la vía espinotalámica conectan la piel con el asta dorsal de la médula espinal, donde hacen sinapsis con las neuronas sensoriales secundarias. Los axones cruzan la línea media y continúan por la médula espinal hasta el tálamo, donde hacen sinapsis con las neuronas sensoriales terciarias que transmiten la información hasta la corteza somatosensorial (Figura 1).

Existen dos vías espinotalámicas: la vía ventral, que procesa la información táctil y la vía lateral, que se encarga de la información relacionada con dolor y temperatura.

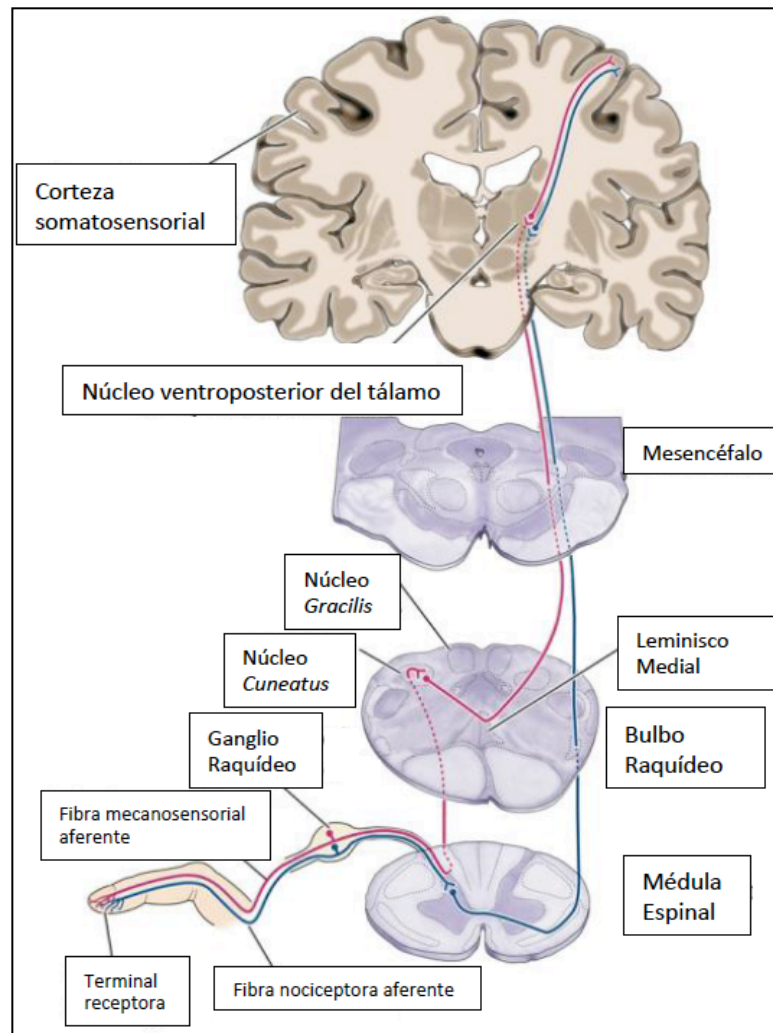


Figura 1. Representación de las dos vías somatosensoriales. La vía dorsal-lemniscal medial, en rojo. Y la vía espinotalámica, en azul. (Adaptado de Purves D, Neuroscience. Cuarta Edición, 2007).

## 2. Dolor y nocicepción

El dolor se define como una sensación desagradable y la experiencia emocional asociada a una lesión tisular actual o potencial, mientras que la nocicepción se describe como el proceso neuronal de codificación del estímulo nocivo (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor; IASP en inglés).

El dolor puede clasificarse en dos tipos: dolor nociceptivo y dolor no nociceptivo (Bennett, 2010).

- Dolor nociceptivo: Es aquel que ocurre debido a la activación de los nervios periféricos por estímulos nocivos. Es una sensación esencial para la supervivencia del individuo (Nash, T., 2005). En este tipo de dolor se englobaría el dolor inflamatorio, que es aquel que se produce

por la respuesta inflamatoria que se desencadena tras una lesión tisular (Huang et al., 2006).

- Dolor no nociceptivo: Este tipo de dolor es debido a una disfunción del sistema somatosensorial. El dolor no nociceptivo engloba al dolor neuropático, éste surge como consecuencia de una disfunción neuronal que conlleva a la sensación dolorosa (IASP, 2008).

La detección de estímulos dolorosos o nocicepción es llevada a cabo por terminaciones nerviosas libres de neuronas sensoriales primarias, cuyos somas se encuentran en los ganglios raquídeos (DRG; del inglés *Dorsal Root Ganglia*) y en los ganglios de los nervios craneales, como por ejemplo el ganglio trigémino (TG; del inglés *Trigeminal Ganglion*).

Los ganglios raquídeos están formados por los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales primarias que se localizan en la columna vertebral paralelos a la médula espinal. Las neuronas de los ganglios raquídeos son pseudounipolares, proyectan su axón periféricamente y a gran distancia, hacia la piel y músculos, donde detectan el estímulo ambiental, y centralmente, hacia la médula espinal, donde transmiten esta información a las interneuronas del asta dorsal. Las neuronas sensoriales se pueden clasificar en función de la modalidad del estímulo capaz de activarlas. De este modo, las neuronas sensoriales se clasifican en propioceptores, mecanorreceptores de bajo umbral, termorreceptores y nociceptores. Los nociceptores detectan estímulos mecánicos de alto umbral o estímulos químicos, mientras que los termorreceptores detectan cambios de temperatura. La proyección periférica de propioceptores y mecanorreceptores de bajo umbral termina en órganos especializados en la piel y músculos (corpúsculo de Meissner, células de Merkel, corpúsculo de Pacini, etc.). Sin embargo, los axones de termo y/o nociceptores acaban en terminaciones nerviosas libres (Figura 2).



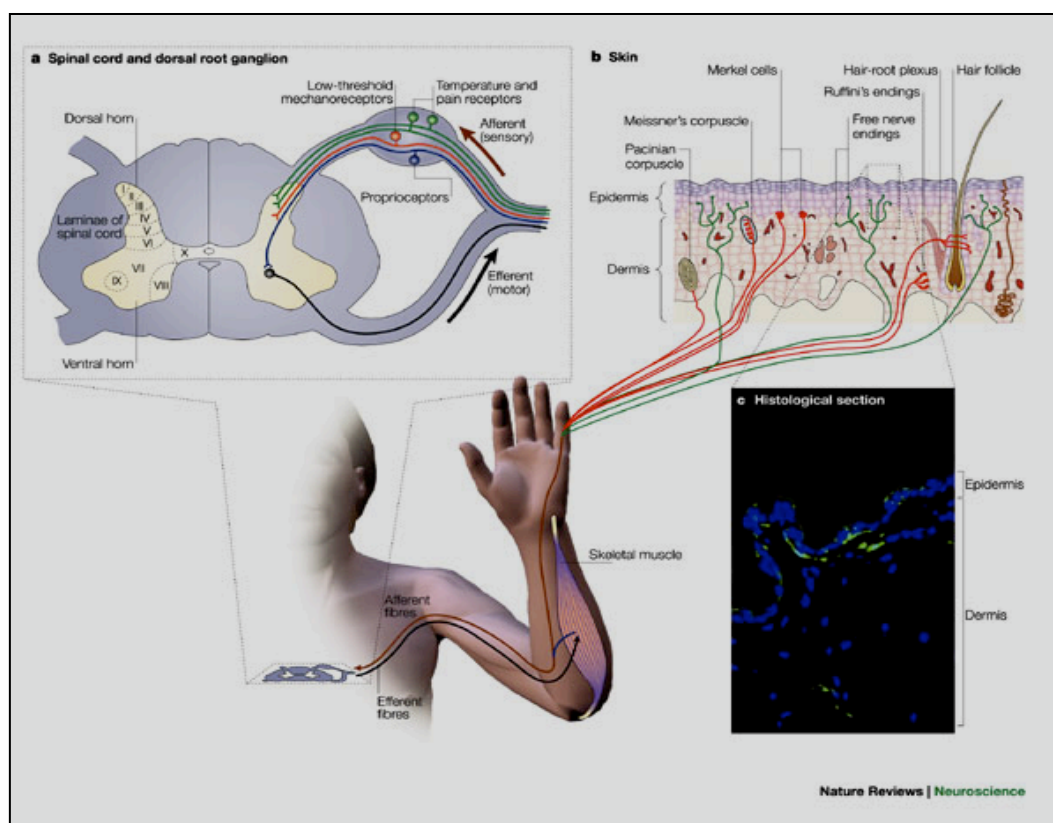


Figura 2. Anatomía y organización funcional del tacto. (Patapoutian *et al.*, 2003)

Los axones de las terminaciones nerviosas libres se engloban en dos tipos:

- Grupo A $\delta$ : Axones poco mielinizados y velocidad de conducción de 5 a 30 m/s.
- Grupo C: Axones no mielinizados y velocidad de conducción  $\leq 2$  m/s.

Las neuronas sensoriales primarias detectan una gran variedad de estímulos (mecánicos, térmicos y químicos), lo que sugiere que pueden tener receptores moleculares específicos para cada uno de estos estímulos. La primera evidencia sobre esta teoría la encontramos en la identificación de corrientes iónicas muy sensibles a la temperatura en la membrana de neuronas sensoriales primarias (Cesare & McNaughton, 1996; Reichling & Levine, 1997). Más tarde, se clonó el receptor de capsaicina TRPV1 (VR1) y se describió como un nociceptor de mamíferos activado por temperaturas elevadas con un umbral de 43°C. (Caterina *et al.*, 1997; Caterina & Julius, 2001).

Desde el clonaje del canal TRPV1 hasta la actualidad, se ha atribuido a numerosos miembros de la superfamilia de canales iónicos TRP un papel

fundamental en los procesos de transducción sensorial de los distintos estímulos (Clapham, 2003).

### **3. Superfamilia de los canales TRP**

El primer miembro de la superfamilia de canales TRP fue identificado en el ojo de la mosca *Drosophila melanogaster* como una proteína asociada a la fototransducción. La caracterización inicial se realizó a partir de un mutante que, a diferencia del fenotipo silvestre, carecía de una respuesta despolarizante sostenida frente a un estímulo luminoso, presentando únicamente potenciales de despolarización transitoria (*trp: transient receptor potential*). Los mutantes *trp* se conocen desde 1969 (Cosens y Manning, 1969), pero hasta décadas más tarde no se los describió como canales iónicos (Vaca et al., 1995; Xu et al., 1997). A lo largo de los años esta superfamilia se ha convertido en uno de los grupos más extensos de canales iónicos, con representantes en una gran diversidad de especies, que van desde las levaduras hasta los humanos (Huang, 2004; Montell, 2005; Pedersen et al., 2005; Ramsey et al., 2006).

Los canales TRP, del inglés Transient Receptor Potential, desempeñan un papel fundamental en el proceso de percepción sensorial. Algunos de estos canales se expresan en las neuronas sensoriales primarias del sistema nervioso periférico, donde están implicados en la transducción de los estímulos de distintas modalidades sensoriales como el tacto, la temperatura y el dolor (Figura 3). Los canales iónicos TRP son permeables a cationes de forma poco selectiva. La mayor parte son permeables al ión calcio y suponen una vía regulada de entrada de este catión a la célula.

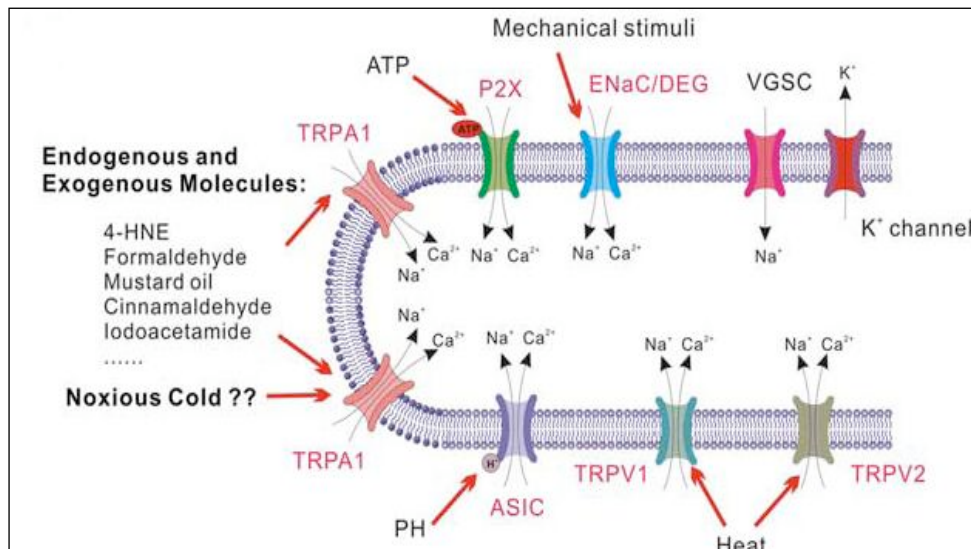


Figura 3. Las neuronas nociceptivas utilizan una variedad de canales iónicos para la detección de estímulos físicos y químicos: TRPV1 y TRPV2 en la detección de calor nocivo; ENaC/DEG en la detección de estímulos mecánicos; ASICs para los cambios de pH; P2X detecta ATP; y TRPA1 en la detección de compuestos químicos y frío nocivo. (Tai, Zhu y Zhou. 2008)

### 3.1. Clasificación de los canales TRP

La superfamilia de canales iónicos TRP de mamífero se ha clasificado tradicionalmente por la homología de sus secuencias primarias de aminoácidos (Venkatachalam et al, 2007), en lugar de por su selectividad, tipo de ligando, regulación, etc. debido a que estas características son variadas y complejas. De este modo, se divide en siete familias (Figura 4):

- TRPC (*Canonical*) Familia formada por 7 miembros. Es la más cercana filogenéticamente al canal TRP de *Drosophila*.
- TRPV (*Vanilloid*) Familia formada por 6 miembros. Debe su nombre al primer miembro identificado VR-1, receptor vaniloide, actualmente conocido como TRPV1.
- TRPM (*Melastatin*) Formada por 8 canales, debe su nombre a que el primer miembro identificado de esta familia, TRPM1, se denominó melastatina al encontrarse por primera vez en melanomas benignos y metastáticos (Duncan et al., 1998).
- TRPML Formada por 3 canales (ML1, ML2 y ML3) relacionadas con la proteína MCOLN1 implicada en la enfermedad hereditaria Mucopolidosis Tipo IV.

- TRPP (*Polycystin*): Familia heterogénea que puede dividirse en dos subfamilias, atendiendo a criterios estructurales.
- TRPN (NOMPC) En vertebrados, el único miembro de esta familia, TRPN1, se ha encontrado en el pez cebra.
- TRPA (*Ankyrin*): Formada por un solo miembro en mamíferos, TRPA1, anteriormente conocido como ANKTM1, debido a los múltiples dominios de anquirina que presenta en su extremo amino terminal.

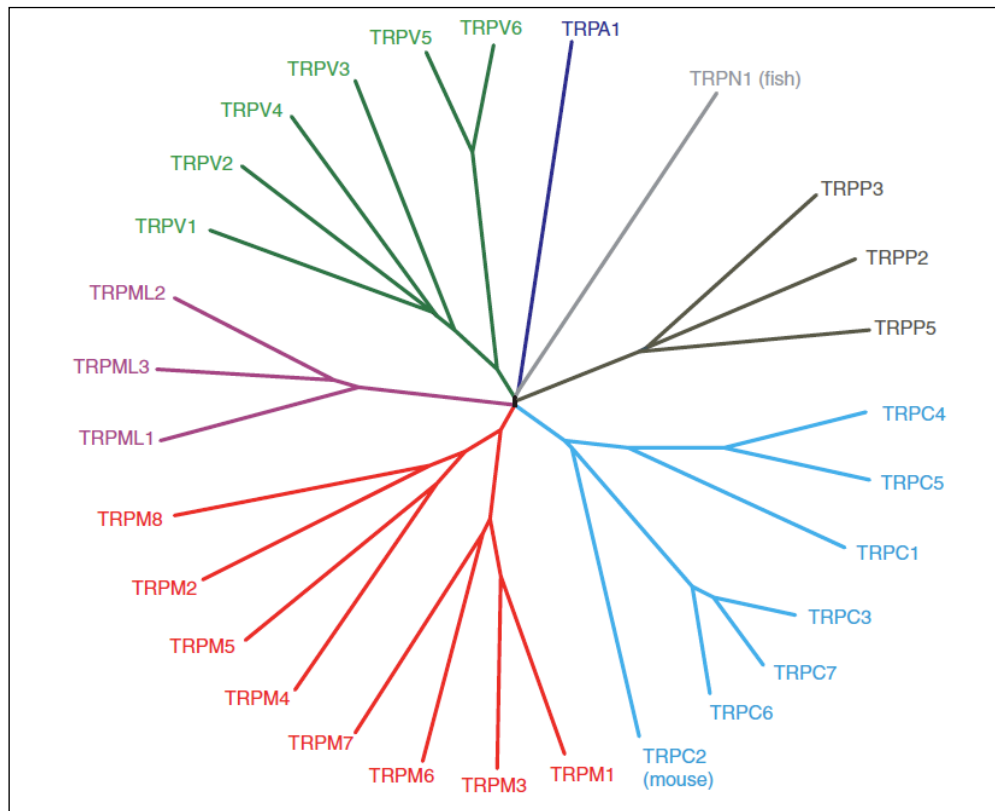


Figura 4. Árbol filogenético de los canales TRP realizado a partir de la homología de secuencia proteica en mamíferos, salvo TRPN1. Cada familia está representada por un color. (Nilius & Owsianik., 2011).

### 3.2. Estructura de los canales TRP

Los canales iónicos TRP forman tetrámeros en su estructura cuaternaria. Cada una de las cuatro subunidades está formada por seis dominios  $\alpha$  hélice transmembrana (S1-S6) y dos dominios intracelulares amino y carboxilo terminales (Figura 5). El poro del canal está formado por el ensamblaje de cada uno de los cuatro dominios transmembrana S5 y S6, y el lazo de aminoácidos situado entre ambos. El filtro de selectividad iónica está situado en la parte extracelular del poro del canal, en el lazo de aminoácidos situados entre las  $\alpha$  hélices transmembrana S5 y S6 (Voets & Nilius, 2003). En la cara

citoplasmática del poro los dominios S6 forman la compuerta que mediante su apertura y cierre regula la entrada de cationes.

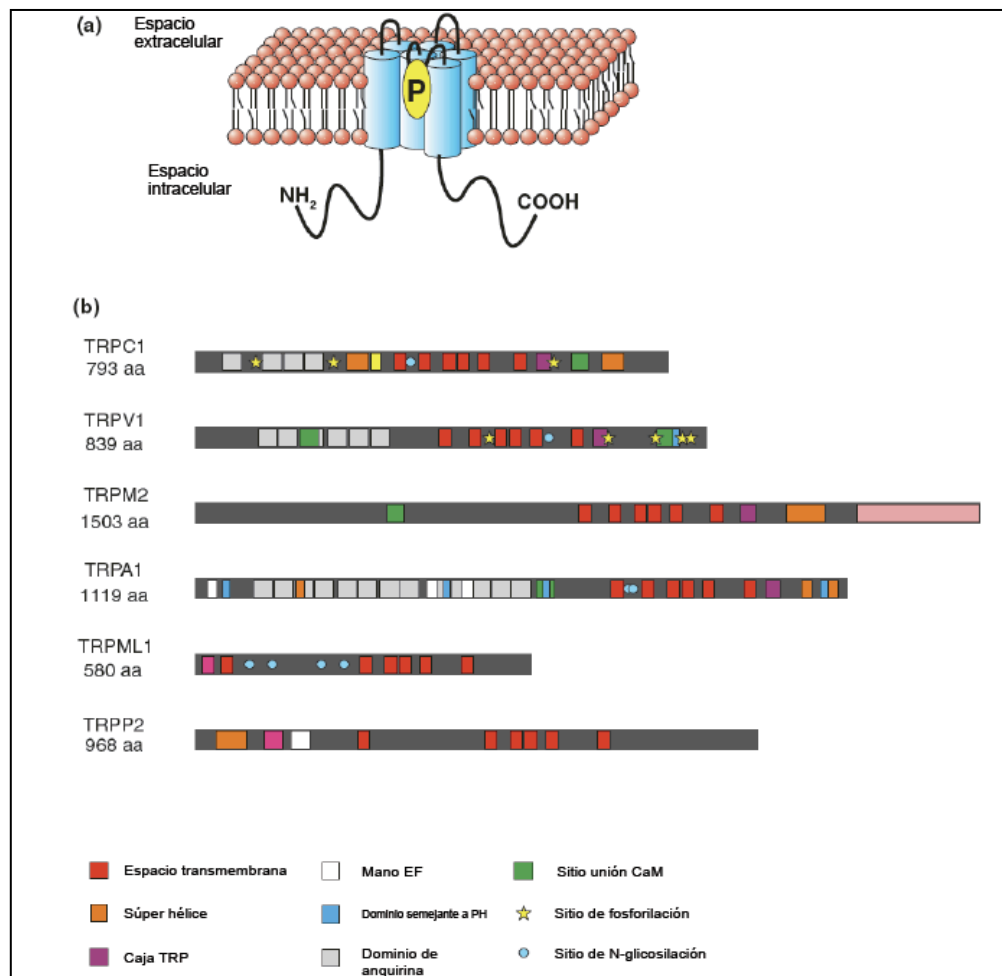


Figura 5. (a) Representación esquemática de la estructura general de los canales TRP. (b) Anotaciones particulares para cada familia. (Adaptado de Nilius & Owsianik et al. 2011)

### 3.3. Distribución de los canales TRP

Los canales TRP están ampliamente distribuidos por los distintos tejidos del organismo, expresándose de forma ubicua en casi todos los tipos celulares donde presentan distintas isoformas. Los canales iónicos TRP pertenecientes a la familia TRPC realizan diferentes funciones en el sistema nervioso central, sistema vascular, músculo esquelético o pulmones. Se ha descrito también que miembros de la familia TRPV se expresan en el sistema nervioso periférico, corazón, piel, vejiga, músculo esquelético, riñón o intestino. Por otro lado, miembros de la familia TRPM realizan importantes funciones en el sistema nervioso periférico, sistema inmune, piel, próstata, riñón, páncreas o hígado

(Tsavalier et al., 2001; Peier et al., 2002; McKemy et al., 2002; Kiessling et al., 2003; Stein et al., 2004).

### 3.4. Canales TRP y percepción de la temperatura

Hasta el momento, siete miembros de la superfamilia de canales TRP han sido descritos como canales iónicos sensibles a temperatura, cubriendo juntos un amplio rango de las temperaturas que los mamíferos son capaces de detectar. Cinco de estos canales TRP, cuatro pertenecientes a la subfamilia TRPV y uno de la subfamilia TRPM, se activan por calor con temperaturas de activación características comprendidas entre temperaturas moderadas (umbral  $> 25^{\circ}\text{C}$  para TRPV4;  $> 31^{\circ}\text{C}$  para TRPV3) (Watanabe et al., 2002; Xu et al., 2002), calor ( $> 40^{\circ}\text{C}$  para TRPM3;  $> 43^{\circ}\text{C}$  para TRPV1) (Vriens et al., 2011; Caterina et al., 1997), y calor intenso ( $> 52^{\circ}\text{C}$  para TRPV2) (Caterina et al., 1999; Rau et al., 2007). Mientras que los canales TRPM8 y TRPA1 (ANKTM1) se activan por frío (umbral  $< 28^{\circ}\text{C}$  para TRPM8;  $< 18^{\circ}\text{C}$  para TRPA1) (McKemy et al., 2002; Story et al., 2003).

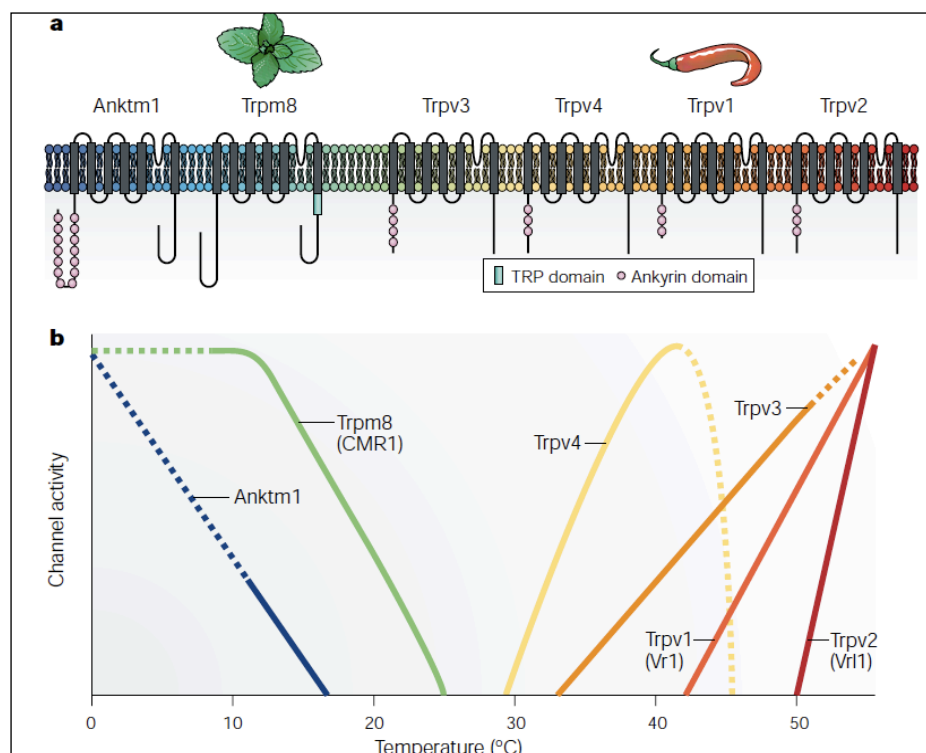


Figura 6. (a) Estructura de los canales TRP termosensibles. (b) Umbrales de temperatura de distintos canales iónicos TRP activados por temperatura (thermoTRPs). (Patapoutian *et al.*, 2003).

### 3.5. El canal iónico TRPA1

El canal TRPA1 está considerado como uno de los principales sensores químicos del cuerpo humano ya que se activa en presencia de una gran variedad de compuestos químicos de diversa naturaleza. Numerosos estudios han descrito al canal TRPA1 como la molécula implicada en la percepción de compuestos irritantes e inflamatorios, tales como el aceite de mostaza (Jordt et al. 2004). El canal TRPA1 ha sido descrito también como un canal iónico sensible a temperaturas inferiores a 18°C (Story et al., 2003), aunque su papel en la percepción de frío nocivo se encuentra bajo debate. Según diversos autores no existe una clara correlación entre las neuronas sensoriales que responden a frío y aquellas que responden al aceite de mostaza (Jordt et al., 2004; Nagata et al., 2005), por lo que la apertura de TRPA1 se produciría por el incremento del calcio intracelular y no debido al estímulo térmico per se (Zurberg et al., 2007). Sin embargo, recientemente se ha demostrado mediante experimentos de *patch-clamp* que TRPA1 puede ser activado por frío en ausencia de calcio (Sawada et al., 2007; Karashima et al., 2009). Del mismo modo, no se han encontrado respuestas a frío y cinamaldehído (agonista de TRPA1; Bandell et al., 2004) en neuronas provenientes de ratones carentes de TRPA1 (Fajardo et al., 2008; Karashima et al., 2009).

La estimulación del canal TRPA1 excita neuronas nociceptivas, contribuye significativamente a respuestas nociceptivas, hiperalgesia inflamatoria y estados de dolor neuropático (Jiang et al., 2011). El papel reconocido del TRPA1 en estados de dolor neuropático le convierten en el objeto de estudio ideal para la investigación sobre este tipo de dolor.

A continuación destacaremos algunos de los aspectos más importantes de este canal iónico, sobre el que se centra esta tesis doctoral.

El canal iónico TRPA1 se identificó originalmente en un cultivo de fibroblastos como una proteína semejante a la anquirina, debido al gran número de repeticiones de este dominio presentes en el extremo amino (Jaquemar et al, 1999). Posteriormente, se clonó a partir de neuronas del ganglio trigémino de ratones adultos, en una subpoblación de neuronas sensoriales periféricas implicadas en la nocicepción, asignándole el papel de sensor del frío nocivo

(Story, 2003). Posteriormente, se postuló el papel del canal como sensor de compuestos irritantes (Jord et al., 2004).

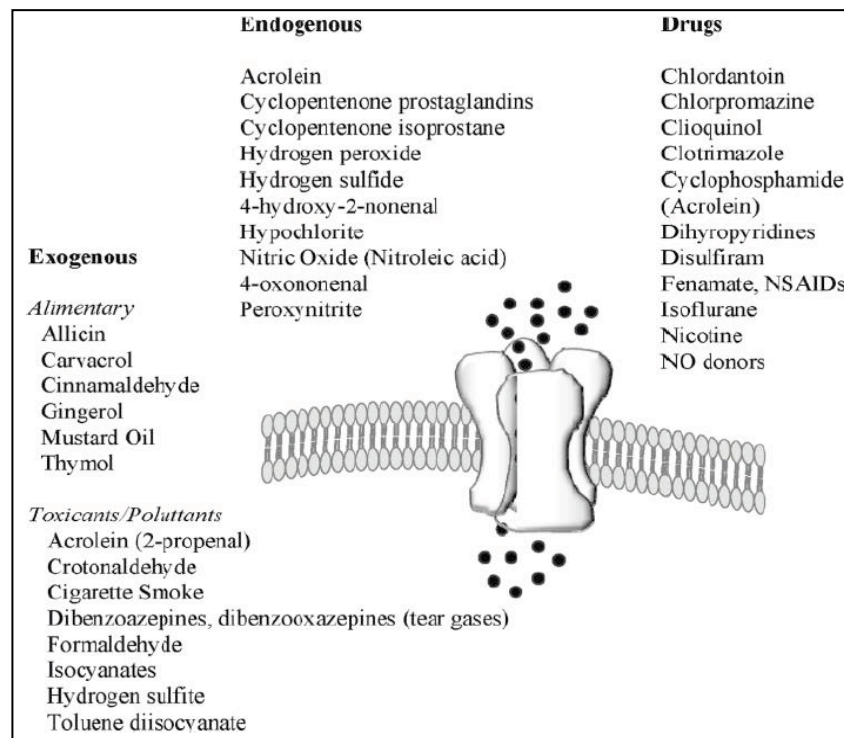


Figura 7. TRPA1 es activado por numerosos compuestos irritantes, tanto exógenos como endógenos. (Baraldi et al. 2010)

Según estudios más recientes, el canal TRPA1 se activa, entre otros, por moléculas exógenas irritantes y por sustancias endógenas liberadas durante el proceso inflamatorio (MacPherson et al., 2007) (Figura 7). En el sistema nervioso periférico, el canal TRPA1 se expresa en un 28% del total de neuronas del ganglio nodoso en roedores (Nagata et al., 2005). Los datos de expresión en neuronas de los ganglios raquídeos varían de un estudio a otro, oscilando entre un 20 y un 56% del total. En neuronas del ganglio trigémino esta cifra varía entre un 20 y un 36% (Jordt et al., 2004; Nagata et al., 2005; Bautista et al., 2005; Obata et al., 2004 y Kobayashi et al., 2005).

El canal TRPA1 también se expresa en la vejiga (Du et al., 2007) y en los sistemas digestivo (Nassenstein et al., 2008), respiratorio (Nassini et al., 2010), y cardiovascular (Inoue et al., 2009).



### **3.5.1 Estructura del canal TRPA1**

La secuencia de aminoácidos correspondiente al TRPA1 presenta 1125 residuos en el caso de la proteína murina y 1119 en el caso de la proteína humana. De entre todos los aminoácidos, destacan las asparraginas 749 y 755 que, según predicciones estructurales, pueden sufrir N-glicosilación y ser importantes en el tráfico del canal a la membrana plasmática. Esta modificación está presente en varios miembros de la superfamilia de los TRP, pudiendo afectar tanto a su tráfico como a su función. (TRPM3: Vannier et al., 1998; TRPC3 y TRPC6: Dietrich et al., 2003; TRPV5: Chang et al., 2005; TRPV1: Wirkner et al., 2005; TRPM8: Eler et al., 2006, Dragoni et al., 2006 y Pertusa et al., 2012). El canal TRPA1 presenta un dominio Mano EF de unión a calcio en el extremo amino terminal así como múltiples dominios de anquirina. Estos dominios han sido descritos como dominios de unión proteína-proteína, aunque en el caso de TRPA1 se han descrito como moduladores de la actividad del canal, determinando su especificidad ante estímulos térmicos y químicos (Cordero-Morales et al., 2011).

TRPA1 puede activarse por una gran variedad de moléculas irritantes. Así, los compuestos electrofílicos (reactivos químicos que reaccionan con compuestos nucleofílicos aceptando un par de electrones y formando un enlace entre ellos) como el aceite de mostaza pueden formar uniones covalentes de naturaleza transitoria o permanente, con residuos del extremo amino terminal, y así, activar el canal. (Hinman et al., 2006). Otros compuestos reactivos como los isotiocianatos, la alicina y los aldehídos insaturados son capaces de formar estas uniones covalentes con cisteínas y otros residuos del N-terminal. (Bautista et al., 2005).

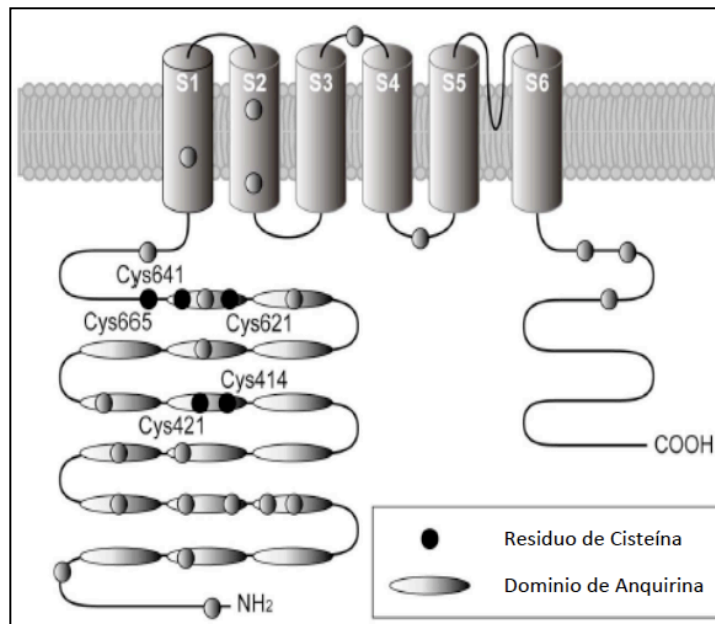


Figura 8. Estructura general de TRPA1 indicando las cisteínas reactivas con compuestos electrofílicos. (Adaptado de Takahashi & Mori., 2011).

Además, TRPA1 puede activarse en respuesta al estrés oxidativo. El oxígeno, agentes fotosensibles como el naranja de acridina (Hill & Schaefer., 2008) e incluso la luz ultravioleta (Takahashi et al., 2011) generan estrés oxidativo en el interior celular lo que lleva a la liberación de especies reactivas de oxígeno, activando TRPA1 (Andersson et al., 2008).

Recientemente se ha demostrado que las prostaglandinas ciclopentenona como el 15d-PGJ<sub>2</sub>, que se forman durante el estrés oxidativo, activan TRPA1 modificando los grupos sulfhidrilo de residuos del canal a través de reacciones de adición de Michael.

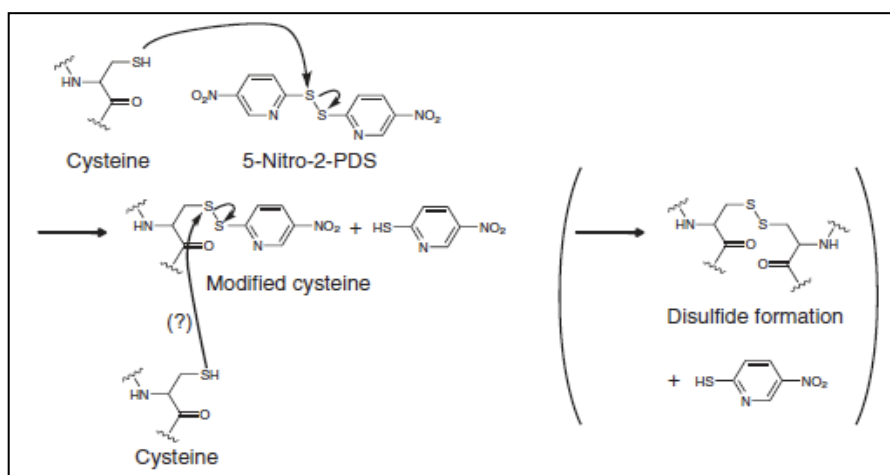


Figura 9. Modificación del grupo sulfhidrilo de una cisteína por acción de compuestos reactivos disulfuro como es el 5-Nitro-2-PDS (Takahashi et al., 2011).

Del mismo modo, el peróxido de hidrógeno, especie reactiva de oxígeno que se forma por la acción de la NADPH oxidasa, activa TRPA1 mediante la formación de puentes disulfuro en las cisteínas (Andersson et al., 2008). También, productos de la peroxidación lipídica tales como el 4-HNE, 4-HHE y el 4-ONE, que se forman durante el estrés oxidativo, activan TRPA1 (Uchida et al., 2003; MacPherson et al., 2007; Andersson et al., 2008).

### **3.5.2 Relevancia fisiopatológica del canal TRPA1**

Como se ha mencionado anteriormente en esta sección, el canal TRPA1 juega un papel importante en la percepción de estímulos dolorosos, tanto de naturaleza física como química. Numerosos estudios conductuales han confirmado la importancia de TRPA1 en la nocicepción. Así, la inyección intraplantar de sustancias irritantes o intermediarios inflamatorios en ratones con genotipo silvestre provoca un comportamiento nociceptivo en los animales tratados (Bautista et al., 2006; Andersson et al., 2008). Sin embargo, estas respuestas no se observan en ratones carentes de TRPA1. Esto es debido a que las especies reactivas de oxígeno que se producen durante el estrés oxidativo pueden activar TRPA1 y producir dolor inflamatorio (Cruz-Orengo et al., 2008).

Asimismo, TRPA1 desarrolla un importante papel durante el proceso inflamatorio y en el dolor asociado a este proceso. TRPA1 es activado por multitud de compuestos endógenos, muchos de ellos mediadores inflamatorios como el 4-HNE. La activación de TRPA1 lleva al disparo de potenciales de acción en las neuronas sensoriales primarias nociceptivas. A su vez, esta actividad neuronal induce la liberación de neuropéptidos y neurotransmisores, como NKA (Neuroquinina A), sustancia P y CGRP (del inglés *Calcitonin gene related peptide*). Estos agentes inducen vasodilatación y, en consecuencia, reclutan células inmunitarias. Las células inmunes reclutadas, a su vez, segregan moléculas de señalización, incluyendo agonistas de TRPA1 como son el hipoclorito (neutrófilos), peróxido de hidrógeno (granulocitos) y prostaglandinas (mastocitos, macrófagos, células dendríticas). Al mismo tiempo, el daño tisular producido, conduce a la generación de especies

reactivas de oxígeno que inducen la peroxidación liposomal y la generación adicional de activadores de TRPA1. (Fanger et al., 2010).

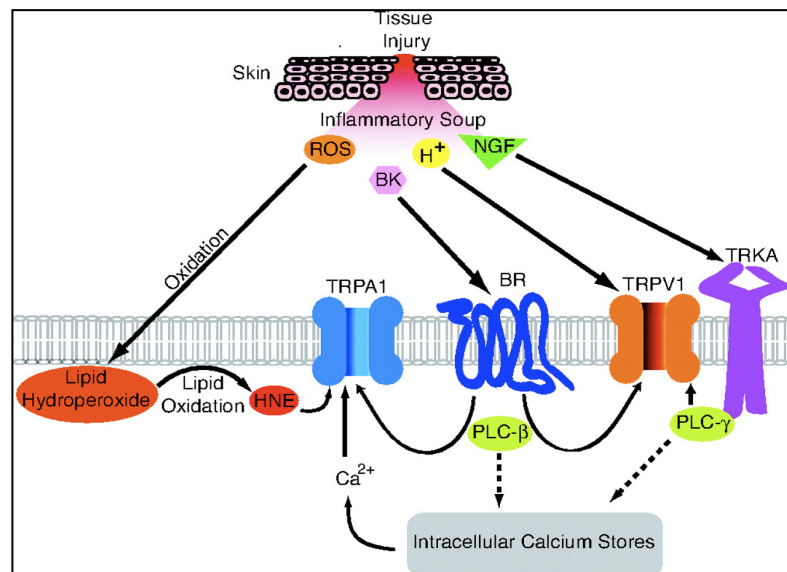


Figura 10. Activación de TRPA1 mediada por especies reactivas de oxígeno (Trevisani et al., 2007).

Recientemente se ha descubierto la importancia del canal TRPA1 en la fisiopatología del sistema respiratorio. Así, TRPA1 media la activación por compuestos irritantes, oxidantes y alérgenos, de neuronas que inervan las vías respiratorias lo que lleva a depresión respiratoria, obstrucción nasal, tos y estornudos (Bessac et al., 2009; Birrell et al., 2009).

Por otro lado, se ha descubierto que una mutación de ganancia de función de TRPA1 causa el síndrome de dolor episódico familiar (Kremeyer et al., 2010), una enfermedad muy rara que se caracteriza por fatiga, hipersensibilidad al frío y falta de apetito.

### **3.5.2.1 El canal TRPA1 como posible mediador del agrandamiento gingival inducido por fármacos**

El agrandamiento gingival se caracteriza por el aumento del tamaño de las encías: las encías se engrosan de tal modo que pueden llegar a cubrir gran parte de la dentadura, haciendo necesaria una intervención quirúrgica para la eliminación del exceso de tejido (Figura 11). Este agrandamiento es un efecto secundario frecuente durante el tratamiento prolongado con alguno de los siguientes fármacos: el bloqueante de canales de calcio nifedipina (Ramon et al., 1984), antiepilépticos como la fenitoína (Kimball., 1939) y la carbamazepina

(Dahllof et al., 1993) y el inmunosupresor ciclosporina A (Rateitschak-Pluss et al., 1983).



Figura 11. Agrandamiento gingival en paciente tratado con fenitoína (Arya y Gulati., 2012)

La nifedipina es una dihidropiridina bloqueante de canales de calcio dependientes de voltaje que se usa en clínica para el tratamiento de la angina de pecho y la hipertensión. El tratamiento con nifedipina puede inducir el agrandamiento gingival, siendo la incidencia variable entre el 0,5 y el 83%, según diversos estudios. (Barak et al., 1987; Slavin & Taylor, 1987; Fattore et al., 1991; Barclay et al., 1992).

La principal acción de los antiepilépticos fenitoína y carbamazepina es la reducción de las convulsiones epilépticas gracias al bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje. La incidencia del agrandamiento gingival para la fenitoína se sitúa en torno al 50% (Dahllof et al., 1993; Casetta et al. 1997), mientras que la carbamazepina produce agrandamiento de las encías en raras ocasiones (Dahllof et al., 1993).

Por otro lado, el inmunosupresor ciclosporina A actúa, principalmente, sobre linfocitos inmunocompetentes. Su incidencia en el agrandamiento gingival varía entorno al 25 ó 30% en adultos (Boltchi et al., 1999).

El agrandamiento gingival se produce por la acumulación de componentes de la matriz extracelular, mayoritariamente colágeno, en el tejido conectivo gingival produciendo diversos grados de inflamación (Lucas et al., 1985; Delilliers et al., 1986; Kataoka et al., 2005). Se desconoce el mecanismo molecular que lo produce, aunque existen varias teorías al respecto. La primera teoría apunta a cambios en el metabolismo y dinámica del calcio intracelular. Una disminución en la entrada del calcio afectaría a la función secretora de los

fibroblastos gingivales, a la vez que se reduciría o incluso inhibiría la acción de las colagenasas, inhibiendo a su vez el recambio de colágeno y propiciando su acumulación (Bullon et al., 2007). Otra teoría apunta a la existencia de fibroblastos de alta capacidad, sensibles a los fármacos que producen el agrandamiento gingival y que provocarían la síntesis de grandes cantidades de proteínas y colágeno (Seymour et al., 1988; González-Jaranay et al., 1991). Ambas teorías señalan a los fibroblastos gingivales como el componente celular implicado en el agrandamiento gingival. Dado que el ion calcio podría tener gran importancia en este proceso, esto nos llevó a preguntarnos por el posible papel del canal TRPA1, un canal permeable a calcio, en los fibroblastos gingivales y el agrandamiento gingival.

La primera evidencia que invita al estudio del agrandamiento gingival inducido por fármacos a través de TRPA1 proviene del trabajo de El Karim y colaboradores, los cuales demostraron la expresión de canales TRPA1, TRPM8, TRPV1 y TRPV4 en odontoblastos humanos (El Karim et al., 2011; Solé-Magdalena et al., 2011) y en fibroblastos de la pulpa dental donde se expresan los receptores TRPA1 y TRPM8. (El Karim et al., 2011). Cabe destacar que no se han encontrado evidencias de expresión de TRPM8 o TRPA1 en odontoblastos de ratón. (Son et al., 2009).

Asimismo, el trabajo de Fajardo y colaboradores (Fajardo et al., 2008) en el que demostraban que las dihidropiridinas activan TRPA1 expresado tanto en sistemas heterólogos como en neuronas del ganglio trigémino, nos sugirió la idea de que TRPA1 podría estar involucrado en el agrandamiento gingival por medio de su activación por nifedipina. Así, otros fármacos diferentes de las dihidropiridinas y que también provocan el agrandamiento gingival como efecto secundario, podrían activar el canal TRPA1.

Todos estos trabajos nos llevaron a investigar el efecto de los fármacos que inducen el agrandamiento gingival sobre TRPA1, la expresión de este canal en fibroblastos gingivales humanos y su posible papel en el agrandamiento gingival.

### **3.5.2.2 TRPA1 como mediador del dolor neuropático producido por oxaliplatino**

El oxaliplatino es un agente quimioterapéutico de tercera generación derivado del platino. Se usa en el tratamiento del cáncer colorrectal y su acción principal es la inhibición de la transcripción mediante la unión covalente con el ADN celular. El mayor problema en los tratamientos con compuestos basados en el platino, como son el oxaliplatino, el cisplatino y el carbaplatino, es la resistencia que las células tumorales adquieren o poseen endógenamente a estos fármacos. Esta resistencia se ha observado tanto para cisplatino como para el carboplatino, pero no así para el oxaliplatino (Cvitkovic., 1998). Otra ventaja del oxaliplatino es que actúa sobre células resistentes al cisplatino (Tordera & Ferriols., 2000). Asimismo, el oxaliplatino, a diferencia del carboplatino, presenta una baja incidencia en la mielosupresión, disminución de actividad de la médula ósea. Este hecho junto con la mayor eficiencia en tumores resistentes a cisplatino han hecho que se generalice el uso clínico del oxaliplatino (Rixe et al., 1996).

Sin embargo, el tratamiento con oxaliplatino presenta efectos secundarios importantes sobre el sistema nervioso (Extra et al., 1990). En 2004 la Agencia Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA de las siglas en inglés) publicó un estudio en el que señalaron que más del 70% de los pacientes que recibían oxaliplatino desarrollaban neuropatía sensorial (Ibrahim et al., 2004). Años más tarde, en un estudio en el que se examinaron los efectos secundarios en 383 pacientes tratados con oxaliplatino e irinotecan, agente quimioterapéutico que impide la mitosis celular, se comprobó cómo el 52% de los pacientes tratados necesitaron de una reducción en las dosis de los agentes quimioterapéuticos, mientras que el 26% requirieron hospitalización debido a los efectos adversos del tratamiento. (Ashley et al., 2007).

Los efectos secundarios del oxaliplatino sobre el sistema nervioso pueden clasificarse según el tiempo de duración en:

- Agudos: Hipersensibilidad al frío, parestesia (sensación anormal al tacto) y disestesia (sensación desagradable al tacto) de las extremidades.

- Crónicos: Disestesia irreversible en extremidades y déficits en propiocepción.

Los síntomas de la neuropatía inducida por el tratamiento con oxaliplatino se desencadenan con la exposición al frío además de conllevar hipersensibilidad a bajas temperaturas (Extra et al., 1990; Gauchan et al., 2009; Anand et al., 2010). Se creó que estos efectos secundarios se deben a la acción del oxaliplatino sobre diversos canales iónicos presentes en la membrana de las neuronas sensoriales primarias. De este modo se ha descrito que el oxaliplatino altera la amplitud del potencial de acción así como la velocidad de conducción de los nervios sensoriales (Jaggi & Singh., 2012). Esta alteración del potencial de acción ha sido estudiada extensamente, caracterizándose el efecto del oxaliplatino sobre los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje. Existe, sin embargo, cierta controversia respecto al efecto del oxaliplatino sobre estos canales; por un lado, se ha mostrado como la amplitud del potencial de acción en segmentos de nervios de rata mielinizados no se modifica en presencia de oxaliplatino, del mismo modo que no se ha observado efecto del oxaliplatino sobre canales de sodio dependientes de voltaje (Kagiava et al., 2008). Por otro lado, se ha descrito cómo el oxaliplatino reduce las corrientes de sodio en neuronas sensoriales de insectos, anfibios y roedores (Grolleau et al., 2001; Benoit et al., 2006; Sittl et al., 2010). Finalmente, otros estudios han constatado que el oxaliplatino modifica la dependencia de voltaje de canales de sodio hacia valores más negativos, aumentando la excitabilidad neuronal (Benoit et al., 2006). Asimismo se ha descrito cómo el oxaliplatino aplicado sobre neuronas del ganglio raquídeo aumenta la amplitud de las corrientes de sodio, aumentando a su vez la amplitud y duración del potencial de acción (Adelsberger et al., 2000). Más concretamente, el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje mediante un análogo de la tocaidina, el compuesto NeP1, reduce los síntomas de la neuropatía inducida por oxaliplatino (Ghelardini et al., 2010).

Respecto a los canales de potasio, se ha descrito la acción inhibitoria del oxaliplatino sobre estos canales expresados en neuronas sensoriales, una inhibición similar a la acción de la 4-aminopiridina sobre canales de potasio dependientes de voltaje (Sittl et al., 2010). Por último, se ha descrito como la



activación de canales de potasio de la familia  $K_v7$  reduce la hiperexcitabilidad neuronal atenuando los síntomas agudos de la neuropatía inducida por oxaliplatino. (Sittl et al., 2010).

En 2012 Sittl y colaboradores identificaron al canal  $Na_v$  1.6 como el mediador del efecto del oxaliplatino a bajas temperaturas sobre las neuronas sensoriales, ya que la aplicación de oxaliplatino y frío en estas neuronas en cultivo aumenta el tamaño de la corriente de sodio en el canal  $Na_v$  1.6 y reduce su tiempo de inactivación (Sittl et al., 2012). Sin embargo, en este trabajo no se han tenido en cuenta otros canales sensibles a bajas temperaturas, como son los canales TRPA1 y TRPM8 a la hora de intentar explicar los efectos del oxaliplatino y el frío sobre neuronas del ganglio raquídeo.

La sensibilidad al frío que se produce en la neuropatía inducida por oxaliplatino podría estar mediada por los canales TRP sensibles a bajas temperaturas, TRPM8 y/o TRPA1; diversos autores han identificado a uno de estos dos canales como el responsable de la hipersensibilidad al frío inducida por oxaliplatino. Así, se ha demostrado que la inyección intraperitoneal de oxaliplatino (3 mg/kg) produce la sobreexpresión de TRPM8 tanto en ratones como en ratas, tres o cinco días tras la inyección, respectivamente (Gauchan et al., 2009; Kawashiri et al., 2012). En humanos también se ha visto cómo la aplicación de mentol, agonista de TRPM8, en la lengua en pacientes con cáncer colorrectal tratados con oxaliplatino produce sensación de frío a menor concentración de mentol respecto de la concentración a la que esta sensación se produce en pacientes sanos (Kono et al., 2011).

Respecto del canal TRPA1, la inyección de oxaliplatino (1-10 mg/kg) induce alodinia térmica en ratones con fenotipo silvestre pero no en ratones deficientes en TRPA1 (Nassini et al., 2011). Del mismo modo, la hipersensibilidad al frío desaparece con la administración del bloqueante específico para TRPA1, el compuesto HC030031 a 100 mg/kg (Zhao et al., 2012). A nivel celular, el oxaliplatino activa el canal TRPA1 expresado en sistemas heterólogos; sin embargo, no activa el canal expresado en neuronas del ganglio raquídeo. Esta activación es dependiente de glutatión, ya que en

presencia de este quelante de especies reactivas de oxígeno, no se observa activación de TRPA1 por parte del oxaliplatino (Nassini et al., 2011).

Estas especies reactivas de oxígeno surgen del estrés oxidativo celular que se produce en el modelo de dolor neuropático inducido por oxaliplatino, y se caracteriza por un aumento en la peroxidación lipídica, incremento de la hidroxilación del ADN y la introducción de grupos carbonilo en las cadenas laterales de las proteínas (Di Cesare Mannelli et al., 2012). Asimismo, los efectos del oxaliplatino *in vivo* pueden ser revertidos mediante la coadministración de antioxidantes como la vitamina C o la acetil-L-carnitina. La administración de acetil-L-carnitina en ratas que están siendo tratadas con oxaliplatino reduce la hiperalgesia mecánica, sin reducir el efecto antitumoral del agente quimioterapéutico. Otro compuesto antioxidante, la silibina, inyectado en ratas a una concentración de 100 mg/kg previene el daño oxidativo producido por el tratamiento con oxaliplatino (2,4 mg/kg durante 21 días). La coadministración de silibina y  $\alpha$  - tocoferol reduce a la mitad la amplitud de las respuestas nociceptivas ante estímulos mecánicos y térmicos en animales tratados con oxaliplatino. (Di Cesare Mannelli et al., 2012).

Con todos estos datos en cuenta, nos preguntamos si los efectos secundarios del oxaliplatino sobre el sistema nervioso se debían a la activación de canales TRP sensibles a frío (TRPA1 y/o TRPM8). Del mismo modo nos propusimos identificar qué otros canales iónicos podían estar mediando este efecto ya que existen evidencias de la importancia de los canales de calcio tipo L en la hiperalgesia producida por el tratamiento con oxaliplatino (Kawashiri et al., 2012). En otros modelos de dolor neuropático como el que se produce tras la ligación del nervio ciático, se ha descrito cómo los canales de calcio tipo L varían su expresión en las neuronas del asta dorsal de la medula espinal (Dobremez et al., 2005). Del mismo modo, el micro ARN que controla la expresión del canal de calcio tipo L Cav 1.2, miR-103, también varía en este modelo de dolor neuropático en ratas (Favereaux et al., 2011). Los micro ARN son secuencias cortas, de 18 a 25 nucleótidos, no codificantes y muy conservadas en la evolución. Su función principal es la regulación de la expresión génica. Los micro ARN inhiben la expresión de su gen diana al unirse a la región no codificante 3'-UTR (del inglés *Untranslated región*) de su

ARN mensajero. (Lujambio & Lowe., 2012).

Finalmente, con el objetivo de vincular efectos agudos y crónicos, nos preguntamos si el tratamiento con oxaliplatino conllevaba cambios de expresión de los canales iónicos TRPA1, TRPM8, Cav 1.2 y sus micro ARN.

## **Objetivos:**

### **1. El canal TRPA1 como posible mediador del agrandamiento gingival inducido por fármacos:**

- 1.1. Comprobar la posible expresión de canales TRP en los fibroblastos gingivales humanos.
- 1.2. Verificar la posible activación de TRPA1 por fármacos que producen agrandamiento gingival.
- 1.3. Dilucidar el posible efecto de los fármacos que producen agrandamiento gingival sobre la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos.

### **2. El canal TRPA1 como mediador del dolor neuropático producido por oxaliplatino:**

- 2.1. Comprobar el efecto del oxaliplatino sobre la función de canales dependientes de voltaje y canales TRP, enfocando el estudio sobre el canal TRPA1.
- 2.2. Estudiar el efecto del oxaliplatino sobre neuronas sensoriales del ganglio raquídeo en cultivo.
- 2.3. Cuantificar los cambios de expresión génica en estas neuronas producidos por el tratamiento con oxaliplatino en animales de experimentación.
- 2.4. Estudiar el efecto del tratamiento con oxaliplatino sobre la conducta de ratones de experimentación.

## **Materiales y métodos**

### **1. Experimentación con animales:**

En el presente estudio realizamos diversos experimentos que requirieron el uso de ratones de laboratorio. El uso y cuidado de los animales de experimentación lo realizamos siguiendo las directrices de la legislación europea (Directiva 2010/63/UE) y española (Ley 32/2007 y Real Decreto 1201/2005), a continuación se detalla la cepa de ratón utilizada en cada experimento.

#### **1.1 Tipo de animales de experimentación:**

Los ratones utilizados para los cultivos de neuronas de ganglio raquídeo fueron de la cepa C57BL/6, de entre 4 y 6 semanas de edad.

Los animales empleados en el tratamiento con oxaliplatino fueron C57BL/6. La edad de estos últimos animales era de entre 5 a 7 semanas.

#### **1.2. Tratamiento de ratones con oxaliplatino:**

El tratamiento con oxaliplatino (6 mg/kg) consistió en 1 única inyección intraperitoneal. El vehículo utilizado para disolver el oxaliplatino fue una solución acuosa suplementada con 5% de glucosa.

## **2. Técnicas de Conducta:**

### **2.1. Test de peso dinámico:**

Los ratones tratados con oxaliplatino o su vehículo fueron utilizados para el test conductual de peso dinámico. Éste test utiliza un sistema de sensores que permite calcular tanto el tiempo que el animal pasa apoyado en cada pata como la fuerza que ejerce mientras que el animal se desplaza libremente por un habitáculo cuadrangular transparente (BIO-DWB-M, Bioseb).

El sistema de sensores (BIO-DWB-M, Bioseb) se conectó a un ordenador que procesó los datos junto con las imágenes de una cámara web (NGS) que registró los movimientos de los animales durante el experimento. El uso del

software DWB (Bioseb) nos permitió el cálculo de peso y movimiento medidos por el sensor y la discriminación en cada extremidad gracias al uso de los vídeos registrados por la cámara.

Los animales se emplazaron individualmente en el habitáculo y, tras 10 minutos de habituación, procedimos a realizar las mediciones: dos registros por animal de 5 minutos de duración cada uno.

### **3. Cultivos Celulares:**

#### **3.1. HEK 293:**

La línea celular HEK 293 (del inglés *Human Embryonic Kidney*) es una línea celular de morfología fibroblastoide obtenida a partir de cultivos procedentes de tejido renal de fetos humanos. Esta línea se mantuvo utilizando el siguiente medio de cultivo:

- DMEM GlutaMax (Gibco)
- Suero bovino fetal al 10% (v/v)
- Penicilina 100 U/ml
- Estreptomicina 100 µg/ml

Las células se mantuvieron a 37°C y en un incubador con la humedad controlada y una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%.

#### **3.2. HGF:**

Las células HGF (del inglés: *Human Gingival Fibroblasts*) provienen de un cultivo primario de células gingivales humanas, y fueron adquiridas a través de la empresa Innoprot (Innoprot. Vizcaya, España). Esta línea primaria se creció con el siguiente medio de cultivo:

- Medio FM (Innoprot)
- Suero bovino fetal 10% (v/v)
- Suplemento de crecimiento para fibroblastos 10% (v/v)
- Penicilina 100 U/ml
- Estreptomicina 100 µg/ml
- Gentamicina 50 µg/ml

Las células se mantuvieron a 37°C y en un incubador con la humedad controlada y una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%.

### **3.3. CHO:**

La línea celular CHO (del inglés *Chinese Hamster Ovary*), deriva de células ováricas de hámster enano chino. Esta línea se creció con el siguiente medio de cultivo:

- DMEM (Gibco)
- Suero fetal bovino 10% (v/v)
- Penicilina 100 U/ml
- Estreptomicina 100 µg/ml
- Glutamax 2% (v/v)

Las células se mantuvieron a 37°C y en un incubador con la humedad controlada y una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%.

### **3.4. CHO-TRPA1:**

Línea celular producida por el laboratorio de Ardem Patapoutian (Instituto de investigación *Scripps*, La Jolla, EE.UU) a partir de la línea CHO. La línea CHO-TRPA1 posee la transfección estable del canal iónico TRPA1 de ratón. Esta línea se creció con el siguiente medio de cultivo:

- DMEM (Gibco)
- Suero fetal bovino 10% (v/v)
- Penicilina 100 U/ml
- Estreptomicina 100 µg/ml
- Glutamax 2% (v/v)
- Blastocidina 5 µg/ml

La blastocidina seleccionó las células que poseían el plásmido con el TRPA1, ya que estas tenían el gen de resistencia a blastocidina (*brs*). La blastocidina inhibió la síntesis proteica en las células que no tenían el plásmido con el TRPA1, ni tampoco el gen *bsr*, y finalmente murieron.

Las células CHO-TRPA1 se mantuvieron a 37° C y en un incubador con la humedad controlada y una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%.

Para inducir la expresión del canal TRPA1 en estas células, añadimos 0,75 µg/ml de tetraciclina en el medio de cultivo. Tres horas después, el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco.

### **3.5. Transfección transitoria de células HEK 293:**

El TRPA1 murino se encontraba clonado en el plásmido pcDNA5, mientras que el TRPA1 humano estaba en el plásmido bicistrónico pIRES-EGFP. Ambos fueron introducidos en las células HEK usando el agente de transfección lipofectamina 2000 (Invitrogen), a razón de:

- 3 µl de lipofectamina por transfección.
- Medio DMEM sin FBS, hasta completar los 50 µl por transfección.

La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se añadió:

- 2 µg del plásmido
- DMEM sin FBS, hasta completar los 50 µl por transfección

Esta mezcla, con un volumen final de 100 µl, se incubó posteriormente durante 20 minutos a temperatura ambiente para después añadirla a las células. Seis horas más tarde se procedió a retirar el medio reemplazándolo por medio completo fresco.

### **3.6. Transfección transitoria de células HGF:**

Los diferentes ARN de interferencia contra TRPA1, se encontraban clonados en el plásmido bicistrónico psiHIV-U6. Para la transfección de células HGF usamos el mismo protocolo que para las células HEK 293, cambiando el medio DMEM por el medio de fibroblastos FM (Innoprot).

### **3.7. Tripsinización**

Una vez las células llegaban a confluencia, se despegaron del sustrato por tripsinización. Para ello lavamos los frascos de cultivo con medio sin completar, con el objetivo de retirar todos los restos de suero presente en el



medio completo que pudieran inhibir la acción de la tripsina. Añadimos 1 ml de solución de tripsina comercial (GIBCO) a las células, y se dejó actuar durante 1-2 minutos a 37° C. Una vez las células empezaron a desprenderse, añadimos 5 ml de medio completo y centrifugamos a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. Retiramos el sobrenadante, y el sedimento celular se resuspendió en el volumen que se consideró oportuno, dependiendo de la cantidad de células de partida. Para conocer la concentración de células, apartamos 10  $\mu$ l de suspensión celular y se contó el número de células mediante una cámara de Neubauer.

### **3.8. Congelación de células**

Las células se hicieron crecer hasta confluencia en un frasco de 25 cm<sup>2</sup> y se tripsinizaron de la manera descrita anteriormente. El sedimento celular final se resuspendió en una mezcla de 10% DMSO y 90% de Medio Completo, y se traspasó la suspensión a un criotubo. La congelación se realizó de manera escalonada: un primer paso a -20°C de 2 a 3 horas, un segundo paso durante tres días a -80°C, y por último se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido, donde se almacenaron hasta su uso.

### **3.9. Descongelación de células**

Los criotubos, con la suspensión celular congelada, se extrajeron del nitrógeno líquido y se introdujeron rápidamente en un baño a 37°C. Una vez descongeladas las células, el contenido del criotubo fue diluido en 5 ml de medio completo, previamente atemperado a 37°C, y finalmente sembrado en un frasco de 25 cm<sup>2</sup>.

### **3.10. Cultivo primario de neuronas de ganglio raquídeo:**

Los ganglios raquídeos se extrajeron de ratones adultos de la cepa C57BL/6 de entre cuatro y seis semanas de edad.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. La visualización de los ganglios raquídeos, se realizó emplazando la columna vertebral diseccionada bajo una lupa binocular (Leica), de este modo se extrajeron los ganglios enteros y se depositaron en una placa con medio HBSS (Invitrogen) en hielo.

Una vez extraídos todos los ganglios, estos se dejaron en una mezcla de colagenasa/dispasa (1 mg/ml) durante una hora a 37°C.

La disociación enzimática se paró con 0,5 ml de HBSS suplementado con suero fetal bovino, posteriormente, se realizó la disociación mecánica con una pipeta Pasteur de vidrio. Tras lo cual, filtramos la suspensión celular a través de un filtro de malla de 0,4  $\mu\text{m}$ , y se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante resultado de la centrifugación se desechó, mientras que el sedimento se resuspendió en medio DRG, y se sembró en la placa de cultivo.

El cultivo de neuronas se mantuvo a 37° C, en un incubador con la humedad controlada y una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5% durante un máximo de 48 horas.

Medio DRG:

- MEM (Gibco)
- Solución vitaminada MEM 1% (v/v) (Gibco)
- Suero fetal bovino 10% (v/v) (Gibco)
- Penicilina 100 U/ml
- Estreptomina 100  $\mu\text{g/ml}$
- Factor de crecimiento neuronal (NGF) 1  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma-Aldrich)

## **4. Métodos de Biología Celular:**

### **4.1. Ensayo de proliferación celular:**

Para el estudio de la proliferación celular utilizamos el ensayo basado en el bromuro de dimetil tiazolil difeniltetrazolio o MTT. Este ensayo se fundamenta en la reducción intracelular del MTT a formazán (Mosmann, 1983).

Las células vivas convierten el MTT a formazán insoluble, éste se solubiliza al añadir al cultivo una solución de cloruro de hidrógeno y SDS, al solubilizarse el formazán, el medio celular adquiere color. La intensidad del color es cuantificable mediante espectrofotometría a 570 nm, y directamente

proporcional a la cantidad de células vivas presentes en el medio.

Las células HGF se sembraron en una placa de 96 pocillos a razón de 5000 células por pocillo. Tras 24 horas, añadimos al medio de cultivo de cada pocillo, la sustancia química sujeta a estudio. Al día siguiente, en el caso del protocolo a 24 horas y a la semana en el caso del protocolo a 7 días, el medio fue reemplazado por 100  $\mu$ l de medio fresco junto con 10  $\mu$ l de solución MTT a 12 mM, tras 4 horas de incubación a 37°C, se añadieron 100  $\mu$ l de solución SDS-HCl a cada pocillo. Finalmente, y tras otras 4 horas de incubación a 37°C, medimos la absorbancia a 570 nm.

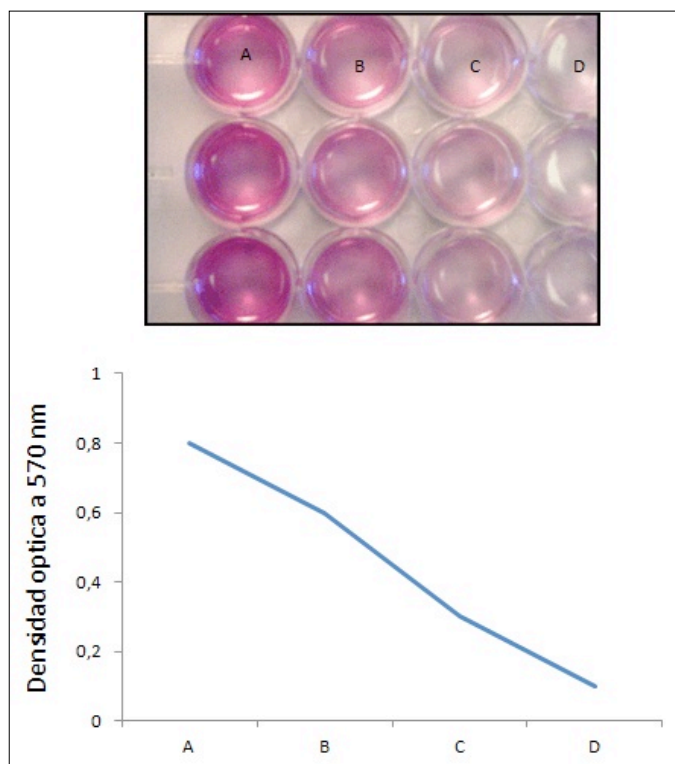


Figura 12. La concentración celular es directamente proporcional a la densidad óptica medida a 570 nm tras la conversión del MTT a formazán en el interior de las células.

#### 4.2. Imagen dinámica de calcio:

Los niveles de calcio intracelular se determinaron mediante el análisis fluorimétrico con la sonda fura-2, utilizando el método ratiométrico. El fura-2 se excita a dos longitudes de onda, 340 y 380 nm, siendo la razón de las fluorescencias de emisión ( $F_{340}/F_{380}$ ) correspondientes a las dos longitudes de onda de excitación, directamente proporcional a la concentración de calcio intracelular (Grynkiewicz et al., 1985). Para la medida del cociente 340/380 usamos un sistema de imagen basado en un monocromador, en este caso el modelo Polychrome IV (TILL Photonics) y una cámara CCD Orca ER (Hamamatsu) conectada a un microscopio modelo Axioskop (Zeiss). El monocromador y la cámara CCD se controlaron con el programa informático METAFUOR (Universal Imaging).

Las células, sembradas a una concentración de 100 mil células por mililitro, se cargaron durante 1h a 37°C con una solución que contenía Fura 2-AM a una concentración final de 5  $\mu$ M, 0,02% de Plurónico y 1 ml de solución control HEPES a un pH de 7,4:

- 140 mM Na Cl
- 5 mM KCl
- 2 mM Ca Cl<sub>2</sub>
- 1 mM Mg Cl<sub>2</sub>,
- 10 mM Glucosa

El análisis de los datos de imagen de calcio lo realizamos mediante el programa Origin 8. Medimos el incremento del cociente de fluorescencia a la longitud de onda de 340 nm frente a la de 380 nm, este cociente se representa como la diferencia entre el valor máximo del cociente tras la aplicación del agonista y el nivel basal.

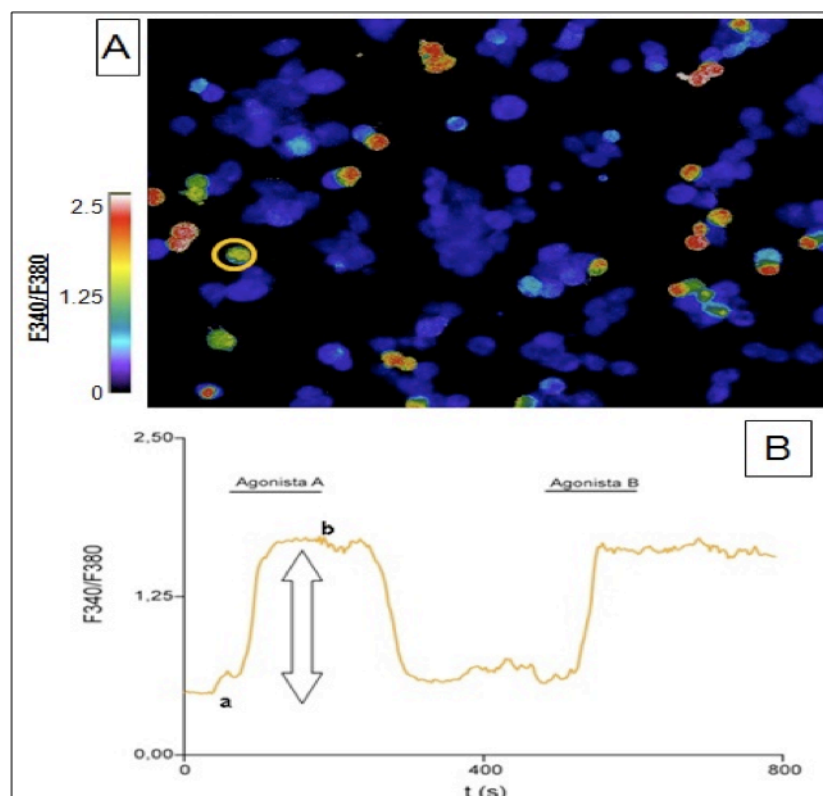


Figura 13. Ejemplo de respuesta de una célula frente a un agonista químico (agonista A). El método utilizado para la valoración de la respuesta se basa en el cálculo del incremento de la razón de fluorescencia a 340 nm frente al nivel de fluorescencia a 380 nm. Para ello se mide el valor del cociente F340/F380 en el punto b, y se le sustrae el valor del mismo cociente en el punto a.

## 5. Técnicas de Biología Molecular:

### 5.1. Western – Blot:

Esta técnica se basa en la separación de las proteínas en función de su peso molecular en un gel desnaturalizante SDS-PAGE y la posterior electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa, donde se realiza la inmunodetección con los anticuerpos correspondientes.

El primer paso para la obtención de las muestras fue recoger las células HGF sembradas a 100 mil células por mililitro de la placa de cultivo, realizando dos lavados previos con PBS 1X para la eliminación del medio de cultivo, posteriormente las células se resuspendieron en 300  $\mu$ l de tampón RIPA por cada pocillo de placa de 6 y se centrifugaron 5 minutos a 1000 r.p.m. y a 4°C. El sedimento celular se hizo pasar por una aguja de 29G para la obtención del extracto proteico total, el cual se midió mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, de Pierce).

Para hacer efectiva la separación en el gel del SDS-PAGE hay un paso previo de desnaturalización de las proteínas, que esta mediada por el  $\beta$ -mercaptoetanol y el SDS presentes en el tampón de carga y por la ebullición de la muestra. Los extractos proteicos a 30 microgramos de proteína con el tampón de carga 2X se calentaron a 95°C durante 5 minutos y posteriormente fueron centrifugados durante 10 s a 11.000 g. Finalizado el proceso, se cargaron los 30 microgramos de proteína con el tampón de carga en un gel del 7,5% de poliacrilamida.

Este tipo de electroforesis requiere un gel superior, de apilamiento, y un gel inferior, de separación. El primero contiene un porcentaje de acrilamida bajo, constante para cada gel y un pH de 6,8, mientras el segundo tiene un porcentaje de acrilamida mayor, que dependerá del peso de la proteína que se quiera resolver, y un pH de 8,8. Se utilizó el sistema *minigel vertical Mini-protean 3* (Bio-Rad). La electroforesis se corrió a 160 V, dejando que las muestras migraran hasta que el frente de azul de bromofenol (presente en el tampón de carga) saliera del gel. Tras finalizar la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman). La transferencia se realizó a 70 V y 4°C durante 2 horas en tampón de transferencia. Posteriormente, se bloqueó la membrana durante 1 hora en tampón TBS con 10% de leche en polvo (tampón de bloqueo). Una vez la membrana estuvo bloqueada, se incubó con el primer anticuerpo en tampón de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la membrana con T-TBS, 3 veces durante 10 minutos, y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP de *horseradish peroxidase*), durante 1 hora a temperatura ambiente, en tampón de bloqueo. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con T-TBS, y por último se reveló la membrana con el sistema basado en luminiscencia *Luminata Forte* (Millipore). El sistema de captación de imagen utilizado fue el equipo *Bioimager* (Fujifilm), y el programa para la cuantificación y tratamiento de las imágenes fue el *Image Gauge V 4.0* (Fujifilm).

- **Tampón salino PBS (pH 7,4):** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- **Concentrado de cóctel de inhibidores (x40):** 1 tableta de cóctel de inhibidores Complete Mini (Roche) en 250 ml de tampón.
- **Tampón RIPA:** PBS (pH 7,4), 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,5% (w/v) deoxicolato, 1:40 del concentrado del cóctel de inhibidores.
- **Tampón de carga 2x:** 50 mM Tris-Cl, pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 4 % (v/v) de 2-β-mercaptoetanol, 0,001% (w/v) de azul de bromofenol.
- **Gel superior o apilador (4% Acrilamida):** 130 mM Tris-Cl, pH 6,8, 4% solución comercial de Acrilamida (30% Acrilamida/0,8% bis-Acrilamida; Sigma-Aldrich), 0,1% (w/v) SDS, 1:50 Solución Persulfato de Amonio (Sigma-Aldrich) en H<sub>2</sub>O 10% (w/v), 1:500 Solución comercial TEMED (Sigma-Aldrich).
- **Gel inferior o separador (7,5% Acrilamida):** 375 mM Tris-Cl, pH 8,8, 7,5% solución comercial de Acrilamida (30% Acrilamida/ 0,8 %bis-Acrilamida), 0,1% (p/v) SDS, 1:50 Solución Persulfato de Amonio 10% (p/v), 1:500 Solución comercial TEMED.
- **Tampón de electroforesis:** 25 mM Tris-base, 192 mM Glicina, 1 % (p/v) SDS.
- **Tampón de Transferencia:** 25 mM Tris-base, 192 mM Glicina.
- **Tampón salino TBS (pH 7.6):** 20 mM Tris-base, 137 mM NaCl.
- **T-TBS:** TBS, 1% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich).
- **Tampón bloqueo:** TBS, 10% (p/v) leche en polvo.
- **Anticuerpos primarios:**
  - Anti-hTRPV1: VR1 - C15 hecho en cabra de Santa Cruz Biotechnologies, usado a una dilución 1/1000.
  - Anti-β actina: AC-15 hecho en ratón de Sigma Aldrich, usado a dilución 1/1000.
- **Anticuerpos secundarios:**
  - Anti-cabra: de Sigma-Aldrich, usado a una dilución 1/2000.
  - Anti-ratón HRP: de Sigma – Aldrich, usado a una dilución de 1/2000.

## 5.2. RT-PCR:

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*) se basa en la retrotranscripción de una hebra de ARN en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, el resultado, se amplifica en un PCR tradicional y se visualiza en un gel de agarosa al 2%. La presencia en el gel de las bandas de interés, indica la expresión génica de dichas secuencias en el tejido o célula de estudio. Se trata por tanto de una técnica semicuantitativa de expresión génica.

Esta técnica la realizamos con el ánimo de comprobar los canales TRP que se expresan en las células HGF.

Para obtener el ARN total de células HGF en cultivo, utilizamos el kit “*PureLink RNA Mini Kit*” (Ambion). Con el ARN total, se procedió a digerir el ADN genómico que pudiera quedar de la extracción de ARN. Para ello usamos la enzima “*DNAse I*” (Invitrogen) durante 30 minutos a 37°C. Una vez digerido el ADN genómico, se realizó la retrotranscripción del ARN mensajero a ADN complementario. Del ARN extraído de las células HGF, tomamos 0,5 µg para la reacción de retrotranscripción a los que añadimos 150 ng de los cebadores aleatorios (Invitrogen) y 10 mM de dNTP. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C seguidos de 5 minutos en hielo.

Posteriormente añadimos el tampón *Superscript* a una concentración final 1X, 10 mM de DTT y 2 unidades por microlitro finales de la enzima “*RNAse OUT*” (Invitrogen). Tras 2 minutos a temperatura ambiente añadimos 50 unidades de la retrotranscriptasa “*Superscript III*” (Invitrogen). Esta mezcla final se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente seguidos de 1 hora a 50°C, finalmente, el proceso de retrotranscripción se paró incubando 15 minutos a 70°C.

Con el ADN complementario obtenido de la retrotranscripción, se realizó el segundo paso de la técnica, que era la amplificación de los genes de interés mediante PCR, para ello utilizamos la enzima “*Go Taq*” de Promega aplicando el siguiente protocolo:

El tampón *Go Taq* se usó a una concentración final de 1X.



Posteriormente añadimos 2,5 mM, concentración final, de cloruro de magnesio, así como 0,5 mM de dNTP y el ADNc a una concentración final de 5 ng por reacción.

A continuación, cada cebador se añadió a la reacción a una concentración final de 1  $\mu$ M.

En última estancia añadimos 5 unidades de enzima Go Taq por reacción.

El volumen final de la reacción de RT-PCR se completó con agua destilada autoclavada hasta alcanzar los 20  $\mu$ l.

Se utilizaron los distintos cebadores que se detallan a continuación:

| Cebador   | Secuencia ( + )      | Secuencia ( - )      |
|---|----------------------|----------------------|
| <b>hTRPA1</b>                                   | tggtgcacaaatagaccagt | tgggcaccttagagagtagc |
| <b>hTRPM8</b>                                   | gatttcaccaatgaccgccg | cccagcagcattgatgtgc  |
| <b>hTRPV1</b>                                   | ctctacaacagcctgtac   | aaggccttctcatgcact   |
| <b>Secuencia diferente entre TRPV1 y TRPV1b</b> | agctcaccaacaagaagg   | gtcccactgtcctgcagg   |
| <b>Actina</b>                                   | accacatgtgccatcta    | gccacaggattccataccca |

La temperatura de fusión para los cebadores se estableció en 55°C.

En la reacción de amplificación de los distintos canales TRP en fibroblastos gingivales humanos, se realizaron 45 ciclos. Para la amplificación de la región diferente entre TRPV1 y TRPV1b, acortamos la reacción de amplificación a 40 ciclos.

### 5.3. qPCR:

Esta técnica es una variante de la PCR convencional basada en la amplificación de secuencias de interés a partir del ADN complementario obtenido mediante el primer paso de la RT-PCR, descrita anteriormente. Sin embargo, y a diferencia del segundo paso de la RT-PCR, la PCR cuantitativa (del inglés *quantitative PCR*) permite la cuantificación de la expresión de los genes de interés.

La adición del fluoróforo SYBR Green (Invitrogen) a la reacción de amplificación, permite la visualización y cuantificación de las secuencias de ADN que van siendo amplificadas, puesto que este fluoróforo se une

inespecíficamente al ADN de doble cadena de nueva formación y al ser excitado con luz azul ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) emite con luz verde ( $\lambda = 522 \text{ nm}$ ). La intensidad de esta señal fluorescente se mide al completar cada ciclo de PCR, y se representa en una “gráfica de amplificación” para determinar el CT, que se define como el punto en el que se detecta por primera vez la señal fluorescente, es decir, el producto de la PCR. Finalmente, se compara el valor CT frente a una curva estándar (basándose en los valores CT de muestras control y sus respectivas cantidades iniciales de ADN o ARN conocidas) para determinar la cantidad de ADN o ARN en la muestra.

La PCR cuantitativa fue utilizada para el análisis de la expresión de los canales TRPA1 y TRPM8 en los ratones tratados con oxaliplatino, así como la cuantificación de la reducción de expresión de TRPA1 en células HGF transfectadas con ARN de interferencia.

La purificación del ARN total a partir de los ganglios raquídeos de los ratones tratados con oxaliplatino o vehículo la realizamos usando el mismo kit de extracción de Ambion utilizado para la RT-PCR de células HGF.

Sin embargo, y a diferencia de lo que sucedía en la extracción a partir de un cultivo celular de fibroblastos gingivales, la cantidad de ARN total que obteníamos era mucho menor, en torno a los  $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Asimismo, la reacción de producción del ADN complementario a partir del ARN extraído arrastraba consigo varios reactivos que inhibían la reacción de PCR cuantitativa.

La reducida cantidad de TRPA1 presente en el ARN total de los ganglios raquídeos extraídos hacía imposible una mayor dilución del ADNc para la realización de la PCR cuantitativa, ya que no se llegaba a observar ninguna amplificación de TRPA1 o TRPM8 más allá de una dilución 1:8. Sin embargo, la presencia de reactivos inhibidores de la reacción de polimerización tras la reacción de producción de ADNc impedía la correcta amplificación de los genes a estudio a las diluciones empleadas.

Por ello, realizamos un paso adicional de purificación tras la producción del ADNc, previo a la PCR cuantitativa, utilizando el kit de GE Healthcare “illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”. Mediante este paso de purificación eliminamos los reactivos inhibidores permitiendo realizar la PCR

cuantitativa con menores diluciones del ADNc, lo que nos permitió la amplificación de los genes TRPA1 y TRPM8, y su posterior cuantificación.

La reacción de PCR cuantitativa se realizó añadiendo los siguientes reactivos; los cebadores específicos para cada amplificación a una concentración final de 50 nM, el ADNc a 2,5 ng, completando hasta los 20 µl finales de la reacción con 10 µl del mix de los fluoróforos SYBR Green y ROX, y agua destilada autoclavada.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

| Cebador         | Secuencia ( + )      | Secuencia ( - )      |
|-----------------|----------------------|----------------------|
| <b>mTRPA1</b>   | atatgcagtggaatgtgga  | ctgaggccaaaagccagtag |
| <b>mTRPM8</b>   | ggctcatccacatttcacc  | caccatccacacagcaaaga |
| <b>hTRPA1</b>   | tggtgcacaaatagaccagt | tgggcaccttagagagtagc |
| <b>ARNr 18S</b> | cggctaccacatccaaggaa | gctggaattaccgcggt    |

La amplificación del gen ARNr 18S nos sirvió como control interno, para normalizar las cantidades de ADNc entre las diferentes muestras y realizar así el cálculo de la expresión relativa. Éste cálculo se realizó utilizando el método conocido como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen y Livak, 2008).

#### 5.4. Rastreo de micro ARN :

El rastreo de los micro ARN se basa en el mismo principio de la PCR cuantitativa, sin embargo, en lugar de medir el nivel de expresión del gen a estudio, se buscan diferencias significativas en el nivel de expresión de los diferentes micro ARN.

La diferencia con la PCR cuantitativa reside en la purificación del ARN a partir del tejido, en nuestro caso, ganglios raquídeos de ratones tratados con oxaliplatino o con su vehículo. Esta purificación se realizó mediante el kit de extracción "*miR Cury RNA isolation kit*" de Exiqon, ya que permitía la extracción de ARN de pequeño tamaño como son los micro ARN.

Una vez obtenido el ARN, preparamos el ADN complementario siguiendo las instrucciones del kit "NCODE VILO miRNA cDNA synthesis kit" (Invitrogen).

El ADN complementario se utilizó para la reacción de PCR cuantitativa a razón de 0,5 ng por pocillo.

Analizamos la expresión de 348 micro ARN mediante una placa de PCR de 384 pocillos en los que se encontraban los cebadores específicos para cada microARN.

El análisis de expresión relativa de cada microARN se realizó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## **6. Análisis Estadístico:**

El análisis estadístico de los resultados lo realizamos utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad software, Inc).

Para el cálculo de varianzas entre dos grupos de estudio utilizamos la Prueba F ( $p > 0,05$  varianzas homogéneas;  $p < 0,05$  varianzas significativamente diferentes).

Para el cálculo de la igualdad entre dos poblaciones con distribución normal utilizamos la Prueba t ( $p < 0,05$  medias significativamente diferentes).

Finalmente, para el cálculo de la igualdad entre más de dos poblaciones usamos la prueba ANOVA con posterior test Dunnet en el que comparamos la igualdad de las medias de las poblaciones con la población control, posterior test Bonferri cuando calculamos la igualdad de las medias de las poblaciones entre sí o test ANOVA medidas repetitivas para muestras pareadas ( $p < 0,05$  media de poblaciones significativamente diferentes a la media de la población control).

Niveles de significancia expresados en las gráficas: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## Resultados

### 1. El canal TRPA1 como posible mediador del agrandamiento gingival inducido por fármacos

#### 1.1. Los Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF) expresan TRPA1 y TRPV1, pero no TRPM8:

La línea celular HGF proviene de muestras gingivales humanas. Como se ha mencionado en la introducción, tanto los odontoblastos humanos como las células de la pulpa dental expresan canales TRP termosensibles. Teniendo en cuenta estos datos, lo primero que hicimos fue comprobar la expresión de los canales termosensibles TRP en los fibroblastos gingivales humanos.

El uso de la técnica de RT-PCR reveló la expresión génica de los canales TRPA1 y TRPV1. Sin embargo, no se obtuvieron evidencias de la expresión de TRPM8.

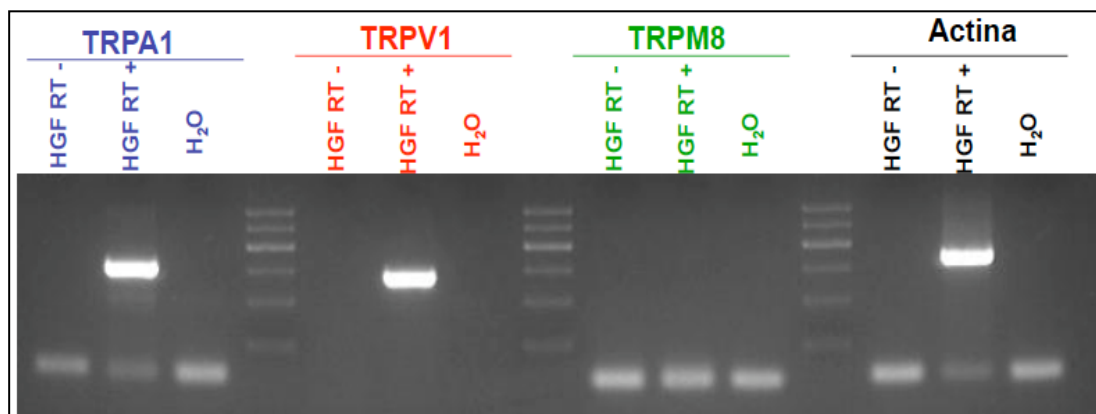


Figura 14. Gel de agarosa (2%) en el que se observa el resultado de la amplificación de los canales TRPA1, TRPV1 y TRPM8. El gen para la  $\beta$ -Actina sirvió como control positivo de la reacción de amplificación.

Una vez comprobada la expresión de estos canales en las células HGF en condiciones de cultivo, quisimos comprobar la funcionalidad de los mismos. Para ello, utilizamos la técnica de imagen de calcio usando agonistas específicos para estos tres canales.

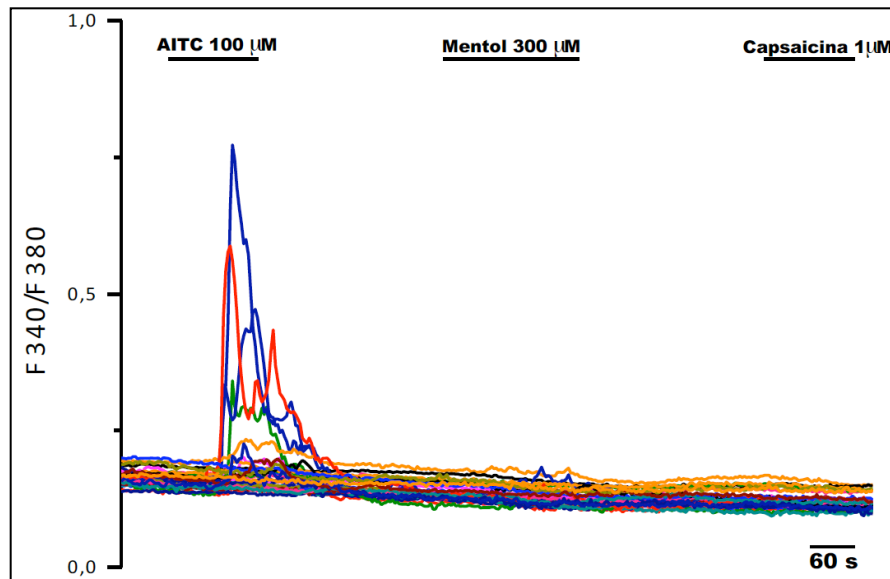


Figura 15. Ejemplo de experimento de imagen de calcio en los fibroblastos gingivales humanos (HGF), a los que se aplicó de forma secuencial distintos agonistas de canales TRP.

Al añadir el aceite de mostaza (AITC; Alil Isotiocianato), agonista específico de TRPA1 (Jordt et al., 2004), gran número de células HGF se activaron (Figura 15). Asimismo, no observamos ningún incremento de calcio intracelular al añadir mentol, agonista de TRPM8 (McKemy et al., 2002), lo cual era esperado, dado que no detectamos expresión de TRPM8. Sorprendentemente, no encontramos ninguna respuesta a capsaicina, agonista de TRPV1 (Caterina et al., 1997), a pesar de haber comprobado su expresión en las mismas células HGF.

## 1.2. Los Fibroblastos Gingivales Humanos expresan TRPV1b, la isoforma dominante negativa del canal TRPV1:

A la vista de los resultados de imagen de calcio, nos planteamos dos hipótesis a la falta de respuesta a capsaicina: o bien el TRPV1 que se expresa en las células HGF no llega a traducirse a proteína, o bien se trata de una isoforma que no responde a capsaicina. Así pues, buscando en la literatura publicada sobre el tema, nos encontramos con varios estudios que apoyaban la segunda hipótesis. En 2005, Gang Lu y colaboradores descubrieron una variante de ajuste humana insensible a capsaicina y protones, llamada TRPV1b. Esta variante difiere de la secuencia proteica de TRPV1 en tan solo 60 aminoácidos de la región amino terminal, suficiente para hacer que TRPV1b actúe como dominante negativo, lo que significa que al tetramerizar con las variantes

silvestre de TRPV1, se forma un canal insensible a capsaicina. (Lu et al., 2005). Otro estudio que apoyaba la hipótesis de la expresión de en células gingivales, fue el publicado por Pecze y colaboradores en 2008 (Pecze et al., 2008). En él, los autores demuestran la expresión de TRPV1b en la línea celular HaCaT de keratinocitos humanos, así como en keratinocitos provenientes de biopsias epidérmicas. Los keratinocitos son el componente celular mayoritario de la epidermis y constituyen el 90% de la población celular gingival (Lindhe et al., 2002). Si estas células expresan la variante TRPV1b, cabía la posibilidad que también lo hicieran los fibroblastos gingivales.

Con todos estos datos, nos decidimos por buscar la presencia de TRPV1b en las células HGF. Para ello, diseñamos cebadores que flanquearan en 60 pares de bases la secuencia de 180 pares de bases que no tiene la variante TRPV1b, pero sí TRPV1 (Figura 16).

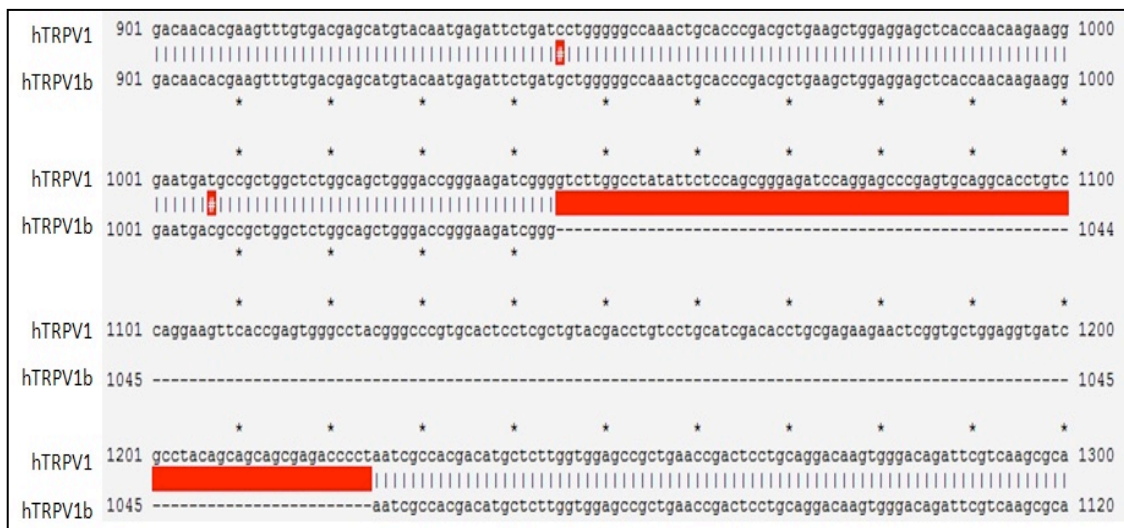


Figura 16. Alineamiento de secuencias entre hTRPV1 y hTRPV1b. Los 180 pares de bases que no tiene TRPV1b van desde la posición 1044 a 1224 en la secuencia de TRPV1. Alineamiento conseguido mediante el software de análisis de secuencias ApE.

El resultado de la RT-PCR reveló dos bandas, una superior correspondiente a las 300 pares de amplificación de TRPV1 y otra menor, de 120 pares de bases correspondiente a TRPV1b (Figura 17).

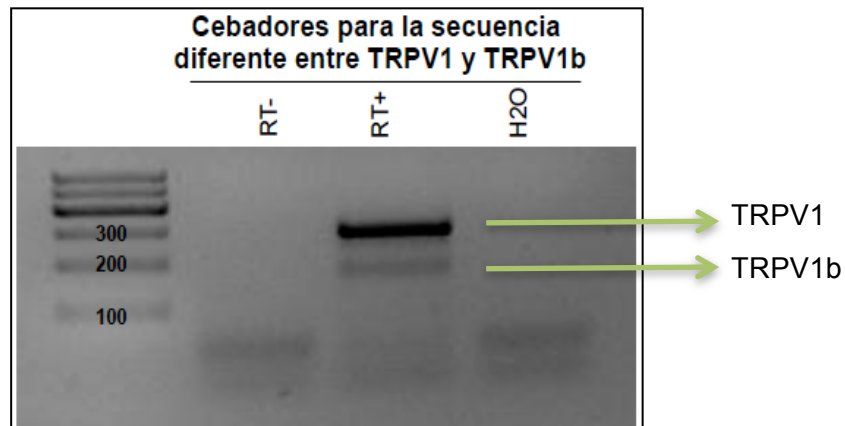


Figura 17. Imagen del gel de agarosa 2% en el que se visualiza el resultado de la RT-PCR realizada a partir de ADNc de células HGF con cebadores que flanquean la región diferente entre TRPV1 y TRPV1b.

Las dos bandas resultado de la RT-PCR se enviaron al Servicio de Secuenciación de la Universidad Politécnica de Valencia, los resultados corroboraron que la banda superior correspondía a TRPV1 y la banda inferior a TRPV1b.

### 1.3. La proteína TRPV1 se expresa en los fibroblastos gingivales humanos:

Una vez habíamos comprobado la expresión a nivel de ARN mensajero, tanto del canal TRPV1 nativo como su versión insensible a capsaicina (TRPV1b), decidimos estudiar la expresión del canal al nivel post-transcripcional. Para ello, realizamos un *western-blot* a partir del extracto proteico total de los fibroblastos gingivales humanos en cultivo.

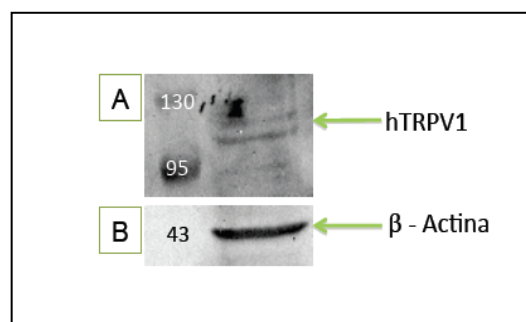


Figura 18. Revelado de membrana de western-blot. (A) hTRPV1 (100KDa). (B)  $\beta$  - actina (43 KDa).

El revelado de la membrana permitió visualizar (Figura 18A), dos bandas en torno a los 100 KDa de peso molecular que se le calcula a TRPV1. La



diferencia de 180 pares de bases entre la versión nativa del canal y la “b” se traducen en 60 aminoácidos menos en la secuencia de TRPV1b, lo que significa una diferencia de peso molecular entorno a los 6 KDa. Por tanto, es probable que la banda superior corresponda a hTRPV1 y la inferior a hTRPV1b. No pudimos confirmar esta hipótesis al carecer de un anticuerpo específico que diferencie entre ambas versiones del canal.

#### 1.4. La sobreexpresión de TRPV1 en células HGF produce la respuesta a capsaicina:

Dado que la variante TRPV1b se comporta como un dominante negativo (Lu et al., 2005), aunque la variante funcional del canal se exprese, al tetramerizar con la variante de ajuste, se formará un canal insensible a capsaicina. Por ello, razonamos que si aumentáramos el nivel de expresión del TRPV1 nativo, podríamos restablecer la respuesta del canal a capsaicina. Así pues, tras transfectar células HGF con el plásmido de la variante nativa de TRPV1 humano, medimos su respuesta a capsaicina mediante la técnica de imagen de calcio.

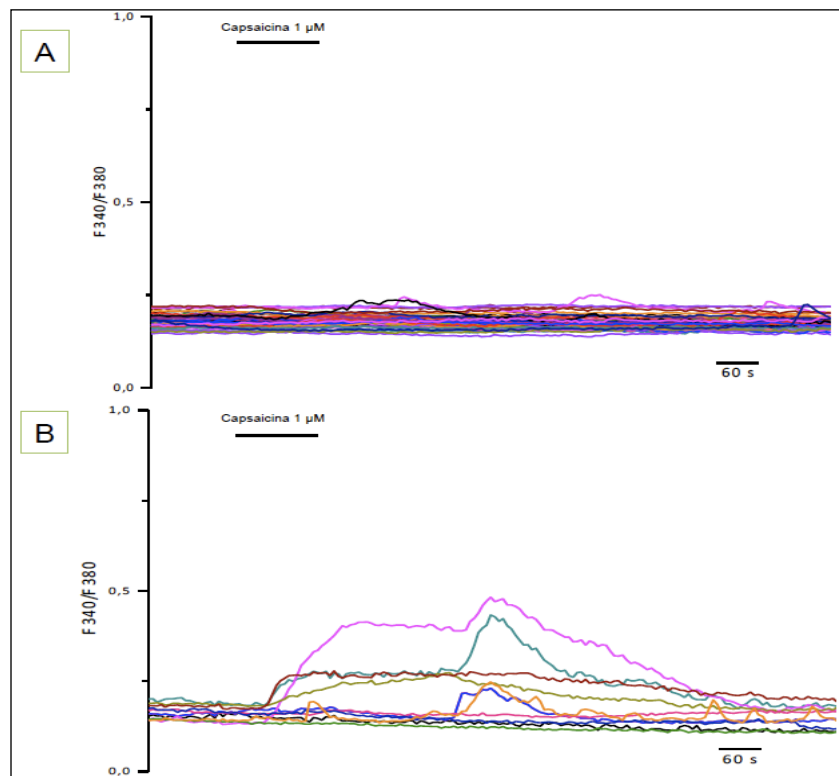


Figura 19. (A) Ausencia de respuesta a capsaicina en las células HGF nativas. (B) Respuesta a capsaicina por parte de las células HGF transfectadas con el TRPV1 humano fenotipo silvestre.

Como se muestra en la Figura 19, la sobreexpresión de TRPV1 produjo la respuesta a capsaicina por parte de las células HGF.

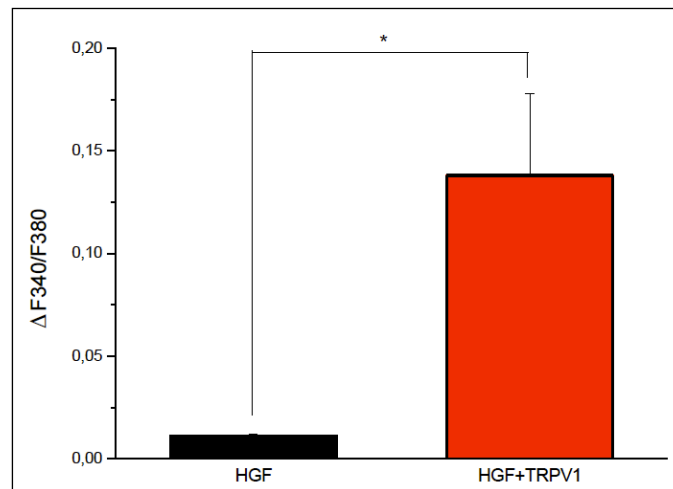


Figura 20. Amplitud de respuesta a capsaicina en células HGF (negro) y HGF transfectadas con hTRPV1 (rojo). (Prueba t; n=50).

La amplitud de respuesta a capsaicina en las células que sobreexpresan el canal TRPV1 fue significativamente mayor a la de los fibroblastos gingivales no transfectados.

### **1.5. Los fármacos que inducen el agrandamiento gingival activan el canal TRPA1 expresado en sistemas heterólogos:**

Como se ha mencionado en la introducción, las dihidropiridinas, como la nifedipina, activan el canal iónico TRPA1, tanto en sistemas heterólogos como en neuronas sensoriales del ganglio trigémino (Fajardo et al., 2008). Por tanto, si las células gingivales expresan el canal TRPA1, éste podría activarse en presencia de nifedipina e incluso, al añadir otros fármacos que producen agrandamiento gingival como por ejemplo la fenitoína o la ciclosporina A. Para comprobarlo utilizamos la técnica de imagen de calcio con células CHO-TRPA1. Como se muestra en la Figura 21, al aplicar fenitoína sobre las células, se produjo un incremento importante del calcio intracelular. Las mismas células que respondieron a fenitoína también lo hicieron a AITC.

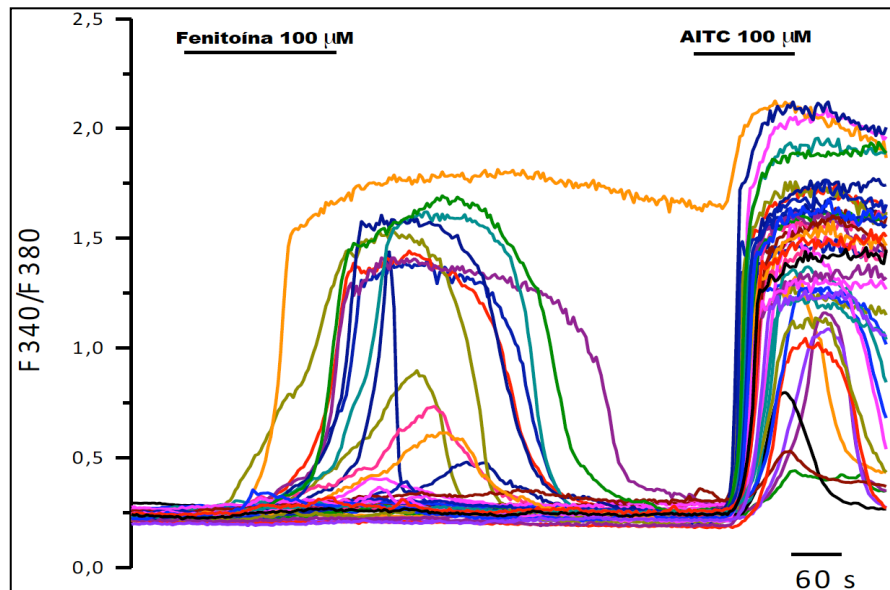


Figura 21. La aplicación de fenitoína (100  $\mu\text{M}$ ) en las células que sobreexpresan TRPA1, produjo un aumento de la razón de fluorescencia similar al que se produjo cuando se aplicó aceite de mostaza (100  $\mu\text{M}$ ).

Otro antiepiléptico, la carbamazepina, es capaz de producir el agrandamiento de las encías aunque en menor medida que la fenitoína. (Dahllof et al., 1993). Al aplicar carbamazepina en las células CHO – TRPA1, se produjo un aumento del calcio intracelular en las mismas células que posteriormente se activaron al aplicar aceite de mostaza.

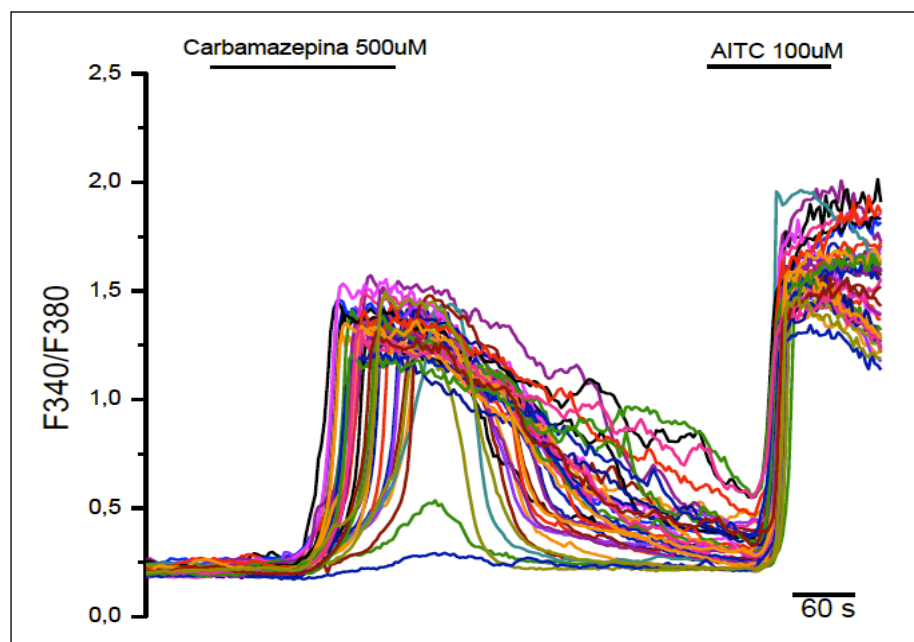


Figura 22. La aplicación de carbamazepina 500  $\mu\text{M}$  en las células que sobreexpresan TRPA1, produjo un aumento de ratio de fluorescencia similar al que se produce cuando se aplicó aceite de mostaza 100  $\mu\text{M}$ .

Por el contrario, la ciclosporina A no produjo respuesta alguna en las células

CHO-TRPA1, aplicada a concentraciones que variaron entre 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Finalmente, la nifedipina, corroborando los resultados obtenidos por Fajardo y colaboradores (2008), activó el canal TRPA1 a concentraciones muy bajas. De este modo la curva dosis-respuesta para los fármacos que inducen agrandamiento gingival sobre TRPA1 expresado en células CHO, quedó de la siguiente manera.

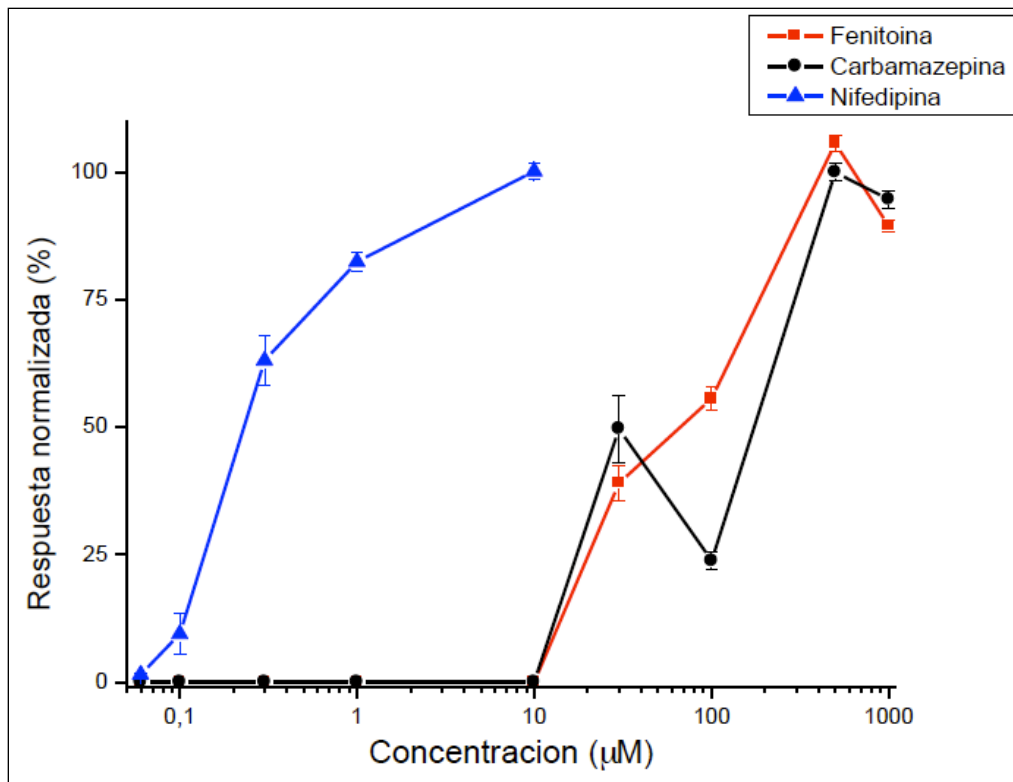


Figura 23. Curva dosis-respuesta de los fármacos: nifedipina (azul), fenitoína (rojo) y carbamazepina (negro). Respuestas medidas con imagen de calcio en células CHO-TRPA1. La amplitud de la respuesta se normaliza a la obtenida al aplicar 10  $\mu\text{M}$  en de nifedipina, y 500  $\mu\text{M}$  en el caso de la fenitoína y la carbamazepina.

Cabe destacar que ninguno de estos tres fármacos produjo respuesta alguna en células CHO que no poseían el plásmido de TRPA1 (Figura 24).

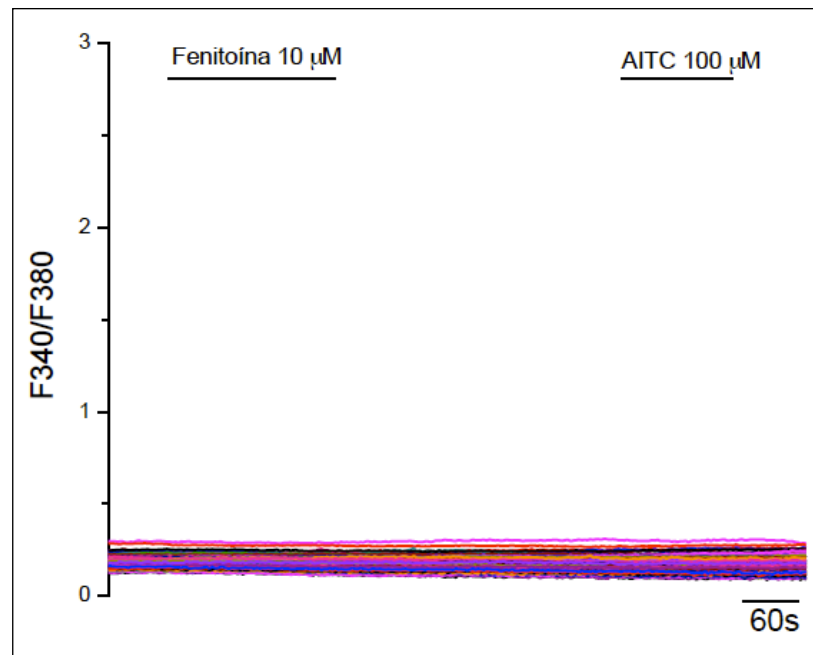


Figura 24. Imagen de calcio en células CHO. Ni la fenitoína, ni el AITC producen respuesta.

La ausencia de respuesta en células que no expresaban TRPA1 apoyaba la idea de que este canal mediaba las respuestas que veíamos en las células CHO - TRPA1 en imagen de calcio. Otro dato que apoyó esta conclusión fue el resultado del experimento que realizamos con HC030031, bloqueante específico del canal TRPA1 (McNamara et al., 2007). Como se muestra en la Figura 25, la aplicación de HC030031 inhibió la respuesta a fenitoína, inhibición que también observamos en las respuestas a nifedipina y carbamazepina.

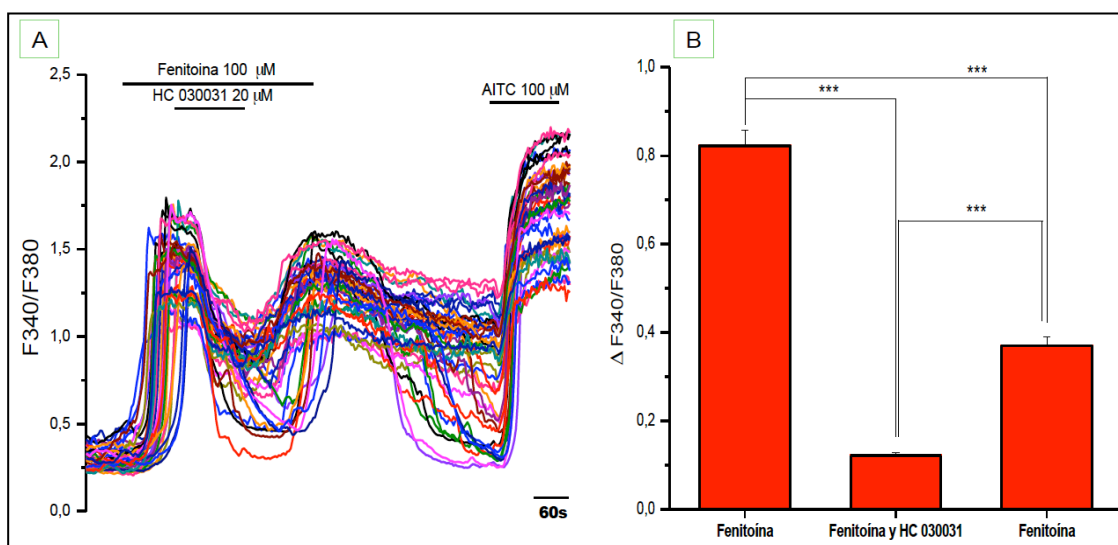


Figura 25. (A) Efecto del HC 030031 sobre la respuesta a la aplicación de fenitoína, en imagen de calcio. (B) Histograma amplitudes de respuesta en cada condición aplicada en A. (ANOVA medidas repetitivas con post test Bonferri; n = 145).

Como se ha mencionado en la introducción, el canal TRPA1 supone una vía de entrada de calcio al interior celular, por lo que en ausencia de este ion en el espacio extracelular, la adición de un agonista sobre TRPA1 no produciría ninguna respuesta medible en imagen de calcio. Así, como era de esperar, cuando aplicamos estos tres fármacos sobre células CHO-TRPA1 en condiciones de cero calcio extracelular, no observamos ninguna respuesta (Figura 26). Estos resultados demostraron que el aumento del calcio se debe al influjo y no a la liberación de depósitos intracelulares. Con frecuencia, al reintroducir el calcio en el medio extracelular se produce un aumento del calcio, respuesta característica de muchas células epiteliales a esta manipulación experimental.

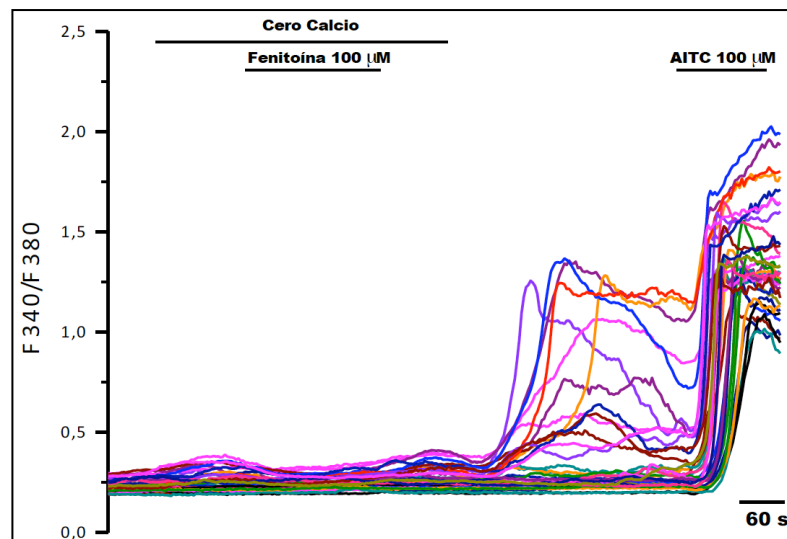


Figura 26. La respuesta de calcio a la aplicación de fenitoína no se produce en ausencia de calcio extracelular.

### 1.6. La fenitoína, la carbamazepina y la nifedipina activan el canal TRPA1 expresado en fibroblastos gingivales humanos:

Como se ha mencionado anteriormente, las células HGF expresan el canal TRPA1. El siguiente paso fue comprobar si los fármacos que inducen el agrandamiento de las encías y que activan TRPA1 expresado en células CHO, podían activarlo en los fibroblastos gingivales.

*Fenitoína:*

La fenitoína aplicada sobre las células HGF produjo una respuesta en las mismas células que respondieron a aceite de mostaza. Todas las células estudiadas que respondieron a fenitoína, respondieron a aceite de mostaza. Sin embargo, obtuvimos mayor número de células que respondieron a AITC respecto del número de células que respondió a fenitoína (Figura 27).

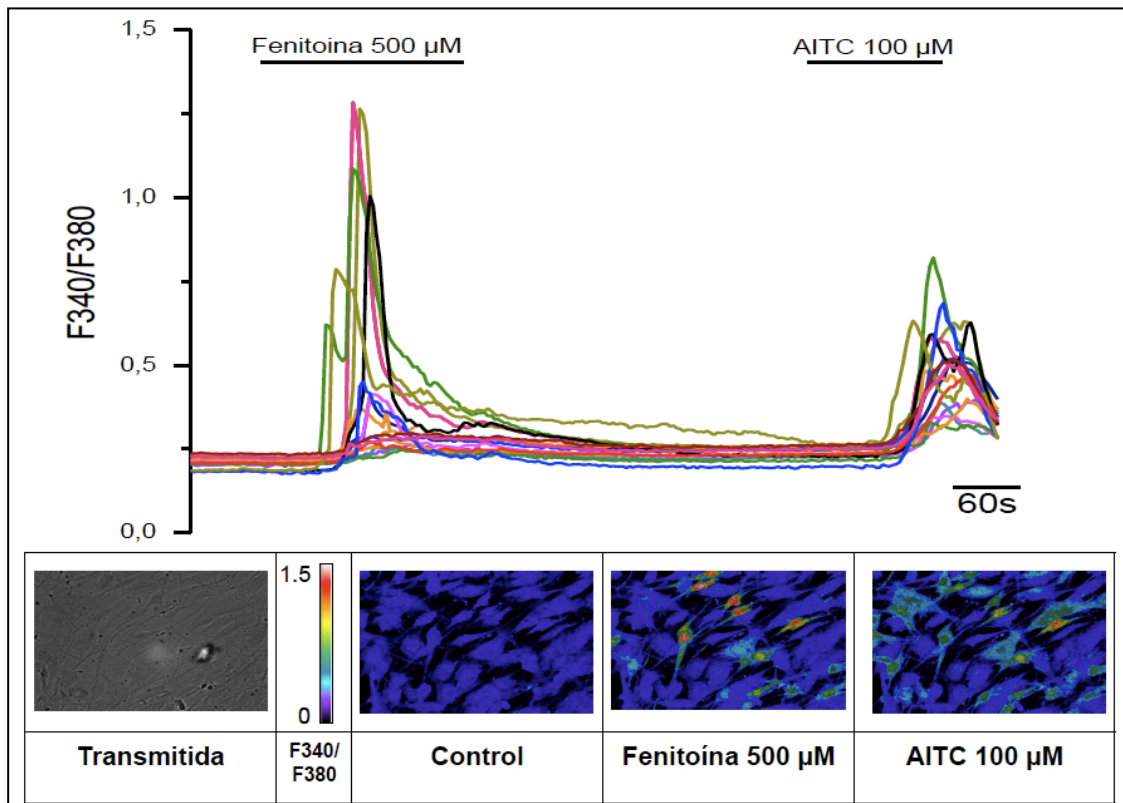


Figura 27. Imagen de calcio sobre fibroblastos gingivales humanos. El experimento muestra cómo las mismas células que responden a 500 µM de fenitoína, responden a aceite de mostaza a 100 µM.

El hecho de que todos los fibroblastos que respondieron a fenitoína lo hicieran también a AITC invitaba a pensar que el canal que mediaba estas respuestas era TRPA1. Para comprobarlo, al igual que hicimos con las células CHO-TRPA1, realizamos experimentos de imagen de calcio aplicando HC030031, bloqueante específico de TRPA1, sobre la respuesta a fenitoína.

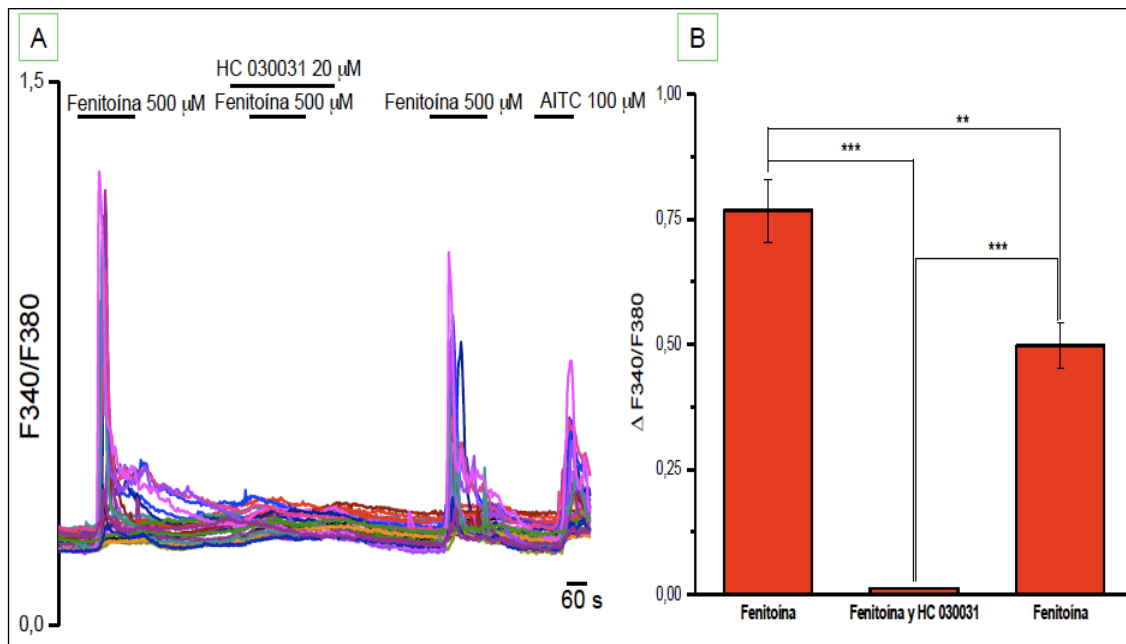


Figura 28. (A) Imagen de calcio de HC 030031 y fenitoína. (B) Histograma de amplitudes de respuesta en cada condición aplicada en A. (ANOVA medidas repetitivas con post test Bonferri; n= 132).

La respuesta a fenitoína se inhibió casi en su totalidad al añadir el bloqueante de TRPA1 (Figura 28). Este bloqueo de la respuesta fue reversible, puesto que una segunda aplicación de fenitoína dio lugar a respuestas de calcio.

#### *Carbamazepina:*

De los tres inductores del agrandamiento gingival que activan TRPA1 expresado en las células CHO, la carbamazepina fue el fármaco que necesitó una mayor concentración para aumentar el calcio intracelular en células HGF (Figura 29).

La carbamazepina, aplicada sobre las células HGF produjo un aumento de su calcio intracelular. Este tipo de respuesta, aunque con una mayor amplitud, se pudo ver en las mismas células cuando aplicamos aceite de mostaza.



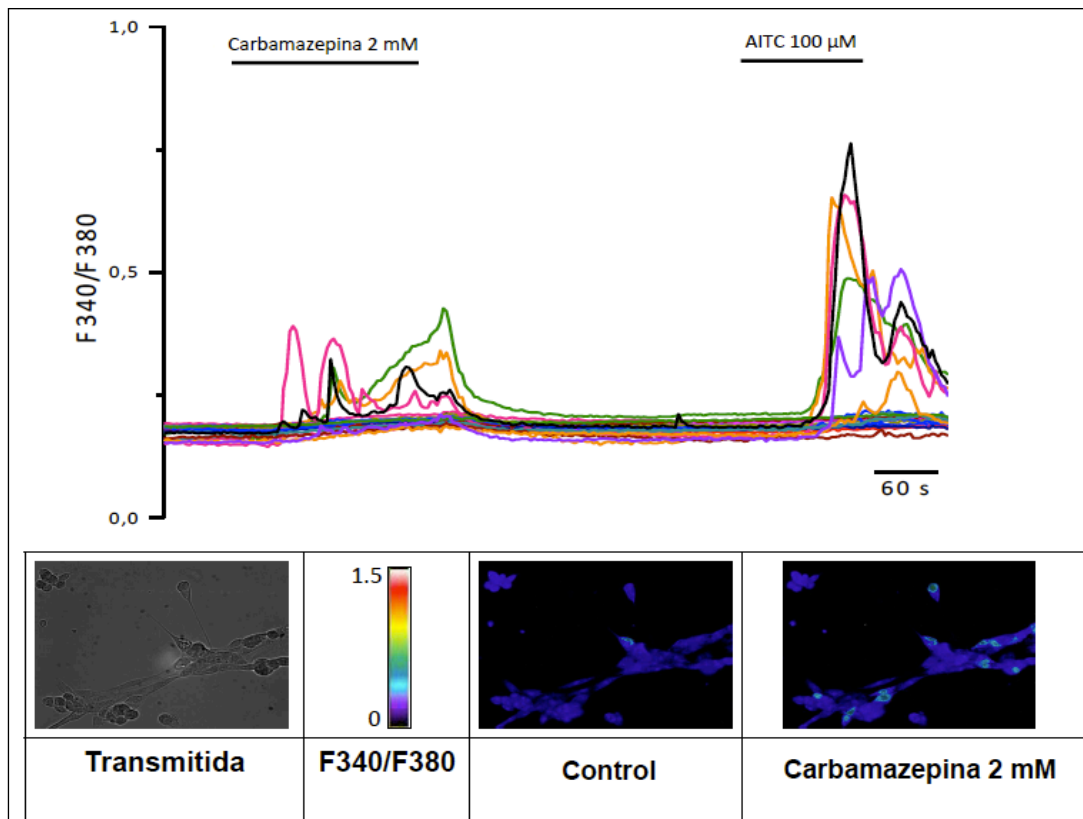


Figura 29. La carbamazepina (2 mM) activó las mismas células que posteriormente se activaron con AITC (100  $\mu$ M).

La carbamazepina activó las células CHO-TRPA1 en un rango de concentración que fue desde 30  $\mu$ M hasta 1 mM. Sin embargo, al aplicarse sobre las células HGF necesitó de una concentración mayor para obtener respuestas de la misma amplitud en comparación con las obtenidas en las células CHO-TRPA1. Así pues, el rango efectivo de concentraciones de la carbamazepina sobre las células HGF fue desde 1 mM hasta 2 mM (Figura 33). En este punto, conviene destacar que la administración de fenitoína puede llegar a tener una incidencia del 50% en el agrandamiento gingival (Dongari-Bagtzoglou: Informe anual de la *American Academy of Periodontology*; 2004), sin embargo la carbamazepina lo induce en raras ocasiones (Dongari, et al., 1993).

Una vez comprobado que la carbamazepina activaba el canal TRPA1 en fibroblastos gingivales humanos, nos centramos en el estudio de la fenitoína como principal fármaco antiepiléptico que induce agrandamiento gingival, puesto que la carbamazepina tiene una menor incidencia en este efecto secundario y se requiere una mayor concentración del fármaco para activar TRPA1.

**Nifedipina:**

La nifedipina aplicada sobre los fibroblastos gingivales humanos, produjo una respuesta en las mismas células que respondieron a aceite de mostaza.

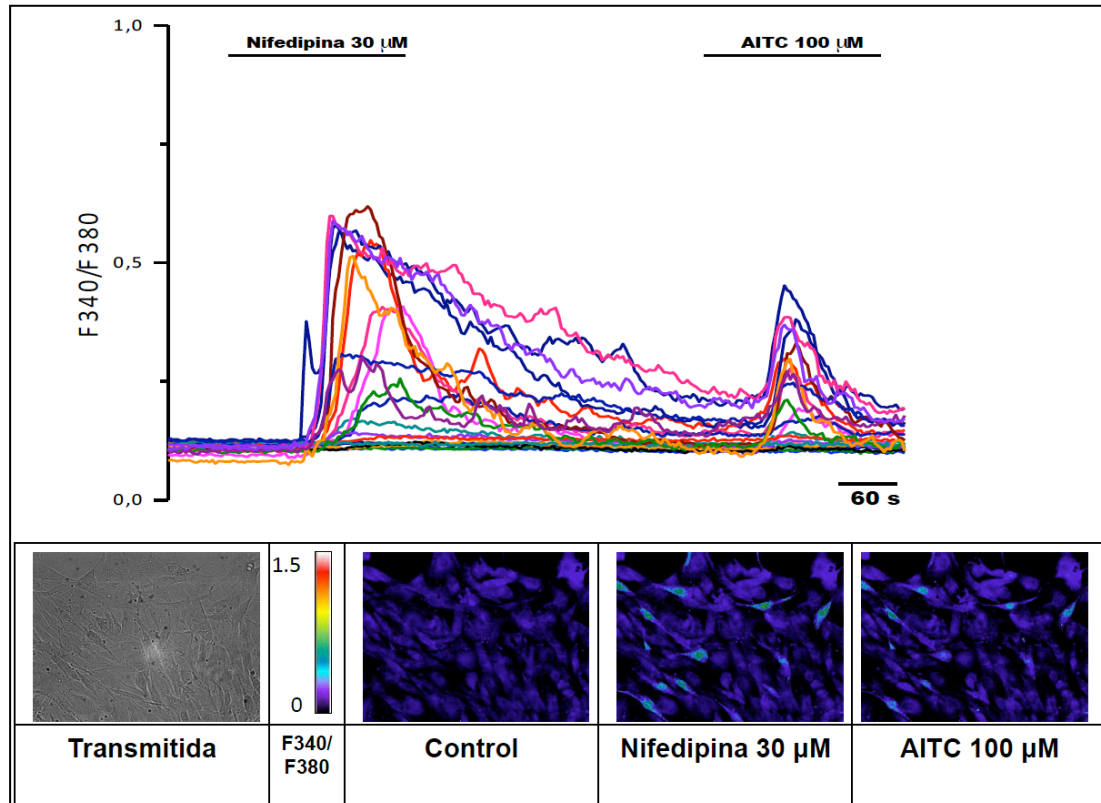


Figura 30. Ejemplo de experimento de imagen de calcio en células HGF, donde se muestra que aquellas células que se activaron con 30 µM de nifedipina, se activaron de nuevo con 100 µM de AITC.

Al igual que sucedió con las células CHO-TRPA1, al aplicar ciclosporina A sobre las células HGF, no encontramos respuesta alguna (Figura 31). Por tanto, los fármacos que inducen el agrandamiento gingival, a excepción de la ciclosporina, también activaron el canal TRPA1 expresado en fibroblastos gingivales humanos en cultivo.

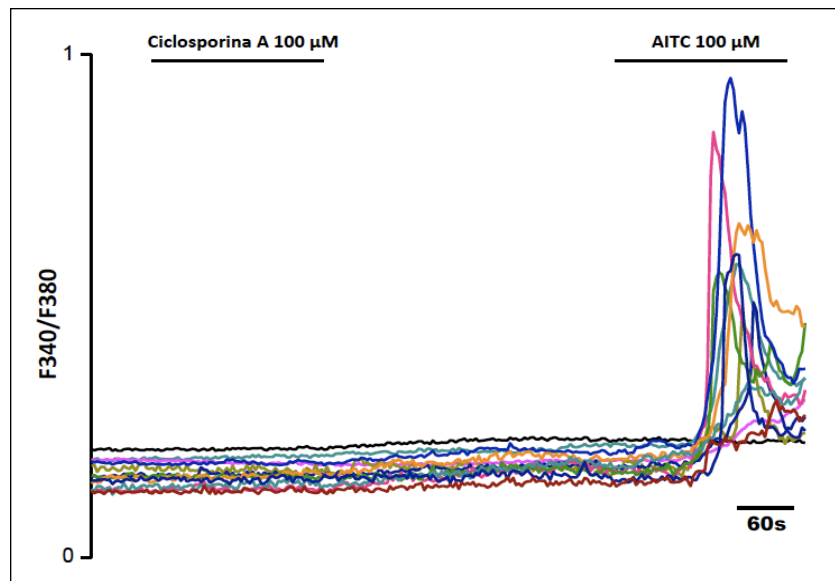


Figura 31. La aplicación de ciclosporina A sobre células HGF no produce ninguna respuesta.

Fenitoína, carbamazepina y nifedipina produjeron un aumento de calcio extracelular en las mismas células que respondieron a aceite de mostaza, el agonista específico de TRPA1.

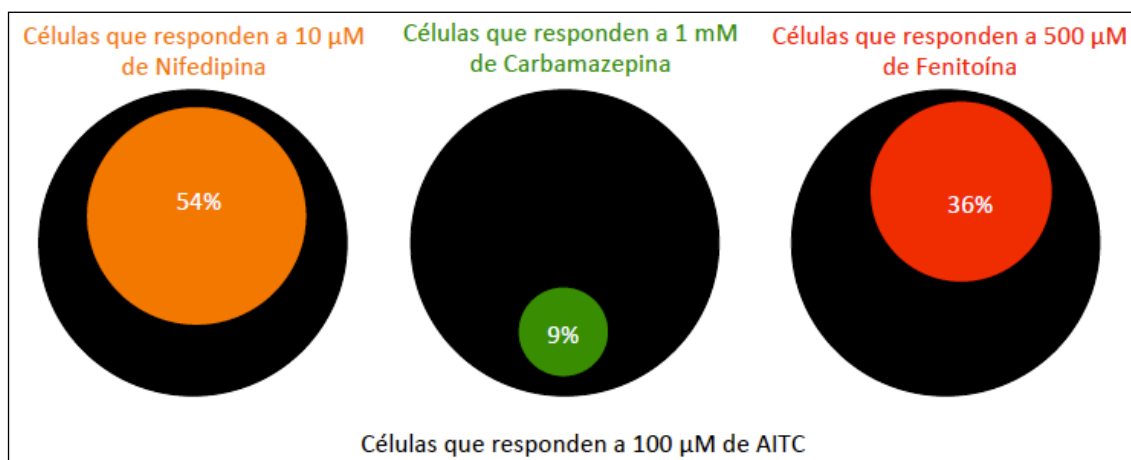


Figura 32. Diagrama de Venn que indica la relación de las células HGF que respondieron a AITC (negro) y a nifedipina (amarillo), carbamazepina (verde) o fenitoína (rojo).

Como se puede ver en la figura 32, todas las células que respondieron a fenitoína, carbamazepina o nifedipina, respondieron a aceite de mostaza. Sin embargo, no todas las células que respondieron a aceite de mostaza, respondieron a estos tres fármacos. Estos resultados sugieren que el aceite de mostaza es un agonista más efectivo sobre TRPA1 que los fármacos responsables del agrandamiento gingival.

Finalmente, la gráfica representativa de la relación dosis-respuesta para las

células HGF quedó de la siguiente forma:

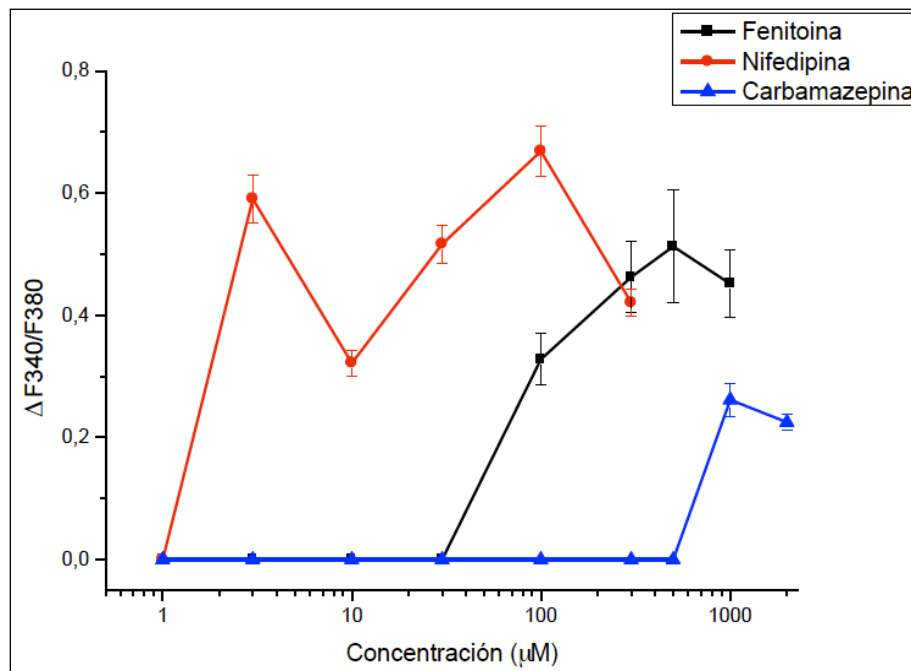


Figura 33. Curvas dosis-respuesta para nifedipina, fenitoína y carbamazepina en células HGF obtenida mediante experimentos de imagen de calcio.

Al igual que con las células CHO-TRPA1, la nifedipina fue la sustancia que activó TRPA1 a dosis más bajas, desde 3 μM hasta los 300 μM, siendo 100 μM la concentración a la que se alcanzó la respuesta máxima. La fenitoína, mantuvo una relación dosis-respuesta similar a la que presentó en las células CHO-TRPA1, siendo 100 μM la concentración umbral para la activación de las células HGF, y 500 μM la concentración a la cual se alcanzó la respuesta de mayor amplitud. Por contra, la carbamazepina requirió concentraciones mucho mayores para activar los fibroblastos gingivales, en comparación con su acción sobre las células CHO-TRPA1, requiriendo concentraciones en el rango milimolar.

### 1.7. La fenitoína activa TRPA1 expresado en células HEK 293, pero no activa ni a TRPM8 ni TRPV1:

Como se ha mencionado en la introducción, los fibroblastos de la pulpa dental expresan TRPA1 y TRPM8, los odontoblastos expresan además TRPV1. Por ello, nos pareció interesante comprobar si la fenitoína activa únicamente TRPA1 y no el resto de canales TRP cuya expresión se ha descrito en células que forman parte de la cavidad bucal.

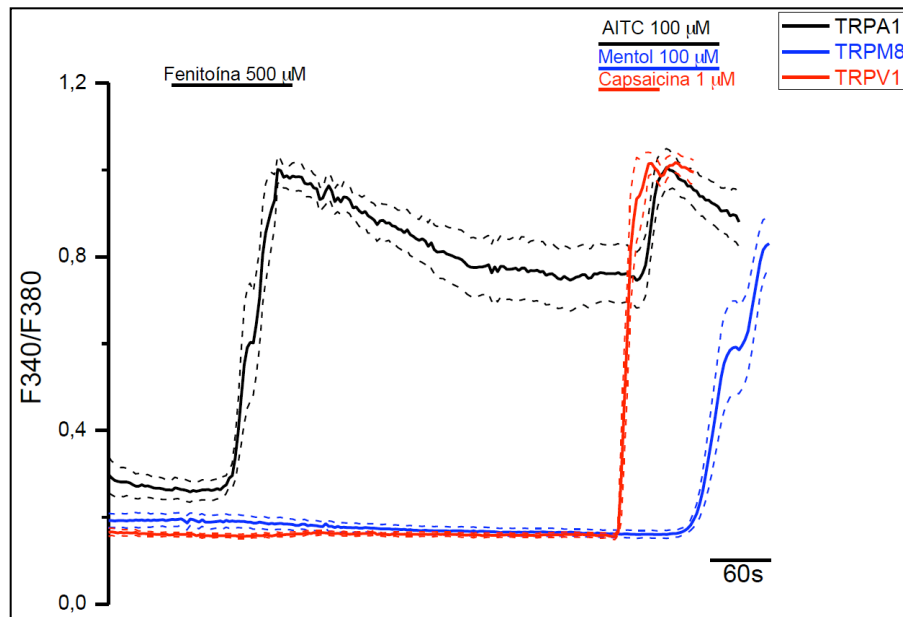


Figura 34. Media (línea sólida) y error estándar (línea punteada) de las respuesta a fenitoína, aceite de mostaza, mentol y capsaicina de 30 células HEK 293 transfectadas con TRPA1, TRPM8 o TRPV1 humanos.

La fenitoína aplicada sobre células HEK 293 transfectadas con TRPA1, TRPM8 o TRPV1, activó únicamente a las células que expresaban TRPA1.

### 1.8. El LPS activa TRPA1 en células HGF:

Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y que les sirve como barrera protectora (Raetz et al., 2002). El LPS actúa como una endotoxina en el tejido infectado; al unirse al receptor TLR4 (del inglés *toll like receptor 4*) presente en las células inmunitarias (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998), se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias que desencadenan la respuesta inmunitaria en el tejido afectado.

Existe una relación entre el LPS y el agrandamiento gingival basada en el papel de la placa bacteriana en la cavidad bucal, ya que dicha placa bacteriana está reconocida como cofactor en la etiología del agrandamiento gingival. Así, el desarrollo y severidad de esta patología está influida por la acumulación de placa dental (Armitage, 1999).

Sin embargo, existe cierta controversia respecto a la relación específica de las bacterias que residen en el entorno gingival con el desarrollo del engrosamiento de las encías. En 2006 Akiyama y colaboradores examinaron el

perfil bacteriano subgingival en pacientes bajo tratamiento con fenitoína. El análisis desarrollado antes y después del tratamiento reveló la importancia de dos bacterias asociadas con el desarrollo del agrandamiento gingival; *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*. Por el contrario, Smith y colaboradores publicaron un trabajo en 1983 en el que afirmaron que no existían diferencias en la población bacteriana de la cavidad oral en pacientes con o sin agrandamiento gingival. Finalmente, otra hipótesis que se ha planteado sobre la importancia de la placa dental en el desarrollo del agrandamiento gingival proviene del reconocimiento de componentes bacterianos por parte de las células gingivales. En ese sentido, el LPS sería reconocido por el receptor TLR4 presente en las células gingivales (Corrêa et al., 2011) y esta unión entre TLR4 y LPS promovería el desarrollo del engrosamiento de las encías.

Siguiendo nuestra hipótesis de agrandamiento gingival a través de la acción sobre el canal TRPA1, nos propusimos comprobar la posible activación de TRPA1 por parte del LPS. En un principio quisimos conocer si el LPS de la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, microorganismo que forma parte de la flora bacteriana del tracto gastrointestinal, era capaz de activar el canal TRPA1 en los fibroblastos gingivales humanos (Figura 35).

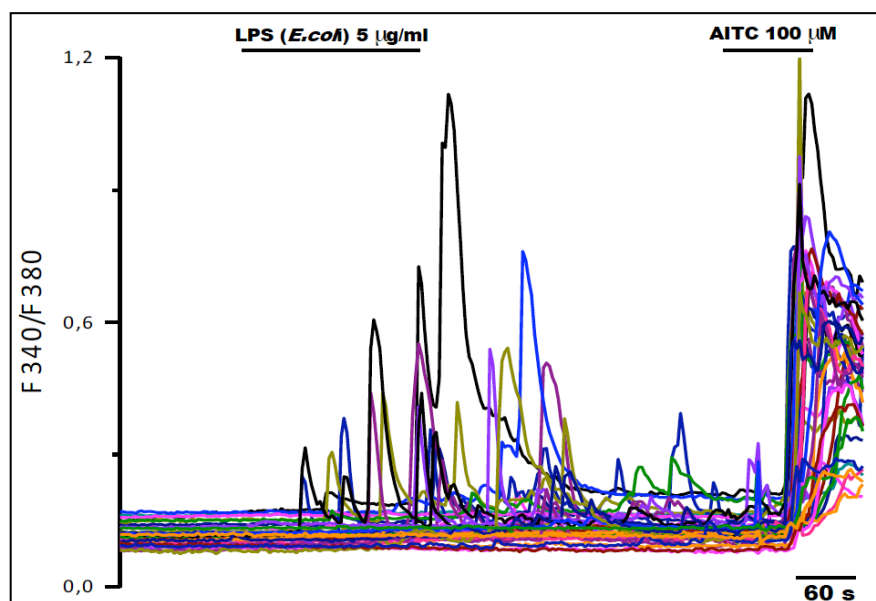


Figura 35. Imagen de calcio en células HGF. El LPS de *E.coli* activa las mismas células que posteriormente responden a aceite de mostaza.

El aumento del calcio producido por LPS de *E.coli* en células HGF se bloqueó

en presencia de HC 030031, un bloqueante específico del canal TRPA1. Este resultado sugiere que dichas respuestas están mediadas por la activación del canal TRPA1.

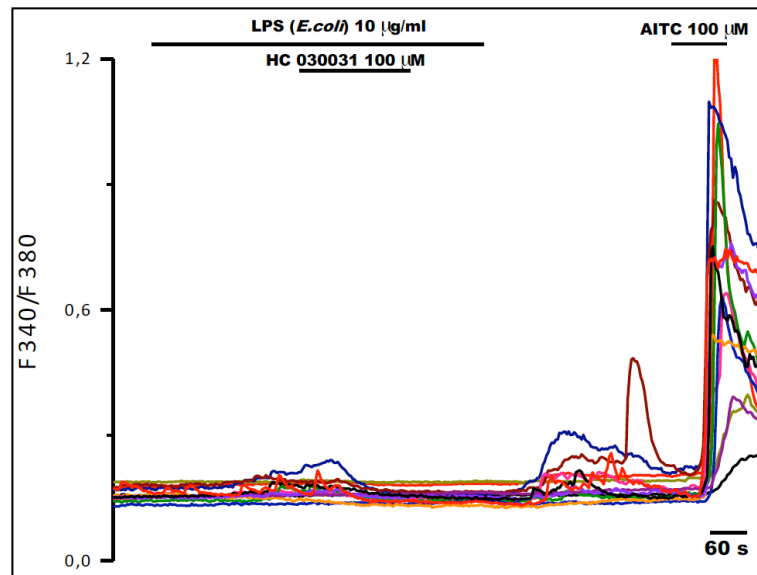


Figura 36. La administración del bloqueante específico de TRPA1, HC 030031, redujo la respuesta de al LPS de *E.coli*

Del mismo modo, probamos la actividad del LPS extraído de *Porphyromonas gingivalis*, bacteria que reside de forma habitual en la cavidad oral, sobre las células HGF (Figura 37).

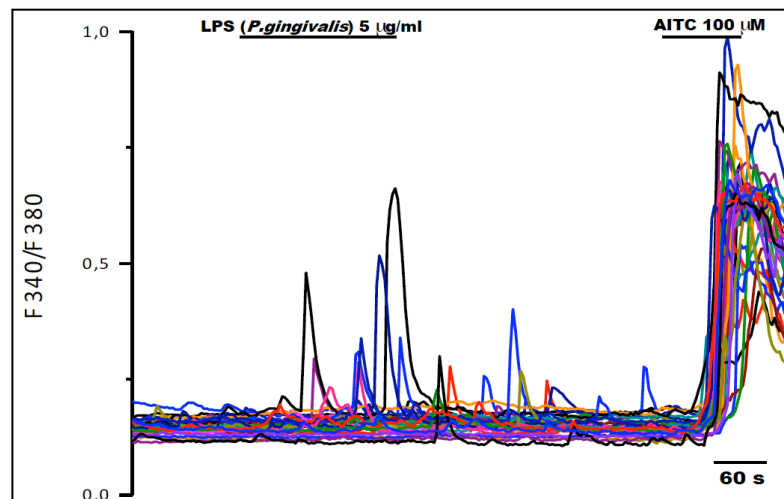


Figura 37. Imagen de calcio en células HGF con LPS de *P. gingivalis*

Al igual que ocurría con el LPS de *E.coli*, las células que respondieron al LPS de *P. gingivalis* también lo hicieron al aceite de mostaza. Sin embargo, no todas las que respondieron a AITC lo hicieron al LPS de *E. coli* o *P. gingivalis*.

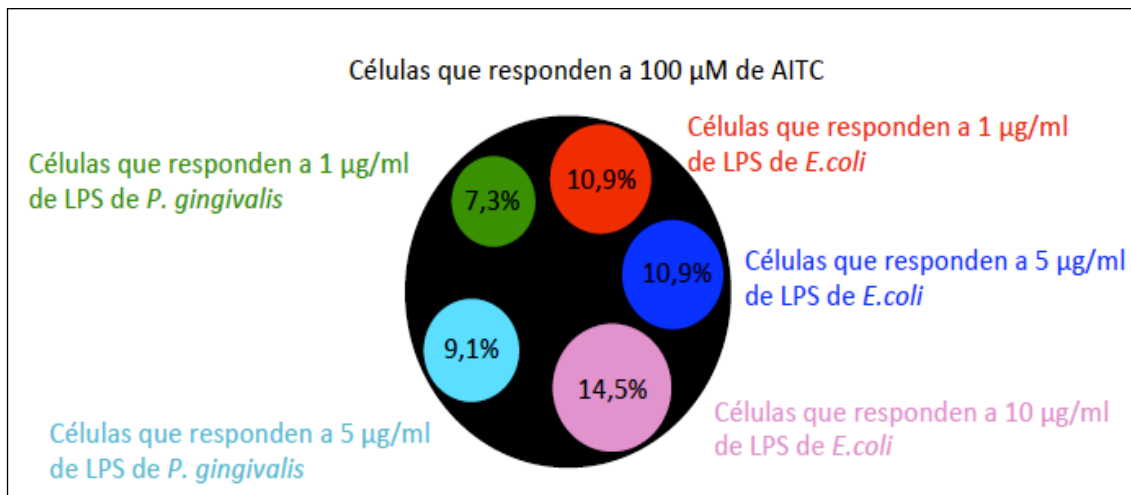


Figura 38. Diagrama de Venn que indica la relación de las células HGF que respondieron a AITC (negro) y al LPS de *E. coli* (1 µg/ml, rojo; 5 µg/ml, azul; 10 µg/ml, magenta) o al LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml, verde; 5 µg/ml, celeste).

Todas las células HGF que se activaron por LPS, tanto de *E. coli* como de *P. gingivalis*, respondieron también al aceite de mostaza, agonista específico de TRPA1.

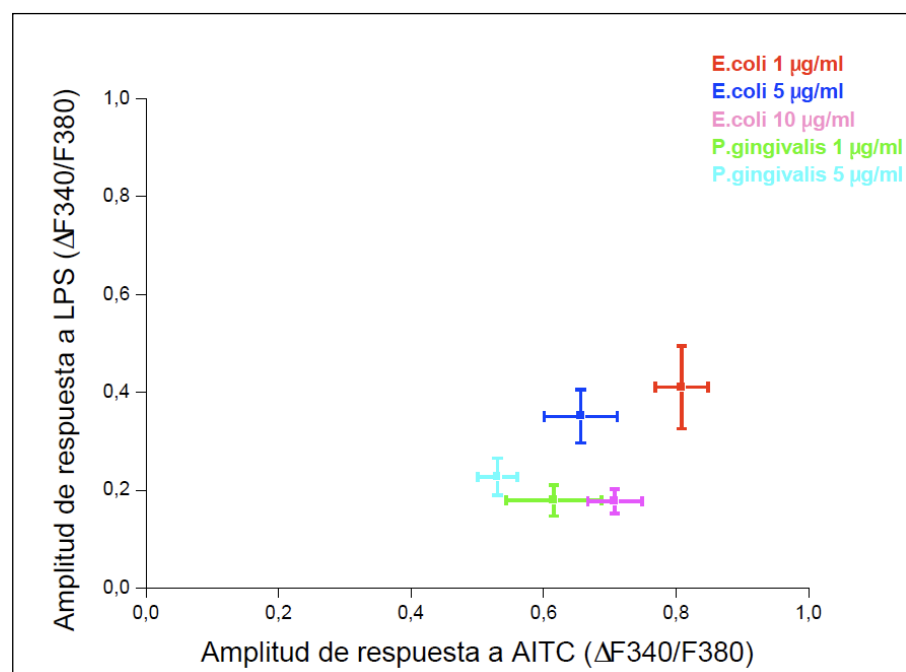


Figura 39. Comparación entre la amplitud de respuesta a AITC y a LPS tanto de *E. coli* como de *P. gingivalis*.

Los fibroblastos que se activaron por LPS, sea de *E. coli* sea de *P. gingivalis*, se activaron también en presencia de aceite de mostaza. Sin embargo, la amplitud de respuesta a AITC fue mayor a la amplitud de respuesta a LPS.

Por otro lado, la amplitud de respuesta al LPS del mismo tipo bacteriano no aumentó con el incremento de concentración del lipopolisacárido.



### 1.9. La transfección de ARN de interferencia en las células HGF disminuye la expresión de TRPA1 y la amplitud de su respuesta a fenitoína y nifedipina:

Hasta el momento, la evidencia de que tanto fenitoína como nifedipina activan el canal TRPA1, venía dada por los resultados que obtuvimos con agonistas y antagonistas farmacológicos en estudios de imagen de calcio. Una vez realizados estos experimentos, nos servimos de la biología molecular para intentar confirmar el papel del canal TRPA1 en la activación por antiepilépticos y dihidropiridinas. Para ello, utilizamos un tipo de ácido ribonucleico de interferencia llamado “*shRNA*” (del inglés: *short hairpin RNA*). Este tipo de ARN de interferencia cuenta con una secuencia de 22 nucleótidos, que se une de forma específica a la secuencia homóloga del ARN mensajero reduciendo la expresión del gen diana a nivel post-transcripcional (Xiang et al., 2006).

Lo primero que hicimos, tras adquirir cuatro secuencias diferentes de shRNA para TRPA1 a través de la empresa Genecopoeia, fue comprobar cual de ellos reducía en mayor medida la expresión de TRPA1 en las células HGF. Mediante PCR cuantitativa, pudimos observar que de las cuatro versiones de shRNA, el que mejor resultado dio reduciendo la expresión de TRPA1 fue el shRNA#1:

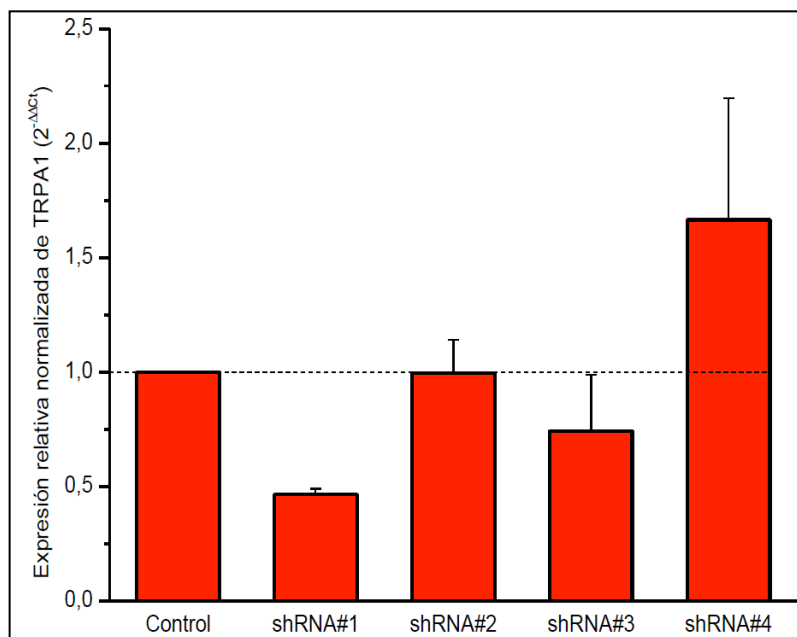


Figura 40. Nivel de expresión de TRPA1 en células HGF transfectadas con distintos shRNA, normalizado a la situación control (células HGF transfectadas con pEYFP-N1. n = 4).

El ARN de interferencia nombrado como shRNA#1, redujo la expresión de TRPA1 hasta casi la mitad, a diferencia del resto que o bien no redujeron la expresión del canal o lo hicieron en menor medida.

|         | % inhibición      | Error estándar |
|---------|-------------------|----------------|
| shARN#1 | 53,5              | 2,56           |
| shARN#2 | 0,41              | 14,35          |
| shARN#3 | 25,68             | 24,64          |
| shARN#4 | no hay inhibición | -              |

Una vez establecido el shRNA#1 como el ARN de interferencia que mejores resultados daba en cuanto a reducción de expresión de TRPA1 (ver tabla superior), el siguiente paso fue medir la respuesta de TRPA1 a fenitoína y nifedipina en células HGF transfectadas con shRNA#1. Para ello, a las 48 horas de introducir el plásmido con el ARN de interferencia en los fibroblastos gingivales, realizamos experimentos de imagen de calcio en los que analizamos las respuestas tanto a nifedipina como a fenitoína.

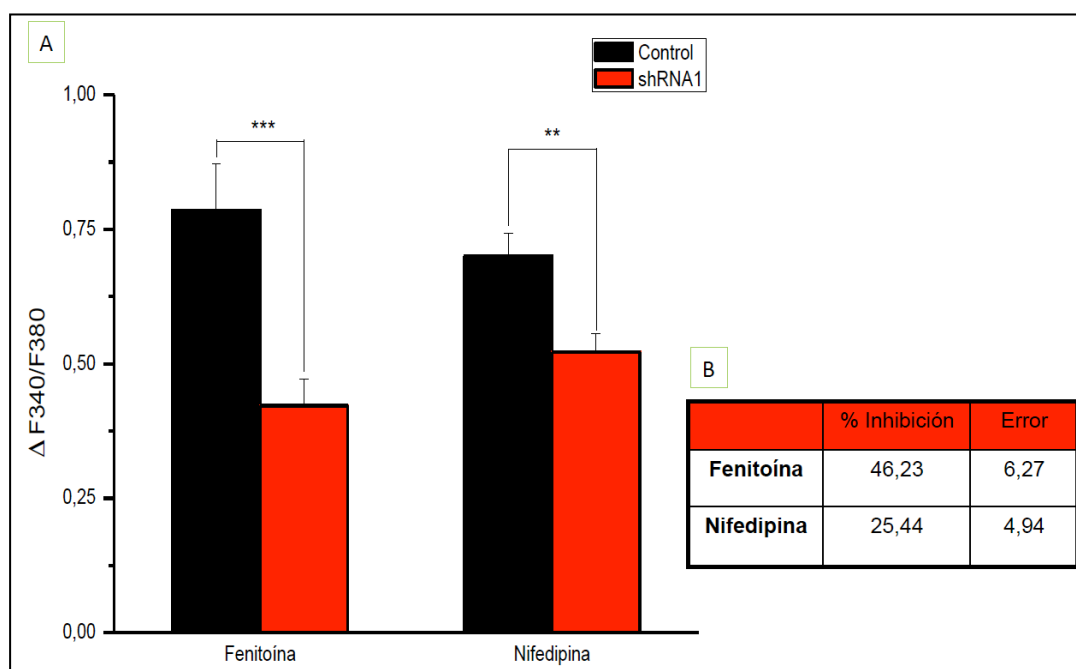


Figura 41. (A) Amplitud de respuestas de células HGF transfectadas con plásmido control (pEYFP-N1) y las transfectadas con el ARN de interferencia (Prueba t; n=142). (B) Porcentaje de inhibición en la respuestas a fenitoína y nifedipina.

Los fibroblastos transfectados con el ARN de interferencia shRNA #1, presentaron unas amplitudes de respuesta significativamente menores, comparadas con las respuestas en células control, tanto para la fenitoína a 500

$\mu\text{M}$  como para la nifedipina a  $10 \mu\text{M}$ .

### **1.10. Las vitaminas antioxidantes reducen la respuesta a fenitoína en los fibroblastos gingivales humanos:**

Los pacientes que reciben tratamiento con fenitoína y que han desarrollado agrandamiento gingival, tienen reducidos los niveles de ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) en suero sanguíneo y saliva. (Sobaniec et al., 2007). Del mismo modo, se ha demostrado que si se proporciona un suplemento de ácido fólico a niños que reciben tratamiento con fenitoína, se previene el agrandamiento gingival. (Arya et al., 2011). Estos resultados sugieren que el ácido ascórbico, el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido fólico juegan un papel importante en el agrandamiento gingival inducido por fenitoína. Hasta el momento, no se ha identificado el mecanismo por el cual las vitaminas antioxidantes presentan esta actividad profiláctica en el agrandamiento gingival.

Recientemente se ha demostrado que especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno, activan el canal TRPA1 expresado en sistemas heterólogos (Hill y Schaefer, 2009). Además, esta activación evoca un comportamiento nociceptivo en ratones a los que se les inyecta el peróxido de hidrógeno. Este comportamiento se reduce en los animales que carecen de TRPA1 y en aquellos, con genotipo silvestre, a los que se les administra un análogo de la vitamina E (Liu y Ji., 2012). Con todos estos datos, que señalan al canal TRPA1 como un importante sensor celular de estrés oxidativo, nos centramos en averiguar su posible papel como diana de la actividad protectora de las vitaminas antioxidantes en los fibroblastos gingivales humanos. Para ello nos servimos de la imagen de calcio, comparando la amplitud de las respuestas de las células HGF a fenitoína en presencia y en ausencia de vitaminas antioxidantes.

#### *Ácido ascórbico:*

La primera vitamina antioxidante que estudiamos fue el ácido ascórbico. Éste compuesto actúa como catalizador de reacciones de reducción/oxidación en el interior de la célula, sirviendo como agente reductor de especies reactivas de oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno, neutralizando su alta capacidad

reactiva (Davies, Austin y Partridge., 1991).

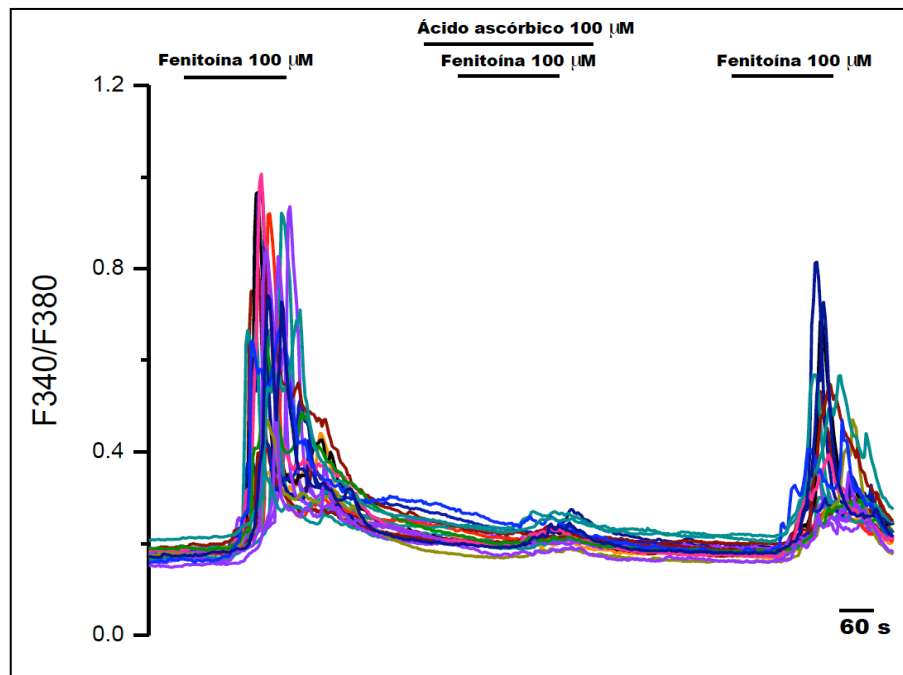


Figura 42. Imagen de calcio en células HGF. En presencia de ácido ascórbico, la respuesta a la segunda aplicación de fenitoína disminuye

Al aplicar ascorbato al mismo tiempo que fenitoína sobre las células HGF, la amplitud de respuesta al fármaco antiepiléptico, se redujo dramáticamente. El efecto del ácido ascórbico fue reversible, de manera que la respuesta a fenitoína se recuperó parcialmente tras una tercera aplicación del fármaco en ausencia del ácido ascórbico.

#### *α – Tocoferol:*

El tocoferol es una de las formas que puede presentar la vitamina E. Existen cuatro tipos de tocoferoles: alfa, beta, gama y delta. La forma  $\alpha$  – tocoferol es una molécula liposoluble cuya actividad antioxidante se basa en la protección de la célula de los efectos de la reacción de peroxidación lipídica que permite la liberación de los radicales libres al espacio extracelular, (Brigelius–Flohé., 1999).

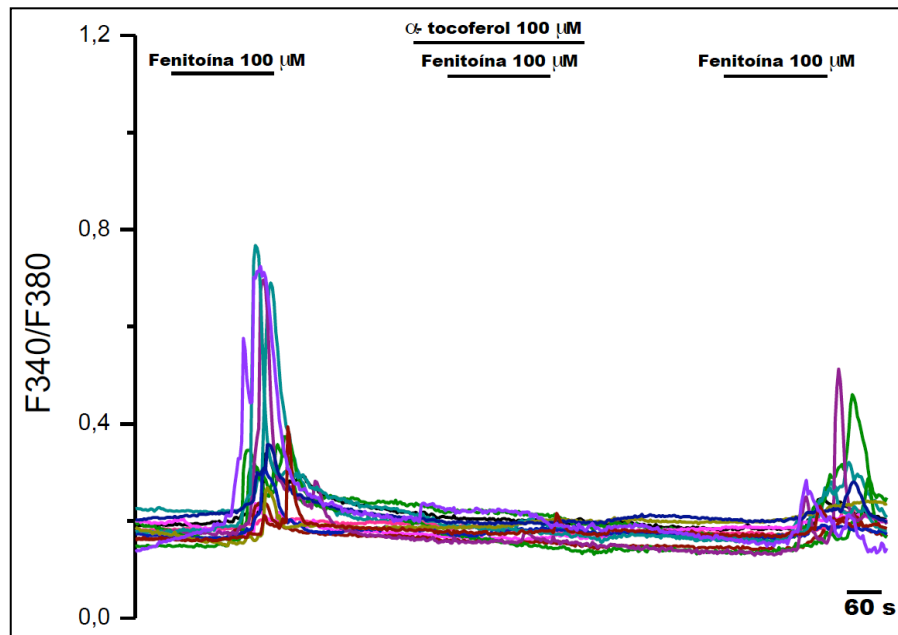


Figura 43. Imagen de calcio en células HGF. En presencia de  $\alpha$ -tocoferol, la fenitoína no logra activar ninguna célula.

Al igual que sucedió con el ácido ascórbico, al añadir  $\alpha$ -tocoferol junto con fenitoína, no se produjo respuesta de los fibroblastos.

#### Ácido fólico:

El ácido fólico tiene propiedades como quelante de radicales libres lo que le confiere actividad antioxidante (Joshi et al., 2001). Al añadir ácido fólico a las células HGF junto con fenitoína, no hubo elevación de calcio en los fibroblastos (Figura 44).

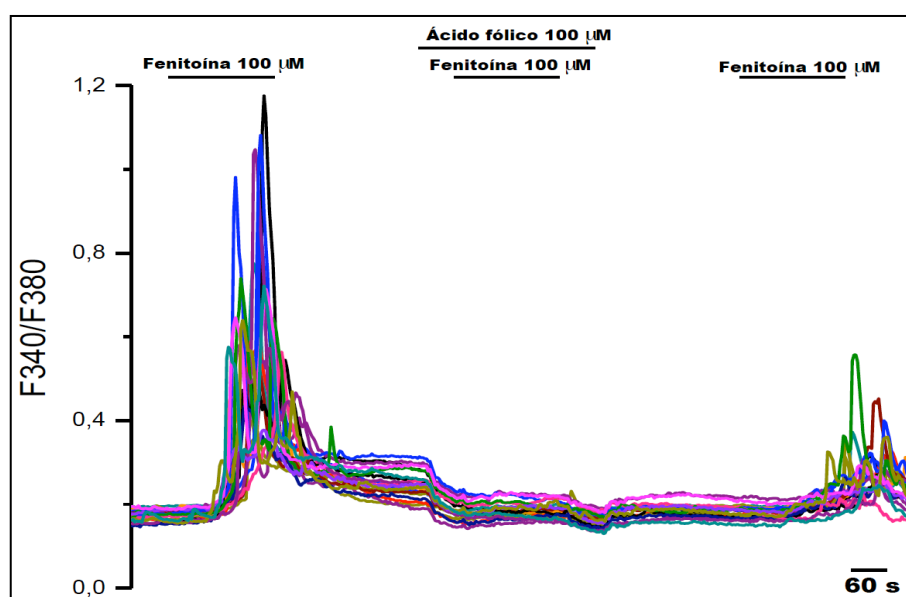


Figura 44. Imagen de calcio en células HGF. En presencia de ácido fólico, la respuesta a fenitoína se ve inhibida.

Dado que las aplicaciones repetidas de fenitoína redujeron la amplitud de la respuesta de calcio en la células HGF (i.e. taquifilaxis) (Figura 45), intentamos estimar esta desensibilización para recalcular el porcentaje real de bloqueo producido por las distintas vitaminas antioxidantes.

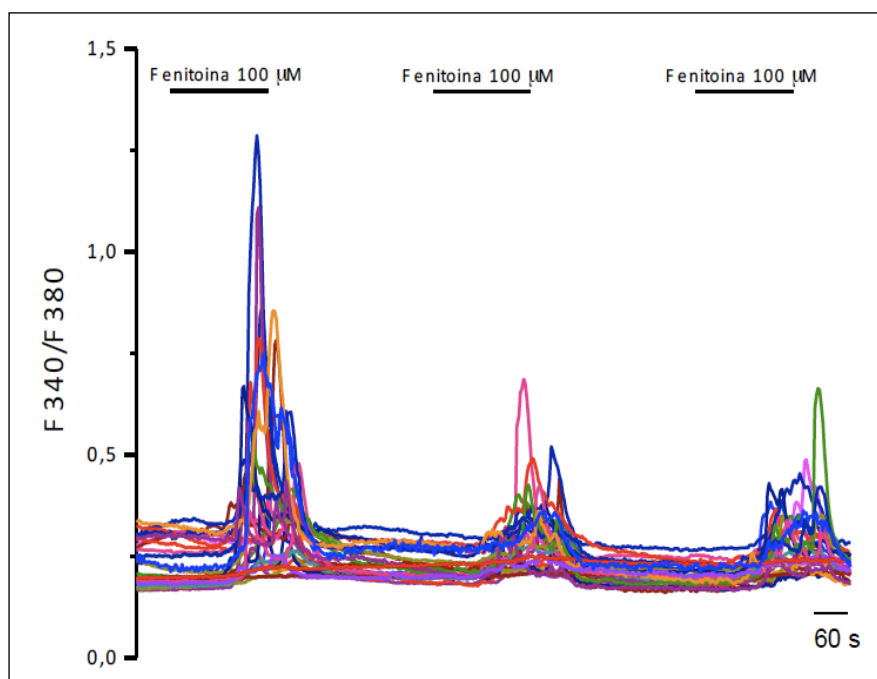


Figura 45. Experimento control en células HGF. Tres aplicaciones de fenitoína a intervalos de cinco minutos.

El cálculo del coeficiente de desensibilización del canal y los porcentajes de inhibición lo realizamos utilizando las siguientes fórmulas matemáticas (Mälkiä et al., 2007):

**Coeficiente de desensibilización (CD)** = *Respuesta a la segunda aplicación de fenitoína en la situación control / Respuesta a la primera aplicación de fenitoína en la situación control*

**Inhibición** =  $1 - (\text{Respuesta a la segunda aplicación de fenitoína y vitamina} / \text{Respuesta a la primera aplicación de fenitoína} \times \text{CD})$

|                                      | % Inhibición | Error estándar | % inhibición sin coeficiente desensibilización | Error estándar |
|--------------------------------------|--------------|----------------|--|----------------|
| <b>Coeficiente desensibilización</b> | 42,99        | 7,06           | –  | –              |
| <b>Ácido ascórbico</b>               | 80,26        | 1,41           | 91,51  | 0,61           |
| <b>α - Tocoferol</b>                 | 78,04        | 2,24           | 90,56  | 0,96           |
| <b>Ácido Fólico</b>                  | 73,77        | 0,97           | 88,72  | 1,05           |

Los porcentajes de inhibición calculados para la respuesta a la segunda aplicación de fenitoína junto con la vitamina correspondiente; ácido fólico,  $\alpha$ -tocoferol o ácido ascórbico, fueron superiores al 70% cuando se tuvo en cuenta el coeficiente de desensibilización de TRPA1 a sucesivas aplicaciones de fenitoína.

Al normalizar las amplitudes de respuesta de la segunda y tercera aplicación de fenitoína respecto a la respuesta a la primera aplicación, vemos como en presencia de vitaminas la amplitud de respuesta a fenitoína disminuye hasta niveles casi basales para luego recuperarse en la tercera aplicación de fenitoína a valores cercanos a los de la situación control.

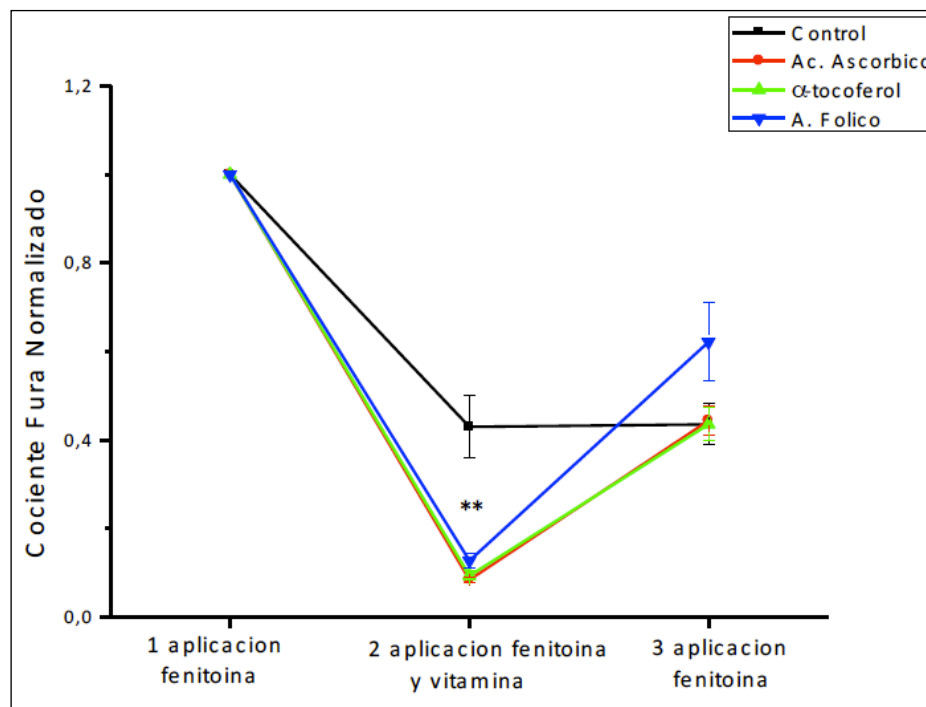


Figura 46. Representación gráfica del ratio de fura normalizado a la primera respuesta a fenitoína (ANOVA con post test Dunnet; n=270).

### 1.11. Las vitaminas antioxidantes, a excepción del $\alpha$ -tocoferol, reducen la respuesta a nifedipina en los fibroblastos gingivales humanos:

En vista de los resultados obtenidos con las tres vitaminas mencionadas sobre la respuesta a fenitoína, decidimos probar su posible efecto inhibitorio sobre la respuesta a nifedipina. Para estos experimentos cambiamos el protocolo, aplicamos la vitamina correspondiente antes de la primera aplicación de nifedipina, ya que repetidas aplicaciones de nifedipina desensibilizaban el canal impidiendo ver respuesta al fármaco en experimentos de imagen de calcio.

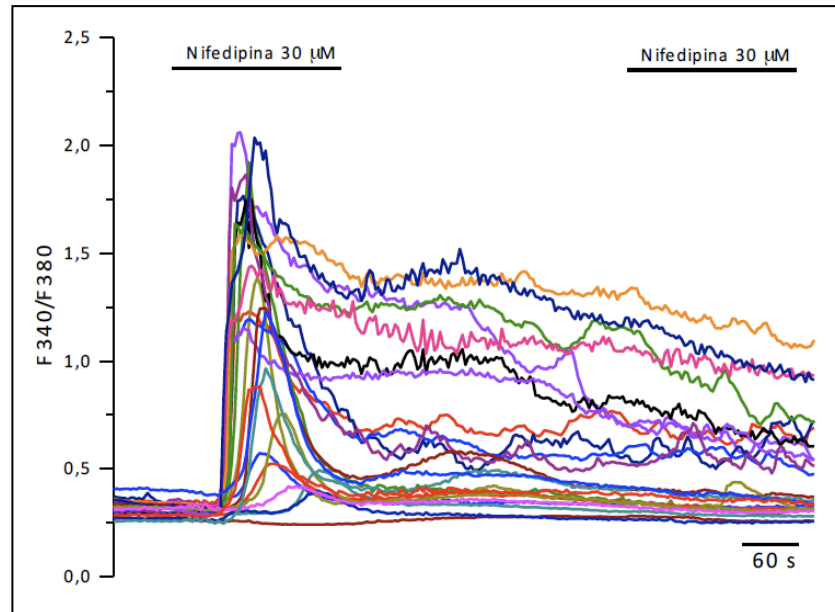


Figura 47. Imagen de calcio en células HGF con dos aplicaciones de nifedipina con un intervalo de lavado de cinco minutos.

Tanto el ácido ascórbico como el ácido fólico redujeron significativamente la amplitud de la respuesta a nifedipina en los fibroblastos gingivales humanos, aunque sin llegar a inhibir completamente la respuesta.

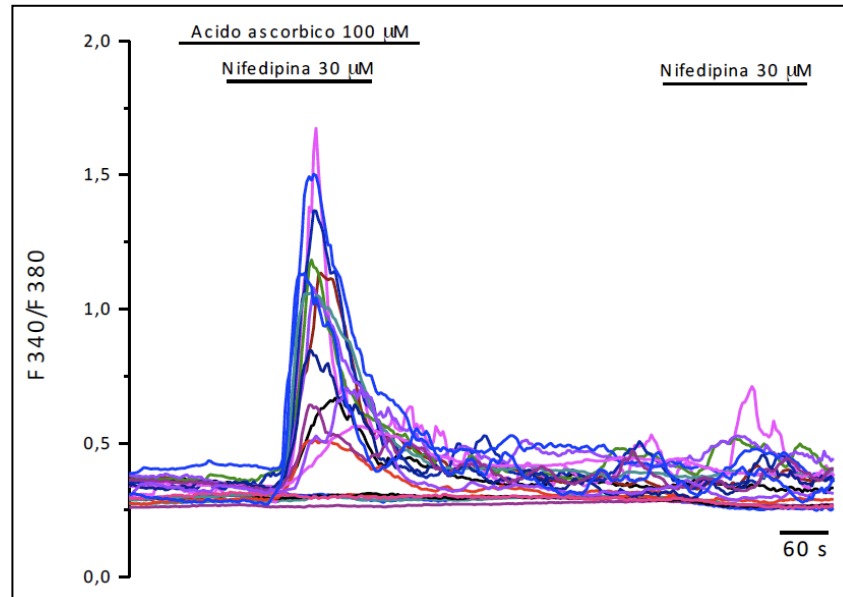


Figura 48. Imagen de calcio en células HGF aplicando nifedipina en presencia de ácido ascórbico.

Por otro lado, la presencia de  $\alpha$ -tocoferol no redujo la respuesta a nifedipina 30  $\mu$ M (Figura 49).



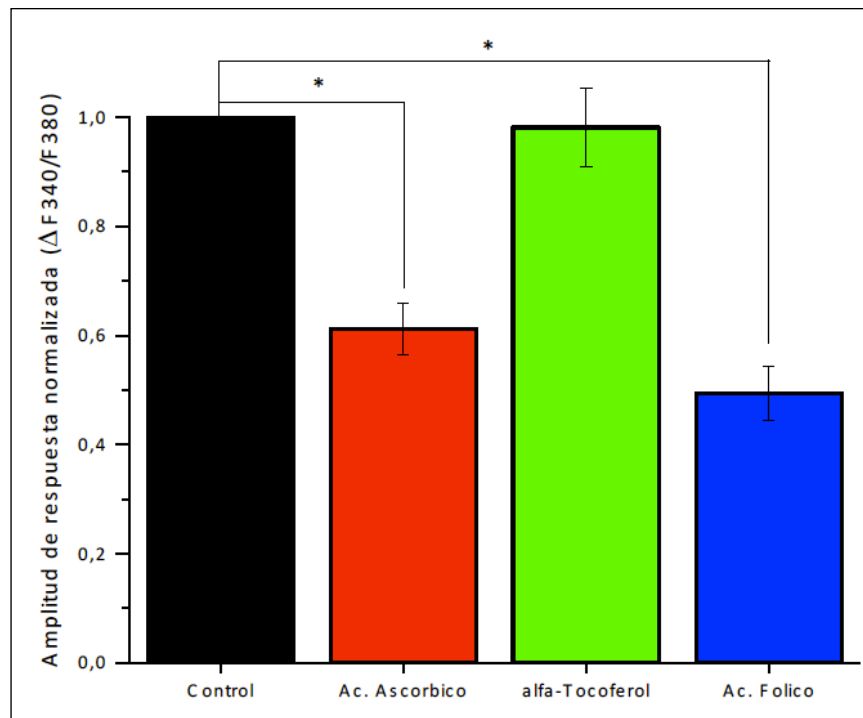


Figura 49. Histograma con las amplitudes de respuesta a nifedipina 30  $\mu\text{M}$  y vitaminas, normalizada a la respuesta en ausencia de vitaminas de la situación control (negro) (ANOVA con post test Dunnet;  $n > 55$ ,  $n < 85$ ).

Respecto al número de células que responden a nifedipina en presencia de vitaminas, no existe variación en comparación con la situación control.

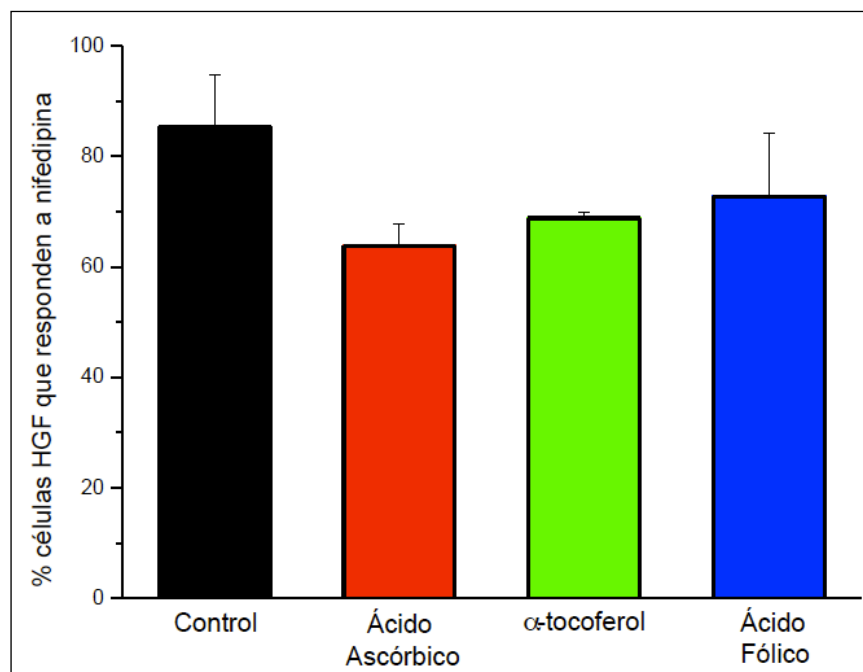


Figura 50. Porcentaje de células que responden a nifedipina en la situación control (negro), en presencia de ácido ascórbico (rojo),  $\alpha$ -tocoferol (verde) o ácido fólico (azul).

El efecto inhibitorio de las vitaminas antioxidantes a la respuesta a nifedipina es

menor al que se produce sobre la respuesta a fenitoína.

### 1.12. Los fármacos que inducen agrandamiento gingival no inducen la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos en cultivo:

Como se ha comentado en la introducción, el agrandamiento gingival está producido por una acumulación de componentes de la matriz extracelular en el tejido conectivo de las encías. Sin embargo, diversos trabajos apoyan la idea de que el agrandamiento gingival se deba a un aumento del número de células que componen la encía, en lugar de la acumulación de colágeno en el tejido gingival. Así, un estudio realizado en fibroblastos en cultivo obtenidos a partir de muestras humanas, señala que el tratamiento de los mismos con fenitoína o nifedipina, induce la proliferación celular. (Sano et al., 2004). Asimismo, según otro trabajo, estos fibroblastos no sólo presentan una mayor proliferación, si no que también ven disminuida su actividad apoptótica. (Kantarci et al., 2007).

Mediante el ensayo de proliferación celular conocido como ensayo MTT, buscamos dilucidar si la presencia de alguno de los fármacos que inducen el agrandamiento gingival, producía un aumento en el número de fibroblastos en cultivo. En un primer ensayo, añadimos los fármacos disueltos en DMSO, al medio de cultivo a una concentración de 1  $\mu$ M durante 24 horas, midiendo la densidad óptica del formazán en los días 1 y 7 tras el tratamiento.

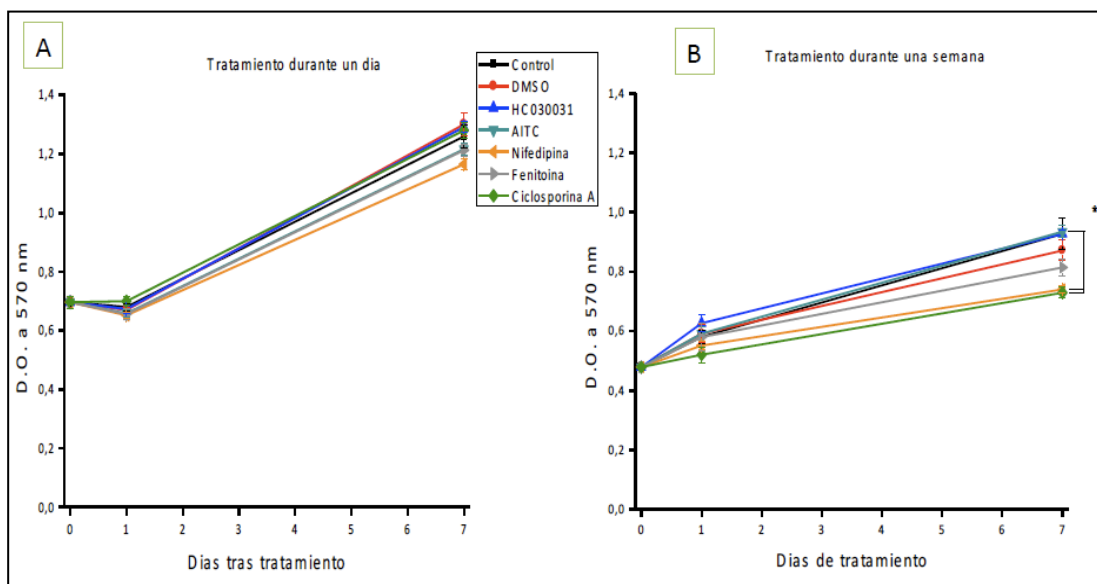


Figura 51. Ensayo MTT de proliferación celular en células HGF en cultivo. (A) Resultados tras un día de tratamiento. (B) Resultados tras una semana de tratamiento (ANOVA con post test Dunnet; n=16).

Tras 1 día de tratamiento, ninguno de los fármacos que inducen el agrandamiento gingival, produjo un aumento en el número de fibroblastos en cultivo en relación a la situación control, ni al día posterior al tratamiento ni a los 7 días del mismo (Figura 51A). Por ello, decidimos realizar un tratamiento más severo, manteniendo la concentración de todos los fármacos a 1  $\mu$ M, pero dejándolos en el medio durante los siete días del estudio. En este segundo ensayo, tampoco observamos un aumento de la proliferación celular en presencia de ninguno de los fármacos a estudio (Figura 51B).

De los fármacos que inducen el agrandamiento gingival, ni la ciclosporina A ni la nifedipina, produjeron un aumento significativo en el número de fibroblastos en el medio, de hecho, éste número fue significativamente menor al nivel de proliferación de la situación control. Las células HGF tratadas con fenitoína presentaron una concentración celular similar a la de la situación control.

En cualquier caso, ninguno de los tres fármacos que inducen el agrandamiento gingival, produjo la proliferación celular de los fibroblastos gingivales humanos en cultivo.

En el mismo experimento, testamos los efectos del bloqueante de TRPA1, HC 030031 y del agonista AITC, ninguno de ellos produjo un aumento de la proliferación distinto del que se producía en la situación control, por lo que ni la activación ni la inhibición del canal TRPA1 parecía tener incidencia en la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos.

## 2. TRPA1 como mediador del dolor neuropático inducido por oxaliplatino

### 2.1. El oxaliplatino activa el canal TRPA1 expresado en células CHO:

Los síntomas agudos derivados del tratamiento con oxaliplatino; sensibilidad al frío, parestesia y disestesia en las extremidades, se exacerban tras la exposición al frío (Webster et al., 2005). Por ello pensamos que el oxaliplatino podía tener un efecto sobre los canales TRP sensibles a bajas temperaturas, como son TRPA1 y TRPM8. Para aclarar esta posibilidad, nos servimos de la imagen de calcio, administrando oxaliplatino a las células que expresan el canal TRPA1.

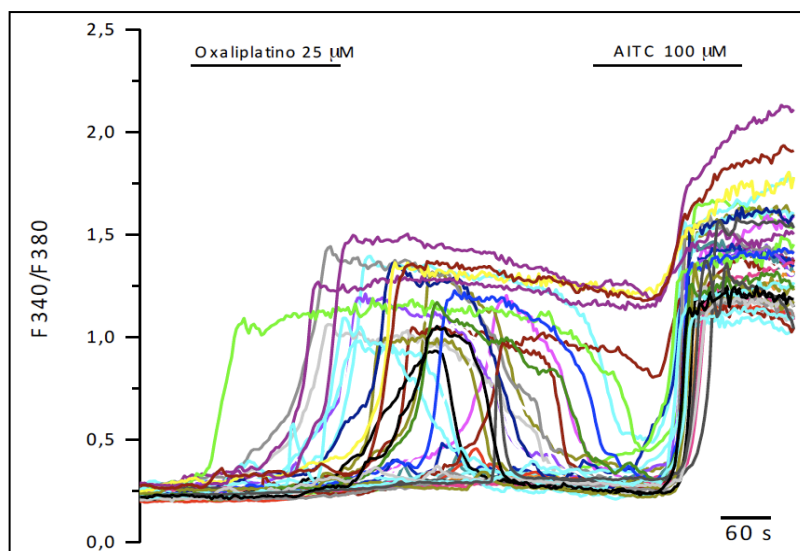


Figura 52. Imagen de calcio en células CHO – TRPA1 en la que se muestra la activación por oxaliplatino.

Al aplicar oxaliplatino sobre las células que expresaban TRPA1, se produjo un aumento de calcio en las mismas células que posteriormente se activaron con el aceite de mostaza. Sin embargo, no todas las células que respondieron a mostaza respondieron a oxaliplatino.

Cabe destacar, que el oxaliplatino no produjo ninguna respuesta en células CHO silvestres, las cuales no expresan el canal TRPA1 (figura 53).

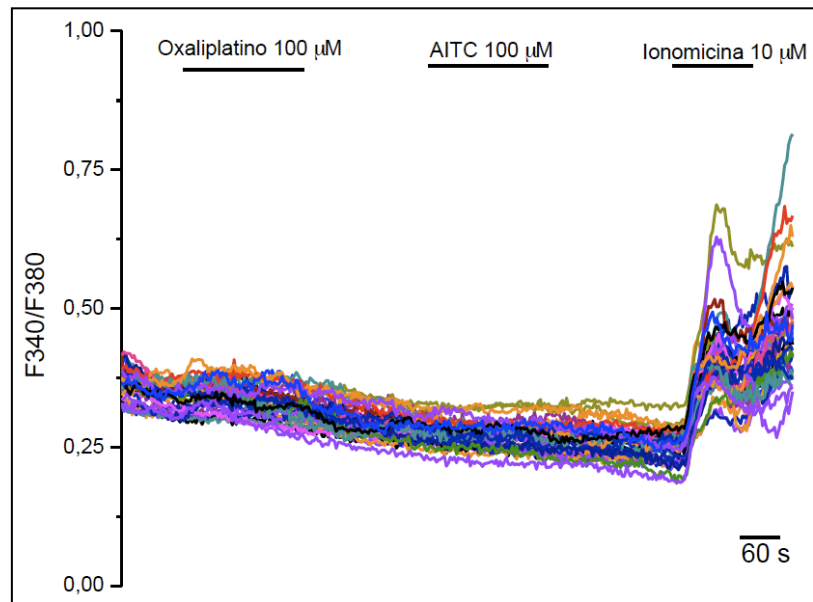


Figura 53. Oxaliplatino, aceite de mostaza e ionomicina sobre células CHO que no expresan TRPA1.

El oxaliplatino activó el canal TRPA1 en una forma dosis-dependiente, la curva dosis respuesta realizada en las células CHO – TRPA1 (Figura 54) presenta forma de campana, con un aumento del calcio intracelular desde concentraciones bajas (1  $\mu\text{M}$ ), hasta la máxima concentración empleada (500  $\mu\text{M}$ ). La máxima amplitud de respuesta la encontramos a 50  $\mu\text{M}$ .

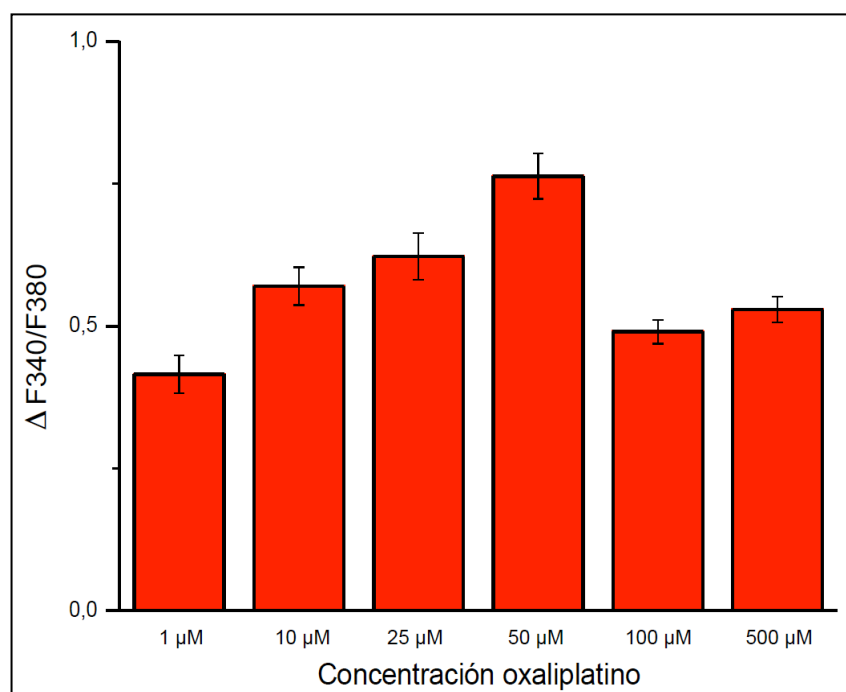


Figura 54. Curva dosis – respuesta para el oxaliplatino en células CHO – TRPA1.

El antagonista específico del canal TRPA1, el compuesto HC 030031, al ser aplicado junto con oxaliplatino sobre las células CHO – TRPA1, produjo una disminución de la respuesta a oxaliplatino. Este resultado sugiere que el incremento de calcio intracelular que observamos al aplicar el oxaliplatino se realizó a través del canal TRPA1.

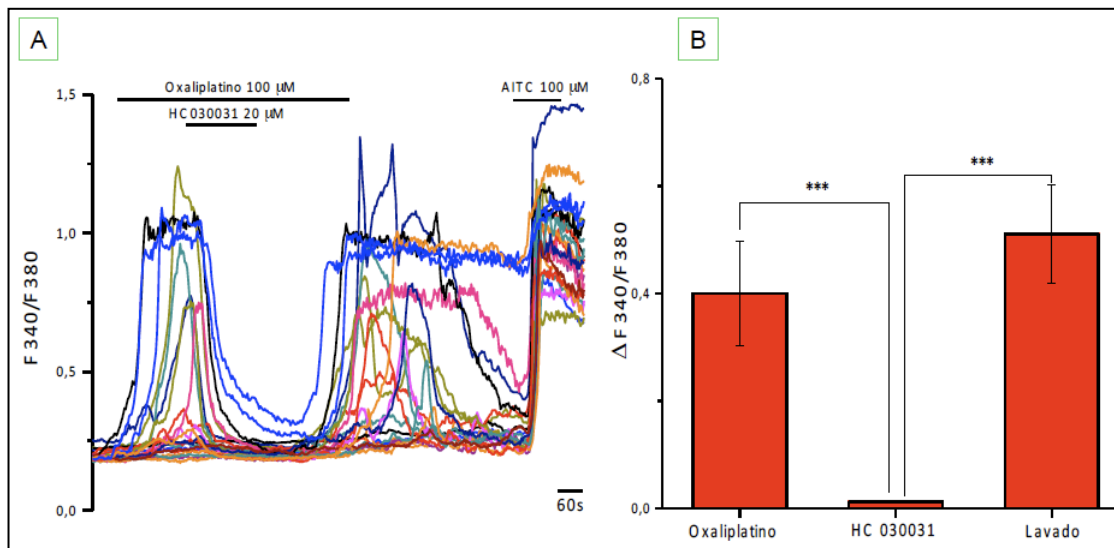


Figura 55. (A) Imagen de calcio sobre CHO – TRPA1 aplicando HC 030031 sobre la respuesta a oxaliplatino. (B) Histograma de amplitudes de respuesta a oxaliplatino, oxaliplatino y HC 030031 y tras el lavado del bloqueante. (ANOVA medidas repetitivas post test Bonferri; n=96).

Asimismo, la aplicación de oxaliplatino en una solución sin cloruro cálcico añadido y con un quelante de calcio (1 mM EGTA), no produjo ninguna respuesta en células CHO – TRPA1.

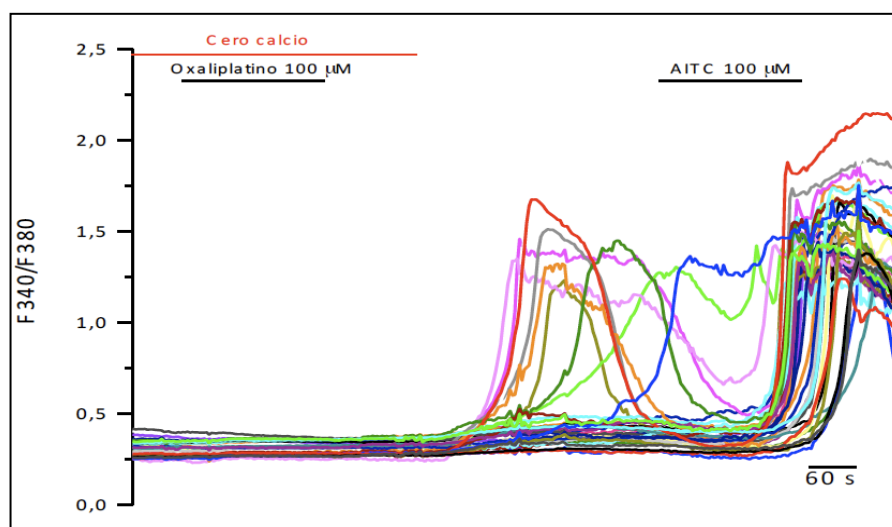


Figura 56. La aplicación de oxaliplatino en ausencia de calcio extracelular sobre células CHO – TRPA1.

Al volver a la solución control (2.4 mM de calcio), se produjo un aumento del calcio intracelular en algunas células. Este “efecto rebote” se ha descrito previamente en células que expresan el canal TRPA1 (Zurborg et al., 2007).

## 2.2. El oxaliplatino produce la liberación de especies reactivas de oxígeno que activan TRPA1:

Según el trabajo de Nassini y colaboradores (2011), el oxaliplatino no activa directamente TRPA1; serían subproductos del estrés oxidativo los que activan el canal.

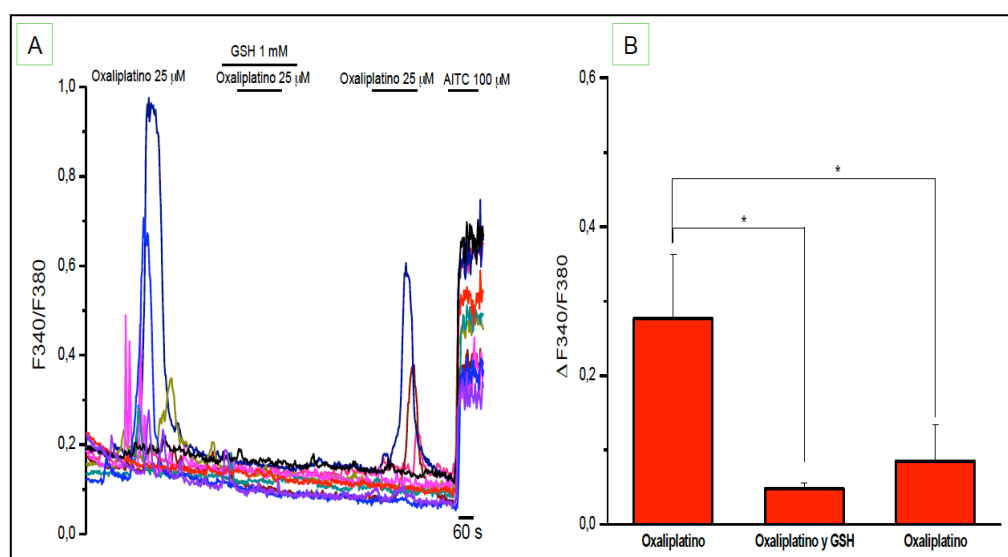


Figura 57. (A) Imagen de calcio en células CHO – TRPA1 en el que se añade glutatión (GSH) y oxaliplatino. (B) Histograma con las amplitudes de respuesta (ANOVA medidas repetitivas post test Bonferri).

En presencia de glutatión, agente reductor de los enlaces sulfhidrilo que se pueden formar entre las cisteínas de TRPA1 tras la adición de compuestos electrofílicos, no observamos respuesta a oxaliplatino en las células que expresaban TRPA1. Cuando aplicamos de nuevo el oxaliplatino sin el quelante, la respuesta del canal se recuperó.

## 2.3. Los efectos del oxaliplatino sobre la amplitud de respuesta a frío varían con la concentración:

Como se ha mencionado anteriormente, los síntomas agudos de neuropatía en pacientes que reciben tratamiento con oxaliplatino, se agravan con la exposición a bajas temperaturas. Precisamente, estas bajas temperaturas pueden activar el canal TRPA1 (Story et al., 2003): en experimentos in vitro,

cuando la temperatura baja de 18°C, el canal se abre permitiendo la entrada de calcio extracelular.

En los apartados anteriores hemos demostrado como el oxaliplatino activa TRPA1 expresado en sistema heterólogos, lo que nos llevó a preguntarnos el papel que el oxaliplatino podía jugar en la respuesta de TRPA1 a bajas temperaturas. Para ello realizamos un experimento de imagen de calcio en el que observamos el efecto de diversas concentraciones de oxaliplatino sobre la respuesta a frío en células CHO-TRPA1.

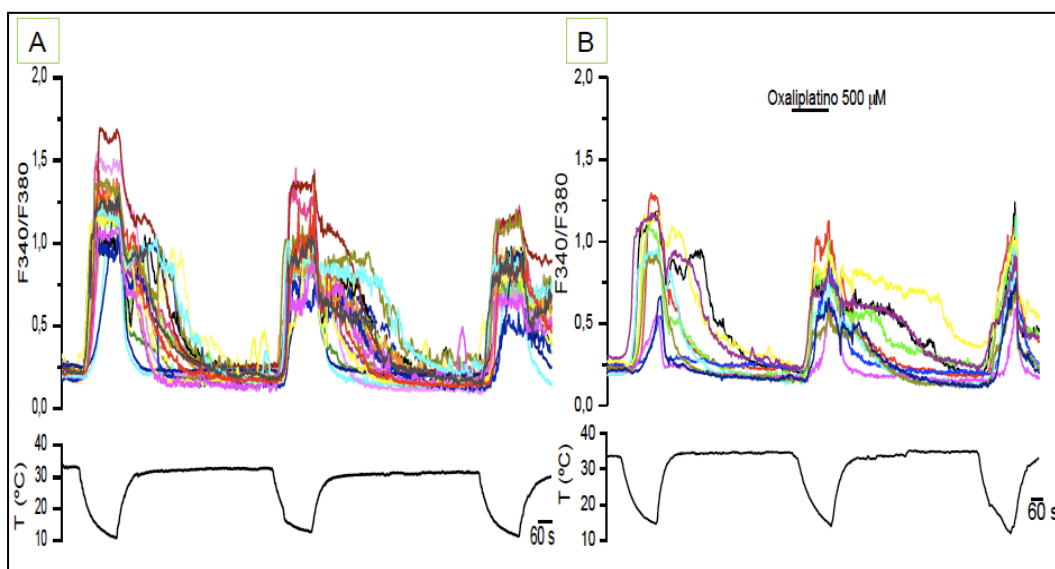


Figura 58. Imagen de calcio en células CHO-TRPA1 usando un protocolo de 3 pulsos de frío. En (A) se muestra las respuestas control. En (B) se muestra el efecto de 500  $\mu\text{M}$  oxaliplatino aplicado durante el segundo pulso de frío.

En el experimento control, las células CHO-TRPA1 fueron sometidas a tres pulsos de frío, en el que la temperatura de la cámara de registro descendió por debajo de los 18°C, separados por cinco minutos de lavado a temperatura superior a 30°C. Para averiguar el efecto de las diferentes concentraciones de oxaliplatino sobre la respuesta a frío, usamos el mismo protocolo de la situación control, aplicando el oxaliplatino sobre el segundo pulso de frío.

Para comparar el efecto de las distintas concentraciones, normalizamos la amplitud de respuesta a frío y oxaliplatino a la amplitud de respuesta del primer pulso de frío.



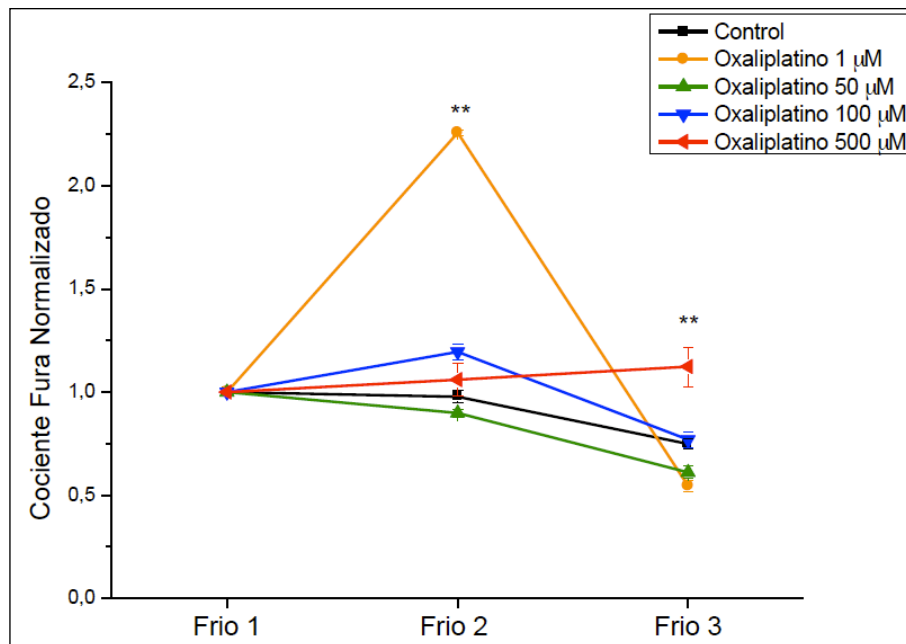


Figura 59. Representación gráfica del efecto de las diferentes concentraciones de oxaliplatino sobre la segunda respuesta a frío (ANOVA post test Bonferri.  $n > 117$ ;  $n < 229$ ).

En la situación control, observamos una disminución gradual del tamaño de respuesta con cada aplicación de frío, lo que indica una desensibilización del canal a repetidos pulsos de frío.

La concentración mínima a la que vimos respuesta de TRPA1 a oxaliplatino cuando el canal se encuentra expresado en sistema heterólogos, 1 µM, produjo una clara potenciación en la amplitud de la segunda respuesta a frío. Mientras que la máxima concentración empleada, 500 µM, produjo un aumento en la amplitud de la respuesta al tercer pulso de frío.

Sin embargo, el resto de concentraciones de oxaliplatino empleadas no tuvieron un efecto significativamente diferente al de la situación control sobre las respuestas a frío.

Parece, por tanto, que la menor concentración de oxaliplatino potenciaba el efecto activador del frío sobre el canal TRPA1.

#### **2.4. El oxaliplatino aplicado sobre la respuesta a frío cambia la temperatura umbral del TRPA1:**

Entre las diferentes concentraciones de oxaliplatino usadas sobre la respuesta a frío de las células CHO – TRPA1, estudiamos la temperatura umbral tanto

para la menor concentración empleada (1  $\mu\text{M}$ ) como para la mayor (500  $\mu\text{M}$ ). Calculamos la diferencia de temperatura umbral entre el primer pulso de frío y el segundo pulso de frío junto con oxaliplatino a estas concentraciones.

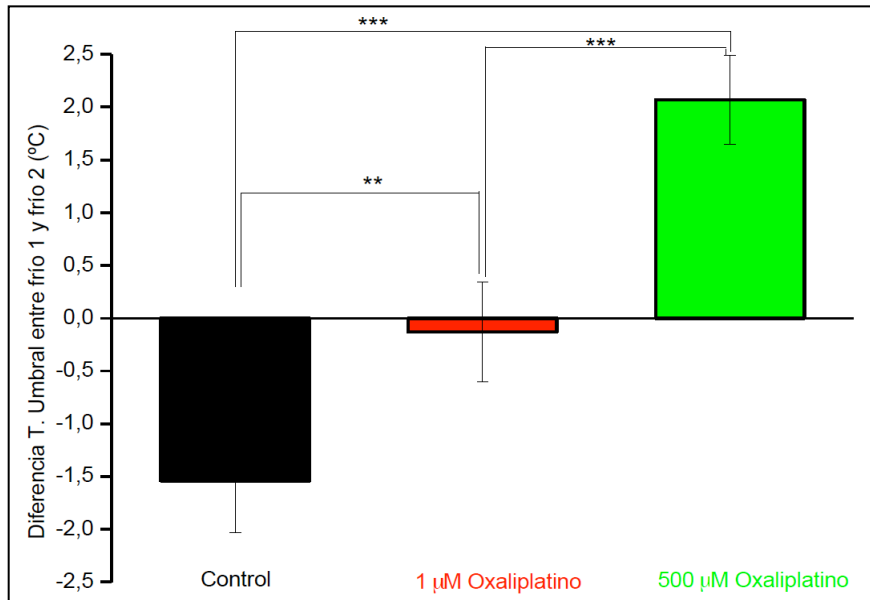


Figura 60. Diferencia entre la temperatura umbral del segundo pulso de frío y del primero (ANOVA post test Bonferri.  $n > 96$ ;  $n < 229$ ).

En la situación control, es decir, en el experimento de tres pulsos de frío sin oxaliplatino, vimos que la diferencia entre la temperatura umbral del segundo pulso y el primero tenía valores negativos, lo que se traduce en que la temperatura umbral del segundo pulso era menor que la del primero, indicando la desensibilización del canal a repetidos pulsos de frío. Cuando aplicamos oxaliplatino a 1  $\mu\text{M}$  sobre la segunda aplicación de frío, la temperatura umbral de la respuesta al segundo pulso de frío prácticamente no varió respecto al primero, pero sí varía en relación a la diferencia de temperaturas umbrales del experimento control. Es decir, en el segundo pulso de frío con 1  $\mu\text{M}$  de oxaliplatino no vimos una disminución de temperatura umbral como la que observamos en el experimento control.

Por otro lado, cuando añadimos 500  $\mu\text{M}$  de oxaliplatino la temperatura umbral del segundo pulso de frío resultó ser superior a la temperatura umbral del primer pulso de frío, indicando la sensibilización del canal a un estímulo térmico. Es decir, en el segundo pulso de frío junto con oxaliplatino la temperatura umbral aumentó en dos grados a diferencia del experimento control en el que la temperatura umbral disminuyó 1,5 grados.

## 2.5. El oxaliplatino no activa el canal TRPM8 expresado en células HEK 293:

Quisimos comparar el efecto del oxaliplatino sobre los dos canales TRP activados por frío, TRPM8 y TRPA1, bajo condiciones experimentales similares. Para ello realizamos experimentos de imagen de calcio en células HEK 293 transfectadas con hTRPA1 o hTRPM8.

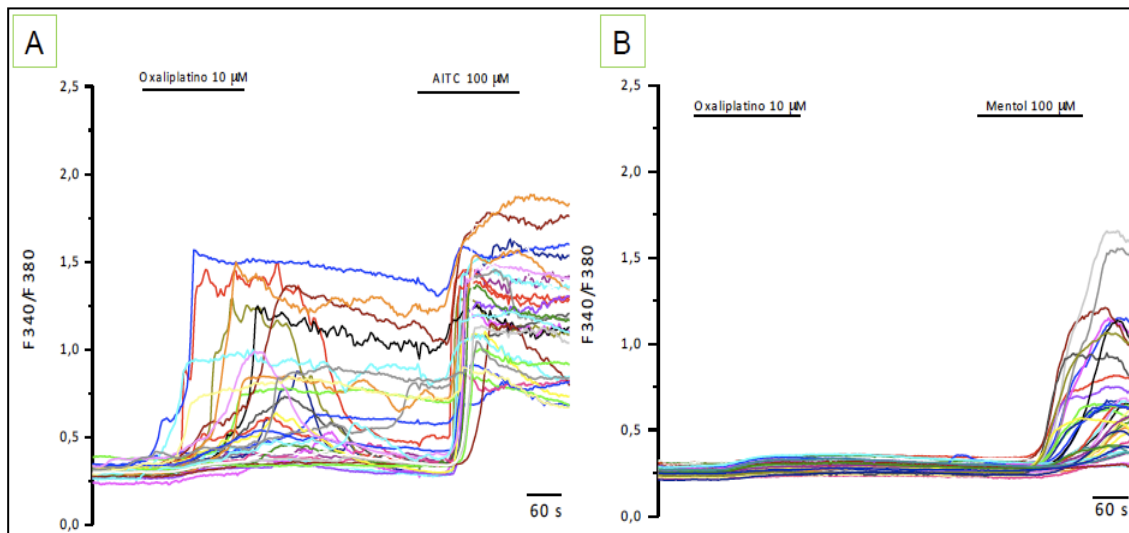


Figura 61. Imagen calcio en HEK 293 transfectadas: (A) Células transfectadas con hTRPA1 y que respondieron tanto a oxaliplatino como a aceite de mostaza. (B) Las células transfectadas con hTRPM8 no respondieron a oxaliplatino pero sí a mentol 100  $\mu\text{M}$ .

El oxaliplatino activó el canal TRPA1 mientras que no produjo un aumento significativo del calcio intracelular en las células transfectadas con el canal TRPM8. A cada aplicación de oxaliplatino (de 3 min) le siguieron 5 minutos de lavado con solución control, seguida de una aplicación de mentol a 100  $\mu\text{M}$  sobre las células transfectadas con TRPM8, y aceite de mostaza a 100  $\mu\text{M}$  sobre las células transfectadas con TRPA1. Conforme aumentábamos la concentración de oxaliplatino de 1 a 50  $\mu\text{M}$ , observamos como disminuía la amplitud de la posterior respuesta a mentol (Figura 62), lo que nos llevó a pensar que el oxaliplatino podría actuar como inhibidor del canal TRPM8, a diferencia del canal TRPA1 que se activaba por el mismo agente químico.

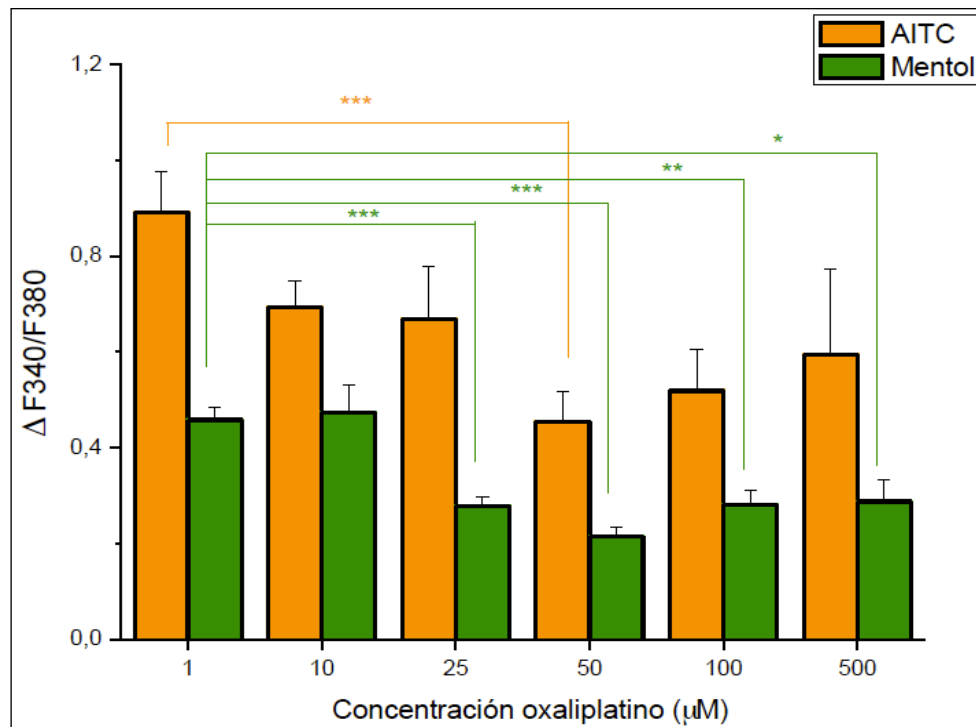


Figura 62. Amplitud de respuesta a AITC por parte de las células transfectadas con TRPA1 (barras amarillas), y a mentol por las células transfectadas con TRPM8 (barras verdes), tras la aplicación de oxaliplatino (ANOVA con post test Dunnet;  $n > 60$ ;  $n < 70$  ).

Al aumentar la concentración de oxaliplatino, no se produjo respuesta alguna en las células transfectadas con TRPM8, sin embargo, la amplitud de respuesta a mentol disminuía. Siendo la menor respuesta a mentol aquella que se produjo tras la aplicación de 50  $\mu\text{M}$  de oxaliplatino.

## 2.6. La amplitud de respuesta de TRPM8 a frío y mentol disminuye en presencia de oxaliplatino:

El canal iónico TRPM8 es sensible a frío; su temperatura umbral se sitúa por encima de la temperatura de activación del TRPA1, 28°C (McKemy et al. 2002). Asimismo, TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales de ganglio trigémino y raquídeo (McKemy et al., 2002; Nealen et al., 2003; Kobayashi et al., 2005), por lo que consideramos importante evaluar el efecto del oxaliplatino sobre la respuesta a frío de este canal. Para ello nos servimos del mismo protocolo de tres pulsos de frío utilizado en células CHO-TRPA1, pero cambiando estas células por las CRM1 que expresan de forma constitutiva TRPM8.

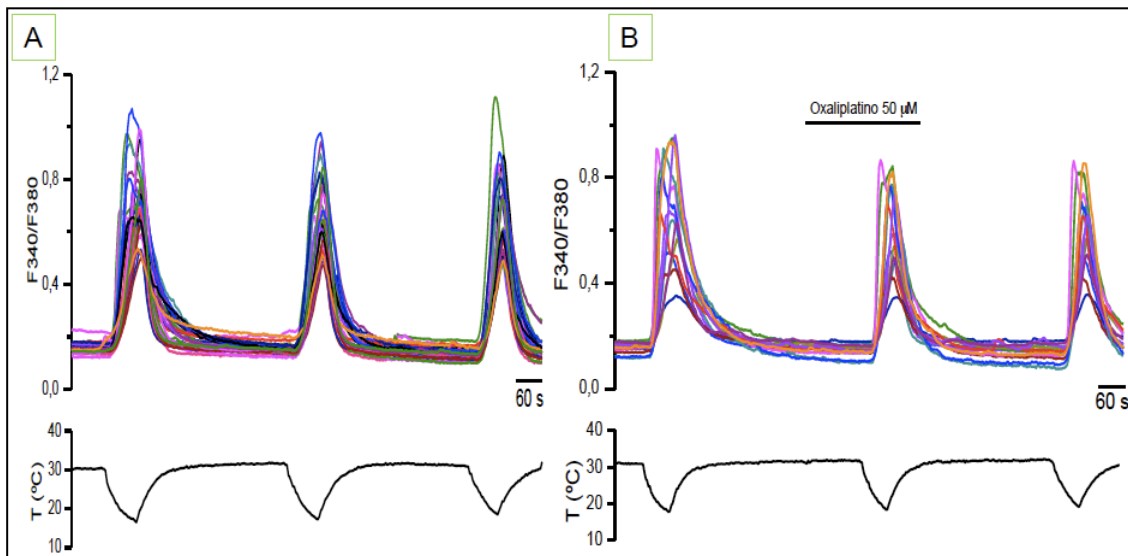


Figura 63. Imagen de calcio en células CRM1. (A) Control: 3 pulsos de frío. (B) 3 pulsos de frío con oxaliplatino sobre el segundo pulso.

En la situación control la amplitud de respuesta en el segundo pulso de frío fue menor en comparación con el primero, sin embargo, no apreciamos diferencia entre la amplitud de respuesta al segundo pulso de frío frente al tercero (Figura 64).

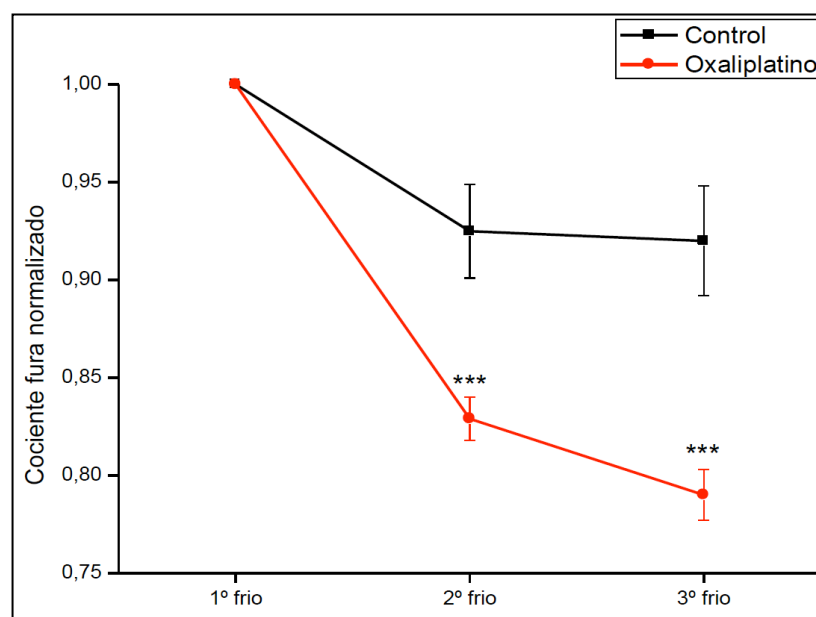


Figura 64. Cociente de fluorescencia normalizado para el experimento control (negro) y el experimento con oxaliplatino (rojo) (Prueba t;  $n > 122$ ;  $n < 130$ ).

Por contra, cuando añadimos oxaliplatino sobre la segunda aplicación de frío, la amplitud de la respuesta disminuyó significativamente. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucedió con las células CHO-TRPA1, la respuesta al tercer pulso de frío siguió disminuyendo.

En cuanto a la temperatura umbral, no observamos una diferencia significativa entre los pulsos de frío con o sin oxaliplatino (Figura 65).

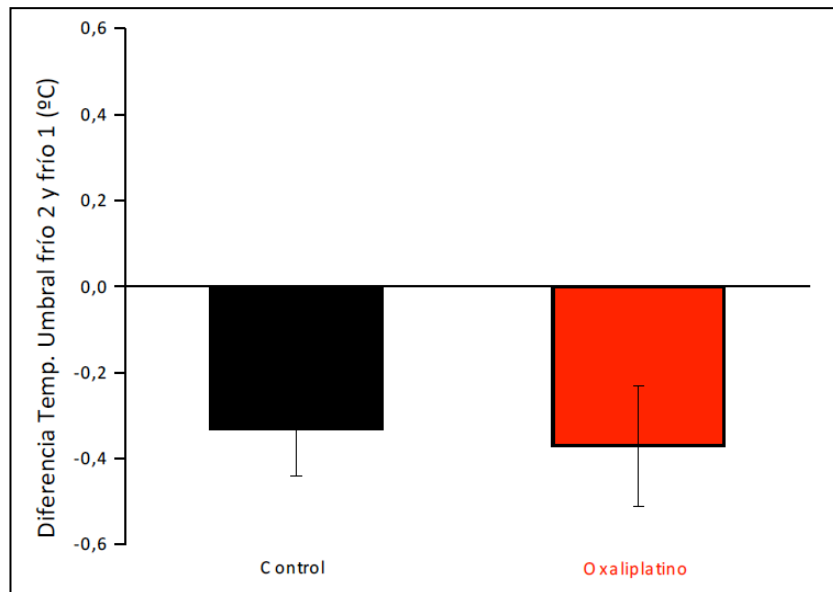


Figura 65. Gráfica con la diferencia de temperatura umbral entre el segundo pulso de frío y el primero. Situación control (negro) y con oxaliplatino 50  $\mu\text{M}$  sobre la segunda aplicación de frío (rojo).

Teniendo en cuenta estos resultados, el oxaliplatino parece actuar más como un inhibidor que como un agonista del canal TRPM8 durante la activación por frío. Esta idea nos llevó a investigar el efecto del oxaliplatino sobre la respuesta a mentol en células CRM1. Para ello realizamos un protocolo similar al de los tres pulsos de frío, cambiando el frío por mentol, agonista químico de TRPM8.

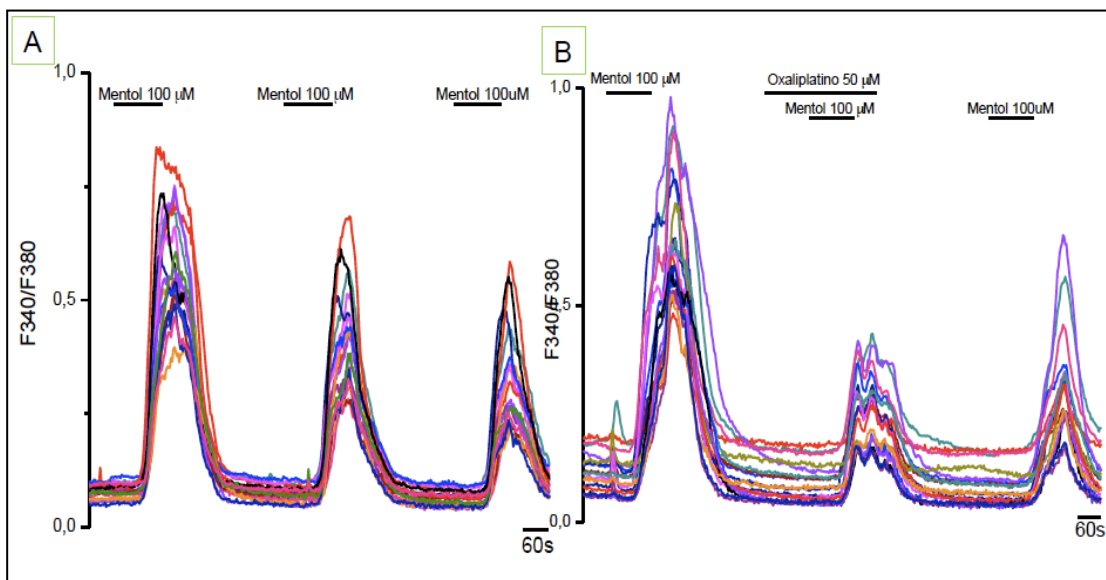


Figura 66. Imagen de calcio en células CRM1. (A) Control: 3 aplicaciones de mentol. (B) 3 aplicaciones de mentol añadiendo oxaliplatino sobre la segunda aplicación.

En la situación control, la amplitud de respuesta disminuyó con las aplicaciones consecutivas de mentol a 100  $\mu$ M. Al añadir oxaliplatino sobre la segunda aplicación de mentol, la amplitud de la respuesta se redujo significativamente comparado con la segunda respuesta observada en el protocolo control.

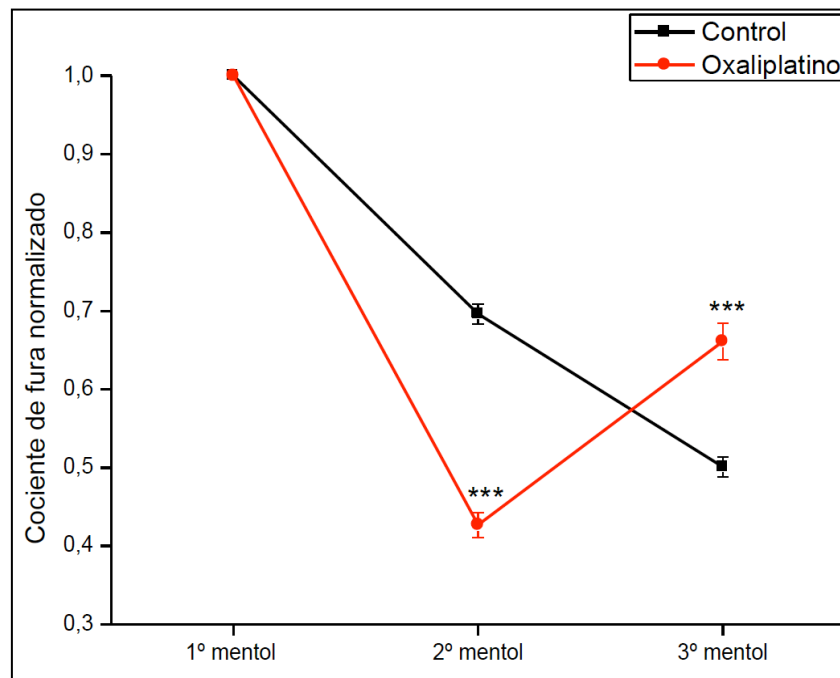


Figura 67. Efecto del oxaliplatino sobre la amplitud de respuesta a mentol en células CRM1 (Prueba t; n=220).

La amplitud de la tercera respuesta a mentol tras la aplicación de oxaliplatino aumentó, siendo mayor incluso que la amplitud de la misma respuesta en la situación control.

En vista de estos resultados, podemos concluir que el oxaliplatino actúa como inhibidor del canal TRPM8, ya que reduce la amplitud de respuesta a frío y mentol. Esta reducción de respuesta es reversible si el agonista es el mentol, pero no así si el agonista es el frío.

## 2.7. Las neuronas del ganglio raquídeo en cultivo no responden a oxaliplatino:

Una vez demostrado que el oxaliplatino activa el canal TRPA1 y reduce las respuestas a mentol y frío del canal TRPM8, cuando ambos canales se expresan en sistemas heterólogos, pasamos a comprobar el papel del oxaliplatino en neuronas del ganglio raquídeo, ya que distintas subpoblaciones de estas neuronas expresan ambos canales (Story 2003; Kobayashi et al.,

2005). Para ello realizamos cultivos de neuronas del ganglio raquídeo de ratones con genotipo silvestre. Para identificar los distintos canales TRP que expresaba cada neurona, tras el oxaliplatino añadimos, secuencialmente, agonistas específicos de tres canales TRP termosensibles; aceite de mostaza a 100  $\mu\text{M}$  para activar TRPA1, mentol 300  $\mu\text{M}$  para activar TRPM8, capsaicina 1  $\mu\text{M}$  para activar TRPV1, y finalmente, cloruro de potasio a 45 mM para comprobar la viabilidad de las neuronas.

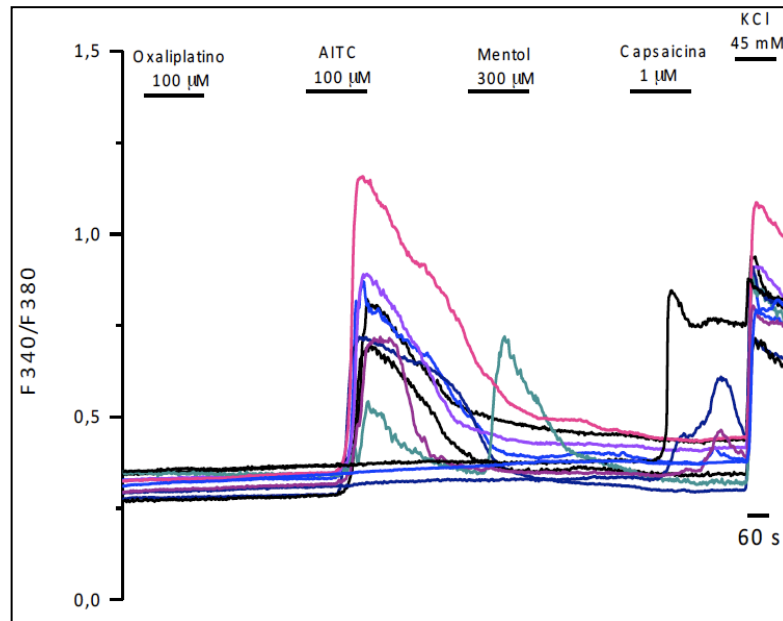


Figura 68. Imagen de calcio en neuronas de raíz del ganglio dorsal.

No observamos respuesta alguna a oxaliplatino por parte de ninguna de las 157 neuronas de los cultivos de ganglio raquídeo utilizados en este estudio.



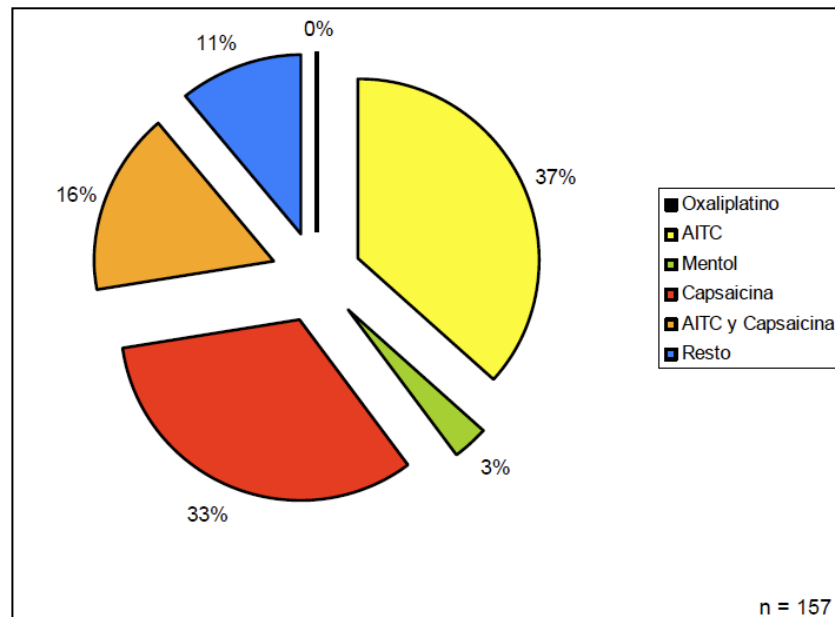


Figura 69. Porcentaje de respuesta de neuronas del ganglio raquídeo a los diferentes agonistas. (Negro: oxaliplatino, amarillo: AITC, verde: mentol, rojo: capsaicina, naranja: AITC y capsaicina, azul: neuronas que respondieron sólo a cloruro de potasio).

## 2.8. El oxaliplatino disminuye las respuestas a cloruro de potasio de las neuronas del ganglio raquídeo:

Tras no encontrar respuestas a oxaliplatino en neuronas sensoriales, quisimos comprobar el efecto de este agente quimioterapéutico sobre la excitabilidad neuronal. Para ello, nos servimos de nuevo de la imagen de calcio, aplicando tres pulsos de un estímulo despolarizante como es el cloruro potásico a 45 mM sobre neuronas sensoriales primarias obtenidas de ratones con genotipo silvestre.

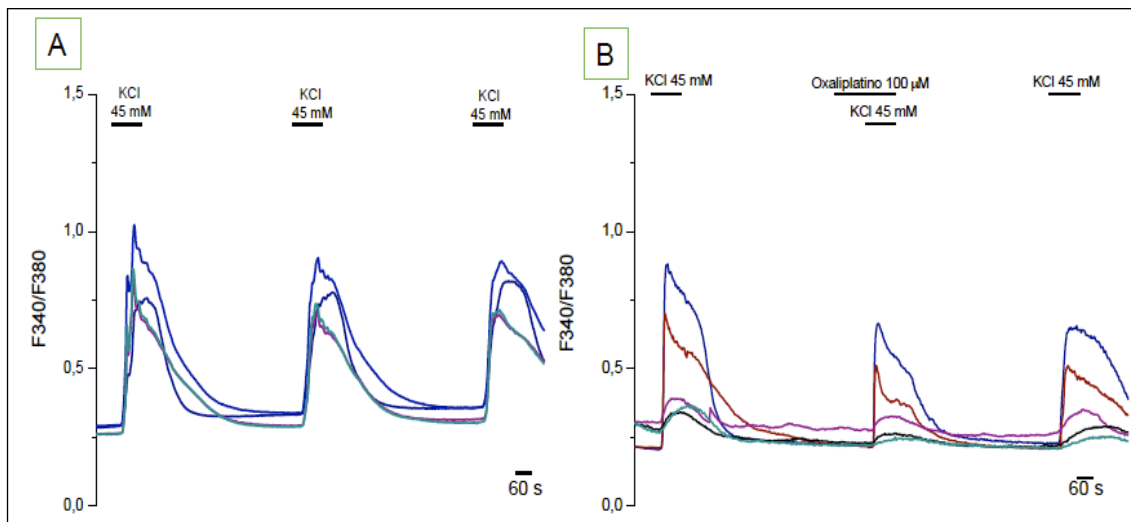


Figura 70. Imagen de calcio en neuronas sensoriales. (A) 3 aplicaciones de cloruro de potasio. (B) El mismo protocolo pero aplicando oxaliplatino conjuntamente con cloruro potásico en la segunda aplicación.

En la situación control, la amplitud de las respuestas a la segunda y tercera aplicación de cloruro de potasio fueron menores respecto a la amplitud de la respuesta a la primera aplicación de KCl a 45 mM (Figura 71).

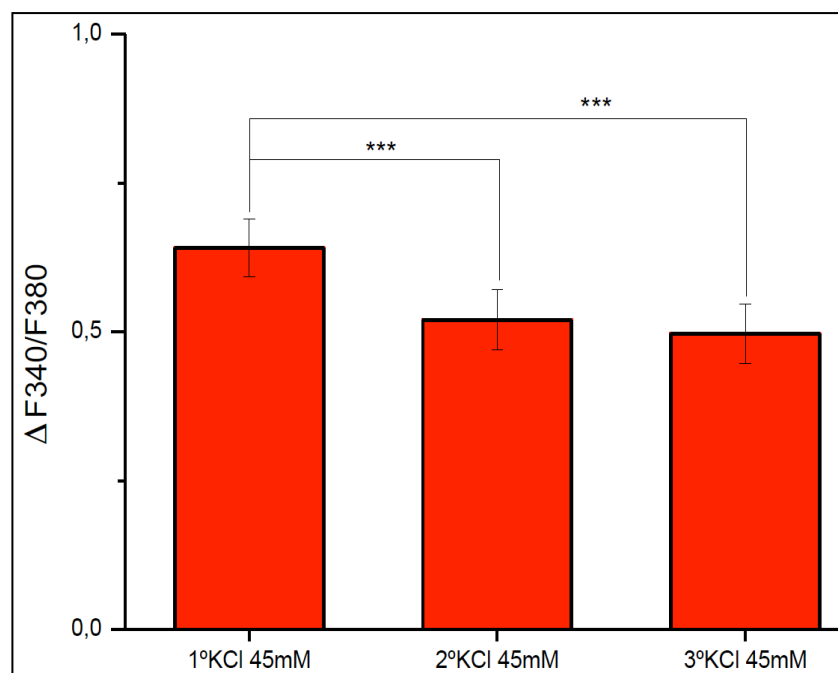


Figura 71. Amplitud de respuesta a 3 pulsos consecutivos de cloruro potásico (ANOVA medidas repetitivas con post test Bonferri; n=96).

Cuando se añadió oxaliplatino sobre la segunda aplicación de potasio, la amplitud disminuyó significativamente para volver a aumentar en el tercer pulso de cloruro potásico. A diferencia de lo que sucedió en el experimento control, tras aplicar oxaliplatino sobre la segunda respuesta y su posterior lavado, se produjo un aumento de respuesta en la tercera aplicación de cloruro potásico.

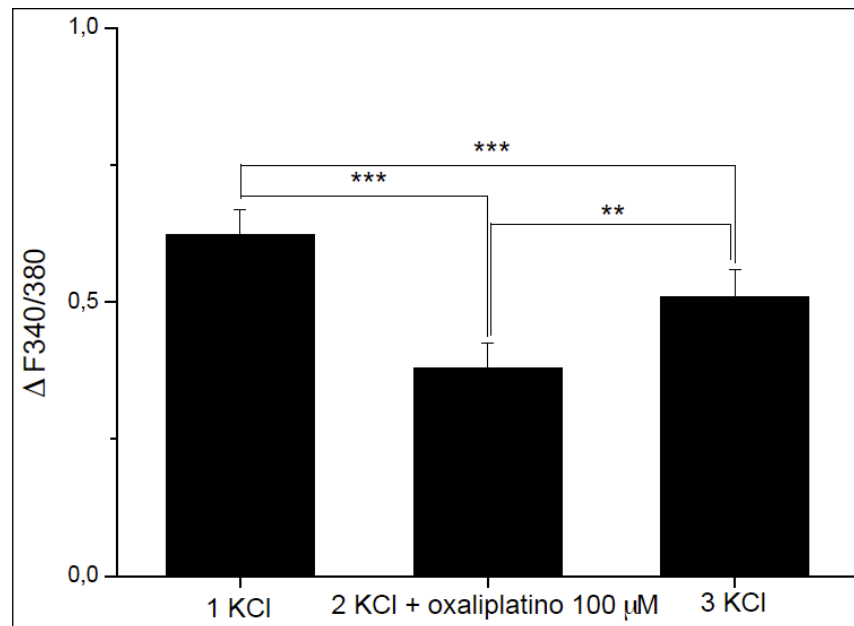


Figura 72. Amplitud de respuesta a 3 pulsos consecutivos de cloruro potásico con oxaliplatino sobre la segunda aplicación (ANOVA medidas repetitivas con post test Bonferri; n=96).

Asimismo, al comparar la amplitud de respuesta a la segunda aplicación de cloruro potásico con y sin oxaliplatino, encontramos diferencias significativas (Figura 73).

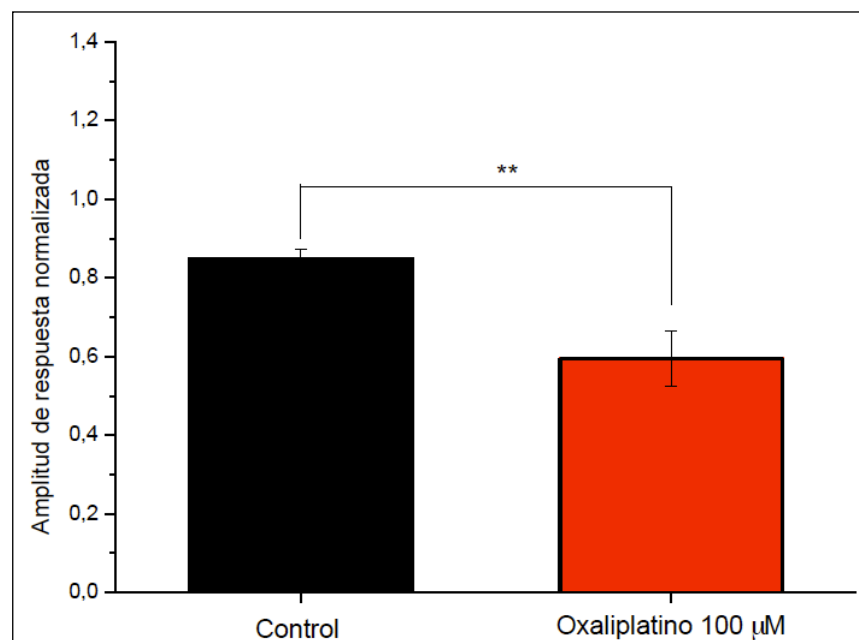


Figura 73. Histograma de amplitud de respuesta a la segunda aplicación de cloruro potásico (rojo) y con oxaliplatino (negro) normalizada a la respuesta a la primera aplicación de cloruro potásico. (Prueba t; n= 96).

La presencia de oxaliplatino sobre la segunda aplicación de cloruro potásico disminuyó la amplitud de la respuesta. Parece, por tanto, que el oxaliplatino actúa como inhibidor en las neuronas del ganglio raquídeo ante estímulos

despolarizantes como es el cloruro potásico a 45 mM. Para indagar en esta cuestión, probamos un protocolo distinto en el que aplicamos cloruro potásico y tras un minuto de perfusión añadimos el oxaliplatino. De este modo pudimos comprobar como en presencia de oxaliplatino, el incremento de calcio intracelular producido por el potasio disminuyó significativamente para volver a aumentar una vez retiramos el oxaliplatino del medio.

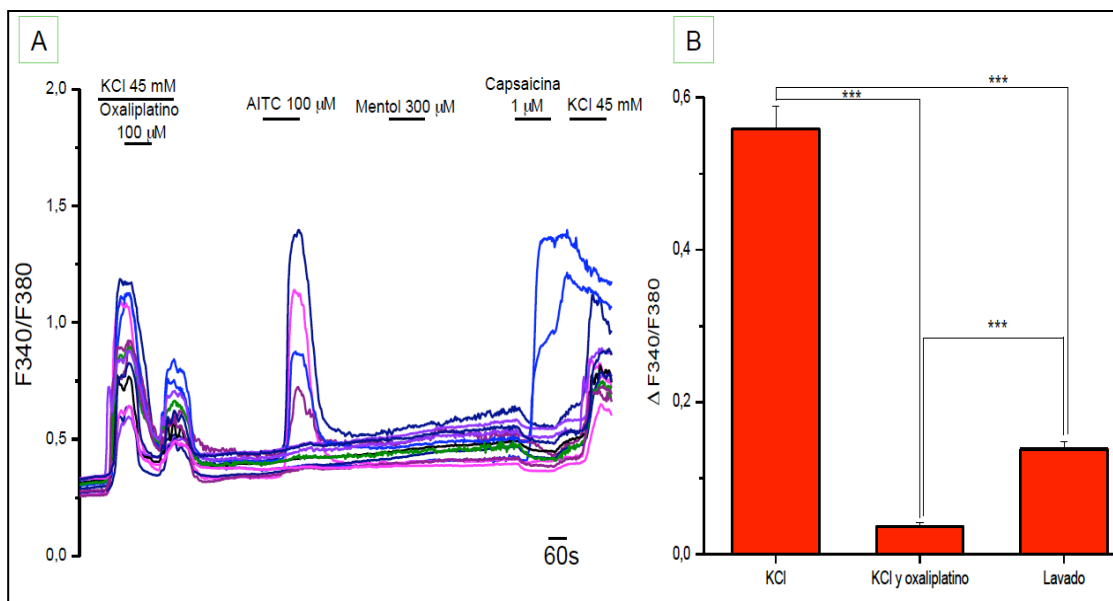


Figura 74. El oxaliplatino aplicado a mitad de la aplicación de cloruro potásico hace disminuir la amplitud de respuesta (ANOVA medidas repetitivas con post test Bonferri; n=49).

Ambos protocolos demostraron que el oxaliplatino redujo las respuestas de las neuronas ante un estímulo despolarizante como es el cloruro de potasio a 45 mM.

## 2.9. Los animales tratados con oxaliplatino presentan un comportamiento nociceptivo en el test de peso dinámico:

El test de peso dinámico permite calcular y discriminar el tiempo y el peso que el animal pasa apoyado sobre cada extremidad, permitiendo inferir el efecto del fármaco de estudio sobre la sensibilidad mecánica de las diferentes extremidades (Tétreault et al., 2011). Previamente, este test ha sido utilizado en el estudio de dolor neuropático, dolor inflamatorio y dolor crónico producido por un tumor femoral. En estos estudios se describe la diferencia en la distribución del peso del animal tratado respecto al control. Así vemos como en modelos de dolor inflamatorio, que se produce tras la inyección del adyuvante completo de Freund, los ratones inyectados tienden a apoyar un menor porcentaje de su

peso sobre la extremidad inyectada en comparación con los animales tratados con el vehículo del adyuvante (Robinson et al., 2012). Asimismo, en los modelos dolor neuropático (ligación del nervio ciático; Bennett et al., 1988) y cáncer óseo en ratas, se ha comprobado como los animales tratados apoyan menos peso sobre las extremidades afectadas en comparación con los animales control (Tétreault et al., 2011).

La idea de realizar este test no invasivo en ratones tratados con oxaliplatino surgió de la necesidad de demostrar el efecto del fármaco sobre la sensibilidad somestésica en estos animales antes de realizar la extracción de ARN y posterior PCR cuantitativa de los genes de interés. Para ello tratamos ratones de la cepa C57BL/6 con 1 mg/ml de oxaliplatino intraperitonealmente y 72 horas más tarde realizamos el test de peso dinámico.

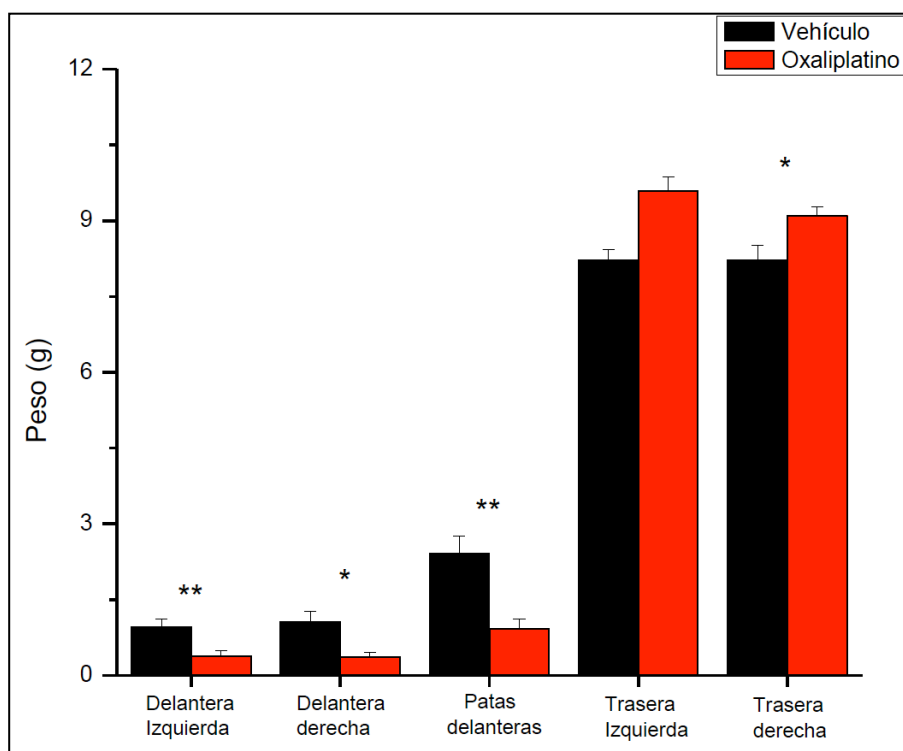


Figura 75. Representación gráfica de la distribución entre las diferentes extremidades, del peso en gramos que el animal apoya sobre el sensor. Prueba t; n=10).

En comparación con animales tratados con vehículo (glucosa al 5%), los animales inyectados con oxaliplatino apoyaron menos peso sobre las dos patas delanteras. La categoría denominada “patas delanteras” representada en las figuras 75 y 76 se corresponde con el momento en el que el animal juntaba las dos patas delanteras impidiendo al sensor de peso discriminar entre ambas.

Por otro lado, los ratones tratados con oxaliplatino apoyaron un mayor peso sobre las dos extremidades traseras respecto a los tratados con la solución que se utilizó como vehículo (Figura 75). Este aumento en el apoyo de peso sobre las extremidades traseras puede deberse a una compensación en el apoyo de los animales tratados con oxaliplatino y previamente caracterizado para los modelos de dolor inflamatorio, dolor neuropático y cáncer óseo (Tétreault et al., 2011).

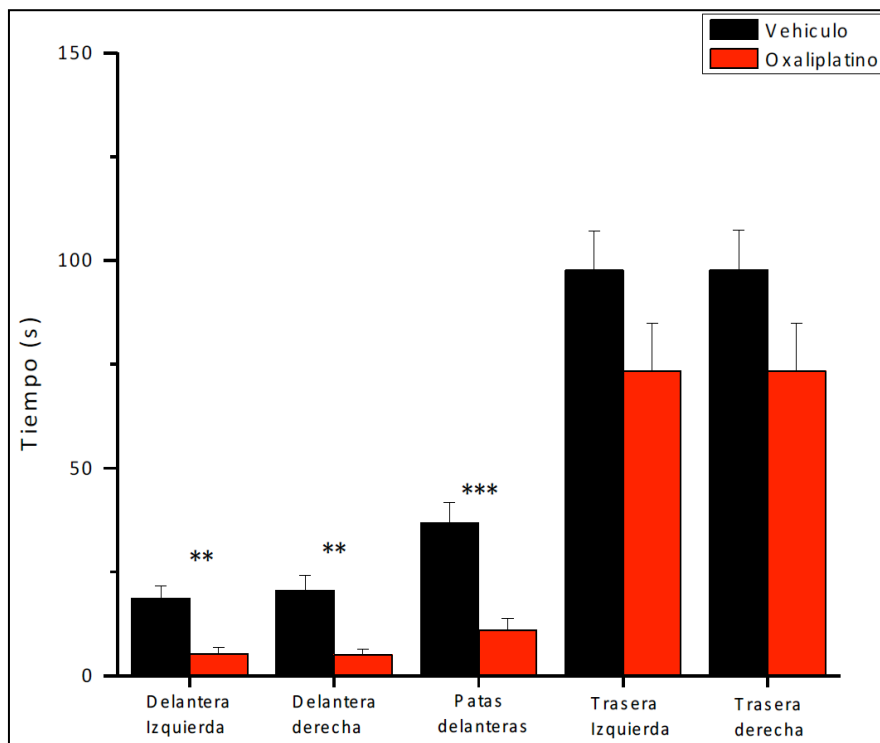


Figura 76. Representación gráfica de la distribución de tiempo entre las diferentes extremidades (Prueba t; n=10).

En cuanto a la distribución del tiempo que los animales tratados apoyaron cada extremidad, observamos como el grupo de ratones inyectados con vehículo tendieron a estar menos tiempo apoyados sobre las extremidades delanteras en comparación con los tratados con oxaliplatino. Al igual que sucedió con la distribución de peso, el efecto más evidente se observó en ambas patas delanteras. Debido a la variabilidad, la reducción en el tiempo de apoyo de las patas traseras no resulto significativa en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Estos resultados nos indicaron el tipo de comportamiento nociceptivo que produce el oxaliplatino cuando es inyectado intraperitonealmente en ratones, caracterizado por una menor distribución de peso en las dos patas delanteras

así como una menor distribución del tiempo que pasaron apoyados sobre las dos extremidades delanteras. Este comportamiento podría atribuirse a los efectos del oxaliplatino sobre la sensación en las extremidades ya que produce parestesia y disestesia de las mismas y déficits en la propiocepción de las extremidades como resultado de un efecto crónico del oxaliplatino.

#### **2.10. Los ratones tratados con oxaliplatino sobreexpresan TRPA1 en el ganglio raquídeo:**

Como se ha mencionado anteriormente, los efectos secundarios derivados del tratamiento con oxaliplatino y que afectan al sistema nervioso se pueden dividir en dos tipos; agudos y crónicos. Los primeros pueden deberse a la activación del canal TRPA1, inhibición del canal TRPM8 y reducción de la excitabilidad neuronal, como hemos demostrado en los apartados anteriores.

Para explicar los síntomas crónicos, pensamos en la posibilidad de que el tratamiento con oxaliplatino modificara el nivel de expresión de los canales TRPA1 y TRPM8. Para comprobarlo, tratamos una serie de ratones con una inyección única de oxaliplatino a 1 mg/ml, mientras que para el control tratamos una serie de animales con el vehículo en el que disolvimos el oxaliplatino, glucosa 5 %. Un día y una semana después del tratamiento, extrajimos los ganglios raquídeos y cuantificamos el nivel de expresión de los genes de TRPA1 y TRPM8 mediante PCR cuantitativa.

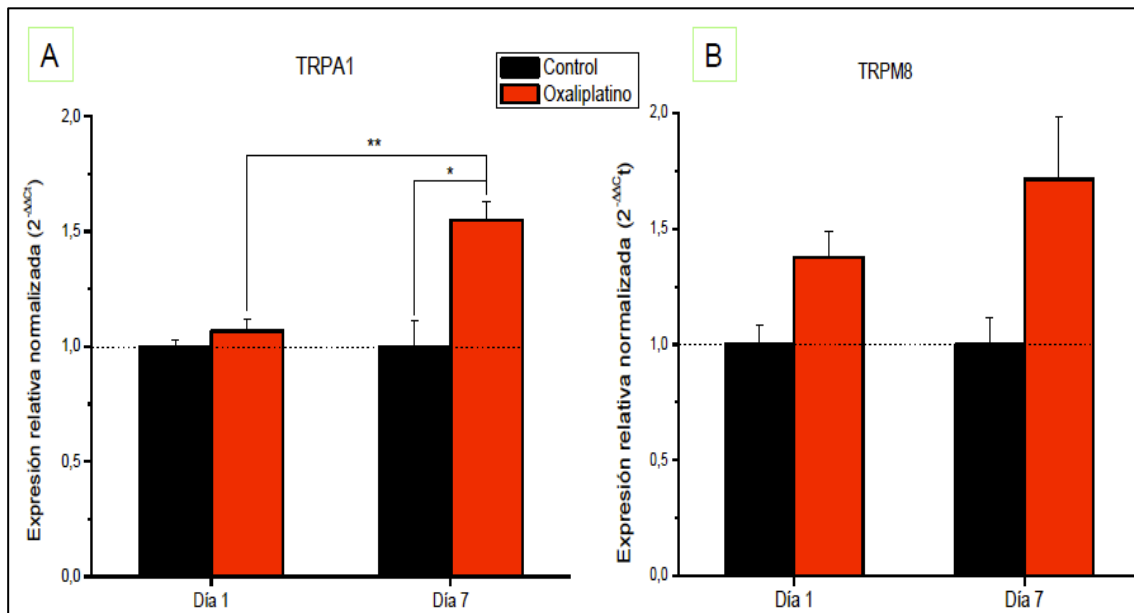


Figura 77. Gráfica de expresión de TRPA1 (A) y TRPM8 (B) en los animales tratados con oxaliplatino, normalizada al nivel de expresión de los tratados con salino. (Prueba t; n = 5).

La expresión del ARN mensajero de TRPA1 aumentó en los ratones tratados con oxaliplatino a los 7 días del tratamiento. Mientras que el nivel del ARN mensajero de TRPM8 fue similar para los días 1 y 7, en comparación con los animales tratados con vehículo.

### 2.11. El rastreo de los micro ARN que varían en los ratones tratados con oxaliplatino sugiere la participación de otros canales iónicos en la hiperalgesia:

Los resultados obtenidos en imagen de calcio junto con los datos de PCR cuantitativa nos sugieren que los canales iónicos TRPA1 y TRPM8, así como los canales dependientes de voltaje podrían estar implicados de una u otra forma en los efectos secundarios mediados por oxaliplatino. A continuación, intentamos identificar micro ARN que pudiesen estar desregulados en este modelo de dolor neuropático. Para ello, iniciamos una colaboración con el laboratorio de Marc Landry, en el Instituto Interdisciplinario de Neurociencias de Burdeos, puesto que estudios recientes de este grupo han demostrado que tanto los canales de calcio tipo L, como algunos micro ARN, varían en los modelos animales de dolor neuropático (Favereaux et al., 2011). Gracias a esta colaboración, pudimos realizar el rastreo de los micro ARN que modifican su expresión en los ratones tratados con oxaliplatino. Para ello, se llevó a cabo el mismo protocolo de inyección de oxaliplatino que realizamos para cuantificar la



expresión de TRPA1 y TRPM8. De los 348 micro ARN estudiados, decidimos centrarnos en dos de ellos, ya que su nivel de cambio de expresión fue significativo:

- miR -343: Según programas bioinformáticos como Target Scan, el cual busca en la secuencia génica la presencia de las regiones conservadas 8 mer y 7 mer que se unen al micro ARN, se predice como un micro ARN que controla la expresión del canal de potasio dependiente de voltaje Kv 7.3 (KCNQ3).
- miR – 26b: Este micro ARN se predice que controla la expresión del canal de calcio dependiente de voltaje Ca<sub>v</sub> 1.2 (CACNA1C).

Una vez realizado el rastreo y elegir a miR-343 y miR-26b como los más interesantes del estudio de entre los micro ARN que más variaban su expresión, nos decidimos a comprobar la expresión de los genes diana que se predicen para dichos micro ARN.

Así pues vimos que, mientras la expresión del miR-343 tiende a aumentar en los ganglios raquídeos de los ratones tratados con oxaliplatino, su gen diana, el canal KCNQ3, tiende a disminuir en el mismo tejido.

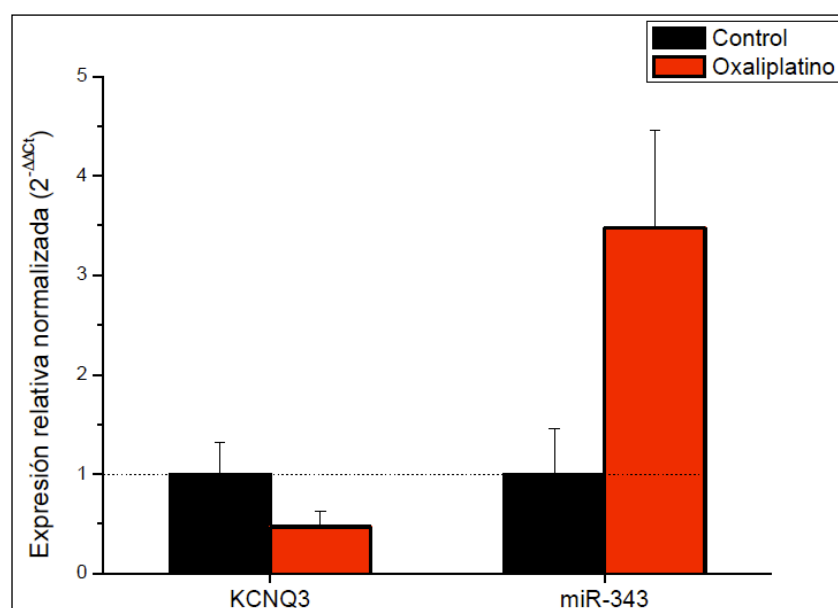


Figura 78. Expresión relativa normalizada del canal K<sub>v</sub> 7.3 (gen KCNQ3) y de su micro ARN miR-343. (Prueba t; n= 5).

Por otro lado, la expresión del miR-26b tiende a disminuir en los ganglios raquídeos de los ratones tratados con oxaliplatino, mientras que su gen diana, el gen *Cacna1a*, aumenta significativamente en el mismo tejido (Figura 79).

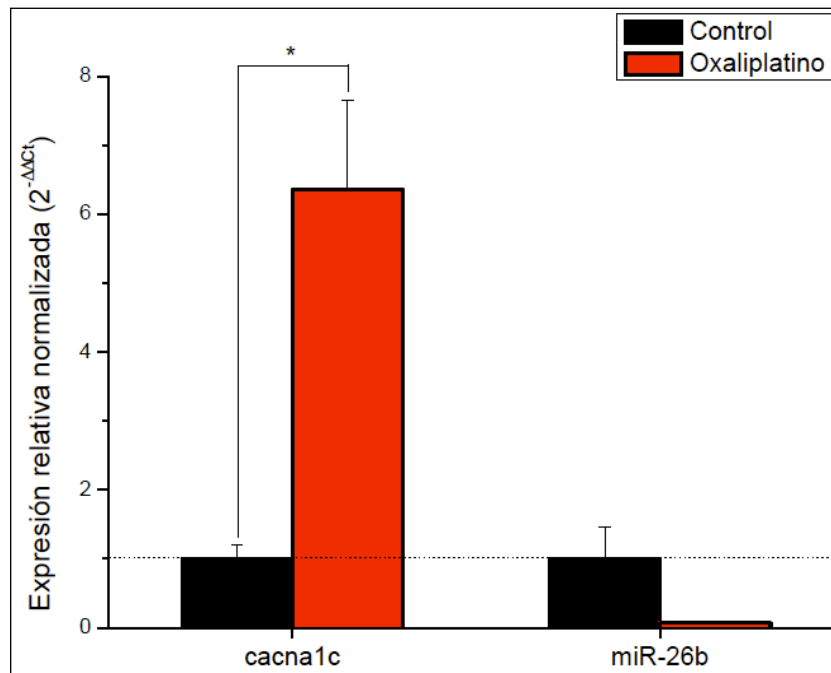


Figura 79. Cambio en la expresión del canal  $Ca_v$  1.2 (gen *Cacna1C*) y de su micro ARN miR-26b (Prueba t; n=5).

La implicación de los micro ARN en el modelo de dolor neuropático inducido por oxaliplatino requiere un estudio más profundo que no ha sido posible durante el desarrollo de esta tesis.

## **Discusión:**

### **1. El canal TRPA1 como mediador del agrandamiento gingival inducido por fármacos**

---

En el agrandamiento gingival inducido por fármacos existe una compleja interacción entre la actividad de los fibroblastos gingivales, el reemplazo de tejido conectivo, procesos inflamatorios y factores de crecimiento que se traducen en el aumento de varios componentes de la matriz extracelular (Arya y Gulati., 2012). Como se ha mencionado en el apartado de resultados, este trabajo se ha centrado en el análisis molecular del papel de los fibroblastos gingivales en dicho agrandamiento gingival.

#### **1.1. Los Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF) expresan canales TRP funcionales:**

Los fibroblastos son uno de los tipos celulares mayoritarios en la composición de las encías junto con los keratinocitos (Lindhe et al., 2002). Como se ha mencionado en la introducción, tanto los odontoblastos como los fibroblastos de la pulpa dental expresan canales TRP termosensibles. Nuestros estudios de biología molecular sobre fibroblastos gingivales humanos en cultivo revelaron la expresión de los canales TRPA1 y TRPV1, así como la variante de TRPV1 insensible a capsaicina TRPV1b.

Por otro lado, los estudios funcionales de imagen de calcio realizados mostraron como la adición del agonista específico de TRPA1, el aceite de mostaza, fue capaz de producir un aumento de calcio intracelular en células HGF. Sin embargo, al añadir los agonistas específicos de TRPM8, mentol, y de TRPV1, capsaicina, no se produjo ninguna respuesta en los fibroblastos gingivales humanos. La falta de respuesta a mentol se explica por la ausencia de expresión de TRPM8 en estas células. Nuestros datos sugieren que la falta de respuesta a capsaicina se debe a la expresión de la variante TRPV1b, insensible a capsaicina y protones (Lu et al., 2005). Esta variante actuaría como dominante negativo, de manera que al tetramerizar con las variantes silvestre de TRPV1, se formaría un canal insensible a capsaicina. (Lu et al., 2005). La sobreexpresión de TRPV1 en las células HGF mediante transfección,

recuperó la sensibilidad de estos fibroblastos a capsaicina. En este caso, el elevado nivel de expresión de TRPV1 haría que pudiesen formarse tetrámeros carentes de subunidades TRPV1b.

### 1.2. Los fármacos que inducen el agrandamiento gingival, a excepción de la ciclosporina A, activan TRPA1:

Los fármacos antiepilépticos; fenitoína y carbamazepina, así como la dihidropiridina nifedipina, activaron el canal TRPA1 expresado en sistemas heterólogos (HEK 293 y CHO – TRPA1) y en el sistema nativo objeto de estudio: fibroblastos gingivales humanos.

Los tres fármacos produjeron el incremento de calcio intracelular. Este aumento del calcio disminuyó hasta casi desaparecer cuando se aplicó el bloqueante específico del canal TRPA1, HC030031. Asimismo, el uso de ARN de interferencia del tipo shARN contra TRPA1 reveló la importancia de este canal en la activación de las células HGF por parte de fenitoína y nifedipina. La transfección del shARN#1 disminuyó la expresión del canal hasta casi la mitad, al mismo tiempo, redujo significativamente las respuestas de calcio cuando se aplicaron fenitoína y nifedipina.

Un estudio paralelo, realizado en el laboratorio por Enoch Baltazar, ha podido demostrar que la fenitoína activa corrientes catiónicas en células HGF, con características compatibles con la activación de canales TRPA1 (Figura 80).

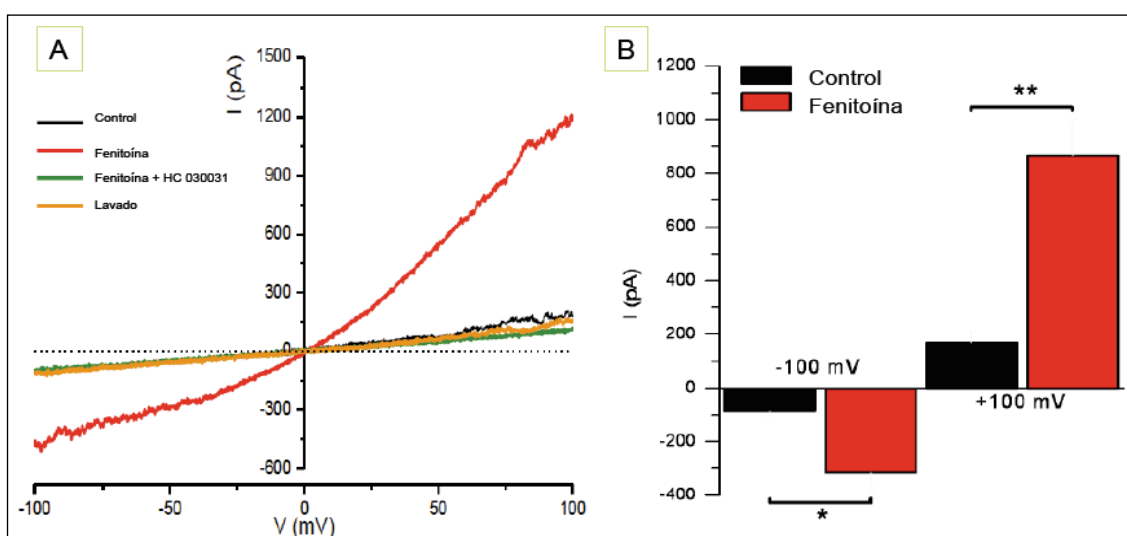


Figura 80. Experimento de *patch-clamp* en células HGF: (A) Curva I/V que muestra el aumento de corriente con fenitoína y como esta corriente no se produce con fenitoína y el bloqueante HC 030031. (B) Histograma con la amplitud de corriente en presencia de fenitoína (rojo) y en solución control (negro). (Prueba t pareada; n=4).

Por tanto, podemos concluir, que los fármacos que inducen el agrandamiento gingival, a excepción de la ciclosporina A, activan el canal TRPA1.

Todos los fibroblastos en los que se ha observado un incremento de calcio intracelular en presencia de fenitoína, carbamazepina o nifedipina, respondieron al agonista de TRPA1, el aceite de mostaza. Sin embargo, no todas las células que respondieron al aceite de mostaza, y que por tanto expresan TRPA1, respondieron en presencia de fenitoína, carbamazepina o nifedipina. Este hecho puede deberse a que el aceite de mostaza actúa formando uniones covalentes con cisteínas del extremo amino terminal del canal, activándolo (Jordt, et al., 2004). Probablemente, la fenitoína, la carbamazepina y la nifedipina activen el canal a través de otro mecanismo, pues no parecen ser compuestos electrofílicos.

El mecanismo de activación de TRPA1 por parte de la fenitoína guarda relación con la capacidad de activación del canal ante especies reactivas de oxígeno, ya que al aplicar vitaminas antioxidantes (ácido ascórbico,  $\alpha$  – tocoferol y ácido fólico) junto con la fenitoína, la respuesta de TRPA1 se redujo hasta casi desaparecer por completo. En consonancia con nuestros resultados, ensayos clínicos en pacientes tratados con este fármaco antiepiléptico, han demostrado como el uso de estas vitaminas antioxidantes reduce e incluso evita el desarrollo del agrandamiento gingival (Arya et al., 2011).

La nifedipina es un compuesto no electrofílico, y por tanto, incapaz de formar puentes covalentes con residuos del canal TRPA1. La activación del mismo por nifedipina se ve reducida, aunque no completamente, en presencia de ácido ascórbico y ácido fólico. Mientras que la respuesta no se redujo en presencia de  $\alpha$  – tocoferol. Asimismo, no observamos una disminución en el porcentaje de células HGF que respondieron a nifedipina y vitaminas respecto a la situación control. Estos resultados podrían indicar que la nifedipina activa TRPA1 de un modo complejo, que depende de otros factores además del estrés oxidativo como la fenitoína.

La administración de vitaminas antioxidantes evita el desarrollo del agrandamiento gingival producido por fenitoína. Del mismo modo, la administración de ácido ascórbico y/o ácido fólico podría ayudar en la

reducción de la incidencia del agrandamiento gingival inducido por nifedipina.

### **1.3. El LPS, cofactor del desarrollo del agrandamiento gingival, también activa TRPA1 en células HGF:**

La placa bacteriana se forma por el depósito sobre la superficie dental y consiste en un entramado orgánico formado por restos de la destrucción de bacterias y polisacáridos que dan lugar a una matriz intercelular, mezclado con las propias bacterias. Entre sus componentes se encuentra el LPS de la pared externa de las bacterias Gram negativas.

La placa bacteriana está considerada como un importante cofactor en el desarrollo del agrandamiento gingival ya que se ha demostrado que la severidad del mismo se ve influida por la acumulación de placa dental (Armitage, 1999).

La bacteria *Porphyromonas gingivalis* está presente en la placa dental. Esta bacteria está reconocida como factor de riesgo en el desarrollo de la periodontitis en adultos (Griffen et al., 1998) así como en la periodontitis prepuberal (Guilarte & Perrone., 2003). El LPS de *P. gingivalis* activó el canal TRPA1 expresado en fibroblastos gingivales humanos. Asimismo, el LPS de *Escherichia coli*, bacteria presente en la flora intestinal, fue capaz de activar TRPA1 expresado en células HGF, produciendo respuestas de mayor amplitud que las producidas por el LPS de *P. gingivalis*.

El LPS de *P. gingivalis*, a diferencia del LPS de *E. coli*, presenta una baja reactividad biológica en cuanto a la activación del proceso inflamatorio se refiere (Kurihara et al., 1991; Reife et al., 1995). Más concretamente, el LPS de *P. gingivalis* inyectado intramuscularmente no produce infiltrado celular en la zona de inyección, tampoco estimula la expresión de las selectinas E y P, moléculas esenciales en el reclutamiento de leucocitos durante las primeras fases de la inflamación. Esta baja reactividad inflamatoria permite a *P. gingivalis* evadir los mecanismos de defensa innatos del huésped, colonizando y produciendo enfermedades tales como la periodontitis (Reife et al., 1995).

El canal TRPA1 juega un importante papel en el proceso inflamatorio pues se activa por mediadores inflamatorios, tras esta activación del canal, se produce

la liberación de neuropéptidos por parte de las neuronas sensoriales que inducen vasodilatación y reclutamiento de células inmunitarias. La baja reactividad inmunitaria del LPS de *P. gingivalis* podría explicarse, en parte, por la baja amplitud de respuesta que el lipopolisacárido de esta bacteria produce en el canal TRPA1, así como por el bajo porcentaje de fibroblastos gingivales que responden a este LPS.

Como se ha mencionado en el apartado de resultados, *P. gingivalis* reside en la cavidad oral. Sin embargo, la formación de placa dental sobre el tejido gingival produce la acumulación de productos de la degradación bacteriana, como el LPS, que contribuyen al desarrollo de periodontitis y gingivitis (Duncan., 2008). En base a nuestros resultados, pensamos que la acumulación del LPS de *P. gingivalis* sobre el tejido gingival podría activar el canal TRPA1 expresado en los fibroblastos gingivales humanos *in vivo*, de la misma forma que hemos demostrado que se activa en estas células en cultivo. Finalmente, esta activación podría contribuir al proceso de agrandamiento gingival y/o enfermedad periodontal.

#### **1.4. Los fármacos que inducen agrandamiento gingival no inducen la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos:**

Ninguno de los fármacos que inducen el agrandamiento de las encías ha sido capaz de estimular la proliferación de los fibroblastos gingivales en cultivo. Este resultado contradice los trabajos publicados por Sano y Kantarci en el que señalan que el tratamiento de los fibroblastos humanos en cultivo con fenitoína o nifedipina, inducen la proliferación celular y disminuye su actividad apoptótica (Sano et al., 2004; Kantarci et al., 2007). Nuestros resultados apoyan una hipótesis alternativa; creemos que el agrandamiento gingival podría estar produciéndose por la acumulación componentes de la matriz extracelular, mayoritariamente colágeno, en el tejido conectivo (Lucas et al., 1985; Delilliers et al., 1986; Kataoka et al., 2005). La acumulación de colágeno en el tejido conectivo se produciría por la secreción de citoquinas por parte de los fibroblastos gingivales (Modeér et al., 1992; Brunius et al., 1993) que inducirían la sobreexpresión del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (Hong et al., 1999). El CTGF está presente tanto en la matriz extracelular como en el

espacio intracelular de los fibroblastos, el CTGF presente en el espacio extracelular induciría la acumulación de colágeno en el tejido conectivo (Hong et al., 1999), mientras que el CTGF intracelular inhibiría la progresión del ciclo celular (Kubota et al., 2000).

El CTGF se encuentra sobreexpresado en el agrandamiento gingival inducido por fenitoína y por nifedipina, pero no así en el agrandamiento inducido por ciclosporina A (Uzel et al., 2001), lo que señala que el mecanismo del agrandamiento gingival producido por este fármaco inmunosupresor difiere del mecanismo utilizado por parte de la fenitoína y la nifedipina. Según nuestros datos y la literatura publicada, pensamos que el agrandamiento gingival inducido por fenitoína y nifedipina se produciría mediante un mecanismo molecular que implicaría la activación del canal TRPA1 por medio del estrés oxidativo producido por estos fármacos, esta activación produciría un aumento del calcio intracelular que, como principal controlador de la expresión génica en neuronas (Johnson et al., 1997; Dolmetsch et al., 1998), induciría la sobreexpresión de citoquinas y CTGF con la consecuente acumulación de colágeno en el tejido conectivo gingival.



## 2. El canal TRPA1 como mediador del dolor neuropático inducido por oxaliplatino

Actualmente, el oxaliplatino es el fármaco de referencia en el tratamiento de tumores del tracto digestivo, especialmente en el cáncer colorrectal (Extra et al., 1990). Como se ha mencionado en la introducción, la neuropatía sensorial periférica inducida por oxaliplatino puede dividirse en aguda o crónica según el tiempo de prevalencia de los síntomas. La neuropatía aguda se produce en el 80% de los pacientes tratados con oxaliplatino, y se convierte en neuropatía crónica entre un 15 y un 20% de los casos (Gamelin et al., 2006).

Distintas evidencias sugieren que la neuropatía se produce por la acción del oxaliplatino sobre diferentes canales iónicos en las neuronas sensoriales periféricas:

- Disminuye la amplitud de la corriente mediada por canales de sodio dependientes de voltaje (Benoit et al., 2006), reduciendo a la mitad la amplitud del potencial de acción de las neuronas sensoriales (Grolleau et al., 2001).
- Reduce las corrientes de potasio (Benoit et al., 2006).
- Activa el canal TRPA1 expresado en sistemas heterólogos, sin embargo, no activa el canal expresado en neuronas del ganglio raquídeo. Esta activación es dependiente de glutatión, ya que en presencia de este quelante de especies reactivas de oxígeno, no se observa activación de TRPA1 por parte del oxaliplatino (Nassini et al., 2011).

En este trabajo hemos mostrado como el oxaliplatino activó el canal TRPA1 expresado en sistemas heterólogos (HEK 293 y CHO – TRPA1). Esta activación se vio abolida en presencia del bloqueante específico del canal, HC030031, así como en presencia de agentes quelantes de especies reactivas de oxígeno. Estos resultados corroboran los obtenidos por Nassini y colaboradores en el que afirman que la activación de TRPA1 es dependiente de la formación de especies reactivas de oxígeno, por lo que el uso de antioxidantes, como el glutatión, podrían servir para la prevención de la neuropatía producida en el tratamiento con oxaliplatino. De este modo se ha

descrito como la infusión sanguínea de glutatión previa a la de oxaliplatino, previene la aparición de los síntomas agudos de la neuropatía sin afectar a la actividad antitumoral del oxaliplatino (Cascinu et al., 2002).

A nivel molecular hemos demostrado como el tratamiento con oxaliplatino produce la sobreexpresión de TRPA1 a los 7 días de la inyección, pero no así de TRPM8. Teniendo en cuenta estos datos, pensamos que la hipersensibilidad al frío en pacientes bajo tratamiento con oxaliplatino se produce tanto por la activación de TRPA1, canal sensible a frío nocivo, como por la inhibición de TRPM8, canal sensible al frío moderado. A nivel crónico la sobreexpresión de TRPA1 perpetuaría la transducción de la sensación de frío a temperaturas moderadas mediante el canal sensible a frío nocivo, TRPA1 y no TRPM8, sensor de frío moderado.

Sorprendentemente, el oxaliplatino no produjo ninguna respuesta sobre neuronas del ganglio raquídeo de ratón en cultivo. Esta falta de respuesta de las neuronas al oxaliplatino en nuestros experimentos de imagen de calcio es consistente con lo publicado anteriormente por Nassini y colaboradores, los cuales tampoco encontraron respuesta a oxaliplatino en dicha preparación (Nassini et al., 2010). Hemos extendido los resultados previos, al comprobar que el oxaliplatino parece producir una inhibición de las respuestas despolarizantes evocadas por cloruro de potasio.

Estos resultados podrían explicarse por la reducción de la amplitud del potencial de acción de las neuronas sensoriales en presencia de oxaliplatino (Grolleau et al., 2001) y son consistentes con los trabajos de Benoit y colaboradores en los que describieron la disminución de la amplitud de la corriente mediada por canales de sodio dependientes de voltaje (Benoit et al., 2006), así como la reducción de las corrientes de potasio (Benoit et al., 2006).

Asimismo, el oxaliplatino produjo la sobreexpresión del canal de calcio dependiente de voltaje  $Ca_v1.2$  (*Cacna1c*) en los ganglios raquídeos de los animales tratados. Este gen se encuentra desregulado en diferentes modelos de dolor neuropático; por ejemplo, su expresión se ve reducida en los ganglios raquídeos del modelo de neuropatía producida por la ligación del nervio ciático (Kim et al., 2001). Por el contrario, la expresión de este gen aumenta en el

modelo de dolor neuropático asociado al tratamiento con gp120 (glicoproteína 120) y ddC (inhibidor de la nucleósido transcriptasa reversa) contra el virus VIH (Maratou et al., 2009), todo lo cual indica que en dos modelos de neuropatía inducida por fármacos (Oxaliplatino y gp120 + ddC), la expresión de uno de los canales candidatos para la transducción del dolor,  $Ca_v1.2$ , aumenta en las neuronas de ganglio raquídeo.

En resumen; el oxaliplatino aplicado sobre neuronas sensoriales reduce las corrientes de sodio y las de potasio alterando la excitabilidad neuronal (Grolleau et al., 2001; Benoit et al., 2006), lo que en nuestros experimentos se ha observado como una disminución en la amplitud de respuesta a un estímulo despolarizante (cloruro potásico 45 mM). A nivel crónico, los cambios de expresión observados en el canal de calcio dependiente de voltaje de voltaje  $Ca_v1.2$  podría modificar las características biofísicas de las neuronas perpetuando los efectos del proceso neuropático de forma crónica.

## Conclusions:

### 1. TRPA1 channel as a potential mediator of drug-induced gingival overgrowth:

- 1.1. Human Gingival Fibroblasts (HGF) express TRPA1 and TRPV1 channels, and also capsaicin insensitive TRPV1 isoform, called TRPV1b. TRPV1 overexpression in HGF cells produces capsaicin responses.
- 1.2. Drugs that induce gingival overgrowth: phenytoin, carbamazepine and nifedipine, activate TRPA1 channels expressed in heterologous systems (HEK 293 and CHO – TRPA1) and native systems (HGF). This activation is blocked by the specific TRPA1 antagonist, HC030031.
- 1.3. The immunosuppressor agent cyclosporine A, drug that also induces gingival overgrowth, does not activate TRPA1 channels expressed in CHO-TRPA1 or HGF cells.
- 1.4. Interference shRNA expression against TRPA1 in HGF cells, reduces TRPA1 responses to phenytoin and nifedipine.
- 1.5. The antioxidant vitamins ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol and folic acid, block TRPA1 response to phenytoin. Ascorbic acid and folic acid, but not  $\alpha$ -tocopherol, reduced TRPA1 responses to nifedipine.
- 1.6. The LPS from two bacterial species that live in the oral cavity, and described as cofactor for gingival overgrowth induction, *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis*, activate TRPA1 channel.
- 1.7. Drugs that induce gingival overgrowth do not induce cellular proliferation of human gingival fibroblasts in culture.

## **2. TRPA1 channel is a mediator of oxaliplatin-induced neuropathic pain:**

- 2.1. Oxaliplatin activates TRPA1 channels expressed in heterologous systems (HEK 293 and CHO – TRPA1). This activation is blocked by the specific TRPA1 antagonist, HC030031.
- 2.2. Glutathione, a reactive oxygen species chelator, prevent TRPA1 activation by oxaliplatin on CHO – TRPA1 cells.
- 2.3. The effects of oxaliplatin on cold activation of TRPA1 were dependent on dose. At low concentration (1  $\mu$ M), oxaliplatin sensitized TRPA1 responses to cold temperature. At high concentrations (500  $\mu$ M), oxaliplatin increased the temperature threshold of activation of TRPA1.
- 2.4. TRPM8 expressed in heterologous systems (HEK 293 and CRM1 cells) shows reduced responses to cold and menthol in the presence of oxaliplatin.
- 2.5. Oxaliplatin does not activate TRPA1 channels expressed in DRG neurons, suggesting an indirect mechanism of action on sensory neurons.
- 2.6. Potassium chloride responses in DRG neurons are reduced in the presence of oxaliplatin.
- 2.7. Oxaliplatin treatment of wild-type mice induces TRPA1 and Cav 1.2 overexpression in DRG neurons.
- 2.8. Wild-type mice treated with oxaliplatin show nociceptive-related behaviour characterized by changes in weight bearing; these mice put less weight and spend less time standing on their front paws compared to control animals.

## Bibliografía

1. Adelsberger, H., S. Quasthoff, et al. (2000). "The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons." Eur J Pharmacol **406**(1): 25-32.
2. Akiyama, S., A. Amano, et al. (2006). "Relationship of periodontal bacteria and Porphyromonas gingivalis fimA variations with phenytoin-induced gingival overgrowth." Oral Dis **12**(1): 51-56.
3. Anand, U., W. R. Otto, et al. (2010). "Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons." Mol Pain **6**: 82.
4. Andersson, D. A., C. Gentry, et al. (2008). "Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress." J Neurosci **28**(10): 2485-2494.
5. Armitage, G. C. (1999). "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." Ann Periodontol **4**(1): 1-6.
6. Arya, R. and S. Gulati (2012). "Phenytoin-induced gingival overgrowth." Acta Neurol Scand **125**(3): 149-155.
7. Arya, R., S. Gulati, et al. (2011). "Folic acid supplementation prevents phenytoin-induced gingival overgrowth in children." Neurology **76**(15): 1338-1343.
8. Ashley, A. C., D. J. Sargent, et al. (2007). "Updated efficacy and toxicity analysis of irinotecan and oxaliplatin (IROX) : intergroup trial N9741 in first-line treatment of metastatic colorectal cancer." Cancer **110**(3): 670-677.
9. Bandell, M., G. M. Story, et al. (2004). "Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin." Neuron **41**(6): 849-857.
10. Barak, S., I. S. Engelberg, et al. (1987). "Gingival hyperplasia caused by nifedipine. Histopathologic findings." J Periodontol **58**(9): 639-642.
11. Baraldi, P. G., D. Preti, et al. (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.
12. Barclay, S., J. M. Thomason, et al. (1992). "The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth." J Clin Periodontol **19**(5): 311-314.
13. Bautista, D. M., P. Movahed, et al. (2005). "Pungent products from garlic

- activate the sensory ion channel TRPA1." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12248-12252.
14. Bautista, D. M., S. E. Jordt, et al. (2006). "TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents." Cell **124**(6): 1269-1282.
  15. Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." Pain **33**(1): 87-107.
  16. Bennett, M. I. (2010). Neuropathic pain. New York, Oxford University Press.
  17. Benoit, E., S. Brienza, et al. (2006). "Oxaliplatin, an anticancer agent that affects both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in frog peripheral myelinated axons." Gen Physiol Biophys **25**(3): 263-276.
  18. Bessac B.F., Sivula M., von Hehn C.A., Caceres A. I., Escalera J., Cohn L., Jordt S.E. (2009). "TRPA2 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases". FASEB J. **23**(4):1102-14.
  19. Birrell, M. A., M. G. Belvisi, et al. (2009). "TRPA1 agonists evoke coughing in guinea pig and human volunteers." Am J Respir Crit Care Med **180**(11): 1042-1047.
  20. Boltchi, F. E., T. D. Rees, et al. (1999). "Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review." Quintessence Int **30**(11): 775-783.
  21. Brigelius-Flohé, R., Traber M.G. (1999) "Vitamin E: Function and metabolism". The FASEB Journal. **13** (10): 1145-1155
  22. Brunius, G., M. Iinuma, et al. (1993). "The phenytoin metabolite p-HPPH upregulates prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts challenged to interleukin-1." Life Sci **53**(6): 503-515.
  23. Bullon, P., I. Gallardo, et al. (2007). "Nifedipine and cyclosporin affect fibroblast calcium and gingiva." J Dent Res **86**(4): 357-362.
  24. Cascinu, S., V. Catalano, et al. (2002). "Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." J Clin Oncol **20**(16): 3478-3483.
  25. Casetta, I., E. Granieri, et al. (1997). "Phenytoin-induced gingival overgrowth: a community-based cross-sectional study in Ferrara, Italy."

- Neuroepidemiology **16**(6): 296-303.
26. Caterina, M. J. and D. Julius (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." Annu Rev Neurosci **24**: 487-517.
  27. Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.
  28. Caterina, M. J., T. A. Rosen, et al. (1999). "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat." Nature **398**(6726): 436-441.
  29. Cesare, P. and P. McNaughton (1996). "A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15435-15439.
  30. Chang, Q., S. Hoefs, et al. (2005). "The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel." Science **310**(5747): 490-493.
  31. Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-524.
  32. Cordero-Morales, J. F., E. O. Gracheva, et al. (2011). "Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(46): E1184-1191.
  33. Corrêa, J. D., C. M. Queiroz-Junior, et al. (2011). "Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features." ISRN Dent **2011**: 497850.
  34. Cosens, D. J. and A. Manning (1969). "Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant." Nature **224**(5216): 285-287.
  35. Cruz-Orengo, L., A. Dhaka, et al. (2008). "Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1." Mol Pain **4**: 30.
  36. Cvitkovic, E. (1998). "A historical perspective on oxaliplatin: rethinking the role of platinum compounds and learning from near misses." Semin Oncol **25**(2 Suppl 5): 1-3.
  37. Dahllof, G., H. Preber, et al. (1993). "Periodontal condition of epileptic adults treated long-term with phenytoin or carbamazepine." Epilepsia **34**(5): 960-964.



38. Davies MB, Austin J, Partridge DA (1991) Vitamin C: Its chemistry and biochemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge UK
39. Delilliers, G. L., F. Santoro, et al. (1986). "Light and electron microscopic study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia." J Periodontol **57**(12): 771-775.
40. Di Cesare Mannelli, L., M. Zanardelli, et al. (2012). "Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin." The Journal of Pain **13**(3): 276-284.
41. Dietrich, A., M. Mederos y Schnitzler, et al. (2003). "N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity." J Biol Chem **278**(48): 47842-47852.
42. Dobremez, E., R. Bouali-Benazzouz, et al. (2005). "Distribution and regulation of L-type calcium channels in deep dorsal horn neurons after sciatic nerve injury in rats." Eur J Neurosci **21**(12): 3321-3333.
43. Dolmetsch, R. E., K. Xu, et al. (1998). "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression." Nature **392**(6679): 933-936.
44. Dongari-Bagtzoglou A. Research, Science and Therapy Committe, American Academy of Periodontology (AAP): "Drug-associated gingival enlargement". J Periodontol 2004; **75**:1424-1431.
45. Dongari, A., H. T. McDonnell, et al. (1993). "Drug-induced gingival overgrowth." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **76**(4): 543-548.
46. Dragoni, I., E. Guida, et al. (2006). "The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functionally important double cysteine motif." J Biol Chem **281**(49): 37353-37360.
47. Du, S., I. Araki, et al. (2007). "Transient receptor potential channel A1 involved in sensory transduction of rat urinary bladder through C-fiber pathway." Urology **70**(4): 826-831.
48. Duncan, L. M., J. Deeds, et al. (1998). "Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis." Cancer Res **58**(7): 1515-1520.
49. Duncan, M. J. (2008). The Molecular Biology of Porphyroonas gingivalis. Molecular Oral Microbiology. A. H. Rogers. University of Adelaide, Caister Academic Press.
50. El Karim IA, L. G., Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, Killough

- SA, Lundy FT. (2011). "Human dental pulp fibroblasts express the "cold-sensing" transient receptor potential channels TRPA1 and TRPM8." Journal of Endodontics **37**(4): 473-478.
51. El Karim, I. A., G. J. Linden, et al. (2011). "Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: implications for dentin sensitivity." Pain **152**(10): 2211-2223.
52. Erler, I., D. M. Al-Ansary, et al. (2006). "Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel." J Biol Chem **281**(50): 38396-38404.
53. Extra, J. M., M. Espie, et al. (1990). "Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer." Cancer Chemother Pharmacol **25**(4): 299-303.
54. Fajardo, O., V. Meseguer, et al. (2008). "TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence." J Neurosci **28**(31): 7863-7875.
55. Fajardo, O., V. Meseguer, et al. (2008). "TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines." Channels (Austin) **2**(6): 429-438.
56. Fanger CM, d. C. D. a. M. M. (2010). "TRPA1 as an analgesic target." The Open Drug Discovery Journal **2010**(2): 64-70.
57. Fattore, L., M. Stablein, et al. (1991). "Gingival hyperplasia: a side effect of nifedipine and diltiazem." Spec Care Dentist **11**(3): 107-109.
58. Favereaux, A., O. Thoumine, et al. (2011). "Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain." EMBO J **30**(18): 3830-3841.
59. Gamelin, L., M. Boisdron-Celle, et al. (2006). "[Oxaliplatin neurotoxicity]." Bull Cancer **93 Suppl 1**: S17-22.
60. Gauchan, P., T. Andoh, et al. (2009). "Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice." Neurosci Lett **458**(2): 93-95.
61. Gauchan, P., T. Andoh, et al. (2009). "Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta-1 subunit." Biol Pharm Bull **32**(4): 732-734.
62. Ghelardini, C., J. F. Desaphy, et al. (2010). "Effects of a new potent analog of tocainide on hNav1.7 sodium channels and in vivo neuropathic pain models." Neuroscience **169**(2): 863-873.

63. González-Jaranay, M. and F. Mesa (1991). "[Nifedipine induced gingival hyperplasia]." Rev Eur Odontoestomatol **3**(2): 127-130.
64. Griffen, A. L., M. R. Becker, et al. (1998). "Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status." J Clin Microbiol **36**(11): 3239-3242.
65. Grolleau, F., L. Gamelin, et al. (2001). "A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels." J Neurophysiol **85**(5): 2293-2297.
66. Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.
67. Guilarte C, P. M. (2003). "Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis." Acta Odontológica Venezolana **42**(3).
68. Hill, K. and M. Schaefer (2009). "Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of oxidative stress." Cell Calcium **45**(2): 155-164.
69. Hinman, A., H. H. Chuang, et al. (2006). "TRP channel activation by reversible covalent modification." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(51): 19564-19568.
70. Hong, H. H., M. I. Uzel, et al. (1999). "Regulation of lysyl oxidase, collagen, and connective tissue growth factor by TGF-beta1 and detection in human gingiva." Lab Invest **79**(12): 1655-1667.
71. Huang, J., X. Zhang, et al. (2006). "Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia." Curr Neuropharmacol **4**(3): 197-206.
72. Huang, X. Z., Y. J. Won, et al. (2004). "Nerve injury alters profile of receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> channel modulation in vagal afferent neurons of rat nodose ganglia." Neurosci Lett **364**(3): 189-194.
73. IASP (2008). Annual Report. Seattle (EE.UU). IASP.
74. Ibrahim, A., S. Hirschfeld, et al. (2004). "FDA drug approval summaries: oxaliplatin." Oncologist **9**(1): 8-12.
75. Inoue, R., Z. Jian, et al. (2009). "Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology." Pharmacol Ther **123**(3): 371-385.
76. Jaggi, A. S. and N. Singh (2012). "Mechanisms in cancer-

- chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy." Toxicology **291**(1-3): 1-9.
77. Jaquemar, D., T. Schenker, et al. (1999). "An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts." J Biol Chem **274**(11): 7325-7333.
78. Jiang, L. H., N. Gamper, et al. (2011). "Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1." Curr Drug Targets **12**(5): 724-736.
79. Johnson, C. M., C. S. Hill, et al. (1997). "Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade." J Neurosci **17**(16): 6189-6202.
80. Jordt, S. E., D. M. Bautista, et al. (2004). "Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1." Nature **427**(6971): 260-265.
81. Joshi, R., S. Adhikari, et al. (2001). "Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity." Free Radic Biol Med **30**(12): 1390-1399.
82. Kagiava, A., A. Tsingotjidou, et al. (2008). "The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat." Neurotoxicology **29**(6): 1100-1106.
83. Kantarci, A., P. Augustin, et al. (2007). "Apoptosis in gingival overgrowth tissues." J Dent Res **86**(9): 888-892.
84. Karashima, Y., K. Talavera, et al. (2009). "TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1273-1278.
85. Kataoka, M., J. Kido, et al. (2005). "Drug-induced gingival overgrowth--a review." Biol Pharm Bull **28**(10): 1817-1821.
86. Kawashiri, T., N. Egashira, et al. (2012). "L type Ca(2)+ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats." Mol Pain **8**: 7.
87. Kiessling, A., S. Fussel, et al. (2003). "Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8." Prostate **56**(4): 270-279.

88. Kim, D. S., C. H. Yoon, et al. (2001). "Changes in voltage-gated calcium channel alpha(1) gene expression in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury." Brain Res Mol Brain Res **96**(1-2): 151-156.
89. Kimball OP, H. T. (1939). "The use of Dilantin in the treatment of epilepsy." Annals of Internal Medicine **13**:787-93.
90. Kobayashi, K., T. Fukuoka, et al. (2005). "Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors." J Comp Neurol **493**(4): 596-606.
91. Kono, T., M. Satomi, et al. (2012). "Oxaliplatin-induced neurotoxicity involves TRPM8 in the mechanism of acute hypersensitivity to cold sensation." Brain Behav **2**(1): 68-73.
92. Kremeyer, B., F. Lopera, et al. (2010). "A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome." Neuron **66**(5): 671-680.
93. Kubota, S., S. Kondo, et al. (2000). "Identification of an RNA element that confers post-transcriptional repression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific 24 (ctgf/hcs24) gene: similarities to retroviral RNA-protein interactions." Oncogene **19**(41): 4773-4786.
94. Kurihara, H., F. Nishimura, et al. (1991). "Humoral immune response to an antigen from Porphyromonas gingivalis 381 in periodontal disease." Infect Immun **59**(8): 2758-2762.
95. Lindhe J, Karring T. (2002): "Anatomy of the periodontium". En Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Edited by: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Copenhagen: Munksgaard.
96. Liu, T. and R. R. Ji (2012). "Oxidative stress induces itch via activation of transient receptor potential subtype ankyrin 1 in mice." Neurosci Bull **28**(2): 145-154.
97. Lu, G., D. Henderson, et al. (2005). "TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant." Mol Pharmacol **67**(4): 1119-1127.
98. Lucas, R. M., L. P. Howell, et al. (1985). "Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A histochemical and ultrastructural study." J Periodontol **56**(4): 211-215.
99. Lujambio, A. and S. W. Lowe (2012). "The microcosmos of cancer." Nature **482**(7385): 347-355.

100. Macpherson, L. J., A. E. Dubin, et al. (2007). "Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines." Nature **445**(7127): 541-545.
101. Mälkiä, A., R. Madrid, et al. (2007). "Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors." J Physiol **581**(Pt 1): 155-174.
102. Maratou, K., V. C. Wallace, et al. (2009). "Comparison of dorsal root ganglion gene expression in rat models of traumatic and HIV-associated neuropathic pain." Eur J Pain **13**(4): 387-398.
103. McKemy, D. D., W. M. Neuhauser, et al. (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." Nature **416**(6876): 52-58.
104. McNamara, C. R., J. Mandel-Brehm, et al. (2007). "TRPA1 mediates formalin-induced pain." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13525-13530.
105. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity". Nature **388** (6640): 394–7.
106. Modeér, T., G. Brunius, et al. (1992). "Phenytoin potentiates interleukin-1-induced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts." Br J Pharmacol **106**(3): 574-578.
107. Modeér, T., I. Anduren, et al. (1992). "Enhanced prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts isolated from patients treated with phenytoin." J Oral Pathol Med **21**(6): 251-255.
108. Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE 2005(272): re3.
109. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
110. Nagata, K., Duggan, A., et al. (2005). "Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing." J Neurosci **25**(16): 4052-4061.
111. Nash, T. P. (2005). "What use is pain?" Br J Anaesth **94**(2): 146-149.
112. Nassenstein, C., K. Kwong, et al. (2008). "Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs." J

- Physiol **586**(6): 1595-1604.
113. Nassini, R., M. Gees, et al. (2011). "Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation." Pain **152**(7): 1621-1631.
  114. Nassini, R., S. Materazzi, et al. (2010). "Transient receptor potential channels as novel drug targets in respiratory diseases." Curr Opin Investig Drugs **11**(5): 535-542.
  115. Nealen, M. L., M. S. Gold, et al. (2003). "TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat." J Neurophysiol **90**(1): 515-520.
  116. Nilius, B. and G. Owsianik (2011). "The transient receptor potential family of ion channels." Genome Biol **12**(3): 218.
  117. Obata, K., H. Yamanaka, et al. (2004). "Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats." Eur J Neurosci **20**(11): 2881-2895.
  118. Patapoutian, A., A. M. Peier, et al. (2003). "ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation." Nat Rev Neurosci **4**(7): 529-539.
  119. Pecze, L., K. Szabo, et al. (2008). "Human keratinocytes are vanilloid resistant." PLoS One **3**(10): e3419.
  120. Pedersen, S. F., G. Owsianik, et al. (2005). "TRP channels: an overview." Cell Calcium **38**(3-4): 233-252.
  121. Peier, A. M., A. Moqrich, et al. (2002). "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol." Cell **108**(5): 705-715.
  122. Pertusa, M., R. Madrid, et al. (2012). "N-glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons." J Biol Chem **287**(22): 18218-18229.
  123. Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Anthony-Samuel LaMantia, AS., White, L.E. (2007) "The Somatic Sensory System: Touch and Proprioception" y "Pain". En Neuroscience. Sunderland (EE.UU). Sinauer Associates.
  124. Raetz, C. R. and C. Whitfield (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins." Annu Rev Biochem **71**: 635-700.
  125. Ramon, Y., S. Behar, et al. (1984). "Gingival hyperplasia caused by

- nifedipine--a preliminary report." Int J Cardiol **5**(2): 195-206.
126. Ramsey, I. S., M. Delling, et al. (2006). "An introduction to TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 619-647.
127. Rateitschak-Pluss, E. M., A. Hefti, et al. (1983). "[Gingival hyperplasia from cyclosporin A medication]." SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd **93**(1): 57-65.
128. Rau, K. K., N. Jiang, et al. (2007). "Heat sensitization in skin and muscle nociceptors expressing distinct combinations of TRPV1 and TRPV2 protein." J Neurophysiol **97**(4): 2651-2662.
129. Reichling, D. B. and J. D. Levine (1997). "Heat transduction in rat sensory neurons by calcium-dependent activation of a cation channel." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 7006-7011.
130. Reife, R. A., R. A. Shapiro, et al. (1995). "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide is poorly recognized by molecular components of innate host defense in a mouse model of early inflammation." Infect Immun **63**(12): 4686-4694.
131. Rixe, O., W. Ortuzar, et al. (1996). "Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel." Biochem Pharmacol **52**(12): 1855-1865.
132. Robinson, I., B. Sargent, et al. (2012). "Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of Freund's Complete Adjuvant induced hypersensitivity in mice." Neurosci Lett **524**(2): 107-110.
133. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll". Proc Natl Acad Sci U S A **95** (2): 588–93.
134. Sano, M., Ohuchi, N., , Inoue, T., Tono, T., Tachikawa, T., Kizawa, T., Murakami, H. (2004) "Proliferative response to phenytoin and nifedipine in gingival fibroblasts cultured from humans with gingival fibromatosis". Fundamental & Clinical Pharmacology. **18** (4): 465–470.
135. Sawada, Y., H. Hosokawa, et al. (2007). "Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels." Brain Res **1160**: 39-46.
136. Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.



137. Seymour, R. A. and P. A. Heasman (1988). "Drugs and the periodontium." J Clin Periodontol **15**(1): 1-16.
138. Sittl, R., A. Lampert, et al. (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.
139. Sittl, R., R. W. Carr, et al. (2010). "Enhancement of axonal potassium conductance reduces nerve hyperexcitability in an in vitro model of oxaliplatin-induced acute neuropathy." Neurotoxicology **31**(6): 694-700.
140. Slavin, J. and J. Taylor (1987). "Cyclosporin, nifedipine, and gingival hyperplasia." Lancet **2**(8561): 739.
141. Smith, Q. T., M. M. Wilson, et al. (1983). "Microbial flora and clinical parameters in phenytoin associated gingival overgrowth." J Periodontal Res **18**(1): 56-66.
142. Sobaniec, H., W. Sobaniec, et al. (2007). "Antioxidant activity of blood serum and saliva in patients with periodontal disease treated due to epilepsy." Adv Med Sci **52** **Suppl 1**: 204-206.
143. Solé-Magdalena A, R. E., Menénez-Díaz I, Calavia MG, Cobo T, García-Suárez O, Pérez-Piñera P, De Carlos F, Cobo J, Vega JA. (2011). "Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins." Microscopy Research and Technique **74**(5): 457-463.
144. Son, A. R., Y. M. Yang, et al. (2009). "Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission." J Dent Res **88**(11): 1014-1019.
145. Stein, R. J., S. Santos, et al. (2004). "Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract." J Urol **172**(3): 1175-1178.
146. Story, G. M., A. M. Peier, et al. (2003). "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures." Cell **112**(6): 819-829.
147. Tai, C., S. Zhu, et al. (2008). "TRPA1: the central molecule for chemical sensing in pain pathway?" J Neurosci **28**(5): 1019-1021.
148. Takahashi, N. and Y. Mori (2011). "TRP Channels as Sensors and Signal Integrators of Redox Status Changes." Front Pharmacol **2**: 58.
149. Tétreault, P., M. A. Dansereau, et al. (2011). "Weight bearing evaluation in

- inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats." Physiol Behav **104**(3): 495-502.
150. Tordera M, F. F. (2000). "Eficacia y tolerancia del oxaliplatino en el cáncer colorrectal avanzado." Farmacia Hospitalaria **24**(5): 277-287.
151. Trevisani, M., J. Siemens, et al. (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.
152. Tsavaler, L., M. H. Shapero, et al. (2001). "Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins." Cancer Res **61**(9): 3760-3769.
153. Uchida, K. (2003). "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." Prog Lipid Res **42**(4): 318-343.
154. Uzel, M. I., A. Kantarci, et al. (2001). "Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth." J Periodontol **72**(7): 921-931.
155. Vaca, L. and D. L. Kunze (1995). "IP3-activated Ca<sup>2+</sup> channels in the plasma membrane of cultured vascular endothelial cells." Am J Physiol **269**(3 Pt 1): C733-738.
156. Vannier, B., X. Zhu, et al. (1998). "The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry." J Biol Chem **273**(15): 8675-8679.
157. Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
158. Voets, T. and B. Nilius (2003). "The pore of TRP channels: trivial or neglected?" Cell Calcium **33**(5-6): 299-302.
159. Vriens, J., G. Owsianik, et al. (2011). "TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat." Neuron **70**(3): 482-494.
160. Watanabe, H., J. Vriens, et al. (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.
161. Webster, R. G., K. L. Brain, et al. (2005). "Oxaliplatin induces hyperexcitability at motor and autonomic neuromuscular junctions through

- effects on voltage-gated sodium channels." Br J Pharmacol **146**(7): 1027-1039.
162. Wirkner, K., H. Hognestad, et al. (2005). "Characterization of rat transient receptor potential vanilloid 1 receptors lacking the N-glycosylation site N604." Neuroreport **16**(9): 997-1001.
163. Xiang, S., J. Fruehauf, et al. (2006). "Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals." Nat Biotechnol **24**(6): 697-702.
164. Xu, H., I. S. Ramsey, et al. (2002). "TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel." Nature **418**(6894): 181-186.
165. Xu, W. X., S. J. Kim, et al. (1997). "Role of actin microfilament in osmotic stretch-induced increase of voltage-operated calcium channel current in guinea-pig gastric myocytes." Pflugers Arch **434**(4): 502-504.
166. Zhao, M., K. Isami, et al. (2012). "Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice." Mol Pain **8**(1): 55.
167. Zurborg, S., B. Yurgionas, et al. (2007). "Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>." Nat Neurosci **10**(3): 277-279.