

Università degli Studi di Firenze



DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Cliniche:

Fisiopatologia Clinica e dell`Invecchiamento

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Rosanna Abbate

RUOLO DEI CANALI IONICI NELLE PATOLOGIE INFIAMMATORIE DOLOROSE

Settore scientifico disciplinare MED/09

Dottorando

Dott. Pamela Pedretti

Tutore

Prof. Pierangelo Geppetti

Coordinatore

Prof. Rosanna Abbate

2011/2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I RECETTORI CANALE TRP (TRANSIENT RECEPTORS POTENTIAL)	2
1.1.1 <i>Classificazione</i>	3
1.1.2 <i>Struttura</i>	7
1.1.3 <i>Meccanismi di attivazione</i>	8
1.2 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL ANKYRIN 1 (TRPA1)	9
1.2.1 <i>Il gene TRPA1</i>	10
1.2.2 <i>Struttura proteica del TRPA1</i>	11
1.2.3 <i>Caratteristiche strutturali</i>	11
1.2.4 <i>TRPA1 in cellule neuronali e non neuronali</i>	13
1.2.5 <i>Meccanismi di attivazione</i>	14
1.2.6 <i>Recettore TRPA1 e infiammazione</i>	18
1.2.7 <i>Agonisti del canale TRPA1</i>	20
1.2.8 <i>Antagonisti del canale TRPA1</i>	23
1.3 APARATO RESPIRATORIO	26
1.3.1 <i>Caratteristiche anatomiche dell'apparato respiratorio</i>	26
1.3.2 <i>Innervazione sensoriale dell'apparato respiratorio</i>	27
1.3.3 <i>Patologie a carico dell'apparato respiratorio a carattere flogistico, asma e BPCO</i>	29

1.3.4 <i>Il ruolo fisiopatologico del canale TRPA1 nell'apparato respiratorio</i>	30
1.4 NOCICEZIONE	32
1.4.1 <i>I neuroni sensitivi primaria</i>	34
1.4.2 <i>TRPA1 e dolore infiammatorio</i>	39
1.5 NEUROPATIA	40
1.5.1 <i>TRPA1 e dolore neuropatico</i>	41
1.5.2 <i>La neuropatia periferica indotta da chemioterapici (CIPN)</i>	42
1.5.3 <i>Ruolo dei transient receptor potential nella CIPN</i>	48
2. SCOPO DELLA TESI	54
3. MATERIALI E METODI	57
3.1 COLTURE CELLULARI	57
3.1.1 <i>IMR90</i>	57
3.1.2 <i>A549</i>	57
3.1.3 <i>SAEC</i>	57
3.1.4 <i>NCTC 2544</i>	58
3.1.5 <i>HEK293-TRPA1</i>	58
3.1.6 <i>HBSMc</i>	58
3.1.7 <i>CHO-mTRPA1</i>	59
3.2 RILASCIO DI IL-8	59
3.3 SAGGIO DI VITALITA'	59
3.4 ISOLAMENTO DEI NEURONI SENSITIVI PRIMARI	60

3.5 REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)	61
3.6 IMMUNOCITOCHIMICA	62
3.7 CALCIUM IMAGING	63
3.8 RELEASE DI NEUORPEPTIDI	64
3.9 ANIMALI	66
3.10 MODELLI DI NEUROPATIA DOLOROSA INDOTTA DAI CHEMIOTERAPICI	66
3.11 STUDI COMPORTAMENTALI	67
3.11.1 Test di valutazione dell'allodina meccanica (<i>Von frey hair test</i>)	67
3.11.2 Test di stimolaizione al freddo (<i>Cold stimulation</i>)	68
3.11.3 Iperalgesia chimica	68
3.12 ANALISI STATISTICA	69
4. RISULTATI	70
4.1 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE TRPA1 IN TESSUTI POLMONARI UMANI	70
4.3 L'ACROLEINA, il CSE e la CNM INDUCONO MOBILIZZAZIONE DI CALCIO INTRACELLULARE IN CELLULE EPITELIALI POLMONARI UMANE	72
4.4 NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA OXALIPLATINO	79
4.5 IPERALGESIA INDOTTA DA PACLITAXEL	83
5. DISCUSSIONE	88
6. CONCLUSIONI	94

8. APPENDICE

PUBBLICAZIONI

Pubblicazioni originali

Rassegne

Articoli di libri

1. INTRODUZIONE

Numerosi processi fisiologici fondamentali quali, ad esempio, la contrazione muscolare, la trasmissione, il rilascio di neuropeptidi, la trascrizione genica, i processi di proliferazione cellulare e i processi di morte cellulare (Berridge et al., 2000) sono rivestiti dall'azione ione calcio. Le conoscenze e l'interesse relativi ai processi che mediano l'ingresso di calcio intracellulare è cresciuto in seguito alla scoperta della superfamiglia dei canali "*transient receptor potential*" o TRP. Lo ione calcio è riconosciuto come attivatore di meccanismi proteici, calcio-dipendenti, che controllano eventi cellulari quali la regolazione della trascrizione genica, la proliferazione cellulare e l'induzione di meccanismi infiammatori. L'apparato respiratorio è caratterizzato da una densa rete di fibre sensitive distribuite dal naso ai piccoli bronchi. Un sottogruppo di tali fibre, sono caratterizzate dalla sintesi e rilascio dai terminali centrali e periferici di neuropeptidi pro-infiammatori che causano infiammazione neurogenica. L'attivazione di tali canali, nei neuroni sensitivi primari, a livello dell'apparato respiratorio, induce inoltre irritazione e risposte riflesse protettive. Studi condotti in modelli animali hanno dimostrato che l'infiammazione neurogenica, indotta da attivazione dei canali TRP (in particolare da TRPV1 e TRPA1), contribuisce ad una serie di patologie infiammatorie delle vie aeree, come asma e broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). Oltre alle patologie infiammatorie delle vie aeree, un'altra branca della medicina legata ad infiammazione e dolore comprende la neuropatia periferica indotta da chemioterapici (CIPN). La CIPN è il principale evento avverso che colpisce il 30-40% dei pazienti trattati ed è causata da una serie di farmaci antitumorali. Molti studi suggeriscono un ruolo chiave di alcuni membri della famiglia di canali ionici Transient Receptor Potential (TRP), tra cui il sottotipo anchirinico 1 (TRPA1) in modelli di dolore infiammatorio e neuropatico.

1.1 I RECETTORI CANALE TRP (TRANSIENT RECEPTORS POTENTIAL)

La superfamiglia dei *Transient Receptors Potential* (TRP) costituisce un eterogeneo ed ampio gruppo di recettori canale di membrana permeabili ai cationi. La prima proteina TRP, da cui prende il nome tutta la famiglia recettoriale, venne identificata trenta anni fa in uno studio relativo ai meccanismi di fototrasduzione nel moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*. Minke (Minke, 1977) evidenziò che nella *Drosophila* la trasduzione del segnale visivo si basava sull'attivazione di fotorecettori costituiti da un recettore di membrana accoppiato a proteina G, la rodopsina, la cui stimolazione determinava il reclutamento di una fosfolipasi C- β , responsabile di un influsso di ioni calcio (Ca^{2+}) attraverso un canale di membrana permeabile ai cationi, con conseguente formazione di una corrente transiente depolarizzante. In seguito, lo studio del potenziale di membrana in risposta a stimoli visivi ha permesso di identificare un ceppo mutante di *Drosophila* caratterizzato da un mancato ingresso di calcio durante il fenomeno di fototrasduzione. Successivamente venne identificato e clonato il gene *trp* codificante per la proteina canale di membrana responsabile della corrente transitoria di ioni calcio che si osserva nel fenomeno di fototrasduzione, da cui il nome di *transient receptor potential* (Minke, 1977; Montell et al., 1985).

Successivamente sono stati clonati numerosi altri tipi di recettori canale TRP, espressi sia nei vertebrati che negli invertebrati e l'argomento è diventato oggetto di grande interesse sia in campo fisiopatologico che farmacologico in quanto questa eterogenea famiglia di recettori sembra essere coinvolta in molti fenomeni biologici. Molti studi su tali recettori hanno dimostrato infatti che questi canali mediano molteplici reazioni nell'organismo. Cellule di lievito, ad esempio, utilizzano un sottotipo recettoriale dei canali TRP per percepire e rispondere alla condizione di ipertonicità dell'ambiente (Denis & Cyert, 2002; Zhou et al., 2003). I nematodi presentano canali TRP nei loro organi olfattivi per percepire ed evitare sostanze chimiche dannose (de Bono et al., 2002). Il maschio del topo utilizza un canale TRP sensibile ai feromoni per distinguere i maschi dalle femmine (Stowers et al., 2002). L'uomo, infine, utilizza canali TRP per percepire stimoli termici ed alcuni gusti come il dolce ed il salato (Zhang et al., 2003).

I canali TRP sono anche coinvolti nei processi di trasduzione di segnali sensoriali e di natura meccanica. Evidenze sempre più numerose indicano un ruolo

importante di alcuni di questi recettori nei fenomeni di trasduzione del segnale in neuroni sensitivi primari di tipo nocicettivo e quindi nella trasmissione del dolore (Levine et al., 1993).

1.1.1 Classificazione

Attualmente la superfamiglia di recettori TRP comprende 56 sottotipi recettoriali classificati in 7 famiglie (Figura 1). Tale classificazione si basa sull'omologia amminoacidica presente tra i differenti sottotipi recettoriali e non su analogie di selettività ionica o funzionalità, in quanto i recettori canale TRP sono in generale poco selettivi nella permeabilità ai cationi e rispondono a stimoli di diversa natura (ed in larga parte ancora non noti). E' per questo motivo che vengono definiti recettori polimodali (Vriens et al., 2004).

Le suddette 7 famiglie recettoriali comprendono: i recettori canale classici o canonici TRPC; i recettori canale per i vanilloidi TRPV; i recettori melastatinici TRPM; i recettori policistinici TRPP; i canali mucolipidici TRPML; i canali TRPN ed infine il recettore canale anchirinico o TRPA1 (Clapham et al., 2003a).

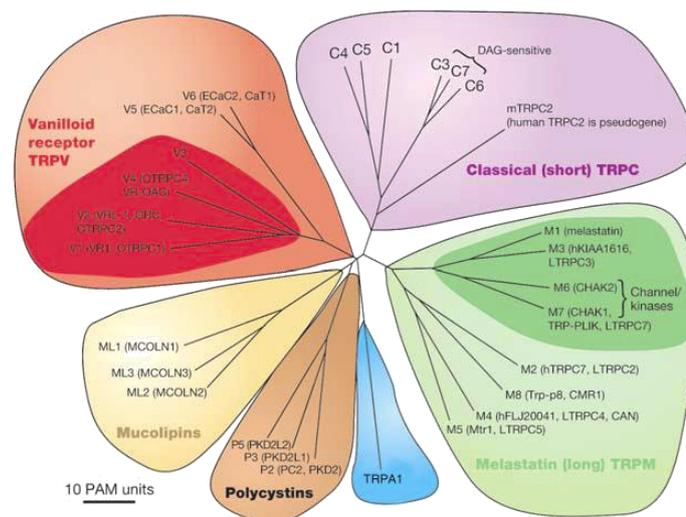


Figura 1. Classificazione dei recettori canale TRP. Clapham, 2003b.

I recettori TRP di mammifero, omologhi ai TRP identificati nella *Drosophila*, sono stati definiti canonici o TRPC. I TRPC sono canali permeabili ai cationi quali lo ione calcio e il sodio, ma la selettività per l'uno o l'altro catione varia notevolmente tra i membri di questa sottofamiglia. In generale, i membri della sottofamiglia dei TRPC sono considerati canali attivati in seguito a stimolazione della fosfolipasi C. Il meccanismo attraverso il quale si realizza tale attivazione è ancora controverso oggetto di studio.

La sottofamiglia dei recettori attivati dai vanilloidi o TRPV conta 6 diversi canali, tra i quali il più caratterizzato è il TRPV1, e costituisce il gruppo di recettori attualmente più conosciuto. Questi recettori vengono attivati da stimoli di varia natura chimica o fisica, che hanno la capacità di agire in modo additivo, o anche potenziante, sull'apertura del canale, conferendogli così il ruolo di integratore di differenti segnali. Per quanto riguarda i sottotipi TRPV5-TRPV6, gli unici canali TRPV non sensibili alle variazioni di temperatura, in condizioni fisiologiche presentano un'elevata selettività per lo ione calcio (Hoenderop et al., 2001), che li rende unici tra tutti i TRP, risultando direttamente attivabili da questo ione (Vennekens et al., 2000; Nilius et al., 2001). Solo in condizioni patologiche, in assenza di calcio extracellulare, diventano permeabili anche ai cationi monovalenti. Il recettore canale TRPV1, originariamente chiamato recettore vanilloide 1 (VR1), è il primo membro della famiglia TRP ad essere stato clonato (Caterina et al., 1997) ed è un canale ionico con maggior affinità per lo ione Ca^{2+} ($Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^{+}$). Tale recettore è presente in molti distretti del sistema nervoso centrale, in particolare nell'ipotalamo, nella corteccia cerebrale e nello striato (Sasamura et al., 1998), anche se il suo massimo livello di espressione si rileva nei neuroni sensitivi di piccolo e medio diametro dei gangli delle radici dorsali e dei gangli trigeminali e nodosi (Szallasi, 1995). Il recettore TRPV1 è presente inoltre in cellule di natura non neuronale tra cui macrofagi, linfociti, cellule della cornea e cheratinociti cutanei (Biro et al., 1998). I primi studi effettuati su questo canale hanno permesso di individuare principalmente tre stimoli capaci di attivare tale recettore: composti vanilloidi come capsaicina e resiniferatossina, calore moderato ($\geq 43^{\circ}C$) e pH extracellulare acido (< 6) (Bevan et al., 1994; Caterina et al., 1997). Il flusso cationico derivante dall'apertura del recettore canale TRPV1 determina una depolarizzazione della membrana cellulare che, una volta raggiunto il valore di soglia, genera un potenziale d'azione che si propaga lungo tutto il neurone sensitivo

fino al sistema nervoso centrale dove viene percepito come sensazione pungente o di dolore urente (Holzer, 1991). Esperimenti *in vivo* ed *in vitro* su topi *knock-out* (KO) per il gene del TRPV1 hanno confermato il ruolo fondamentale di questi canali nei fenomeni nocicettivi, infiammatori e termici causati dai composti vanilloidi e il loro contributo nella trasduzione di segnali nocicettivi acuti di tipo termico e nell'iperalgia a seguito di un danno tissutale (Caterina et al., 2000). Ulteriori studi hanno infatti dimostrato che mediatori dell'infiammazione come bradichinina, prostaglandina E₂ (PGE₂), ATP extracellulare, glutammato e il fattore di crescita neuronale NGF (Nerve Growth Factor), sensibilizzano indirettamente i canali TRPV1 (Tominaga et al., 2000; Calixto et al., 2005). L'elevata presenza del recettore TRPV1 a livello dei neuroni sensitivi primari ha fatto supporre l'esistenza di molecole endogene, con azione simile alla capsaicina, in grado di attivare questi neuroni. Diversi studi hanno portato all'individuazione di alcune molecole di particolare interesse. Fra queste ricordiamo l'anandamide (AEA), derivato arachidonico agonista dei recettori per i cannabinoidi (CB), e la N-arachidonoil dopamina, derivato della dopamina, che presenta una struttura analoga a quella dei vanilloidi (Huang, 2002). Oltre all'anandamide alcuni metaboliti prodotti dall'acido arachidonico (AA) nella via della lipossigenasi sono in grado di attivare direttamente il recettore per la capsaicina (Hwang et al., 2000), l'acido 12- e 15-(S)-idroperossieicosatetraenoico (12- e 15-(S)-HPETE), l'acido 5- e il 15-(S)-idrossieicosatetraenoico (5- e 15-(S)-HETE) e il leucotriene B₄, rappresentano i più potenti. Anche la bradichinina (BK), un importante mediatore infiammatorio ed algescico in grado di indurre la produzione dei prostanoidi (Thayer et al., 1988), sembra in grado di stimolare il TRPV1 attraverso la produzione di metaboliti dell'AA. Inoltre, la BK è in grado di potenziare la risposta al calore, di indurre depolarizzazione (Mizumura et al., 1997) e di evocare la secrezione di neuropeptidi, in neuroni capsaicino-sensibili, in modo proteinchinasi-dipendente (Kessler et al., 1999).

I membri della sottofamiglia dei recettori melastatinici o TRPM vengono ulteriormente suddivisi sulla base delle analogie strutturali in 3 sottogruppi: TRPM1/3, TRPM4/5 e TRPM6/7, con TRPM2 e TRPM8 che rappresentano una vera e propria classe distinta di canali. Strutturalmente presentano la peculiarità di non avere domini anchirinici nella subunità N-terminale. I TRPM presentano una permeabilità al calcio e magnesio altamente variabile; i canali TRPM4 e TRPM5

risultano invece impermeabili al calcio, mentre i TRPM6 e TRPM7 sono altamente permeabili agli ioni calcio e magnesio (Peier et al., 2002).

La sottofamiglia TRPP viene strutturalmente divisa in proteine PKD1-like (TRPP1-like) e proteine PKD2-like (TRPP2-like). I TRPP1 presentano una struttura differente da tutti gli altri TRP, con 11 domini transmembrana, mentre i TRPP2 presentano una struttura classica. I primi presentano inoltre un elevato numero di motivi policisteinici nei domini extracellulari la cui funzione rimane ancora sconosciuta.

I recettori mucolipidici o TRPML contano 3 sottotipi recettoriali espressi in un gran numero di cellule di diversi organi ed apparati. Questi recettori sembrano essere localizzati a livello nucleare ed avere come target di segnalazione gli endosomi/lisosomi (Nilius et al., 2007).

Il recettore TRPA1, strutturalmente presenta la peculiarità di avere numerosi domini anchirinici a livello della regione N-terminale ed è stato identificato inizialmente come recettore del freddo (Bandell et al., 2004). Attualmente l'interesse intorno a questo recettore è cresciuto enormemente in quanto sembra essere determinante in numerose funzioni fisiologiche e coinvolto in diverse patologie (Garcia-Anoveros & Nagata, 2007; Nilius et al., 2007). La co-espressione con il recettore TRPV1 a livello dei neuroni sensitivi primari ne suggerisce inoltre un importante ruolo nei processi di nocicezione.

I recettori TRPN che comprendono il sottotipo NONMPC presentano un'elevata analogia strutturale con il TRPA1. Il recettore NONMPC, espresso nella *Drosophila*, necessario per il volo e per la trasduzione di stimoli di natura meccanica, presenta infatti, numerosi domini anchirinici a livello della porzione N-terminale.

I recettori TRP sono quindi coinvolti in numerosi eventi fisiopatologici e la loro distribuzione appare vasta e complessa, tanto da risultare di difficile sintesi e schematizzazione (Clapham et al., 2003a). Di particolare interesse è l'espressione di alcuni sottotipi recettoriali, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1, a livello dei neuroni sensitivi primari (Levine et al., 2007) (Figura 2).

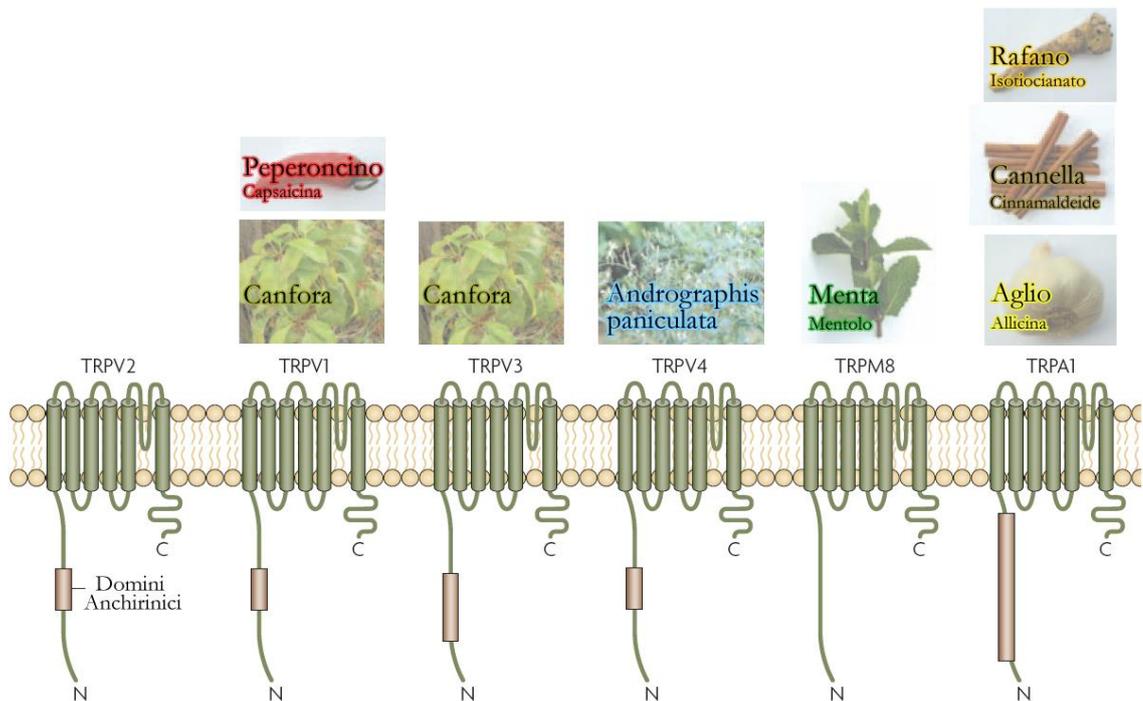


Figura 2. I canali TRP espressi nei neuroni sensitivi primari. Modificata da: Szallasi et al., 2007.

1.1.2 Struttura

I recettori TRP presentano una struttura tipica dei canali ionici di membrana, con una porzione idrofobica transmembrana costituita da 6 domini e due estremità citoplasmatiche. Tra il dominio 5 e 6 è presente una breve sequenza idrofobica, che attraversa solo parzialmente la membrana plasmatica, dando luogo ad un poro, attraverso il quale si ha il passaggio dei cationi. Entrambe le estremità, N-terminale e C-terminale, sono localizzate in sede citoplasmatica (Clapham et al., 2001). Le subunità si assemblano inoltre a formare omo ed etero-tetrameri dando luogo così a veri e propri canali ionici. La sequenza C-terminale è altamente conservata nei vari sottotipi, mentre la sequenza N-terminale è abbastanza variabile e va a caratterizzare i differenti sottotipi recettoriali. A livello di questa porzione sono generalmente presenti sequenze anchiriniche in numero variabile, importanti per l'interazione con altre proteine (Sedgwick et al., 1999) (Figura 3).

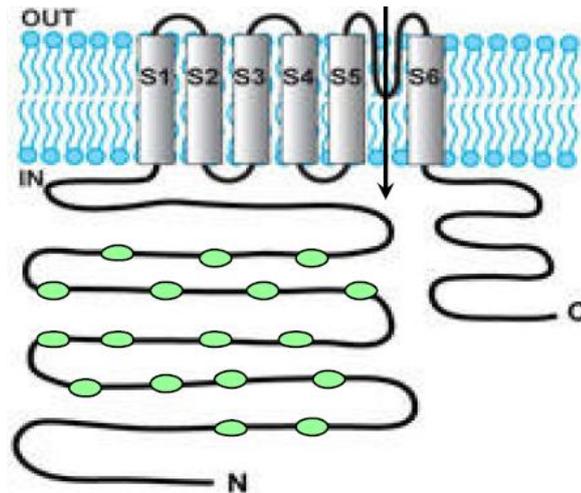


Figura 3. Struttura tipica dei recettori canale TRP caratterizzata da 6 domini transmembrana, una breve sequenza idrofobica tra i domini S5 e S6 che attraversa solo parzialmente la membrana, e con i domini N- e C-terminali intracitoplasmatici.

1.1.3 Meccanismi di attivazione

Le conoscenze attuali relative ai meccanismi di attivazione dei canali TRP risultano scarse e poco chiare e necessitano di ulteriori approfondimenti. La scarsa conoscenza dei ligandi endogeni ed esogeni che attivano i TRP giustifica tale lacuna scientifica. Sono state però formulate alcune teorie riguardo alla modalità di apertura di questi canali che indicano i TRP come *receptor-operated channels* (ROC) o come *store-operated channels* (SOC) (Clapham, 2003b; Janssen et al., 2007).

La teoria dei ROC, attualmente la più accreditata, prevede il reclutamento di recettori associati a proteine G o recettori con attività tirosin-chinasica che portano alla formazione di un secondo messaggero intracellulare, responsabile di una attivazione diretta dei canali TRP. Sebbene non si conosca l'identità di tale messaggero, è stato evidenziato come il fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP₂) sia capace di modulare l'apertura di alcuni di questi canali. Inoltre è stato osservato come questo possa avere effetti contrapposti a seconda del sottotipo recettoriale

considerato, inibendone (ad es. nei TRPV1) oppure incrementandone (ad es. nei TRPM7) l'attività. In questi casi il ruolo delle PLC- β o PLC- γ , attivate, rispettivamente, dai recettori associati a proteina G_q o dai recettori con attività tirosin-chinasica, risulta fondamentale, poiché l'idrolisi del PIP₂ ne determina una minore disponibilità nella membrana plasmatica. Tuttavia, l'azione del PIP₂ modula l'apertura di numerosi canali TRP, ma non tutti, e pertanto non rappresenta il meccanismo di attivazione comune di questa famiglia di canali.

Tra i recettori associati a proteine G o quelli ad attività tirosin-chinasica in grado di attivare indirettamente i canali TRP troviamo il recettore muscarinico (Jordt et al., 2004), il recettore istaminergico di tipo 1, i recettori per le purine, il recettore B2 per la bradichinina (Bautista et al., 2005) e i recettori PAR per le proteasi (Ossovskaya et al., 2004).

La teoria che identifica i canali TRP come SOC è ancora oggetto di studio a causa dei risultati controversi di alcuni esperimenti, ma non è stata del tutto scartata. Secondo questa teoria i TRP vengono attivati in seguito alla deplezione delle riserve intracellulari di Ca²⁺ per compensare la perdita dello ione e mantenere l'omeostasi cellulare. Secondo questo modello l'apertura dei canali TRP avviene tramite dei messaggeri "retrogradi" generati al momento dell'attivazione dei recettori canale presenti sul reticolo endoplasmatico (Parekh & Putney, 2005). Fino ad ora però non è stato identificato nessun messaggero retrogrado, rendendo incerta la dimostrazione di questa teoria. Infatti, secondo alcuni autori, molto probabilmente, i canali TRP non sono dei veri e propri SOC, ma, come altri canali permeabili al Ca²⁺, contribuiscono a mantenere costante i livelli intracellulari di tale ione (Clapham, 2003b).

1.2 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL ANKYRIN 1 (TRPA1)

Il canale TRPA1 è stato inizialmente identificato nei fibroblasti umani in coltura come una proteina transmembrana che presenta numerosi domini anchirinici, pertanto denominato ANKTM1 (*Ankyrin-like protein with transmembrane domains-1*) (Jaquemar et al., 1999). Originariamente venne classificato come appartenente ad un gruppo di proteine la cui espressione veniva soppressa nelle cellule trasformate (Schenker & Trueb, 1998). La successiva scoperta che in cellule eucariote, la

sovraespressione di questa proteina interferisce con la crescita cellulare (Jaquemar et al., 1999), aveva indotto a ritenere che questo recettore modulasse direttamente o indirettamente il ciclo cellulare. Successivamente, sulla base dell'omologia strutturale e funzionale, è stato riconosciuto come un nuovo sottotipo recettoriale appartenente alla famiglia TRP, da cui il nome *transient receptor potential ankyrin 1* (TRPA1).

In seguito, venne proposto che il canale TRPA1 funzionasse da recettore del freddo, in particolare si parlava di freddo nocivo, in quanto attivato da temperature inferiori ai 18°C (Story et al., 2003), che sono associate a sensazioni dolorifiche trasdotte da fibre nervose capsaicino-sensibili. Il meccanismo attraverso il quale il freddo attiva questo canale rimane ancora controverso e da chiarire (Reid, 2005), ma sembra correlato al fatto che le temperature fredde attivano l'ingresso di calcio nel neurone e questo aumento sembrerebbe determinare l'apertura del canale TRPA1 attraverso un meccanismo diretto operato dagli ioni calcio (Zurborg et al., 2007).

Ulteriori studi hanno portato all'identificazione di numerosi composti, per la maggior parte irritanti, capaci di attivare direttamente il TRPA1, suggerendo il coinvolgimento di tale canale nei fenomeni nocicettivi ed infiammatori. In particolare la dimostrazione che il TRPA1 è co-espresso con il TRPV1 in una sottopopolazione di neuroni capsaicino-sensibili dai quali partono fasci di fibre nervose (di tipo C e A δ) coinvolte nella trasduzione del dolore (Story et al., 2003), avvalorava questa ipotesi.

1.2.1 Il gene TRPA1

Il gene TRPA1 umano è composto da 27 esoni e si estende su 55.701 coppie di basi (bp) del cromosoma umano 8q13. E' stato trovato in molti organismi sia vertebrati (roditori, mammiferi) che invertebrati, (*Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*). Contrariamente ai mammiferi che contengono un unico gene TRPA1, altre classi del regno animale contengono più omologhi del TRPA1. Ad esempio ve ne sono 4 nel moscerino della frutta, 2 nel *Caenorhabditis elegans* (Nilius et al., 2012). Si ritiene che tutti gli animali contengano almeno un gene TRPA1 e che esista un legame evolutivo tra le varie specie elettrosensibili del TRPA1, particolarità che indica una sua conservazione per milioni di anni (Kang et al., 2010; Macpherson et al., 2010).

1.2.2 Struttura proteica del TRPA1

Il gene TRPA1 codifica una proteina costituita da 1100 amminoacidi con un peso di 120-130 kiloDalton. È molto probabile che il TRPA1 funzioni come un omotetramero composto da più proteine TRPA1 (Nilius *et al.*, 2011). La topologia strutturale del TRPA1 è simile ad altre proteine TRP e comprende sei segmenti transmembrana (S1-S6). Il sito permeabile agli ioni è localizzato tra i segmenti S5-S6 ed il primo ciclo extracellulare tra S1-S2 contiene due siti di glicosilazione. La lunga porzione NH₂-terminale contiene fino a 18 ripetizioni anchiriniche (ARD), composte da 33 aa, che sono coinvolte nelle interazioni tra proteine e danno elasticità al canale. Infatti, la delezione delle ARD influenza negativamente l'inserimento del canale nella membrana plasmatica (Nilius *et al.*, 2011; Nilius *et al.*, 2012). Nella porzione NH₂-terminale è presente inoltre un dominio caratterizzato da una struttura di tipo helix-turn-helix costituita da due α -eliche perpendicolari l'una all'altra e collegate tra di loro da una breve sequenza di 12 amminoacidi che permette al recettore di legare ioni calcio permettendo l'attivazione diretta del canale TRPA1 (Doerner *et al.*, 2007; Zurborg *et al.*, 2007).

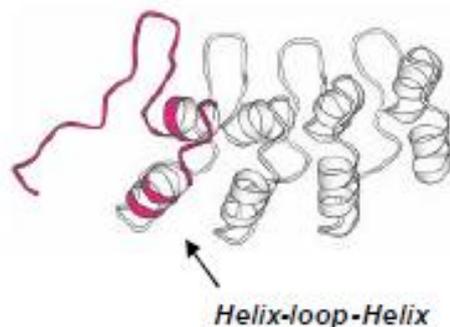


Figura 4. Struttura molecolare dei domini anchirinici.

1.2.3 Caratteristiche strutturali

Il canale TRPA1 umano è una proteina di membrana di grosse dimensioni formata da 1119 amminoacidi e codificata da un gene di circa 50 kilobasi, localizzato sul cromosoma 8. Analogamente agli altri recettori appartenenti alla famiglia TRP, il TRPA1 è funzionalmente un canale ionico poco selettivo, permeabile agli ioni

monovalenti e bivalenti, e, strutturalmente, presenta sei domini transmembrana, un loop idrofobico tra il quinto ed il sesto dominio, ed è organizzato in tetrameri a costituire un canale funzionante (Jan et al., 1992; MacKinnon, 1995). Le estremità N- e C-terminali della proteina sono situate entrambe nel versante citosolico (Jaquemar et al., 1999). A livello dell'estremità N-terminale sono presenti 18 domini anchirinici che caratterizzano questo sottotipo recettoriale. Questi domini sono regioni composte da 33 amminoacidi coinvolte nelle interazioni tra proteine, anche se recenti studi hanno ipotizzato (Howard et al., 2004; Sotomayor et al., 2005), e successivamente dimostrato (Lee et al., 2006), che conferiscono anche elasticità alle proteine. A livello dell'estremità N-terminale è presente un dominio a mano E-F (*E-F-hand*), che corrisponde ad una regione con struttura supersecondaria di tipo *helix-turn-helix* (Figura 3), presente in molte proteine che legano il calcio, come ad esempio la calmodulina. Questo dominio, infatti, è capace di legare ioni Ca^{2+} ed è formato da due α -eliche, perpendicolari l'una rispetto all'altra, collegate tra di loro da un breve loop (di solito di 12 amminoacidi). Recentemente è stato dimostrato che tale dominio è essenziale per l'attivazione diretta del canale TRPA1 operata dallo ione Ca^{2+} (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007).

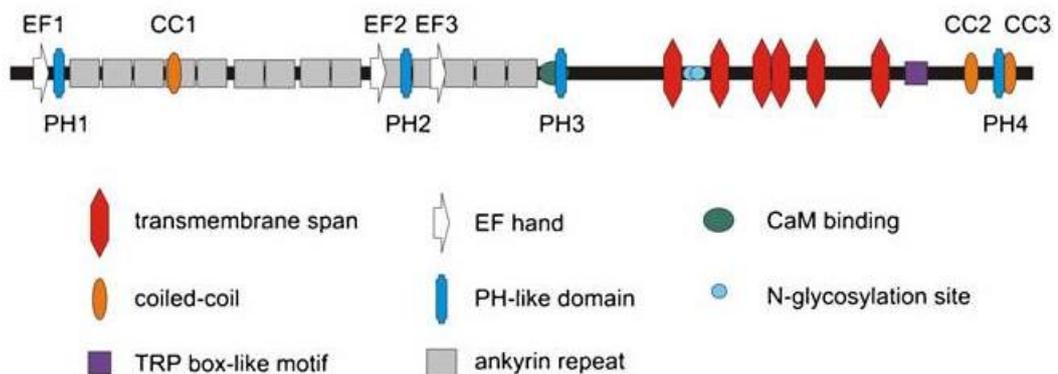


Figura 5. Principali siti legame strutturali funzionali del recettore canale TRPA1. La figura mostra i principali domini strutturali del canale TRPA1, importanti per la modulazione dell'attività del canale.

1.2.4 TRPA1 in cellule neuronali e non neuronali

La prima identificazione del recettore canale TRPA1 è stata effettuata in fibroblasti polmonari umani in cui è stata trovata una correlazione tra gli eventi di trasformazione oncogenica e l'alterazione dei livelli di espressione di tale recettore (Jaquemar et al., 1999). Per mezzo di analisi di Northern blot è stato infatti dimostrato come il RNA messaggero (mRNA) per il recettore TRPA1 sia presente nei fibroblasti polmonari umani in livelli molto bassi e del tutto assente in seguito a trasformazione oncogenica (Jaquemar et al., 1999). Gli unici distretti anatomici in cui sono presenti livelli significativi del recettore TRPA1 sono i gangli periferici che contengono i pirenofori dei neuroni sensitivi primari (Jordt et al., 2004; Kobayashi et al., 2005) e l'epitelio sensoriale dell'orecchio interno che trasduce stimoli di tipo meccanico (Nagata et al., 2005). Ulteriori studi di ibridazione *in situ* hanno rilevato l'espressione di tale recettore nei gangli delle radici dorsali, trigeminali, nodosi e giugulari, distretti in cui tale canale risulta espresso in una considerevole percentuale (circa il 30%) di neuroni nocicettivi di piccolo diametro che esprimono anche il canale TRPV1, attivato dalla capsicina e per questo definiti neuroni sensitivi capsaicino-sensibili (Story et al., 2003; Bautista et al., 2005). In particolare, l'espressione del canale TRPA1 è stata evidenziata soltanto nelle fibre nervose di tipo C, ma non in quelle di tipo A δ (Kobayashi et al., 2005). I neuroni sensitivi primari, insieme al recettore TRPA1 e TRPV1, esprimono altri 4 sottotipi recettoriali, TRPM8, TRPV2, TRPV3 e TRPV4 (Levine & Alessandri-haber, 2007) e rappresentano una classe di neuroni capaci di recepire stimoli periferici di varia natura (di tipo meccanico, chimico, termico o doloroso) e trasmettere il segnale direttamente al sistema nervoso centrale, contraendo sinapsi nel midollo spinale con interneuroni o neuroni sensitivi di secondo ordine. Il TRPM8, in particolare, si distingue dal canale TRPA1 in quanto risponde alle basse temperature comprese tra i 19°C ed i 24°C, quindi leggermente superiori a quelle in grado di attivare il TRPA1 (<18°C) (Story et al., 2003). Tuttavia, studi di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che il canale TRPM8 e TRPA1 non vengono mai co-espressi (Story et al., 2003; Bautista et al., 2005). A livello di tali fibre nervose, insieme al canale TRPV1, il recettore TRPA1 sembra partecipare ai processi infiammatori e alla trasmissione del dolore (Story et al. 2003).

Sebbene molti studi siano dedicati alla caratterizzazione funzionale del recettore TRPA1 a livello dei neuroni sensitivi primari, in cui è ormai ben definita la sua espressione, altrettanti studi sono rivolti alla individuazione e caratterizzazione di tale recettore in cellule non appartenenti ai distretti neuronali. Molti lavori definiscono infatti la presenza di questo recettore negli omogenati di numerosi altri tessuti, come ad esempio il distretto intestinale, lo stomaco, la muscolatura scheletrica, la vescica, il distretto polmonare e cardiaco, sebbene la presenza del trascritto genico non necessariamente implica la presenza della proteina attiva (Nozawa et al., 2008). Recentemente è stato definito un ruolo importante del canale TRPA1 nel tratto gastrointestinale che va dallo stomaco al colon. In particolare è stata individuata una elevata espressione di tale recettore nelle cellule enterocromaffini della mucosa intestinale, sia nell'uomo che nel ratto (Nozawa et al., 2008). Mediante studi *in vitro* ed *in vivo* è stata osservato come gli agonisti del recettore TRPA1 siano in grado di evocare contrazioni intestinali; in particolare l'attivazione del recettore TRPA1 determina influsso di calcio all'interno delle cellule enterocromaffini con conseguente rilascio di serotonina, un mediatore coinvolto nella modulazione dell'attività peristaltica (Nozawa et al., 2008). Ulteriori studi, mediante analisi immunistochemica, hanno individuato la presenza di questo recettore anche a livello dei cheratinociti della membrana basale dell'epidermide (Anand et al., 2008) anche se il ruolo non è stato bene definito, ma potrebbe controllare la secrezione di vari mediatori così come avviene come nelle cellule epiteliali dell'intestino. Infine, recenti studi hanno identificato la presenza del recettore TRPA1 nei distretti cerebrali, in particolare a livello delle arterie cerebrali, suggerendone un importante ruolo nell'attività vasomotoria (Earley et al., 2009).

1.2.5 Meccanismi di attivazione del recettore canale TRPA1

Il canale TRPA1 può essere attivato direttamente o indirettamente da numerosi stimoli di natura meccanica, termica e chimica, e pertanto viene definito *polimodale*. Come ricordato in precedenza, il recettore TRPA1 è stato identificato come sensore del freddo in quanto attivato da temperature inferiori ai 18°C che causano, infatti, una mobilitazione di calcio intracellulari nei neuroni sensitivi primari che esprimono questo recettore (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005).

Esperimenti funzionali condotti in cellule trasfettate con il gene che codifica per il recettore TRPA1 hanno evidenziato l'attivazione di questi canali in seguito ad esposizione alle basse temperature, confermando questa teoria (Bandell et al., 2004). Tuttavia i dati attualmente disponibili circa il ruolo di termosensore del recettore TRPA1 risultano ancora controversi. Infatti, altri studi effettuati su cellule umane trasfettate con il gene TRPA1 eterologo, di ratto o umano, non hanno evidenziato alcuna attivazione in seguito all'esposizione alle basse temperature, anche inferiori ai 5°C (Jordt et al., 2004; Nagata et al., 2005). Inoltre, nei gangli sensitivi primari isolati da topi KO per il recettore è stata evidenziata una normale distribuzione dei neuroni attivati dal freddo sensibili ed insensibili all'azione del mentolo; esperimenti *in vivo* sugli stessi animali hanno mostrato una risposta alle basse temperature analoga a quella osservata nei topi *wild type* (Bautista et al., 2006). L'evidenza che solo l'icilina, agonista aspecifico che attiva sia il TRPA1 che il TRPM8 (McKemy et al., 2002), riesca a provocare una sensazione rinfrescante se applicata alla cute (Story et al., 2003; Nagata et al., 2005), a differenza degli agonisti TRPA1 selettivi che provocano una sensazione di bruciore urente caratteristica del reclutamento delle fibre nervose capsaicino-sensibili (Bandell et al., 2004), rende ulteriormente difficoltosa ed incerta l'interpretazione dei dati. Recentemente è stato ipotizzato che l'attivazione del recettore ad opera delle basse temperature sia un effetto indiretto dovuto alla mobilitazione del calcio intracellulare che si verifica durante il processo di raffreddamento (Zurborg et al., 2007).

Numerosi sono gli agonisti identificati da estratti di piante, in grado di attivare il canale TRPA1. Molti di questi sono derivati dell'isotiocianato e costituiscono i principali ingredienti piccanti del wasabi, della senape, dei cavoletti di Bruxelles, dei capperi (Jordt et al., 2004); inoltre la cinnamaldeide, estratta dalla cannella (*Cinnamomum*), l'allicina, contenuta nell'aglio, l'acroleina, un'aldeide prodotta nella via metabolica della ciclofosfamide e contenuta nell'estratto del fumo di sigaretta, il gingerolo, estratto dal ginger, l'eugenolo, presente nei chiodi di garofano ed il Δ -9-tetraidrocannabinolo (THC), estratto dalla marijuana (Calixto et al., 2005), sono tutti agonisti naturali del canale. Studi recenti hanno inoltre evidenziato come l'acqua ossigenata (H₂O₂) (Sawada et al., 2008) ed alcuni metaboliti dello stress ossidativo, come il 4-idrossi-2-nonenale (4-HNE) (Trevisani et al., 2007), prodotti intermedi generati durante i processi infiammatori, come prostaglandine e isoprostani-ciclopentenoni (Materazzi et al., 2008), siano in grado di

attivare direttamente il canale TRPA1. L'icilina invece è il primo composto di sintesi identificato come agonista del canale TRPA1, anche se non selettivo in quanto agisce anche sul TRPM8. Il meccanismo con cui tali agonisti riescano ad attivare questi recettori, però, non è stato ancora del tutto chiarito. Il fatto che molte di queste molecole siano scarsamente idrofile ed estremamente lente nell'attivazione del canale (da qualche secondo fino a qualche minuto) ha fatto supporre che sia necessario il loro passaggio attraverso il doppio strato lipidico della membrana plasmatica, al fine di interagire direttamente o indirettamente con il recettore TRPA1. Molti agonisti esogeni ed endogeni del recettore TRPA1, come l'allile isotiocianato, la cinnamaldeide, l'allicina (Calixto et al., 2005), l'acroleina (Bautista et al., 2006) o la formaldeide (McNamara et al., 2007), presentano un doppio legame α,β -insaturo, la cui presenza è stata dimostrata fondamentale per l'interazione diretta agonista-recettore. Queste molecole, per lo più aldeidi α,β -insature, possiedono un atomo di carbonio o di zolfo elettrofilo in grado di reagire con il gruppo nucleofilo di una cisteina, una lisina o un'istidina (Aldini et al., 2006; Dalle-Donne et al., 2006) presenti nelle catene laterali del recettore TRPA1. Questa reazione, che prende il nome di *Michael-addition*, promuove l'attivazione del recettore attraverso un'inusuale modificazione covalente di alcuni amminoacidi presenti sulla porzione N-terminale (Hinman et al., 2006; Trevisani et al., 2007). In particolare, è stato evidenziato il ruolo chiave di tre cisteine ed una lisina che formano un legame covalente con il gruppo elettrofilo dell'agonista, determinando l'apertura del canale. La sostituzione di queste cisteine infatti rende il canale insensibile all'azione di tali agonisti (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007; Trevisani et al., 2007).

Analogamente ad altri canali TRP, anche il TRPA1 viene attivato o modulato da composti endogeni capaci di stimolare la via della fosfolipasi C (PLC) o della protein chinasi A (PKA) (Clapham, 2003b; Wang et al., 2008). Tra questi troviamo la bradichinina (BK), che rappresenta uno dei più importanti mediatori dell'infiammazione. La BK è in grado di eccitare direttamente i nocicettori dei gangli delle radici dorsali provocando dolore sia nell'uomo che negli animali (Levine et al., 1993; Couture et al., 2001). Alcuni studi hanno mostrato infatti che la BK sensibilizza il canale TRPV1, abbassandone la soglia termica di attivazione in seguito all'attivazione della PLC (Cesare et al., 1999; Premkumar et al., 2000). Tuttavia, non è ancora chiaro il meccanismo attraverso il quale il recettore TRPA1 contribuisce all'eccitazione o sensibilizzazione dei nocicettori indotta dalla BK

(Hardie, 2003). La BK agisce su due recettori, B1R e B2R, anche se la maggior parte delle sue azioni fisiopatologiche coinvolge solo B2R (Farmer et al., 1992; Hall, 1992). Quest'ultimo è un recettore accoppiato a proteine G capaci di stimolare le vie della PLC o dell'adenilato ciclasi/cAMP che portano rispettivamente all'attivazione della protein chinasi C (PKC) e della PKA. In particolare, la PLC e la PKA modulano l'attività del recettore TRPA1 con meccanismi non ancora del tutto chiari (Wang et al., 2008) (Figura 4).

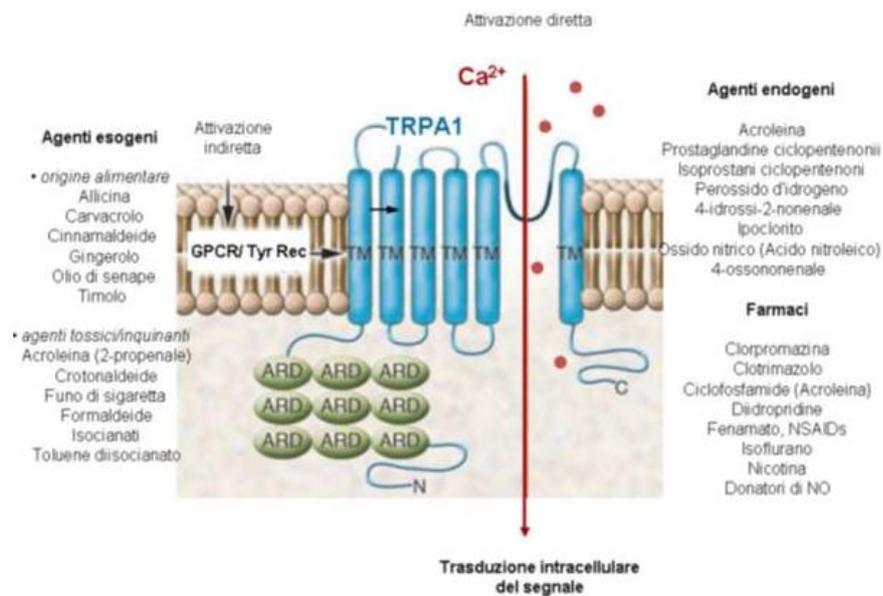


Figura 6. Meccanismi di attivazione ed attivatori del canale TRPA1. Il canale TRPA1 può essere attivato, sia direttamente che indirettamente, da un'ampia varietà di agenti esogeni ed endogeni che inducono un flusso di cationi, in particolare ioni Ca^{2+} , attraverso la membrana cellulare. Anche alcuni farmaci, o loro metaboliti, sono in grado di attivare o modulare l'attività del canale TRPA1.

Come sottolineato in precedenza, il canale TRPA1 presenta numerosi domini anchirini, analogamente al canale TRPN1 che è espresso solo negli invertebrati ed ha il ruolo di meccanocettore (Walker et al., 2000; Sidi et al., 2003). La presenza di queste analogie strutturali ha fatto quindi ipotizzare un ruolo del canale TRPA1 nella trasduzione di stimoli meccanici. Alcuni studi infatti sostengono che tale recettore espresso nelle stereocilia delle cellule pilifere dell'orecchio interno sia coinvolto nei meccanismi di trasduzione dei segnali meccanici contribuendo alla formazione di un canale complesso (Corey et al., 2004; Nagata et al., 2005). La questione rimane tuttavia ancora oggetto di dibattito in quanto altri studi sembrerebbero smentire il

ruolo di meccanosensore del recettore TRPA1 (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006). Questi risultati, apparentemente contraddittori, troverebbero una spiegazione comune nell'ipotesi che il canale TRPA1 sia importante, ma non essenziale, nella formazione di un complesso organo deputato alla trasduzione di stimoli di natura meccanica. Questa ipotesi è avvalorata da un lavoro recente che ha dimostrato il ruolo importante di questo recettore nell'iperalgia meccanica (Petrus et al., 2007).

1.2.6 Recettore TRPA1 e infiammazione

Il rilascio di neuropeptidi dai terminali periferici dei neuroni sensitivi primari produce una serie di risposte infiammatorie complessivamente definite “infiammazione neurogena” (Geppetti et al., 1995). I neurotrasmettitori rilasciati dai neuroni sensitivi primari in seguito ad attivazione, sono prevalentemente di natura peptidica: il calcitonin gene-related peptide (CGRP), e le tachichinine come la sostanza P (SP) e la neurochinina A (NKA) (Regoli et al., 1994). Questi peptidi sono prodotti a livello del pirenoforo e successivamente trasportati nei terminali centrali (corni dorsali del midollo spinale e allungato) e nei terminali periferici, dove vengono rilasciati in seguito ad un'eccitazione neuronale. La SP e la NKA rilasciate dai neuroni fanno parte della famiglia delle tachichinine ed agiscono su specifici recettori per le neurochinine (NK) accoppiati a proteine G. I recettori per le tachichinine sono espressi in numerosi tipi di cellule: muscolari lisce, epiteliali, endoteliali, nelle cellule ghiandolari esocrine e nei neuroni centrali e periferici. Inoltre, la loro presenza è stata evidenziata anche a livello dell'encefalo, del midollo spinale, dell'intestino e dell'apparato respiratorio. L'azione delle tachichinine ha un effetto predominante di natura proinfiammatoria rilevabile come aumento locale del flusso ematico (Piedimonte et al., 1993), stravasamento di plasma (Bowden et al., 1994) ed adesione di neutrofili alla parete endoteliale (Baluk et al., 1995). Il CGRP invece è un polipeptide di 37 amminoacidi che interagisce con recettori associati a proteine di tipo G_s che attivano l'adenilato ciclasi, con il conseguente aumento dei livelli intracellulari di adenosin-monofosfato ciclico (cAMP). Queste sostanze infatti hanno come bersaglio le cellule del sistema immunitario, le cellule della muscolatura liscia vascolare ed i mastociti con il risultato complessivo di generare un processo

infiammatorio. Gli effetti locali più evidenti di questi fenomeni flogistici sono la presenza di arrossamento e calore, gonfiore ed ipersensibilità rispettivamente dovuti alla vasodilatazione, allo stravasamento di plasma ed all'alterazione dell'eccitabilità di membrana di alcuni neuroni sensitivi (Holzer, 1988; Geppetti et al., 1993). Molti stimoli di natura chimica e fisica sono in grado di provocare il rilascio dei neurotrasmettitori peptidici da parte dei neuroni capsaicino-sensibili. Tra questi sono stati identificati la bradichinina (BK), gli agonisti dei recettori attivati da proteasi (PAR), l'istamina, la serotonina, l'adenosin-trifosfato (ATP), la prostaglandina E₂ (PGE₂), i protoni extracellulari, i mezzi ipertonici ed infine il calore (Richardson et al., 2002). Il rilascio di CGRP dalle terminazioni periferiche dei neuroni afferenti primari ricopre un ruolo molto importante nell'infiammazione neurogena; il CGRP viene infatti considerato il principale mediatore della vasodilatazione che caratterizza tale fenomeno infiammatorio (Figura 7).

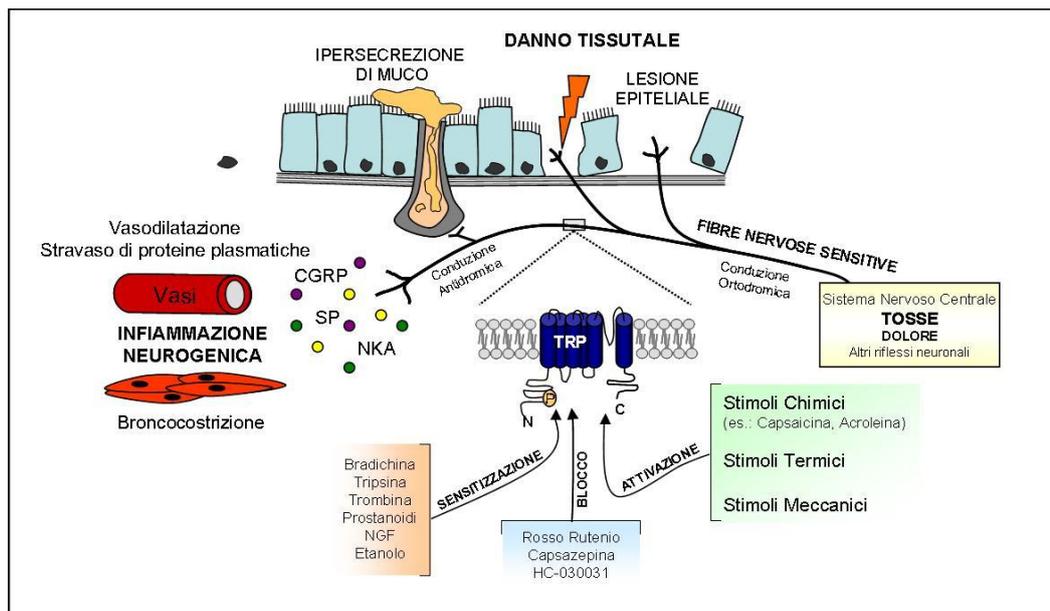


Figura 7. Infiammazione neurogena. Modificata da: Geppetti et al., 2007.

L'infiammazione neurogena può essere indotta o inibita dall'attivazione di numerose proteine recettoriali o dall'attività di canali ionici espressi sulla membrana dei terminali periferici dei nocicettori (Schaible et al., 2005). Tra le strutture molecolari ad attività eccitatoria, i recettori canale TRP rappresentano la famiglia più vasta ed eterogenea fino ad oggi conosciuta.

1.2.7 Agonisti del canale TRPA1

L'icilina è il primo agonista sintetico in grado di attivare i canali TRPA1 (Calixto et al., 2005). Sono molte invece le sostanze estratte da piante e gli irritanti ambientali, capaci di attivare questo canale e quasi tutte sono molecole altamente elettrofile che presentano gruppi aldeidici α,β -insaturi (Figura 6). La famiglia di agonisti più numerosa comprende i composti derivati dell'isotiocianato (Jordt et al., 2004; Calixto et al., 2005). Tra questi, l'allil isotiocianato è il composto maggiormente presente nelle piante del genere *Brassica* e costituisce il principio pungente dell'olio di senape (Calixto et al., 2005). L'applicazione di olio di senape sulla cute attiva le terminazioni sensitive periferiche producendo una sensazione dolorosa di bruciore, infiammazione ed ipersensibilità agli stimoli meccanici e termici (Jiang et al., 1998). L'olio di senape, infatti, agisce sugli stessi neuroni sensitivi primari che vengono stimolati anche dalla capsaicina, causando in tal modo il rilascio di peptidi pro-infiammatori che producono vasodilatazione ed infiammazione locale (Lembeck et al., 1979; Louis et al., 1989). Esperimenti su topi KO per il recettore TRPV1 ma esprimenti normali livelli di recettore TRPA1, hanno mostrato di mantenere la sensibilità all'olio di senape, evidenziando un'azione selettiva verso il canale TRPA1 (Caterina et al., 2000).

Le piante appartenenti al genere *Allium* contengono una serie di molecole organiche a base di zolfo responsabili del loro tipico sapore pungente ed effetto lacrimogeno. Una di queste sostanze, l'allicina, è prodotta da una reazione chimica attivata dalla rottura dell'aglio e catalizzata dall'enzima alliinasi (Amagase et al., 2001). In soluzione acquosa l'allicina è molto instabile e quindi viene rapidamente convertita in composti più stabili come diallil sulfide (DAS), diallil disulfide (DADS) e diallil trisulfide (DATS) (Amagase et al., 2001; Block, 1985). Per molti secoli l'aglio è stato utilizzato per combattere patologie come l'ipertensione, l'ipercolesterolemia e la trombosi (Brace, 2002). Tuttavia può provocare anche effetti avversi come irritazione cutanea, edema e dermatiti allergiche da contatto (Joseph et al., 1989). In soluzione acquosa, l'allicina e gli altri derivati sono composti molto reattivi capaci di inibire enzimi, modificare acidi nucleici ed alterare la fluidità di membrana (Bautista et al., 2005). Studi recenti hanno dimostrato inoltre come

l'allicina e il DADS siano capaci di eccitare i neuroni capsaicino-sensibili tramite l'interazione con i canali TRPA1 (Bautista et al., 2005; Macpherson et al., 2005).

L'olio di cannella viene ottenuto dalle foglie e dalla corteccia di piante del genere *Cinnamomum* e presenta un caratteristico sapore dolce e piccante. Anche quest'olio è in grado di eccitare i neuroni sensitivi primari principalmente tramite la componente aldeidica, o cinnamaldeide. Esperimenti *in vitro*, su cellule trasfettate con il recettore TRPA1, hanno mostrato una consistente corrente in ingresso di ioni Ca^{2+} in seguito alla stimolazione con cinnamaldeide; gli stessi esperimenti effettuati su cellule trasfettate con TRPV1, TRPV4 o TRPM8 invece non hanno mostrato nessuna risposta cellulare, evidenziando così l'effetto agonista selettivo della cinnamaldeide sui canali TRPA1 (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004).

Molteplici composti volatili sono in grado di attivare le terminazioni sensitive primarie nelle vie aeree, inducendo infiammazione neurogenica o contribuendo ad aggravare la tosse cronica e l'asma (Handzel, 2000; Leikauf, 2002). Uno di questi composti irritanti è l'acroleina (2-propenale), un'aldeide α,β -insatura altamente tossica presente nei gas lacrimogeni, negli scarichi delle auto e nel fumo prodotto dagli incendi boschivi e dalla combustione del tabacco (Hales et al., 1988; Hales et al., 1992). Inoltre, è prodotta nel metabolismo di alcuni agenti chemioterapici comunemente utilizzati nel trattamento del cancro, dell'artrite reumatoide, della sclerosi multipla e del lupus, quali il ciclofosfamide e l'ifosfamide (Fleming, 1997; Nicol, 2002). L'acroleina può provocare apnea, tosse, ostruzione delle vie aeree e secrezione di muco (Ghilarducci et al., 1995), nonché aumento della permeabilità vascolare e fuoriuscita di proteine plasmatiche (Geppetti et al., 1993). Questa aldeide agisce sulle fibre nervose sensitive primarie e, grazie alla presenza del doppio legame α,β -insaturo, è in grado di attivare selettivamente il canale TRPA1 (Bautista et al., 2006).

Anche la formaldeide, aldeide α,β -insatura contenuta nella formalina, è in grado di attivare il canale TRPA1 (McNamara et al., 2007) e di indurre dolore in seguito all'eccitazione dei neuroni nocicettivi. Infatti, la formalina viene utilizzata negli esperimenti *in vivo* come modello per indurre dolore, confermando in tal modo il ruolo fondamentale dei TRPA1 nella trasduzione dei processi nocicettivi (McNamara et al., 2007).

Il 4-HNE ed i lipidi correlati, 4-oxo-2-nonenale (4-ONE) e 4-idrossiesanale (4-HHE), sono i metaboliti della perossidazione dei lipidi e risultano altamente

reattivi. In particolare il 4-HNE è la specie maggiormente abbondante e reattiva, generata tramite la perossidazione di acidi grassi ω -6 polinsaturi, come l'acido linoleico e l'acido arachidonico (Benedetti et al., 1980; Esterbauer et al., 1991). Essendo un aldeide α,β -insatura, inoltre, è capace di formare un legame covalente con residui di lisina, cisteina ed istidina (Uchida et al., 2003). Con un meccanismo simile a quello osservato per la cinnamaldeide e le altri aldeidi α,β -insature è in grado quindi di attivare il canale TRPA1 e di indurre dolore (Trevisani et al., 2007).

L' H_2O_2 , in condizioni fisiologiche, viene prodotta all'interno dei mitocondri durante la fosforilazione ossidativa, ma in condizioni patologiche è capace di attivare, come le altre specie reattive dell'ossigeno (ROS), una sottopopolazione di neuroni capsaicino-sensibili, causando dolore (Stahl et al., 1993; Ruan et al., 2005). L'azione diretta su questi neuroni è confermata anche dal fatto che, quando viene applicata sulla cute lesa, provoca un dolore acuto urente o un'irritazione caratteristica del reclutamento delle fibre nervose nocicettive C o A δ (Watt et al., 2004). Anche il meccanismo d'azione con cui agisce l' H_2O_2 consiste nella modificazione della catena laterale di alcune cisteine presenti nel TRPA1, come avviene per le altre aldeidi α,β -insature. L'attivazione del canale, però, in questo caso non è dovuta alla formazione di un legame covalente tra le cisteine e l'agonista, bensì all'ossidazione dei residui delle cisteine ad opera del H_2O_2 (Poole et al., 2004; Sawada et al., 2008).

Lavori recenti hanno evidenziato il ruolo di alcuni composti endogeni nell'attivazione diretta dei canali TRPA1. Tra questi le prostaglandine (PG) (Materazzi et al., 2008) che sono identificate come un gruppo di molecole bioattive appartenenti alla famiglia dei prostanoidi della quale fanno parte anche la prostaciclina (PGI₂) ed il trombossano (A₂). In condizioni fisiologiche i prostanoidi vengono costantemente sintetizzati e rivestono un ruolo importante nella regolazione delle funzioni svolte dalle piastrine ed in organi come i reni e lo stomaco (Funk, 2001). In altri tessuti, invece, normalmente si rilevano bassi livelli di prostanoidi, tuttavia durante un processo flogistico si ha un notevole incremento della produzione di queste molecole (Tilley et al., 2001). Un'inflammatione periferica, infatti, promuove la sintesi di prostanoidi sia a livello locale che centrale (Dantzer et al., 1998; Dirig & Yaksh, 1999). La caratteristica comune delle prostaglandine ciclopentenoni e degli isoprostani ciclopentenoni, metaboliti intermedi del processo infiammatorio, è la presenza di almeno un gruppo carbonile α,β -insaturo, altamente reattivo, all'interno dell'anello ciclopentenonico. Tale gruppo di molecole è capace di

formare addotti con gruppi nucleofili come quelli sulfidrilici dei residui delle cisteine presenti nel glutatione ridotto (GSH) o nelle proteine, tramite la reazione di *Michael addition* (Straus et al., 2001) e quindi attivare direttamente il canale TRPA1 (Materazzi et al., 2008; Taylor-Clark et al., 2008).

1.2.8 Antagonisti del canale TRPA1

A seguito del ruolo chiave del TRPA1 nella trasmissione del dolore e nell'infiammazione, numerosi gruppi di ricerca e numerose aziende farmaceutiche hanno incentrato la loro attenzione sullo sviluppo di nuovi composti con azione antagonista per tale recettore (Fig. 11). Tra i primi antagonisti non selettivi per tale recettore identificati troviamo il rosso rutenio e la gentamicina, molecole ad attività calcio-antagonista, che agiscono bloccando il poro del canale TRPA1, differendo invece da altri antagonisti aspecifici, quali *l'amiloride* e il gadolinio, che bloccano il canale legandosi invece ad un sito extra-cellulare esterno al poro (Nagata *et al.*, 2005). Tuttavia ciascuno di questi antagonisti è in grado di bloccare anche altri membri della famiglia dei TRP, così come altri canali ionici.

Il primo antagonista selettivo TRPA1 ad essere stato identificato è un prodotto di sintesi della Hydra Biosciences, HC-030031 (McNamara *et al.*, 2007), il cui utilizzo è stato fondamentale per identificare il ruolo di questo recettore nel dolore ed *in primis* nel dolore infiammatorio. Nello studio del 2007, infatti, questa molecola è stata fondamentale per identificare il ruolo del TRPA1 nella prima e nella seconda fase della risposta indotta dalla formalina, rispettivamente nocicettiva acuta e infiammatoria (McNamara *et al.*, 2007). Successivi studi hanno dimostrato che HC-030031 riduce la risposta nocicettiva a livello somatico e viscerale (Kerstein *et al.*, 2009) e l'iperalgia meccanica indotta da BK (Petrus *et al.*, 2007). Ad oggi HC-030031 costituisce uno dei principali composti utilizzati negli studi sperimentali volti ad identificare il coinvolgimento del TRPA1 in condizioni fisiologiche e patologiche, in quanto potente e selettivo.

Successivamente, sono stati sintetizzati ed identificati altri antagonisti selettivi per il canale TRPA1, tra cui AP18 (Petrus *et al.*, 2007) e Chembridge5861528 (Wei *et al.*, 2009). AP18, un'ossima derivata dalla cinnamaldeide, è una piccola molecola che agisce come inibitore competitivo legandosi al sito attivo del TRPA1. L'attività analgesica di AP18 è stata valutata in

modelli *in vivo* di infiammazione, indotta da somministrazione di adiuvante completo di Freud (CFA), e di iperalgesia meccanica indotta da somministrazione intraplantare di BK (Petrus *et al.*, 2007). È stato dimostrato che AP18 inibisce selettivamente sia il recettore TRPA1 murino che umano.

Il Chembridge5861528 è un analogo sintetico di HC-030031 utilizzato per la prima volta in un modello di dolore neuropatico associato a diabete. In questo modello, tale molecola ha inibito l'iperlgesia meccanica, dimostrando anche che il canale TRPA1 è coinvolto in tale evento patologico (Wei *et al.*, 2009).

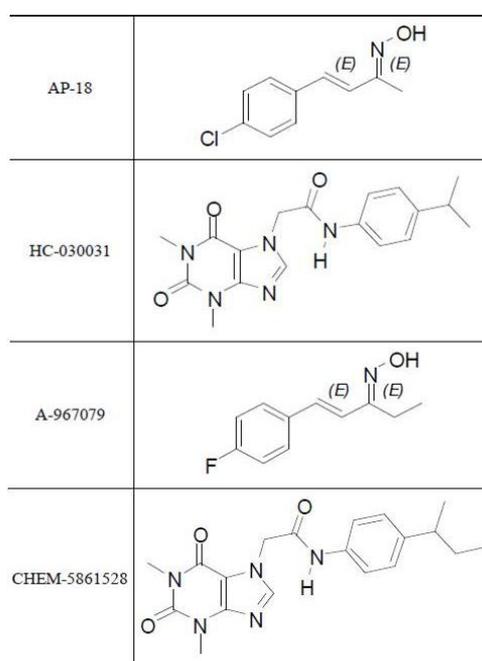


Figura 8. Struttura chimica di alcuni antagonisti sintetici del canale TRPA1. (*TRPA1 as an Analgesic Target*. The Open Drug Discovery Journal 2010)

Recentemente la Abbott ha identificato una nuova molecola, A-967079, composto che sebbene sia altamente reattivo non possiede proprietà di scavenger (Chen *et al.*, 2011). Tale antagonista, è risultato piuttosto potente e ha evidenziato che il blocco del recettore TRPA1, sia a livello centrale che periferico, non altera la percezione della temperatura (Chen *et al.*, 2011), un evento molto importante per lo sviluppo clinico di nuovi antagonisti TRPA1.

Esistono anche una serie di composti naturali che hanno effetti inibitori sul canale TRPA1. Tra questi troviamo la canfora, sostanza aromatica cristallina estratta dal legno del *Laurus Camphora*, che è usata come medicamento topico in caso di irritazioni cutanee e pruriti. Queste sue proprietà ancora non trovano una precisa spiegazione molecolare, però studi *in vitro* su colture primarie di neuroni sensitivi primari dei gangli delle radici dorsali hanno evidenziato un'azione da agonista nei confronti del TRPV1 mentre un'azione antagonista verso il TRPA1 (Xu *et al.*, 2005).

1.3 APPARATO RESPIRATORIO

1.3.1 Caratteristiche anatomiche dell'apparato respiratorio

L'apparato respiratorio è costituito da numerose strutture, la cui funzione principale è quella di fornire all'organismo l'ossigeno dell'aria atmosferica e di eliminare l'eccesso di anidride carbonica presente nel sangue.

I bronchi principali del polmone destro e sinistro si originano nel mediastino, alla biforcazione della trachea. Ogni polmone è organizzato attorno al suo sistema di vie aeree, definito albero bronchiale. Con la progressiva ramificazione dei bronchi le vie aeree subiscono modificazioni graduali dall'aspetto istologico tipico dei bronchi a quello dei bronchioli. Questi ultimi conservano l'organizzazione radiale dei tratti soprastanti, ma non sono più rivestiti internamente da un epitelio di tipo laringobronchiale, non hanno cartilagine, nè ghiandole, nè una tonaca muscolare continua. Presentano invece un epitelio prismatico in cui un unico tipo di cellula secernente sostituisce le cellule mucose, e un aumento proporzionale dello spessore della muscolatura. Ogni bronchiolo terminale si divide in due rami detti bronchioli respiratori. Questi sono del tutto simili al bronchiolo terminale, ad eccezione del fatto che la loro parete è interrotta da estroflessioni saccolari, dette alveoli, in cui avvengono gli scambi dei gas respiratori. La parete alveolare è specializzata nel promuovere la diffusione dei gas fra l'ambiente esterno e quello interno. L'epitelio alveolare non è omogeneo, essendo costituito principalmente da cellule alveolari pavimentose assottigliate e da grandi cellule alveolari polimorfe. Le *cellule epiteliali pavimentose degli alveoli* (cellule di tipo I) appaiono largamente separate l'una dall'altra perchè il loro citoplasma si assottiglia bruscamente oltre la regione perinucleare. Le *grandi cellule alveolari* (cellule di tipo II) svolgono funzioni diverse. Sono cellule polimorfe, che spesso hanno forma approssimativamente cubica. Poggiano sulla lamina basale dell'epitelio, occupando talora nicchie comprese fra le anse capillari o sporgono a gruppi di due o di tre sulla superficie alveolare. Esse hanno notevoli capacità metaboliche. Nella parete degli alveoli si trovano anche *cellule endoteliali dei capillari*. Di solito i mastociti restano confinati nel tessuto connettivo che circonda le vie aeree ed i vasi sanguigni e seguono il decorso intrapolmonare di queste strutture per una distanza variabile in rapporto alla

specie. Per il resto il tessuto connettivo degli alveoli normalmente contiene soltanto alcuni fibroblasti, plasmacellule, leucociti migranti e, raramente, fibrocellule muscolari lisce solitarie. Solitamente durante un processo infiammatorio sia acuto che cronico, lo spazio connettivale aumenta e dal sangue circolante vengono richiamate in gran numero le cellule infiammatorie. I fibroblasti polmonari ed il tessuto epiteliale polmonare rappresentano il sito primario di danno in numerose patologie. In questa sede il rimodellamento morfologico e strutturale, il danno cellulare come l'apoptosi e le alterazioni funzionali rappresentano step importanti nello sviluppo della malattia polmonare (Kuwano, 2007; Racké et al., 2007).

1.3.2 Innervazione sensoriale dell'apparato respiratorio

L'apparato respiratorio risulta innervato da fibre sensoriali deputate al controllo di importanti funzioni, come la costrizione a livello bronchiale, o la tosse. Tali funzioni sono regolate principalmente da due tipi di fibre nervose: quelle più veloci e mieliniche di tipo A δ , e quelle amieliniche di tipo C (Sant'Ambrogio & Mortola, 1978). La maggior parte delle fibre sensoriali presenti nell'apparato respiratorio appartengono al nervo vago; i corpi cellulari dei neuroni che danno origine a tali fibre si trovano localizzati a livello dei gangli giugulare e nodoso. Dai suddetti gangli partono fibre nervose pseudounipolari che si distribuiscono sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico, rispettivamente al midollo e alle vie respiratorie. L'apparato respiratorio risulta però innervato anche da altre fibre nervose, provenienti dai gangli (toracici) della radice dorsale del midollo spinale, che corrono insieme alle fibre simpatiche (Sant'Ambrogio & Mortola, 1978; Coleridge & Coleridge, 1994). Un'inappropriata attivazione di queste fibre sensoriali provoca una serie di eventi, come broncocostrizione, tosse, aumento della secrezione di muco, che sono caratteristici di alcune patologie a carattere prevalentemente flogistico dell'apparato respiratorio, come l'asma e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (o BPCO) (Barnes, 2001) (Figura 8). Infatti, il rilascio di SP e NKA causato dalla stimolazione delle fibre nervose sensoriali C e A δ e la conseguente interazione con i recettori post-sinaptici di membrana NK₁ ed NK₂ localizzati sulle cellule muscolari lisce, provoca una risposta contrattile muscolare, vasodilatazione, edema, ipersecrezione di muco, tipiche dei fenomeni flogistici (Karlsson, 1993; Barnes,

1986; Barnes, 1995). Sulla base dei dati presenti in letteratura è possibile affermare che un'eccessiva attivazione delle fibre nervose broncopolmonari C e A δ potrebbe rappresentare il principale contributo alla sintomatologia delle patologie respiratorie infiammatorie, sebbene anche l'innervazione non-adrenergica non-colinergica (NANC) delle vie respiratorie, contribuisca in buona parte alla broncoconstrizione e all'ipersecrezione di muco che si riscontrano durante un attacco di asma (Ramnarine et al., 1998). Tali fenomeni sembrano essere invece inibiti dalla stimolazione di altri recettori neuronali come il recettore GABA-B, il recettore adrenergico α_2 , il recettore per i cannabinoidi CB₂ e il recettore D₂ per la dopamina (Belvisi et al., 1988; Ramnarine et al., 1998).

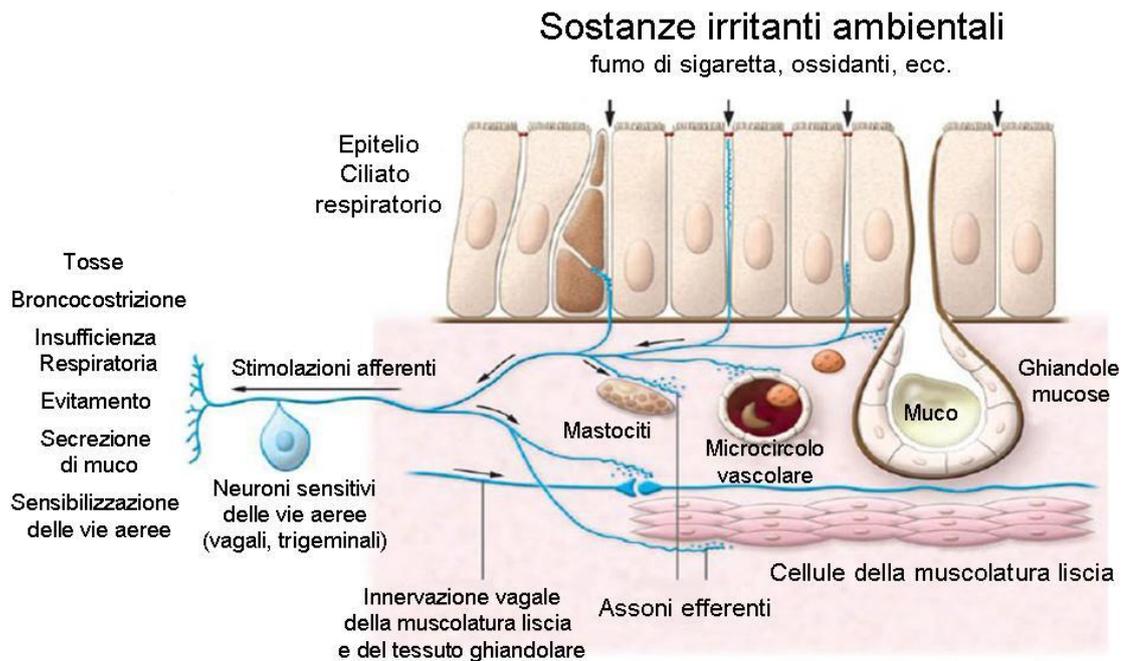


Figura 9. Rappresentazione schematica dell'unità neuronale sensoriale respiratoria. L'esposizione delle vie aeree ad agenti irritanti può indurre risposte riflesse tramite l'attivazione delle fibre nervose nocicettive e la trasduzione del segnale al livello del sistema nervoso centrale. Tali risposte protettive riflesse possono dare: tosse, depressione respiratoria fino all'arresto, ipersecrezione di muco, iperresponsività bronchiale e comportamento di evitamento. Modificata da: Simon & Liedthe, 2008.

1.3.3 Patologie a carico dell'apparato respiratorio a carattere flogistico, asma e BPCO

L'infiammazione è il complesso dei processi locali con i quali l'organismo reagisce all'azione nociva di molti agenti.

Una delle principali e più comuni patologie a carico dell'apparato respiratorio è l'asma, che è una affezione delle vie respiratorie caratterizzata da infiammazione ed iperattività correlate ad un'ampia varietà di stimoli e che prevalentemente interessa le vie aeree di conduzione. La ragione per cui la flogosi nell'asma coinvolge elettivamente le vie aeree di conduzione non è nota, ma è molto probabile che ciò dipenda dalle proprietà specifiche dell'epitelio delle vie aeree che, oltre a rappresentare una barriera fisiologica, ha un ruolo importante nell'orientare la risposta infiammatoria. Si è soliti ancora considerare l'asma allergico come una malattia prevalentemente di tipo immunitario, ma anche in questo caso è valido il modello di disfunzione epiteliale in cui la reazione al danno o allo stress (per esempio a virus, inquinanti o allergeni) produce un microambiente che facilita lo sviluppo di una risposta mediata dai linfociti T Helper di tipo 2 (Cohn et al., 2004). Nell'asma le cellule normalmente residenti nelle vie aeree (fibroblasti, miofibroblasti, cellule epiteliali e muscolari lisce) rilasciano una serie di citochine e fattori di crescita che possono contribuire alla natura cronica dell'infiammazione bronchiale. I fibroblasti giocano un ruolo chiave nel processo infiammatorio e di rimodellamento che caratterizzano la patologia (Cohn et al., 2004). Le cellule epiteliali alveolari secernono citochine e chemochine proinfiammatorie (Cohn et al., 2004) e monossido d'azoto (Jiang et al., 2009) che concorrono allo sviluppo della patologia. I cambiamenti funzionali cellulari si associano ai sintomi caratteristici dell'asma (tosse, difficoltà di respiro e respiro sibilante) e all'iperresponsività generale delle vie aeree verso stimoli broncocostrittori. La tosse è probabilmente causata dalla stimolazione delle terminazioni nervose sensitive delle vie aeree da parte dei mediatori dell'infiammazione. I mediatori dell'infiammazione possono inoltre alterare la percezione della dispnea attraverso i loro effetti eccitanti sui nervi afferenti (Vignola et al, 1998).

La BPCO è una sindrome, che comprende varie entità a diversa eziopatogenesi, quali, ad esempio la bronchite cronica e l'enfisema, caratterizzata sul piano clinico-funzionale da un'ostruzione permanente e progressiva dei piccoli

bronchi e da ipersecrezione bronchiale. La BPCO può essere schematicamente riconducibile ad un processo di flogosi cronica che interessa per decenni la parete delle vie aeree, ma i cui effetti a lungo termine si manifestano distalmente alle vie aeree, interessando il parenchima e l'interstizio polmonare. Nella BPCO il diametro delle vie aeree è ristretto, la parete dei bronchi è ispessita ed alterata; nelle vie aeree c'è una maggior produzione di espettorato che causa la tosse e rende difficoltoso il passaggio di aria durante l'espiazione. Gli alveoli sono dilatati a causa dell'aria intrappolata. I muscoli respiratori per lo sforzo di espellere l'aria si ipertrofizzano e diminuiscono di efficienza e la respirazione si fa sempre più difficoltosa.

Il fumo di tabacco, anche respirato passivamente, è in grado di causare infiammazione e rimodellamento nei tessuti polmonari attraverso un meccanismo di stress ossidativo, causato sia direttamente dagli ossidanti contenuti nel fumo di sigaretta, sia indirettamente attraverso la risposta infiammatoria. Infatti, il fumo di sigaretta contiene una grande quantità di agenti ossidanti ed è in grado di aumentare la produzione endogena di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule infiammatorie residenti o migrate nelle vie respiratorie, tra cui i macrofagi alveolari e i neutrofili. Il risultato finale di tale cascata di eventi è la generazione di circoli viziosi che mantengono ed amplificano i processi infiammatori associati alla BPCO. Nei pazienti affetti da BPCO si assiste ad un rimodellamento strutturale e funzionale in cui risultano coinvolti fibroblasti (si va in contro ad una fibrosi generalizzata) e le cellule epiteliali alveolari (Facchinetti et al., 2007; Moretto et al., 2009).

Attualmente, numerose evidenze hanno sottolineato il coinvolgimento delle fibre nervose capsaicino-sensibili in queste patologie.

1.3.4 Il ruolo fisiopatologico del canale TRPA1 nell'apparato respiratorio

Come ampiamente discusso in precedenza, le vie respiratorie risultano innervate dalle terminazioni delle fibre nervose sensoriali vagali capsaicino-sensibili. Queste fibre inviano segnali a livello del sistema nervoso centrale in risposta a stimoli di varia natura (termica, meccanica e chimica) che potrebbero essere potenzialmente nocivi per l'organismo. Questa attivazione dà luogo ad una serie di risposte riflesse, come apnea, bradicardia, tosse o secrezione di muco, che, in generale, hanno il compito di proteggere l'organismo dagli eventi nocivi (Coleridge

& Coleridge, 1994; Lee et al., 2006). In particolare, le terminazioni periferiche delle fibre nervose che irradiano l'epitelio bronchiale (Lamb & Sparrow, 2002), identificano stimoli irritanti di natura sia fisica che chimica con il conseguente incremento dell'attività riflessa.

Numerosi studi hanno chiarito ampiamente l'importanza del ruolo rivestito dalle fibre nervose sensoriali C e A δ nelle patologie o sindromi dell'apparato respiratorio. Risulta quindi ormai evidente che il canale TRPV1 riveste un importante ruolo fisiopatologico (Geppetti et al., 2008). Negli ultimi anni la ricerca in questo campo si è però soffermata sul possibile ruolo fisiopatologico di un altro recettore canale espresso su questa classe di fibre nervose, il canale TRPA1 (Nagata et al., 2005; Nassenstein et al., 2008). In particolare, sulla scia delle conoscenze relative al ruolo fisiopatologico del canale TRPV1, numerosi sono gli studi che hanno suggerito per il canale TRPA1 un ruolo di mediatore della stimolazione nervosa delle vie respiratorie (Andrè et al., 2008; Nassenstein et al., 2008).

Studi recenti, eseguiti mediante saggi elettrofisiologici sia su preparati isolati di polmone di topo che *in vivo*, hanno dimostrato che la cinnamaldeide è in grado di produrre risposte analoghe alla capsaicina (induzione di potenziali d'azione sulle fibre vagali C) (Nassenstein et al., 2008). Numerosi altri studi affermano che il canale TRPA1 è coinvolto nello sviluppo di patologie respiratorie. Infatti, sono stati recentemente pubblicati alcuni importanti lavori in cui è emerso come irritanti sia esogeni che endogeni, correlati con le patologie respiratorie, siano potenti attivatori del canale TRPA1. Tra gli irritanti esogeni dobbiamo ricordare il fumo di sigaretta (Andrè et al., 2008), ma anche acroleina (Bautista et al., 2005) e crotonaldeide in esso contenute (Andrè et al., 2008), gli ipocloriti (clorina) presenti nell'aria inquinata (Bessac et al., 2008) ed il toluene diisotiocianato (TDI), ritenuto responsabile dell'insorgenza dell'asma occupazionale (Taylor-Clark et al., 2009). Inoltre, individui affetti da sindromi respiratorie di natura allergica, come rinite ed asma, spesso mostrano una ipersensibilità in risposta ad agenti chimici irritanti come clorina, acroleina ed altri agonisti TRPA1 (Bessac et al., 2008). Tra gli irritanti endogeni troviamo principalmente agenti ossidanti, come il perossido d'idrogeno (Bessac et al., 2008), ed alcuni metaboliti dello stress ossidativo, come il 4-HNE (Trevisani et al., 2007), l'acroleina stessa, gli isoprostani ciclopentenoni (Materazzi et al., 2008), i metaboliti dell'infiammazione come le prostaglandine ciclopentenoni (Materazzi et

al., 2008; Taylor.Clarck et al., 2008) e altri mediatori proinfiammatori come la bradichinina (Bandell et al., 2004).

Un lavoro molto recente ha inoltre sottolineato il ruolo chiave del canale TRPA1 nello sviluppo dell'asma. In particolare ha suggerito che questo canale potrebbe funzionare da integratore per gli stimoli di natura chimica ed immunologica che modulano l'infiammazione nelle vie aeree in questa patologia. Questa capacità di integrazione potrebbe spiegare gli effetti proinfiammatori dovuti all'esposizione ad agenti chimici nei pazienti asmatici. Tramite l'attivazione del canale TRPA1 questi agenti chimici promuovono il rilascio di neuropeptidi e chemochine esagerando la risposta infiammatoria cellulare e tissutale (Caceras et al., 2009). Pertanto il canale TRPA1 espresso sulle fibre vagali C e A δ , che innervano l'apparato respiratorio, risulta attivato da una vasta gamma di sostanze chimiche irritanti esogene e da mediatori infiammatori endogeni, evidenziandone un importante ruolo fisiopatologico.

1.4. NOCICEZIONE

Il dolore, o nocicezione, rappresenta una sensazione complessa, che coinvolge non solo la percezione e la trasduzione degli stimoli dolorosi ambientali, ma anche l'elaborazione di stimoli cognitivi ed emozionali da parte del sistema nervoso centrale (SNC). Il dolore rappresenta una modalità sensoriale molto importante, in quanto ha come obiettivo primario quello di mettere in guardia l'individuo verso tutte quelle condizioni che potrebbero arrecare danno reale o potenziale ai tessuti e quindi all'individuo stesso. La sensazione dolorosa rappresenta quindi un meccanismo di difesa messo in atto dall'organismo nei confronti di stimoli nocivi, che ha, infatti, imparato ad associare sensazioni spiacevoli all'attivazione di determinate vie sensoriali ad alta soglia, che si estendono dalla periferia, con i nocicettori e le fibre nervose nocicettive, fino alla corteccia cerebrale, passando attraverso il talamo e le corna dorsali del midollo spinale o il midollo allungato (Fig. 10).

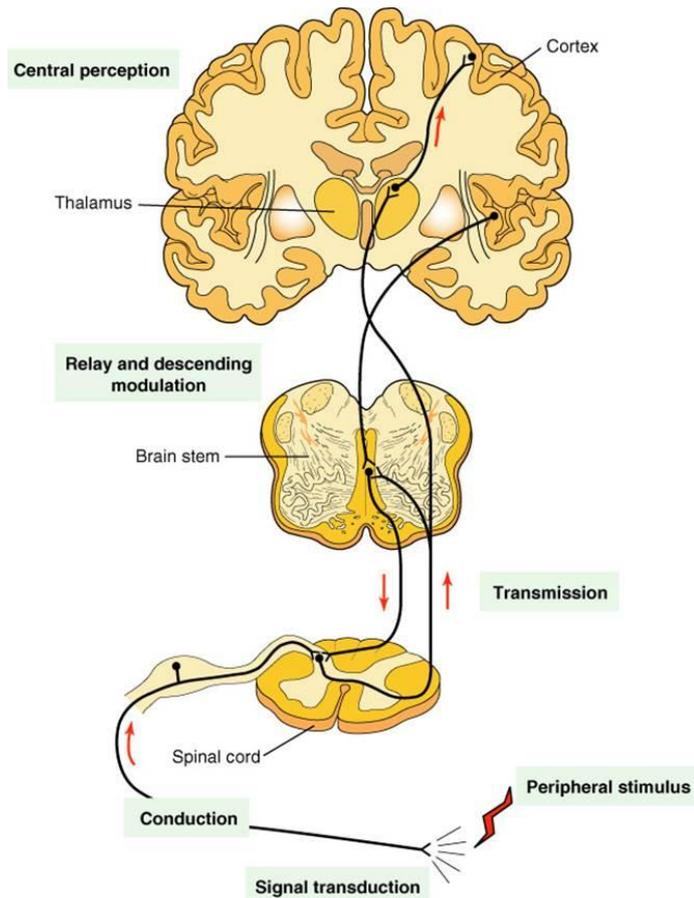


Figura 10. Trasmissione della sensazione dolorosa. Percorso delle informazioni dolorifiche somatiche che dalla periferia raggiungono la corteccia cerebrale dove saranno percepite e riferite alla parte del corpo da cui provengono.

Il dolore può essere classificato in acuto e cronico. Il dolore acuto è stato definito come un dolore ad inizio recente e di durata limitata. Esso generalmente ha una correlazione causale e temporale identificabile con stimoli potenzialmente o realmente lesivi per l'individuo, che generano, rispettivamente, un dolore transiente o dolore da danno tissutale (Woolf *et al.*, 1998). Il dolore acuto si esaurisce quando termina l'applicazione dello stimolo o quando il danno tissutale viene risolto. Il dolore cronico è un dolore che perdura anche dopo la risoluzione della causa primaria, venendo meno il rapporto causa-effetto che definisce il dolore acuto. Indipendente dalla durata, è sostenuto da una modificazione plastica, stabile, dei circuiti neuronali centrali che facilita l'elaborazione degli stimoli nocicettivi e non nocicettivi in dolore. La cronicità del dolore è dunque da ricondurre alle

modificazioni plastiche del SNC indotta dalla lesione algogena nocicettiva (Rome & Rome, 2000). A causa di queste modificazioni, i circuiti neuronali centrali attivati dalla lesione algogena restano attivi anche quando tale lesione non sussiste più, essendosi consolidati come una sorta di traccia di memoria. Il dolore può anche essere distinto in dolore nocicettivo, neuropatico ed infiammatorio. Il dolore nocicettivo compare in seguito ad un evento lesivo (per esempio un trauma o un intervento chirurgico). In tal caso, lo stimolo viene percepito a livello periferico dai nocicettori, che, in seguito a depolarizzazione, trasducono lo stimolo algogeno sottoforma di segnale elettrico a livello del sistema nervoso centrale, dove viene memorizzato. Può essere somatico, se causato da una lesione dei tessuti, come pelle e muscoli, o viscerale, se causato da alterazioni a carico degli organi interni. Il dolore neuropatico è legato principalmente ad una lesione primaria o ad un'alterazione funzionale del sistema nervoso a livello periferico o centrale; questo permane anche dopo l'esaurimento dello stimolo algogeno a causa di una trasformazione morfologico-funzionale dello stato funzionale dei nocicettori che persiste anche dopo la riparazione del danno tissutale. Il dolore infiammatorio, infine, è causato e correlato alla presenza di un fenomeno infiammatorio a carico di varie strutture ed alla conseguente attivazione dei nocicettori periferici.

Infine, il dolore può essere distinto in primario e secondario a seconda della regione topografica in cui si sviluppa. In particolare il dolore primario è avvertito nella sede dello stimolo nocicettivo come conseguenza dell'attivazione dei nocicettori locali, in relazione alla corrispondenza topografica; il dolore secondario è percepito in una sede diversa da quella della nocicezione, senza coinvolgimento dei nocicettori locali ed è legato all'azione di meccanismi non nocicettivi che producono effetti a distanza rispetto alla sede in cui operano.

1.4.1. I neuroni sensitivi primari

Nell'ambito della percezione del dolore i neuroni sensitivi primari svolgono un ruolo cruciale. Si tratta di una classe di neuroni capaci di trasmettere un segnale di natura sensitiva dalla periferia al SNC contraendo sinapsi con neuroni sensitivi secondari, che a loro volta contraggono sinapsi a livello del midollo spinale con interneuroni oppure raggiungono il talamo, dove si connettono con i neuroni sensitivi terziari, prendendo ulteriori contatti con le strutture corticali. Tra i neuroni sensitivi

primari si distingue una classe di neuroni deputati alla trasduzione di stimoli dolorosi che presenta una peculiare sensibilità per la capsaicina, principio pungente del peperoncino (Holzer, 1991). Questi neuroni vengono anche definiti neuroni sensitivi primari capsaicino-sensibili che, a causa del loro ruolo funzionale nella nocicezione, prendono anche il nome di nocicettori. I pirenofori dei neuroni sensitivi primari sono localizzati a livello dei gangli delle radici dorsali (DRG) del midollo spinale, le cui fibre nervose periferiche vanno ad innervare il tronco, gli arti e parte dei visceri, a livello dei gangli trigeminali (TG), le cui proiezioni innervano la testa, la cavità orale ed il collo fino al nucleo trigeminale, ed a livello vagale, nodoso e giugulare, le cui proiezioni innervano i visceri e le vie aeree. I neuroni sensitivi primari sono anche definiti neuroni pseudounipolari o cellule a “T” per la loro caratteristica struttura anatomica. Essi appartengono, infatti, ad una sottoclasse di neuroni bipolari e posseggono due processi funzionalmente specializzati: il dendrite, che porta informazioni alla cellula, e l’assone, che trasmette informazioni dalla cellula. Nei neuroni pseudounipolari, durante lo sviluppo, i due processi della cellula bipolare embrionale si fondono ed emergono dal corpo cellulare come unico processo che si suddivide poi in due processi distinti che funzionano entrambi da assone, l’uno dirigendosi alla periferia, mentre l’altro si dirige al sistema nervoso centrale (Fig. 11). I terminali periferici dei NSP sono distribuiti a livello somatico, viscerale e perivascolare, mentre i terminali centrali si distribuiscono a livello delle corna dorsali del midollo spinale e allungato.

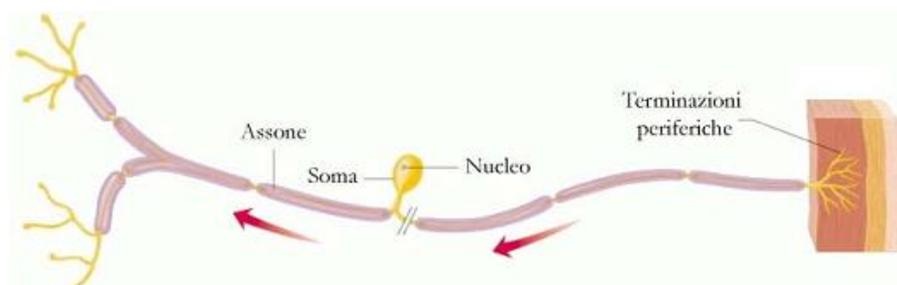


Figura 11. Neurone sensitivo primario. La figura mostra la tipica struttura a “T” dei neuroni sensitivi primari, dove si distinguono due processi distinti che funzionano entrambi da assoni, uno diretto verso la periferia e uno verso il sistema nervoso centrale.

I neuroni sensitivi primari danno origine a fibre nervose di piccolo e medio calibro, distinte in fibre C (amieliniche, di piccolo diametro, a lenta conduzione, generalmente inferiore ad 1 m/s), fibre A δ (scarsamente mielinizzate, di medio diametro, a conduzione più alta, 5-30 m/s), e le fibre A β (mieliniche, di grande diametro). Le fibre C e le fibre A δ sono deputate alla trasmissione e alla conduzione di stimoli dolorosi di natura diversa: meccanica, termica e chimica, e per questo definite polimodali (Holzer, 1988). Le fibre A δ sono responsabili della trasmissione di un dolore rapido, pungente o lancinante, ben localizzato e di breve durata; le fibre C, invece, trasmettono un dolore che è lento, progressivo, di tipo urente, più diffuso e duraturo (Julius *et al.*, 2001).

Le fibre afferenti nocicettive dei neuroni dei DRG terminano a livello dei neuroni del corno dorsale del midollo spinale, anatomicamente e funzionalmente suddiviso in sei lamine (I-VI). I neuroni di proiezione della lamina I ricevono afferenze direttamente dalle fibre A δ ed indirettamente dalle fibre C attraverso interneuroni della lamina II. I neuroni della lamina V sono prevalentemente ad ampio spettro dinamico. Essi ricevono afferenze dalle fibre mieliniche di grande diametro, A β , e, sia direttamente che indirettamente, dalle fibre afferenti nocicettive (A δ e C). I neuroni sensitivi primari capsaicino-sensibili si caratterizzano anche per il loro contenuto in neuropeptidi tra cui alcune tachichinine, quali la sostanza P (SP) e la neurochinina A (NKA), e il *calcitonine gene-related peptide* (CGRP), e per tale motivo definiti neuroni peptidergici (Regoli *et al.*, 1994). Tali neuropeptidi sono prodotti nel pirenoforo e quindi trasportati a livello dei terminali centrali (corna dorsali del midollo spinale ed allungato) e periferici, dove vengono rilasciati in seguito ad un'eccitazione neuronale. I neurotrasmettitori peptidici agiscono a livello dei mastociti, cellule del sistema immunitario, cellule della muscolatura liscia, etc., determinando una serie di eventi vascolari ed extravascolari pro-infiammatori complessivamente definiti come infiammazione neurogenica (Geppetti *et al.*, 1993; Geppetti & Holzer, 1996) (Fig. 5). A livello vascolare si verificano eventi quali la vasodilatazione arteriolare e lo stravasamento di proteine plasmatiche dalle venule post-capillari e il richiamo di neutrofili (Geppetti *et al.*, 1993; Holzer, 1988; Maggi *et al.*, 1991). A livello extravascolari invece si hanno eventi come la contrazione della muscolatura liscia iridea urinaria e bronchiale, un aumento della secrezione da parte di ghiandole esocrine, effetti inotropi e cronotropi a livello cardiaco.

Molteplici stimoli, di natura chimica e fisica, determinano il rilascio di neuropeptidi dai terminali dei neuroni sensitivi primari instaurando risposte infiammatorie neurogeniche, ne sono un esempio la bradichinina (BK), gli agonisti dei recettori attivati da proteasi (PAR), l'istamina, la serotonina, l'adenosintrifosfato (ATP), la prostaglandina E₂ (PGE₂), i protoni extracellulari, i mezzi ipertonici ed la temperatura (Richardson & Vasko, 2002). Al contrario, esistono sostanze che inibiscono il rilascio di neuropeptidi proinfiammatori agendo ad esempio sui recettori degli oppiacei o sui canali per il potassio (Maggi *et al.*, 1991). L'infiammazione neurogenica è quindi un fenomeno che può esser modulato in senso sia positivo che negativo in base a quali recettori o canali ionici espressi sulla membrana dei terminali periferici dei nocicettori vengono attivati.

Molteplici stimoli, di natura chimica e fisica, determinano il rilascio di neuropeptidi dai terminali dei neuroni sensitivi primari instaurando risposte infiammatorie neurogeniche, ne sono un esempio la bradichinina (BK), gli agonisti dei recettori attivati da proteasi (PAR), l'istamina, la serotonina, l'adenosintrifosfato (ATP), la prostaglandina E₂ (PGE₂), i protoni extracellulari, i mezzi ipertonici ed la temperatura (Richardson & Vasko, 2002). Al contrario, esistono sostanze che inibiscono il rilascio di neuropeptidi proinfiammatori agendo ad esempio sui recettori degli oppiacei o sui canali per il potassio (Maggi *et al.*, 1991). L'infiammazione neurogenica è quindi un fenomeno che può esser modulato in senso sia positivo che negativo in base a quali recettori o canali ionici espressi sulla membrana dei terminali periferici dei nocicettori vengono attivati. Una lesione tissutale, ad esempio, determina l'instaurarsi di risposte cellulari volte alla rimozione dell'agente di danno e alla riparazione della zona danneggiata, meccanismi che si accompagnano alla generazione di dolore acuto; spesso però questi meccanismi si protraggono per tempi maggiori, traducendosi in uno stato prolungato, e talvolta cronico, d'iperalgia e allodinia (Millan *et al.*, 1999; Finnerup *et al.*, 2004) legati al coinvolgimento di meccanismi centrali e periferici, dovuti, quest'ultimi, ad un'attivazione eccessiva dei nocicettori (Giulio *et al.*, 2001). In particolare, l'iperalgia è una condizione di aumentata sensibilità al dolore. Nell'iperalgia si registra una sorta di sensibilizzazione dei neuroni nocicettivi. La sensibilizzazione dei nocicettori a seguito di una lesione o di un'infiammazione può essere provocata dalla liberazione di varie sostanze chimiche da parte delle cellule lesionate e dei tessuti circostanti alla sede della lesione. Fra queste sostanze troviamo la BK,

l'istamina, le prostaglandine, i leucotrieni, l'acetilcolina, la serotonina e gli stessi CGRP e SP. Sebbene tutte queste sostanze vengano prodotte da cellule differenti tutte agiscono provocando una diminuzione della soglia di attivazione dei nocicettori. L'allodinia invece corrisponde all'abbassamento della soglia del dolore in modo che uno stimolo che normalmente non produce dolore venga percepito come doloroso.

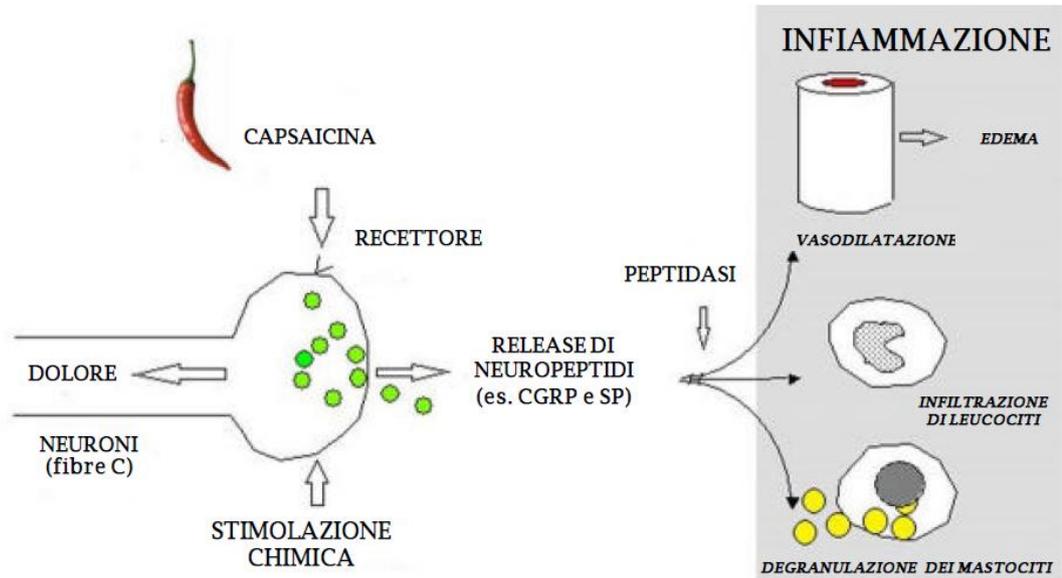


Figura 12. Infiammazione neurogena. Il rilascio di neuropeptidi dai neuroni sensitivi primari peptidergici determina una serie di eventi vascolari e extra-vascolari proinfiammatori che danno luogo ad un processo complesso definito infiammazione neurogena.

Tra le strutture molecolari ad attività eccitatoria espressi a livello dei nocicettori ne fanno parte i recettori-canale appartenenti alla famiglia dei *Transient Receptor Potential* (TRP); in particolare a livello dei nocicettori sono espressi i sottotipi TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1 (Levine *et al.*, 2002).

1.4.2 TRPA1 e dolore infiammatorio

Lo sviluppo di fenomeni infiammatori è associato a dolore. In queste condizioni si assiste, infatti, sia al rilascio di mediatori proinfiammatori da parte della zona danneggiata, sia ad un'attivazione dei nocicettori che culmina nel rilascio di sostanze bioattive, come SP, NKA e CGRP, che agiscono a livello periferico il cui effetto finale è caratterizzato dalla generazione di arrossamento e calore, secondari alla vasodilatazione, gonfiore, dovuto alla stravasazione di proteine plasmatiche, ed ipersensibilità, legata ad un'alterazione nei neuroni sensitivi primari (Geppetti *et al.*, 1996). I primi dati indiretti del coinvolgimento del TRPA1 nel dolore infiammatorio derivano da studi *in vivo* in modelli d'infiammazione ottenuti mediante iniezione intradermica o intrarticolare di CFA, in cui si osserva l'insorgere di un'iperalgisia termica e meccanica indotta da un aumento dell'espressione del canale TRPA1 e da una sensibilizzazione dei neuroni in cui è espresso (Obata *et al.*, 2005; Dunham *et al.*, 2008). L'effetto di antagonisti selettivi TRPA1 in questi modelli ha sottolineato il contributo del canale TRPA1 (Petrus *et al.*, 2007; Eid *et al.*, 2008; da Costa *et al.*, 2010; McGaraughty *et al.*, 2010).

Inoltre, un altro modello che ha affermato il ruolo del canale TRPA1 nel dolore infiammatorio è rappresentato dall'iniezione intraplantare di formalina (McNamara *et al.*, 2007). Il trattamento produce una risposta dolorosa che consta di due distinte fasi: la prima, di tipo sensoriale, ha inizio immediatamente dopo l'iniezione di formalina ed è caratterizzata proprio dall'attivazione delle fibre sensoriali C ed A δ e dura circa 15 minuti, la seconda fase è definita di tipo infiammatorio in quanto associata alla liberazione dei mediatori dell'infiammazione (Coderre *et al.*, 1992) e ad una sensibilizzazione centrale (Sheu *et al.*, 2002) e dura circa 4-5 ore. In questo studio è stato evidenziato che l'iperalgisia meccanica e termica indotta da formalina è significativamente ridotta in topi pretrattati con HC-030031 o in topi TRPA1-KO (McNamara *et al.*, 2007).

Anche altri modelli sperimentali di dolore infiammatorio, in cui è stato utilizzato come stimolo la carragenina, hanno avvalorato l'ipotesi che il recettore TRPA1 sia importante per lo sviluppo ed il mantenimento dell'ipersensibilità meccanica e termica, contribuendo in tal modo alla sensibilizzazione dei nocicettori (Bonet *et al.*, 2013). Inoltre, è stato osservato che il trattamento con antagonisti selettivi TRPA1 riduce notevolmente la sensibilizzazione neuronale in modelli di

osteoartrite indotta da CFA o carragenina, e in modelli di gotta indotta da iniezioni intraarticolari di monosodio idioacetato (McGaraughty *et al.*, 2010; Okun *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011; da Costa *et al.*, 2010). Tuttavia, nonostante i dati sperimentali in nostro possesso, non si hanno ancora informazioni riguardo i meccanismi molecolari che guidano l'evolversi del dolore infiammatorio acuto in un fenotipo di dolore cronico mediato da attivazione del canale TRPA1 espresso sui neuroni sensitivi primari.

1.5 NEUROPATIA

Con il termine neuropatia si fa riferimento a un gruppo particolarmente complesso di affezioni che interessano i nervi periferici; si parla, infatti, generalmente, di *neuropatie periferiche*. In base alle funzioni svolte i nervi, le cui proprietà fondamentali sono l'eccitabilità e la conduttività, si distinguono tre tipologie di nervi: nervi motori (responsabili dei cosiddetti *movimenti volontari*), nervi sensitivi (quelli che ci consentono percepire dolore, vibrazioni ecc.) e nervi autonomici (deputati al controllo delle funzioni involontarie, come il respiro, il battito cardiaco)

La stragrande maggioranza delle neuropatie interessa tutte e tre le tipologie di nervi, ma il processo patologico può anche essere relativo a solo una o a due di esse; per tali ragioni le neuropatie possono essere puramente oppure prevalentemente di tipo motorio, sensitivo e autonomico (anche *vegetativo*). Esistono vari criteri di classificazione dei vari tipi di neuropatia. Facendo riferimento al tipo di fibre interessate dal processo patologico si distinguono: neuropatie motorie, neuropatie sensitive, neuropatie autonome (anche *neuropatie vegetative*), neuropatie miste. È anche possibile effettuare una distinzione in base al processo patologico; in questo caso si parla di: neuropatie demielinizzanti, neuropatie assonali. Nel primo caso il danno interessa la mielina, nel secondo l'assone; è opportuno precisare che, molto frequentemente, il danno è di tipo misto; sono cioè interessati sia la mielina sia l'assone. Facendo riferimento invece al processo evolutivo si effettua la seguente classificazione: neuropatie acute, neuropatie subacute, neuropatie croniche.

1.5.1 TRPA1 e dolore neuropatico

Il dolore neuropatico è la risultante di lesioni o patologie che interessano il sistema nervoso somato-sensoriale periferico o centrale. Clinicamente, è caratterizzato da episodi dolorosi ad insorgenza spontanea e da un'augmentata sensibilità e risposta a stimoli nocicettivi e non, rispettivamente definite iperalgesia e allodinia. Molteplici sono i dati che evidenziano un ruolo del TRPA1 nell'ipersensibilità chimica, termica e meccanica associata a diverse condizioni patologiche, come lesioni a livello delle fibre nervose, nella neuropatia periferica associata a diabete e nella neuropatia indotta dall'uso di chemioterapici (CIPN). Alcuni modelli sperimentali *in vivo* hanno permesso di studiare e dimostrare il coinvolgimento del canale TRPA1 nell'ambito di tali patologie neuropatiche. Il modello della legatura del nervo sciatico (Kim & Chung., 1992), ad esempio, ha permesso di valutare il possibile coinvolgimento del TRPA1 in un modello di neuropatia periferica dovuto ad una lesione del tessuto nervoso. Recenti evidenze sperimentali, prodotte anche dal nostro laboratorio, hanno inoltre evidenziato un coinvolgimento del TRPA1 nell'insorgenza di CIPN. È noto che la terapia con antitumorali di diversa natura risulti fortemente limitata dalla sua tossicità e da alcuni effetti collaterali importanti tra cui la neuropatia periferica, che rappresenta un comune effetto collaterale estremamente diffuso e limitante. La CIPN è clinicamente caratterizzata da ipersensibilità a stimoli meccanici (intorpidimento e formicolio) e termici (in particolare al freddo) a carico delle estremità (mani, polsi, piedi e caviglie). Molteplici fattori determinano la severità di CIPN, inclusi la dose, la durata del trattamento o il co-trattamento con altri farmaci neurotossici. La CIPN può insorgere già dopo la prima somministrazione del farmaco aumentando di gravità con il procedere del trattamento. Vari meccanismi sono stati proposti per spiegare lo sviluppo della CIPN tra cui alterazioni della funzionalità dei mitocondri, con conseguente disfunzione dell'omeostasi del Ca^{2+} (Shishkin *et al.*, 2002) e la generazione di ROS (Chung, 2004). Recenti evidenze hanno evidenziato il coinvolgimento dei canali TRP espressi a livello dei nocicettori nei meccanismi alla base della CIPN (Alessandri-Haber *et al.*, 2008; Miyano *et al.*, 2009; Nassini *et al.*, 2011). A tale riguardo è stato dimostrato che l'insorgenza dell'ipersensibilità meccanica e termica indotta da oxaliplatino, cisplatino e bortezomib è completamente dipendente dall'attivazione del recettore TRPA1 in quanto prevenuta

dal pretrattamento con HC-030031 o abolita in topi *Trpa1*^{-/-} (Nassini *et al.*, 2011; Trevisan *et al.*, 2013).

Alcuni studi recenti hanno evidenziato il ruolo del canale TRPA1 anche in modelli animali di neuropatia da diabete indotto da streptozotocina (Wang & Wang, 2003). Anche in questo caso è stato osservato un coinvolgimento del TRPA1 nello sviluppo di allodinia meccanica e ipersensibilità termica associata alla neuropatia diabetica (Koivisto *et al.*, 2012).

1.5.2 La neuropatia periferica indotta da chemioterapici (CIPN)

La neuropatia periferica indotta da chemioterapici (CIPN) è un effetto collaterale frequente e invalidante di molti farmaci chemioterapici, tra cui i composti del platino (cisplatino e oxaliplatino), i tassani (paclitaxel e docetaxel), gli alcaloidi della vinca (vincristina e vinblastina), la talidomide e suoi derivati e bortezomib (Windebank *et al.*, 2008). L'incidenza di CIPN varia dal 30 al 40% dei pazienti sottoposti a chemioterapia e dipende dal tipo di farmaco citotossico, dalla durata della somministrazione, dalla dose cumulativa e dalla eventuale pre-esistente neuropatia periferica. Ulteriori fattori legati al paziente, come l'età, la concomitante presenza di altre patologie (e.g. diabete) e l'uso di alcool rappresentano delle variabili importanti nello sviluppo della CIPN (Windebank *et al.*, 2008). Tali condizioni, infatti, possono influenzare negativamente la funzionalità dei nervi, rendendoli più sensibili ad un agente chemioterapico. Nella maggior parte dei pazienti, CIPN presenta segni e sintomi principalmente di tipo sensitivo, o comunque il coinvolgimento della componente sensitiva rappresenta un elemento predominante rispetto alla disabilità motoria. Con una certa variabilità dipendente dalla dose somministrata, CIPN è infatti caratterizzata da una neuropatia sensitiva periferica che può manifestarsi subito o dopo mesi dall'inizio della terapia (Lehky *et al.*, 2004) e da una serie di sintomi descritti come ipersensibilità a stimoli termici (freddo) e meccanici, parestesie delle mani, dei piedi e della regione periorale (Wilson *et al.*, 2002). I sintomi sensitivi di CIPN possono essere classificati secondo il danno da cui essi derivano e che comprendono danni alle grandi fibre (dovuti all'utilizzo di farmaci a base platino) o il danno alle piccole fibre (ad esempio, con l'uso di bortezomib). Tuttavia, il coinvolgimento multimodale delle fibre sensitive risulta

molto più comune rispetto ad un coinvolgimento specifico di singole tipologie di fibre sensitive. Il manifestarsi della neurotossicità rappresenta spesso una delle cause di interruzione del trattamento o riduzione del dosaggio che incidono sul trattamento stesso (Ashley *et al.*, 2007).

I farmaci antitumorali a base di platino, cisplatino, carboplatino e oxaliplatino vengono utilizzati con successo nel trattamento del cancro del polmone, colon, ovaio, mammella, testa-collo, della vescica e tumori testicolari. Il meccanismo d'azione di questi farmaci prevede la formazione di legami tra l'atomo di platino ed i filamenti complementari del DNA. La neurotossicità indotta dal trattamento farmaci a base di platino è prevalentemente caratterizzata da neuropatia sensoriale, che produce principalmente dolore e parestesia alle estremità. Tale neuropatia sensoriale può avere un esordio ritardato, settimane dopo l'inizio del trattamento e nelle fasi avanzate può progredire a grave dolore neuropatico e atassia sensitiva. L'oxaliplatino è maggiormente utilizzato nel trattamento del cancro colon-rettale (Andre *et al.*, 2004) e mostra un profilo neurotossico singolare. Oxaliplatino induce infatti una neuropatia acuta dolorosa che si sviluppa subito dopo la somministrazione (Pasetto *et al.*, 2006). I pazienti accusano parestesie, più spesso localizzate a livello periorale e alle estremità, e grave ipersensibilità al freddo. In circa il 90% dei pazienti, l'esposizione a fattori scatenanti il freddo induce una sindrome transitoria caratterizzata da crampi, parestesie e disestesie. In seguito a più cicli di trattamento con oxaliplatino si sviluppa spesso una neuropatia periferica cronica simile a quella indotta da cisplatino.

Paclitaxel è utilizzato per il trattamento di un'ampia varietà di tumori solidi. La neurotossicità indotta da paclitaxel si presenta tipicamente come una neuropatia sensoriale che comprende intorpidimento, formicolio, bruciore e dolore. I sintomi sensoriali di solito iniziano simmetricamente negli arti inferiori ma possono anche manifestarsi simultaneamente in entrambe le mani e piedi (Dougherty *et al.*, 2004). Molti casi si risolvono brevemente dopo l'interruzione del trattamento ma le anomalie sensoriali e il dolore possono essere di lunga durata (Rowinsky *et al.*, 1993).

Tra gli altri farmaci antitumorali, la vincristina è un agente antineoplastico ampiamente utilizzato che può essere somministrato da solo o in combinazione con altri farmaci nel trattamento di molti tipi di tumore (Weiss *et al.*, 1994; Kaplan *et al.*,

1982). La proprietà antitumorale della vincristina deriva dalla sua capacità di inibire la divisione cellulare agli stadi precoci del processo di mitosi. La vincristina si lega ai monomeri di tubulina, impedendo la formazione dei microtubuli delle fibre del fuso mitotico durante il processo di replicazione cellulare. Il bortezomib è un inibitore del proteosoma 20, enzima fondamentale per diverse proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, la cui inibizione causa morte delle cellule neoplastiche. Viene utilizzato principalmente nel trattamento del mieloma multiplo e del linfoma (Richardson *et al.*, 2003; San Miguel *et al.*, 2008; Frankland-Searby *et al.*, 2012). Recentemente anche la talidomide ha riscosso molta attenzione per la sua notevole efficacia terapeutica nel trattamento del mieloma multiplo (Morgan *et al.*, 2006). Evidenze cliniche riportano l'insorgenza di una neuropatia periferica anche nel caso di trattamento con questi ultimi farmaci utilizzati nella terapia anticancro.

E' stato descritto, inoltre, come alcuni pazienti che hanno manifestato CIPN, anche se scomparsa dopo interruzione del trattamento, presentano un rischio maggiore di manifestare patologie di tipo metabolico che a loro volta potrebbero scatenare nuovamente la neuropatia (Pachman *et al.*, 2011). I regimi di dosaggio alternativi, l'utilizzo di sistemi di modificazione del trattamento in base ai criteri di tossicità comuni e la diagnosi precoce, sono necessari ma non sufficienti per limitare la quantità di danni neurotossici associati alla chemioterapia. CIPN può rappresentare quindi una patologia estremamente invalidante influenzando negativamente sulla qualità della vita dei pazienti. Numerose ipotesi sono state formulate per spiegare questa condizione dolorosa e vari tentativi terapeutici sono stati proposti, ma i meccanismi alla base della CIPN non sono ancora completamente conosciuti ed i pazienti che ne soffrono rimangono tutt'oggi senza trattamento. Per questo motivo l'obiettivo principale della ricerca in questo settore è quello di sviluppare un trattamento efficace nei pazienti che hanno già sviluppato CIPN ma allo stesso tempo individuare i meccanismi alla base della patologia al fine di prevenire lo sviluppo della stessa. Nonostante i molteplici tentativi, quali l'uso di farmaci detossificanti, antiossidanti, anticonvulsivanti ed antidepressivi, ad oggi non c'è alcun trattamento efficace nel prevenire o limitare l'insorgenza e la gravità della CIPN (Cavaletti *et al.*, 2010). Vari meccanismi sono stati studiati per il loro possibile coinvolgimento nello sviluppo di CIPN. L'infiammazione, lo stress ossidativo, la perdita delle fibre nervose intraepidermiche, la variazioni della funzione mitocondriale, il coinvolgimento di specifici canali ionici, compresi i canale al

calcio, al sodio, e al potassio, sono solo una parte dei possibili meccanismi indicati come responsabili dello sviluppo e progressione di CIPN (Jaggi *et al.*, 2012). Ad esempio, è stato osservato nel ratto come la somministrazione intraplantare di vincristina, paclitaxel (Siau *et al.*, 2006) e oxaliplatino (Boyette-Davis & Dougherty., 2011) provoca la perdita delle fibre nervose intraepidermiche causando ipersensibilità agli stimoli termici e meccanici (Ochoa & Yarnitsky., 1994; Flatters & Bennett., 2004; Polomano *et al.*, 2001).

Un altro meccanismo rilevante sembra essere legato alla disregolazione delle vie di segnalazione mitocondriali (Bouillot *et al.*, 2002). I mitocondri, infatti, regolano una serie di processi fisiologicamente importanti per l'integrità cellulare la cui disfunzione potrebbe essere implicata nello sviluppo del dolore neuropatico (Jaggi & Singh, 2011). Tali processi comprendono la regolazione del Ca^{2+} intracellulare (Shishkin *et al.*, 2002), la produzione dei ROS (Chung *et al.*, 2004) e l'attivazione delle vie di segnalazione pro-apoptotiche (Joseph & Levine, 2004). È stato descritto, ad esempio, che paclitaxel stimola l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP) (Flatters & Bennett., 2006) causando rilascio di Ca^{2+} dai mitocondri (Kidd *et al.*, 2002). Il coinvolgimento del Ca^{2+} rilasciato dai mitocondri nello sviluppo di CIPN è stato avvalorato da uno studio condotto con l'utilizzo di agenti chelanti per il Ca^{2+} , i quali somministrati in associazione al paclitaxel riducono l'insorgenza di CIPN (Siau & Bennett., 2006). Nella neuropatia periferica indotta da bortezomib sembra sia coinvolta la vacuolizzazione intracitoplasmatica nei DRG delle cellule satellite, attribuita ad un aumento del volume mitocondriale e del reticolo endoplasmatico (Cavaletti *et al.*, 2007). Questi cambiamenti sono legati alla capacità del bortezomib di indurre disregolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} (Landowski *et al.*, 2005) e di conseguenza l'attivazione del processo apoptotico mitocondriale, e conseguente attivazione delle caspasi (Broyl *et al.*, 2010). La regolazione dei livelli di Ca^{2+} intracellulare sembra quindi essere un fattore importante nella patogenesi della CIPN. Il paclitaxel aumenta l'espressione dell'mRNA della subunità $\alpha 2\delta$ dei canali al calcio contenuti nei neuroni dei DRG (Xiao *et al.*, 2007; Gauchan *et al.*, 2009). Di conseguenza è stato proposto che la capacità della gabapentina, di contrastare l'allodinia meccanica indotta dal paclitaxel, sia dovuta all'azione inibitoria sui canali al calcio attraverso il legame alla subunità $\alpha 2\delta$ (Matsumoto *et al.*, 2006). Così come il paclitaxel, anche la somministrazione di vincristina è in grado di indurre CIPN agendo sulla membrana

mitocondriale, dove sembra compromettere sia l'assorbimento che il rilascio di Ca^{2+} alterando la sua concentrazione intracellulare. Uno studio, ha dimostrato la possibilità di attenuare il dolore neuropatico, indotto da vincristina e paclitaxel, mediante l'uso di farmaci che diminuiscono i livelli di Ca^{2+} intracellulare, come i chelanti del calcio extracellulare, confermando ulteriormente i dati precedentemente riportati (Tari *et al.*, 1986; Kidd *et al.*, 2002).

Anche i canali al Na^+ voltaggio-dipendenti sembrano avere un ruolo molto importante nello sviluppo della CIPN. A dimostrazione di ciò è stato scoperto che il blocco dei canali al Na^+ voltaggio-dipendenti, attraverso l'uso di antagonisti selettivi, quali lidocaina e mexiletina, riduce parzialmente l'allodinia meccanica e l'ipersensibilità al freddo indotte dalla somministrazione di oxaliplatino in modelli animali (Nieto *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2010; Egashira *et al.*, 2010). Anche l'ossalato, un metabolita dell'oxaliplatino può alterare le proprietà funzionali dei canali al Na^+ voltaggio-dipendenti (Grolleau *et al.*, 2001), ed indurre sintomi sensoriali quali parestesie e disestesie (Webster *et al.*, 2005). L'esposizione al freddo altera ulteriormente la cinetica di apertura di questi canali (Rutkove *et al.*, 2001) provocandone la disfunzione (Bouhours *et al.*, 2003), un evento che si verifica comunemente nella neurotossicità acuta indotta da oxaliplatino. Il ruolo dei canali al Na^+ voltaggio-dipendenti nella CIPN è stato ulteriormente evidenziato con l'uso della tocinide, bloccante dei canali Na 1.7, che ha mostrato un'attenuazione del dolore neuropatico indotto da oxaliplatino (Ghelardini *et al.*, 2010).

Nello sviluppo della CIPN anche i canali al potassio (K^+) voltaggio-dipendenti svolgono un ruolo rilevante (Kagiava *et al.*, 2008). E' stato evidenziato infatti che l'ipersensibilità al freddo indotta da oxaliplatino, sia dovuta in parte alla riduzione dell'espressione di un particolare tipo di canale al potassio voltaggio-dipendente, il TREK1, di tipo inibitorio, normalmente espresso sui neuroni DGR di ratto. Allo stesso tempo l'oxaliplatino favorisce l'espressione, nei DRG, di specifici canali eccitatori, i canali attivati da iperpolarizzazione (HCNs) che stimolano l'eccitazione dei nocicettori causando ipersensibilità (Descoeur *et al.*, 2011).

Un'altra delle cause coinvolte nello sviluppo della CIPN sembra essere l'induzione di uno stato infiammatorio da parte di tali farmaci (Siau *et al.*, 2006). La somministrazione di paclitaxel e vincristina causa il reclutamento delle cellule del Langerhans (LC) (Siau *et al.*, 2006), le quali contribuiscono allo sviluppo del dolore neuropatico attraverso diversi meccanismi, come il rilascio di NO (Qureshi *et al.*,

1996), di citochine pro-infiammatorie (Deng *et al.*, 2003) e di fattori neurotrofici (Torii *et al.*, 1997) e conseguente sensibilizzazione dei nocicettori e ipersensibilità meccanica. Successivi studi hanno riportato che il dolore neuropatico indotto da paclitaxel e bortezomib è associato al rilascio di molecole pro-infiammatorie, quali interleuchina-1 β , fattore di necrosi tumorale (TNF- α) (Ledeboer *et al.*, 2007) e interleuchina-6 nei DRG lombari (Mangiacavalli *et al.*, 2010).

Anche lo stress ossidativo prodotto in seguito alla somministrazione di farmaci antitumorali ha un ruolo importante nello sviluppo della CIPN (Carozzi *et al.*, 2010). L'aumento intracellulare di ROS è un evento cruciale nella CIPN indotta da paclitaxel, vincristina (Alexandre *et al.*, 2006) e oxaliplatino (Afzal *et al.*, 2012). Alcuni studi riportano che l'uso di antiossidanti come la vitamina C, l'acetil-L-carnitina e l'acido- α -lipoico somministrati in concomitanza con oxaliplatino o paclitaxel sono in grado di attenuare l'iperalgia meccanica e l'allodinia al freddo indotta da tali farmaci (Joseph *et al.*, 2008). Allo stesso modo anche la neurotossicità indotta da bortezomib, per aumento della produzione di ROS nei neuroni DRG (Wang *et al.*, 2011), è risultata ridotta attraverso la somministrazione di vitamina C e N-acetil-L-cisteina.

Diversi modelli sperimentali di neuropatia indotta nei ratti hanno mostrato che la manifestazione della CIPN è preceduta anche dal rilascio di neuropeptidi proinfiammatori dai DRG (Jamieson *et al.*, 2007). Ad esempio, paclitaxel stimola la secrezione di SP e neuropeptide Y (Jamieson *et al.*, 2005), a differenza di oxaliplatino e cisplatino in cui è più rilevante il rilascio di altri neuropeptidi proinfiammatori quali CGRP e somatostatina (Horvath *et al.*, 2005; Tatsushima *et al.*, 2011).

Anche il rilascio eccessivo di glutammato, che porta all'iperattività della neurotrasmissione glutammatergica per attivazione del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA), sembra associato alla CIPN. In uno studio è stato rilevato che la somministrazione di ketamina, antagonista del recettore NMDA, attenua l'iperalgia meccanica e al freddo indotte da paclitaxel (Pascual *et al.*, 2010). Allo stesso modo l'inibizione della glutammato carbossipeptidasi, enzima che catalizza la produzione di glutammato per idrolisi del suo precursore, N-acetil-aspartil-glutammato, genera effetti neuroprotettivi in modelli sperimentali di CIPN indotta da cisplatino, paclitaxel e bortezomib (Carozzi *et al.*, 2010).

Altro fattore coinvolto nella CIPN è l'alterazione della funzionalità delle Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK). Le MAPK sono proteine coinvolte nella regolazione di diversi processi cellulari in risposta a stimoli come lo shock termico, la presenza di citochine pro-infiammatorie e lo stress osmotico. Tali chinasi regolano l'espressione genica, la differenziazione cellulare, la mitosi e l'apoptosi ed un'alterazione della loro funzionalità può essere coinvolta nel dolore neuropatico. Studi *in vivo* hanno dimostrato che l'iperalgia meccanica e l'allodinia al freddo, indotte da cisplatino e oxaliplatino (Scuteri *et al.*, 2009), sono attenuate dalla somministrazione del fattore di crescita nervoso (NGF), che svolge un'attività protettiva per i neuroni DRG ripristinando la funzionalità delle MAPK (Scuteri *et al.*, 2010).

Altri recettori che sembrano svolgere un ruolo nella CIPN sono i recettori per la serotonina (5-HT_{2A}) (Doly *et al.*, 2004). I recettori 5-HT_{2A} sono espressi nei neuroni sensitivi primari e nel corno dorsale del midollo spinale e il loro ruolo nella sensibilizzazione delle fibre nocicettive periferiche e spinali è ben caratterizzato. È stato evidenziato infatti un aumento dei recettori 5-HT_{2A} a livello del corno dorsale lombare e nei DRG in modelli animali di CIPN indotta da vincristina (Thibault *et al.*, 2008). Infine, i topi che non esprimono il trasportatore per la serotonina (5-HTT) sono relativamente resistenti all'iperalgia al caldo e recuperano più velocemente dall'ipersensibilità meccanica indotta da vincristina (Hansen *et al.*, 2011).

1.5.3 Ruolo dei transient receptor potential nella CIPN

Recenti studi dimostrano un ruolo primario nello sviluppo di CIPN dei membri della famiglia dei canali ionici TRP in particolare i TRPV1, TRPV4, TRPA1 e TRPM8. Data la loro specifica espressione in neuroni sensitivi primari presenti nei gangli trigeminali e delle radici dorsali, la ricerca sui canali TRP rappresenta un tema importante, che è stato recentemente esplorato per comprendere i meccanismi del CIPN. L'ipotesi che l'induzione di stress ossidativo indotto dall'uso di diversi agenti chemioterapici possa contribuire all'insorgenza di CIPN sta assumendo sempre più importanza. Infatti, l'utilizzo di un antiossidante come N-acetilcisteina è stato riportato prevenire completamente l'ipersensibilità meccanica indotta da paclitaxel (Nassini *et al.*, 2011). A supporto di questa ipotesi, recenti studi dimostrano che

paclitaxel e oxaliplatino non sono in grado di attivare direttamente il canale TRPA1 espresso dai neuroni sensitivi primari, ma probabilmente esercitano la loro azione indirettamente attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS ed RNS, rispettivamente) da parte delle cellule vicine che a loro volta attivano il canale a livello dei terminali nervosi (Joseph *et al.*, 2008; Nassini *et al.*, 2011; Materazzi *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2012; Jaggi *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). In base a questi e molti altri dati emerge che sia l'effetto proapoptotico e quindi antitumorale da un lato che l'induzione di CIPN dall'altro, sembrano dipendere da un unico meccanismo, cioè la capacità di questi farmaci di generare stress ossidativo. Recentemente, mediante approcci farmacologici e genetici è stato dimostrato che i farmaci a base di platino e i taxani inducono ipersensibilità termica e meccanica nei roditori, principalmente o esclusivamente mediata da produzione di ROS e dipendente dall'attivazione del TRPA1 (Nassini *et al.*, 2011; Materazzi *et al.*, 2012). L'aumento dell'ipersensibilità a stimoli termici e meccanici indotta da oxaliplatino è stata associata ad aumentati livelli di espressione di RNA messaggero di TRPV1, TRPA1 e TRPM8 in neuroni in coltura (Anand *et al.*, 2010; Gauchan *et al.*, 2009; Ta *et al.*, 2010). Inoltre, l'iperalgia meccanica indotta da paclitaxel sembra essere in parte mediata da attivazione del TRPV4 (Alessandri-Haber *et al.*, 2004; Materazzi *et al.*, 2012). Inoltre il canale TRPV4 è risultato essere in parte coinvolto nell'iperalgia meccanica indotta dal paclitaxel (Alessandri-Haber *et al.*, 2008). La possibilità che una comune via di segnale sia attivata da molecole chimicamente così diverse, come i farmaci derivati del platino ed i taxani è basata sulla loro capacità indurre stress ossidativo, con la produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS e RNS, rispettivamente) nei diversi tessuti e tipi cellulari (Joseph *et al.*, 2008; Ramanathan *et al.*, 2005; Materazzi *et al.*, 2012). Tale effetto sembra costituire parte integrante della loro attività antitumorale (Alexandre *et al.*, 2007; Kopetz *et al.*, 2009), inoltre molte evidenze dimostrano che la neurotossicità periferica indotta dai derivati del platino è legata alla produzione di stress ossidativo nei neuroni dei DRG (Carozzi *et al.*, 2010). Molteplici studi *in vitro* e *in vivo* hanno suggerito che la citotossicità di oxaliplatino è legata alla maggiore produzione di ROS (Afzal *et al.*, 2012). Inoltre, vi sono numerose evidenze a dimostrazione del fatto che il trattamento con paclitaxel è associato alla produzione di stress ossidativo (Alexandre *et al.*, 2007; Ramanathan *et al.*, 2005).

TRPV1

Tra gli effetti collaterali dei farmaci antitumorali a base di platino ritroviamo ipersensibilità al caldo. Recentemente, è stato evidenziato un incremento dell'espressione dell'mRNA che codifica per il canale TRPV1 in neuroni stimolati con cisplatino (Ta *et al.*, 2010). Nello stesso studio è stato osservato che l'incremento d'espressione del TRPV1 causa maggiore risposta dei nocicettori che contribuiscono ai meccanismi molecolari dell'ipersensibilità al calore osservata in modelli animali in seguito a trattamento con cisplatino. Questi risultati suggeriscono che il canale TRPV1 è quindi implicato nello sviluppo dell'ipersensibilità al calore ma non nell'iperalgia meccanica indotta da cisplatino. Tuttavia i meccanismi molecolari alla base di tale meccanismo non sono ancora del tutto chiari. Si presume che l'aumento d'espressione dell'mRNA del TRPV1 nel corpo delle cellule nervose sensitive potrebbe tradursi in un maggiore flusso di proteine TRPV1 nei terminali nocicettivi periferici. La partecipazione del TRPV1 nell'iperalgia potrebbe coinvolgere anche la fosforilazione del canale da parte delle proteine chinasi, portando ad una maggiore sensibilità del TRPV1 che contribuisce al dolore neuropatico (Patapoutian *et al.*, 2009). Oltre che per il cisplatino è stato visto che anche l'esposizione dei DRG o la somministrazione *in vivo* di oxaliplatino determina aumento della sensibilizzazione alla capsaicina del TRPV1 espresso nei neuroni sensitivi. Alcuni studi indicano che la rapida sensibilizzazione del canale TRPV1 sia dovuta ad una modificazione post trasduzionale simile a quella osservata nel rapido inserimento del TRPV1 nella membrana dopo l'attivazione della proteina chinasi A e fosforilazione del TRPV1, altri autori ritengono che sia dovuta probabilmente all'aumento dell'adenosinmonofosfato ciclastasi intracellulare (Anand *et al.*, 2010).

TRPV4

Il canale TRPV4 sembra essere coinvolto, non solo nei normali stimoli nocicettivi, ma nei meccanismi coinvolti nella cronicizzazione del dolore ed in particolare nell'iperalgia meccanica associata a CIPN (Alessandri-Haber *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2007). In modelli sperimentali di neuropatia periferica associata a chemioterapici, alcolismo o diabete, la somministrazione intratecale di inibitori dell'espressione del gene TRPV4 riduce parzialmente lo sviluppo dell'iperalgia

meccanica indotta da paclitaxel. In modo analogo, la somministrazione di paclitaxel e vincristina in topi KO per il TRPV4, induce una ridotta iperalgesia meccanica, rispetto ai corrispettivi topi WT (Alessandri-Haber *et al.*, 2004).

Il ruolo del TRPV4 nella neuropatia periferica, indotta da paclitaxel, sembra non essere correlata all'aumento del suo livello di espressione, ma piuttosto sembra attribuibile ad una interazione con le vie di segnalazione dei secondi messaggeri (Alessandri-Haber *et al.*, 2004). Diversi studi indicano, inoltre, che il canale TRPV4 non subisce diretta attivazione da parte dei farmaci antitumorali, ma viene attivato da un complesso di fenomeni che si verificano in seguito ad un processo infiammatorio. Questi fenomeni possono attivare una cascata di vie di segnalazione, promosse da integrine, le quali per stimolazione della tirosina chinasi (Src), inducono attivazione del canale TRPV4 (Alessandri-Haber *et al.*, 2008). Le tirosin-chinasi sono note per la loro funzione regolatrice dell'attività dei canali ionici tra cui anche i canali TRP (Xu *et al.*, 2003; Odell *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005; Sternfeld *et al.*, 2007).

Un altro studio riporta che paclitaxel evoca iperalgesia meccanica e allodinia termica anche attraverso l'aumento delle triptasi, le quali dopo attivazione dei recettori delle proteasi 2 (PAR2), sensibilizzano i canali TRPV1, TRPV4 e TRPA1 co-espressi sui neuroni sensitivi primari (Chen *et al.*, 2011). L'attivazione dei PAR2 porta a produzione di proteina chinasi A e C ϵ e fosfolipasi C che fosforilando i canali TRP, li attiva. Infatti, il blocco a valle delle vie di segnalazione dei PAR2, attenua significativamente l'ipersensibilità meccanica e termica indotta da paclitaxel (Chen *et al.*, 2011).

TRPM8

Anche il TRPM8 sembra sia coinvolto nella manifestazione dell'ipersensibilità al freddo causata da farmaci antitumorali. Quest'affermazione è supportata da uno studio condotto sui topi in cui la somministrazione di oxaliplatino seguita da aumento dell'ipersensibilità al freddo era accompagnata dall'incremento nell'espressione dell'mRNA che codifica per il TRPM8 nei gangli spinali, suggerendo che l'aumento dell'ipersensibilità al freddo è almeno in parte dovuto alla maggiore espressione di TRPM8 nei neuroni sensitivi primari (Gauchan *et al.*, 2009). Questa ipotesi è stata avvalorata da un'altra ricerca in cui la somministrazione di icilina, un agonista non selettivo del TRPM8, determina un'alterazione

comportamentale nei topi trattati con oxaliplatino, rispetto a quelli non esposti ad icilina (Gauchan *et al.*, 2009). Altri studi hanno dimostrato, invece, che l'oxaliplatino agisce selettivamente sul TRPA1 piuttosto che sul TRPM8, in quanto la sensibilizzazione all'icilina dovuta al trattamento con l'antitumorale coinvolge il canale TRPA1, piuttosto che il TRPM8 (Anand *et al.*, 2010). In letteratura sono riportati anche dei casi in cui l'applicazione topica del mentolo, agonista del TRPM8 e del TRPA1, genera un effetto analgesico nella CIPN indotta da bortezomib (Colvin *et al.*, 2008) o carboplatino (Combadiere *et al.*, 2013), tuttavia il meccanismo con cui ciò avviene non è stato ricercato. Quindi l'applicazione topica continua del mentolo durante la chemioterapia sembra in grado di impedire il peggioramento della neuropatia senza manifestazione di effetti negativi, tuttavia il ruolo maggiore di uno o dell'altro canale TRPA1 o M8 non è stato ricercato.

TRPA1

Data la sua localizzazione a livello dei neuroni sensitivi primari e il suo ruolo come sensore di stress ossidativo il canale TRPA1 sembra svolgere un ruolo importante nella CIPN (Nassini *et al.*, 2011; Materazzi *et al.*, 2012).

Esistono pareri contrastanti sul ruolo del canale TRPA1 nell'ipersensibilità al freddo indotta da oxaliplatino, alcuni studi riportano un suo coinvolgimento essenziale (Nassini *et al.*, 2011) altri suggeriscono che in realtà è l'attivazione del canale TRPM8 a generare tale fenomeno (Descœur *et al.*, 2011). Attraverso indagini genetiche e farmacologiche è stato dimostrato che l'ipersensibilità meccanica e al freddo, indotte nei topi e ratti in seguito a trattamento con oxaliplatino e cisplatino, risulta completamente mediata dall'attivazione del canale TRPA1 attraverso un meccanismo in cui sembra coinvolta la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Nassini *et al.*, 2011). Questa modalità d'attivazione è stata confermata dalla co-somministrazione di sostanze antiossidanti, quali acido- α -lipoico, acetil-L-cisteina e vitamina C, che riducono il dolore neuropatico (Nassini *et al.*, 2011).

Altre ricerche hanno permesso di capire che l'iperalgia meccanica indotta dal paclitaxel, in parte, è mediata dal canale TRPV4 (Alessandri-Haber *et al.*, 2004) ed in parte dall'attivazione del TRPA1 (Materazzi *et al.*, 2012) a differenza dell'allodinia al freddo, dovuta esclusivamente all'attivazione del canale TRPA1 (Materazzi *et al.*, 2012).

Dunque, una possibile via di attivazione comune da parte di molecole chimicamente diverse come lo sono i farmaci a base di platino e i taxani è rappresentata dalla sensibilizzazione del TRPA1 da parte dello stress ossidativo causato dagli antitumorali nelle diverse cellule e tessuti (Joseph *et al.*, 2008; Ramanathan *et al.*, 2005).

L'aumento d'espressione del TRPA1 sui neuroni DRG riportato attraverso studi molecolari (Barriere *et al.*, 2012) non è stato tuttavia confermato da esperimenti funzionali (Ta *et al.*, 2010).

In un modello di ratto diabetico sembra che l'iperalgia al freddo indotta da paclitaxel sia dovuta oltre che all'attività del TRPA1 anche a quella della proteina Nav1.8. Il potenziamento dell'ipersensibilità al freddo può derivare dalla combinazione tra la produzione mitocondriale di H₂O₂ indotta da paclitaxel e l'aumento d'espressione del TRPA1 indotto da H₂O₂ (Barriere *et al.*, 2012). Dunque, sulla base di queste conoscenze sembra che il canale TRPA1 sia fortemente coinvolto nella neuropatia periferica indotta da farmaci antitumorali.

2. SCOPO DELLA TESI

I *transient receptor potential channel* (TRP) comprendono un vasto ed eterogeneo gruppo di recettori canale di membrana con numerose ed importanti funzioni fisiopatologiche. Il ruolo fondamentale di questi canali è sottolineato dalla loro ampia distribuzione nella maggior parte degli organi e tessuti (Clapham et al., 2003a). Il canale TRPA1, uno degli ultimi membri di questa famiglia ad essere stato scoperto (Jaquemar et al., 1999), presenta delle peculiari caratteristiche che lo rendono un interessante oggetto di studio. Il TRPA1, come i canali TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 e TRPM8, è espresso nei neuroni sensitivi primari dei gangli delle radici dorsali, trigeminali, nodosi e vagali (Levine et al., 2007) che danno origine a fibre nervose afferenti che trasducono segnali sensoriali di varia natura (meccanica, chimica e termica). Sappiamo inoltre che il recettore TRPA1 risulta co-espresso con il TRPV1, il canale attivato dalla capsaicina, in una sottopopolazione di neuroni, per tale motivo definiti capsaicino-sensibili, che corrispondono ai nocicettori (Story et al., 2003) in quanto in grado di trasdurre a livello centrale stimoli di natura dolorosa. L'attivazione del canale TRPA1, espresso a livello neuronale, causa, tramite il rilascio di neuropeptidi proinfiammatori (SP e CGRP), dolore ed infiammazione neurogenica.

Recentemente è stato ampiamente discusso come il recettore TRPA1 possa essere considerato un sensore di danno tissutale, in quanto esso viene attivato da numerose molecole endogene o esogene di natura irritante e mediatori infiammatori, generati anche dallo stress ossidativo (Trevisani et al., 2007; Andersson et al.; 2008; Andrè et al., 2008; Materazzi et al., 2008; Taylor-Clark et al., 2009). Il ruolo di sensore dello stress ossidativo rende il TRPA1 un recettore rilevante per la patogenesi di patologie dell'apparato respiratorio, come asma o BPCO (Caceres et al., 2009). Dobbiamo anche ricordare che il TRPA1 è stato inizialmente clonato da fibroblasti polmonari fetali umani (Jaquemar et al., 1999). Studi recenti hanno evidenziato l'espressione del recettore TRPA1 in alcuni tipi cellulari non neuronali del tratto gastroenterico (Nozawa et al., 2009) e su cellule endoteliali vascolari (Earley et al., 2009) e, recentemente è stato anche localizzato nelle cellule della membrana basale dell'epidermide (Anand et al., 2008).

Gli obiettivi della presente tesi sono stati diretti ad evidenziare e valutare ulteriormente l'espressione del canale TRPA1, identificato inizialmente a livello dei neuroni sensitivi primari, in vari organi e tessuti a livello non neuronale e identificarne coinvolgimento nelle varie patologie croniche infiammatorie e dolorose.

Sulla base dei dati presenti in letteratura nei nostri studi abbiamo ipotizzato che il canale TRPA1 potesse essere espresso nel tessuto polmonare, anche a livello non neuronale, ed in particolare a livello delle cellule epiteliali delle vie aeree e dell'alveolo polmonare, che costituiscono un elemento fondamentale nei meccanismi che regolano varie patologie respiratorie. Questa ipotesi risulta suffragata dall'osservazione che nel polmone di ratto i livelli di mRNA per il canale TRPA1 risultano essere piuttosto elevati (Stokes et al., 2006). Inizialmente è stata valutata l'espressione del recettore TRPA1 in cellule epiteliali alveolari umane e, successivamente, ne è stata evidenziato il ruolo da un punto di vista funzionale. Pertanto, mediante le tecniche di Real-Time PCR ed immunocitochimica, abbiamo testato l'espressione del recettore TRPA1 in linee cellulari e colture primarie di cellule epiteliali umane residenti nelle vie aeree terminali (A549, SAEC) e nei fibroblasti fetali polmonari umani (IMR90). Successivamente, mediante esperimenti di *calcium imaging* abbiamo valutato la risposta funzionale di tali canali ad agonisti selettivi TRPA1, in presenza o meno di pretrattamento con antagonisti selettivi. Infine, ci siamo soffermati sull'aspetto fisiopatologico ed abbiamo preso in considerazione il danno cellulare (principalmente apoptosi) indotto dall'apertura del canale ed il conseguente ingresso massivo di ioni Ca^{2+} .

Inoltre, l'identificazione dell'espressione di canali ionici TRPA1 in vari distretti tissutali e tipi cellulari rappresenta un'area di ricerca di estremo interesse ed in rapido avanzamento, che sta mettendo in luce funzioni inattese di questo recettore pleiotropico, sia nella fisiologia che nella patologia d'organo rendendolo un ottimo possibile bersaglio in ambito terapeutico. Molti studi suggeriscono un ruolo chiave di alcuni membri della famiglia di canali ionici Transient Receptor Potential (TRP), tra cui il sottotipo anchirinico 1 (TRPA1) (Toxicol 2012;291:1) in modelli di dolore infiammatorio e neuropatico. Il canale TRPA1 è co-espresso con i sottotipi vanilloidi 1 e 4 (TRPV1 e TRPV4) in un sottogruppo di neuroni sensitivi primari peptidergici (nocicettori). Di fondamentale importanza per il presente progetto sono le

osservazioni che il TRPA1, come sensore di stress ossidativo, in quanto attivato da specie reattive dell'ossigeno (ROS). Gli agenti chemioterapici che provocano CIPN sono in grado di aumentare lo stress ossidativo nell'uomo e negli animali da esperimento, e infine l'uso di antiossidanti produce beneficio in modelli di CIPN.

Un altro filone della nostra ricerca è stato quello di analizzare il ruolo del canale TRPA1 nell'ipersensibilità meccanica e da freddo associata alla terapia con alcuni chemioterapici. Abbiamo studiato il contributo dei neuroni sensitivi primari, ed in particolare del recettore TRPA1, nel mediare gli effetti dolorosi associati alla terapia con chemioterapici. A tale scopo sono stati condotti studi di *calcium imaging* su colture primarie di neuroni sensitivi primari e su cellule trasfettate con il cDNA che codifica la proteina canale TRPA1 umana per valutare la capacità di paclitaxel e oxaliplatino di indurre mobilitazione di Ca^{2+} intracellulare tramite attivazione del canale TRPA1. Sono stati inoltre allestiti modelli *in vivo* per stabilire il ruolo del recettore TRPA1 nel mediare gli effetti dolorosi associati al trattamento, locale e sistemico, con Paclitaxel e oxaliplatino. Quindi, tramite studi farmacologici, caratterizzati dall'impiego di antagonisti selettivi dei TRP, e studi genetici, eseguiti impiegando topi *wild type* e topi *KO* per il gene *trpa1* (rispettivamente, *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-}) è stato possibile studiare il contributo del recettore TRPA1 espresso nei neuroni sensitivi primari negli stati dolorosi associati alla somministrazione dei due antitumorli.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

3.1.1 IMR90

Gli IMR90 sono fibroblasti derivati dal tessuto polmonare di un feto femmina di 16 settimane, di origine Caucasica (ottenute da American Type Culture Collection, ATCC). Le cellule IMR90 sono state cresciute in adesione in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Euroclone) contenente siero fetale bovino (FBS; Euroclone) al 10% (v/v), L-glutamina (Euroclone) 2 mM, penicillina/streptomicina (Euroclone) 1% (v/v) e mantenute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni 3 giorni e le cellule sono state divise (1:5) una volta alla settimana.

3.1.2 A549

Le A549 sono una linea di cellule epiteliali alveolari umane, derivanti da un paziente affetto da carcinoma polmonare (ATCC). Mantengono le caratteristiche delle cellule epiteliali alveolari di tipo II, come la presenza di corpi multilamellari citoplasmatici e la capacità di sintetizzare le proteine del surfattante. Le A549 crescono in adesione e vengono coltivate in RPMI (Euroclone), contenente FBS al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, penicillina/streptomicina 1% (v/v) e HEPES 1 mM. Le cellule sono state mantenute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C.

3.1.3 SAEC

Le SAEC (Small Airway Epithelial Cells) sono cellule primarie di tipo epiteliale, isolate dalla zona distale delle piccole vie aeree (Lonza S.r.l., Basel, Switzerland). Le cellule sono state coltivate in SAEC basal medium contenente supplementi di crescita (SingleQuots®) forniti dalla ditta produttrice e coltivate secondo il protocollo indicato (SAGM BulletKit, Lonza S.r.l., Basel, Switzerland). Le cellule sono state mantenute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C.

3.1.4 NCTC 2544

Le NCTC 2544, gentilmente donate dal Prof. Roberto Maffei Facino (Università degli Studi di Milano), sono una linea cellulare di cheratinociti umani. Le cellule sono state coltivate in DMEM contenente FBS al 10% (v/v), L-glutammina 2 mM, penicillina/streptomina 1% (v/v) e cresciute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C. Il terreno è stato cambiato ogni 3 giorni e le cellule sono state divise (1:3) tre volte alla settimana. Le cellule sono state mantenute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C.

3.1.5 HEK293-TRPA1

Cellule HEK293 (Human Embryonic Kidney) transfettate con il gene che codifica per il recettore canale TRPA1 di ratto (HEK293-TRPA1) o con il vettore vuoto (HEK293-Vec) sono state gentilmente donate dal Prof. Nigel W. Bunnett (UCSF; San Francisco, CA). HEK293-TRPA1 e HEK293-Vec sono state create utilizzando il sistema Flp-In (Invitrogen) secondo le indicazioni della ditta produttrice. In breve, le HEK293 sono state trasfettate stabilmente con un plasmide contenente il cDNA del gene che codifica per il recettore TRPA1 di ratto inserito sotto il controllo trascrizionale di un promotore inducibile, tetraciclina-dipendente, o con il plasmide vuoto. Pertanto l'aggiunta di tetraciclina (0.1 µg/ml per 16 ore) al terreno di coltura, contenente Irgomicina 50 µg/ml e Blastidina 10 µg/ml, determina l'espressione del recettore TRPA1. HEK293-Vec, anch'esse stimulate con tetraciclina, sono state utilizzate come controllo negativo. Le cellule sono state mantenute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C.

3.1.6 HBSMc

Le HBSMc (Promocell-cellule muscolari primarie), sono cellule muscolari primarie umane (ATCC). Le cellule sono state coltivate in DMEM contenente FBS al 10% (v/v), L-glutammina 2 mM, penicillina/streptomina 1% (v/v) e cresciute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C. Le cellule sono state mantenute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C.

3.1.7 CHO-mTRPA1

Le CHO-mTRPA1 (Chinese hamster ovary) sono state gentilmente donate dal professor Nilius. Le cellule sono state coltivate in DMEM (high glucose) (Gibco 41965-039) contenente tetraciclina free 10% inattivato a 55°C per 1 ora; penicillina/streptomina (Gibco 15070-071), 100U mL⁻¹-100µg mL⁻¹ = 2%; Glutamax (Gibco 35050-038) 10mM = 2%; 5ml Non-Essential-Amino-Acid (Gibco 1140-035)=1%; 1ml Hygromicina (200µg/ml) e 500µl Blastidina 5µg/ml. Le cellule sono state mantenute in incubatore al 95% di aria e 5% di CO₂, a 37°C.

3.2 RILASCIO DI IL-8

Per valutare l'effetto della stimolazione del canale TRPA1 sul rilascio di citochine infiammatorie abbiamo quantificato il rilascio di interleuchina-8 (IL-8) nel sovrinatante cellulare mediante metodo ELISA. Le cellule, SAEC, sono state piastrate in multiwell da 48 pozzetti ad una densità di 104 cellule per pozzetto e lasciate crescere fino all'80-90% circa di confluenza prima di essere stimulate. Ogni trattamento è stato eseguito in triplicato. Le cellule sono state trattate con CSE (0.02 e 0.05 OD) o TNF- α (10 ng/ml; come controllo positivo) per 18 ore a 37°C al 5% di CO₂. Al termine della stimolazione i supernatanti sono stati recuperati e sugli stessi sono stati eseguiti i dosaggi ELISA. Per studiare l'effetto del canale TRPA1 sul rilascio di IL-8 da parte delle cellule alveolari umane, le cellule sono state trattate con CSE o TNF- α in presenza di antagonisti selettivi per il canale TRPA1, quali AP18 (5 µM) e HC-030031 (30 µM). Per il dosaggio dell'IL-8 è stato usato un saggio immunoenzimatico per human-IL-8 (Invitrogen) secondo le istruzioni della ditta produttrice. I dati sono stati espressi in pg/ml.

3.3 SAGGIO DI VITALITA'

Al fine di valutare eventuali effetti sulla vitalità cellulare indotti dai trattamenti con TRPA1 agonisti e/o antagonisti impiegati nello studio del rilascio di IL-8 nelle cellule epiteliali alveolari in parallelo ai suddetti esperimenti sono stati

effettuati saggi della vitalità cellulare. In particolare è stato utilizzato il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), una molecola di colore giallo, che viene ridotta a formazano, un sale di colore blu-violaceo, dagli enzimi cellulari, in particolare mitocondriali: lo sviluppo di colore è quindi indice di vitalità cellulare. In breve, al termine del trattamento veniva aggiunto MTT alla concentrazione finale di 0.5 mg/ml ed incubato per 30 minuti a 37°C. Al termine dell'incubazione i sovrinatanti venivano aspirati e le cellule ancora adese lavate in PBS prima di aggiungere DMSO. Il multiwell è stato poi passato all'analizzatore di piastra dove è stata misurata l'assorbanza a 570 nm, la lunghezza d'onda alla quale assorbe il formazano. La vitalità cellulare è stata espressa quindi come percentuale dei valori misurati nei pozzetti non trattati, corrispondenti al 100%.

3.4 ISOLAMENTO DEI NEURONI SENSITIVI PRIMARI

Le colture primarie di neuroni sensitivi primari sono state ottenute isolando i neuroni da gangli delle radici dorsali di ratto o di topo. Dopo anestesia con dose sub-letale di sodio pentobarbitale (50 mg/kg, i.p.) gli animali sono stati sacrificati ed isolata la porzione interessata. Con l'aiuto di un microscopio binoculare sono stati isolati i gangli, rapidamente ripuliti dalle terminazioni e da altro materiale residuo circostante e, in fine, messi in 2 ml di Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) a 4°C. I gangli sono stati quindi sottoposti ad una dissociazione enzimatica con collagenasi (2mg/ml) e tripsina (1mg/ml) per 30 minuti a 37°C. Successivamente i gangli sono stati trasferiti in 2 ml di medium della seguente composizione: Minimum essential medium eagle (MEME), Penicillina/Streptomicina (100 U/ml e 100 UG/ml, rispettivamente), L-glutammina (2mM), Fetal Bovine Serum (FBS, 10%) e siero di cavallo (HS, 10%) per le colture primarie di ratto o di topo. I gangli sono stati quindi sottoposti a dissociazione meccanicamente tramite una triturazione effettuata con siringhe ed aghi di diverso calibro (23G e 25G). La soluzione contenente le cellule è stata filtrata e centrifugata. Il pellet ottenuto è stato poi sospeso nuovamente in un'aliquota di medium, addizionato con Fattore di crescita neuronale (NGF7S mouse 100 ng/ml) e un inibitore mitotico, Citosina-b-D-arabinofuranoside (2.5 µM). Infine, le cellule sono state piastrate su vetrini coprioggetto precedentemente trattati con

poly-L-Lysina (8 μ M, 30 min) e con laminina (5 μ g/petri). Dopo 3/4 giorni le cellule possono essere utilizzate per gli esperimenti di *calcium imaging*.

3.5 REAL-TIME REVERSE-TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

Per la valutazione e quantificazione dell'espressione di mRNA per il recettore canale TRPA1 nei differenti tipi cellulari ci siamo avvalsi della tecnica della Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Esperimenti preliminari di tipo funzionale avevano dimostrato che le NCTC 2544 non rispondono alla stimolazione con agonisti del canale TRPA1 e pertanto sono state utilizzate come controllo negativo della reazione di RT-PCR, mentre cellule IMR90, responsive alla stimolazione del canale TRPA1, sono state impiegate come controllo positivo per la reazione di amplificazione.

Isolamento di RNA totale. Il RNA totale è stato estratto dalle cellule A549, SAEC, IMR90 e NCTC 2544, utilizzando un kit (NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel) in base alle istruzioni della ditta produttrice. La concentrazione e la purezza del RNA è stata determinata misurando l'assorbanza a 260nm (A260) e 280nm (A280), utilizzando uno spettrofotometro. Il rapporto di assorbanza A260/A280 è stato considerato accettabile quando compreso tra i valori di 1.8 e 2.1.

Retrotrascrizione. Per la reazione di retrotrascrizione è stato utilizzato uno specifico kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems) seguendo le indicazioni della ditta produttrice. In breve, la reazione di trascrizione inversa è stata effettuata mediante l'incubazione di 1 μ g di RNA estratto, con primer casuali (2,5 μ M), dNTPs (500 μ M), un inibitore della RNase (0,4 U/ μ L), e l'enzima Multiscribe RT (1,25 U/ μ L), in un volume totale (tampone di reazione 1x) di 100 μ L. La trascrizione inversa è stata effettuata con il seguente protocollo: 25°C per 10 minuti, 37°C per 120 minuti e interrotta da una incubazione a 80°C per 5 minuti.

Real-time PCR. I primer per la PCR e le sonde specifiche TaqMan per il gene target, TRPA1, e per il gene di riferimento, GAPDH, sono stati acquistati dalla ditta produttrice (Applied Biosystems). Entrambe le sonde risultano marcate con lo stesso reporter: FAM, 6-carbossi fluoresceina, legato all'estremità 5', e lo stesso quencher, TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine, legato all'estremità 3'. Tutte le reazioni di

PCR sono state eseguite utilizzando un ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem), con il seguente protocollo: dopo incubazione iniziale a 50°C per 2 minuti, e 95°C per 3 minuti, sono stati eseguiti 40 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto.

I risultati della Real-Time PCR sono stati rappresentati come valori del Ct, dove Ct è stato definito come il ciclo soglia al livello del quale si ha la rilevazione del prodotto amplificato. I valori di Ct sono stati quindi analizzati utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.6 IMMUNOCITOCHIMICA

Per la valutazione qualitativa dell'espressione della proteina canale TRPA1 nelle NCTC 2544, A549, SAEC ed IMR90 ci siamo avvalsi della metodica di immunocitochimica, utilizzando un anticorpo primario policlonale specifico per la proteina TRPA1 (Neuromics). Le cellule sono state cresciute, fino a raggiungere una confluenza del 70-80%, direttamente su vetrino. Successivamente il terreno di coltura è stato rimosso e i vetrini sono stati lavati con PBS (phosphate buffer saline) e fissati con etanolo al 95% per 10 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati poi immersi in una soluzione di acqua ossigenata (H₂O₂) al 3% in acqua distillata, per 10 minuti. La presenza di H₂O₂ induce l'inibizione delle perossidasi endogene, evitando un eccesso di substrato. Il blocco dei siti antigenici aspecifici è stato ottenuto incubando i vetrini in siero (LabVision) per 5 minuti. I vetrini sono stati quindi incubati con l'anticorpo primario anti-TRPA1 (diluizione 1:200), per 1 ora a temperatura ambiente. Sono quindi stati eseguiti due lavaggi di 10 minuti ciascuno con PBS, e successivamente i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo secondario biotinilato (LabVision) per 10 minuti, a temperatura ambiente. I vetrini sono stati lavati due volte in PBS e quindi trattati con streptoavidina coniugata con la perossidasi (LabVision). Per visualizzare l'immunoreattività, le cellule sono state incubate per 5 minuti con il cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (LabVision) (Figura 9). I nuclei delle cellule sono stati contro-colorati con ematossilina di Mayer (2 minuti). I controlli negativi sono stati allestiti allo stesso modo, sostituendo l'anticorpo primario con un siero non immune. I vetrini sono stati infine sottoposti ad un ciclo completo di disidratazione attraverso i passaggi successivi in acqua, etanolo

70%, 90%, 95%, 100%, e xilene per 60 secondi, quindi i vetrini coprioggetto sono stati montati con qualche goccia di Permount (Sigma) per l'osservazione al microscopio (Nikon Eclipse 50i). Le cellule sono state infine fotografate con una fotocamera digitale (Nikon DS-Ri1) e, le immagini ottenute, elaborate ed analizzate con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe System).

3.7 CALCIUM IMAGING

Per valutare l'attivazione funzionale del canale cationico TRPA1 è stata utilizzata la tecnica del calcium imaging (Trevisani et al., 2002). Per gli esperimenti di mobilizzazione di Ca^{2+} intracellulare $[Ca^{2+}]_i$ in singola cellula, le cellule sono state incubate a $37^{\circ}C$ per circa 45 minuti con Fura-2-AM-estere ($5 \mu M$), diluito in una soluzione dalla seguente composizione: $CaCl_2$ 1.4 mM, KCl 5.4 mM, $MgSO_4$ 0.4 mM, NaCl 135 mM, D-Glucosio 5 mM, HEPES 10 mM e BSA (0.1%), pH 7.4. Il Fura-2AM, fluoroforo derivato dal composto chelante il calcio EGTA, viene utilizzato come indicatore fluorescente della concentrazione del calcio citosolico. Il Fura-2, infatti, sotto forma di acetossimetilestere (Fura-2-AM), penetra facilmente nel citoplasma attraverso la membrana plasmatica dove è substrato di esterasi aspecifiche e quindi intrappolato in forma acida libera. Quando il Fura-2 è legato allo ione Ca^{2+} assorbe ad una lunghezza d'onda di 340 nm, mentre quando è in forma libera assorbe a 380 nm; in entrambi i casi esso emette fluorescenza in una singola banda centrata a 510 nm. Il rapporto delle emissioni alle due lunghezze d'onda di eccitazione è proporzionale alla quantità di $[Ca^{2+}]_i$. Questa metodica permette quindi di quantificare le variazioni di $[Ca^{2+}]_i$ nel tempo.

Al termine del caricamento con il fluoroforo, il vetrino con le cellule viene adagiato in una cameretta aperta, termostata ($37^{\circ}C$), che consente di effettuare successivi trattamenti chimici. Al termine di ogni singolo esperimento è stata somministrata ionomicina alla concentrazione finale di $5 \mu M$. La ionomicina è un ionoforo selettivo per lo ione calcio in grado di determinare, alle concentrazioni usate, un aumento della permeabilità di membrana con un conseguente ingresso di calcio dall'ambiente extracellulare. La quantità di calcio mobilizzata in seguito a trattamento con ionomicina è stata valutata come risposta massima del sistema. L'effetto di ogni trattamento è stato espresso come variazione della concentrazione di calcio intracellulare, in percentuale alla risposta massima indotta dalla ionomicina.

Per la determinazione dinamica della concentrazione intracellulare degli ioni Ca^{2+} è stato utilizzato un sistema di analisi di immagine (Laboratory Autotomation 2.0, RCS, Firenze) che consiste in un microscopio inverso per epifluorescenza (Nikon eclipse TE2000-U) dotato di due set di led che emettono luce in banda stretta, centrata rispettivamente a 340 e 380 nm, quindi nella regione ultravioletta dello spettro. I due set di led sono accesi alternativamente ed in modo sincronizzato con l'analizzatore d'immagine e con la telecamera. La luce colpisce uno specchio diecrico che riflette nella regione ultravioletta (340 nm e 380 nm) e devia la radiazione di eccitazione, attraverso l'obiettivo del microscopio, sul preparato. Il Fura-2 contenuto nelle cellule viene eccitato alternativamente a 340 e 380 nm ed emette una radiazione di fluorescenza che, dopo essere stata raccolta dall'obiettivo grazie ad un sistema di filtri, arriva alla telecamera.

Per lo studio della mobilitazione di calcio intracellulare, attraverso la metodica del calcium imaging, le cellule (NCTC 2544, A549, SAEC ed IMR90) sono state piastrate su vetrini coprioggetto del diametro di 25 mm ed utilizzate al 60% di confluenza.

3.8 RELEASE DI NEUORPEPTIDI

Gli esperimenti di release di neuropeptidi sono stati eseguiti da fette di esofago di topo (0.4mm) C57/Bl6, $\text{TRPA1}^{+/+}$ o $\text{TRPA1}^{-/-}$. Dopo anestesia con sodio pentobarbitale (50 mg/kg, i.p.), gli animali sono stati decapitati ed quindi isolati i tessuti interessati. Dopo il prelievo i tessuti vengono immersi in una soluzione di Krebs-Hanseleit avente la seguente composizione: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.18 mM MgSO_4 , 1.20 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 11.1 mM glucosio a pH 7.4, ossigenata, mantenuta ad una temperatura di 4°C. I tessuti sono stati sezionati in fettine di 0.4 mm con un microtomo McElwan e posti in celledette (50-150 mg per pozzetto) termostatate a 37°C, e perfuse con la soluzione di Krebs-Hanseleit ossigenata con una miscela di oxcarb contenete 95% di O_2 , e 5% di CO_2 alla velocità di 0.4 ml/min Nigel W. Dopo 180 minuti di stabilizzazione, si procedeva all'esperimento vero e proprio durante il quale vengono raccolte, ogni 5 minuti, frazioni di 2 ml di relisato. Durante l'esperimento la soluzione di Krebs-Hanseleit è stata modificata aggiungendo fosforamidon (1 μM), inibitore delle endopeptidasi

neutre (NEP), captopril (1 μM), ACE inibitore, e BSA allo 0.1%, per impedire l'adesione dei neuropeptidi alle pareti della vetreria da laboratorio. I tessuti sono stati perfusi con Paclitaxel (10,30,50 μM) o con il suo veicolo (2,5% DMSO). Alcuni tessuti sono stati preesposti a capsaicina (10 μM) per 20 min per desensibilizzare le terminazioni nervose esprimenti TRPV1. Altri esperimenti sono stati condotti in presenza di HC-030031 (30 μM) e HC-067047 (3 μM). Le frazioni di rilascio recuperate sono state riscaldate a 80°C per 10 minuti per eliminare eventuali proteine con attività enzimatica e poi congelate a -80°C. Le frazioni, successivamente liofilizzate, vengono ricostituite in tampone EIA (tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M, BSA 0.1 %, Sodio Azide 0.01%) al momento del dosaggio. Per ogni singolo esperimento è stato dosato sia il rilascio di SP che di CGRP.

Per il dosaggio del CGRP (CGRP-LI, CGRP-like immunoreactivity) è stato impiegato un metodo sviluppato recentemente (Frobert et al., 1999) che utilizza l'anticorpo monoclonale anti-CGRP mAb83. Le piastre (96-well) sono state precedentemente trattate con l'anticorpo primario alla concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$ in tampone fosfato (0.05 M pH 7.4). Al momento del dosaggio i campioni e la curva standard vengono piastrati e, per la rivelazione, viene usato un anticorpo monoclonale anti-CGRP coniugato con acetilcolinesterasi, mAb72-AchE (3000 UE/mm/ml), il quale lega in maniera specifica il CGRP già legato all'anticorpo primario adeso alla piastra. Come tracciante si utilizza il reattivo di Ellman (tampone fosfato 0.01 M pH 7.4, DNTB 0.25 mM, acetilcolina 0.75 mM, NaCl 14.5 mM) il quale coniugandosi con l'anticorpo mAb72-AchE evidenzia la quantità del CGRP presente nella piastra attraverso un cambio di colorazione da trasparente a giallo. La piastra viene quindi letta allo lettore di piastra a 405 nm. La minima concentrazione misurabile è di 2 pg/ml. La variazione intradosaggio è dell'8% e quella interdosaggio del 14% per valori compresi tra 2-250 pg/ml.

Il dosaggio della SP (SP-LI, SP-like immunoreactivities) viene effettuato con il metodo precedentemente riportato (Ricciardolo et al., 2000) che utilizza un sistema immunoenzimatico composto di un primo anticorpo di topo diretto contro IgG del coniglio che si lega alla superficie dei pozzetti. Il dosaggio viene effettuato aggiungendo SP standard (2 pg/ml-250 pg/ml), soluzione di tampone EIA (legante non specifico) e campione. Si aggiunge, quindi, SP marcata con acetilcolinesterasi e infine antisiero anti-SP che lega l'anticorpo di topo diretto contro le IgG del coniglio. A questo antisiero si lega competitivamente la SP presente nel campione incognito e

la SP-AchE. Per la rivelazione viene usato anche in questo caso il reagente di EllmanNigel W. La lettura si effettua a 405 nm come per il dosaggio del CGRP-LI. La minima concentrazione misurabile è di 2 pg/ml. La variazione intradosaggio è del 7% e quella interdosaggio del 15% per valori compresi tra 2-250 pg/ml.

3.9 ANIMALI

I ratti utilizzati per gli esperimenti sono state acquistati da Harlan (Milano, Italia). I topi (ceppo C57BL/6, 25-30 gr) maschi forniti dalla ditta Harlan Laboratories (Milano), topi (C57BL/6) WT (*trpa1^{+/+}*) per il recettore TRPA1 e topi KO (*trpa1^{-/-}*) per il recettore TRPA1 forniti dalla ditta Jackson Laboratories (Sacramento, USA). Tutti gli animali utilizzati sono stati stabulati per almeno due giorni prima dell'esperimento ad una temperatura tra 20 e 22 °C e umidità controllata, con un ciclo di 12 ore di luce e 12 di buio e con libero accesso a cibo ed acqua. Gli esperimenti comportamentali sono stati effettuati in un ambiente a temperatura controllata (20-22 °C) tra le 09:00 a.m. e le 05:00 p.m. Gli animali sono stati sacrificati con dosi elevate (200 mg/kg) di fenobarbital sodico intraperitoneale (i.p.). Gli esperimenti sono stati svolti in osservanza alle norme della legislazione italiana (art.4 DL 116/92) e del Consiglio della comunità europea (Direttiva 86/609/CEE) in materia di sperimentazione animale. Gli studi sono stati condotti sotto il permesso n°143/2008-B dell'Università di Firenze, approvato dal Comitato nazionale italiano per la sperimentazione animale.

3.10 MODELLI DI NEUROPATIA DOLOROSA INDOTTA DAI CHEMIOTERAPICI

Studi precedenti hanno riportato che somministrazioni ripetute e prolungate di paclitaxel, in modelli sperimentali di ratto o topo, inducono neuropatia periferica. Sulla base di queste conoscenze, nella prima serie di esperimenti abbiamo valutato se una singola somministrazione di paclitaxel e oxaliplatino, nei topi, genera ipersensibilità meccanica e al freddo, come osservato per altri agenti chemioterapici tra cui oxaliplatino, paclitaxel e vincristina (Nassini et al., 2011; Materazzi et al., 2012). Dopo aver abituato gli animali e aver fatto le misurazioni basali di sensibilità al dolore, gli stessi sono stati randomizzati in diversi gruppi di trattamento. Topi C57BL/6, topi (*trpa1^{+/+}*) e (*trpa1^{-/-}*) sono stati trattati

con una singola somministrazione intraperitoneale (i.p.) di paclitaxel a dosi differenti (0.2, 0.5 e 1 mg/kg) o con il suo veicolo dimetilsolfossido (DMSO 1%) (Bruna et al., 2010). Paclitaxel, formulato ad una concentrazione di 1 mg/ml, è stato sciolto in un veicolo di DMSO e il volume è stato aggiustato a 10 ml/kg per una concentrazione finale di DMSO 1% ed infine la soluzione è stata diluita in soluzione salina isotonica (NaCl 0.9%) per ottenere dosi più basse. Un altro gruppo di topi C57BL/6 è stato trattato con una singola somministrazione (i.p.) di oxaliplatino ad una dose di 3 mg/kg o del suo veicolo (soluzione salina isotonica, NaCl 0.9%) (Nassini et al., 2011). Dopo la somministrazione di paclitaxel o oxaliplatino, nei topi, non è stata osservata nessuna perdita di peso per tutta la durata degli esperimenti. Inoltre, gli effetti indotti da paclitaxel ed oxaliplatino sono stati valutati, rispettivamente, per 14 e 30 giorni (a partire da 6 ore successive alla somministrazione del farmaco), mentre i valori basali dei test nocicettivi sono stati osservati prima dell'inizio del trattamento con il farmaco di riferimento

3.11 STUDI COMPORTAMENTALI

Le risposte nocicettive indotte da paclitaxel e oxaliplatino sono state valutate utilizzando topi C57BL/6 e topi (trap1+/+) e (trpa1-/-) mediante iniezioni intraperitoneali (i.p) dei farmaci.

3.11.1 Test di valutazione dell'allodina meccanica (Von frey hair test)

L'allodinia meccanica, misurata come variazione della soglia di risposta ad una stimolazione meccanica è stata valutata in C57/BL6, topi trap1+/+e trpa1-/- dopo una singola somministrazione i.p. di paclitaxel (0.2, 0.5 e 1 mg/kg) o somministrazione i.p. di oxaliplatino (3mg/kg). Tale tecnica permette di misurare la soglia di risposta ad uno stimolo meccanico utilizzando il sistema di Von Frey. Il test dei filamenti di Von Frey è stato descritto per la prima volta nel 1980 (Dixon., 1980) come metodo per determinare la presenza di ipersensibilità a stimoli meccanici utilizzando filamenti numerati di diversa rigidità, che imprimono una forza crescente. Tali filamenti vengono applicati sulla superficie plantare della zampa posteriore per 3-5 secondi. La risposta indotta da ogni singolo filamento viene misurata valutando la risposta di ritiro della zampa (withdrawal) in seguito all'applicazione dei singoli filamenti che imprimono una forza (tradotta in grammi) crescente. La valutazione della risposta di ogni singolo animale è stata valutata utilizzando il metodo up-down (Chaplan et al., 1994; Dixon 1980) che consente di determinare il valore corrispondente al 50% della soglia di withdrawal. Prima della somministrazione dei

composti gli animali sono stati collocati in gabbie di plastica con un pavimento di rete metallica. La soglia meccanica di ogni singolo animale è stata determinata, prima (livello basale) e dopo i diversi trattamenti. I dati sono espressi come la soglia (espressa in g) di risposta dell'animale, calcolata in seguito ai vari test effettuati come descritto (Chaplan et al., 1994; Dixon., 1980).

3.11.2 Test di stimolazione al freddo (Cold stimulation)

L'allodinia termica al freddo, è stata valutata mediante il test dell'acetone negli animali C57/BL6, topi (trap1+/+) e (trpa1-/-) misurando la risposta nocicettiva acuta all'acetone, evocata dal raffreddamento evaporativo (Materazzi et al., 2012). Il test consiste nell'applicazione di acetone (50 µl) sulla pianta della zampa posteriore dell'animale e successivamente nel monitorare per 60 secondi il tempo di licking, lifting, beating. La risposta alla stimolazione al freddo vengono ottenute dalla media di tre applicazioni di acetone con intervalli di tempo di circa 10-15 minuti.

3.11.3 Iperalgesia chimica

L'iperlgesia chimica è stata valutata misurando la risposta nocicettiva spontanea indotta da somministrazione di 20 µl (i.pl.) di una dose sotto-soglia di allile isotiocianato (AITC; 1 nmol/paw), di capsaicina (0,01 nmol/paw), di soluzione salina ipotonica (NaCl, 0.45%) o della prostaglandina E2 (PGE2, 0.3 nmol/paw) negli animali trattati con oxaliplatino e paclitaxel o con veicolo al settimo giorno dopo la somministrazione. Immediatamente dopo l'iniezione, i topi sono stati collocati all'interno di una camera in plexiglass e il tempo totale trascorso nel licking e lifting della zampa posteriore trattata è stato registrato per 5 minuti per AITC, capsaicina, e soluzione salina ipotonica e per 20 minuti per PGE2. Esperimenti precedenti, condotti nel nostro laboratorio e determinati da altri studi (Alessandri-Haber et al., 2005; Kassuya et al., 2007) hanno suggerito che dosi sottosoglia di ciascuna sostanza utilizzata.

3.12 ANALISI STATISTICA

Tutti i valori riportati sono medie \pm errore standard della media (SEM). I confronti statistici sono stati effettuati mediante il test del t di Student e l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test per il confronto multiplo di Bonferroni. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando $P < 0,05$. L'efficacia degli agonisti è espressa come concentrazione molare che produce il 50% dell'effetto massimo (EC50) \pm intervallo di confidenza (CI).

4. RISULTATI

4.1 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE TRPA1 IN TESSUTI POLMONARI UMANI

In collaborazione con il gruppo di ricerca del professor Lorcan McGarvey (*Queen's University* di Belfast) è stata valutata l'espressione della proteina TRPA1 in biopsie umane di tessuto polmonare, mediante analisi immunohistochimica. In Figura 7A è mostrata la colorazione specifica, ottenuta mediante l'incubazione dei tessuti con un anticorpo diretto contro un *marker* specifico delle cellule epiteliali, la citocheratina. Tale colorazione, in marrone, evidenzia la superficie epiteliale esterna rispetto agli altri strati cellulari del tessuto polmonare. Gli stessi tessuti sono stati trattati con anticorpo selettivo per la proteina TRPA1 umana e come mostrato in Figura 13B, e in Figura 13C a maggiore ingrandimento, i tessuti risultano colorati.

Inizialmente è stata caratterizzata l'espressione dell'RNA messaggero del recettore TRPA1 mediante analisi Real-Time PCR a livello di linee cellulari immortalizzate, A549. Dai risultati è emerso che la linea cellulare A549 esprime l'mRNA del TRPA1. Al fine di escludere la possibilità che l'espressione di tale canale sia correlata ad un evento secondario alla trasformazione cellulare, l'analisi RT-PCR è stata condotta anche a livello di colture primarie IMR90, NHLF, SAEC e HBSMC. Impiegando tale tecnica è stato verificato che i modelli sperimentali oggetto di studio esprimono l'mRNA per il TRPA1, in particolare i fibroblasti polmonari fetali umani, IMR90, e i fibroblasti polmonari umani, NHLF, mostrano livelli di espressione dell'RNA messaggero più elevati rispetto alle SAEC, A549 e HBSMC (Figura 13A). In seguito, mediante analisi immunohistochimica, è stata valutata l'espressione del recettore TRPA1 in biopsie del tratto respiratorio umano (Figura 13B). Dai risultati ottenuti è stato possibile concludere che il TRPA1 è espresso a livello di cellule non neuronali del tratto respiratorio umano, che esprimono marcatori specifici delle cellule epiteliali e muscolari lisce, citocheratina e α -SMA, rispettivamente (Figura 13B). La specificità dell'anticorpo impiegato è stata validata mediante analisi immunohistochimica condotta su tessuto delle vie aeree e polmonare di topi *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-} positivi per i marcatori specifici delle cellule epiteliali e muscolari lisce, citocheratina e α -SMA, rispettivamente (Figura 13C).

I risultati ottenuti confermano che il recettore TRPA1 risulta espresso a livello non neuronale nei tessuti isolati da topi *Trpa1*^{+/+}, ma non nei *Trpa1*^{-/-} (Figura 13C). Tali dati confermano inoltre la specificità dell'anticorpo che riconosce una porzione centrale del recettore, assente nella proteina dei *Trpa1*^{-/-}.

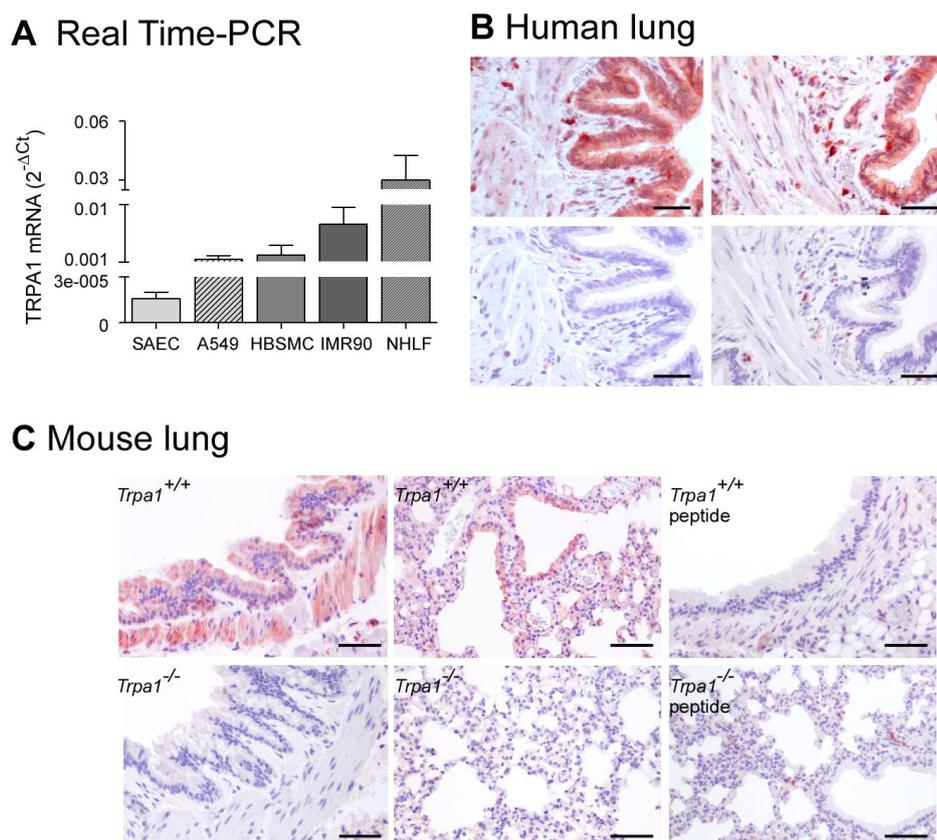


Figura 13. Espressione del recettore TRPA1 in cellule non neuronali del tratto respiratorio umano. (A) RT-PCR per caratterizzare l'espressione dell'mRNA del TRPA1. L'RNA totale è stato estratto da colture primarie e linee cellulari epiteliali polmonari, rispettivamente SAEC e A549, da fibroblasti polmonari umani (NHLF, IMR90) e da colture primarie di cellule muscolari lisce bronchiali, HBSMC. Le barre rappresentano la media \pm SEM di $n \geq 2$ esperimenti indipendenti. (B) Analisi immunohistochimica dell'espressione del TRPA1 condotta a livello di biopsie del tratto respiratorio umano. L'analisi dimostra l'espressione del TRPA1 in cellule epiteliali e muscolari lisce polmonari umane. Controllo negativo con siero non immune (pannello in basso).

4.3 L'ACROLEINA CSE E CNM INDUCONO MOBILIZZAZIONE DI CALCIO INTRACELLULARE IN CELLULE EPITELIALI POLMONARI UMANE

Per caratterizzare il recettore TRPA1 da un punto di vista funzionale, sono stati utilizzati studi di *calcium imaging*, in quanto la colorazione immunocitochimica del recettore, rilevabile sulla superficie delle cellule polmonari, non necessariamente implica che la proteina sia anche attiva (Nozawa et al., 2008). In particolare, per mezzo di agonisti ed antagonisti selettivi è stato possibile studiare l'attivazione diretta del canale TRPA1 nei differenti tipi cellulari A549, SAEC ed IMR90. Come mostrato in Figura 14A la stimolazione delle A549 con acroleina (ACR), noto agonista del recettore TRPA1 (Bautista et al, 2006, Andrè et al 2008), mobilita calcio intracellulare ($[Ca^{2+}]_i$) e tale effetto è concentrazione-dipendente, con un EC_{50} di 36 μM (IC, 27-50 μM). Inoltre, come ulteriore dimostrazione dell'attivazione del recettore TRPA1, sono stati utilizzati antagonisti non selettivi (rosso rutenio, RR) e selettivi (HC-030031), per tale recettore. Come mostrato in Figura 14B la mobilizzazione di $[Ca^{2+}]_i$ ottenuta dalla stimolazione delle cellule con acroleina (30 μM) risulta significativamente ridotta dal pretrattamento delle stesse con i due antagonisti, RR (3 μM) ed HC-030031 (10 μM). Il pretrattamento con gli antagonisti non influisce, invece, sulla risposta delle cellule alla tripsina (TRP), agonista del recettore per le proteasi (PAR-2), utilizzata come controllo interno positivo. Tali dati evidenziano quindi, che l'effetto inibitorio esercitato dagli antagonisti è selettivo per il canale TRPA1. Per caratterizzare la funzionalità del recettore-canale TRPA1 sono stati condotti esperimenti di *calcium imaging* su SAEC (Figura 14A), NHLF (Figura 14B) e HBSMC (Figura 14C) mediante l'impiego di agonisti ed antagonisti selettivi per il TRPA1. In particolare, come agonisti TRPA1 sono stati impiegati acroleina (ACR), cinnamaldeide (CNM) ed estratto di fumo di sigaretta (CSE) che oltre all'acroleina contiene un altro agonista TRPA1, la crotonaldeide (Andrè et al., 2008). Come mostrato in Figura 14, gli agonisti TRPA1 testati inducono un aumento di calcio intracellulare concentrazione-dipendente nei tipi cellulari considerati. Tale effetto risulta significativamente ridotto in seguito al pretrattamento con gli antagonisti selettivi per il TRPA1, AP-18 e HC-030031 (Figura 14). Il pretrattamento con AP-18 o HC-030031 non influisce sulla risposta delle cellule al peptide

SLIGKV-NH₂ (hPAR₂-AP), agonista del recettore attivato dalle proteasi-2 (PAR-2), utilizzato come controllo interno positivo, dimostrando la specificità di azione di tali antagonisti.

Dai risultati è inoltre emerso che il pretrattamento con gli antagonisti selettivi per il TRPA1 abolisce l'effetto indotto dal CSE. Di conseguenza si può concludere che tale evento è completamente mediato dall'attivazione del recettore TRPA1.

Gli stessi esperimenti sono stati ripetuti su colture primarie di cellule epiteliali polmonari delle piccole vie aeree (SAEC) in cui la stimolazione con acroleina ha determinato una mobilizzazione di [Ca²⁺]_i concentrazione-dipendente, con valori di EC₅₀ di 19 μM (IC, 10-36 μM) (Figura 14A). Come per le A549, il pretrattamento delle stesse cellule con l'antagonista selettivo del recettore TRPA1, HC-030031 (10 μM), riduce significativamente la mobilizzazione di [Ca²⁺]_i indotta da acroleina (30 μM).

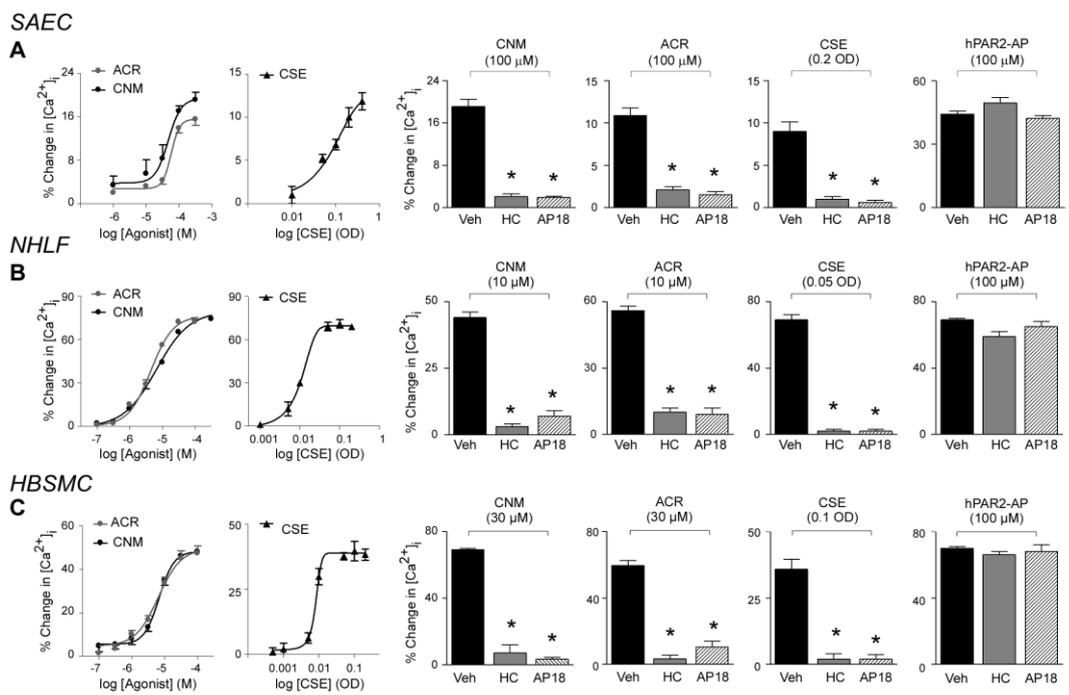


Figura 14. Mobilizzazione di Ca²⁺ intracellulare in seguito a trattamento con agonisti selettivi per il recettore TRPA1. Curve concentrazione-risposta della mobilizzazione di Ca²⁺ intracellulare in seguito a trattamento con acroleina (ACR), cinnamaldeide (CNM) ed estratto di fumo di sigaretta (CSE) nelle colture cellulari di SAEC (A) e HBSMC (C). **Mobilizzazione di Ca²⁺ intracellulare in seguito a pretrattamento con antagonisti TRPA1.** Dati complessivi della mobilizzazione di Ca²⁺ intracellulare nelle SAEC (A) e HBSMC (C) indotta da ACR (30 μM) in presenza di pretrattamento con HC-030031 (10 μM) e AP18 (10 μM). Ogni colonna rappresenta la media ± SEM di almeno 25 cellule per ogni condizione sperimentale. *, P < 0.05 vs. cellule pretrattate con il veicolo degli antagonisti (DMSO 1%) (ANOVA).

Complessivamente i risultati ottenuti dimostrano che il canale TRPA1 è espresso a livello delle cellule epiteliali e delle cellule muscolari lisce delle vie aeree umane, confermandone, oltre all'espressione, una ben definita attività funzionale. Studi presenti in letteratura riportano che l'esposizione al fumo di sigaretta (CS) induce il rilascio di mediatori dell'infiammazione, quali interleuchina-1 β (IL-1 β), chemochina KC (proteina chemoattrattante dei neutrofili), metalloproteinasi-9, IL-2 (Ref), nel liquido derivante dal lavaggio broncoalveolare di topi *Trpa1*^{+/+}, ma non nei *Trpa1*^{-/-}.

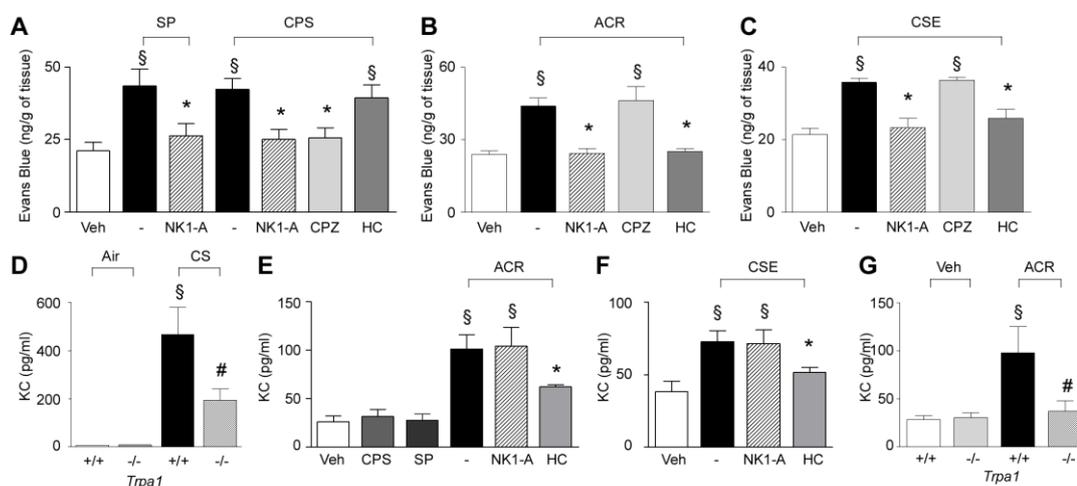


Figura 15. Release di KC in vivo, attraverso un meccanismo non neuronale TRPA1 dipendente. (A) L'instillazione intratracheale (i.t., 30 μ l) in topi C57BL/6 di sostanza P (SP, 25 nM) e capsaicina (CPS, 100 μ M) aumenta in trachea e bronchi l'extravasazione Evans blue dye (PPE), un effetto prevenuto da L-733,060 (antagonista recettoriale NK1, NK-1A; 2 μ mol/kg, i.v.) e capsazepina (CPZ; 30mg/Kg, i.p.), ma non da HC-030031 (HC;300 mg/kg, i.g.). (B) L-733,060 e HC, ma non CPZ prevengono l'aumento di PPE in trachea e bronchi di topi C57BL/6 indotto da acroleina (ACR, 5mM, i.t.)- ed (C) estratto di fumo di sigaretta(CSE,1 OD, i.t.).

L'effetto di ACR e CSE risulta selettivamente annullato del pretrattamento con HC-030031. Lo stravasato di plasma mediato da tutti gli stimoli condotti è revertito dal pretrattamento con l'antagonista selettivo del recettore NK1. Complessivamente

questi dati indicano che la stimolazione sia del recettore TRPV1 sia del recettore TRPA1 determina infiammazione neurogenica nel vie aeree di topo e tale fenomeno risulta associato all'attivazione del recettore NK1. Sulla base di queste evidenze, sono stati condotti esperimenti al fine di verificare se l'attivazione del recettore TRPA1 determina il rilascio di mediatori dell'infiammazione. Nel presente studio è stato confermato che iniezioni di ACR, CSE, CPS o SP nella trachea di topi C57BL/6 determina stravasato di plasma (PPE), tale effetto risulta annullato dal pretrattamento con l'antagonista del recettore di SP (NK1) (Figura 15A-C).

Evidenze sperimentali dimostrano che l'esposizione di cellule epiteliali alveolari e bronchiali all'acroleina o al CSE, maggiori responsabili dell'induzione di patologie infiammatorie croniche delle vie respiratorie, in particolare BPCO, induce rilascio di interleuchina-8 (IL-8) (Moretto et al., 2009). Questa citochina è un potente fattore chemotattico secreto dalle cellule epiteliali alveolari e bronchiali in condizioni di infiammazione cronica e danno epiteliale in risposta a citochine proinfiammatorie come il TNF- α e l'IL-1, ma anche in seguito a stimoli irritanti come ozono, tossine batteriche e fumo di sigaretta (Mio et al., 1997; Moretto et al., 2009). I livelli di IL-8 risultano aumentati in presenza di patologie a carattere infiammatorio a livello dell'apparato respiratorio, quali asma e BPCO. Alla luce di queste evidenze, sono stati effettuati degli esperimenti al fine di verificare il coinvolgimento del recettore TRPA1 nel mediare il rilascio di IL-8 indotto dagli agonisti del TRPA1 stesso, ACR e CSE. Dai risultati è emerso che la stimolazione *overnight* dei tipi cellulari SAEC e HBSCMC con ACR induce un rilascio concentrazione-dipendente di IL-8 misurato mediante saggio ELISA (Figura 16).

Risultati analoghi sono stati ottenuti stimolando *overnight* gli stessi tipi cellulari con CSE con densità ottica (OD) compresa tra 0.01 e 0.07 (Figura 17). Il pretrattamento con HC-030031 e AP-18 riduce significativamente il rilascio di IL-8 indotto da ACR e CSE.

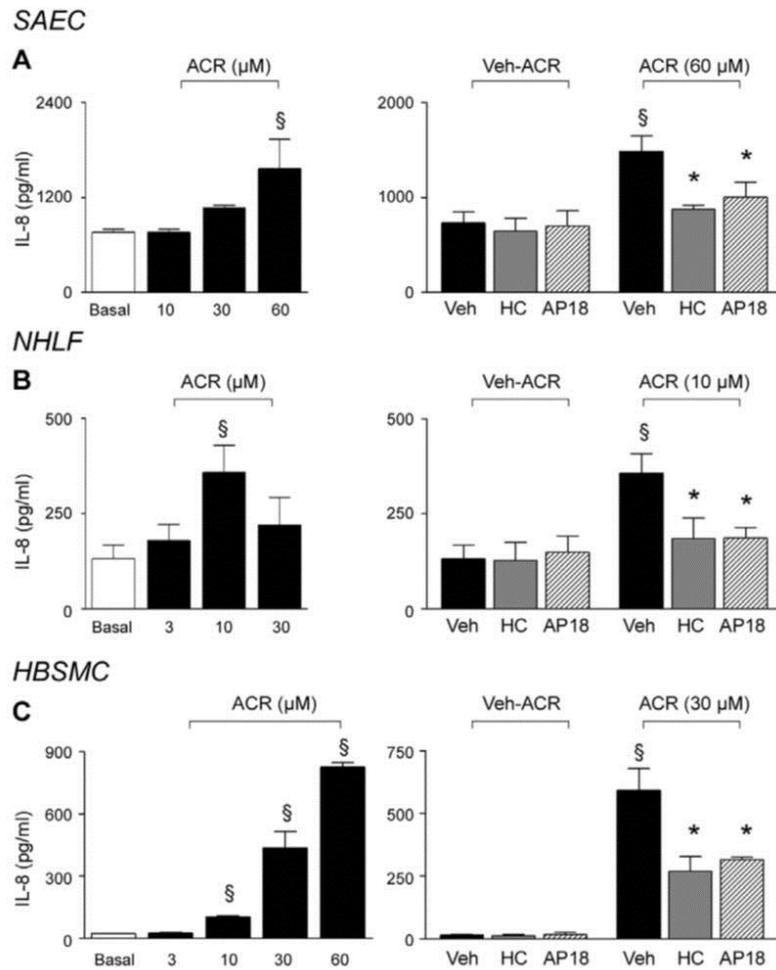


Figura 16. L'esposizione all'acroleina (ACR) induce rilascio di IL-8 TRPA1-dipendente. L'esposizione *overnight* a concentrazioni crescenti di ACR promuove il rilascio di IL-8, concentrazione-dipendente, nelle cellule epiteliali delle piccole vie aeree (SAEC) (A) ed in colture primarie di cellule muscolari lisce bronchiali (HBSMC) (B). Il pretrattamento con HC-030031 30 μM e AP18 10 μM riduce il rilascio di IL-8 mediato da ACR. Ogni colonna rappresenta la media ± SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti. §P < 0.05 vs. Veh/Veh-ACR; *P < 0.05 vs. Veh/ACR

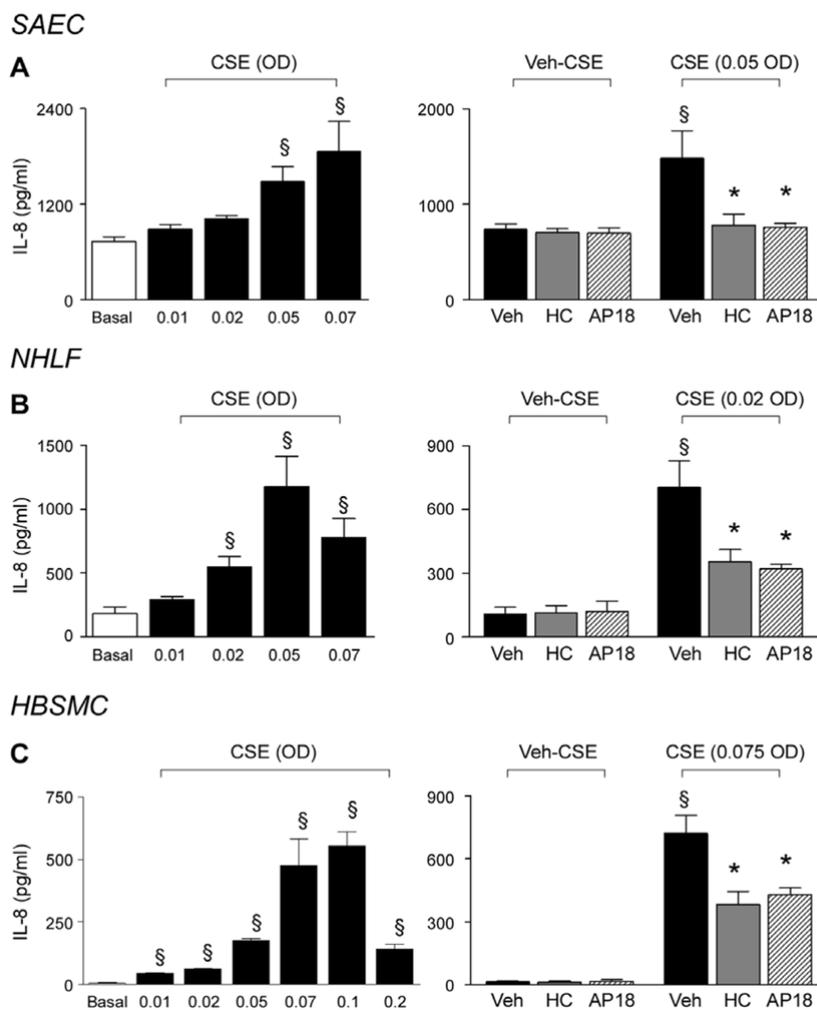


Figura 17: L'esposizione all'estratto di fumo di sigaretta (CSE) induce un rilascio di IL-8 TRPA1-dipendente. L'esposizione *overnight* a concentrazioni crescenti di CSE promuove il rilascio di IL-8, concentrazione-dipendente, a livello di cellule epiteliali delle vie aeree (SAEC) (A), colture primarie di fibroblasti polmonari adulti (NHLF) (B) e colture primarie di cellule muscolari lisce bronchiali (HBSMC) (C). Il pretrattamento con HC-030031 30 μ M e AP18 10 μ M riduce il rilascio di IL-8 mediato da ACR. Ogni colonna rappresenta la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti. $^{\$}P < 0.05$ vs. Veh/Veh-ACR; $^*P < 0.05$ vs. Veh/ACR.

Al fine di escludere eventuali effetti tossici dell'esposizione al CSE a tali concentrazioni e per tale durata, è stata condotta un'analisi di vitalità cellulare mediante saggio MTT. Dai risultati è emerso che tale protocollo sperimentale non induce effetti tossici sulle cellule trattate (Figura 18).

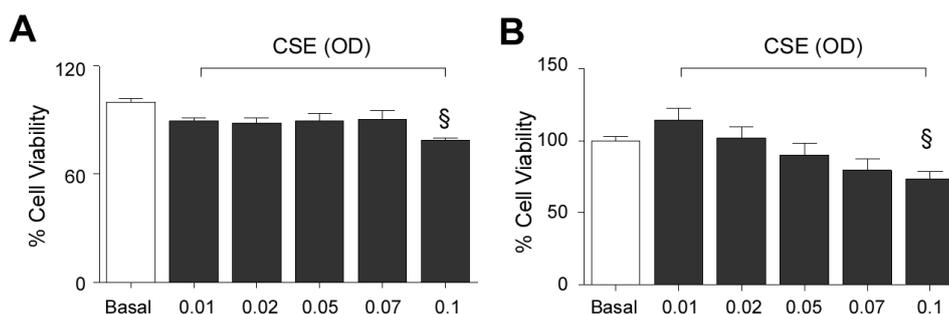


Figura 18. Saggio di vitalità cellulare (MTT) in seguito a trattamento con concentrazioni crescenti di CSE. Il trattamento prolungato (18 h) con CSE OD 0.01, 0.02, 0.05, 0.07 non modifica significativamente la vitalità cellulare di SAEC (**A**) e HBSMC (**B**). Dai risultati emerge che il trattamento delle cellule con CSE 0.1 OD riduce la vitalità cellulare. Ogni colonna rappresenta la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti. [§] $P < 0.05$ vs. basale.

Successivamente, per validare i risultati ottenuti dagli esperimenti *in vitro*, sono stati condotti degli studi *in vivo* su topi *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-} al fine di verificare se l'esposizione al fumo induce rilascio di citochine pro-infiammatorie nel fluido del lavaggio broncoalveolare (BAL). In particolare nel liquido del BAL è stato valutato, mediante saggio ELISA, il rilascio della citochina KC, analogo murino di IL-8. Dai risultati è emerso che l'esposizione al fumo di sigaretta induce rilascio di KC e tale effetto risulta ridotto nei topi *Trpa1*^{-/-} (figura 7). Si può dunque concludere che il rilascio di tale citochina proinfiammatoria indotto dall'esposizione al fumo di sigaretta risulta mediato dall'attivazione del recettore TRPA1.

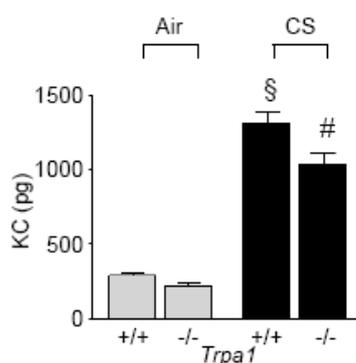


Figura 19. Rilascio di interleuchina KC in seguito ad esposizione di topi *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-} al fumo di sigaretta. Il livello di espressione di KC è stato valutato nel liquido del lavaggio broncoalveolare di topi *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-} in seguito ad esposizione per 3 giorni consecutivi al fumo prodotto dalla combustione di 5 sigarette. Ogni colonna rappresenta la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti. [§] $P < 0.05$ vs. *Trpa1*^{+/+} esposti all'aria (Air); [#] $P < 0.05$ vs. *Trpa1*^{+/+} esposti al fumo di sigaretta (CS).

4.4 NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA OXALIPLATINO

Inizialmente è stato allestito un modello animale di neuropatia periferica indotta da una singola somministrazione di oxaliplatino, (OXA). Come riportato in letteratura, la somministrazione intravenosa (i.v.) di OXA (2 mg/kg) induce nei ratti iperalgesia meccanica misurabile, mediante il test di Randall-Selitto, come riduzione della soglia di risposta al contatto con una stimolazione pressoria. Tale condizione risulta già visibile al giorno 1 dalla somministrazione del chemioterapico e rimane invariata fino al giorno 8, quindi la soglia di risposta alla stimolazione meccanica aumenta progressivamente portandosi a plateau intorno al giorno 15 (Fig. 20A). Per verificare il coinvolgimento del recettore TRPA1 nel mediare l'iperalgesia meccanica indotta da OXA, gli animali sono stati trattati al giorno 2 (Fig. 20B) o 15 (Fig. 20C) dalla somministrazione del chemioterapico con l'antagonista selettivo del recettore, HC-030031 (100 mg/kg), somministrato per via intragastrica (i.g.). Dai risultati ottenuti è emerso che l'iperalgesia meccanica indotta da OXA è mediata dall'attivazione del recettore TRPA1, in quanto il trattamento con l'antagonista reverte completamente lo stato iperalgico (Fig. 20B e C). L'effetto dell'HC-030031 risulta evidente a 60 minuti dalla somministrazione. L'antagonista di per sé non altera la soglia di risposta alla stimolazione meccanica degli animali naïve (Fig. 20B e C).

Impiegando lo stesso protocollo di somministrazione, è stato verificato che OXA induce nei ratti un aumento della sensibilità al freddo (iperalgesia termica) misurata come il tempo impiegato dall'animale a retrarre la coda immersa in un recipiente contenente acqua a 10°C (Fig. 21A). Tale effetto risulta annullato dal trattamento con l'antagonista selettivo del TRPA1 (Fig. 21B). L'HC-030031 non altera di per sé la sensibilità al freddo negli animali naïve (Fig. 21B). Complessivamente questi dati dimostrano il ruolo centrale del TRPA1 nel mediare l'iperalgesia meccanica e termica indotta da OXA.

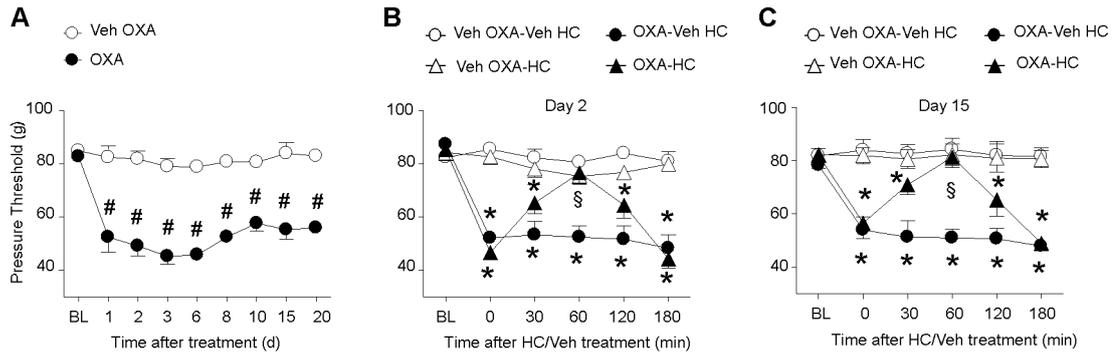


Fig. 20. Oxaliplatino (OXA) induce iperalgesia meccanica mediante l'attivazione del recettore TRPA1 nei ratti. Una singola somministrazione di oxaliplatino (OXA; 2 mg/kg, i.v.) produce una riduzione tempo-dipendente della soglia di risposta alla stimolazione meccanica misurata mediante il test di Randall-Selitto (A). Ai giorni 2 (B) e 15 (C) il trattamento con HC-030031 (HC; 100 mg/kg, i.g.) reverte completamente l'iperalgia meccanica 60 minuti dopo la somministrazione. Veh è il veicolo di OXA. I valori sono la media \pm SEM di $n = 8-10$ ratti. # $P < 0.05$ vs. Veh OXA in A; test t di Student; * $P < 0.05$ vs. Veh OXA-Veh HC e Veh OXA-HC in B e C; § $P < 0.05$ vs. OXA-Veh HC in B e C; one-way ANOVA e test di Bonferroni. BL, soglia di risposta basale alla stimolazione meccanica.

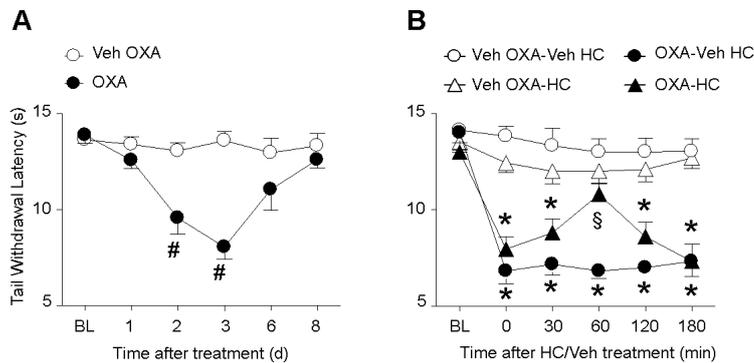


Fig. 21. Oxaliplatino induce nei ratti iperalgesia al freddo mediante l'attivazione del TRPA1. Una singola dose di OXA (2 mg/kg, i.v.) determina una riduzione tempo-dipendente della soglia di risposta ad uno stimolo termico freddo (10°C) (A). Al giorno 2 dal trattamento con OXA, l'HC-030031 (HC; 100 mg/kg, i.g.) annulla l'iperalgia termica 60 minuti dopo la somministrazione (B). # $P < 0.05$ vs. Veh OXA in A; test t di Student; * $P < 0.05$ vs. Veh OXA-Veh HC e Veh OXA-HC in B; § $P < 0.05$ vs. OXA-Veh HC in B; test di Bonferroni. BL, soglia di risposta basale alla stimolazione meccanica.

Successivamente sono stati condotti degli esperimenti analoghi su topi *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-}. Come riportato in letteratura, la somministrazione intraperitoneale (i.p.) di una singola dose di OXA (3 mg/kg) in topi C57BL/6 produce un aumento della sensibilità al contatto con una stimolazione pressoria normalmente non percepita come dolorosa (allodinia meccanica), misurabile mediante test di Von Frey come riduzione della soglia di risposta ad una stimolazione meccanica. La riduzione della soglia di risposta è visibile al giorno 3 e persiste fino al giorno 15 o 20 dalla somministrazione (Fig. 3A). Lo stesso protocollo sperimentale è stato impiegato nei topi *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-}. Come riportato in Fig. 2C2, l'allodinia meccanica indotta da OXA nei topi *Trpa1*^{+/+} risulta assente nei topi *Trpa1*^{-/-}. Analogamente, OXA determina un aumento della sensibilità al freddo (Fig. 22B) che nel topo può essere misurata mediante test dell'acetone. Tale test misura il tempo impiegato dall'animale a sollevare/leccare la zampa in seguito all'applicazione topica di acetone. Dai risultati è emerso che l'allodinia termica che si sviluppa nei topi *Trpa1*^{+/+} conseguentemente al trattamento con il chemioterapico risulta assente nei topi *Trpa1*^{-/-} (Fig. 22D).

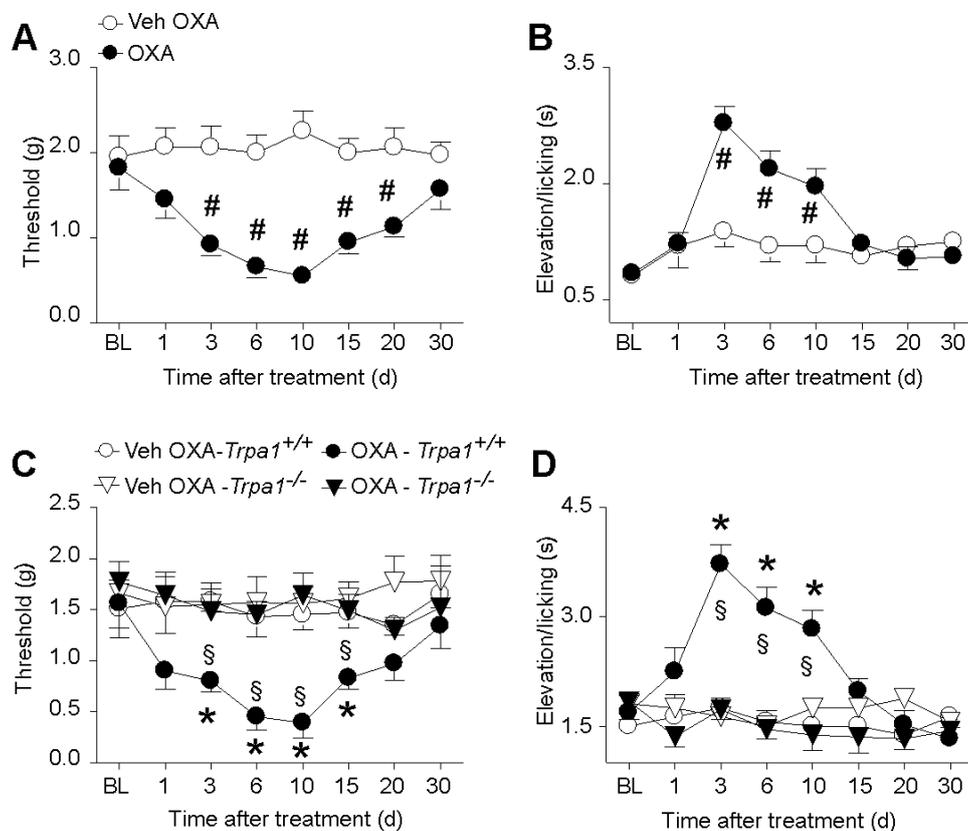


Fig.22. L'attivazione del recettore TRPA1 media l'allodinia meccanica e l'allodinia al freddo indotta da oxaliplatino nei topi. La somministrazione di una singola dose di OXA (3 mg/kg, i.p.) induce nei topi C57BL/6 allodinia meccanica (test di Von Fey) (A) e allodinia al freddo (test dell'acetone) (B) con un picco al giorno 10 e 3, rispettivamente. Lo sviluppo di allodinia meccanica (C) e termica (D) osservata nei topi *Trpa1*^{+/+} in seguito a trattamento con OXA risulta assente nei topi *Trpa1*^{-/-}. #P < 0.05 vs. Veh OXA in A e B; test t di Student; *P < 0.05 vs. Veh OXA- *Trpa1*^{+/+} in C e D; test di Bonferroni. BL, soglia di risposta basale alla stimolazione meccanica.

Mediante analisi HPLC/ESI-MS è stato possibile dimostrare che un'incubazione di 10 minuti con GSH (tempistica impiegata negli esperimenti di *calcium imaging*) non è sufficiente a ridurre la concentrazione del chemioterapico (dati non mostrati). Questi risultati indicano che OXA non attiva direttamente il TRPA1, ma indirettamente tramite la generazione di specie chimiche sensibili all'azione del GSH, inclusi ROS e loro prodotti.

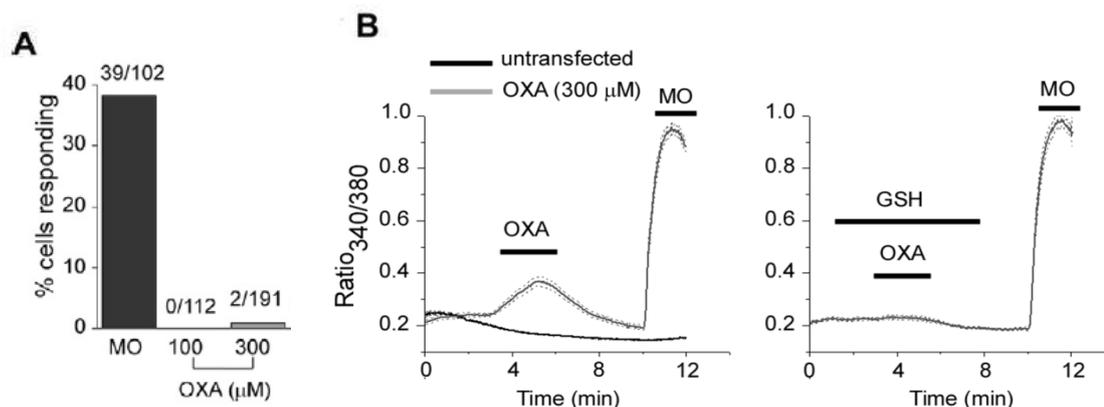


Fig. 23. Oxaliplatino attiva il TRPA1 in maniera indiretta mediante un meccanismo GSH-sensibile. (A) OXA (100-300 μM) non induce mobilizzazione di calcio intracellulare nei neuroni dei gangli delle radici dorsali che rispondono all'olio di mostarda (MO), agonista TRPA1. (B) Tracciato tipico della mobilizzazione di calcio indotta da OXA (300 μM) nelle CHO stabilmente trasfettate con il cDNA del TRPA1 murino. MO è impiegata come controllo positivo. OXA non induce mobilizzazione di calcio in cellule CHO non trasfettate. (C) L'effetto di OXA sulla mobilizzazione di calcio nelle mTRPA1-CHO è annullato in presenza di glutazione (GSH, 1 mM).

Sulla base dei risultati ottenuti, è stata valutata la capacità di OXA di attivare direttamente il recettore TRPA1. Quindi sono stati eseguiti esperimenti di *calcium imaging* su colture di neuroni sensitivi primari isolati dai gangli delle radici dorsali (DRG), che esprimono il TRPA1, e su colture cellulari di CHO trasfettate con il cDNA del TRPA1 murino (mTRPA1-CHO), per evidenziare eventuali variazioni di calcio intracellulare indotte dalla stimolazione con il chemioterapico.

Dai risultati è emerso che OXA, 100-300 μ M, non induce mobilizzazione di calcio nei neuroni isolati dai DRG (Fig. 23A). Al contrario, OXA induce mobilizzazione di calcio nelle mTRPA1-CHO (Fig. 23B). Tale effetto risulta annullato in presenza di glutatione (GSH). Quindi è stato indagato il meccanismo con il quale il GSH blocca l'effetto di OXA. Come riportato in letteratura (Fakih S *et al.*, 2003), l'incubazione prolungata (ore) con GSH determina una riduzione della concentrazione di OXA libero.

5 4.IPERALGESIA INDOTTA DA PACLITAXEL

Analogamente al lavoro svolto con OXA, abbiamo verificato il ruolo del TRPA1 nel mediare la neuropatia periferica indotta dal trattamento con un altro chemioterapico ampiamente impiegato in clinica, paclitaxel (PXL). Come riportato in letteratura, una singola somministrazione di PXL (6 mg/kg, i.p.) in topi C57BL/6 produce allodinia meccanica. La riduzione della soglia di risposta alla stimolazione meccanica risulta evidente al giorno 2 dal trattamento, con picco al giorno 8, quindi la soglia di risposta aumenta progressivamente fino a tornare al livello basale al giorno 20 (Fig. 24A). Studi riportati in letteratura dimostrano il coinvolgimento dell'attivazione del recettore TRPV4 nel mediare gli effetti neuropatici del trattamento con PXL. I risultati ottenuti confermano quanto dimostrato precedentemente, in quanto la somministrazione dell'antagonista selettivo del recettore TRPV4, HC-067047 (10 mg/kg, i.p.), 8 giorni dopo il trattamento con PXL reverte parzialmente l'allodinia meccanica indotta dal chemioterapico (Fig. 24B). HC-067047 non altera il livello soglia di risposta alla stimolazione meccanica degli animali naïve (Fig. 24B). Successivamente, è stato valutato l'effetto dell'inibizione del TRPA1 sull'allodinia meccanica dipendente da PXL. Al giorno 8 dal trattamento con PXL, la somministrazione di HC-030031 (300 mg/kg, i.g.) riduce l'allodinia meccanica (Fig. 24C). Complessivamente tali risultati dimostrano un coinvolgimento sia del TRPV4 sia del TRPA1 nel mediare l'allodinia meccanica indotta da PXL. A sostegno di queste evidenze, è emerso che il trattamento simultaneo con HC-067047

(10 mg/kg, i.p.) e HC-030031 (300 mg/kg, i.g.) è in grado di annullare lo stato allodinico (Fig. 24D).

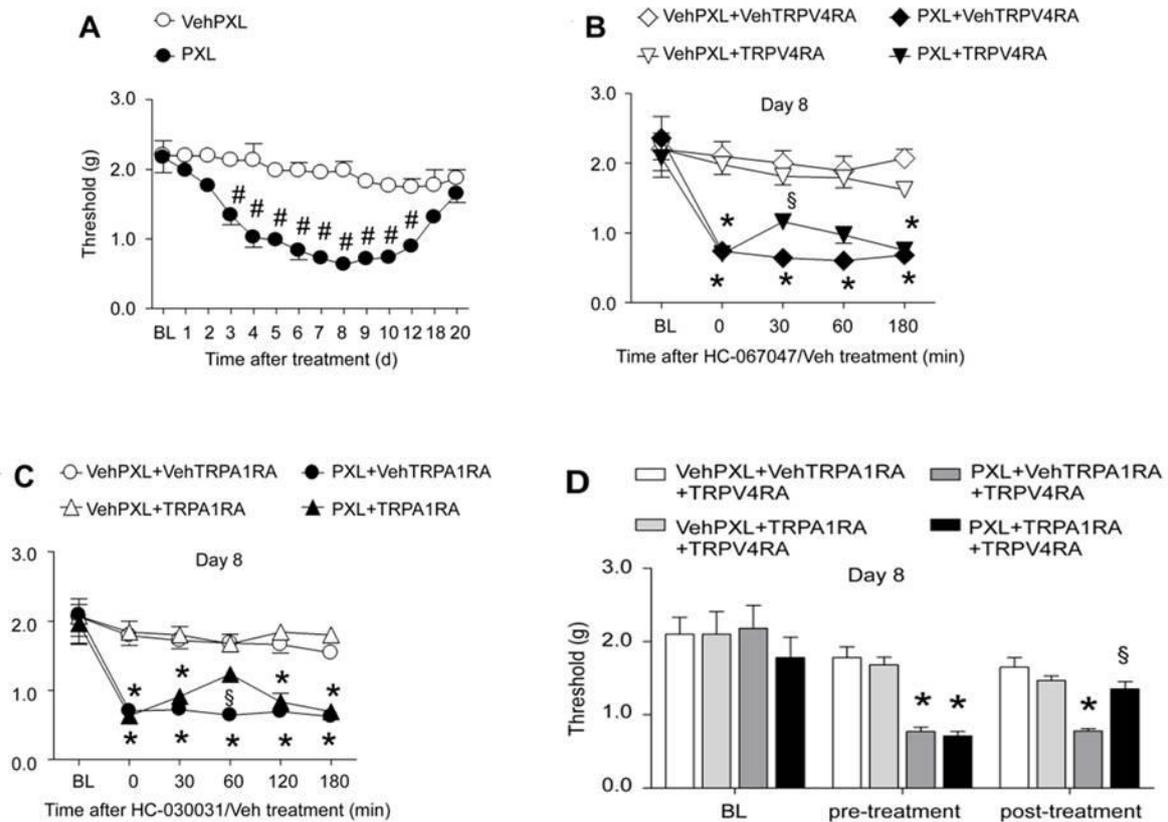


Fig. 24. Paclitaxel (PXL) induce allodinia meccanica mediante l'attivazione del TRPA1 e del TRPV4 nei topi. (A) La somministrazione di una singola dose di PXL (6 mg/kg, i.p.) in topi C57BL/6 induce una riduzione tempo-dipendente della soglia di risposta alla stimolazione meccanica (test di Von Frey) con un effetto massimo al giorno 8 dal trattamento. (B) Al giorno 8 dalla somministrazione di PXL, il trattamento con l'antagonista HC-067047 del recettore TRPV4 (TRPV4RA; 10 mg/kg, i.p.) riduce significativamente l'allodinia meccanica 30 minuti dopo la somministrazione. (C) Un'analogia riduzione dell'allodinia meccanica è visibile in seguito al trattamento con l'antagonista HC-030031 del TRPA1 (TRPA1RA; 300 mg/kg, i.g.) 60 minuti dopo la somministrazione. (D) Al giorno 8 dalla somministrazione di PXL, il trattamento simultaneo di HC-030031 e HC-067047 (TRPA1RA + TRPV4RA) annulla completamente l'allodinia meccanica. I valori sono la media \pm SEM di $n=8-10$ topi. # $p<0.05$ vs. VehPXL in A; test t di Student; * $p<0.05$ vs. VehPXL-VehTRPA1RA e VehPXL-TRPA1RA in B, o VehPXL-VehTRPV4RA e VehPXL-TRPV4RA in C o VehPXL-TRPA1 + TRPV4RA e VehPXLTRPA1RA + TRPV4RA in D; § $p<0.05$ vs. PXL-Veh TRPA1RA in B, o PXL-VehTRPV4RA in C; test di Bonferroni. BL, soglia di risposta basale alla stimolazione meccanica.

L'impiego di topi *Trpa1*^{+/+} e *Trpa1*^{-/-} ha permesso di validare ulteriormente i dati ottenuti. Quindi utilizzando lo stesso protocollo sperimentale, è emerso che i topi *Trpa1*^{+/+} sviluppano allodinia meccanica in seguito a trattamento con PXL, mentre i topi *Trpa1*^{-/-} mostrano uno stato allodinicico meno severo di quello misurato nei *Trpa1*^{+/+} (Fig. 25A) ed il trattamento con l'HC-067047 riduce l'allodinia meccanica sviluppata dai *Trpa1*^{-/-} (Fig. 25B).

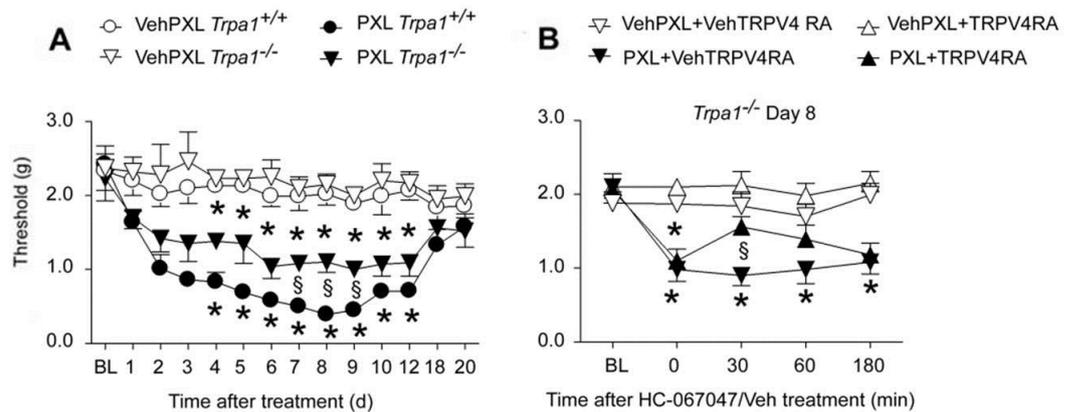


Fig. 25. Paclitaxel induce allodinia meccanica tempo-dipendente nei topi *Trpa1*^{+/+} che è ridotta, ma non abolita, nei *Trpa1*^{-/-} (A). (B) Al giorno 8, il trattamento con l'antagonista HC-067047 del recettore TRPV4 (TRPV4RA; 10 mg/kg, i.p.) riduce l'allodinia meccanica sviluppata nei *Trpa1*^{-/-}. I valori sono la media \pm SEM di n=8-10 topi. *p<0.05 vs. VehPXL-*Trpa1*^{+/+} and Veh PXL*Trpa1*^{-/-} in A o VehPXL-Veh TRPV4RA e VehPXL-TRPV4RA in B; §p<0.05 vs. PXL-VehTRPV4RA B o PXL-Veh TRPA1RA + TRPV4RA in A o PXL *Trpa1*^{-/-} in B; test di Bonferroni. BL, soglia di risposta basale alla stimolazione meccanica.

Il modello di neuropatia periferica indotta da PXL oltre a causare l'insorgenza di allodinia meccanica nel topo, evoca anche ipersensibilità al freddo con picco al giorno 8 dal trattamento (Fig. 26A). Tale fenomeno risulta completamente annullato dall'azione dell'antagonista selettivo del TRPA1 (Fig. 26B) e nei topi *Trpa1*^{-/-} (Fig. 26D). Al contrario, il trattamento con HC-067047 (10 mg/kg, i.p.) al giorno 8 dalla somministrazione di PXL mantiene invariato lo stato allodinicico (Fig. 26C). Ne consegue che mentre l'allodinia meccanica indotta da PXL è dipendente dall'attivazione del TRPA1 e del TRPV4, l'allodinia termica è interamente dipendente dall'attivazione del TRPA1.

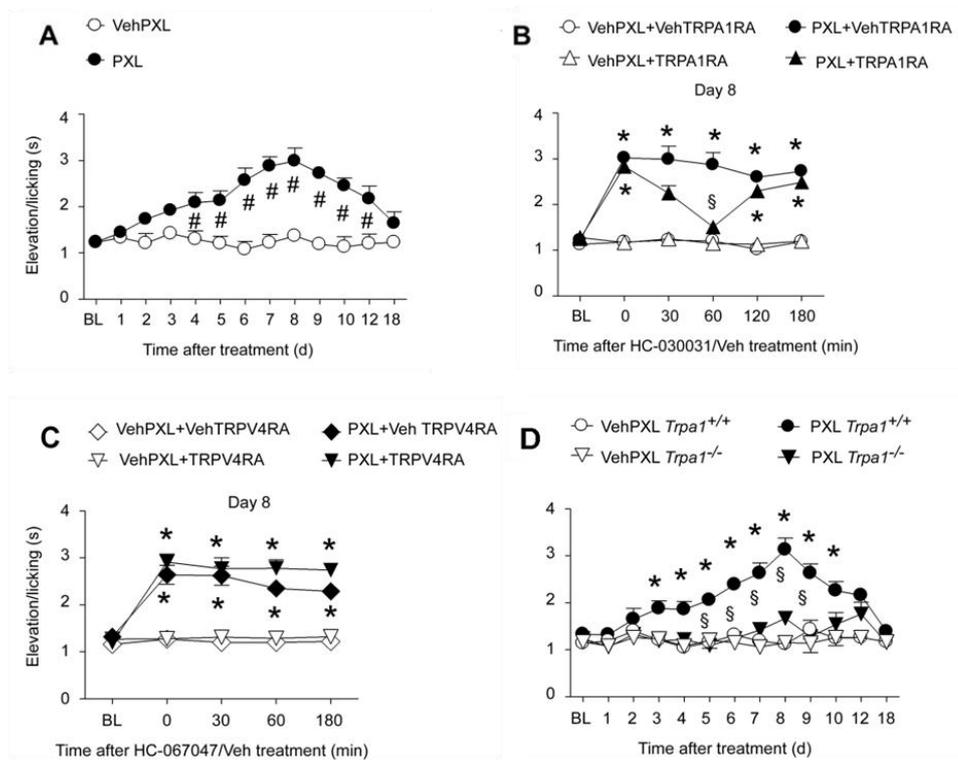


Fig. 26. L'ipersensibilità al freddo indotta da PXL è mediata dall'attivazione del recettore TRPA1 nei topi. La somministrazione di PXL (6 mg/kg, i.p.) induce nei topi C57BL/6 una ipersensibilità al freddo tempo-dipendente (test dell'acetone) con un effetto massimo al giorno 8 dopo il trattamento con il chemioterapico (A). Al giorno 8, l'antagonista selettivo del TRPA1 HC-030031 (TRPA1RA, 300 mg/kg, i.g.) reverte completamente l'allodinia al freddo 60 minuti dopo la somministrazione (B). Il trattamento con l'antagonista del TRPV4 HC-067047 (TRPV4RA, 10 mg/kg, i.p.) lascia invariato lo stato allodinico indotto da PXL (C). Lo sviluppo dell'allodinia termica presente nei topi *Trpa1*^{+/+} risulta completamente assente nei *Trpa1*^{-/-} (D). I valori sono la media \pm SEM di n=8–10 topi. #p<0.05 vs. Veh PXL in A; test t di Student; *p<0.05 vs. VehPXL-VehTRPA1RA e VehPXL-TRPA1RA in B, o VehPXL-VehTRPV4RA e VehPXL-TRPV4RA in C or VehPXL-*Trpa1*^{+/+} in D; §p<0.05 vs. PXL-VehTRPA1RA in B or PXL-*Trpa1*^{-/-} in D; test di Bonferroni. BL, soglia di risposta basale alla stimolazione meccanica.

L'attivazione del TRPA1 a livello dei terminali nervosi dei neuroni capsaicino-sensibili induce il rilascio di neuropeptidi, quali il CGRP. Molti tessuti periferici, esofago incluso, sono utilizzati per lo studio del rilascio di neuropeptidi. PXL determina un rilascio di CGRP da sezioni di esofago di topi C57BL/6 in modo concentrazione-dipendente, risposta che risulta abolita dalla pre-esposizione dei tessuti a concentrazioni di capsaicina tali da indurre desensibilizzazione dei terminali nervosi o in assenza di calcio (Fig. 27A). Quindi PXL evoca rilascio di CGRP calcio-dipendente dai neuroni capsaicino-sensibili. Il rilascio di CGRP è ridotto, ma non abolito, in presenza di HC-030031 o HC-067047, mentre il pretrattamento dei tessuti con GSH annulla completamente il rilascio del neuropeptide (Fig. 27B). Analogamente, l'esposizione a PXL media rilascio di CGRP da preparati isolati da topi *Trpa1*^{+/+}. Questa risposta è ridotta, ma non abolita, nei tessuti isolati da topi *Trpa1*^{-/-} (Fig. 27C). Ancora una volta, il GSH riduce nei topi *Trpa1*^{-/-} ulteriormente il rilascio di CGRP. In conclusione PXL media un rilascio di CGRP calcio-dipendente mediante un processo che vede coinvolti sia il TRPA1 sia il TRPV4.

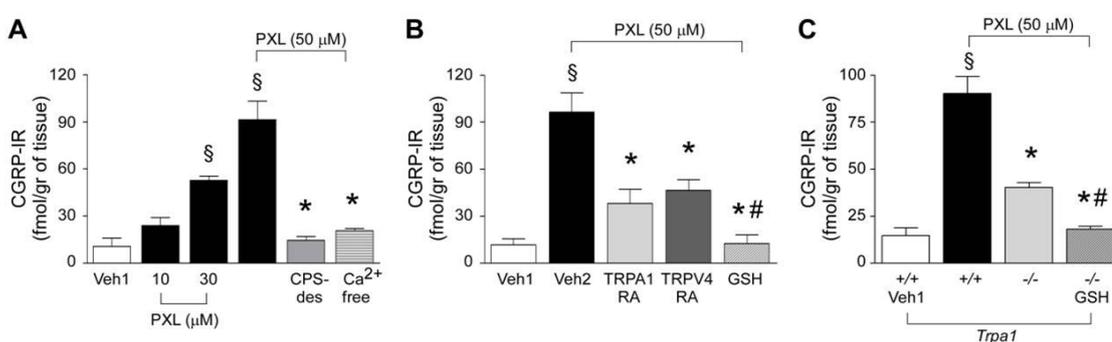


Fig. 27. Paclitaxel induce il rilascio di CGRP dalle terminazioni nervose periferiche dell'esofago di topo. (A) PXL (10-30-50 μM) media il rilascio di CGRP da sezioni di esofago isolato da topi C57BL/6 in modo concentrazione-dipendente. Il rilascio del neuropeptide è abolito in seguito a desensibilizzazione mediata da capsaicina (CPS-des) o in mezzo calcio privo (Ca^{2+} free). (B) Il rilascio di CGRP indotto da PXL è ridotto in seguito a pretrattamento con l'antagonista selettivo del TRPA1, HC-030031 (TRPA1RA, 30 μM), o del TRPV4, HC-067047 (TRPV4RA, 3 μM), e dal glutatione (GSH, 1 mM). (C) PXL induce rilascio di CGRP da sezioni di esofago isolato da topi *Trpa1*^{+/+}, tale effetto risulta ridotto nei topi *Trpa1*^{-/-}. Il pretrattamento dei tessuti isolati da topi *Trpa1*^{-/-} con GSH (1 mM) annulla il rilascio di CGRP indotto da PXL. Veh1 è il veicolo di PXL and Veh2 è una combinazione dei veicoli di vari trattamenti. I valori sono la media \pm SEM di n=5 esperimenti. §p<0.05 vs. Veh1; *p<0.05 vs. Veh2 o PXL- *Trpa1*^{+/+}, #p<0.05 vs. TRPA1RA e TRPV4RA o PXL- *Trpa1*^{-/-}.

5. DISCUSSIONE

Il recettore canale di membrana TRPA1 è uno degli ultimi sottotipi recettoriali della famiglia dei TRP ad essere stato identificato (Jaquemar et al., 1999). Quest'ultimo, insieme al recettore TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 e TRPM8, è espresso nei neuroni sensitivi primari dei gangli delle radici dorsali, trigeminali, nodosi e vagali (Levine et al., 2007), che danno origine a fasci di fibre nervose afferenti deputate alla trasduzione dei segnali sensoriali di varia natura (meccanica, chimica e termica). In particolare, il canale TRPA1 risulta espresso in una sottopopolazione di neuroni sensitivi primari definiti capsaicino-sensibili o nocicettori (Story et al., 2003), in quanto esprimono il canale TRPV1, il recettore per la capsaicina, e trasducono le sensazioni dolorifiche a livello del sistema nervoso centrale.

Recentemente è stato proposto che il canale TRPA1 rappresentasse un sensore di danno tissutale (Caceres et al., 2009), in quanto attivato da numerose molecole endogene ed esogene di natura irritante, inclusi metaboliti dello stress ossidativo e mediatori intermedi dell'infiammazione (Trevisani et al., 2007; Andersson et al.; 2008; Andrè et al., 2008; Materazzi et al.; 2008; Taylor-Clark et al., 2009).

L'attivazione del canale TRPA1, e la conseguente eccitazione neuronale, determina, tramite il rilascio di neuropeptidi proinfiammatori (SP, NKA e CGRP) a livello periferico, dolore ed infiammazione neurogenica. Recentemente è stato evidenziato come questo meccanismo di attivazione neuronale mediato dal TRPA1, analogamente a quello già ampiamente descritto per il canale TRPV1, risulti fortemente correlato allo sviluppo di patologie a carico dell'apparato respiratorio a carattere prevalentemente flogistico, come asma e BPCO (Caceres et al., 2009).

Sulla base di dati recenti che indicano una distribuzione del canale TRPA1 anche a livello non neuronale (Jaquemar et al.; 1999; Anand et al., 2008; Earley et al., 2009; Nozawa et al., 2009), abbiamo ipotizzato che il canale TRPA1 potesse essere espresso, nel tessuto polmonare, anche in cellule non neuronali, ed in particolare a livello di quei tipi cellulari che rappresentano un elemento primario

nello sviluppo delle patologie respiratorie, quali le cellule epiteliali delle piccole vie aeree ed i fibroblasti polmonari.

L'ipotesi che l'espressione del TRPA1 non sia limitata ai neuroni sensitivi primari risulta suffragata dal fatto che questo recettore è stato identificato per la prima volta proprio in colture di fibroblasti polmonari fetali umani (Jaquemar et al., 1999) e dall'osservazione che, nel polmone di ratto, i livelli di mRNA per il canale TRPA1 risultano essere piuttosto consistenti (Stokes et al., 2006).

Abbiamo valutato, sia mediante Real-Time PCR che mediante immunocitochimica, i livelli di espressione di messaggero e della proteina per il canale TRPA1 in una linea di cellule epiteliali alveolari di tipo II (A549) ed in cellule epiteliali primarie delle piccole vie aeree (SAEC). I risultati del nostro studio dimostrano, per la prima volta, che il canale TRPA1 è espresso anche in questi due tipi di cellule, quindi in cellule non neuronali dell'apparato respiratorio. Abbiamo inoltre dimostrato che questo canale in tali cellule è funzionalmente attivo.

Pertanto, sulla base dei dati complessivi risulta evidente che il canale TRPA1 è funzionalmente espresso, a livello del tessuto polmonare, anche in cellule di natura non neuronale.

Occorre sottolineare che i dati ottenuti dalle SAEC, ossia cellule epiteliali umane normali, indicano che tale espressione non è un carattere acquisito con la trasformazione tumorale, come era stato proposto da alcuni Autori, ma un carattere già presente nelle cellule primarie, *in vivo*.

Ci siamo quindi chiesti quale poteva essere il ruolo fisiopatologico del canale TRPA1 espresso a livello polmonare, nei tessuti non neuronali. Le cellule epiteliali polmonari, ma anche i fibroblasti, rappresentano un importante bersaglio in numerose patologie del tratto respiratorio (Kuwano, 2007; Racké et al., 2007). Numerose sono le evidenze che mostrano come una protratta stimolazione dei canali cationici TRP, ed il conseguente ingresso massivo di ioni calcio, causi morte cellulare, principalmente tramite apoptosi (Montell 2005; Miller 2006; Shirakawa et al., 2008; Abramowitz and Birnbaumer 2009). Alcuni lavori avevano dimostrato che in cellule A549 l'acroleina è in grado di determinare apoptosi e necrosi (Hoshino et al. 2001; Thompson et al., 2008), effetto che gli Autori, attribuivano genericamente

ad un danno da "stress aldeidico". I nostri dati suggeriscono che, l'esposizione prolungata all'acroleina, produce apoptosi anche tramite la stimolazione diretta e continua del canale TRPA1. Infatti, in cellule trasfettate con il canale TRPA1 (HEK293-TRPA1), la stimolazione con acroleina determina morte cellulare in maniera TRPA1 dipendente, un effetto dimostrabile sperimentalmente anche nelle A549 e nelle cellule IMR90, che esprimono la forma nativa del canale.

I dati ottenuti dal presente studio identificano e caratterizzano farmacologicamente il canale TRPA1 in un nuovo distretto cellulare non neuronale, ed evidenziano la possibilità che l'attivazione del recettore sia coinvolta nel rimodellamento cellulare presente nelle varie fasi di sviluppo di patologie dell'apparato respiratorio, come asma e BPCO. In questo scenario, l'attivazione del canale TRPA1 riveste un ruolo centrale in quanto potenziale bersaglio di molecole esogene di natura irritante, già legate all'evoluzione di tali patologie come il fumo di sigaretta con le aldeidi α,β -insature in esso contenute, o agenti ossidanti presenti nell'inquinamento atmosferico, quali il toluene diisotiocianato già associato all'asma occupazionale (Andrè et al., 2008; Bessac et al., 2008; Taylor-Clark et al., 2009). Ma il canale TRPA1 risulta il bersaglio anche di numerose molecole endogene, quali mediatori intermedi dell'infiammazione (prostaglandine ed isoprostani ciclopentenoni) (Materazzi et al., 2008; Taylor-Clark et al., 2008) o metaboliti dello stress ossidativo, anch'essi agonisti TRPA1 (4-HNE; 4-ONE; perossido di idrogeno) (Andersson et al., 2008; Trevisani et al., 2007). Pertanto, possiamo ipotizzare che l'attivazione prolungata nel tempo del canale TRPA1 da parte di agonisti esogeni ed endogeni, contribuisca allo sviluppo di patologie polmonari di carattere infiammatorio-degenerativo. Questo avviene non solo attraverso meccanismi neuronali (infiammazione neurogenica), ma, anche attraverso meccanismi non neuronali, entrambi TRPA1-dipendenti. Questo studio evidenzia quindi un nuovo ruolo fisiopatologico per il recettore canale TRPA1 ed avvalorare l'ipotesi secondo la quale tale canale rappresenta un sensore di danno tissutale (Caceres et al., 2009).

I dati relativi a questo nuovo ruolo per il canale TRPA1 ed i dati preliminari sul coinvolgimento di questa via di segnalazione nei processi degenerativi di patologie respiratorie, apre la strada a nuovi studi fisiopatologici e all'individuazione di nuovi bersagli farmacologici. Infatti, bloccanti del recettore TRPA1 potrebbero rappresentare una nuova classe di farmaci da impiegare oltre che per un presumibile

effetto di inibizione neuronale (che nelle vie respiratorie potrebbe risultare antitussigeno), come molecole antiinfiammatorie o antiapoptiche in corso di patologie croniche infiammatorie delle vie aeree.

La neuropatia periferica sensoriale costituisce uno dei principali effetti avversi del trattamento con chemioterapici. La frequente comparsa di disordini funzionali e di dolore neuropatico legata ai trattamenti antitumorali comporta necessariamente un ridimensionamento della terapia o la sua interruzione. I chemioterapici più spesso associati all'insorgenza di complicanze neurologiche a carico del sistema nervoso periferico sono rappresentati dal platino e dai suoi derivati, cisplatino e oxaliplatino, dai taxani (paclitaxel), dall'inibitore del proteasoma bortezomib, dagli alcaloidi della Vinca (vincristina). Sebbene i meccanismi alla base della neuropatia periferica indotta da chemioterapia (CIPN) non siano noti, recenti studi evidenziano il ruolo cruciale di alcuni canali ionici appartenenti alla superfamiglia dei TRP, espressi a livello di una sottopopolazione di neuroni sensitivi primari, nel mediare gli effetti neuropatici di alcuni chemioterapici.

Al riguardo è stato dimostrato il coinvolgimento del TRPV1 e TRPM8 nella neuropatia indotta da oxaliplatino (Gauchan *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2007). Altri studi riportano un transiente aumento dell'espressione dell'mRNA per il TRPA1 in colture di neuroni sensitivi primari isolati dai gangli delle radici dorsali (DRG) di ratto 6 ore dopo l'esposizione ad oxaliplatino e 6-24 e 48 ore dopo l'esposizione a cisplatino (Ta *et al.*, 2010). Inoltre, il trattamento per 3 settimane sia di oxaliplatino che di cisplatino induce nei neuroni dei gangli trigeminali di topo un aumento dell'espressione dell'mRNA per il TRPA1 (Ta *et al.*, 2010). Il TRPA1, espresso in una sottopopolazione di neuroni sensitivi primari di tipo nocicettivo dei gangli delle radici dorsali, trigeminali, vagali, nodosi, coespresso con il recettore TRPV1, attivato dalla capsaicina, principio pungente del peperoncino, è stato definito sensore di danno tissutale in quanto attivato da composti generati dallo stress ossidativo, quali H₂O₂, ipoclorito, acido nitroleico, acroleina, 4-idrossinonenale. Come riportato in letteratura, oxaliplatino e cisplatino producono stress ossidativo e l'impiego di agenti antiossidanti, quali l'acetil-L-carnitina, la vitamina C, l'acido α -lipoico, riduce l'iperalgia indotta da oxaliplatino nel ratto (Joseph *et al.*, 2008). Questi dati rappresentano un possibile meccanismo attraverso il quale il TRPA1 può contribuire allo sviluppo di un fenotipo iperalgico in seguito al trattamento con chemioterapici.

Nel presente lavoro, è stato confermato quanto riportato in letteratura che una singola somministrazione di OXA produce iperalgesia meccanica e ipersensibilità al freddo nel ratto, ed allodinia meccanica ed al freddo nel topo. L'insorgenza di tali stati patologici risulta dipendente dall'attivazione del TRPA1, come dimostrato in questo lavoro dall'effetto protettivo esercitato dell'antagonista selettivo del recettore. Queste evidenze sono supportate dal mancato sviluppo di ipersensibilità meccanica e termica nei topi *Trpa1*^{-/-}. Studi di *calcium imaging* hanno permesso di dimostrare che OXA non è in grado di attivare direttamente il TRPA1, in quanto il chemioterapico non induce mobilizzazione di calcio in colture di neuroni di DRG di topo che esprimono costitutivamente il canale. Viceversa, OXA induce mobilizzazione di calcio glutatione (GSH)-sensibile in colture di CHO stabilmente trasfettate con il TRPA1, ma non in colture di CHO naïve. L'incubazione di GSH con OXA per 10 minuti, impiegata negli esperimenti di *calcium imaging*, non altera la concentrazione del chemioterapico. Ciò implica che l'azione *scavenger* del GSH non è diretta su OXA, ma piuttosto sui composti generati in seguito all'esposizione al chemioterapico. Complessivamente questi risultati indicano che l'espressione del TRPA1 è un requisito necessario ma non sufficiente per promuovere la mobilizzazione di calcio in seguito ad esposizione ad OXA. Le cellule infatti devono avere la capacità di produrre metaboliti dello stress ossidativo in seguito ad esposizione al chemioterapico. Di conseguenza è possibile ipotizzare che il trattamento con OXA media la produzione di molecole sensibili all'azione del glutatione, inclusi ROS e loro prodotti, in cellule non-neuronali circostanti i terminali nervosi dei nocicettori che esprimono il TRPA1, determinando l'attivazione del recettore stesso.

La neuropatia sensoriale periferica colpisce una elevata porzione di pazienti trattati col farmaco chemioterapico paclitaxel, e questa reazione avversa è spesso la causa della discontinuità nell'assunzione del farmaco. L'equivalente sperimentale di questa condizione clinica è stata descritta in molti studi su roditori che mostrano che il paclitaxel causa allodinia meccanica e termica. Successivamente l'attenzione è stata spostata sul ruolo del TRPA1 nel mediare la neuropatia periferica di questo chemioterapico, il paclitaxel (PXL). Nel presente lavoro è stato dimostrato in modelli murini che l'attivazione del recettore TRPV4 media l'allodinia meccanica indotta da PXL, in accordo con studi presenti in letteratura, ma non contribuisce totalmente all'insorgenza del fenotipo allodinico. Infatti, lo sviluppo dell'allodinia meccanica

implica l'ulteriore attivazione del TRPA1. Questa evidenza è stata dimostrata mediante studi farmacologici, impiegando antagonisti selettivi dei recettori, e genetici, impiegando topi *Trpa1*^{-/-}. Quindi è stato indagato il ruolo del TRPA1 e del TRPV4 nel mediare l'allodinia al freddo indotta da trattamento con PXL. Dai risultati è emerso che l'insorgenza di tale ipersensibilità dipende interamente dall'attivazione del TRPA1 e non, come nel caso dell'allodinia meccanica, dall'attivazione sia del TRPA1 sia del TRPV4. I dati ottenuti in questo lavoro ampliano le conoscenze attuali in merito al ruolo svolto dai TRP nel mediare le complicanze neurologiche indotte dalle terapie antitumorali. In particolare, la dimostrazione del coinvolgimento del TRPA1 e/o del TRPV4 nel mediare alcuni degli effetti avversi dell'impiego di OXA e di PXL apre un capitolo importante che riguarda la possibilità di intervenire nel trattamento del dolore neuropatico modulando l'attività dei recettori stessi, riducendo gli effetti neurotossici dei chemioterapici senza però alterarne i potenziali anti-neoplastici.

Tra i vari meccanismi proposti come causa della neuropatia sensoriale da paclitaxel, studi recenti hanno evidenziato un ruolo per il canale TRPV4 nell'allodinia meccanica in modelli di topo e ratto. Qui, noi confermiamo in un modello murino che il TRPV4 contribuisce all'allodinia meccanica indotta dal paclitaxel.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che il TRPA1 è responsabile della ipersensibilità meccanica residua evidenziata nei precedenti studi in seguito al trattamento con tale farmaco nei topi TRPV4 KO.

Questa conclusione deriva sia da studi farmacologici, fatti con l'uso di antagonisti selettivi TRPA1 e TRPA4 che da studi di genetica fatti con topi mancanti del gene TRPA1. I nostri studi infatti evidenziano come l'antagonista selettivo del canale TRPV4, HC-067047, riduce in modo significativo la componente dell'allodinia meccanica causata dal paclitaxel che era resistente al blocco farmacologico del TRPA1 o dall'eliminazione del gene. La somministrazione di paclitaxel ai roditori avica una tipica ipersensibilità termica, che rievoca la condizione clinica causata dal farmaco in pazienti trattati. In contrasto, con l'allodinia meccanica, sia gli studi farmacologici che quelli genetici indicano un ruolo primario e unico del TRPA1 nel modello murino di ipersensibilità termica causata da paclitaxel.

6. CONCLUSIONI

Il recettore canale TRPA1 espresso a livello delle terminazioni nervose sensitive primarie media, analogamente al recettore canale TRPV1 co-espresso nelle stesse terminazioni, numerosi fenomeni fisiopatologici. Inizialmente definito come recettore del freddo, in quanto attivato dalle basse temperature (Story et al., 2003; Jordt et al., 2004; Nagata et al., 2005;), ha richiamato l'interesse scientifico, in quanto responsabile della trasduzione di stimoli di natura nocicettiva (McNamara et al., 2007; Trevisani et al., 2007; Materazzi et al. 2008), L'apertura del recettore, operata da stimoli di diversa natura, determina l'eccitazione dei neuroni nocicettivi in cui è espresso e la conseguente neurosecrezione di peptidi proinfiammatori.

Recentemente è stato proposto che il canale TRPA1 rappresentasse un sensore di danno tissutale (Caceres et al., 2009), in quanto attivato da numerose molecole endogene ed esogene di natura irritante, dallo stress ossidativo e da alcuni mediatori intermedi dell'infiammazione (Trevisani et al., 2007; Andersson et al.; 2008; Andrè et al., 2008; Materazzi et al.; 2008; Taylor-Clark et al., 2009). Studi recenti hanno inoltre evidenziato l'espressione del recettore TRPA1 in alcuni tipi cellulari non neuronali di derivazione gastrica (Nozawa et al., 2009) ed endoteliale (Earley et al., 2009) e, recentemente l'espressione di questo recettore è stata localizzata anche nelle cellule della membrana basale della epidermide (Anand et al., 2008).

Nell'ambito di questo vasto panorama scientifico i nostri risultati contribuiscono all'identificazione di nuove sedi non neuronali per l'espressione del canale TRPA1 e portano alla luce l'ipotesi di nuovi ruoli fisiopatologici per tale recettore. Infatti, sulla base dei nostri dati, è possibile supporre che questo canale contribuisca al fenomeno di rimodellamento tissutale che si riscontra in numerose patologie dell'apparato respiratorio. Questo dato fisiopatologico suggerisce che bloccanti del recettore TRPA1, potrebbero essere impiegati nel trattamento di alcune patologie che interessano le vie respiratorie, determinando un complessivo effetto antitussigeno, antinfiammatorio e antiapoptotico. Nella prospettiva di un possibile impiego terapeutico, ulteriori studi in questo campo saranno necessari per chiarire

definitivamente il ruolo fisiologico e patologico del recettore TRPA1 nell'apparato respiratorio.

La neuropatia periferica indotta da chemioterapici (CIPN) è il principale evento avverso causato dai farmaci chemioterapici, tra cui cisplatino e oxaliplatino, paclitaxel, vincristina, talidomide e l'inibitore del proteasoma, bortezomib. Tra i sintomi sensoriali del CIPN, il dolore neuropatico è il principale e dose-limitante per molti pazienti. Sebbene siano state formulate molteplici ipotesi per spiegare questa condizione, i pazienti affetti da CIPN rimangono sottotrattati e le conseguenze sono l'interruzione della terapia e l'ospedalizzazione. Il motivo per cui CIPN risulta prolungata nel tempo e continua mesi/anni dopo l'esposizione agli agenti chemioterapici è sconosciuto. Nel nostro studio, con approcci genetici e farmacologici, abbiamo evidenziato che il TRPA1 media interamente l'ipersensibilità meccanica e al freddo indotte da oxaliplatino e cisplatino nei roditori. Inoltre, mentre abbiamo confermato che il TRPV4 media parzialmente l'iperalgia meccanica indotta dal paclitaxel, tassano derivato, abbiamo dimostrato che l'allodinia al freddo indotta da paclitaxel è completamente mediata dall'attivazione di TRPA1, così come l'iperalgia meccanica TRPV4-resistente. Con tali studi abbiamo quindi identificato il TRPA1 come principale protagonista in due importanti modelli di CIPN. Una possibile via comune attivata da molecole chimicamente differenti come farmaci platino-derivati e taxani è che entrambi causano stress ossidativo e di conseguenza produzione di ROS e RNS in diversi tessuti e cellule un effetto che sembra contribuire anche alla loro attività antitumorale. Infatti, abbiamo scoperto che oxaliplatino e paclitaxel sono in grado di attivare neuroni nocicettivi mediante la formazione di sottoprodotti dello stress ossidativo, che stimolano il TRPA1 (Materazzi et al., 2012; Nassini et al., 2011).

Quindi, lo stress ossidativo sembra contribuire all'insorgenza di CIPN, stimolando le terminazioni nervose sensoriali nocicettive attivando il TRPA1. Tuttavia, una serie di interrogativi rimangono senza risposta. In primo luogo, ulteriori agenti chemioterapici (vincristina, bortezomib, talidomide e derivati) sono noti produrre stress ossidativo e causare CIPN, ma il ruolo del TRPA1 in questo effetto non è stato ancora esplorato. È possibile che diversi meccanismi molecolari siano coinvolti in una iperfunzione dei TRP, compresi i meccanismi di trasduzione intracellulare e fattori epigenetici, che sono stati proposti svolgere un ruolo chiave

nei modelli di dolore neuropatico. I risultati ottenuti da questo progetto identificano ulteriormente il ruolo del canale TRPA1 come sensore dello stress ossidativo prodotto in differenti condizioni patologiche (croniche ed infiammatorie) e definiscono nuove e potenziali strategie terapeutiche per CIPN, basate sull'utilizzo di antagonisti del canale TRPA1 in grado di ridurre l'ipersensibilità sensoriale dolorosa evocata da differenti agenti chemioterapici.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz J., Birnbaumer L. *Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels*. *Faseb J* 2009; 23: 297-328
- Aldini G., Dalle-Donne I., Colombo R., Maffei Facino R., Milzani A., Carini M. *Lipoxidation-derived reactive carbonyl species as potential drug targets in preventing protein carbonylation and related cellular dysfunction*. *Chem Med Chem* 2006; 1: 1045-58
- Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y. *Intake of garlic and its bioactive components*. *J Nutr* 2001; 131: 955S-62S
- Amann R., Donnerer J., Lembeck F. *Ruthenium red selectively inhibits capsaicin-induced release of calcitonin gene-related peptide from the isolated perfused guinea pig lung*. *Neurosci Lett* 1989; 101: 311-5
- Anand U., Otto W.R., Facer P., Zebda N., Selmer I., Gunthorpe M.J., Chessell, I.P., Sinisi M., Birch R., Anand P. *TRPA1 receptor localisation in the human peripheral nervous system and functional studies in cultured human and rat sensory neurons*. *Neurosci Lett*. 2008; 438: 221-7
- Andersson D.A., Gentry C., Moss S., Bevan S. *Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress*. *J Neurosci* 2008; 28: 2485-94
- Andre' E., Campi B., Materazzi S., Trevisani M., Amadesi S., Massi D., Creminon C., Vaksman N., Nassini R., Civelli M., Baraldi P.G., Poole, D.P., Bunnett N.W., Geppetti P., Patacchini R. *Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents*. *J Clin Invest* 2008; 118: 2574-82
- Baluk P., Bertrand C., Geppetti P., McDonald D.M., Nadel J.A. *NK1 receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea*. *Am J Physiol* 1995; 268: L263-9
- Bandell M., Story G.M., Hwang S.W., Viswanath V., Eid S.R., Petrus M.J., Earley T.J., Patapoutian A. *Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin*. *Neuron* 2004; 41: 849-57
- Barnes, P.J. *Asthma as an axon reflex*. *Lancet*.1986; 1: 242-5
- Barnes P.J. *Overview of neural mechanisms in asthma*. *Pulm Pharmacol*. 1995; 8: 151-9
- Barnes p.j. *Cytokine modulators as novel therapies for airway disease*. *Eur Respir J Suppl* 2001; 34: 67s-77s.

- Bautista D.M., Movahed P., Hinman A., Axelsson H.E., Sterner O., Hogestatt E.D., Julius D., Jordt S.E., Zygmunt P.M. *Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1*. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 12248-52
- Bautista D.M., Jordt S.E., Nikai T., Tsuruda P.R., Read A.J., Poblete J., Yamoah E.N., Basbaum A.I., Julius D. *TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents*. Cell 2006; 124: 1269-82
- Belvisi m.g., chung k.f., jackson d.m., barnes p.j. *Opioid modulation of non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig in vivo*. Br J Pharmacol 1988; 95: 413-8
- Benedetti A., Comporti M., Esterbauer H. *Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids*. Biochim Biophys Acta 1980; 620: 281-96
- Bessac B.F., Sivula M., Von Hehn C.A., Escalera J., Cohn L., Jordt S.E. *TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons*. J Clin Invest. 2008; 118: 1899-910
- Biro t., Acs G., Acs P., Modarres S., Blumberg P.M. *Recent advances in understanding of vanilloid receptors: a therapeutic target for treatment of pain and inflammation in skin*. J Investig Dermatol Symp Proc 1997; 2: 56-60
- Bowden J.J., Sulakvelidze, I., Mc,Donald, D.M.. *Inhibition of neutrophil and eosinophil adhesion to venules of rat trachea by beta 2-adrenergic agonist formoterol*. J Appl Physiol 1994; 77: 397-405
- Brace L.D. *Cardiovascular benefits of garlic (Allium sativum L)*. J Cardiovasc Nurs 2002; 16: 33-49
- Caceres A.I., Brackmann M., Elia M.D., Bessac B.F., Del Camino D., D'amours M., Witek J.S., Fanger C.M., Chong J.A., Hayward N.J., Homer R.J., Cohn L., Huang X., Moran M.M., Jordt S.E. *A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma*. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 19
- Calixto J.B., Kassuya C.A., Andre E., Ferreira J. *Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions*. Pharmacol Ther 2005; 106: 179-208
- Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius, D. *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. Nature 1997; 389: 816-24
- Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeitz K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. *Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor*. Science 2000; 288: 306-13

- Cesare P., Dekker L.V., Sardini A., Parker P.J., McNaughton P.A. *Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat*. *Neuron* 1999; 23: 617-24
- Clapham D.E., Runnels L.W., Strubing C. *The TRP ion channel family*. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 387-96
- Clapham D.E., Montell C., Schultz G., Julius D. *International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels*. *Pharmacol Rev* 2003a; 55: 591-6
- Clapham, D.E. *TRP channels as cellular sensors*. *Nature* 2003b; 4: 426, 517-24
- Cohn L., Elias J.A., Chupp G.L. *Asthma: mechanisms of disease persistence and progression*. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 789-815
- Coleridge H.M., Coleridge J.C. *Pulmonary reflexes: neural mechanisms of pulmonary defense*. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 69-91
- Corey D.P., Garcia-Anoveros J., Holt J.R., Kwan K.Y., Lin S.Y., Vollrath M.A., Amalfitano A., Cheung E.L., Derfler B.H., Duggan A., Geleoc G.S., Gray P.A., Hoffman M.P., Rehm H.L., Tamasauskas D., Zhang D.S. *TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells*. *Nature* 2004; 432: 723-30
- Couture R., Harrisson M., Vianna R.M., Cloutier F. *Kinin receptors in pain and inflammation*. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 161-76
- Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A. *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression*. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 389-406
- Dantzer R., Bluthé R.M., Gheusi G., Cremona S., Layé S., Parnet P., Kelley K.W. *Molecular basis of sickness behavior*. *Ann New York Acad Sci* 1998; 856: 132-138
- De Bono M., Tobin D.M., Davis M.W., Avery L., Bargmann C.I. *Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli*. *Nature* 2002; 419: 899-903
- Denis V., Cyert M.S. *Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue*. *J Cell Biol* 2002; 156: 29-34
- Dirig D.M., Yaksh T.L. *Spinal synthesis and release of prostanoids after peripheral injury and inflammation*. *Adv Exp Med Biol* 1999; 469: 401-408
- Doerner J.F., Gisselmann G., Hatt H., Wetzel C.H. *Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions*. *J Biol Chem* 2007; 282: 13180-9

- Earley S., Gonzales A.L., Crnich R. *Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels*. *Circ Res* 2009; 104: 987-94
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128
- Facchinetti F., Amadei F., Geppetti P., Tarantini F., di Serio C., Dragotto A., Gigli P.M., Catinella S., Civelli M., Patacchini R. *Alpha,beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 37: 617-23
- Farmer S.G., Burch R.M. *Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32: 511-36
- Fleming R.A. *An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology*. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 146S-154S
- Funk C.D. *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. *Science* 2001; 294: 1871-1875
- García-Añoveros J., Nagata K. *TRPA1*. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 347: 62
- Geppetti P., Bertrand C., Ricciardolo F.L., Nadel J.A. *New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation*. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 843-7
- Geppetti P., Bertrand C., Baker J., Yamawaki I., Piedimonte G., Nadel J.A. *Ruthenium red, but not capsazepine reduces plasma extravasation by cigarette smoke in rat airways*. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 646-50
- Geppetti P., Materazzi S., Nicoletti P. *The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease*. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 207-14
- Geppetti P., Nassini R., Trevisani M. *Rationale for vanilloid receptor 1 antagonist-based therapies in asthma*. In Polosa, R., Holgate, S.T. *Therapeutic Strategies. ASTHMA Modern Therapeutic Targets* 2007; 117-127
- Ghilarducci D.P., Tjeerdema, R.S. *Fate and effects of acrolein*. *Rev Environ Contam Toxicol* 1995; 144: 95-146
- Hales C.A., Barkin P.W., Jung W., Trautman E., Lamborghini D., Herrig N., Burke J. *Synthetic smoke with acrolein but not HCl produces pulmonary edema*. *J Appl Physiol* 1988; 64: 1121-33

- Hales C.A., Musto S.W., Janssens S., Jung W., Quinn D.A., Witten M. *Smoke aldehyde component influences pulmonary edema*. J Appl Physiol 1992; 72: 555-61
- Hall J.M. *Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles*. Pharmacol Ther 1992; 56: 131-90
- Handzel Z.T *Effects of environmental pollutants on airways, allergic inflammation, and the immune response*. Rev Environ Health 2000; 15: 325-36
- Hardie R.C. *Regulation of TRP channels via lipid second messengers*. Annu Rev Physiol 2003; 65: 735-59
- Hinman A., Chuang H.H., Bautista D.M., Julius D. *TRP channel activation by reversible covalent modification*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 19564-8
- Hoenderop J.G., Vennekens R., Muller D., Prenen J., Droogmans G., Bindels R.J., Nilius, B. *Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2*. J Physiol 2001; 537: 747-61
- Holzer P. *Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides*. Neuroscience 1988; 24: 739-68
- Holzer P. *Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons*. Pharmacol Rev 1991; 43: 143-201
- Hoshino Y., Mio T., Nagai S., Miki H., Ito I., Izumi T. *Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L509-16
- Howard, J., Bechstet S. *Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors*. Curr Biol 2004; 14: R224-6
- Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J., Miller J.D., Davies S.N., Geppetti P., Walker J.M., Di Marzo V. *An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors*. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8400-5
- Hwang S.W., Cho H., Kwak J., Lee S.Y., Kang C.J., Jung J., Cho S., Min K.H., Suh Y.G., Kim D., Oh U. *Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 6155-60
- Jan Y.N., Jan L.Y. *Neuronal specification*. Curr Opin Genet Dev 1992; 2: 608-13

- Janssen L.J., Kwan C.Y. *ROCs and SOCs: What's in a name?* Cell Calcium 2007; 41: 245-247
- Jaquemar D., Schenker T., Trueb B. *An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts.* J Biol Chem 1999; 274: 7325-33
- Jiang M. C., Gebhart G. F. *Development of mustard oil-induced hyperalgesia in rats.* Pain 1998; 77: 305-313
- Jiang J., Malavia N., Suresh V., George S.C. *Nitric oxide gas phase release in human small airway epithelial cells.* Respir Res 2009;19: 10-3
- Jordt S.E., Bautista D.M., Chuang H.H., Mckemy D.D., Zygmunt P.M., Hogestatt E.D., Meng I.D., Julius D. *Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1.* Nature 2004; 427: 260-5
- Joseph P.K., Rao K.R., Sundaresh C.S. *Toxic effects of garlic extract and garlic oil in rats.* Indian J Exp Biol 1989; 27: 977-9
- Karlsson J.A. *A role for capsaicin sensitive, tachykinin containing nerves in chronic coughing and sneezing but not in asthma: a hypothesis.* Thorax. 1993; 48: 396-400
- Kessler F., Habelt C., Averbek B., Reeh P.W., Kress M. *Heatinduced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA.* Pain 1999; 83: 289-95
- Kobayashi K., Fukuoka T., Obata K., Yamanaka H., Dai Y., Tokunaga A., Noguchi K. *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 2005; 493: 596-606
- Kuwano K. *Epithelial cell apoptosis and lung remodeling.* Cell Mol Immunol 2007; 4: 419-29
- Kwan K.Y., Allchorne A.J., Vollrath M.A., Christensen A.P., Zhang D.S., Woolf C.J., Corey D.P. *TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction.* Neuron 2006; 50: 277-89
- Lamb J.P., Sparrow M.P. *Three-dimensional mapping of sensory innervation with substance p in porcine bronchial mucosa: comparison with human airways.* Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166: 1269-81
- Lee G., AbdI K., Jiang Y., Michaely P., Bennett V., Marszalek P.E. *Nanospring behaviour of ankyrin repeats.* Nature 2006; 440: 246-9
- Leikauf G.D. *Hazardous air pollutants and asthma.* Environ Health Perspect 2002; 4: 505-26

- Lembeck F., Holzer P. *Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1979; 310: 175-83
- Levine J.D., Fields H.L.; Basbaum A.I. *Peptides and the primary afferent nociceptor*. J Neurosci 1993; 13: 2273-86
- Levine J.D., Alessandri-Haber N. *TRP channels: targets for the relief of pain*. Biochim Biophys Acta 2007; 1772: 989-1003
- Livak KJ., Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Applied Biosystems 2001; 402 -408
- Mackinnon R. *Pore loops: an emerging theme in ion channel structure*. Neuron 1995; 14: 889-92
- Macpherson L.J., Dubin A.E., Evans M.J., Marr F., Schultz P.G., Cravatt B.F., Patapoutian A. *Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines*. Nature 2007; 445: 541-5
- Materazzi S., Nassini R., Andre E., Campi B., Amadesi S., Trevisani M., Bunett W.N., Patacchini R., Geppetti P. *Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1*. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 12045-50
- Mckemy D.D., Neuhausser W.M., Julius, D. *Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation*. Nature 2002; 416: 52-8
- Mcnamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M. *TRPA1 mediates formalin-induced pain*. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 13525-30
- Miller B.A. *The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death*. J Membr Biol 2006; 209: 31-41
- Minke B. *Drosophila mutant with a transducer defect*. Biophys Struct Mech 1977; 3: 59-64
- Mizumura K., Koda H., Kumazawa T. *Evidence that protein kinase C activation is involved in the excitatory and facilitatory effects of bradykinin on canine visceral nociceptors in vitro*. Neurosci Lett 1997; 237: 29-32
- Montell C. *The TRP superfamily of cation channels*. Sci, STKE 2005; 22: 272
- Montell C., Jones K., Hafen E., Rubin G. *Rescue of the Drosophila phototransduction mutation trp by germline transformation*. Science 1985; 230: 1040-3
- Moretto N., Facchinetti F., Southworth T., Civelli M., Singh D., Patacchini R. *{alpha},{beta}-Unsaturated aldehydes contained in cigarette smoke elicit IL-8 release in pulmonary cells*

- through mitogen-activated protein kinases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296: L839-48
- Nagata K., Duggan A., Kumar G., Garcia-Anoveros J. *Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. J Neurosci* 2005; 25: 4052-61
- Nassenstein C., kwong K., taylor-Clark T., Kollarik M., macglashan D.M., braun A., Udem B.J. *Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. J Physiol.* 2008; 586: 1595-604
- Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. *Transient receptor potential cation channels in disease. Physiol* 2007; 87: 165-217
- Nilius B., Vennekens R., Prenen J., Hoenderop J.G., Droogmans G., Bindels R.J. *The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel. J Biol Chem* 2001; 276: 1020-5
- Nozawa k., Kawabata-shoda e., Doihara h., Kojima r., Okada h, Mochizuki s., Sano y., Inamura k., Matsushime h., Koizumi t., Yokoyama t., Ito h. *TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. Drug Discovery Research* 2009; 106: 3408-13
- Ossovskaya V.S., Bunnett N.W. *Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. Physiol Rev* 2004; 84: 579-621
- Parekh A.B., Putney J.W. *Store-operated calcium channels. Physiol Rev* 2005; 85: 757-810
- Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A. *A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. Cell* 2002; 108: 705-15
- Petrus M., Peier A.M., Bandell M., Hwang S.W., Huynh T., Olney N., Jegla T., Patapoutian, A. *A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. Mol Pain* 2007; 3: 40
- Piedimonte G., Hoffman J.I., HusseinI W.K., Snider R.M., Desai M.C., Nadel J.A. *NK1 receptors mediate neurogenic inflammatory increase in blood flow in rat airways. J Appl Physiol* 1993; 74: 2462-8
- Poole L.B., Karplus P.A., Claiborne A. *Protein sulfenic acids in redox signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 325-47
- Premkumar L.S., Ahern G.P. *Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. Nature* 2000; 408: 85-90

- Racke' K., Haag S., Bahulayan A., Warnken M. *Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2008; 378: 93-201
- Ramnarine S.I., Liu Y.C., Rogers D.F. *Neuroregulation of mucus secretion by opioid receptors and K(ATP) and BK(Ca) channels in ferret trachea in vitro*. Br J Pharmacol 1998; 123: 1631-8
- Regoli D., Boudon A., Fauchere J.L. *Receptors and antagonists for substance P and related peptides*. Pharmacol Rev 1994; 46: 551-99
- Reid G. *ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to?* Pflugers Arch 2005; 451: 250-63
- Richardson J.D., Vasko M.R. *Cellular mechanisms of neurogenic inflammation*. J Pharmacol Exp Ther 2002; 302: 839-45
- Ruan T., Lin Y.S., Lin K.S., Kou Y.R. *Sensory transduction of pulmonary reactive oxygen species by capsaicin-sensitive vagal lung afferent fibres in rats*. J Physiol 2005; 565: 563-78
- Sant'ambrogio G., Mortola J.P., Severin C.M. *Stretch receptors of the trachea*. Adv Exp Med Biol 1978; 99: 307-13
- Sasamura T., Sasaki M., Tohda C., Kuraishi Y. *Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus*. Neuroreport 1998; 9: 2045-8
- Sawada Y., Hosokawa H., Matsumura K., Kobayashi S. *Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide*. Eur J Neurosci 2008; 27: 1131-42
- Schaible H.G., Del Rosso A., Matucci-Cerinic M. *Neurogenic Aspects of Inflammation*. Rheum Dis Clin N Am 2005; 31: 77-101
- Schenker T., Trueb, B. *Down-regulated proteins of mesenchymal tumor cells*. Exp Cell Res 1998; 239: 161-8
- Sedgwick S.G., Smerdon S.J. *The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework*. Trends Biochem Sci 1999; 24: 311-6
- Shirakawa H., Yamaoka T., Sanpei K., Sasaoka H., Nakagawa T., Kaneko S. *TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons*. Biochem Biophys Res Commun 2008; 377: 1211-5
- Sidi S., Friedrich R.W., Nicolson T. *NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction*. Science 2003; 301: 96-9

- Simon S.A., Liedtke W. *How irritating: the role of TRPA1 in sensing cigarette smoke and aerogenic oxidants in the airways*. J Clin Invest 2008; 118: 2383-6
- Sotomayor M., Corey D.P., Schulten K. *In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats*. Structure 2005; 13: 669-82
- Stahl G.L., Pan H.L., Longhurst J.C. *Activation of ischemia- and reperfusion-sensitive abdominal visceral C fiber afferents. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals*. Circ Res 1993; 72: 1266-75
- Stokes A., wakano C., koblan-Huberson M., adra C.N., fleig A., turner H. *TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD*. Cell Signal. 2006; 18: 1584-94
- Story G.M., Peier A.M., Reeve A.J., Eid S.R., Mosbacher J., Hricik T.R., Earley T.J., Hergarden A.C., Andersson D.A., Hwang S.W., McIntyre P., Jegla T., Bevan S., Patapoutian A. *ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures*. Cell 2003; 112: 819-29
- Stowers L., Holy T.E., Meister M., Dulac C., Koentges G. *Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2*. Science 2002; 295: 1493-500
- Straus D.S., Glass C.K. *Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets*. Med Res Rev 2001; 21: 185-210
- Szallasi A. *Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man*. Acta Physiol Scand Suppl 1995; 629: 1-68
- Szallasi A., Cortright D.N., Blum C.A., Eid S.R. *The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept*. Nat Rev Drug Discov 2007; 6: 442
- Taylor-Clark T.E., Udem B.J., Macglashan D.W. Jr., Ghatta S., Carr. M.J., Mcalexander M.A. *Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1)*. Mol Pharmacol 2008; 73: 274-81
- Taylor-Clark T.E., Kiros F., Carr M.J., Mcalexander M.A. *Transient receptor potential ankyrin 1 mediates toluene diisocyanate-evoked respiratory irritation*. Am J Respir Cell Mol Biol 2009; 40: 756-62
- Thompson C.A., Burcham P.C. *Protein alkylation, transcriptional responses and cytochrome c release during acrolein toxicity in A549 cells: influence of nucleophilic culture media constituents*. Toxicol In Vitro 2008; 22: 844-53

- Tilley S.L., Coffman T.M., Koller B.H. *Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes*. J Clin Invest 2001; 108: 15–23
- Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. *The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli*. Neuron 1998; 21: 531-43
- Tominaga M., Julius D. *Capsaicin receptor in the pain pathway*. Jpn J Pharmacol 2000; 83, 20-4
- Trevisani M., Smart D., Gunthorpe M.J., Tognetto M., Barbieri M., Campi B., Amadesi S., Gray J., Jerman J.C., Brough S.J., Owen D., Smith G.D., Randall A.D., Harrison S., Bianchi A., Davis J.B., Geppetti P. *Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1*. Nat Neurosci 2002; 5: 546-51
- Trevisani M., Siemens J., Materazzi S., Bautista D.M., Nassini R., Campi B., Imamachi N., Andrè E., Patacchini R., Cottrell G.S., Gatti R., Basbaum A.I., Bunnett N.W., Julius D., Geppetti P. *4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1*. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 13519-24
- Uchida K. *4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress*. Prog Lipid Res 2003; 42: 318-43
- Vennekens R., Hoenderop J.G., Prenen J., Stuiver M., Willems P.H., Droogmans G., Nilius B., Bindels R.J. *Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel*. J Biol Chem 2000; 275: 3963-9
- Vignola A.M., Chanez P., Siena L., Chiappara G., Bonsignore G., Bousquet J. *Airways remodelling in asthma*. Pulm Pharmacol Ther 1998; 11: 355-7
- Vriens J., Owsianik G., Voets T., Droogmans G., Nilius B. *Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels*. Pflugers Arch 2004; 449: 213-26
- Walker R.G., Willingham A.T., Zuker C.S. *A Drosophila mechanosensory transduction channel*. Science 2000; 287: 2229-34
- Wang S., Dai Y., Fukuoka T., Yamanaka H., Kobayashi K., Obata K., Cui X., Tominaga M., Noguchi K. *Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain*. Brain 2008; 131: 1241-51
- Watt B.E., Proudfoot A.T., Vale J.A. *Hydrogen peroxide poisoning*. Toxicol Rev 2004; 23: 51–57
- Xu H., Blair N.T., Clapham D.E. *Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism*. J Neurosci 2005; 25: 8924-37

- Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K.L., Cook B., Wu D., Zuker C.S., Ryba N.J. *Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways*. Cell 2003; 112: 293-301
- Zhou X.L., Batiza A.F., Loukin S.H., Palmer C.P., Kung C., Saimi Y. *The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 7105-10
- Zurborg S., Yurgionas B., Jira J.A., Caspani O., Heppenstall P.A. *Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca^{2+}* . Nat Neurosci 2007; 10:277-9
- Zygmunt P.M., Petersson J., Andersson D.A., Chuang H., Sorgard M., Di Marzo V., Julius D., Hogestatt E.D. *Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide*. Nature 1999; 400: 452-7

8. APPENDICE

Nassini R, Materazzi S, Andrè E, Sartiani L, Aldini G, Trevisani M, Carnini C, Massi D, **Pedretti P**, Carini M, Cerbai E, Preti D, Villetti G, Civelli M, Trevisan G, Azzari C, Stokesberry S, Sadofsky L, McGarvey L, Patacchini R, Geppetti P. "Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents." *FASEB J.* 2010 Aug 18.

Romina Nassini, Maarten Gees, Selena Harrison, Gaetano De Siena, Serena Materazzi, Nadia Moretto, Paola Failli, Delia Preti, Nicola Marchetti, Alberto Cavazzini, Francesca Mancini, **Pamela Pedretti**, Bernd Nilius, Riccardo Patacchini and Pierangelo Geppetti. "Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents *via* TRPA1 receptor stimulation". *Pain* 2011 Jul;152(7):1621-31. Epub 2011 Apr 9.

Materazzi S, Fusi C, Benemei S, **Pedretti P**, Patacchini R, Nilius B, Prenen J, Creminon C, Geppetti P, Nassini R. *TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism.* *Pflugers Arch.* 2012 Apr;463(4):561-9. Epub 2012 Jan 19.

Baraldi PG, Romagnoli R, Saponaro G, Aghazadeh Tabrizi M, Baraldi S, **Pedretti P**, Fusi C, Nassini R, Materazzi S, Geppetti P, Preti D. *7-Substituted-pyrrolo[3,2-d]pyrimidine-2,4-dione derivatives as antagonists of the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel: A promising approach for treating pain and inflammation.* *Bioorg Med Chem.* 2012 Mar 1;20(5):1690-8. Epub 2012 Jan 24.

Nassini R, **Pedretti P**, Moretto N, Fusi C, Carnini C, Facchinetti F, Viscomi AR, Pisano AR, Stokesberry S, Brunmark C, Svitacheva N, McGarvey L, Patacchini R, Damholt AB, Geppetti P, Materazzi S. *Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation.* *PLoS One.* 2012;7(8):e42454. Epub 2012 Aug 14.

Riccardo Zecchi, Marcello Trevisani, Maria Gloria Pittelli, **Pamela Pedretti**, Maria Elena Manni, Giuseppe Pieraccini, Barbara Pioselli, Francesco Amadei, Gloriano Moneti and Silvia Catinella. *Impact of drug administration route on drug delivery and distribution into the lung: an imaging mass spectrometry approach.* *Eur. J. Mass Spectrom.* 19, 2013.

Nassini R., De Cesaris F., **Pedretti P.** and Geppetti P. "*TRPS and Migraine*" *The Open Drug Discovery Journal*, 2010, 2, 55-63.

Raffaele Gatti, **Pamela Pedretti**, Romina Nassini, and Marcello Trevisani. *Enhanced Cough, Animal Models.* *Methods in Pharmacology and Toxicology.* 2013,17.