



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Universidad Miguel Hernández

Instituto de Neurociencias

Los canales iónicos termosensibles TRPM8 y TRPA1:
papel en la termosensación y la termorregulación en
condiciones fisiológicas y en un modelo experimental de
neuropatía inducida por el oxaliplatino

Tesis para optar al grado de Doctor en Neurociencias

Presentada por:

Carlos Fernández-Peña Acuña

Directores:

Dr. Félix Viana de la Iglesia

Dra. Rosa Señarís Rodríguez



2015

A QUIEN CORRESPONDA:

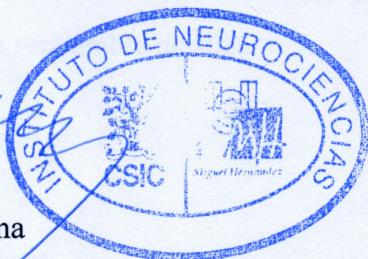
Prof. Juan Lerma Gómez, Director del Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA,

Que la Tesis Doctoral "*Los canales iónicos termosensibles TRPM8 y TRPA1: Papel en la termosensación y la termorregulación en condiciones fisiológicas y en un modelo experimental de neuropatía inducida por el oxaliplatino*" ha sido realizada por D. Carlos Fernández-Peña Acuña bajo la dirección del Dr. Félix Viana de la Iglesia y la Dra. Rosa Señarís Rodríguez, y da su conformidad para que se presente la tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expide y firma el presente Certificado en San Juan de Alicante en Septiembre de 2015

Fdo. Juan Lerma
Director



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

A QUIEN CORRESPONDA:

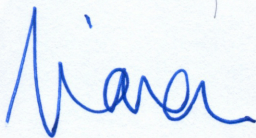
Félix Viana de la Iglesia, Investigador Científico del CSIC en el Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y la Agencia Estatal de Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA,

Que el Sr. Carlos Fernández-Peña Acuña, ha realizado bajo mi dirección el trabajo experimental que recoge en su Tesis Doctoral "Los canales iónicos termosensibles TRPM8 y TRPA1: Papel en la termosensación y la termorregulación en condiciones fisiológicas y en un modelo experimental de neuropatía inducida por el oxaliplatino".

Que he revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo y doy mi conformidad para que se presenta la tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expide y firma el presente Certificado en San Juan de Alicante a 21 de septiembre de 2015.



Fdo. Félix Viana de la Iglesia



UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Fisioloxía

Facultade de Medicina

R/ S. Francisco, s/n

15782 Santiago de Compostela

Tel. 981 582 658 • Fax. 981 574 145

Dña. Rosa M^a Señarís Rodríguez, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "Los canales iónicos termosensibles TRPM8 y TRPA1: Papel en la termosensación y la termorregulación en condiciones fisiológicas y en un modelo experimental de neuropatía inducida por el oxaliplatino" ha sido realizada bajo mi dirección por D. Carlos Fernández-Peña Acuña.

Que este trabajo ha sido concluido, revisado y reúne las condiciones necesarias para optar al Título de Doctor.

Para que así conste, firmo la presente certificación en Santiago de Compostela, 21 de Septiembre de 2015.

Fdo. Rosa M^a Señarís Rodríguez



A Dios,

a mis padres José Luis y Alicia,

a mi esposa Rebeca,

a toda mi familia y amigos.

Índice

| | |
|--|------------------|
| Resumen | <i>i</i> |
| Abreviaturas | <i>ii</i> |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. La familia de canales iónicos TRP | 2 |
| 1.1.1. El canal iónico TRPM8..... | 6 |
| Papel del canal TRPM8 en algunas patologías..... | 10 |
| 1.1.2. El canal iónico TRPA1..... | 11 |
| Papel del canal TRPA1 en algunas patologías..... | 15 |
| 1.2. La termosensación y la termorregulación | 17 |
| 1.2.1. Vías aferentes de la termosensación..... | 19 |
| 1.2.1.1. Aferencia discriminativa..... | 21 |
| 1.2.1.2. Aferencia homeostática..... | 22 |
| 1.2.2. Termorregulación..... | 24 |
| 1.2.3. Control circadiano de la temperatura interna..... | 28 |
| 1.2.4. Termorregulación durante la restricción calórica..... | 31 |
| 1.2.5. TRPM8 en la termorregulación..... | 32 |
| 1.2.6. TRPA1 en la termorregulación..... | 33 |
| 1.3. Nocicepción y dolor | 34 |
| 1.3.1. Percepción del dolor por frío..... | 34 |
| 1.3.2. Mecanismos de transducción de estímulos nocivos..... | 35 |
| 1.3.2.1. Clasificación de los nociceptores..... | 36 |
| 1.3.3. Vías aferentes de la información nociceptiva..... | 37 |
| 1.3.4. Clasificación del dolor..... | 39 |
| 1.3.4.1. Dolor nociceptivo..... | 39 |
| 1.3.4.2. Dolor Inflamatorio..... | 39 |
| 1.3.4.3. Dolor neuropático..... | 40 |
| 1.3.5. Neuropatía inducida por administración de oxaliplatino..... | 41 |
| 1.3.5.1. Fases de la neuropatía por oxaliplatino..... | 42 |
| 2. Objetivos | 45 |
| 2.1. Objetivo general | 45 |
| 2.2. Objetivos específicos | 45 |
| 3. Materiales y métodos | 46 |
| 3.1. Animales | 46 |
| Ratones Trpm8DTR..... | 46 |
| 3.2. Fármacos | 47 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. Experimentos conductuales | 47 |
| 3.3.1. Test de acetona | 48 |
| 3.3.2. Test de la placa fría y test de la placa fría dinámica..... | 48 |
| 3.3.3. Enfriamiento con hielo seco o “Cold plantar assay test” | 49 |
| 3.3.4. Test de von Frey | 51 |
| 3.3.5. El “Eye-wiping test” como modelo de dolor trigeminal..... | 51 |
| 3.4. Medición telemétrica de la temperatura interna y la actividad motora. 52 | |
| 3.4.1. Implantación de sensores telemétricos | 52 |
| 3.4.2. Configuración del sistema de registro y análisis de datos | 53 |
| 3.5. Análisis general de datos | 55 |
| 4. Resultados | 57 |
| 4.1. Papel de los canales iónicos TRPM8 y TRPA1 como sensores de frío en condiciones fisiológicas | 57 |
| 4.2. Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad a estímulos de frío y a estímulos mecánicos. | 64 |
| 4.3. Efecto agudo del oxaliplatino sobre la termosensación de frío | 71 |
| 4.4. Efecto de los antagonistas de TRPA1 y TRPM8 sobre la hipersensibilidad al frío inducida por oxaliplatino | 74 |
| 4.5. Efecto del AP18 sobre la sensibilidad mecánica y al frío de ratones silvestres sanos | 77 |
| 4.6. Efecto del oxaliplatino sobre la sensación de frío en animales deficientes en TRPA1 o TRPM8 | 80 |
| 4.7. Efecto del oxaliplatino sobre la tolerancia al enfriamiento | 86 |
| 4.8. Efecto del oxaliplatino sobre las respuestas evocadas por el enfriamiento con hielo seco | 88 |
| 4.9. Papel de las neuronas que expresan el canal iónico termosensible TRPM8 sobre la hipersensibilidad al frío inducida por oxaliplatino. | 90 |
| 4.10. Efecto del oxaliplatino sobre las respuestas nocidéfensivas evocadas por icilina. | 93 |
| 4.11. Efecto del oxaliplatino sobre el sistema trigeminal | 96 |
| 4.12. Efecto preventivo de la Acetil-L-Carnitina (ALCAR) sobre la sensibilización térmica y mecánica inducida por el oxaliplatino. | 99 |
| 4.13. Papel del canal iónico TRPM8 en la termorregulación. | 103 |
| 4.13.1. Frío ambiental | 103 |

| | |
|---|------------|
| 4.13.2. Restricción calórica (ayuno) | 121 |
| 4.13.3. Efecto del oxaliplatino sobre la termorregulación | 126 |
| 5. <i>Discusión</i>..... | 130 |
| 5.1. Papel de los canales TRPM8 y TRPA1 como sensores de frío..... | 130 |
| 5.1.1. TRPM8 | 130 |
| 5.1.2. TRPA1 | 133 |
| 5.2. Papel de los canales iónicos TRPM8 y TRPA1 en la hipersensibilidad al frío en la neuropatía inducida por oxaliplatino | 134 |
| 5.3. Participación del canal TRPM8 en los mecanismos de termorregulación | 141 |
| 5.3.1. Papel del TRPM8 en la termorregulación activada por el frío ambiental..... | 141 |
| 5.3.2. Papel del TRPM8 durante la hipotermia inducida por el ayuno | 148 |
| 5.3.3. El oxaliplatino altera transitoriamente la termorregulación, de forma independiente al TRPM8. 152 | |
| 5.4. Visión general | 153 |
| 6. <i>Conclusiones</i> | 155 |
| 7. <i>Referencias</i> | 156 |



Resumen

La termosensación es un mecanismo esencial para la supervivencia de los organismos superiores, pues permite evitar la exposición a estímulos térmicos potencialmente lesivos, así como mantener la temperatura interna constante bajo distintas condiciones ambientales. Sin embargo, distintas condiciones patológicas como la neuropatía inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino, resultan en una termosensación alterada. La detección de estímulos térmicos es llevada a cabo por neuronas sensoriales especializadas que expresan diversos receptores en sus membranas, entre los que destacan los canales iónicos termosensibles pertenecientes a la familia de los “Transient Receptor Potential” (TRP). De ellos, el canal TRPM8 y el TRPA1, se activan por frío como han revelado numerosos estudios *in vitro*, aunque existe controversia acerca de sus roles *in vivo*. Mediante diversas técnicas conductuales, en este trabajo se muestra que el canal iónico TRPM8, y no el TRPA1, actúa como el principal termosensor de frío *in vivo*, tanto en condiciones fisiológicas como en un modelo de neuropatía inducida por oxaliplatino. Además se muestra como el canal TRPA1 es necesario para el desarrollo de hipersensibilidad a estímulos mecánicos y de frío; signos característicos de dicha neuropatía experimental. Asimismo, la administración de un antioxidante previene la aparición de dichos signos, sugiriendo la implicación del estrés oxidativo. Adicionalmente, mediante estudios de telemetría, se demuestra la participación del canal TRPM8 en los mecanismos termorreguladores que son activados por el frío ambiental y por la restricción calórica. En conjunto, la evidencia aquí mostrada, refuerza enormemente el potencial terapéutico que representa la modulación de estos canales iónicos para el tratamiento óptimo de diversas patologías.

Abreviaturas

4-HNE: 4-Hidroxinoneal
ALCAR: Acetil-L-carnitina
A_m: Actividad motora
AMPc: Adenosina monofosfato cíclico
AP18: 4-(4-Clorofenil)-3-metil-3-buten-2-ona oxima
ARC: Núcleo arcuato
ATP: Adenosina trifosfato
BAT: Tejido adiposo pardo
BCTC: N-(4-terciaributilfenil)-4-(3-cloropiridin-2-il) tetrahidropiracina-1 (2H)-carboxil amida
BMR: "Basal metabolic rate"
CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
DMH: Hipotálamo dorsomedial
DMSO: Dimetil sulfóxido
DRG: Ganglio raquídeo
DT: Toxina diftérica
EC₅₀: Concentración de un compuesto necesaria para evocar el 50 % de activación.
FDR: "False Discovery Rate"
GABA: Ácido γ amino butírico
HC-030031: 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidro-7H-purin-7-il)-N-(4-isopropilfenil) acetamida
I.p.: Intraperitoneal
I.pl.: Intraplantar
I.v.: Intravenosa
IB4: Isolectina B4
IC₅₀: Concentración de un compuesto necesaria para conseguir el 50 % de inhibición.
IML: Núcleo intermediolateral de la médula espinal
MnPO: Núcleo preóptico mediano
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
NST: Termogénesis facultativa no dependiente de escalofríos
PBMC: 1-Feniletil-4-(benciloxi)-3-3-metoxibencil-(2-aminoetil)-carbamato
PBS: Tampón fosfato salino
POA: Área preóptica
PVN: Núcleo paraventricular
Q₁₀: Coeficiente de temperatura
rRPa: Rafe pallidus
SCN: Núcleo supraquiasmático
SEM: Error estándar de la media
ST: Termogénesis facultativa dependiente de escalofríos
SNA: Sistema nervioso autónomo
SNC: Sistema nervioso central
Task3^{-/-}: Genotipo carente del TASK3

TASK3: "TWIK-related acid sensitive K⁺ channel" 3
T_i: Temperatura corporal interna
TRP: "Transient receptor potential"
Trpa1^{-/-}: Genotipo carente del TRPA1
TRPA1: "Transient receptor Potential" Anquirina 1
Trpm8^{-/-}: Genotipo carente del TRPM8
TRPM8: "Transient receptor potential" Melastatina 8
Trpm8DTR: Genotipo que no expresa el receptor de DT en las neuronas TRPM8 positivas
Trpm8DTR⁺: Genotipo que expresa el receptor de DT en las neuronas TRPM8 positivas
Trpv1^{-/-}: Genotipo carente del TRPV1
TRPV1: "Transient receptor potential" Vaniloide 1
Tween80: Polisorbato 80
U.A.: Unidades arbitrarias
UCP1: "Uncoupling protein 1"
Vc: Vasoconstricción
WS: Neuronas del hipotálamo preóptico sensibles a calor



1. Introducción

Para cualquier ser vivo, desde las bacterias hasta los mamíferos, su capacidad para detectar y discernir cambios térmicos en el entorno representa un factor clave para su supervivencia (Digel 2011). En organismos superiores, la información térmica del medio es detectada y traducida en señales eléctricas por neuronas especializadas del sistema nervioso periférico, las cuales expresan una gran variedad de receptores sensoriales sensibles a la temperatura (McGlone & Reilly 2010). Dicha información es posteriormente procesada en el sistema nervioso central dando lugar, en última instancia, a una respuesta fisiológica adecuada a dichos estímulos.

Las primeras evidencias sobre la existencia de los receptores sensoriales activados por cambios térmicos llegaron a finales del siglo XIX con el descubrimiento de pequeños puntos cutáneos que, al ser estimulados por distintas temperaturas, evocaban sensaciones de frío o de calor (revisado en Belmonte et al 2009, Perl 2011). Durante la primera mitad del siglo XX, se describió la existencia de poblaciones de receptores cutáneos que eran activados preferentemente por estímulos térmicos inocuos. Estos receptores, descubiertos gracias a técnicas de registro electrofisiológico, fueron bautizados como termorreceptores (Belmonte et al 2009, Hensel 1981, Zotterman 1935). Los termorreceptores se pueden clasificar en termorreceptores de frío y termorreceptores de calor de acuerdo a la respuesta dinámica producida por un estímulo térmico (Hensel 1981). Dicho de otra manera, se considera que un termorreceptor es de frío cuando su actividad se incrementa con el descenso de la temperatura y es inhibida por un aumento de la temperatura, mientras que un termorreceptor de calor verá incrementada su actividad por el aumento de la temperatura e inhibida por el enfriamiento.

En 1967, Burgess y Perl describieron la existencia de una subpoblación de fibras aferentes poco mielinizados en la piel del gato que eran activadas exclusivamente por estímulos mecánicos nocivos (Burgess & Perl 1967). En un estudio posterior, se encontró que una gran proporción de las fibras C (no mielinizadas) eran activadas únicamente por estímulos nocivos, incluyendo estímulos térmicos, mecánicos y químicos, por lo que fueron bautizados como nociceptores polimodales (Bessou & Perl 1969). Esto sugirió que la información sensorial inocua y la que da lugar a respuestas de dolor viaja desde la periferia hacia el sistema nervioso central por vías separadas, permitiendo el procesamiento adecuado de las mismas (Ma 2010).

Entre las neuronas sensoriales primarias, existen subpoblaciones que están sintonizadas para detectar específicamente distintas temperaturas, discriminado además entre estímulos inocuos y nocivos. Se cree que dicha especificidad es otorgada por la expresión diferencial de receptores moleculares en las distintas subpoblaciones de neuronas sensoriales (Bandell et al 2007). En este sentido, se ha demostrado que distintos canales iónicos de la familia TRP ("Transient Receptor Potential") se encuentran involucrados en el procesamiento de señales ambientales, actuando como sensores moleculares de estímulos químicos, mecánicos y térmicos (Bandell et al 2007, Flockerzi & Nilius 2014).

1.1. La familia de canales iónicos TRP

En el año 1969, mientras se realizaban registros electrofisiológicos en retinas de *Drosophila melanogaster* mutantes, se descubrió una respuesta eléctrica anormal a estímulos lumínicos; en lugar de un potencial receptor normal, se observó un potencial receptor transitorio (Cosens & Manning 1969), siendo bautizado en un estudio posterior como potencial de receptor transitorio (TRP por sus siglas en inglés) (Minke et al 1975). Años más tarde se logró clonar el gen *trp*, dando como resultado una proteína de 1275 amino ácidos y seis regiones transmembrana putativas (Montell & Rubin 1989) (ver

Fig. 1.1a). Dichas características topológicas sugirieron que esta proteína podría formar un canal iónico o un receptor, lo cual inició una búsqueda intensa de nuevas proteínas receptoras relacionadas con el gen *trp*, lo que eventualmente dio lugar al descubrimiento de lo que hoy se conoce como familia de los canales iónicos TRPs (Patapoutian et al 2003) (ver Fig. 1.1b).

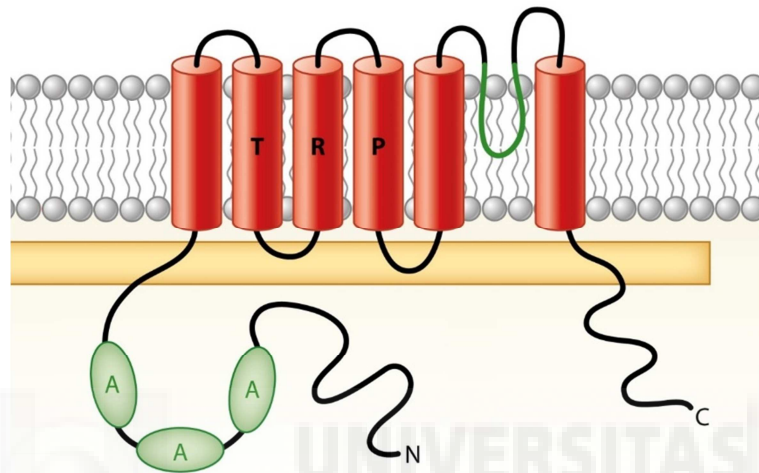


Figura 1.1a. Estructura canónica para una subunidad de un canal iónico TRP típico. A, dominios repetidos de anquirina; C, carboxilo terminal y N, amino terminal. Adaptado de (Julius 2013).

En mamíferos, la familia de los canales iónicos TRP está conformada por más de 30 miembros, subdividida en 7 subfamilias: TRP anquirina (TRPA), TRP canónico (TRPC), TRP melastatina (TRPM), TRP mucolipina (TRPML), TRP NOMPC (TRPN), TRP policistina (TRPP) y TRP vaniloide (TRPV1) (ver Fig. 1.1b) (Montell 2005, Nilius & Owsianik 2011, Vay et al 2012). A nivel de secuencia, estos canales poseen una gran semejanza con los canales de potasio activados por voltaje, lo cual ha permitido hacer aproximaciones acerca de su estructura tridimensional (Nilius & Owsianik 2011, Vay et al 2012). Las subunidades TRP se ensamblan en tetrámeros, tanto de homómeros como de heterómeros, para formar un canal funcional (Caterina 2007b, Moiseenkova-Bell et al 2008). Cada subunidad posee seis segmentos transmembrana, con un poro putativo formado entre los dominios transmembrana 5 y 6. Tanto el extremo N-terminal como el C-terminal son citosólicos, varían en longitud y en dominios estructurales y están

involucrados en la modulación y el tráfico de estos canales (Gees et al 2012, Vay et al 2012).

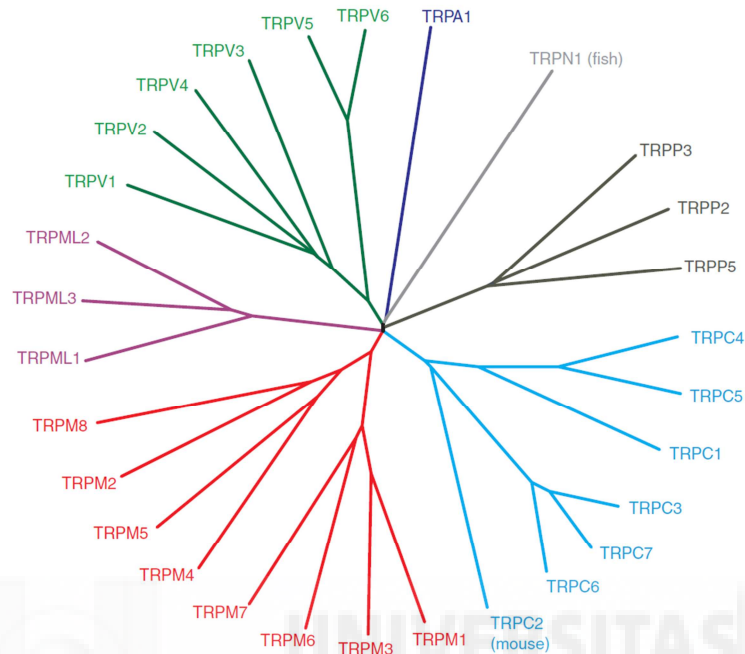


Figura 1.1b. Árbol filogenético de la familia de los canales TRP humanos. Adaptado de (Nilius & Owsianik 2011).

A pesar de que no se ha podido cristalizar ningún canal TRP hasta la fecha, recientemente se ha conseguido determinar la estructura tridimensional de los canales TRPV1 (Liao et al 2013) y TRPA1 (Paulsen et al 2015) empleando criomicroscopía electrónica de partícula única, lo cual ha aportado información muy valiosa para el estudio de los distintos estados conformacionales de dichos canales y la interacción con distintos compuestos moduladores. Muchos de los canales TRP juegan un papel muy importante en la detección de distintas modalidades sensoriales como la temperatura, el tacto y el dolor, entre otros (Bandell et al 2007, Clapham 2003). Entre todos los canales TRP, nueve miembros son considerados termosensibles, pudiendo ser agrupados en termosensibles a calor: TRPV1-4, TRPM3-5; y termosensibles a frío: TRPM8 y TRPA1 (Ferrandiz-Huertas et al 2014, Tominaga 2007). Se dice que un canal iónico es termosensible cuando sus mecanismos de apertura y cierre son altamente sensibles a la temperatura, lo cual se expresa mediante sus coeficientes de temperatura

(Q_{10}). El Q_{10} se define como el cambio relativo en la velocidad de una reacción o proceso biológico producido por un incremento de 10 °C en la temperatura. El mecanismo de apertura de los canales iónicos puede entenderse como una reacción química, en la cual el estado cerrado representa los reactantes y el estado abierto representa los productos. De esta forma, mediante la transferencia de energía térmica entre el entorno y el sistema, se facilita la transición desde el estado cerrado (reactantes) hacia el estado abierto (productos) (Talavera et al 2008). Para los distintos TRPs, sus Q_{10} oscilan entre 6 y 30, a diferencia de la mayoría de los canales iónicos cuyos valores de Q_{10} se encuentran entre 2 y 4 (Talavera et al 2008).

Uno de los hitos en el campo de los canales iónicos TRP ha sido la clonación y caracterización en 1997 del receptor de capsaicina o receptor vaniloide, que posteriormente pasó a llamarse potencial de receptor transitorio vaniloide 1 (o canal TRPV1 por sus siglas en inglés) (Caterina et al 1997). El canal TRPV1, el primer TRP identificado en mamíferos, es un canal catiónico no selectivo que se activa por la capsaicina, un compuesto pungente de las guindillas picantes o chiles, por pH ácido y por temperaturas elevadas dentro del rango considerado nocivo, con un umbral de activación alrededor de los 43 °C. Estas características, así como su expresión en nociceptores, sugirió que podría funcionar como transductor del calor nocivo *in vivo* (Caterina et al 1997). En este sentido, un estudio posterior mostró que los ratones *Trpv1*^{-/-} carecían de respuestas a estímulos de calor nocivo (>50 °C) (Caterina 2000). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por un grupo independiente no se reportaron diferencias significativas en los umbrales nociceptivos a estímulos térmicos nocivos cuando se comparó los ratones *Trpv1*^{-/-} con ratones silvestres (Davis et al 2000). A pesar de estas discrepancias, parece claro que el TRPV1 juega un papel importante en el dolor inflamatorio, pues se ha observado en distintos modelos experimentales que los animales que carecen de dicho canal no desarrollan hipersensibilidad térmica (Davis et al 2000, Woodbury et al 2004).

La caracterización de los distintos integrantes termosensibles de la familia de los canales TRP reveló que sus umbrales de activación cubrían un

amplio espectro de temperaturas, desde el frío hasta el calor nocivo, por lo que se ha propuesto que estos canales confieren la especificidad sensorial tanto a termorreceptores como a nociceptores (ver Fig. 1.1c.) (Belmonte & Viana 2008).

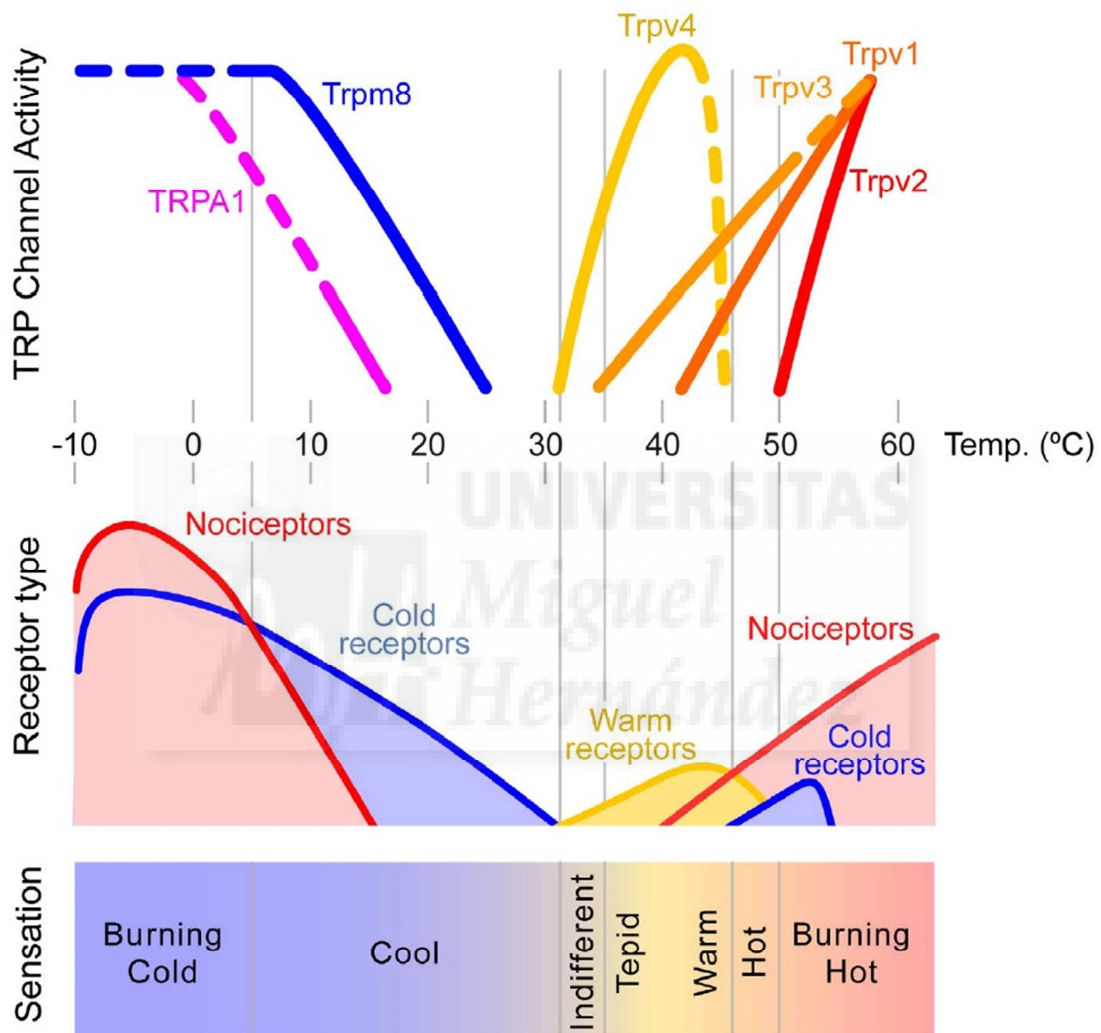


Figura 1.1c. Correspondencia hipotética entre la activación de los canales TRP termosensibles más importantes, la temperatura de la piel y la sensación evocada. Tomado de (Belmonte & Viana 2008).

1.1.1. El canal iónico TRPM8

El canal iónico receptor de potencial transitorio melastatina 8 (TRPM8 por sus siglas en inglés), es un canal catiónico no selectivo permeable a calcio que fue descubierto y clonado a partir de muestras de tejido

canceroso de próstata humana en el año 2001 por Tsavaler y colaboradores (Tsavaler et al 2001). En humanos, el TRPM8 está constituido por 1104 aminoácidos y, al igual que los otros TRPs, se ensambla en tetrámeros cuyas subunidades constan de 6 dominios transmembrana, un poro entre el quinto y el sexto dominio transmembrana y ambos extremos intracelulares (ver Fig. 1.1.1). El canal TRPM8 se expresa en una gran variedad de tejidos, incluyendo varios tipos de tumores, piel, lengua, dientes y sistema nervioso periférico. En el sistema nervioso periférico, se expresa en los ganglios raquídeos y del trigémino en aproximadamente el 10% de las neuronas sensoriales de pequeño diámetro (Almaraz et al 2014, Clapham 2003, Mäkiä et al 2007, Voets et al 2004). El TRPM8 se expresa mayoritariamente en neuronas no peptidérgicas y negativas al marcaje con la isolectina IB4 (Dhaka et al 2008, Peier et al 2002), aunque una pequeña fracción se expresa en neuronas peptidérgicas (i.e. CGRP y sustancia P positivas) (Axelsson et al 2009, Takashima et al 2007)

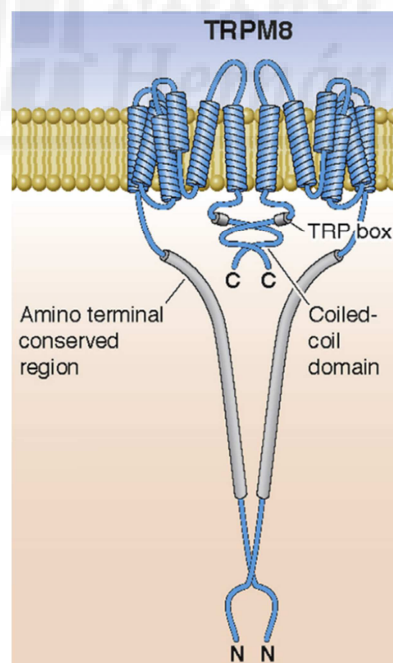


Figura 1.1.1. Esquema de la estructura de un dímero del canal iónico TRPM8. Cada subunidad contiene 6 segmentos transmembrana y dominios N y C terminales en el lado intracelular. La región N terminal está conservada entre los miembros de los TRPM. El extremo C terminal posee una región conservada entre las subfamilias TRPC, TRPV y TRPM denominada TRP box. Adaptado de (Cohen & Moiseenkova-Bell 2014).

La expresión del canal TRPM8 en sistemas heterólogos da lugar a una corriente iónica que se activa por frío con un umbral de activación entre 25-28 °C, similar al umbral observado en algunas neuronas sensoriales (27-33°C). El TRPM8 también se activa por compuestos que producen sensación de frescor como el mentol, el eucaliptol y la icilina (McKemy et al 2002, Peier et al 2002). Distintos factores pueden modular la actividad del canal TRPM8 (Almaraz et al 2014). Algunos factores modulan positivamente el canal, como por ejemplo el Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) o los lisofosfolípidos (LPL) (Andersson et al 2007, Liu & Qin 2005), la disrupción de las balsas de colesterol en la membrana plasmática (Morenilla-Palao et al 2009) o la glicosilación (Pertusa et al 2012). Por el contrario, otros factores como la actividad de la proteína quinasa A (PKA) (De Petrocellis et al 2007), los ácidos grasos poliinsaturados (Andersson et al 2007), la actividad de la proteína quinasa C (PKC) (Yudin & Rohacs 2012) y la interacción con sus propias isoformas truncadas (Bidaux et al 2012) lo modulan de forma negativa. Se han identificado una variedad de compuestos que actúan como antagonistas de este canal, entre los que se pueden destacar los protones (i.e. el pH bajo tanto intra como extracelular) (Andersson et al 2004), el 1-Feniletíl-4-(benciloxi)-3-3-metoxibencil-(2-aminoetil)-carbamato (PBMC) (Knowlton et al 2011), el hidrocloreuro de N-(3-aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metil]oxi-N-(2-tienilmetil) benzamida (AMTB) (Lashinger et al 2008), AMG978, AMG0635 (Gavva et al 2012), la capsazepina y la 4-(3-Cloro-2-piridinil)-N-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-1-piperacina-carboxamida (BCTC) (Behrendt et al 2004).

Distintos estudios farmacológicos han permitido demostrar que el canal TRPM8 tiene un importante papel como sensor de frío en neuronas sensoriales primarias en cultivo (Colburn et al 2007, Madrid et al 2006, McKemy et al 2002). Adicionalmente, estudios conductuales en ratones han aportado muchas evidencias de que este canal juega un papel muy importante en la detección de estímulos de frío inocuo. En dichos estudios se observó cómo los animales *Trpm8*^{-/-} mostraron un número menor de

respuestas, en comparación con animales silvestres, al ser estimulados con acetona, la cual al evaporarse produce un leve enfriamiento de la superficie cutánea. Más aún, en pruebas de preferencia de lugar, estos animales pasaban una mayor proporción del tiempo en las zonas frías en comparación a los ratones silvestres, sugiriendo que el canal TRPM8 participa en la detección de frío inocuo ($>15\text{ }^{\circ}\text{C}$) *in vivo* (Bautista et al 2007, Colburn et al 2007, Dhaka et al 2007). Sin embargo, utilizando experimentos en la placa fría para examinar las respuestas nocid defensivas ($<15\text{ }^{\circ}\text{C}$), algunos autores no observaron diferencias entre los animales *Trpm8*^{-/-} y los ratones silvestres, sugiriendo la existencia de al menos otro sensor que permite la detección de estos estímulos (Bautista et al 2007, Dhaka et al 2007).

A pesar de que estos resultados sugerían que el TRPM8 solo participaba en la detección del frío inocuo, los resultados de dos estudios recientes realizados de manera independiente, también indican un importante papel del TRPM8 en la detección del frío nocivo *in vivo* (Descoeur et al 2011, Knowlton et al 2010). En uno de estos trabajos, los autores observaron que, al colocar a los ratones sobre dos placas metálicas contiguas a distinta temperatura, los ratones *Trpm8*^{-/-} no mostraban diferencias significativas en el número de veces que exploraban la placa fría (27, 25, 20 y 15 $^{\circ}\text{C}$), comparada con las veces que exploraban la placa a 30 $^{\circ}\text{C}$ (Knowlton et al 2010). En el otro trabajo, los autores observaron que al exponer a los ratones silvestres a una gradiente térmico de enfriamiento (desde 30 hasta 0 $^{\circ}\text{C}$), estos mostraron respuestas conductuales de escape (consideradas nocid defensivas) con un umbral alrededor de 5 $^{\circ}\text{C}$, mientras que los ratones *Trpm8*^{-/-} carecieron de dichas respuestas (Descoeur et al 2011).

Más recientemente, dos grupos independientes desarrollaron ratones transgénicos que expresan el receptor de toxina diftérica en las neuronas que expresan el canal TRPM8 (*Trpm8DTR*⁺), de modo que la administración de la toxina diftérica en esos animales produce la ablación específica de las neuronas TRPM8 positivas (Knowlton et al 2013, Pogorzala et al 2013). En ambos trabajos, los autores observaron que tras la administración de toxina

diféptica, estos animales desarrollaron un fenotipo caracterizado por déficit en la detección de estímulos de frío aún mayor que al observado previamente en los *Trpm8*^{-/-}, sugiriendo la presencia de al menos otro sensor de frío presente en la misma subpoblación de neuronas que expresa el TRPM8.

Papel del canal TRPM8 en algunas patologías

Una fracción de neuronas sensoriales que expresan TRPM8 también responden a capsaicina (McKemy et al 2002, Viana et al 2002), co-localizan con marcadores de fibras nociceptivas como TRPV1 (Dhaka et al 2008), CGRP (Takashima et al 2007), sustancia P (Axelsson et al 2009) y receptores purinérgicos (Xing et al 2006). Adicionalmente, en modelos murinos de dolor inflamatorio (mediante la inyección del coadyuvante de Freund, CFA) y dolor neuropático (mediante la constricción crónica del nervio ciático, CCI), donde se observa la aparición de fenómenos de sensibilización como alodinia e hiperalgesia a estímulos de frío, se ha reportado que la hipersensibilidad al frío desarrollada en los ratones *Trpm8*^{-/-} era inferior al compararla con animales silvestres (Colburn et al 2007). Como consecuencia de estos antecedentes, se ha sugerido que el TRPM8 podría participar en distintas patologías (revisado en Fernández-Peña & Viana 2013). Por ejemplo, se ha descrito que la actividad del canal TRPM8 en las terminaciones sensoriales que inervan la córnea, modula la lacrimación basal manteniendo la superficie ocular correctamente hidratada, proponiendo a este canal como una diana terapéutica interesante para el tratamiento del síndrome de ojo seco (Parra et al 2010). También se ha vinculado este canal con otras patologías como la migraña y el dolor orofacial, aunque los resultados no son concluyentes, siendo necesarios más estudios para confirmar dicha asociación (revisado en Fernández-Peña & Viana 2013).

1.1.2. El canal iónico TRPA1

El gen *Trpa1*, que fue originalmente denominado *Anktm1* debido a la presencia de numerosas repeticiones de anquirina en la región amino-N-terminal, fue clonado por primera vez a partir de fibroblastos de pulmón en cultivo (Jaquemar et al 1999). Este gen codifica una proteína de 1119 aminoácidos en humanos y de 1115 aminoácidos en ratón (Nilius et al 2012) y su secuencia se asemeja a la de otros canales iónicos. El canal TRPA1 se compone de cuatro subunidades, donde cada una consta de seis regiones transmembrana putativas, dominios C y N terminales intracelulares y una región de poro ubicada entre las regiones transmembrana S5 y S6 (ver Fig. 1.1.2a) (Zhou et al 2013, Zygmunt & Högestätt 2014). Mediante estudios electrofisiológicos y de imagen de calcio se llevó a cabo la caracterización funcional de este canal iónico, revelando que se trata de un canal catiónico no selectivo que es activado por frío, con un umbral de activación de 17 °C aproximadamente, valor que se aproxima al umbral de dolor al frío en humanos (alrededor de 15 °C) (Caterina 2007b, Story et al 2003).

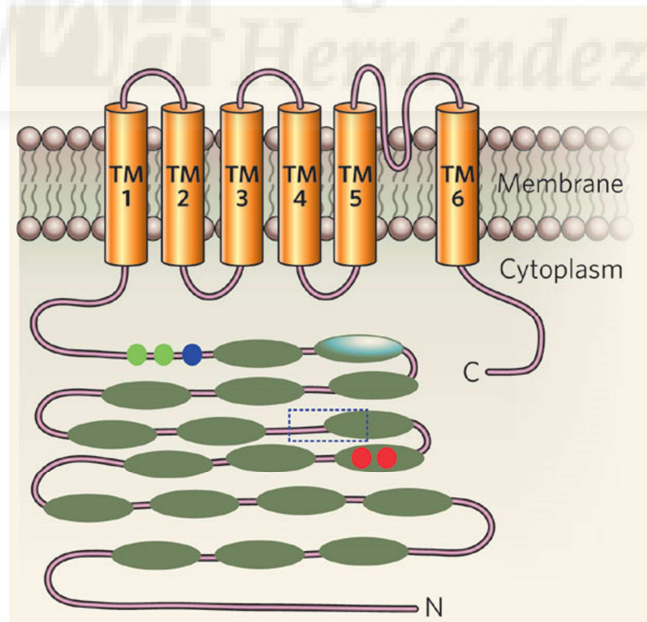


Figura 1.1.2a. Estructura de una subunidad del canal iónico TRPA1. En naranja están representados los seis dominios transmembrana (TM1-TM6). N y C indican las regiones amino y carboxilo terminal, respectivamente. La línea punteada indica un dominio EF. Los óvalos representan los dominios repetidos de anquirina. Los círculos indican los residuos de cisteína cruciales para la activación covalente en ratón (rojo), humano (verde) o ambos (azul). Adaptado de (Caterina 2007a).

El canal TRPA1 se expresa en una amplia variedad de tejidos como el corazón, intestino delgado, pulmones, músculo esquelético y páncreas, así como en el cerebro y en una subpoblación de neuronas nociceptivas de ganglios raquídeos, ganglio trigeminal y ganglio nodoso, donde se co-expresa con el canal iónico TRPV1, pero no con TRPM8 (Fajardo et al 2008a, Karashima et al 2009, Nilius et al 2012, Story et al 2003). En el ganglio trigeminal y en los ganglios raquídeos, el TRPA1 se expresa tanto en neuronas peptidérgicas (IB4 negativas) como no peptidérgicas (IB4 positivas y CGRP o sustancia P negativas) (Zygmunt & Högestätt 2014), aunque se ha descrito que se expresa mayoritariamente en estas últimas (Barabas et al 2012).

Además de frío, este canal puede ser activado por una extensa lista de compuestos entre los que cabe mencionar los isotiocianatos (compuestos activos presentes en sustancias acres como la mostaza o el wasabi), cinemaldehído (presente en la canela), alicina (presente en el ajo), productos endógenos asociados a daño tisular (H_2O_2 , 4-HNE, H_2S , bradikinina), acroleína (presente en el humo del tabaco), clotrimazol (un fármaco antimicótico), nifedipina (bloqueante de canales de calcio empleado en el tratamiento de la hipertensión), entre otros (ver Fig. 1.1.2b)(Bandell et al 2004, Bautista et al 2006, Bereiter et al 2005, Bessac et al 2008, Fajardo et al 2008a, Fajardo et al 2008b, Karashima et al 2009, Koivisto et al 2014, Meseguer et al 2008, Nilius et al 2012, Talavera et al 2009). La diversidad de estos agonistas ha despertado el interés por estudiar en profundidad los mecanismos de activación del canal TRPA1. Una característica común entre muchos de los compuestos que actúan como agonistas de este canal es su carácter electrofílico, pudiendo de esta manera formar enlaces covalentes con las distintas cisteínas reactivas que forman parte del TRPA1. En este sentido, se han descrito varias cisteínas en la región N terminal que son necesarias para la activación por cinemaldehído (C415, C422 y C622 en ratón y C621, C641 y C665 en humano), así como para la activación por acroleína, cinemaldehído y isotiocianato de alilo (C619, C639 y C663), sin

afectar la sensibilidad a otros agonistas como la icilina, δ -9-tetrahidrocanabinol ó 2-aminoetoxifenil borano (2-APB), sugiriendo que la activación de estos últimos compuestos ocurre mediante mecanismos diferentes (Hinman et al 2006, MacPherson et al 2007b). Adicionalmente, se han descrito otras cisteínas importantes para la sensibilidad del TRPA1 a condiciones de hiperoxia como la C633 y la C856 (Takahashi et al 2011), y para la activación del canal por mediadores pro inflamatorios como prostaglandinas (C421 y C461), H_2O_2 y NO (C421, C41 y C665) (Takahashi et al 2008).

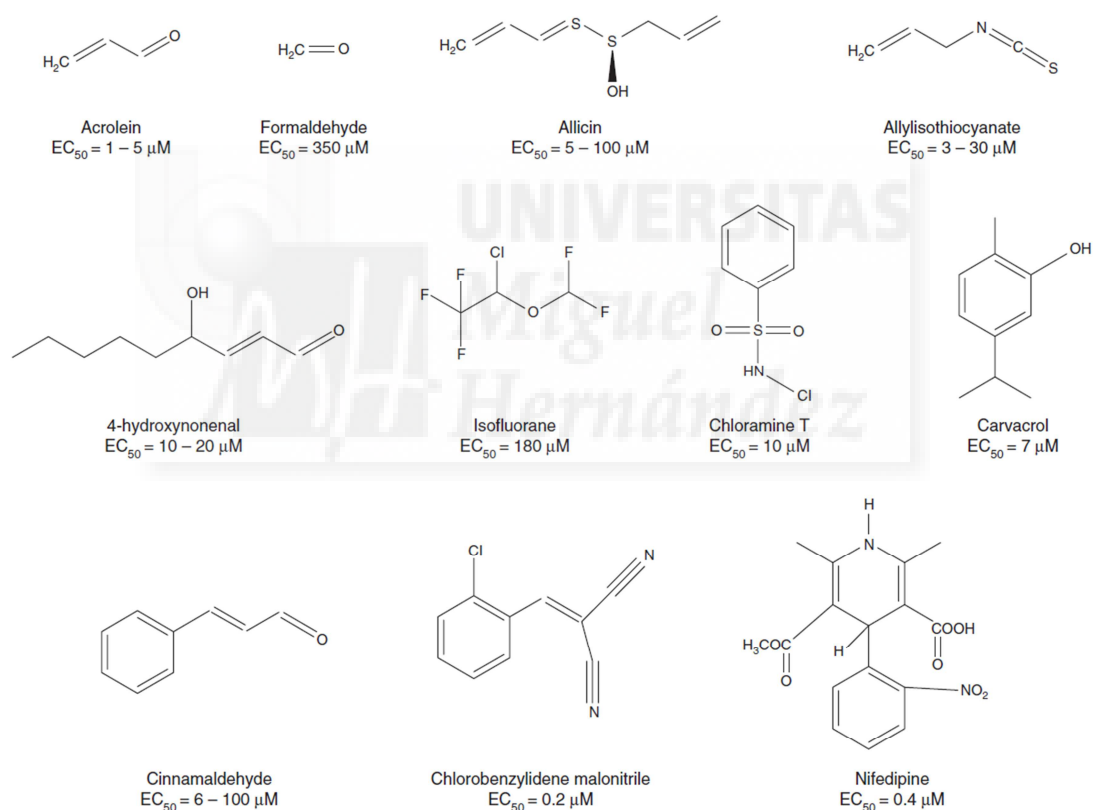


Figura 1.1.2b. Agonistas más importantes de TRPA1 con sus respectivos valores de EC₅₀. Adaptado de (Viana & Ferrer-Montiel 2009).

En comparación con la gran variedad de agonistas que se han descubierto, hasta ahora solo se conocen unos pocos antagonistas del canal TRPA1, entre los que se pueden destacar los más ampliamente empleados:

el HC-030031 (McNamara et al 2007) y el 4-(4-Clorofenil)-3-metilbut-3-2-oxima (AP18) (Petrus et al 2007).

En el trabajo que caracterizó funcionalmente por primera vez al TRPA1, los autores reportaron que este canal era activado por bajas temperaturas, tanto en sistemas heterólogos como en neuronas aisladas de ganglios raquídeos, lo cual planteo la posibilidad de que pudiese actuar como sensor de frío *in vivo* (Story et al 2003). Posteriormente, dos grupos independientes observaron que el TRPA1, expresado en sistemas heterólogos, era activado por aceite de mostaza (AITC) pero no por estímulos de frío (Jordt et al 2004, Nagata et al 2005), lo cual generó una gran controversia acerca del posible papel de este canal como sensor de frío. De hecho, dos trabajos posteriores aportaron evidencia de la activación del TRPA1 por frío en sistemas heterólogos y en neuronas cultivadas del ganglio trigeminal y del ganglio nodoso (Fajardo et al 2008a, Karashima et al 2009). Esta controversia se extiende a los estudios *in vivo*, donde tampoco se ha podido alcanzar un consenso. Algunos grupos de investigación, mediante experimentos conductuales, han observado que los ratones *Trpa1*^{-/-} presentan una clara deficiencia para detectar bajas temperaturas en el rango nocivo (Andersson et al 2009, Gentry et al 2010, Karashima et al 2009, Kwan et al 2006). En contraste, otros grupos de investigación no encontraron diferencias entre las respuestas a frío nocivo de ratones *Trpa1*^{-/-} y ratones silvestres (Bautista et al 2006, Brenner et al 2014, Knowlton & McKemy 2011).

Para intentar explicar esta gran disparidad en los resultados, se ha sugerido que probablemente se deba a diferencias en las metodologías empleadas. Adicionalmente, se ha sugerido que las variaciones observadas en los distintos estudios sobre el TRPA1, son dependientes de la especie estudiada. Por ejemplo, Chen y colaboradores, empleando ensayos *in vitro* en sistemas heterólogos, observaron que mientras el TRPA1 de ratón y de rata eran activados por frío, el canal de humano o de mono Rhesus (*Macaca mulatta*) eran insensibles a dicho estímulo (Chen et al 2013). Sin embargo, un trabajo publicado reciente por otro grupo de investigación, ha mostrado

que el TRPA1 de humano purificado puede ser activado por frío (Moparthi et al 2014). Es necesario por tanto tener muy en cuenta estos aspectos a la hora de interpretar y extrapolar los resultados provenientes de modelos experimentales en roedores al estudio de enfermedades en humanos.

Papel del canal TRPA1 en algunas patologías

A pesar de que la participación del TRPA1 como sensor de frío *in vivo* en condiciones fisiológicas es controvertida, cada vez parece más clara su participación en procesos de sensibilización durante condiciones patofisiológicas (Nilius et al 2012). Obata y colaboradores aportaron una de las primeras evidencias a favor de un posible rol del TRPA1 en la sensación de frío durante condiciones patológicas. Estos autores, empleando modelos experimentales de dolor inflamatorio y dolor neuropático en ratas, observaron la sobreexpresión del mRNA *Trpa1* en neuronas de los ganglios raquídeos durante la fase de hipersensibilidad al frío (Obata et al 2005). Más aún, observaron que la administración intratecal de un oligonucleótido antisentido para el mRNA de *Trpa1*, suprimía la inflamación y la hiperalgesia al frío asociadas a estos modelos experimentales (Obata et al 2005). Un año más tarde, este mismo grupo pudo reproducir este efecto en el mismo modelo de dolor neuropático al administrar por vía intratecal oligonucleótidos antisentido contra el mRNA de *Trpa1*, pero no contra el mRNA de *Trpm8* (Katsura et al 2006).

Adicionalmente, existe evidencia de que la inhibición farmacológica del canal TRPA1 es capaz de revertir la hipersensibilidad mecánica y al frío observada en condiciones experimentales de dolor inflamatorio y neuropático. Por ejemplo, Petrus y colaboradores observaron que la administración intraplantar de AP18, un antagonista específico del TRPA1, producía un efecto antihiperalgésico sobre las respuestas mecánicas en un modelo inflamatorio (Petrus et al 2007). Mediante la utilización de otro antagonista específico del TRPA1, el HC-030031, otro grupo observó la reducción de la hipersensibilidad al frío desarrollada durante condiciones

inflamatorias y neuropáticas experimentales (del Camino et al 2010). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descubierto, empleando distintas aproximaciones experimentales, que el canal TRPA1 juega un papel muy importante como mediador de la respuesta inflamatoria inducida por endotoxinas bacterianas (Meseguer et al 2014).

Hace pocos años, se describió la primera canalopatía del TRPA1 en humanos, la cual fue bautizada como síndrome familiar de dolor episódico (Kremeyer et al 2010). Esta rara enfermedad presenta una herencia autosómica dominante y se caracteriza por fuertes episodios de dolor principalmente en el pecho, el tórax, los brazos y, en menor medida, en el abdomen y las piernas, los cuales son precipitados por el ayuno o el estrés físico. Los investigadores descubrieron que se trata de una mutación puntual (Asp855Ser) en la región transmembrana S4 del canal TRPA1, la cual le otorga a dicho canal un incremento en la corriente de entrada tras la activación con cinemaldehído a potenciales de reposo.

Todo esto plantea un interrogante importante acerca de cómo el TRPA1 está involucrado en tal diversidad de patologías. Recientemente Zhou y colaboradores hicieron un gran descubrimiento que ha ayudado a arrojar luz sobre este asunto. Estos autores demostraron la existencia de una variante de *splicing* del canal TRPA1, el TRPA1b, que carece de una parte del segundo dominio transmembrana y el lazo intracelular adyacente; 30 aminoácidos en total (Zhou et al 2013). Esta carencia causa que la isoforma TRPA1b sea inactiva por sí sola, sin embargo, ambas isoformas coexisten e interactúan entre sí. Los autores observaron que la sobreexpresión de la isoforma TRPA1b induce un aumento en la expresión de TRPA1a, haciéndola más activa. Adicionalmente, se observó que aunque en condiciones fisiológicas la expresión de la isoforma TRPA1b es muy baja, durante condiciones experimentales de dolor inflamatorio y de dolor neuropático los niveles de TRPA1b aumentaron de forma significativa. Esto podría sugerir que la sensibilización que se observa en ciertas condiciones patológicas se vería afectada por cambios en el nivel de expresión de ambas isoformas.

1.2. La termosensación y la termorregulación

La termosensación es la capacidad que tienen los organismos para detectar y traducir estímulos térmicos (Belmonte et al 2009). En organismos superiores este proceso de transducción sensorial es altamente complejo, de manera que la participación conjunta de distintos canales iónicos moldea la sensibilidad de una neurona determinada al estímulo térmico (Belmonte et al 2009, Foulkes & Wood 2007) (ver Fig. 1.2).

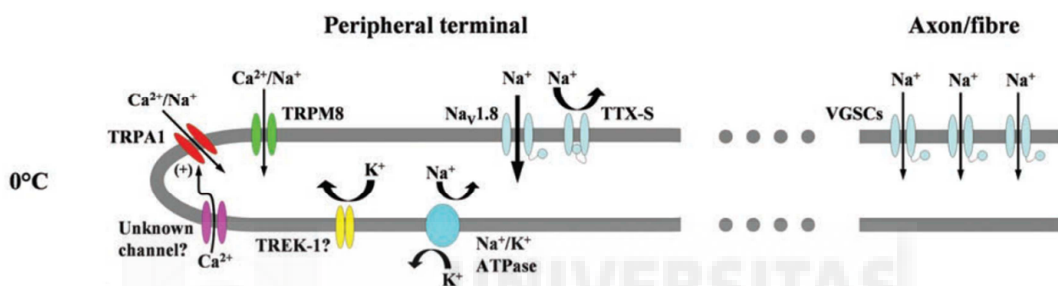


Fig. 1.2. Esquema del mecanismo de transducción y transmisión de estímulos de frío. En la figura se muestra la posible participación de distintos mecanismos iónicos en la actividad de una fibra aferente en presencia de un estímulo de frío intenso. Adaptado de (Foulkes & Wood 2007).

Se han postulado tres mecanismos moleculares mediante los cuales se lleva a cabo la transducción de estímulos de frío en neuronas sensoriales. Aunque los describiré por separado, en una terminal sensorial concreta, estos mecanismos podrían solaparse. Estos mecanismos comprenden: 1) la activación directa de canales por las bajas temperaturas, como los TRPs ya descritos; 2) la inhibición de canales de fuga de K^+ y 3) la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. El primer mecanismo implica la apertura directa de canales catiónicos termosensibles como consecuencia del descenso de temperatura, lo cual produciría la entrada de iones como el Na^+ y Ca^{2+} en la terminal nerviosa, resultando en la despolarización del potencial de membrana y la generación de potenciales de acción. La primera evidencia a favor de la activación directa de canales activados por frío fue reportada en el año 2001 por Reid y Flonta. Estos autores describieron, en una subpoblación de neuronas en cultivo de ganglios raquídeos de rata, la

aparición de corrientes iónicas de entrada durante el enfriamiento (Reid & Flonta 2001a). Estas corrientes compartían algunas de las características que se habían descrito en termorreceptores intactos como la potenciación por mentol y la modulación por Ca^{2+} (Reid & Flonta 2001a). Posteriormente se demostró que estas corrientes iónicas evocadas por enfriamiento eran bloqueadas por N-(4-terciaributilfenil)-4-(3-cloropiridin-2-il) tetrahidropiracina-1 (2H)-carboxil-amida (BCTC), un antagonista inespecífico del TRPM8 (Madrid et al 2006). El segundo mecanismo comprende el cierre de ciertos canales de fuga de K^+ como consecuencia de un descenso en la temperatura, lo cual disminuye la salida de este ion hacia el exterior celular resultando en una despolarización del potencial de membrana, un aumento de la resistencia y un incremento de la excitabilidad neuronal. De hecho, en neuronas sensibles a frío en cultivo se observó que la disminución de la temperatura es capaz de bloquear corrientes de fuga de K^+ y generar potenciales de acción (Morenilla-Palao et al 2014, Reid & Flonta 2001b, Viana et al 2002). El tercer mecanismo postulado es la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa, una bomba electrogénica, lo cual se traduce en un aumento en la concentración intracelular de iones positivos haciendo que el potencial de membrana se desplace hacia valores más positivos. En 1990, Schäffer y Braun mostraron como la aplicación de ouabaina, un compuesto extraído de las semillas de las plantas pertenecientes al género *Strophantus* y que actúa como un inhibidor de la Na^+/K^+ ATPasa, producía un efecto excitatorio sobre los termorreceptores de la lengua, incrementando la frecuencia de los potenciales de acción (Schäffer & Braun 1990). Sin embargo, años más tarde otro estudio mostró que el bloqueo de la Na^+/K^+ ATPasa por ouabaina producía una despolarización menor que la producida por frío y por sí sola no era capaz de generar potenciales de acción, lo cual sugiere que este mecanismo posee un papel secundario en la transducción de frío (Reid & Flonta 2001b).

1.2.1. Vías aferentes de la termosensación

En mamíferos, los termorreceptores cutáneos, al igual que el resto de neuronas sensoriales primarias, son neuronas pseudounipolares cuyo único axón central se divide en dos ramas, una rama se proyecta hacia la periferia y la otra rama lleva la información hacia el sistema nervioso central: tronco cerebral en el caso de las neuronas agrupadas en el ganglio trigeminal o médula espinal en el caso de las neuronas agrupadas en los ganglios raquídeos.

Las fibras aferentes que llevan la información desde la periferia hacia el sistema nervioso central se han clasificado clásicamente de acuerdo a su diámetro y grado de mielinización, aspectos que afectan directamente la velocidad de conducción (Kandel et al 2013). Las fibras A α y las A β , que se caracterizan por poseer axones mielinizados de gran diámetro y una alta velocidad de conducción, son activadas principalmente por estímulos mecánicos inocuos. Las fibras involucradas en la termosensación son las clasificadas como A δ y C: las primeras se caracterizan por tener axones de mediano diámetro poco mielinizados y velocidades de conducción intermedias, y las segundas se caracterizan por axones de pequeño diámetro no mielinizados y bajas velocidades de conducción (ver figura 1.2.1a) (Julius & Basbaum 2001).

Aunque se ha descrito la existencia de fibras C sensibles a frío en la piel humana (Campero et al 2001), estudios psicofísicos sugieren que la termosensación de frío inocuo en humanos está mediada principalmente por fibras A δ (revisado en Schepers & Ringkamp 2010).

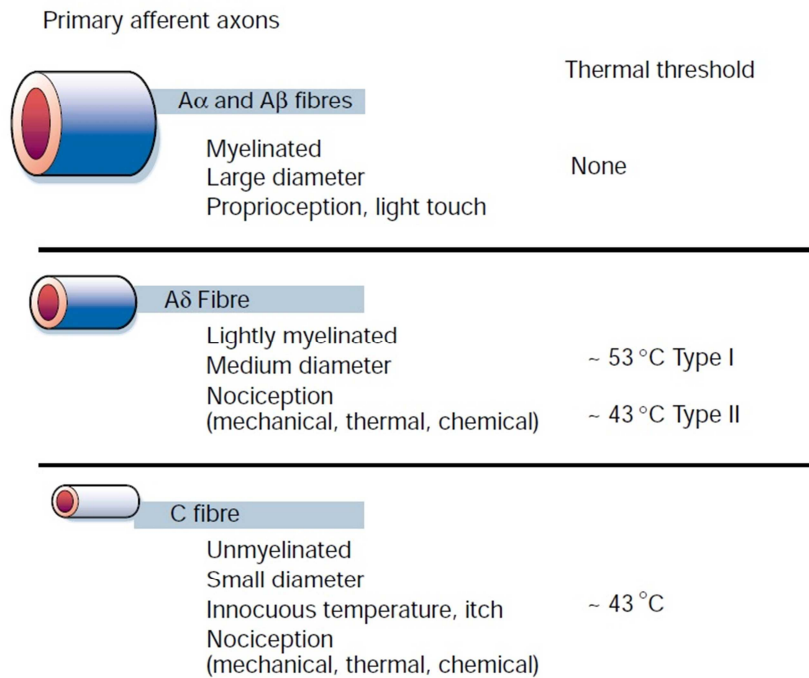


Fig. 1.2.1a. Clasificación y características de las fibras sensoriales cutáneas. Se agrupan en fibras de axones mielinizados de gran diámetro (A β), diámetro mediano y poco mielinizados (A δ) y no mielinizadas de pequeño diámetro (C). Adaptado de (Julius & Basbaum 2001).

Una vez que la información térmica ha alcanzado la médula espinal, esta puede seguir tres vías: la vía encargada de las respuestas reflejas mediadas por la acción de interneuronas espinales, la aferencia discriminativa, que lleva información acerca de la cualidad, intensidad y localización del estímulo térmico y la aferencia homeostática, que lleva la información necesaria para el mantenimiento de la homeostasis térmica (ver Fig. 1.2.1b) (Romanovsky 2007).

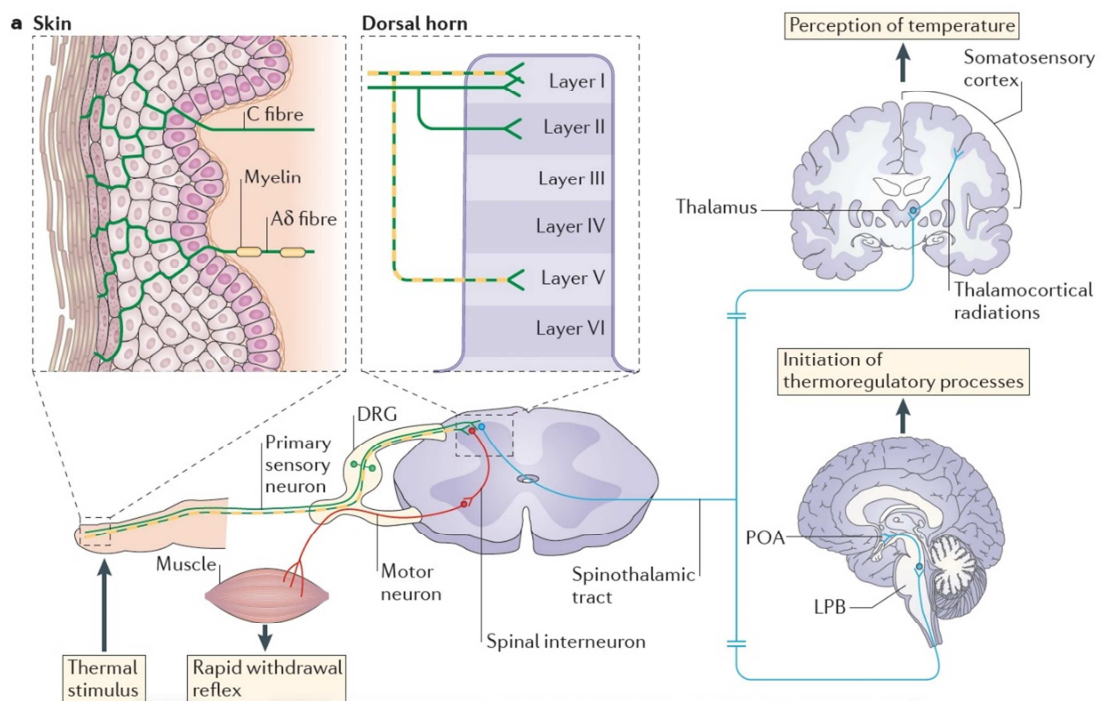


Fig. 1.2.1b. Esquema de las aferencias de información térmica desde la periferia hacia el sistema nervioso central. DRG, ganglios raquídeos; POA, área preóptica; LPB, núcleo parabraquial lateral. Tomado de (Vriens et al 2014).

1.2.1.1. Aferencia discriminativa

Las aferencias primarias transmiten la información térmica desde la periferia hasta su terminación en las láminas I, II y V del asta dorsal de la médula espinal. Las neuronas de segundo orden ubicadas en la médula espinal transmiten la información hacia la corteza insular contralateral (en humanos, gatos y ratones) a través de dos vías anatómicas: haciendo un relevo sináptico en la región posterior del núcleo ventromedial del tálamo o haciendo un primer relevo en el núcleo parabraquial en el tallo cerebral y otro relevo en la región basal del núcleo ventromedial del tálamo (ver Fig. 1.2.1b en el apartado anterior). Una vez que la información ascendente ha alcanzado su destino final, la corteza primaria somatosensorial, tiene lugar la percepción de la temperatura, lo que permite iniciar las respuestas conductuales adecuadas al estímulo percibido (Vriens et al 2014). Experimentos en humanos, mediante el uso de resonancia magnética funcional, han revelado que esta ruta está organizada somatotópicamente

(Hua et al 2005). Un estudio reciente en ratones ha revelado que la corteza somatosensorial (S1) es necesaria para la percepción de estímulos de frío inocuo. En dicha función es necesaria la participación del canal iónico TRPM8 (Milenkovic et al 2014). Esta vía es necesaria por lo tanto, para determinar la ubicación del estímulo con una alta resolución espacial y permite discernir entre un estímulo inocuo y uno potencialmente dañino.

1.2.1.2. Aferencia homeostática

En el hipotálamo tiene lugar la integración de la información térmica proveniente de los termorreceptores centrales y periféricos, permitiendo a los organismos homeotermos mantener su temperatura corporal relativamente constante a pesar de variaciones en la temperatura ambiental (Morrison et al 2014). La existencia de termorreceptores centrales viene demostrada por la posibilidad de inducir la activación de respuestas termorreguladoras mediante la estimulación térmica de distintas áreas del SNC. De ellas, se considera que el área preóptica del hipotálamo (POA) es la más importante para la activación de las respuestas termorreguladoras autonómicas (revisado en Romanovsky 2007). Aunque la mayoría de las neuronas en esta región hipotalámica son insensibles a temperatura, existen neuronas termosensibles a frío (“Cold-sensitive”, CS) y termosensibles a calor (“Warm-sensitive”, WS) (Boulant & Dean 1986). Las neuronas WS, que son las más abundantes de las neuronas termosensibles del POA, se caracterizan por estar activas tónicamente en termoneutralidad y porque el calentamiento local del hipotálamo produce un incremento en su actividad (Nakayama et al 1963). Todavía se desconocen los mecanismos moleculares responsables de la sensibilidad a la temperatura de estas neuronas hipotalámicas. (Kobayashi et al 2006, Wechselberger et al 2006). La región preóptica del hipotálamo responde también a cambios térmicos de la periferia, sugiriendo que hay neuronas preópticas que reciben e integran información térmica del organismo y del ambiente.

Las aferencias que transmiten la información térmica desde la piel hasta el hipotálamo se han estudiado con detalle (ver Fig. 1.2.1.2) (Morrison

& Nakamura 2011). Se ha descrito que las fibras aferentes provenientes de los termorreceptores en la periferia llevan la información térmica hasta la médula espinal; los axones de las neuronas de segundo orden cruzan la línea media y se proyectan hacia el núcleo parabraquial lateral (LPB). Allí, las neuronas que llevan la información de frío hacen sinapsis con las neuronas ubicadas en el subnúcleo lateral del LPB (LPBel), mientras que las neuronas que llevan la información de calor hacen sinapsis en el subnúcleo dorsal del LPB (LPBd) (Nakamura & Morrison 2008). Las neuronas que llevan información de frío o calor se proyectan principalmente hacia el área preóptica hipotalámica, activando en el núcleo preóptico mediano (MnPO) interneuronas GABAérgicas o glutamatérgicas, respectivamente. Estas neuronas en el MnPO modulan la actividad de neuronas localizadas en el núcleo medial del hipotálamo preóptico (MPO), potencialmente neuronas WS. (Morrison et al 2014), que actúan, por tanto, como integradoras de la información térmica periférica y central regulando respuestas termorreguladoras (ver Fig. 1.2.1.2) (Morrison & Nakamura 2011). Así, estas neuronas del MPO inhiben la vasoconstricción cutánea mediante la inhibición de neuronas premotoras en el bulbo raquídeo (incluyendo el rafe *pallidus*, rRPa), las cuales se proyectan hacia el núcleo intermediolateral de la médula que controlan el tono vascular. Además, inhiben la termogénesis facultativa mediante la inhibición de neuronas en el hipotálamo dorsomedial (DMH), las cuales activan neuronas premotoras en el rRPa. Desde aquí, estas neuronas se proyectan hacia la médula espinal hasta el IML o hasta el asta ventral para controlar los dos mecanismos principales que constituyen la termogénesis facultativa: la termogénesis dependiente y no dependiente de escalofríos (ST y NST) (Fig. 1.2.1.2) (Morrison & Nakamura 2011). Por tanto, el objetivo de la activación de la aferencia homeostática a partir de los termorreceptores cutáneos, es poner en marcha los mecanismos termorreguladores cuando la temperatura ambiental cambia, antes de que la temperatura corporal interna se vea afectada.

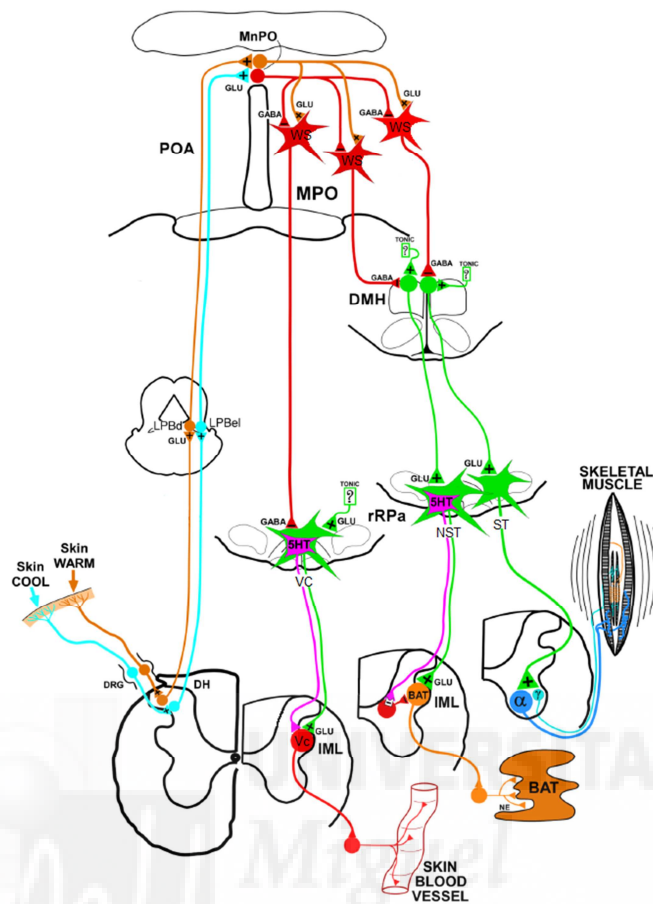


Fig. 1.2.1.2. Modelo neuroanatómico de las vías fundamentales de la información térmica para la activación de los efectores termorregulatorios. BAT, tejido adiposo pardo; DRG, ganglios raquídeos; DMH, hipotálamo dorsomedial; DH, asta dorsal; GABA, ácido γ -amino butírico; GLU, glutamato; IML, núcleo intermediolateral; LPBd, subnúcleo dorsal del núcleo parabraquial lateral; LPBel, subnúcleo lateral del núcleo parabraquial lateral; MnPO, núcleo preóptico mediano; MPO, núcleo medial preóptico; NE, noradrenalina; rRPa, rafe *pallidus*; ST y NST, termogénesis facultativa; Vc, vasoconstricción; WS, neuronas termosensibles a calor. Adaptado de (Morrison & Nakamura 2011).

1.2.2. Termorregulación

En los mamíferos, incluidos los humanos, la temperatura interna se mantiene constante alrededor de 37 °C. Esto es posible gracias a la termorregulación, la cual engloba los mecanismos fisiológicos que permiten al organismo el mantenimiento de la homotermia a pesar de cambios en la temperatura ambiental. Estos mecanismos termorreguladores se activan cuando la temperatura ambiental sobrepasa los límites de cierto intervalo de temperaturas, llamado zona de termoneutralidad (Cannon & Nedergaard

2011). Dentro de la zona de termoneutralidad, la producción de calor asociada al metabolismo basal (BMR) y regulada por la acción de las hormonas tiroideas, es suficiente para el mantenimiento de la temperatura corporal (ver Fig. 1.2.1.2b) (Cannon & Nedergaard 2011, Silva 2006). El rango de temperaturas que constituye la zona de termoneutralidad depende principalmente del BMR y de la conductancia térmica del organismo. La conductancia térmica a su vez es función de la relación superficie/volumen y del aislamiento térmico del animal. Por ejemplo, en animales pequeños como los ratones, con un alto cociente superficie/volumen, la zona de termoneutralidad se encuentra alrededor de los 30 °C (Silva 2006), mientras que en humanos, con un menor cociente superficie/volumen, este valor baja hasta alrededor de los 28 °C para una persona desnuda y entre 24-25 °C para una persona vestida (Kingma et al 2014).

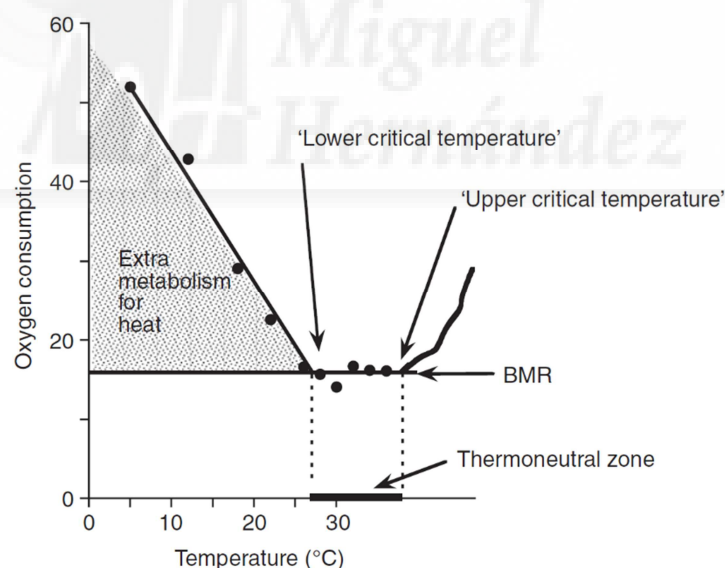


Fig. 1.2.1.2b. Efecto de la temperatura ambiental sobre el gasto energético en ratones.

El eje de ordenadas representa el gasto energético (medido como consumo de oxígeno en unidades arbitrarias) y el eje de abscisas la temperatura ambiental. A medida que la temperatura ambiental se aleja del límite inferior de la zona de termoneutralidad (línea punteada de la izquierda), el consumo energético se incrementa por encima del funcionamiento basal del metabolismo (BMR) para mantener la temperatura corporal constante. La pendiente de la curva del consumo energético depende de la conductancia térmica; a menor conductancia térmica menor será la pendiente. Tomado de (Cannon & Nedergaard 2011).

Al exponer un organismo homeotermo a una temperatura ambiental inferior a su zona de termoneutralidad, se inician inmediatamente respuestas fisiológicas para intentar mantener la temperatura corporal. En primera instancia, se activa la vasoconstricción cutánea y el animal adopta posturas de forma esférica para minimizar la pérdida de calor (Tattersall et al 2012). Si la temperatura ambiental baja todavía más, entonces el organismo pone en marcha mecanismos termogénicos adicionales a expensas del consumo de ATP, denominados en su conjunto como termogénesis facultativa. En primer lugar se producen los escalofríos (ST), contracciones involuntarias del músculo esquelético que generan calor. Si estas contracciones se mantuviesen en el tiempo, interferirían con la actividad diaria, generando probablemente malestar y estrés. Sin embargo, el sistema termorregulador ha evolucionado de manera tal que tras una larga exposición al frío, los escalofríos van disminuyendo paulatinamente hasta desaparecer, siendo sustituido este mecanismo por la termogénesis facultativa no dependiente de escalofríos (NST). El tiempo de exposición al frío que es necesario para la activación de la NST a una determinada temperatura, depende principalmente de las condiciones térmicas previas a las que fue expuesto el organismo (temperatura y duración) (Cannon & Nedergaard 2011, Hart et al 1956, Sellers et al 1954). Por ejemplo, Sellers y colaboradores observaron en ratas aclimatadas al frío (1,5 °C durante 3 meses), una menor actividad muscular que las ratas no aclimatadas cuando eran expuestas de forma aguda al frío (Sellers et al 1954). Por otra parte, Hart y colaboradores observaron en ratas la desaparición de la ST tras un período de aclimatación de 4 semanas a 6 °C. Sin embargo, cuando fueron aclimatadas a -6 °C, la termogénesis dependiente de escalofríos se mantuvo constantemente elevada durante 5 semanas (Hart et al 1956).

En mamíferos, incluyendo a los humanos, la NST tiene lugar principalmente en el tejido adiposo pardo o "brown adipose tissue" (BAT) (Clapham 2012, Hany et al 2002, van Marken Lichtenbelt et al 2009). El mecanismo de generación de calor en el BAT comienza por la liberación de noradrenalina en las terminales del sistema nervioso simpático que inervan

este órgano. La noradrenalina, mediante la activación de los receptores β_3 adrenérgicos expresados en los adipocitos marrones, incrementa la producción de AMPc, resultando en la hidrólisis de los triglicéridos citoplasmáticos a ácidos grasos libres, los cuales actúan como activadores de la proteína mitocondrial desacoplante 1 (UCP1) (Cannon & Nedergaard 2004). La UCP1 es una proteína que se ensambla en dímeros en la membrana interna mitocondrial donde actúa como un transportador de cationes, permitiendo que los protones acumulados en el espacio intermembrana, como resultado del transporte de electrones en la cadena respiratoria, entren nuevamente hacia la matriz mitocondrial, generando calor y haciendo menos eficiente la producción de ATP (ver Fig. 1.2.1.2c) (Busiello et al 2015, Nelson & Cox 2008).

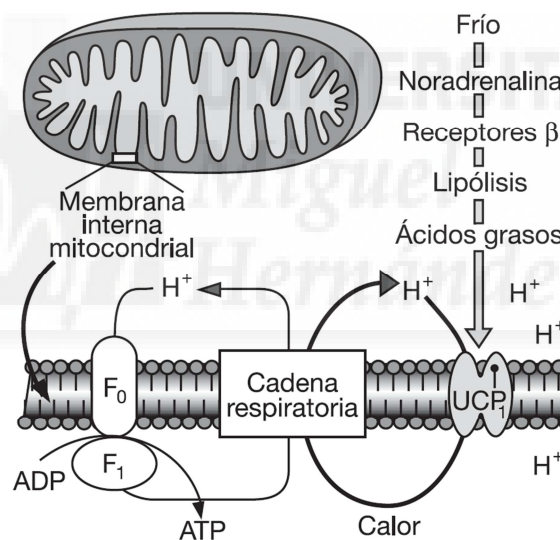


Fig. 1.2.1.2c. Estimulación de la termogénesis facultativa no dependiente de escalofríos (NST) en el tejido adiposo pardo (BAT). La exposición al frío produce la liberación de noradrenalina, la cual activa a los receptores β_3 adrenérgicos. Esto conlleva a la liberación de ácidos grasos, los cuales estimulan la UCP1, la cual actúa como un "bypass" en la reentrada de protones acumulados en el espacio intermembrana por la cadena respiratoria. Adaptado de (Obregon 2007).

Es importante añadir que la exposición prolongada al frío induce el aumento en la capacidad termogénica mediante la proliferación y la diferenciación de los adipocitos marrones, así como el incremento en el tamaño y el número de mitocondrias y el aumento en la expresión de la

UCP1 en estas células (Busiello et al 2015). Aunque el sistema nervioso simpático es el principal regulador de la fisiología del BAT, controlando los niveles de expresión y actividad de las proteínas más relevantes de la función de este órgano, las hormonas tiroideas son importantes para la respuesta del BAT al frío, jugando principalmente un papel permisivo en la termogénesis no dependiente de escalofríos (Obregon 2014). El descubrimiento de la deiodinasa 2 (Dio2) en este tejido y su activación por el sistema nervioso simpático, revelaron la importancia de la producción local de T₃ en el tejido adiposo marrón, la cual actúa como un factor de transcripción del gen *UCP1* (Obregon 2014).

Por otra parte, la exposición a temperaturas ambientales por encima del límite superior de la zona de termoneutralidad, induce la activación de mecanismos termorreguladores destinados a incrementar la disipación del calor como la vasodilatación cutánea, la sudoración en humanos y la salivación termorreguladora en roedores (Romanovsky 2014). A diferencia de los otros efectores, la vasodilatación cutánea no supone la pérdida de líquidos ni gasto energético. No obstante, en su conjunto, los mecanismos de defensa contra el calentamiento por encima de la zona de termoneutralidad requieren de un gasto energético comparable al observado durante la exposición a frío (ver Fig. 1.2.1.2b).

Además de estos mecanismos autonómicos y hormonales, la termorregulación está constituida por mecanismos comportamentales, como la actividad motora, la ingesta y cambios posturales que regulen la conductancia térmica (Abreu-Vieira et al 2015, Terrien et al 2011).

1.2.3. Control circadiano de la temperatura interna

Distintos estudios publicados desde la segunda mitad del siglo XIX, han mostrado como los animales homeotermos sufren oscilaciones en su temperatura interna a lo largo del día, como resultado del control metabólico impuesto por los ritmos circadianos (Merrow et al 2005). El término circadiano proviene del latín "*Circa diem*" que significa aproximadamente un

día y se refiere a un ritmo que es capaz de mantenerse en ausencia de señales externas (o Zeitgebers), y que al mismo tiempo, es capaz de sincronizarse con dichas señales externas (luz y la temperatura) (Refinetti 2010). Se cree que las oscilaciones de la temperatura corporal interna observadas en los animales homeotermos son el resultado de la integración de la señal oscilatoria provista por el sistema circadiano y el sistema termorregulador, lo cual produce un desfase entre la producción y la pérdida de calor (Aschoff 1982).

En los vertebrados, los ritmos circadianos están controlados de manera jerárquica por distintos relojes moleculares, donde el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SCN) actúa como reloj maestro sobre los relojes cerebrales externos al SCN y los relojes periféricos (Huang et al 2011). El SCN se localiza bilateral, adyacente al tercer ventrículo y dorsal al quiasma óptico (Barclay et al 2012). En ratas y ratones está compuesto por unas 20.000 neuronas aproximadamente, y se ha sugerido que cada una de estas neuronas poseen un oscilador circadiano molecular autónomo, cuya periodicidad es muy similar entre sí (Honma et al 2012). El SCN recibe información lumínica desde la retina a través del tracto retinohipotalámico (RHT) (Huang et al 2011) e información no lumínica desde la lámina intergeniculada lateral (IGL) mediante el tracto geniculohipotalámico (GHT) y desde neuronas serotoninérgicas del núcleo rafe dorsal (DRN) y del núcleo rafe medio (MRN) (Fig. 1.2.1.2d) (Dibner et al 2010).

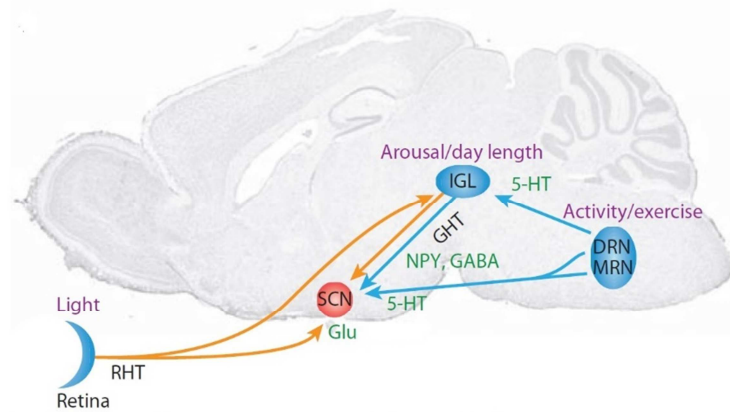


Fig. 1.2.1.2d. Vías aferentes principales del núcleo supraquiasmático (SCN) en la ratona. Las flechas naranjas representan las aferencias con información lumínica y las flechas azules las aferencias no lumínicas. DRN, núcleo rafe dorsal; IGL, lámina intergeniculada lateral; GHT, tracto geniculohipotalámico. Modificado de (Dibner et al 2010).

A su vez, el SCN inerva numerosas áreas, participando en la modulación de numerosos procesos fisiológicos como la ingesta, la actividad locomotora, la temperatura interna, la adicción y el circuito de recompensa, entre otras (ver Fig. 1.2.1.2e) (Dibner et al 2010). Estas áreas incluyen regiones hipotalámicas como el núcleo paraventricular (PVN), la región subparaventricular (sPVN), la región preóptica (POA), el núcleo arcuato (ARC), el área lateral hipotalámica (LHA), el hipotálamo dorsomedial (DMH) y regiones no hipotalámicas como el área ventrosegmental (VTA) (Barclay et al 2012, Huang et al 2011). Las neuronas del PVN proyectan mayoritariamente hacia la hipófisis regulando la liberación de hormonas como la adrenocorticotropina y la tirotrópina, y controlan además la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA) (Barclay et al 2012).

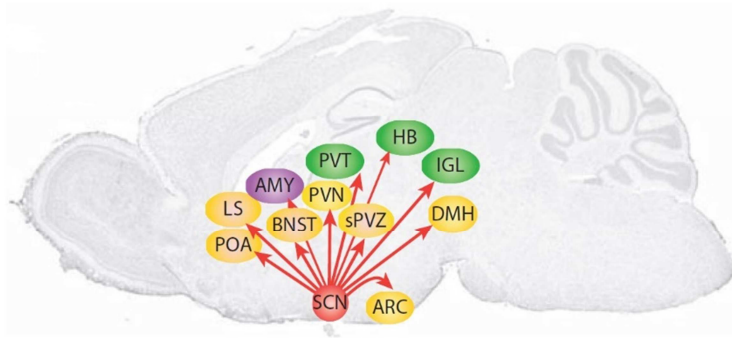


Fig. 1.2.1.2e. Vías eferentes principales del núcleo supraquiasmático (SCN) en la rata. AMY, amígdala; ARC, núcleo arcuato; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; DMH, hipotálamo dorsomedial; HB, habénula; IGL, lámina intergeniculada lateral; LS, septum lateral; POA, área preóptica; PVN núcleo hipotalámico paraventricular; PVT, núcleo talámico paraventricular; SCN, núcleo supraquiasmático; sPVZ, zona supraventricular. Modificado de (Dibner et al 2010).

Además, el SCN se conecta con la glándula pineal mediante una vía multisináptica que incluye sucesivamente neuronas en el PVN, neuronas simpáticas pre-ganglionares en la columna intermediolateral de la médula espinal y neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (SCG). Desde allí, los axones simpáticos postganglionares ascienden a lo largo de la arteria carótida interna y los nervios coronarios hasta llegar a los pinealocitos de la glándula pineal, células neuroepiteliales encargadas de sintetizar melatonina (Kalsbeek et al 2000). En mamíferos, la síntesis y la liberación de melatonina son inhibidas por la luz y estimuladas por la oscuridad. Durante el día, se inhibe la liberación de noradrenalina por los nervios coronarios; durante la noche, estas fibras liberan noradrenalina produciendo un rápido incremento de la actividad de la enzima Arilalquilamina- N- Acetiltransferasa, lo cual se traduce en un incremento de la producción y secreción de melatonina (Brzezinski 1997, Kalsbeek et al 2000).

1.2.4. Termorregulación durante la restricción calórica

Como se ha descrito previamente, la termorregulación es un proceso muy costoso a nivel energético, especialmente en ambientes fríos. Por esto, cuando muchos mamíferos, marsupiales y aves se encuentran en

situaciones ambientales desfavorables (poco alimento y frío), entran en un estado hipometabólico e hipotérmico para favorecer su supervivencia (Bechtold et al 2012, Geiser 2004, Nagashima et al 2003, Swoap 2008). Este estado, es un proceso regulado y circadiano que se caracteriza por un descenso en la temperatura corporal que comienza hacia el final de la fase nocturna, alcanzando un valor mínimo al principio de la fase diurna y con una posterior recuperación de la temperatura aunque persista el estado de ayuno (Jensen et al 2013, Refinetti 2010, Ruby 2003). Son numerosos los factores que se han involucrado en el desarrollo de este proceso, como las hormonas tiroideas, la leptina, la ghrelina y el SNA, aunque las cascadas de señalización aún no se conocen completamente (Jensen et al 2013, Swoap 2008). Hay que destacar que en ciertas poblaciones humanas, como los aborígenes australianos o los bosquimanos del Kalahari, se ha descrito una respuesta metabólica similar en respuesta al frío (Hammel et al 1959, Hammel et al 1963).

1.2.5. TRPM8 en la termorregulación

La evidencia existente hasta el momento, sugiere que el canal iónico TRPM8 juega un papel importante como sensor de frío *in vivo*. Sin embargo, la mayoría de los trabajos solo han evaluado las respuestas conductuales nocidéfensivas o de confort asociadas a la actividad de TRPM8, es decir, la actividad de TRPM8 asociada a la aferencia discriminativa de la información térmica, mientras que se ha dejado de lado su posible contribución a la aferencia homeostática. Sin embargo, en algunos trabajos recientes se ha comenzado a explorar el papel del TRPM8 en la termorregulación (Almeida et al 2012, Feketa et al 2014, Gavva et al 2012, Knowlton et al 2011, McCoy et al 2013, Tajino et al 2011, Tajino et al 2007). Tajino y colaboradores observaron que la aplicación de mentol, uno de los activadores del TRPM8, sobre el torso de ratones silvestres expuestos a una temperatura ambiente de 27 °C, producía un incremento en la temperatura corporal de estos animales (Tajino et al 2007). Otros grupos han explorado el efecto de distintos antagonistas del TRPM8 sobre la temperatura corporal,

reportándose que la administración de dichos compuestos en ratones o ratas producía el desarrollo de hipotermia (Almeida et al 2012, Feketa et al 2014, Gavva et al 2012, Knowlton et al 2011). De forma interesante, Almeida y colaboradores concluyeron que la hipotermia producida por el antagonista del TRPM8 observada en su estudio, era el resultado del bloqueo de los termorreceptores periféricos, pues este efecto hipotérmico era más potente cuando el antagonista se administraba por vía intravenosa que por vía intracerebroventricular o intratecal (Almeida et al 2012). Mediante la utilización de animales modificados genéticamente, no se han encontrado diferencias entre la temperatura corporal de ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} expuestos a distintas temperaturas ambientales: 24 °C (McCoy et al 2013), 26 °C (Almeida et al 2012) o 27 °C (Tajino et al 2011). No obstante, la exposición de ratones a frío (10 °C) durante una hora producía una hipotermia transitoria en los ratones *Trpm8*^{-/-} pero no en los animales silvestres (Tajino et al 2011). En conjunto, esta evidencia sugiere que el TRPM8 participa en la termorregulación.

1.2.6. TRPA1 en la termorregulación

Como se ha mencionado antes, el canal iónico TRPA1 ha sido propuesto como sensor de frío nocivo *in vivo*, aunque existe evidencia tanto a favor como en contra de esta hipótesis (Bautista et al 2006, Brenner et al 2014, Karashima et al 2009, Knowlton et al 2010, Kwan et al 2006). Al igual que ha sucedido con el TRPM8, la mayoría de los estudios llevados a cabo hasta ahora para esclarecer el papel del canal TRPA1 como termosensor *in vivo*, solo han analizado su papel en las aferencias discriminativas y apenas se ha investigado su papel en termorregulación. En este sentido, solo dos trabajos han explorado esta idea; el primero, publicado en el 2011 por Chen y colaboradores y el segundo, más exhaustivo, publicado en el 2014 por de Oliveira y colaboradores. En el primero, los autores examinaron la acción de un nuevo antagonista del canal iónico TRPA1 administrado por vía oral, el cual fue capaz de revertir la alodinia al frío inducida por un modelo de dolor neuropático en ratas sin alterar significativamente la temperatura interna de

los animales (Chen et al 2011). En el segundo trabajo, enfocado en estudiar un posible papel del TRPA1 sobre la termorregulación, los autores no observaron diferencias significativas en la temperatura intracolónica entre ratones *Trpa1*^{-/-} y silvestres cuando estos fueron expuestos a bajas temperaturas (8 °C). De igual manera, la administración de antagonistas de este canal iónico en ratas expuestas a una temperatura aún más baja (3 °C), no produjo cambios significativos en su temperatura intracolónica (de Oliveira et al 2014). Los resultados de ambos estudios sugerirían que el canal iónico TRPA1 no está involucrado en los mecanismos de termorregulación.

1.3. Nocicepción y dolor

La IASP (*International Association for the Study of Pain*) define el dolor como: “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño”, mientras que la nocicepción se define como “los procesos neurales encargados de la codificación y procesamiento de los estímulos nocivos” (Loeser & Treede 2008). Al emplear modelos animales para la investigación de los mecanismos del dolor, es importante tener en cuenta la diferencia entre dolor y nocicepción. El dolor es una experiencia compleja que incluye componentes afectivos/emocionales, acompañados de componentes discriminativos y cognitivos. Por esto, mientras que en los estudios en humanos es posible cuantificar el dolor, mediante la valoración de expresiones verbales o la categorización de escalas visuales, en los ensayos en modelos murinos se estudia fundamentalmente la nocicepción (Barrot 2012).

1.3.1. Percepción del dolor por frío

Los estímulos térmicos de frío puede percibirse de forma variable: desde un agradable frescor hasta dolor intenso. Distintas variables, como por ejemplo la magnitud del estímulo, la tasa de enfriamiento, el área expuesta, la adaptación en el tiempo y los cambios en la actividad vascular

pueden modificar la percepción del frío (Belmonte et al 2009, Dubin & Patapoutian 2010). Normalmente, el dolor por frío es descrito como una sensación de escozor, de ardor o como un dolor punzante (Davis 1998). El umbral de temperatura a partir del cual un estímulo de frío es percibido como dolor, es mucho más variable que el umbral de dolor provocado por el calor (Foulkes & Wood 2007, McKemy 2013). De hecho, se ha observado que el umbral promedio para la detección de frío nocivo en humanos puede variar entre los 0 y los 28 °C, mientras que el umbral de dolor por calor puede oscilar entre 39 y 50 °C (Davis & Pope 2002, McKemy 2013, Morin & Bushnell 1998).

1.3.2. Mecanismos de transducción de estímulos nocivos

La detección y transducción de los estímulos nocivos se lleva a cabo por un grupo heterogéneo de neuronas sensoriales activadas preferentemente por estímulos lesivos, denominados nociceptores (Sherrington 1906). De forma similar a como se ha descrito previamente en la transducción de estímulos térmicos (ver Termosensación), se han postulado tres mecanismos iónicos de transducción de los estímulos nocivos en impulsos eléctricos. El primer mecanismo involucra la apertura de canales iónicos (como los TRPs), lo cual permitiría la entrada iones como el Na^+ y el Ca^{2+} en el interior celular, desplazando el potencial de membrana hacia valores positivos hasta generar un potencial de acción (Gold 2013). El segundo mecanismo depende del cierre de canales de fuga de K^+ , resultando en el desplazamiento del potencial de membrana hasta alcanzar el potencial umbral. El tercer y último mecanismo involucra la activación de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} , lo cual permitiría en algunas neuronas (aquellas cuya concentración intracelular de Cl^- es suficientemente alta) la salida de Cl^- , desplazando el potencial de membrana hacia valores más positivos hasta generar potenciales de acción (Liu et al 2010).

1.3.2.1. Clasificación de los nociceptores

Los nociceptores se han clasificado de acuerdo a varios criterios como su velocidad de conducción (fibras C y fibras A), la modalidad del estímulo al que responde (estímulos mecánicos, térmicos y químicos), las características de las respuestas y los distintos marcadores moleculares que expresan, como receptores y neuropéptidos (Ringkamp et al 2013). La mayoría de los nociceptores poseen axones poco mielinizados A δ o no mielinizados C, aunque se ha visto que en ratas, alrededor del 20 % de las fibras altamente mielinizadas A α y β son nociceptivas (Djouhri & Lawson 2004). La mayoría de los nociceptores A δ y C son polimodales (Ringkamp et al 2013). Las terminales cutáneas de las fibras A δ están desmielinizadas y se encuentran agrupadas ocupando un área pequeña del tejido innervado (campo receptor), lo cual provee al SNC de una gran resolución espacial. Por el contrario, las terminales de las fibras C se encuentran distribuidas en un área mayor, lo cual disminuye su resolución espacial en la localización del estímulo. Debido a su rápida velocidad de conducción, las fibras A δ median la primera sensación de dolor producida por un estímulo nocivo, caracterizada por ser intensa, muy localizada y punzante (Julius & Basbaum 2001). Posteriormente, las fibras C, más lentas, median la segunda sensación de dolor, que se caracteriza por un dolor sordo y difuso (ver Fig. 1.3.2.1) (Julius & Basbaum 2001).

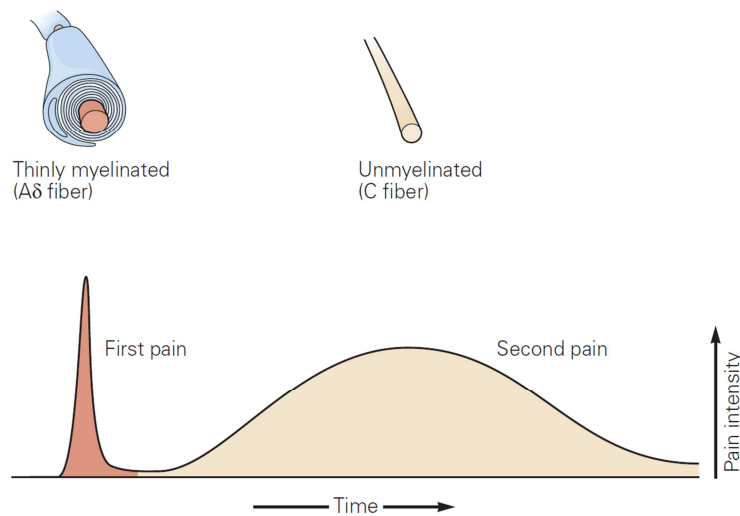


Fig. 1.3.2.1. Fibras nociceptivas de tipo A δ y C y su relación con el tipo de dolor percibido. Las fibras A δ , de diámetro mediano y conducción rápida, median la primera sensación de dolor (first pain). Posteriormente, la actividad de las fibras C, de pequeño diámetro y no mielinizadas, media la segunda sensación de dolor (second pain). Modificado de (Kandel et al 2013).

Mediante estudios histológicos y genéticos, se han correlacionado las características anatómicas y funcionales de los nociceptores con la expresión de marcadores moleculares. Por ejemplo, se ha observado en los ganglios raquídeos de rata que el 50 % de los nociceptores de fibras C y el 20 % de fibras A δ son peptidérgicas, es decir, que expresan péptidos como la sustancia P, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y somatostatina (Lawson 1996, McCarthy & Lawson 1989). Por otra parte, se ha observado que los nociceptores no peptidérgicos contienen la fosfatasa ácida resistente a fluoruro (FRAP), receptores purinérgicos P2X3 y se marcan por la isolectina B4 (Silverman & Kruger 1988a, Silverman & Kruger 1988b, Vulchanova et al 1998).

1.3.3. Vías aferentes de la información nociceptiva

La nociceptores se encargan de transmitir la actividad eléctrica desde la periferia hasta la médula espinal donde sus terminales hacen sinapsis con interneuronas localizadas en varias láminas del asta dorsal. Las láminas I y II reciben principalmente aferencias de fibras nociceptivas A δ y C mientras que la lámina V recibe aferencias de fibras A β , A δ y C. Adicionalmente, existen

aferencias indirectas hacia las láminas VII y VIII (Basbaum & Jessell 2013). Las neuronas de segundo orden ascienden hacia los núcleos supraespinales mediante cinco vías ascendentes: el tracto espinotalámico, el espinorreticular, el espinomesencefálico, el cervicotalámico y el tracto espinohipotálamico. En su vía ascendente, las neuronas de segundo orden cruzan hacia el cuadrante contralateral anterolateral (excepto en el tracto espinorreticular). La vía espinotalámica, considerada como la vía más importante en la transmisión de la información nociceptiva, lleva información proveniente de las láminas I, V y VII hasta hacer sinapsis en el núcleo ventral posterior lateral y en el núcleo central lateral del tálamo. Desde allí, las neuronas de tercer orden se proyectan a la corteza sensorial y a la corteza de asociación (ver Fig. 1.3.3) (Basbaum & Jessell 2013). El tracto espinorreticular contiene axones provenientes de las láminas VII y VIII y asciende hasta la formación reticular y el tálamo (ver Fig. 1.3.3). El tracto espinomesencefálico, que contiene proyecciones de las láminas I y V, se proyecta hacia la formación reticular mesencefálica y la sustancia gris periacueductal (PAG) (ver Fig. 1.3.3). Se piensa que la información transmitida por esta última vía contribuye al componente afectivo del dolor. El tracto cervicotalámico discurre a lo largo de los dos primeros segmentos cervicales de la medula espinal y los axones de neuronas ubicadas en núcleo lateral cervical, el cual recibe aferencias de neuronas ubicadas en las láminas III y IV del asta dorsal. La mayoría de los axones ascienden a través del lemnisco medial terminando en los núcleos lateral ventro-posterior y medial posterior del tálamo. Finalmente, el tracto espinohipotálamico contiene axones provenientes de las láminas I, V y VIII del asta dorsal, desde donde se proyectan hacia núcleos hipotálamicos involucrados en la regulación neuroendocrina y en respuestas cardiovasculares (Basbaum & Jessell 2013).

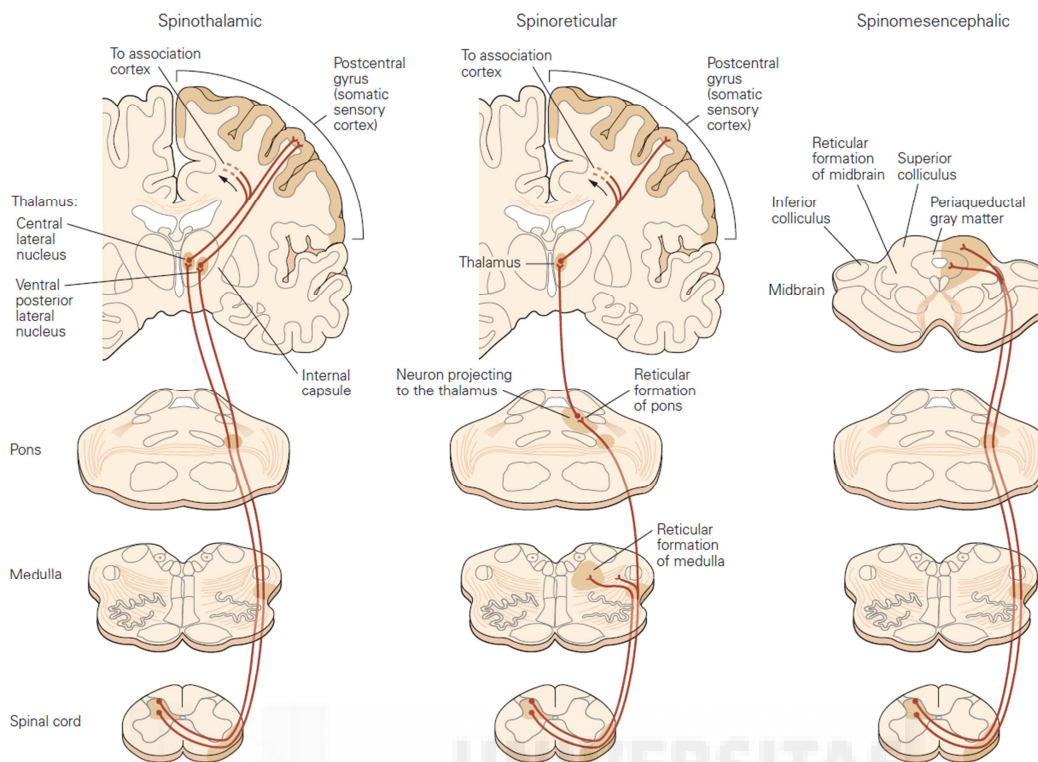


Fig. 1.3.3. Esquema de las vías ascendentes más importantes de la información nociceptiva. Tomado de (Basbaum & Jessell 2013).

1.3.4. Clasificación del dolor

De acuerdo a su naturaleza, el dolor se puede clasificar en nociceptivo, inflamatorio o neuropático (Woolf 2010).

1.3.4.1. Dolor nociceptivo

El dolor conocido como nociceptivo se produce cuando los estímulos físicos y/o químicos de alta intensidad son detectados por los nociceptores. Este tipo de dolor se considera fisiológico ya que funciona como un sistema de protección o de alarma, ya que permite evitar o minimizar la exposición a estímulos lesivos, como el contacto con un objeto punzante o una superficie muy caliente (Dubin & Patapoutian 2010).

1.3.4.2. Dolor Inflamatorio

El dolor inflamatorio se genera tras la activación del sistema inmunitario como consecuencia de un daño tisular, con la consecuente liberación local de factores pro-inflamatorios, como por ejemplo el TNF- α , IL-

1 e IL-6, bradikinina entre otros (Grace et al 2014). El conjunto o mezcla de sustancias pro-inflamatorias, también llamada “sopa pro-inflamatoria”, induce la sensibilización tanto del tejido dañado como del adyacente (Grace et al 2014). Al igual que el dolor nociceptivo, éste también es protector pues evita el contacto con la zona afectada, lo cual ayuda durante el proceso de regeneración tisular (Woolf 2010).

1.3.4.3. Dolor neuropático

El dolor neuropático se define como el dolor que se manifiesta como consecuencia directa de una lesión o enfermedad que afecta al sistema somatosensorial (Chaplan & Sorkin 1997, Treede et al 2008). Se caracteriza por la presencia de síntomas crónicos como dolor espontáneo y persistente, acompañado de una sensación de ardor o de descargas eléctricas y fenómenos de sensibilización como la alodinia (donde un estímulo no doloroso es percibido como doloroso) e hiperalgesia (donde un estímulo doloroso es percibido con mayor intensidad) (von Hehn et al 2012). Con frecuencia, esta sintomatología tiene un impacto muy negativo sobre la calidad de vida de los pacientes, impidiéndoles realizar las actividades cotidianas con normalidad (McMahon et al 2013). Se estima que entre un 5 y un 8 por ciento de la población sufre de dolor neuropático (Bouhassira et al 2008, Torrance et al 2006), y su tratamiento es complicado debido a que las terapias convencionales con analgésicos comunes como los Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES) y los opioides tienen una eficacia limitada, acompañada además de importantes efectos secundarios (Chaparro et al 2012, Fields 2011).

Existen diversas patologías o situaciones clínicas que pueden desencadenar un cuadro de dolor neuropático, como por ejemplo la diabetes mellitus, la neuralgia post-herpética, el dolor post quirúrgico, el cáncer y la quimioterapia (McMahon et al 2013). Se estima que alrededor de un 20% de los pacientes de que sufren de cáncer, cursan la enfermedad con dolor neuropático (Lema et al 2010). Esta situación se puede complicar aún más debido a la neurotoxicidad de los fármacos quimioterapéuticos, empleados

en el tratamiento de muchos tumores (Raffa et al 2013). Por ejemplo, el tratamiento con el fármaco quimioterapéutico oxaliplatino, induce diversos efectos secundarios en la mayoría de los pacientes tratados, incluyendo el desarrollo de dolor neuropático.

1.3.5. Neuropatía inducida por administración de oxaliplatino

El oxaliplatino es un agente quimioterapéutico que fue aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés) en el año 2002 para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal y, desde entonces, se ha convertido en el tratamiento de primera línea contra este tipo de cáncer (McWhinney et al 2009, Wilson et al 2002). Este fármaco, que representa la tercera generación de agentes quimioterapéuticos derivados del platino, también ha mostrado gran efectividad en el tratamiento de otros tumores malignos además del colorrectal, como el cáncer de ovario, de mama y de pulmón (Baker 2003, Labianca et al 2004, Muggia 2004, Petit et al 2006, Screnci et al 2000).

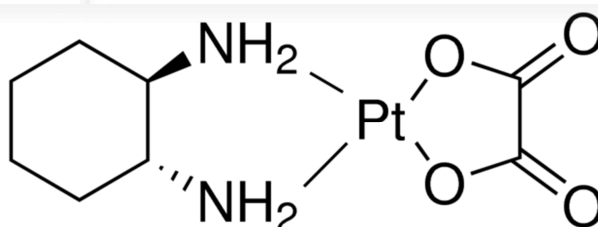


Fig. 1.3.5. Estructura molecular del oxaliplatino. Tomado de (<http://www.sigmaaldrich.com/>)

El oxaliplatino presenta ventajas con respecto a otros agentes quimioterapéuticos con platino usados rutinariamente, como el cisplatino y el carboplatino, por ser más efectivo, al formar aductos de DNA de mayor tamaño, y tener menores efectos secundarios como nefro-, hemato- y ototoxicidad (Joseph et al 2008, Kiernan 2007, Ta et al 2009). Sin embargo, a dosis recomendadas clínicamente, este fármaco es neurotóxico, lo cual limita su uso en pacientes que así lo requieren (Benoit et al 2006, Joseph et

al 2008). El oxaliplatino normalmente se administra cada dos semanas junto con coadyuvantes en regímenes de FOLFOX (200 mg/m² de ácido folínico, 600 mg/m² de fluorouracil y 85 mg/m² de oxaliplatino) o de XELOX (1000 mg/m² de capecitabina y 130 mg/m² de oxaliplatino) durante doce y ocho ciclos respectivamente (Cassidy et al 2004, de Gramont et al 2000).

1.3.5.1. Fases de la neuropatía por oxaliplatino

Atendiendo a su curso temporal, se han descrito dos fases en la neuropatía inducida por administración de oxaliplatino en humanos, la fase aguda y la fase crónica (Beijers et al 2014, Lehky et al 2004, Wilson et al 2002). La fase aguda se desarrolla rápidamente, incluso durante el periodo de infusión del fármaco, y afecta a cerca del 95% de los pacientes. Esta fase, que suele remitir en una semana, se caracteriza por el desarrollo de parestesias, disestesias, espasmos musculares e hipersensibilidad al frío, las cuales pueden ser disparadas o exacerbadas por el frío (Beijers et al 2014, Lehky et al 2004, McWhinney et al 2009, Wilson et al 2002). Cuando la dosis acumulativa alcanza entre 600 y 850 mg/m², se desarrolla la fase crónica, la cual afecta entre el 50-70% de los pacientes tratados (Argyriou et al 2013). Esta fase se caracteriza por la pérdida de sensación, el desarrollo de disestesia y ataxia motora (Beijers et al 2014, Lehky et al 2004). Estos síntomas suelen mejorar pero pueden perdurar hasta dos años después de detener el tratamiento (Briani et al 2014).

A pesar de que se han llevado a cabo numerosos estudios en modelos animales, las causas de la neurotoxicidad producida por el oxaliplatino no se conocen con precisión. Tampoco se sabe si los mecanismos de la fase aguda y crónica son comunes o no (Kiernan 2007, Sittl et al 2012). Adelsberger y colaboradores observaron que la aplicación extracelular de oxaliplatino, producía un incremento en las corrientes de Na⁺ y la ralentización en la inactivación de los canales responsables de dichas corrientes (Adelsberger et al 2000). Más tarde, otros autores observaron en neuronas del ganglio abdominal terminal (TAG) de cucaracha, que tanto la aplicación intracelular del oxaliplatino como el oxalato, un metabolito del

oxaliplatino, producía una inhibición importante en las corrientes de Na^+ (Grolleau et al 2001). En una aproximación más fisiológica, mediante la administración intraplantar en ratones, Deuis y colaboradores sugirieron que la activación anormal de los canales de Na^+ dependientes de voltaje $\text{Na}_v1.6$ estaría implicada en el mantenimiento de la neuropatía inducida por el oxaliplatino (Deuis et al 2013). Ling y colaboradores mostraron en 2007 que la administración intraperitoneal de una única dosis de oxaliplatino, era suficiente para replicar en ratas la hipersensibilidad al frío observada en humanos. Adicionalmente, en este modelo murino los autores observaron el desarrollo de hipersensibilidad mecánica (Ling et al 2007a). Posteriormente, Joseph y colaboradores sugirieron que la hipersensibilidad mecánica y al frío inducida por el oxaliplatino, estaría mediada por nociceptores IB4 positivos, implicando al estrés oxidativo en la génesis de la neuropatía (Joseph et al 2008). Recientemente, se ha reportado que la administración intraperitoneal de oxaliplatino producía un incremento significativo en los niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en los ganglios raquídeos lumbares, efecto que fue atenuado por el tratamiento con un péptido antioxidante (SS-31) (Toyama et al 2014). Estos autores también observaron que el tratamiento con el péptido antioxidante prevenía el desarrollo o aliviaba la hipersensibilidad mecánica y a frío (Toyama et al 2014). Otros autores, han sugerido la atrofia selectiva de una subpoblación de neuronas en los ganglios raquídeos de rata, como la causa de esta neuropatía (Herszényi & Tulassay 2010). Resultados de varios trabajos recientes han colocado a los canales iónicos TRPs en el centro de atención. Por ejemplo, en 2009, Gauchan y colaboradores mostraron que una única inyección de oxaliplatino, producía la sobreexpresión del canal TRPM8, lo cual podría explicar el desarrollo de la hipersensibilidad al frío inducida por este fármaco (Gauchan et al 2009). Un año más tarde, otro grupo mostró que la incubación de neuronas de ganglios raquídeos de ratón con cisplatino u oxaliplatino, inducía la sobreexpresión de mRNA de los canales TRPV1, TRPA1 y TRPM8, sugiriendo la posible implicación de dichos canales en la hipersensibilidad secundaria al tratamiento (Ta et al 2010). No obstante, en

ratones tratados con oxaliplatino estos autores sólo pudieron detectar un incremento en la expresión del mRNA de TRPA1 en neuronas del ganglio trigeminal. Un año más tarde, Descoeur y colaboradores, observaron que la administración de una sola dosis de oxaliplatino inducía el aumento en la expresión del mRNA de TRPA1 (pero no de TRPM8) y de canales catiónicos activados por hiperpolarización (HCN) así como la disminución en la expresión de mRNA de canales de fuga de K^+ (TREK1 y TRAAK) (Descoeur et al 2011). Los autores sugirieron que la hipersensibilidad al frío se debe al aumento en la excitabilidad neuronal secundario a estos cambios en la expresión de distintos canales. Adicionalmente, sugirieron que la hipersensibilidad mecánica observada en modelos murinos está mediada por la actividad del TRPA1. Ese mismo año, otro grupo mostró que el canal TRPA1 no solo media la hipersensibilidad mecánica, sino que también es necesario para el desarrollo de la hipersensibilidad al frío inducida por la administración de oxaliplatino (Nassini et al 2011). En definitiva, existen datos dispersos que implican a distintos canales iónicos en la sintomatología dolorosa pero no hay un esquema definitivo sobre su fisiopatología.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Estudiar el papel de los canales iónicos termosensibles TRPM8 y TRPA1 en la termosensación en condiciones fisiológicas y durante la neuropatía inducida por oxaliplatino, así como el posible rol del TRPM8 en los mecanismos termorreguladores.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Estudiar la sensibilidad al frío inocuo y nocivo de ratones silvestres, *Trpm8*^{-/-}, *Trpa1*^{-/-} y *Trpm8DTR*⁺ en condiciones fisiológicas.
- 2.2.2. Estudiar la sensibilidad al frío inocuo y nocivo de ratones silvestres, *Trpm8*^{-/-}, *Trpa1*^{-/-} y *Trpm8DTR*⁺ durante la neuropatía inducida por la administración intraperitoneal de oxaliplatino.
- 2.2.3. Estudiar el efecto de la estimulación del TRPM8 y del TRPA1 por icilina, en ratones silvestres en condiciones fisiológicas y durante la neuropatía inducida por la administración intraperitoneal de oxaliplatino.
- 2.2.4. Estudiar el posible efecto preventivo de un compuesto antioxidante sobre la hipersensibilidad a estímulos de frío y mecánicos durante la neuropatía inducida por la administración intraperitoneal de oxaliplatino.
- 2.2.5. Estudiar la temperatura corporal interna y la actividad motora a distintas temperaturas ambientales en ratones silvestres, *Trpm8*^{-/-} y *Trpm8DTR*⁺ en condiciones fisiológicas.
- 2.2.6. Estudiar el efecto de la restricción calórica sobre la temperatura corporal interna y la actividad motora en ratones silvestres, *Trpm8*^{-/-} y *Trpm8DTR*⁺.
- 2.2.7. Estudiar el efecto del oxaliplatino sobre la temperatura corporal interna y la actividad motora en ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-}.

3. Materiales y métodos

3.1. Animales

En el estudio se emplearon ratones macho de 5-20 semanas de edad, de distintos genotipos: silvestre (C57BL/6JOlaHsd; <http://www.harlan.com>), *Trpm8*^{-/-}, *Trpa1*^{-/-}, *Task3*^{-/-}, *Trpm8DTR*⁺ y *Trpm8DTR*⁻. Los ratones *Trpm8*^{-/-} diseñados originalmente en laboratorio del Dr. David Julius (Bautista et al 2007), provienen de The Jackson Laboratory (Stock # 008198; <http://www.jax.org>). Los ratones *Trpa1*^{-/-} fueron amablemente donados por el Dr. David Corey (Kwan et al 2006). Los ratones *Task3*^{-/-} fueron generados por el Dr. Douglas Bayliss (Department of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, EEUU) (Rajan et al 2000). Los ratones *Trpm8DTR* fueron amablemente cedidos por el Dr. Mark Hoon (National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, Maryland, EEUU) (Pogorzala et al 2013). Todos estos ratones han sido mantenidos en heterocigosis, cruzándolos con los C57BL/6JOlaHsd. Los ratones fueron estabulados en condiciones estándar en el animalario de la Universidad Miguel Hernández, con temperatura controlada a aproximadamente 23 ± 1 °C, ciclo de luz-oscuridad 12:12 h y comida y agua *ad libitum*. Los experimentos han sido realizados de acuerdo con las directrices del Consejo Directivo de la Comunidad Europea (86/609/ECC) y el Real Decreto 1201/2005.

Ratones *Trpm8DTR*

Los ratones *Trpm8DTR*⁺ son ratones transgénicos que expresan el receptor de la toxina diftérica en las neuronas que sintetizan el canal iónico TRPM8 (Pogorzala et al 2013). De esta forma, el tratamiento con toxina diftérica produce la ablación selectiva de estas neuronas. Para ello, cada ratón de genotipo *Trpm8DTR*⁺ fue tratado con toxina diftérica (DT, 100 µl a 2 ng/µl) por vía intraperitoneal, diariamente, durante 7 días. La elección de la dosis empleada se basó en la utilizada en el trabajo original (Pogorzala et al 2013) y en distintas pruebas para determinar la dosis más efectiva que no afectase la supervivencia de los animales. Los ratones *Trpm8DTR*⁻ (carentes

del receptor) también recibieron la toxina siguiendo el mismo protocolo y sirvieron como controles. El éxito de la ablación de las neuronas TRPM8 positivas se confirmó como una disminución en la sensibilidad del ratón al enfriamiento con hielo seco (ver más abajo en Experimentos conductuales) (Pogorzala et al 2013). Resultados de nuestro grupo confirmaron además que esta dosis de DT en los animales *Trpm8DTR⁺* eliminaba las neuronas que expresan TRPM8 utilizando inmunohistoquímica y RT-PCR. A estos animales, una vez tratados, se les permitió recuperarse durante una semana antes de empezar los experimentos.

3.2. Fármacos

El oxaliplatino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fue disuelto en 5% glucosa en agua destilada. El 4-(4-Clorofenil)-3-metilbut-3-2-oxima (AP18) (Biomol) se disolvió en PBS conteniendo 0,5% Tween80 y 1% DMSO. El 4-(3-Cloro-2-piridinil)-*N*-[4-(1,1-dimetiletil) fenil]-1-piperacinacarboxamida (BCTC) (Biomol) se preparó en un stock de 13 mM en DMSO y luego se disolvió en PBS conteniendo 10% Tween80. La icilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fue disuelta en DMSO (10 mM stock) y luego diluida en solución salina (NaCl 0,9 %) hasta 1,5 mg/ml para la administración intraplantar (50 % DMSO) y 10 µg/ml para la aplicación ocular (3,2 % DMSO). La Acetil-L-Carnitina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fue disuelta en NaCl 0,9 %. La toxina diftérica (List Biological Laboratories, Inc; cat # 150) fue disuelta en agua destilada (1 mg/ml stock) y luego diluida en solución salina (NaCl 0,9 %) hasta una concentración final de 2 ng/µl.

3.3. Experimentos conductuales

Al recibir los animales, éstos fueron monitorizados para buscar posibles signos de agresión como heridas en los miembros, cola y/o espalda. Cuando se encontró alguno, se identificó al ratón dominante y este fue recolocado en una jaula separada. Los ratones fueron habituados al manejo y a las distintas pruebas una semana antes de iniciar los experimentos. Todos los experimentos fueron realizados sin que el

experimentador conociese el genotipo ni el tratamiento, y fueron grabados en video para su posterior análisis.

3.3.1. Test de acetona

La hipersensibilidad al frío se estimó empleando el test de acetona (Flatters & Bennett 2004). Para ello, se colocaron los ratones sobre una superficie elevada con piso de malla de alambre, cubriéndose cada animal individualmente con una caja cilíndrica de plástico transparente (dimensiones 12 cm diámetro x 12 cm alto). Allí se les permitió habituarse durante 30 min o hasta que cesaron su conducta exploratoria. Empleando una jeringa sin aguja de 1 ml, se colocó cuidadosamente una gota (aprox. 50 μ l) de acetona en la superficie plantar de la pata trasera, y se cuantificaron las respuestas (sacudida, lamida y mordida de la pata) producidas por dicho estímulo durante un minuto. Esto se repitió 3 veces con un intervalo de 5 min entre cada una de las aplicaciones, obteniéndose así un valor promedio para cada animal.

3.3.2. Test de la placa fría y test de la placa fría dinámica

Otra prueba utilizada para estudiar la sensibilidad al frío fue el test de placa fría (Nadal et al 2006) y la placa fría dinámica (Yalcin et al 2009). Para realizar la primera prueba, los ratones fueron colocados en una caja plástica transparente (20 x 20 de superficie y 40 cm de altura) con piso metálico manteniendo una temperatura estable: temperatura ambiente, 10 °C ó 0 °C. Se cuantificó la latencia hasta la primera respuesta producida por frío (frotamiento de las patas delanteras o escalofríos) (Karashima et al 2009). El frotamiento de las patas delanteras y los escalofríos (contracciones musculares involuntarias) se observaron mientras los animales mantenían una postura esférica, acompañadas de piloerección y apoyándose principalmente sobre sus patas traseras.

Para realizar el test de la placa fría dinámica, los animales fueron colocados individualmente sobre una placa de aluminio de 16,5 x 16,5 cm, a

30 °C, delimitada por una caja de metacrilato de 50 cm de alto y se les permitió habituarse por 30 minutos. Un día después, los animales fueron colocados sobre la misma placa y se sometieron a un gradiente de enfriamiento con una temperatura inicial de 30 °C y una temperatura final de 0 °C, con una tasa de enfriamiento de 1 °C/min. El experimento fue grabado en video para ser analizado posteriormente. En el análisis se extrajo la temperatura de la primera conducta de escape (salto), la distribución de los saltos y el número de saltos totales. Para los resultados finales, se consideró únicamente la temperatura del primer salto al ser el valor con mayor reproducibilidad.

3.3.3. Enfriamiento con hielo seco o “Cold plantar assay test”

Este test se realizó siguiendo el protocolo descrito recientemente por Brenner y colaboradores con ligeras modificaciones (Brenner et al 2012). El mismo día del experimento se pulverizó hielo seco, se colocó en una bolsa plástica y se almacenó dentro de una caja aislante llena de hielo seco en píldoras (“pellets”) hasta el momento de su utilización. Posteriormente, se colocaron los ratones sobre una superficie elevada formada por una lámina de cristal de borosilicato, cubriéndose cada animal individualmente con una caja cilíndrica de plástico transparente (dimensiones 12 cm diámetro x 12 cm alto), donde se les permitió habituarse durante al menos una hora o hasta que dejaron de observarse comportamientos exploratorios. Luego se llenó una jeringa de 2 ml, a la cual previamente se le removió la punta, con el hielo seco en polvo y se compactó con la ayuda del émbolo, formando un pequeño cilindro de hielo seco. Dicho cilindro se presionó en la cara inferior del vidrio coincidiendo con la posición de una de las patas traseras del ratón, hasta que se observó la retirada de la pata. Posteriormente, se midió la latencia de retirada de la pata y se estimó la temperatura teórica del vidrio en dicho momento. La tasa de transferencia de calor de cristales de distinto grosor, se estimó aplicando el estímulo de frío de la misma manera que se

hizo para la estimulación de los animales, mientras se registraba la temperatura con una termosonda conectada a un controlador Warner CL-100 (Warner Instruments) (Fig. 3.3.3).

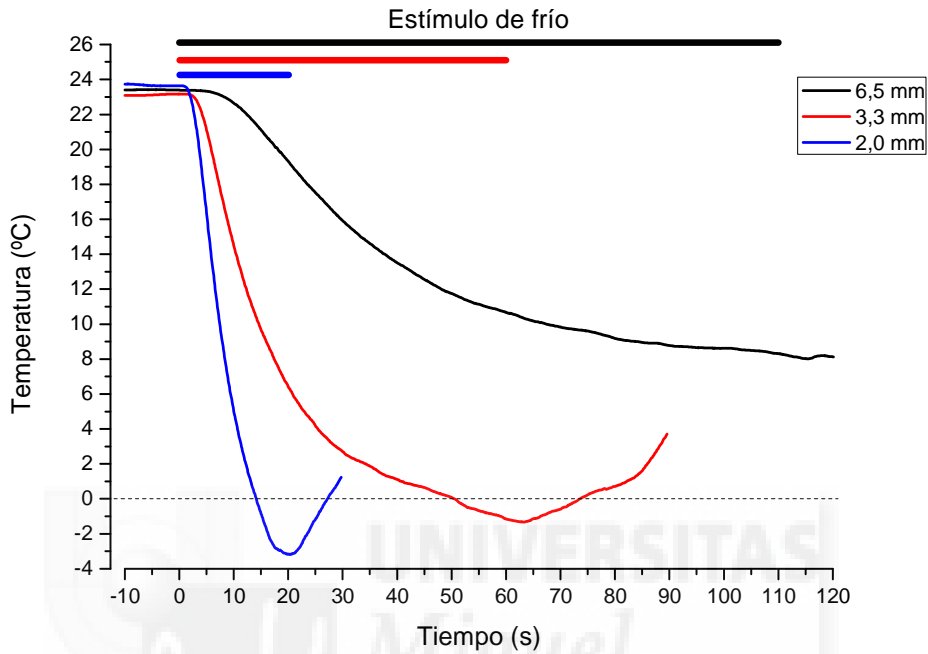


Fig. 3.3.3. Calibración de la temperatura superficial en las láminas de cristal de distinto grosor. En la figura se muestra la temperatura en la superficie del cristal en función del tiempo mientras se estimula el otro lado con la sonda de hielo seco. Los valores mostrados son el promedio de tres mediciones.

El cambio inicial en la temperatura del cristal se ajustó a una ecuación exponencial:

$$y = y_0 \cdot e^{(-x/\tau)} + A$$

Donde, y_0 es el valor inicial de la temperatura, τ es la constante de tiempo con la que cambia la temperatura y A representa el valor de la asíntota.

| Grosor cristal (mm) | τ (s) | A |
|---------------------|------------|--------|
| 2,0 | 15,4 | -17,79 |
| 3,3 | 16,8 | -1,73 |
| 6,5 | 40,6 | 6,58 |

Tabla 4.6. Valores de τ y A en función del grosor del cristal.

Luego de pruebas preliminares, se decidió utilizar el cristal de grosor intermedio (3,3 mm) debido a que ofrece un margen más amplio para la observación de los umbrales dolorosos.

3.3.4. Test de von Frey

La alodinia mecánica se determinó mediante filamentos de von Frey clásicos (Stoelting Co. EEUU; <http://www.stoeltingco.com>) empleando el método conocido como “Up Down” de Dixon (Chaplan et al 1994). Los ratones fueron colocados sobre una superficie elevada con piso de malla de alambre, cubriéndose cada animal individualmente con una caja cilíndrica de plástico transparente (dimensiones 12 cm diámetro x 12 cm alto). Allí se les permitió habituarse durante 30 min o hasta que cesaron su conducta exploratoria. Cada filamento de von Frey fue aplicado, en orden ascendente de fuerza, perpendicularmente sobre la superficie plantar de la pata trasera durante aproximadamente 1,5 segundos, repitiéndose tres veces. Al obtener una respuesta, se probó el filamento anterior en orden de fuerza, en caso contrario se probó el siguiente en orden de fuerza hasta obtener un umbral claramente definido. Se consideraron como respuestas positivas el alzamiento o encogimiento de la pata examinada. Este procedimiento se realizó tres veces dejando cinco minutos entre cada medición.

3.3.5. El “Eye-wiping test” como modelo de dolor trigeminal

Para estudiar las respuestas nocidefensivas mediadas por el sistema trigeminal, se empleó el ensayo conocido como “Eye-wiping test” descrito previamente con ligeras modificaciones (Farazifard et al 2005). Brevemente, los ratones fueron sujetados firmemente y empleando una pipeta se les aplicó 10 µl de solución vehículo (3,2 % DMSO en NaCl 0,9 %) en el ojo derecho e inmediatamente se colocaron sobre una superficie lisa metálica (dimensiones 16,5 x 16,5 cm) delimitada por paredes de metacrilato de 50 cm de alto y se cuantificó el número de veces que el animal se frotó dicho ojo durante un período de 5 min. Una hora después, se repitió el mismo

procedimiento sobre el ojo izquierdo pero aplicando 10 µl de icilina (10 µg/ml en NaCl 0,9 % y 3,2 % DMSO). Finalmente los datos fueron expresados como el número de frotamientos por minuto y el número de frotamientos totales.

3.4. Medición telemétrica de la temperatura interna y la actividad motora.

3.4.1. Implantación de sensores telemétricos

Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 5 %. Una vez en el plano anestésico deseado, los animales se mantuvieron con 2-1,5 % y se les administró un antibiótico profiláctico (enrofloxacino 5 mg/kg) por vía subcutánea. Rápidamente se afeitó la región abdominal y se colocó al animal sobre una manta térmica retroalimentada a través de un termómetro rectal. Posteriormente se esterilizó la zona con alcohol al 70 % y Betadine y se le administró buprenorfina (0,1 mg/kg) por vía intraperitoneal. Se realizó una laparotomía longitudinal de aproximadamente 1 cm a través de la línea media y se implantó el sensor (G2 E-mitter series, MiniMitter, Starr Life Sciences Corp. <http://www.starmlifesciences.com>) fijándolo en la pared abdominal lateral izquierda con un punto de sutura. Posteriormente, se suturaron los músculos y la piel en capas y se esterilizó nuevamente la zona con Betadine. Se permitió que los animales se recuperaran de la anestesia en jaulas individuales iluminadas con luz infrarroja para evitar el desarrollo de hipotermia. Posteriormente, se les colocó agua y comida *ad libitum* y se les mantuvo en recuperación durante al menos siete días en una habitación con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 y una temperatura de estabulación de 21 °C.

3.4.2. Configuración del sistema de registro y análisis de datos

Antes de comenzar los experimentos, los ratones fueron colocados en jaulas limpias, con agua y comida *ad libitum* y lecho suficiente para cubrir el suelo pero no para hacer un nido. A continuación, en la misma habitación de recuperación (luz/oscuridad 12:12 y 21 °C), cada jaula se colocó sobre un receptor (modelo ER-4000, MiniMitter, Starr Life Sciences Corp. <http://www.starrlifesciences.com>) con una separación mínima de 20 cm entre cada receptor según especificaciones del fabricante para evitar interferencias entre ellos. Los receptores se conectaron a un computador en una habitación diferente desde donde se realizó la recolección de datos mediante el programa VitalView (Starr Life Sciences Corp. <http://www.starrlifesciences.com>). Este sistema permite el registro de la temperatura corporal interna y de la actividad motora bruta (no permite discernir entre locomoción y no locomoción) de los ratones implantados. Los datos crudos generados por este programa (formato ASCII) fueron procesados usando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation). Posteriormente, los datos ritmométricos fueron analizados mediante el ajuste de los registros continuos a una función sinusoidal y extrayendo los distintos parámetros de acuerdo a lo descrito en la literatura (ver Figs. 3.5.2 y 3.5.3) (Cornelissen 2014, Nagashima et al 2003).

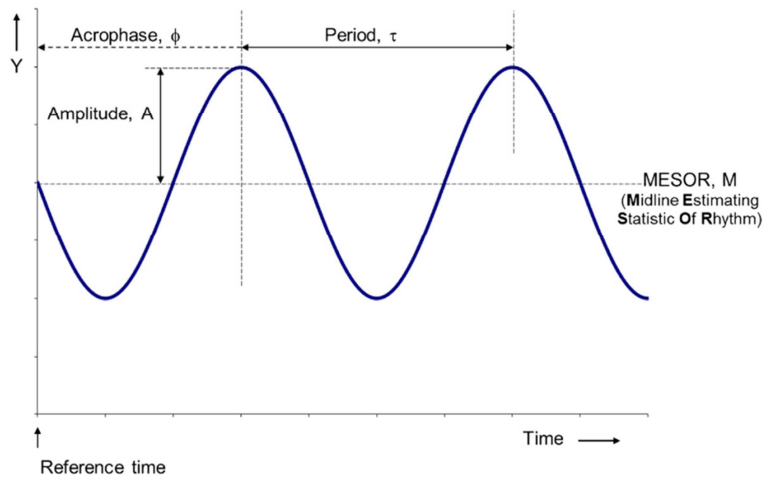


Fig. 3.4.2a. Características de los ritmos circadianos. MESOR indica el valor de temperatura alrededor del cual ocurren las oscilaciones. Amplitud indica la diferencia entre el valor MESOR y valor mínimo y máximo de temperatura. Acrofase es el tiempo estimado desde el inicio de la fase diurna hasta alcanzar el pico máximo. Período indica la duración de cada ciclo. Adaptado de (Cornelissen 2014).

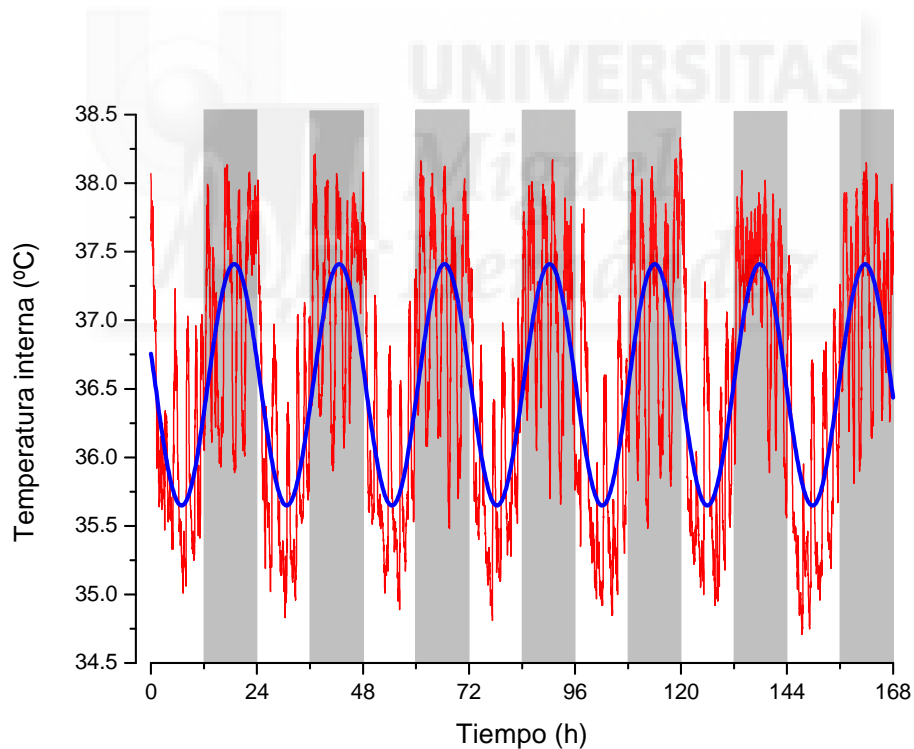


Fig. 3.4.2b. Ejemplo del ajuste de los datos para el análisis ritmométrico. En la figura se muestra un registro cada 30 segundos (duración total igual a 7 días) de temperatura corporal interna de un ratón silvestre a 21 °C (rojo) y la función sinusoidal ajustada a dichos datos (azul). Las barras grises representan la fase de oscuridad de los ciclos 12:12 de luz/oscuridad.

La función sinusoidal utilizada para el ajuste de los datos fue la siguiente:

$$y = y_0 + A \cdot \text{sen}\left(\frac{\pi(x - xc)}{w}\right)$$

Donde y_0 representa el MESOR, A la amplitud de los ciclos, xc representa el cambio de fase y w representa $\frac{1}{2}$ del periodo. La acrofase se extrajo manualmente de la gráfica generada mediante la función mencionada.

Para el análisis cualitativo, la temperatura corporal interna y de actividad motora fueron graficados en intervalos de 30 minutos. Adicionalmente, los datos provenientes de los registros de cada 30 segundos fueron procesados de manera longitudinal-transversal. Este análisis consistió en calcular el promedio a lo largo de las fases diurna y nocturna de los 5-7 días para cada individuo, y luego calcular el promedio de todos los individuos de cada genotipo. Así, estos datos fueron representados en intervalos de 15 minutos hasta completar el ciclo completo luz/oscuridad (24 horas).

3.5. Análisis general de datos

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa PASW 18 (SPSS Inc.), mientras que la representación gráfica de los mismos se hizo mediante el programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation). Para determinar el tipo de prueba estadística a utilizar, se realizó en primera instancia la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Para las comparaciones de datos con distribución normal pertenecientes a dos grupos dependientes se utilizó la prueba T de Student pareada, mientras que para los grupos independientes se empleó la prueba T de Student no pareada. Dado que al realizar comparaciones múltiples se incrementa la probabilidad de cometer errores Tipo I (falsos positivos), el valor de significancia fue ajustado mediante la corrección de tasa de falso descubrimiento (FDR) para las múltiples comparaciones mediante la prueba T de Student (Benjamini & Hochberg 1995). En el caso de datos con

distribución no normal, se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Para las comparaciones de tres o más grupos, con distribución normal, se utilizó la prueba ANOVA de una sola vía con el análisis *post hoc* Bonferroni. Para las comparaciones entre datos dicotómicos, se realizaron tablas de contingencia y las pruebas estadísticas de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher.



4. Resultados

4.1. Papel de los canales iónicos TRPM8 y TRPA1 como sensores de frío en condiciones fisiológicas

Como se ha mencionado en la introducción, existe un debate acerca del papel específico de los canales iónicos TRPM8 y TRPA1 como sensores de frío *in vivo* en condiciones fisiológicas. Para ahondar en esta cuestión y aportar nuevos datos que ayuden a esclarecer esta controversia, se estudiaron las respuestas a estímulos de frío de distinta intensidad y naturaleza en ratones sanos silvestres, *Trpa1*^{-/-}, *Trpm8*^{-/-} y *Trpm8DTR*⁺. En primer lugar, se examinó la sensibilidad al frío inocuo en estos ratones. Para ello, se utilizó el enfriamiento evaporativo producido por la aplicación de una gota de acetona en las patas traseras de los ratones, lo cual generó conductas como sacudidas, lamidas o mordisqueos de la pata estimulada. Al examinar estas respuestas en los animales silvestres, se pudo cuantificar un promedio de $9,8 \pm 0,2$ respuestas por aplicación, valor similar al observado en los animales carentes del canal TRPA1 ($10,8 \pm 0,9$; $p=0,28$) (Fig. 4.1a). Sin embargo, al estudiar el efecto del frío evaporativo producido por la acetona en ratones *Trpm8*^{-/-}, se pudo observar una disminución significativa en las respuestas de aproximadamente un 65 %, al compararlo con los ratones silvestres ($3,5 \pm 0,3$; $p<0,001$) (Fig. 4.1a). Posteriormente, se examinó la sensibilidad al enfriamiento evaporativo en los animales *Trpm8DTR*⁺, observándose una disminución significativa en las respuestas evocadas de ~70 % con respecto a los animales silvestres ($2,8 \pm 0,5$; $p<0,001$). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los ratones *Trpm8*^{-/-} y los *Trpm8DTR*⁺ (Fig. 4.1a).

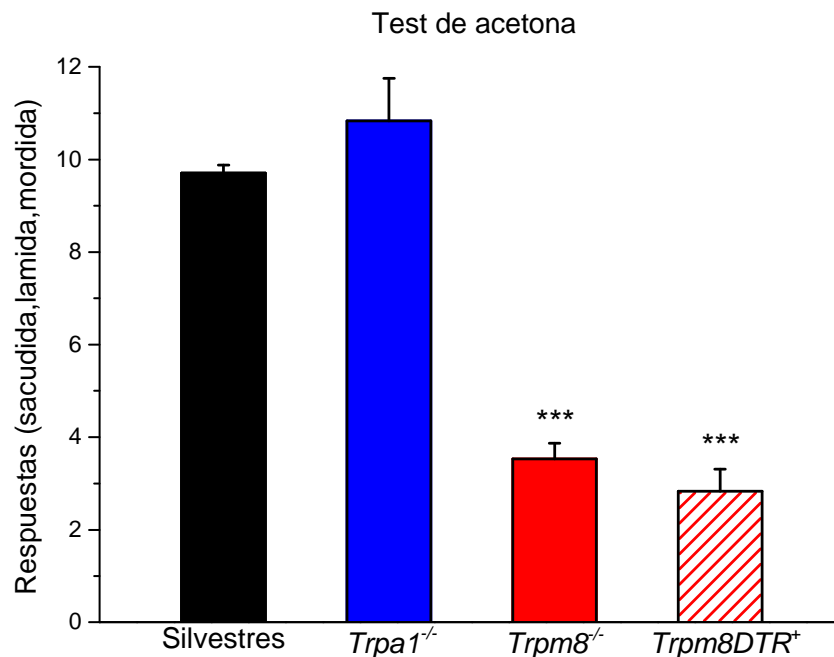


Fig. 4.1a. Sensibilidad a estímulos de frío inocuo mediante el test de la acetona. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudidas, lamidas y mordidas) en la pata trasera estimulada de ratones silvestres, *Trpa1*^{-/-}, *Trpm8*^{-/-} y *Trpm8DTR*⁺. Los valores son expresados como la media ± SEM. ****p*<0,001; ANOVA y Bonferroni. (Silvestres *n*=10, *Trpa1*^{-/-} *n*=10, *Trpm8*^{-/-} *n*=10 y *Trpm8DTR*⁺ *n*=6).

Estos resultados sugieren que el papel del canal TRPA1 en la sensación de frío inocuo es irrelevante en condiciones fisiológicas, mientras que la actividad del TRPM8 es de una gran importancia para la detección de este tipo de estímulos térmicos. Asimismo, la ausencia de diferencias significativas entre los ratones *Trpm8*^{-/-} y *Trpm8DTR*⁺ sugiere que las respuestas residuales observadas en ambos genotipos al enfriamiento evaporativo, podrían estar mediadas por otro sensor (o sensores) térmico expresado en otra subpoblación de neuronas sensoriales.

Debido a que otros factores, además del cambio de temperatura, pueden afectar los resultados de esta prueba como el olor de la acetona o un efecto químico, se examinó la sensibilidad a distintos valores de frío nocivo (10 y 0 °C) mediante el test de la placa fría. La exposición de los ratones a estas temperaturas, produjo la aparición de escalofríos o el

frotamiento de las patas delanteras, actividades motoras asociadas a la exposición al frío (Karashima et al 2009). Tras cuantificar la latencia en la aparición de estos dos signos de frío, se observó una latencia media de $11,5 \pm 0,4$ s en los animales silvestres a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, disminuyendo hasta los $6,4 \pm 0,3$ s cuando estos fueron expuestos a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4.1b).

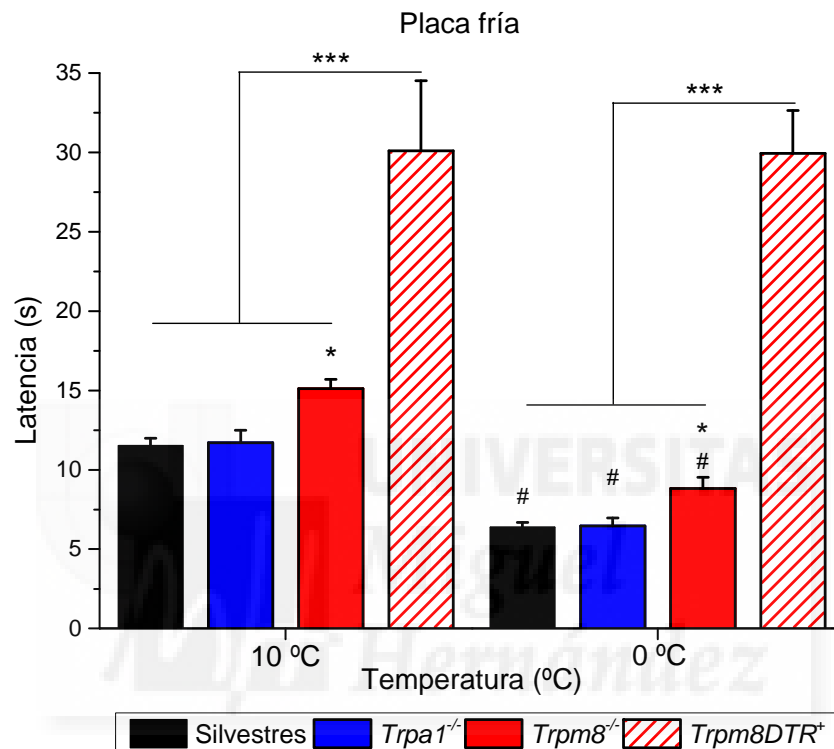


Fig. 4.1b. Latencia a la aparición de la primera reacción producida tras la exposición a la placa fría. En la figura se muestra la latencia hasta la aparición de escalofríos o frotamiento de las patas delanteras de los ratones expuestos al test de placa fría a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) Versus silvestres, (#) Comparación del mismo genotipo $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ versus $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un símbolo $p < 0,05$; triple símbolo $p < 0,001$; ANOVA y Bonferroni (*), y T de Student pareada (#). (Silvestres $n=14$, *Trpa1*^{-/-} $n=10$, *Trpm8*^{-/-} $n=13$ y *Trpm8DTR*⁺ $n=6$).

En los animales *Trpa1*^{-/-} se observaron valores de latencia de $11,9 \pm 0,8$ s cuando la placa fría fue ajustada a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, observándose una disminución de dicha latencia cuando estos mismos ratones fueron expuestos a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4.1b). Al compararlos con los ratones silvestres, no se observaron diferencias significativas ni a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p=0,77$) ni a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p=0,33$). En contraste, al exponer los animales *Trpm8*^{-/-} a la placa fría, se pudo observar un incremento significativo en la latencia tanto a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($15,1 \pm 0,6$

s; $p=0,034$) como a 0 °C ($8,8 \pm 0,7$ s; $p=0,04$), con respecto a los ratones silvestres (Fig. 4.1b). Adicionalmente, tras examinar los ratones con ablación selectiva de las neuronas que expresan TRPM8 (*Trpm8DTR⁺*), se pudo observar un incremento significativo en la latencia a 10 °C ($30,1 \pm 4,4$ s; $p<0,001$) y a 0 °C ($30,0 \pm 2,7$ s; $p<0,001$) con respecto al resto de genotipos (Fig. 4.1b). A diferencia de lo observado en los otros genotipos, en los ratones *Trpm8DTR⁺* no se pudieron observar diferencias en las latencias entre 10 °C y 0 °C, lo que sugiere la existencia de sensores térmicos adicionales al TRPM8, de los cuales dependen las respuestas cuantificadas.

Los resultados obtenidos mediante esta prueba sugieren nuevamente que la sensibilidad al frío, en este caso nocivo, parece depender de la actividad del canal iónico TRPM8 y de las neuronas que expresan dicho canal. Por otra parte, el rol del TRPA1 en la mediación de estas respuestas pareciera ser ínfimo.

Posteriormente, se empleó otra variante del test de la placa fría para intentar arrojar luz sobre un posible papel del TRPA1 como sensor de frío *in vivo*. Esta prueba consistió en exponer a los ratones a una rampa de enfriamiento que parte desde los 30 °C, hasta observar una conducta de escape (Yalcin et al 2009). De esta forma, se puede estimar de forma precisa un valor de temperatura umbral necesario para evocar esta respuesta nocidefensiva. Al estudiar a los ratones silvestres, se observó que el 95,6 % de estos animales (22 de 23) mostraron la conducta nocidefensiva, obteniéndose un umbral promedio de $10,3 \pm 0,8$ °C (Fig. 4.1c). Por otra parte, al examinar los animales *Trpa1^{-/-}* se observó una frecuencia inferior de respuestas de 66,7 % (8 de 12 animales; $p=0,038$), aunque el valor umbral de las respuestas no fue significativamente diferente al mostrado por los animales silvestres ($8,3 \pm 1,7$ °C; $p=0,26$) (Fig. 4.1c). De forma sorprendente, no se observaron respuestas conductuales de escape durante la duración de la rampa (desde 30 °C hasta 0 °C) ni en los ratones *Trpm8^{-/-}* ni *Trpm8DTR⁺* (Fig. 4.1c-A). Estos datos sugieren una vez más que el aporte del TRPA1 a la sensación de frío en condiciones fisiológicas parece ser muy modesta, mientras que los datos de ausencia de función del TRPM8 sugieren un rol

importante de este canal iónico en la sensibilidad al frío en un rango amplio de temperaturas.

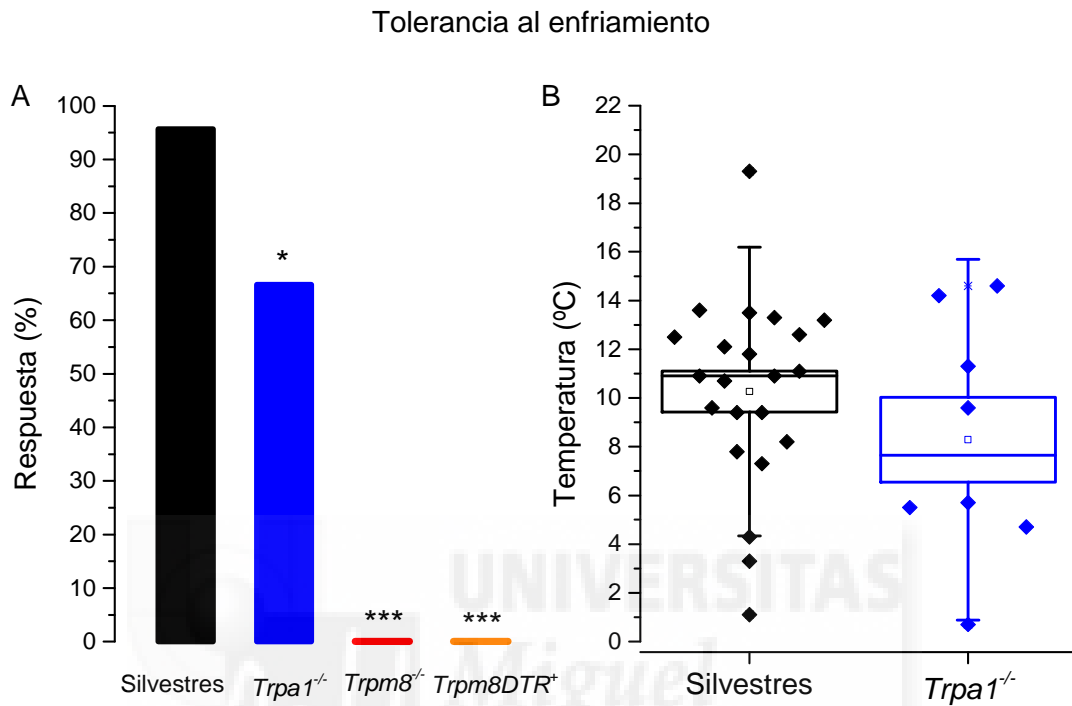


Fig. 4.1c. Tolerancia al enfriamiento en la placa fría dinámica. En la figura se muestra A) el porcentaje de respuesta (primera conducta de escape) y B) la temperatura umbral de la placa fría necesaria para inducir dicha respuesta. En B), se expresan los valores individuales y la media \pm SEM (rectángulo) y desviación estándar (barras). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Chi cuadrado y test exacto de Fisher para (A) y prueba T de Student para (B). (Silvestres $n=23$, *Trpa1*^{-/-} $n=12$, *Trpm8*^{-/-} $n=12$ y *Trpm8DTR*⁺ $n=6$).

Finalmente, para intentar esclarecer un posible papel del TRPA1 como sensor de frío *in vivo*, así como delinear el rol del TRPM8 dentro de la sensibilidad a estímulos focales de frío intenso, se empleó una técnica descrita recientemente (Brenner et al 2012). A diferencia del test de la placa fría, mediante esta técnica se enfría únicamente, y de forma rápida, el área cutánea de la pata trasera en contacto con la superficie del objeto frío (ver métodos). De esta forma, se obtuvo un valor promedio de latencia en los ratones silvestres de $5,8 \pm 0,3$ s, lo cual se tradujo en una temperatura teórica del cristal de $20,1 \pm 0,4$ °C (Fig. 4.1d). En el caso de los ratones *Trpa1*^{-/-}, se observaron valores de latencia y de temperatura teórica

indistinguibles de los silvestres de $5,4 \pm 0,4$ s ($p=0,3$) y $20,5 \pm 0,5$ °C ($p=0,58$) respectivamente. Al examinar los ratones *Trpm8*^{-/-}, se observó un incremento significativo en la latencia ($9,8 \pm 0,3$ s; $p<0,001$) y un descenso en la temperatura teórica ($14,8 \pm 0,4$ °C; $p<0,001$) con respecto a los silvestres (Fig. 4.1d). Asimismo, en los ratones *Trpm8DTR*⁺ se observó una mayor latencia a la retirada de la pata ($15,2 \pm 0,7$ s) con respecto a los ratones silvestres de ~160 % y de ~55 % con respecto a los ratones *Trpm8*^{-/-} ($p<0,001$) (Fig. 4.1d-A). En términos de la temperatura teórica del cristal, esta latencia se traduce en que la temperatura tuvo que descender hasta los $9,8 \pm 0,5$ °C para evocar la retirada de la pata, es decir, ~10 °C menos que los silvestres y ~5 °C menos que los *Trpm8*^{-/-} (Fig. 4.1d-B). La diferencia observada entre los ratones *Trpm8*^{-/-} y los *Trpm8DTR*⁺, sugiere que debe existir otro sensor de frío que se co-expresa junto con el TRPM8 en la misma subpoblación de neuronas. En este sentido, en nuestro grupo de investigación se ha descrito la expresión altamente selectiva del canal TASK3 en neuronas que expresan el canal iónico TRPM8. Este es un canal de K⁺ de doble poro sensible a pH, que produce corrientes de fuga y es capaz de modular la sensibilidad al frío de dichas neuronas (Morenilla-Palao et al 2014, Rajan et al 2000). Por ello, se estudió el papel de dicho canal de fuga de K⁺ en la sensibilidad al frío utilizando ratones *Task3*^{-/-}. Se pudo observar que estos animales poseen una sensibilidad ligeramente mayor al estímulo de frío en comparación con los ratones silvestres. Esto se pudo evidenciar como una disminución en la latencia ($4,5 \pm 0,3$ s; $p=0,03$) y un aumento en la temperatura teórica del cristal ($21,6 \pm 0,3$ °C; $p=0,02$) (Fig. 4.1d).

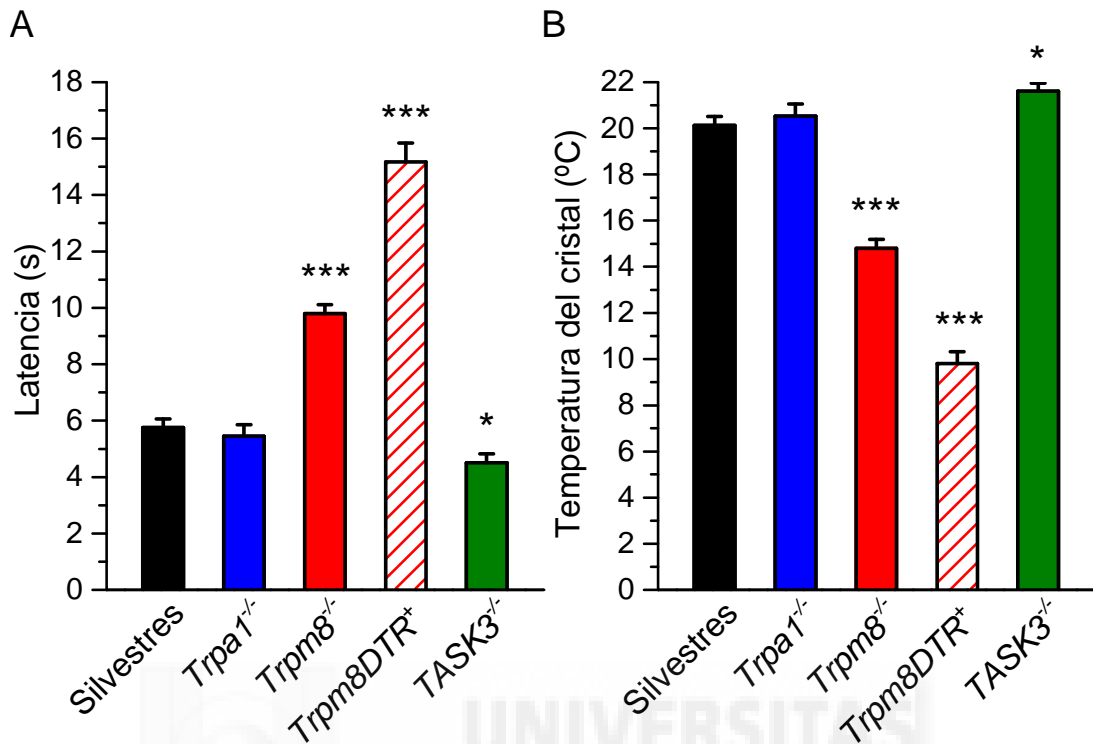


Fig. 4.1d. Sensibilidad al estímulo de frío con hielo seco. En la figura se muestra la latencia hasta la retirada de la pata trasera estimulada (A) y la temperatura teórica del cristal en ese instante (B), en ratones silvestres, *Trpa1*^{-/-}, *Trpm8*^{-/-}, *Trpm8DTR*⁺ y *Task3*^{-/-}. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$; ANOVA y Bonferroni. (Silvestre $n=6$; *Trpa1*^{-/-} $n=9$; *Trpm8*^{-/-} $n=9$; *Trpm8DTR*⁺ $n=18$ *Task3*^{-/-} $n=11$).

En su conjunto, estos datos sugieren que la sensibilidad al frío, tanto inocuo como nocivo, no depende de la actividad del canal TRPA1. A su vez, estos datos sugieren que la actividad del canal iónico TRPM8 es esencial para la sensibilidad al frío desde el rango inocuo hasta valores nocivos. Adicionalmente, el profundo déficit en la sensibilidad al frío observada en los ratones *Trpm8DTR*⁺ sugiere la presencia de al menos otro mecanismo molecular asociado a la termosensación en las mismas neuronas que expresan TRPM8.

4.2. Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad a estímulos de frío y a estímulos mecánicos.

Durante el tratamiento de pacientes oncológicos con el fármaco quimioterapéutico oxaliplatino, se ha descrito el desarrollo de una neuropatía caracterizada por el desarrollo de una marcada hipersensibilidad al frío (Beijers et al 2014, Wilson et al 2002). Se han desarrollado diversos modelos de neuropatía en pequeños roedores que reproducen algunos de los síntomas que se observan en pacientes tratados con oxaliplatino. Los modelos varían en la ruta de administración (intravenoso, intraperitoneal, intraplantar) y en la cantidad de dosis (desde la administración de una única dosis hasta tratamientos que se prolongan durante dos semanas) (Gauchan et al 2009, Joseph et al 2008, Ling et al 2007a). Por ello, se evaluaron dos modelos para determinar cuál resultaría más práctico para estudiar el posible papel de los canales TRPM8 y TRPA1 en la neuropatía inducida por el oxaliplatino. Un modelo consistió en la administración i.p. de una única dosis de oxaliplatino (3 mg/kg) o solución vehículo (glucosa 5 %), mientras que el otro consistió en la administración i.p. de tres dosis idénticas del fármaco (3 mg/kg) o solución vehículo durante tres días consecutivos.

Al estudiar el primer modelo, se observó que la administración i.p. del vehículo (glucosa 5%) en ratones silvestres no produjo cambios significativos en las respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo (test de la acetona). Por el contrario, la administración de una única dosis de oxaliplatino (3 mg/kg) por vía intraperitoneal en ratones de este mismo genotipo, indujo un aumento en el número de respuestas producidas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (Fig. 4.2a). Este aumento fue estadísticamente significativo a partir del tercer día posterior a la administración del fármaco. Esta hipersensibilidad térmica alcanzó una meseta a los cinco días de la inyección del oxaliplatino, prolongándose hasta once días después de la administración.

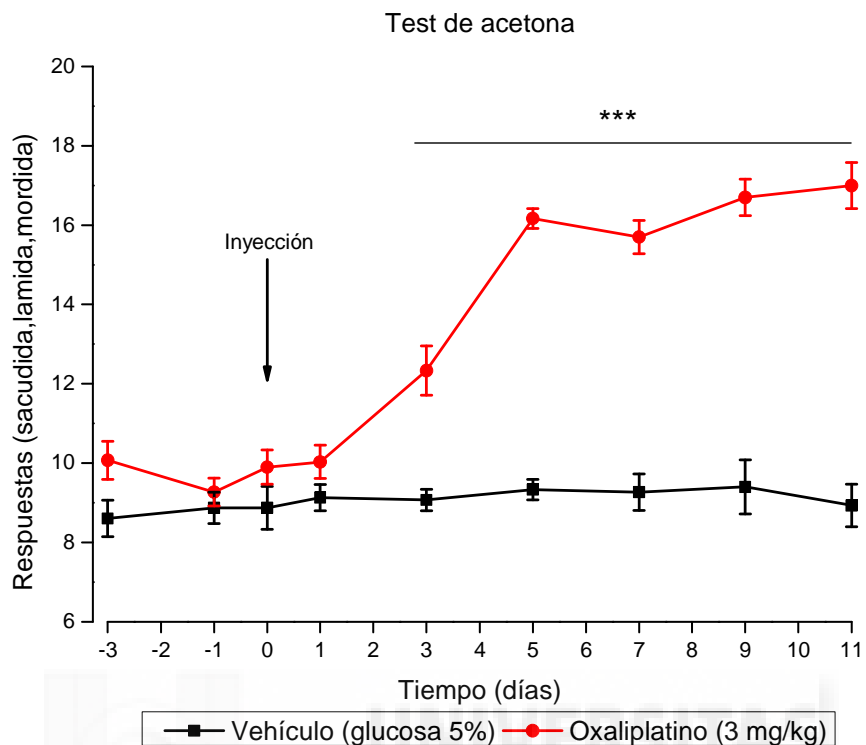


Fig. 4.2a. Efecto de una dosis de oxaliplatino sobre la sensibilidad al frío inocuo. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudidas, lamidas y mordidas) en ratones silvestres, antes y después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. *** $p < 0,001$; prueba T de Student no pareada. (n=10 por grupo).

Posteriormente, se estudió el modelo de tres dosis consecutivas e idénticas de oxaliplatino (3 mg/kg) para lo que se utilizaron nuevos grupos de ratones silvestres: los que recibieron solución vehículo, una única dosis o tres dosis de oxaliplatino (Fig. 4.2b). De igual manera a lo anteriormente observado, este tratamiento indujo el desarrollo de hipersensibilidad al enfriamiento evaporativo. Un día después de la última inyección, es decir, tres días después de administrar la primera de las dosis, se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo (Fig. 4.2b).

El número de respuestas alcanzó entonces una meseta en el quinto día posterior a la administración del fármaco, manteniéndose de esta manera hasta el día once después de la inyección de la primera dosis (Fig. 4.2b). Al comparar ambos tratamientos, a pesar de que se observa una

tendencia hacia valores mayores en el modelo de tres dosis, no se observaron diferencias significativas en el número de respuestas (ver Fig. 4.2b).

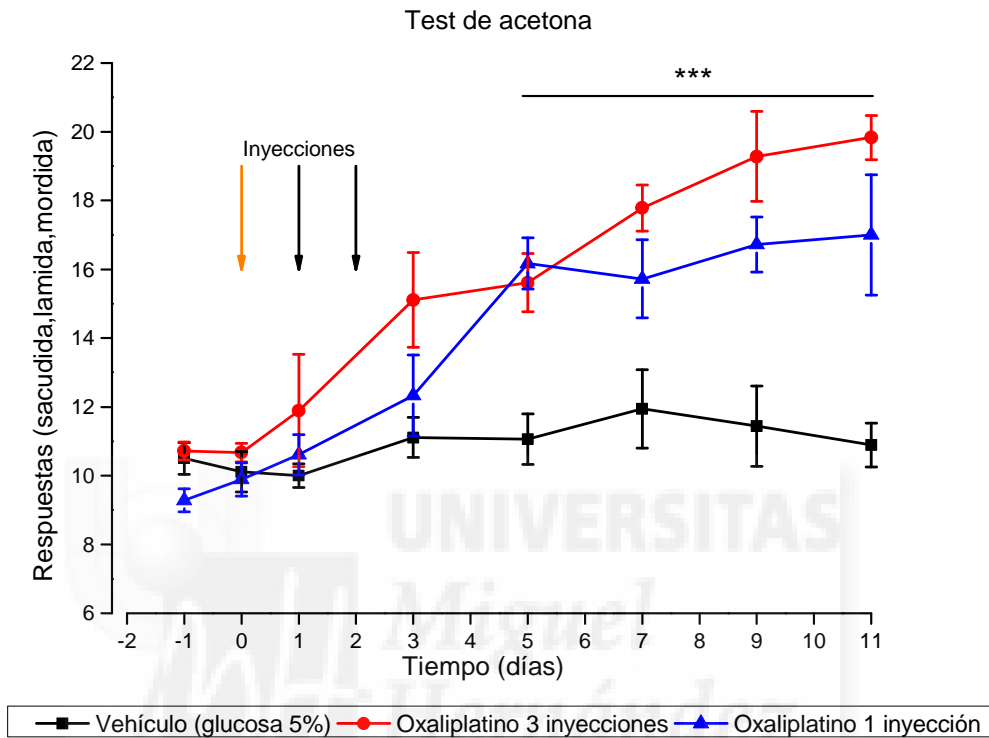


Fig. 4.2b. Efecto de tres dosis de oxaliplatino sobre la sensibilidad al frío inocuo. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudidas, lamidas y mordidas) en ratones silvestres antes y después de la administración de una (la flecha naranja) o tres dosis (las tres flechas) de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) Comparación de una o tres dosis versus sus respectivos valores basales (día 0). *** $p < 0,001$; prueba T de Student pareada. (n=6 por grupo).

Otro síntoma observado en los modelos murinos de neuropatía inducida por oxaliplatino es la aparición de alodinia mecánica (Joseph et al 2008, Ling et al 2007a). La alodinia es un fenómeno de sensibilización en el que estímulos normalmente inocuos, son percibidos como dolorosos (McMahon et al 2013). El método estándar para cuantificar la alodinia mecánica desde hace muchos años es el test de von Frey, puesto en práctica en 1896 por el fisiólogo alemán Maximilian von Frey (Von Frey 1896). Este test consiste en determinar, mediante un simple estesiómetro

construido con filamentos de nylon graduados, el umbral doloroso a estímulos mecánicos. Tras administrar una única dosis de oxaliplatino (3 mg/kg) se observó la disminución significativa del umbral mecánico para la retirada de la extremidad a partir del primer día posterior a la administración de oxaliplatino (Fig. 4.2c).

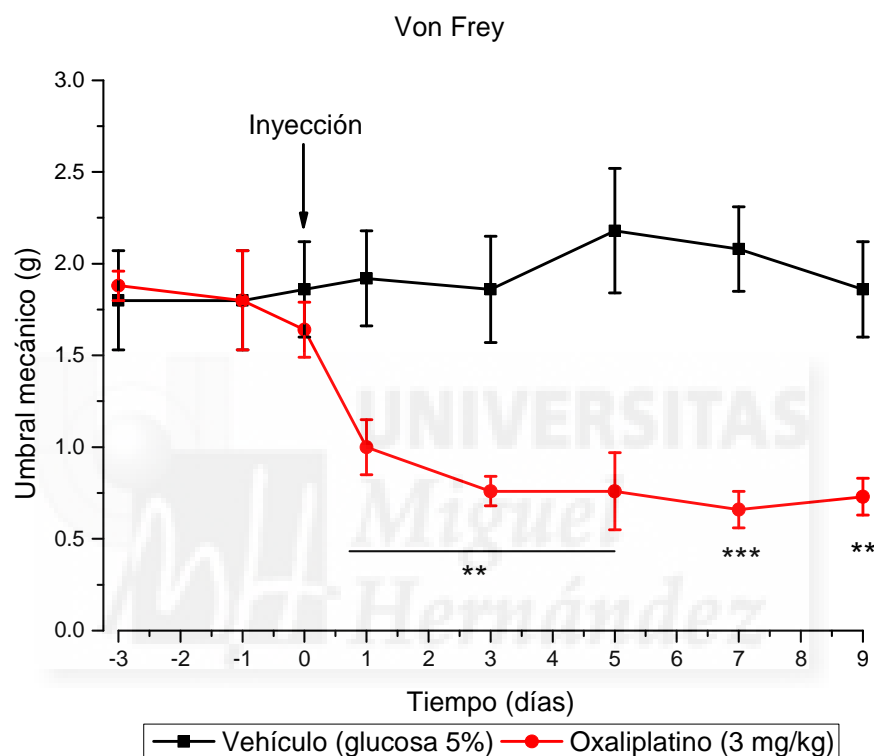


Fig. 4.2c. Efecto de una dosis de oxaliplatino sobre la sensibilidad mecánica. En la figura se muestra el umbral de fuerza a la cual los animales retiran la pata trasera al ser estimulada con un filamento de von Frey, antes y después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; prueba T de Student no pareada. (n=10 por grupo).

La alodinia mecánica alcanzó una meseta tres días después de la administración de oxaliplatino, extendiéndose hasta nueve días posteriores a la administración, mostrando un curso temporal muy similar a lo observado con el enfriamiento evaporativo (Fig. 4.2c). Por otra parte, también se observó que la administración del vehículo (glucosa 5%) no tuvo efectos significativos sobre el umbral mecánico (Fig. 4.2c).

Tras la administración de tres dosis consecutivas de oxaliplatino (3 mg/kg), se evidenció la aparición de alodinia mecánica un día después de la última administración. Esta hipersensibilidad mecánica alcanzó una meseta el quinto día después de la inyección de la primera dosis del fármaco, manteniéndose por seis días más (Fig. 4.2d).

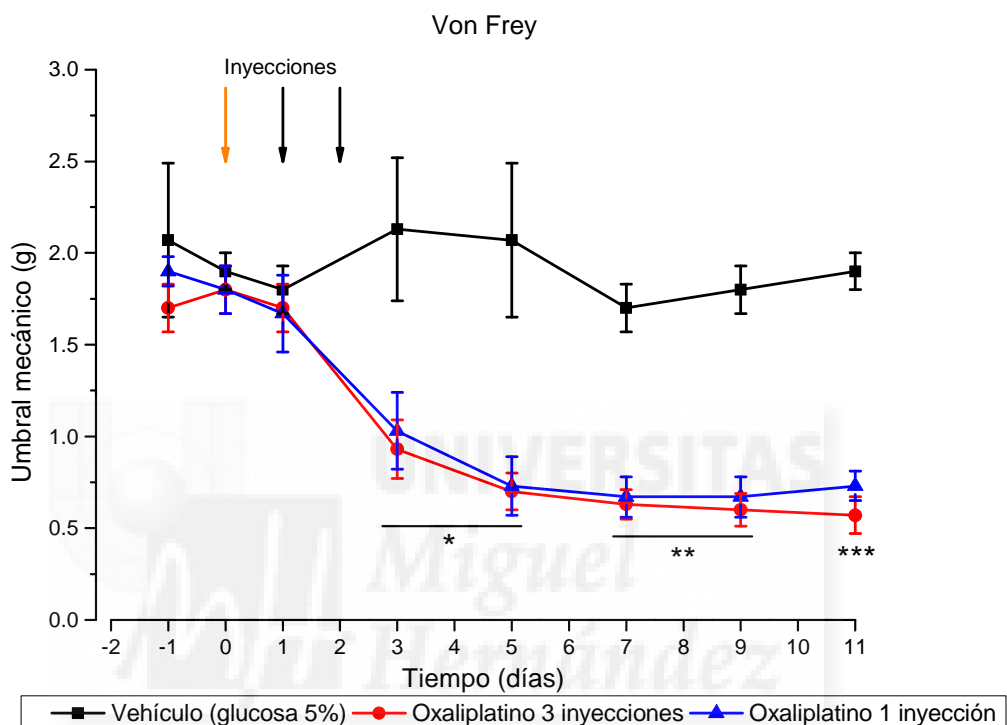


Fig. 4.2d. Efecto de tres dosis de oxaliplatino sobre la sensibilidad mecánica. En la figura se muestra el umbral de fuerza a la cual los animales retiran la pata trasera estimulada con un filamento de von Frey antes y después de la administración i.p. de una dosis (la flecha naranja) o tres dosis (las tres flechas) de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) Comparación de una o tres dosis versus sus respectivos valores basales (día 0). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; prueba T de Student pareada. (n=6 por grupo).

De igual manera que en el modelo anterior, la administración de solución vehículo no produjo cambios estadísticamente significativos sobre el umbral mecánico de los animales tratados (Fig. 4.2d). Adicionalmente, tampoco se apreciaron diferencias entre la administración de una o tres dosis consecutivas de oxaliplatino (3 mg/kg). Considerando que mediante cualquiera de los dos modelos de administración, se observó el desarrollo e instalación de la hipersensibilidad térmica al frío y de alodinia mecánica, sin

existir diferencias importantes entre ambos, se decidió continuar con el modelo más eficiente, es decir, la administración de una única dosis de oxaliplatino.

Posteriormente, se examinó la sensibilidad al frío mediante exposición a la placa fría a una temperatura fija de 10 ó 0 °C. De nuevo, se cuantificó la latencia a la aparición de escalofríos o el frotamiento de las patas delanteras,

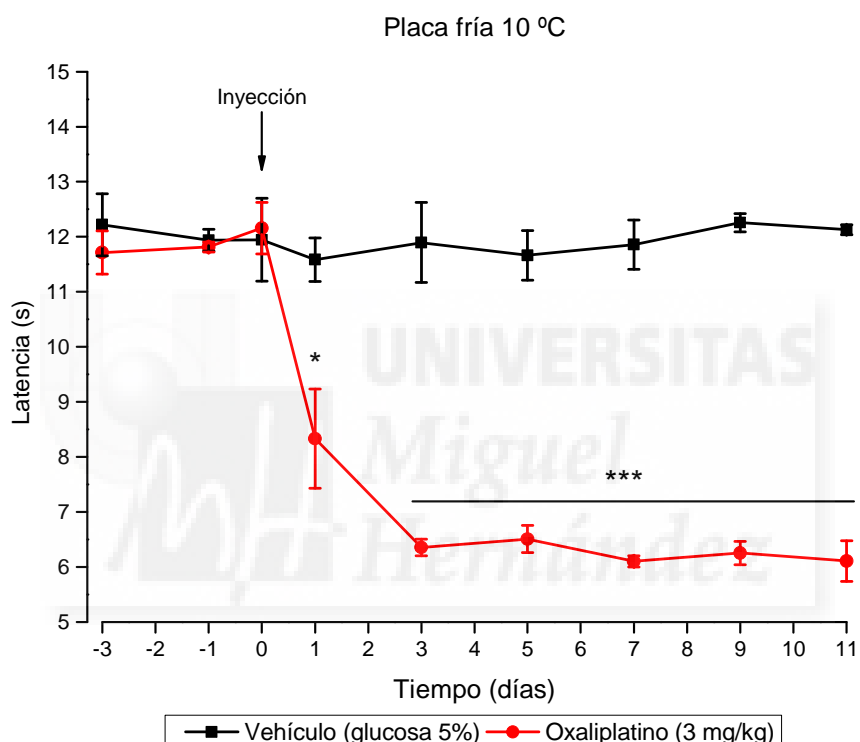


Fig. 4.2e. Efecto del oxaliplatino sobre la latencia a la aparición de la primera reacción producida tras la exposición a la placa fría a 10 °C. En la figura se muestra la latencia a la aparición de síntomas de enfriamiento (escalofrío o frotamiento de las patas delanteras) en ratones silvestres expuestos al test de placa fría a 10 °C, antes y después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM.* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; prueba T de Student no pareada. (n=5 por grupo).

La exposición a 10 °C arrojó valores de latencia de aproximadamente 12 s, los cuales no variaron significativamente tras la administración de solución vehículo (Fig. 4.2e). Un día posterior a la administración de una única dosis de oxaliplatino, se observó un descenso significativo en la latencia lo que demuestra el desarrollo de una hipersensibilidad al frío (Fig.

4.2e). La latencia continuó disminuyendo hasta alcanzar un valor mínimo al tercer día posterior a la administración, extendiéndose hasta once días después de la inyección del agente quimioterapéutico (Fig. 4.2e). Asimismo, los ratones mostraron una latencia inferior al ser expuestos a una temperatura de 0 °C en la placa fría (Fig. 4.2f). A lo largo de los días de experimentación, no se observaron diferencias significativas en los valores de latencia después de la administración de solución vehículo (Fig. 4.2f).

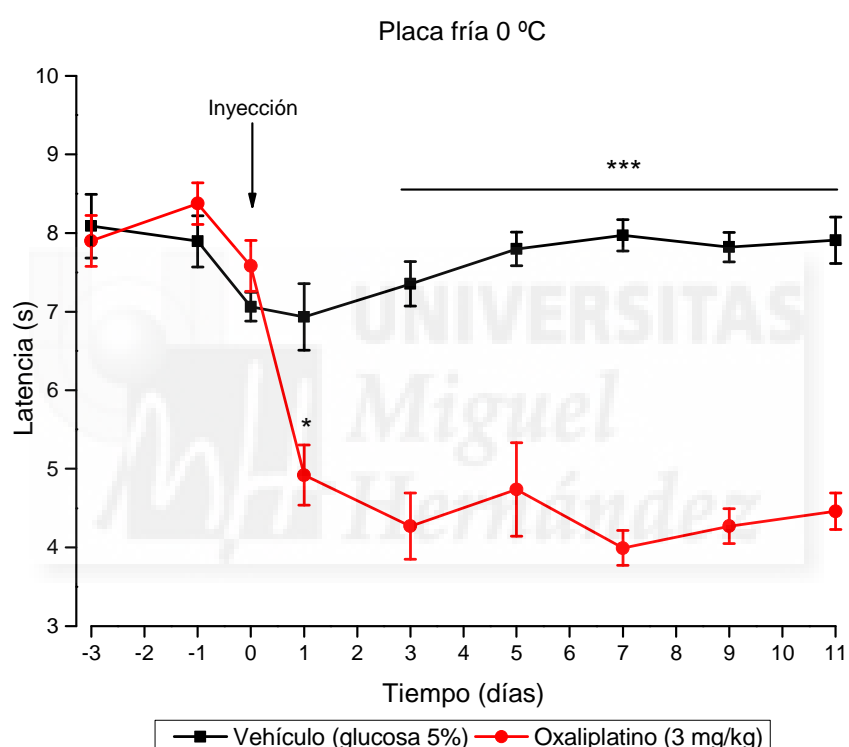


Fig. 4.2f. Efecto del oxaliplatino sobre la latencia a la aparición de la primera reacción producida tras la exposición a la placa fría a 0 °C. En la figura se muestra la latencia a la aparición de síntomas de enfriamiento (escalofrío o frotamiento de las patas delanteras) en los ratones silvestres expuestos al test de placa fría a 0 °C, antes y después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; prueba T de Student no pareada. (n=5 por tratamiento).

Mientras que la administración de solución vehículo no produjo ningún efecto significativo, la inyección de oxaliplatino produjo una importante disminución en la latencia, siendo esta estadísticamente significativa desde el tercer hasta el undécimo día posterior a la administración (Fig. 4.2f).

Estos datos sugieren que la administración i.p. de una única dosis de oxaliplatino es suficiente para inducir el desarrollo de una marcada hipersensibilidad, tanto al frío como mecánica, por lo que se empleó este modelo para los experimentos siguientes.

4.3. Efecto agudo del oxaliplatino sobre la termosensación de frío

En pacientes tratados con oxaliplatino inyectado por vía intravenosa, se ha reportado que la aparición de la hipersensibilidad al frío puede llegar a ser inmediata (Broomand et al 2009). Por ello, se estudió si la administración de oxaliplatino intraperitoneal es capaz de producir un efecto sensibilizador agudo sobre la termosensación de frío de forma similar a lo observado en la administración intravenosa en humanos. Debido a que es necesario permitir que los animales se habitúen durante al menos 30 minutos, este es el menor tiempo posible para examinar los efectos agudos del oxaliplatino mediante la prueba de acetona. Así, al examinar las respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo, no se observaron cambios significativos tras la administración del vehículo (Fig. 4.3a). De igual manera, la inyección i.p. de oxaliplatino no produjo cambios significativos sobre el número de respuestas evocadas (Fig. 4.3a).

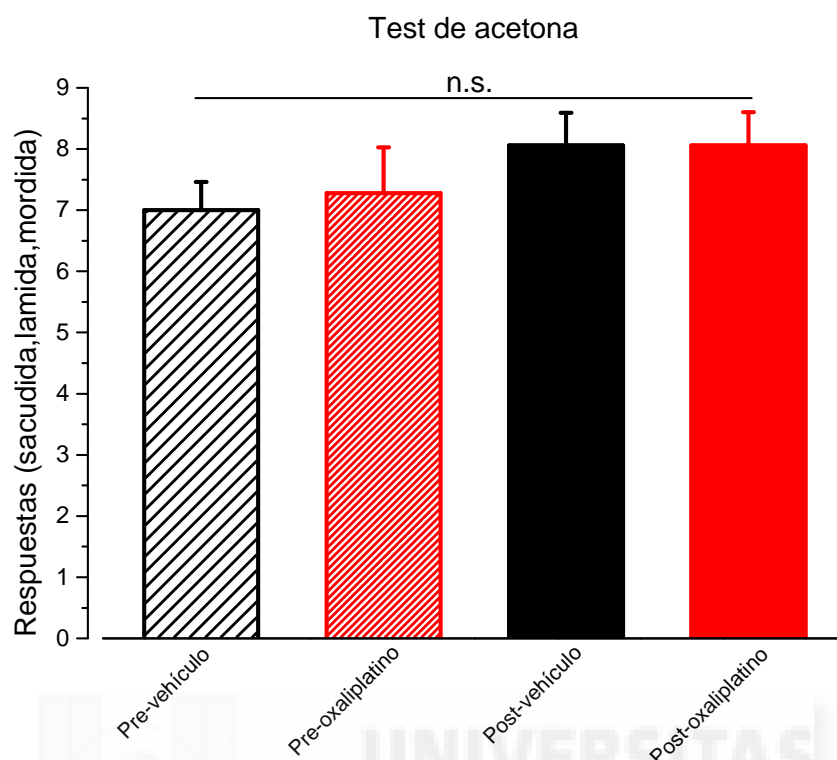


Fig. 4.3a. Efecto agudo del oxaliplatino sobre la sensibilidad al frío inocuo. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudida, lamida, mordida) en ratones silvestres antes y 30 min después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados la media \pm SEM. Prueba T de Student pareada. (n=6).

El paso siguiente consistió en estudiar la latencia a la aparición de los primeros síntomas de enfriamiento producidas por la exposición a la placa fría. Cuando los animales fueron expuestos a la placa enfriada a 10 °C, no se observaron cambios significativos en los valores de latencia tras la administración tanto de solución vehículo como de oxaliplatino (Fig. 4.3b).

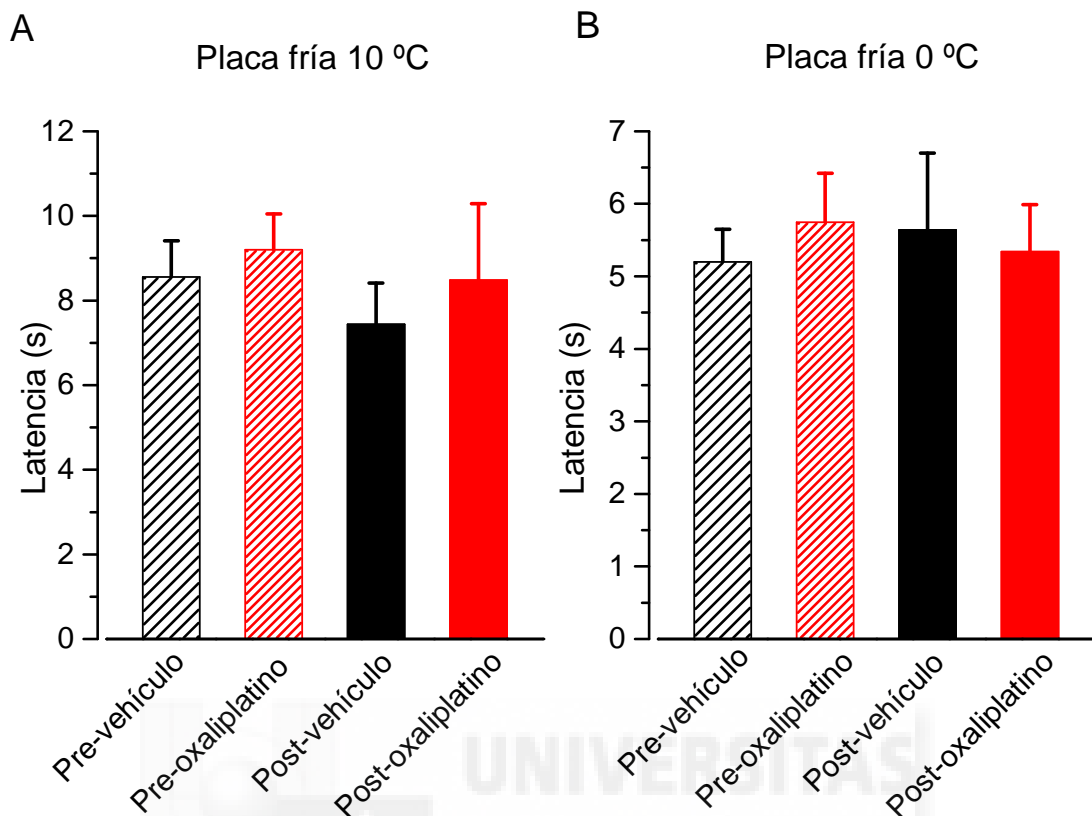


Fig. 4.3b. Efecto agudo del oxaliplatino sobre la latencia a la aparición de la primera reacción producida tras la exposición a la placa fría. En la figura se muestra la latencia a la aparición de síntomas de enfriamiento (escalofríos o frotamiento de las patas delanteras) en los ratones silvestres expuestos al test de placa fría a 10 °C (A) y a 0 °C (B), antes y 30 min después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. Prueba T de Student pareada. (n=6).

El ensayo empleando la placa fría a 0 °C arrojó resultados similares a los anteriores, es decir, la administración de oxaliplatino así como la administración de su vehículo (glucosa 5%) no modificaron los valores de latencia (Fig. 4.8b). Estos resultados podrían sugerir que en este modelo murino, la hipersensibilidad al frío requiere de mayor tiempo para desarrollarse.

4.4. Efecto de los antagonistas de TRPA1 y TRPM8 sobre la hipersensibilidad al frío inducida por oxaliplatino

Hasta este punto, se ha mostrado que la administración de una única dosis de oxaliplatino es capaz de producir sensibilización térmica al frío. Para examinar la posible participación de los canales iónicos TRPA1 y TRPM8 en el desarrollo del fenómeno de sensibilización inducidos por la administración del agente quimioterapéutico, se realizó un abordaje farmacológico, utilizando AP18 como antagonista específico del canal TRPA1 (Petrus et al 2007) y BCTC como potente antagonista no selectivo del canal TRPM8 (Behrendt et al 2004).

Como era de esperar, se observó un aumento en las respuestas evocadas por enfriamiento evaporativo tras la administración de oxaliplatino en todos los grupos tratados (Fig. 4.4a). La administración intraperitoneal de la solución vehículo o del antagonista del TRPM8, treinta minutos antes del ensayo, nueve días después de la inyección de oxaliplatino, no produjo cambios sobre las respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona. Por el contrario, la administración intraperitoneal de AP18 (21 mg/kg), bloqueante del TRPA1, al noveno día posterior a la inyección de oxaliplatino y 30 minutos antes del test, inhibió significativamente las respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo con respecto al séptimo día (Fig. 4.4a). Sin embargo, este efecto inhibitorio, aunque potente, fue transitorio, pues las respuestas alcanzaron nuevamente los valores máximos un día después de la inyección del bloqueante (Fig. 4.4a).

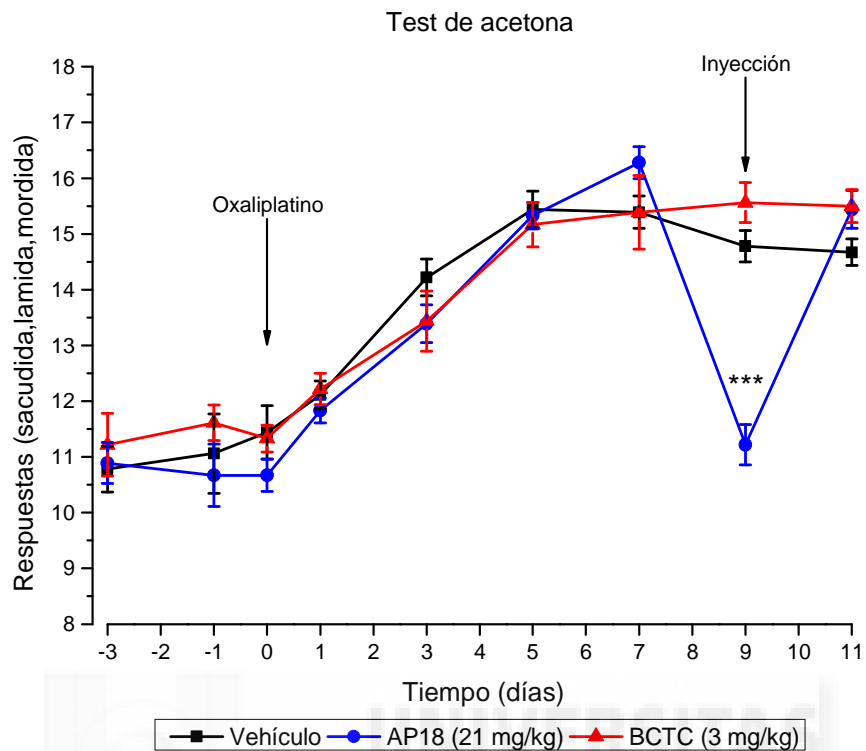


Fig. 4.4a. Efecto de los antagonistas de TRPA1 y TRPM8 sobre la hipersensibilidad al frío inocuo. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudidas, lamidas, mordidas) en ratones silvestres antes y después de la administración i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg) y después de la administración i.p. de los antagonistas de TRPA1 (AP18, 21 mg/kg), TRPM8 (BCTC, 3 mg/kg) o el vehículo de los mismos. Los valores son expresados como la media \pm SEM. *** $p < 0,001$; AP18 versus vehículo; ANOVA de una vía y Bonferroni. (n=6 por grupo).

Mediante el test de la placa fría, se pudo observar que la administración i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg) produjo la disminución de la latencia tanto a 10 como a 0 °C (Fig. 4.4b). Posteriormente, la administración intraperitoneal de vehículo o el bloqueante del TRPM8 no afectó la hipersensibilidad al estímulo de frío (Fig. 4.4b). La administración intraperitoneal del antagonista del canal iónico TRPA1 (21 mg/kg) al noveno día, treinta minutos antes del ensayo, revirtió parcialmente la hipersensibilidad al estímulo de 10 °C pero no a 0 °C (Fig. 4.4b-A y B). Estos datos sugieren que el TRPA1 está involucrado en el aumento de la sensibilidad a estímulos de frío inducida por el oxaliplatino.

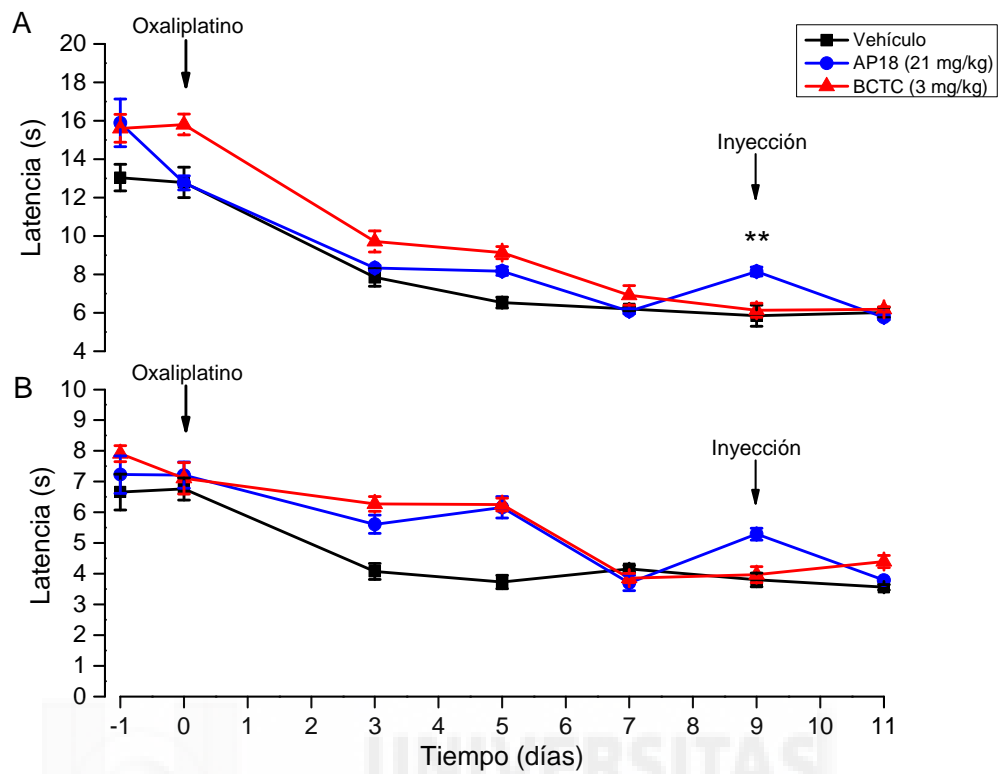


Fig. 4.4b. Efecto de los antagonistas de TRPA1 y TRPM8 sobre la hiperalgesia al frío inducida por oxaliplatino. En la figura se muestra la latencia a la aparición de los síntomas de enfriamiento (escalofrío o frotamiento de las patas delanteras) en ratones silvestres expuestos al test de placa fría a 10 °C (A) y 0 °C (B), antes y después de la administración i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg) y la administración i.p. de los antagonistas de TRPA1 (AP18, 21 mg/kg), TRPM8 (BCTC, 3 mg/kg) o el vehículo de los mismos. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$ AP18 versus vehículo; ANOVA de una vía y Bonferroni ($n=6$ por grupo).

4.5. Efecto del AP18 sobre la sensibilidad mecánica y al frío de ratones silvestres sanos

Previamente se mostró como la administración intraperitoneal del antagonista específico del TRPA1 (AP18) es capaz de inhibir la hipersensibilidad inducida por la administración de oxaliplatino. Entonces surgió la pregunta de si este compuesto podría modificar la sensibilidad mecánica y al frío en condiciones fisiológicas. Primero, se estudió el efecto del AP18 (21 mg/kg, i.p.) sobre las respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo, no observándose diferencias estadísticamente significativas treinta minutos después de la administración del antagonista ($p=0,49$) (Fig. 4.5a).

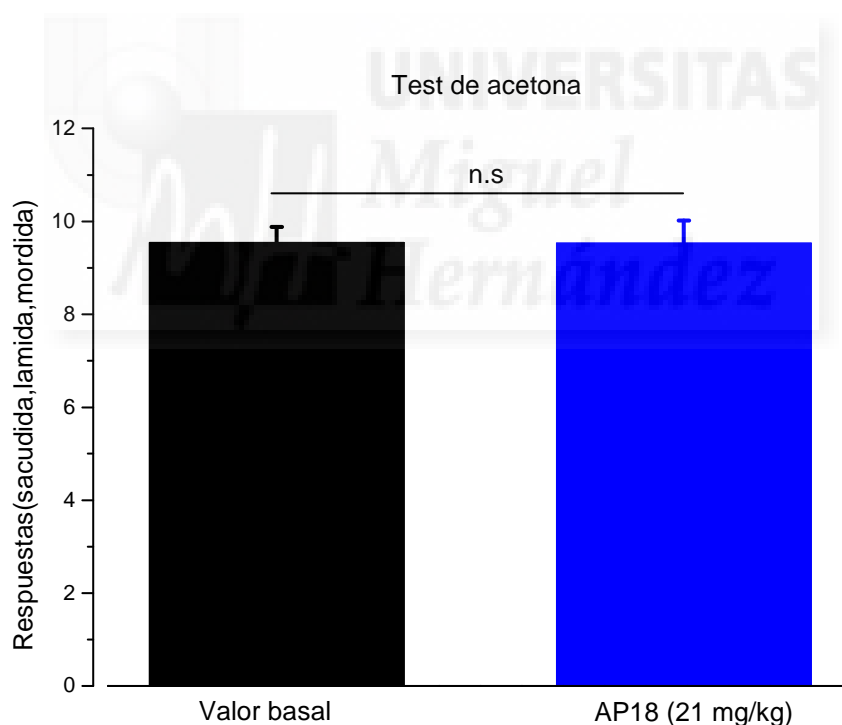


Fig. 4.5a. Efecto del antagonista del TRPA1 (AP18) sobre la sensibilidad al frío inocuo. En la figura muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudidas, lamidas, mordidas) en ratones silvestres antes y 30 min después de la administración i.p. de AP18 (21 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. Prueba T de Student pareada. (n=11).

De forma consistente, tampoco se apreciaron cambios significativos sobre la latencia a la aparición de los primeros síntomas de enfriamiento en el test de placa fría, tanto a 10 ($p=0,4$) como a 0 °C ($p=0,9$), tras la administración intraperitoneal del bloqueante específico del TRPA1 (21 mg/kg) (Fig. 4.5b).

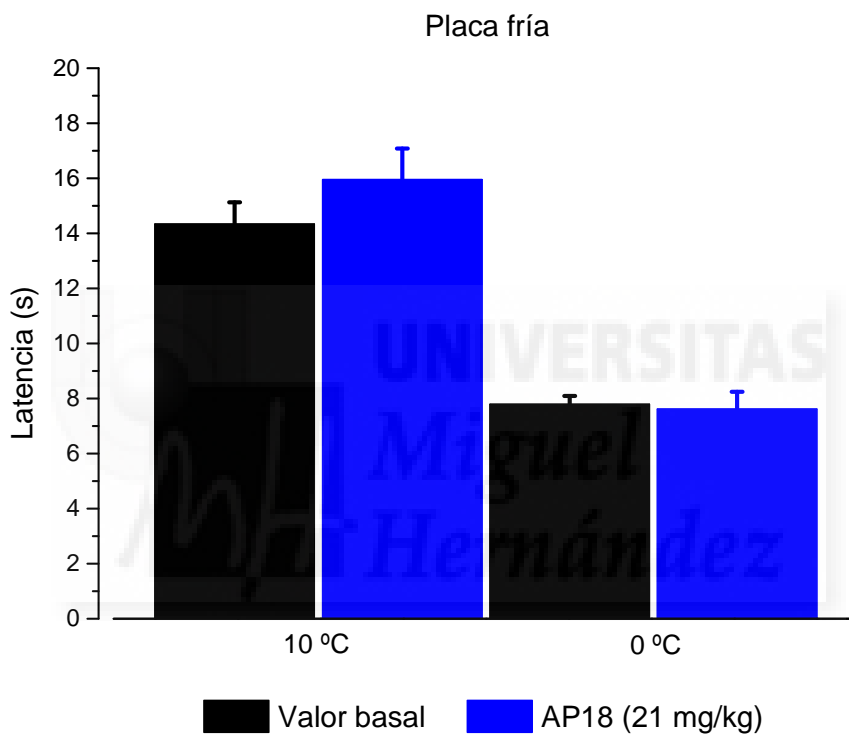


Fig. 4.5b. Efecto del antagonista del TRPA1 (AP18) sobre la latencia a la aparición de la primera reacción producida tras la exposición a la placa fría. En la figura se muestra la latencia hasta la aparición de los síntomas del enfriamiento (escalofríos o frotamiento de las patas delanteras) en ratones silvestres expuestos al test de placa fría a 10 °C y 0 °C, antes y 30 min después de la administración i.p. del antagonista del TRPA1 (AP18, 21 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. Prueba T de Student pareada ($n=11$).

A continuación, se estudió si la inhibición del canal TRPA1 en condiciones fisiológicas tiene algún efecto sobre la sensibilidad mecánica. Al igual que lo observado sobre las respuestas a frío, la inhibición farmacológica del canal TRPA1 en condiciones fisiológicas no produjo cambios significativos sobre el umbral mecánico ($p=0,71$), lo que podría

sugerir que el TRPA1 no participa en la mecanosensación en condiciones fisiológicas (Fig. 4.5c).

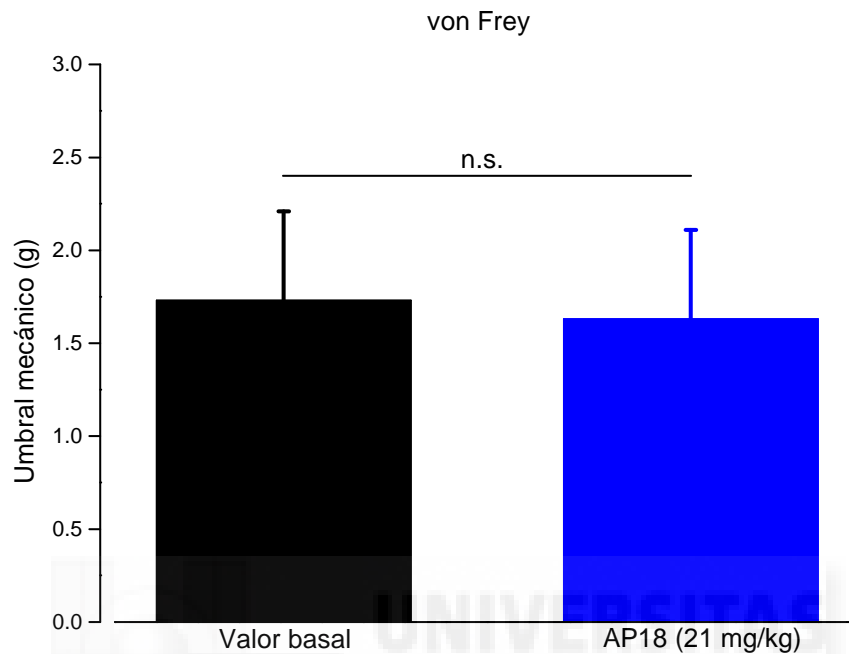


Fig. 4.5c. Efecto del antagonista del TRPA1 (AP18) sobre la sensibilidad mecánica. En la figura se muestra el umbral de fuerza a la cual los ratones silvestres retiran la pata trasera tras ser estimulada con un filamento de von Frey, antes y 30 min después de la administración i.p. del antagonista del TRPA1 (AP18, 21 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. Prueba T de Student pareada. (n=6).

4.6. Efecto del oxaliplatino sobre la sensación de frío en animales deficientes en TRPA1 o TRPM8.

Los resultados previos indican que la inhibición farmacológica del canal iónico TRPA1 es capaz de reducir, o incluso revertir completamente, la hipersensibilidad térmica a estímulos de frío inducida por la administración de oxaliplatino. Por el contrario, la inhibición farmacológica del canal TRPM8 no tiene efecto alguno sobre la hipersensibilidad térmica producida por el oxaliplatino. Para confirmar lo observado mediante el uso de los antagonistas farmacológicos, se estudió el efecto de la administración de oxaliplatino en ratones carentes del canal iónico TRPA1 (*Trpa1*^{-/-}) o TRPM8 (*Trpm8*^{-/-}).

Tal y como se mostró previamente, la sensibilidad basal al enfriamiento evaporativo de los ratones *Trpm8*^{-/-} era significativamente inferior al compararlo con los ratones silvestres. La administración de oxaliplatino produjo una notable sensibilización al frío, tanto en animales silvestres como en los *Trpm8*^{-/-} (Fig. 4.6a). Además, la administración intraperitoneal de AP18 (21 mg/kg), en estos animales, treinta minutos antes del test, produjo una disminución significativa en el número de respuestas evocadas con respecto al día anterior, tanto en animales silvestres como en *Trpm8*^{-/-} (Fig. 4.6a).

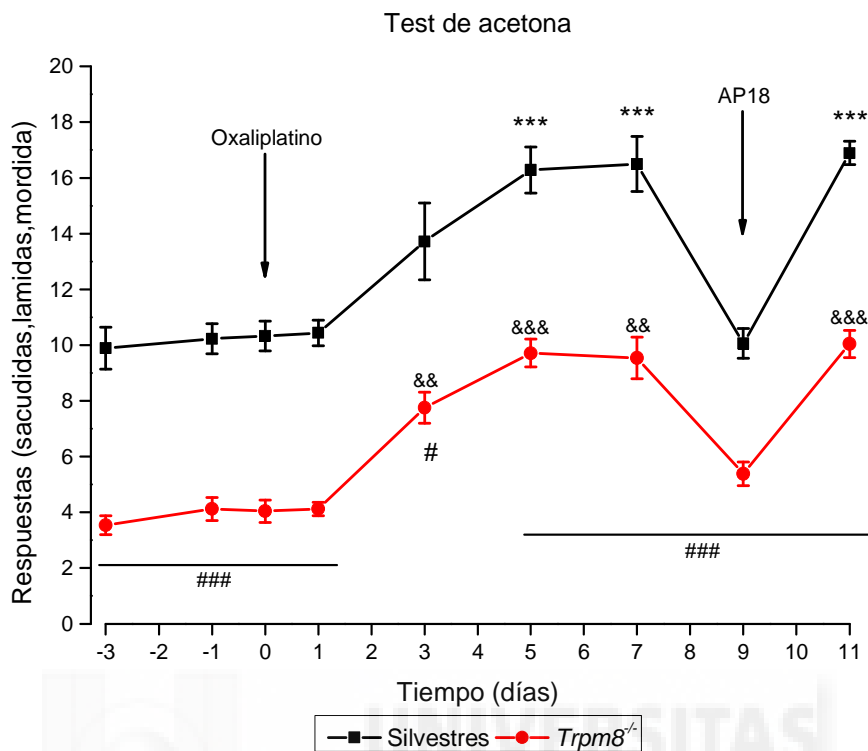


Fig. 4.6a. Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad al frío inocuo de ratones *Trpm8*^{-/-}. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudidas, lamidas y mordidas) en ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} antes y después de la administración i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg) y del antagonista del TRPA1 (AP18, 21 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. (#) Silvestres versus *Trpm8*^{-/-}; (*) Silvestres, día versus línea base (día 0); (&) *Trpm8*^{-/-}, día versus línea base (día 0). Doble símbolo p<0,01 y triple símbolo p<0,001; prueba T de Student tanto pareada (* y &) como no pareada (#). (Silvestres n=6, *Trpm8*^{-/-} n=8).

Al examinar la sensibilidad al frío mediante la placa fría tanto a 10 °C como a 0 °C, se observó que la administración de oxaliplatino produjo el desarrollo de hipersensibilidad al estímulo de frío en los ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-}, mostrando en ambos genotipos un curso temporal similar al observado previamente (Fig. 4.6b). Posteriormente, la administración intraperitoneal del antagonista del TRPA1 (AP18, 21 mg/kg) el noveno día posterior a la inyección de oxaliplatino, y 30 minutos antes del test, tuvo un efecto inhibitorio parcial sobre la hipersensibilidad al frío en ambos genotipos a 10 °C, pero no a 0 °C aumentando significativamente el tiempo necesario para la aparición de escalofríos o frotamiento de las patas delanteras (Fig. 4.6b).

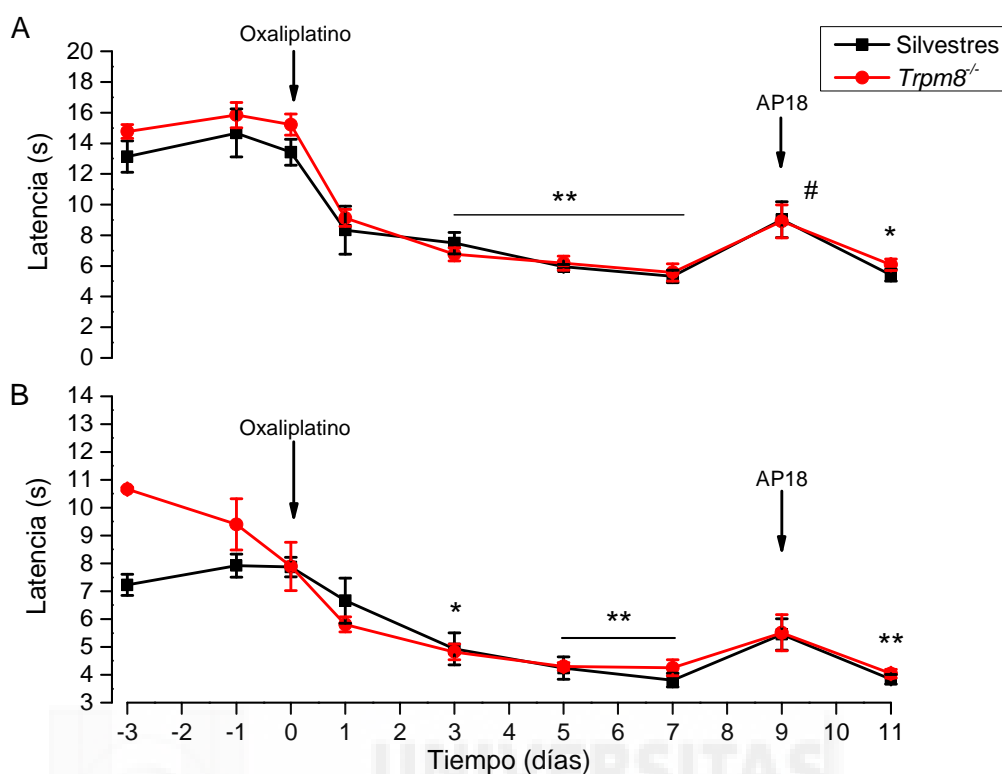


Fig. 4.6b. Efecto del oxaliplatino sobre la latencia a la aparición de la primera reacción producida tras la exposición a la placa fría de ratones *Trpm8*^{-/-}. La figura muestra la latencia a la aparición de síntomas de enfriamiento (escalofrío o frotamiento de las patas delanteras) en ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} expuestos al test de placa fría a 10 °C (A) y 0 °C (B), antes y después de la administración i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg) y el antagonista del TRPA1 (AP18, 21 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. (#) Día 9 versus día 7; (*) día versus día 0. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; prueba de T de Student pareada. (Silvestres $n=6$, *Trpm8*^{-/-} $n=8$).

A continuación, se estudió el efecto del oxaliplatino sobre un grupo de ratones *Trpa1*^{-/-}. De acuerdo a lo esperado, los ratones silvestres tratados con oxaliplatino desarrollaron hipersensibilidad al enfriamiento evaporativo de la acetona, mostrando un curso temporal similar al descrito previamente (Fig. 4.6c). En los ratones *Trpa1*^{-/-} no se observaron cambios en la sensibilidad basal al enfriamiento por acetona. Además, en estos ratones, la administración de oxaliplatino no produjo hipersensibilidad al frío evocado por acetona (Fig. 4.6c).

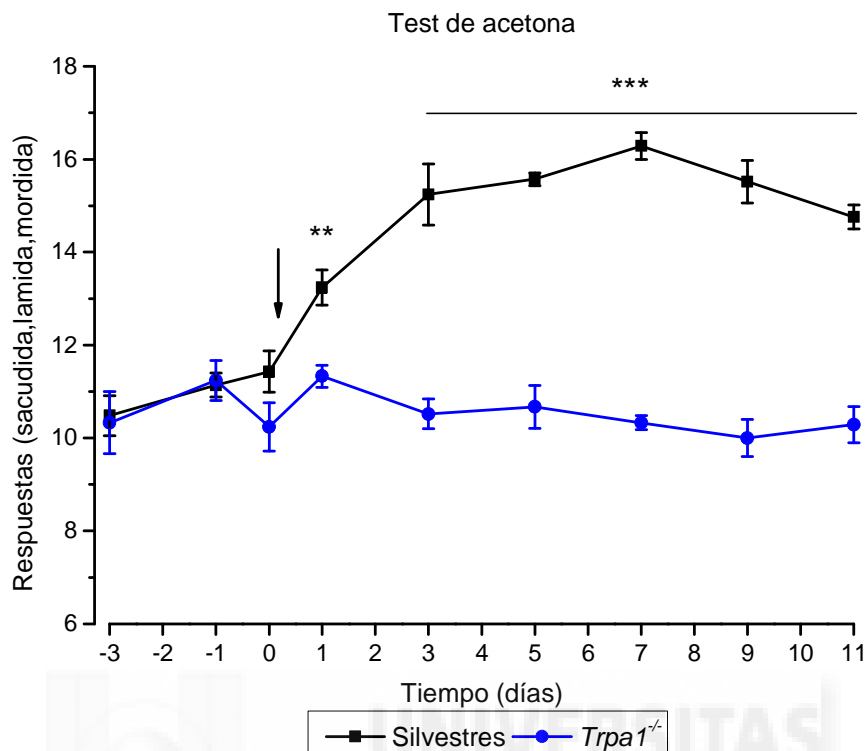


Fig. 4.6c. Efecto del oxaliplatino sobre la al frío inocuo de ratones *Trpa1*^{-/-}. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona (sacudidas, lamidas, mordidas) en ratones silvestres y *Trpa1*^{-/-} antes y después de la administración i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; prueba T de Student no pareada. (n=7 por grupo).

Al estudiar la sensibilidad al frío mediante la placa fría a 10 y a 0 °C, se pudo observar que mientras que los ratones silvestres desarrollaron la típica hipersensibilidad al frío tras recibir el oxaliplatino, los animales *Trpa1*^{-/-} mostraron resistencia al desarrollo de dicha hipersensibilidad, observándose valores promedio de latencia relativamente estables durante todos los días del registro (Fig. 4.6d). En la misma línea de los resultados anteriores, estos resultados sugieren que el TRPA1 posee un rol de gran importancia en el desarrollo de la hipersensibilidad al frío inducida por el oxaliplatino.

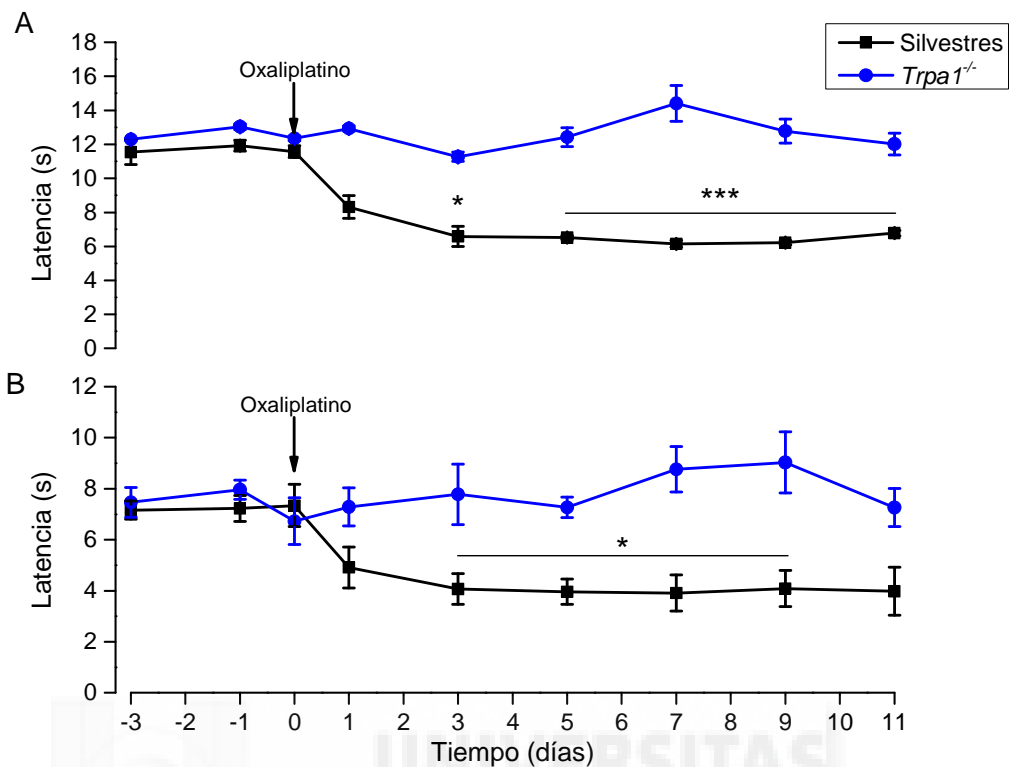


Fig. 4.6d. Efecto del oxaliplatino sobre la hipersensibilidad al frío en ratones *Trpa1*^{-/-}. En la figura se muestra la latencia a la aparición de síntomas de enfriamiento (escalofrío o frotamiento de las patas delanteras) en ratones silvestres y *Trpa1*^{-/-} expuestos al test de placa fría a 10 °C (A) y 0 °C (B), antes y después de la administración i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media ± SEM. *p<0,05; ***p<0,001 prueba T de Student no pareada. (n=7 por grupo).

Varios estudios *in vitro* han mostrado que el TRPA1 es activado por estímulos mecánicos, por lo que se ha propuesto que podría actuar como mecanosensor *in vivo* (Corey et al 2004, Kwan et al 2009, Vilceanu & Stucky 2010). Los estudios *in vivo* sugieren que, a pesar de que su función como mecanosensor en condiciones fisiológicas no es clara, este canal juega un papel crítico en el desarrollo de hipersensibilidad mecánica en condiciones patológicas (Bautista et al 2006, Kwan et al 2006, Meseguer et al 2014). Por esto, se estudió si la alodinia mecánica inducida por el oxaliplatino está mediada por el canal iónico TRPA1. Se pudo observar una sensibilidad basal a estímulos mecánicos similar entre los ratones silvestres y los *Trpa1*^{-/-}, sugiriendo que en condiciones fisiológicas el TRPA1 no juega un papel esencial como mecanosensor (Fig. 4.6e). Mientras que la administración de oxaliplatino (3 mg/kg; i.p.) produjo un descenso en el umbral mecánico en los

ratones silvestres, los ratones *Trpa1*^{-/-} fueron resistentes al desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la administración de oxaliplatino (Fig. 4.6e).

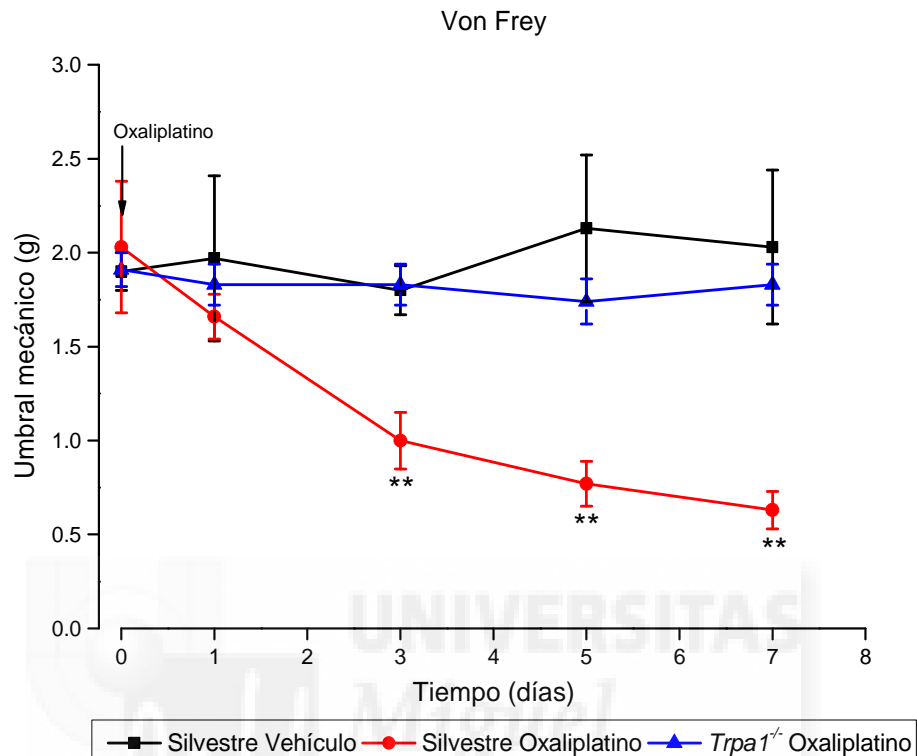


Fig. 4.6e. Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad mecánica de ratones *Trpa1*^{-/-}. En la figura se muestra el umbral de fuerza a la cual los animales retiran la pata trasera estimulada con un filamento von Frey, antes y después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (3 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. **p<0,01; ANOVA y Bonferroni. (n=7 por grupo).

En resumen, los resultados anteriores sugieren que el TRPA1 juega un papel clave para la génesis de tanto de la hipersensibilidad mecánica como al frío inducidas por el oxaliplatino.

4.7. Efecto del oxaliplatino sobre la tolerancia al enfriamiento

Previamente, se pudo observar que la tolerancia al enfriamiento de ratones silvestres y *Trpa1*^{-/-} sanos era similar. Asimismo, se observó que los ratones *Trpm8*^{-/-} eran insensibles a esta prueba (ver sección 4.1). Con el fin de examinar si la administración intraperitoneal de oxaliplatino es capaz de modificar la tolerancia al frío, se repitió el ensayo de la tolerancia al enfriamiento pero utilizando ratones pretratados con oxaliplatino 3 días antes del ensayo. Para estos experimentos se incrementó la dosis de oxaliplatino al doble (6 mg/kg), con el fin de poder compararlos con los resultados reportados en un trabajo reciente (Descoeur et al 2011). En los ratones silvestres pretratados con oxaliplatino, se observó una temperatura umbral nociceptiva mayor que en los ratones pretratados con solución vehículo ($10,7 \pm 0,6$ °C versus $16,2 \pm 1,2$ °C; $p=0,016$) (Fig. 4.7a). Este efecto no se observó en otro grupo de ratones, también pretratados con oxaliplatino, a los cuales adicionalmente se les administró el antagonista del canal iónico TRPA1 (AP18 21 mg/kg; i.p.) 15 minutos antes del test ($7,8 \pm 1,5$ °C; $p=0,003$) (Fig. 4.7a). Consistente con estos resultados, la administración i.p. de oxaliplatino no alteró significativamente el umbral nociceptivo de los ratones *Trpa1*^{-/-} ($8,3 \pm 1,7$ °C sanos vs $6,8 \pm 1,8$ °C tratados; $p=0,44$) (Fig. 4.7a). Por último, la administración de oxaliplatino no alteró la insensibilidad de los ratones *Trpm8*^{-/-} a esta prueba (Fig. 4.7a).

Tolerancia al enfriamiento

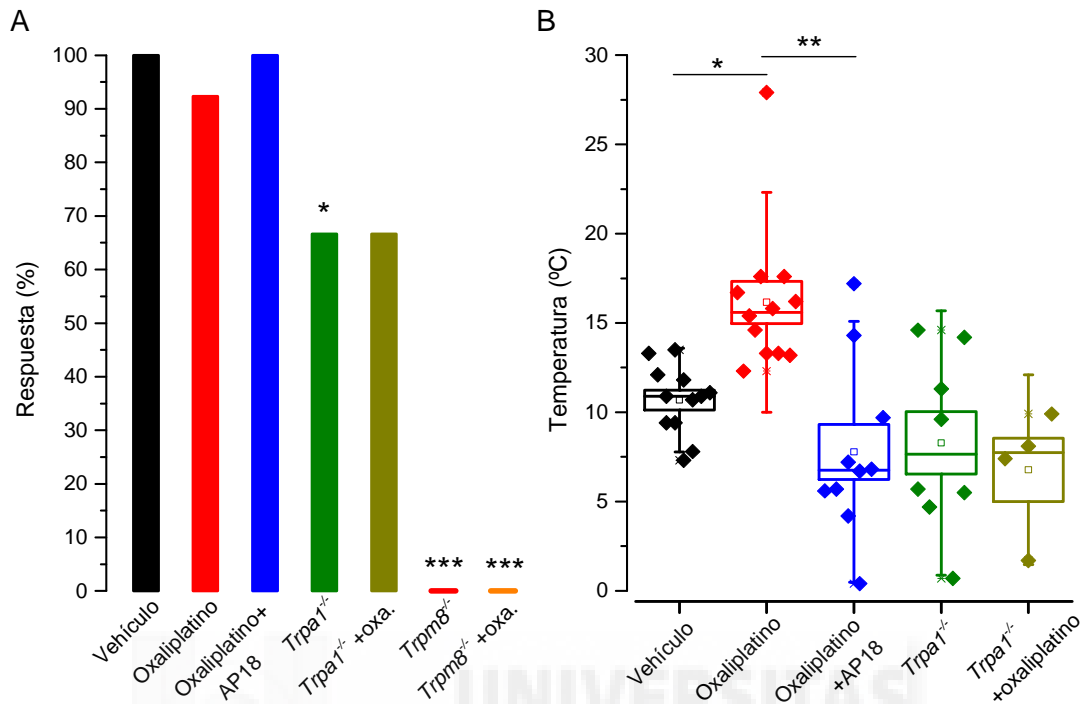


Fig. 4.7a. Efecto del oxaliplatino sobre la tolerancia al enfriamiento. En la figura se muestra A) el porcentaje de respuesta (primera conducta de escape) y B) la temperatura umbral de la placa fría necesaria para inducir dicha respuesta, antes y tres días después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (6 mg/kg), de ratones silvestres, *Trpa1*^{-/-} y *Trpm8*^{-/-}. El AP18 (bloqueante de TRPA1) se administró (i.p. 21 mg/kg) quince minutos antes del ensayo. En B), se expresan los valores individuales y la media \pm SEM (rectángulos) y la desviación estándar (barras). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$; Chi cuadrado para (A) y ANOVA y Bonferroni para (B). (Vehículo n=12; oxaliplatino n=13; oxaliplatino + AP18 n=10; *Trpa1*^{-/-} n=12; *Trpa1*^{-/-} + oxaliplatino n=6; *Trpm8*^{-/-} n=12; *Trpm8*^{-/-} + oxaliplatino n=6).

4.8. Efecto del oxaliplatino sobre las respuestas evocadas por el enfriamiento con hielo seco.

Los resultados previos sugieren que tanto TRPA1 como TRPM8 participan en las respuestas exacerbadas a estímulos de frío inducidas por la administración del agente quimioterapéutico. Para intentar delinear mejor el rol que juega cada uno, se empleó nuevamente la técnica conductual del enfriamiento con hielo seco (Brenner et al 2012). Utilizando esta método, se pudo observar que el pretratamiento con oxaliplatino (6 mg/kg; i.p.) de los ratones silvestres tres días antes del ensayo, produjo una disminución en la latencia de retirada de la pata de ~46 % ($3,1 \pm 0,1$ s; $p < 0,001$) así como un incremento en la temperatura teórica del cristal ($22,5 \pm 0,1$ °C; $p < 0,001$) (Fig. 4.8a). Por el contrario, el pretratamiento con el oxaliplatino de los ratones *Trpa1*^{-/-}, no produjo cambios significativos ni en la latencia ni en la temperatura teórica en comparación con sus valores iniciales ($p = 0,8$) (Fig. 4.8a). La administración intraperitoneal de oxaliplatino (6 mg/kg; i.p.) tres días antes del ensayo, produjo en los ratones *Trpm8*^{-/-} una disminución significativa de ~27 % ($p < 0,001$) en la latencia así como en la temperatura teórica del cristal ($p < 0,001$) con respecto a sus valores basales (Fig. 4.8a).

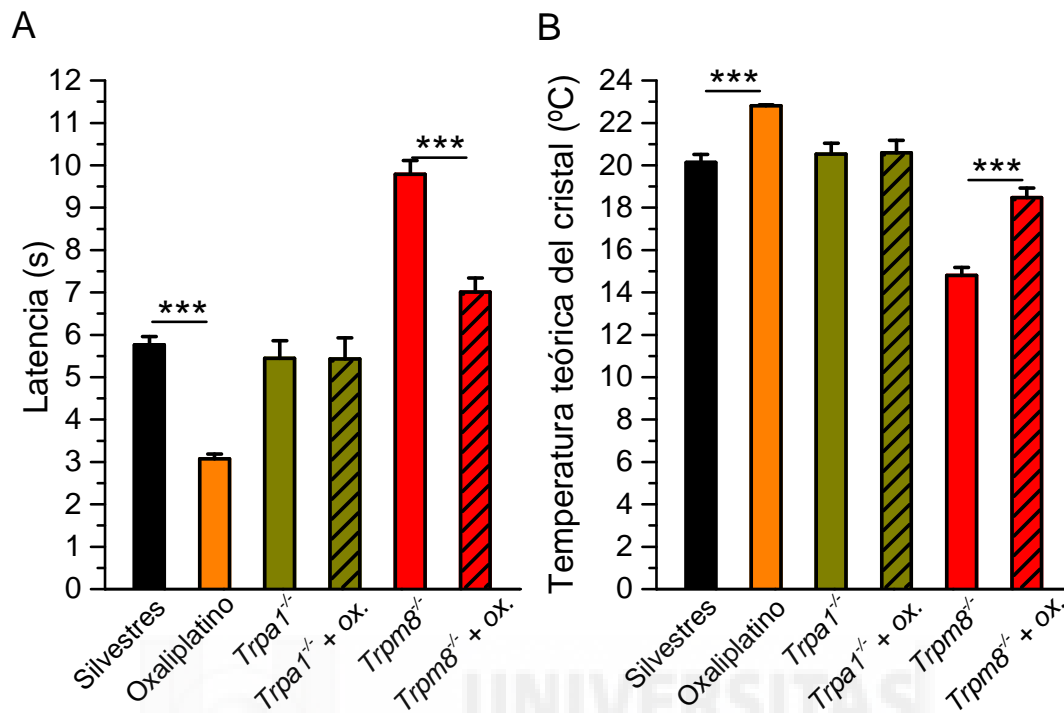


Fig. 4.8a. Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad al estímulo de frío con hielo seco. En la figura se muestra la latencia de retirada de la pata trasera (A) y la temperatura teórica del cristal al momento de la retirada (B) tras la estimulación con la sonda de hielo seco en ratones silvestres, *Trpa1*^{-/-} y *Trpm8*^{-/-}, antes y después del tratamiento con oxaliplatino (ox.) (6 mg/kg; i.p.). Los valores son expresados como la media \pm SEM. *** $p < 0,001$; ANOVA y Bonferroni. (Silvestres $n=12$; *Trpa1*^{-/-} $n=9$; *Trpm8*^{-/-} $n=9$; *Trpm8*^{-/-} + ox. $n=6$).

Estos resultados sugieren, en consonancia con los datos mostrados anteriormente, que el canal iónico TRPA1 es necesario y suficiente para el desarrollo de la hipersensibilidad al frío inducida por la administración de oxaliplatino (6 mg/kg; i.p.). A pesar de que el canal iónico TRPM8 no es necesario para el desarrollo de dicha hipersensibilidad, este media gran parte de las respuestas exacerbadas al enfriamiento con hielo seco (considerado nocivo) en la neuropatía inducida por el oxaliplatino.

4.9. Papel de las neuronas que expresan el canal iónico termosensible TRPM8 sobre la hipersensibilidad al frío inducida por oxaliplatino.

Los datos mostrados en este trabajo y en varios estudios previos sugieren con bastante claridad que, a diferencia de lo que se creía inicialmente, el canal iónico TRPM8 posee un rol muy importante en la sensación de frío nocivo además de su papel bien establecido en la detección del frío inocuo (Knowlton et al 2010, Knowlton et al 2011, Knowlton et al 2013). Así, observamos que las sensibilidades basales de los ratones *Trpm8*^{-/-} al enfriamiento evaporativo (considerado como inocuo) y al enfriamiento con hielo seco (considerado nocivo), se encuentran notablemente disminuidas con respecto a los animales silvestres. Esto sugiere que la sensibilidad remanente observada en dichos animales está mediada por al menos otro sensor de frío a nivel periférico. Para intentar discernir si este sensor, o sensores, se localiza(n) en las neuronas TRPM8 positivas, se emplearon nuevamente los ratones *Trpm8DTR*⁺, los cuales, a modo de recordatorio, expresan el receptor de la toxina diftérica en las neuronas donde se expresa el canal iónico TRPM8 (Pogorzala et al 2013). En primera instancia, se evaluó el efecto de la ablación de las estas neuronas mediante la administración de toxina diftérica (DT) sobre la sensibilidad al enfriamiento con hielo seco. Antes de la administración de DT, no se apreciaron diferencias significativas entre los animales carentes del receptor de toxina diftérica (*Trpm8DTR*) y aquellos que si lo poseen (*Trpm8DTR*⁺) (Fig. 4.14a). Posterior a la administración de DT, se apreció un incremento significativo en la latencia y en la temperatura teórica del cristal únicamente en los ratones *Trpm8DTR*⁺ ($p < 0,001$) (Fig. 4.9a).

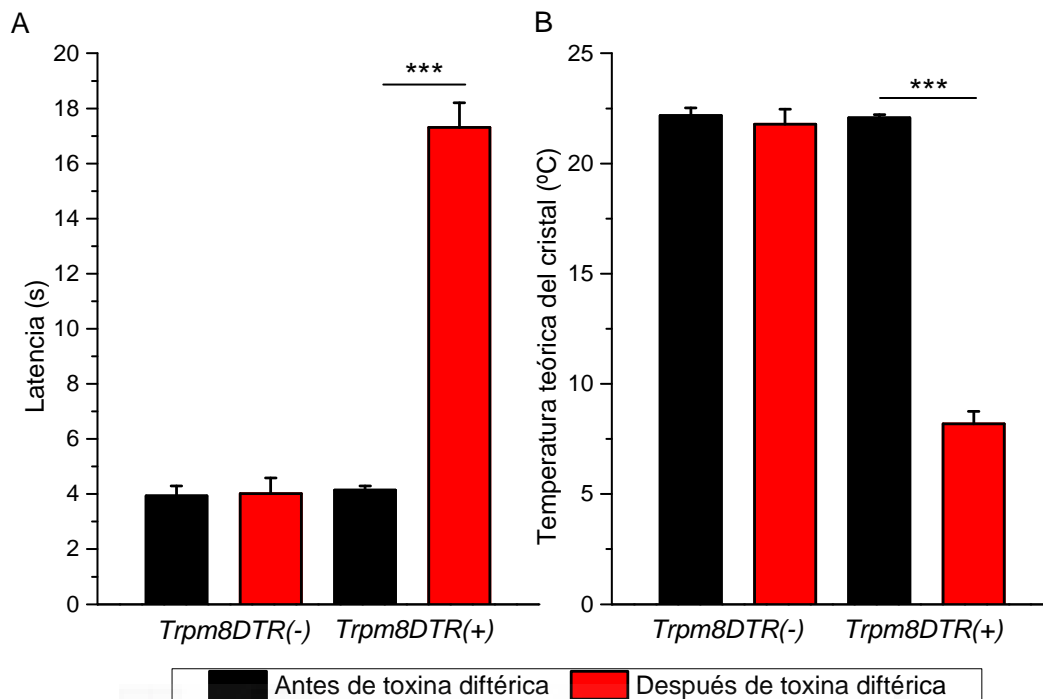


Fig. 4.9a. Efecto de la ablación de neuronas TRPM8 positivas sobre la sensibilidad al estímulo de frío con hielo seco. En la figura se muestra la latencia de retirada de la pata trasera (A) y la temperatura teórica del cristal al momento de la retirada (B) tras la estimulación con la sonda de hielo seco en ratones *Trpm8DTR* y *Trpm8DTR*⁺, antes y siete días después de la administración i.p. de toxina diftérica. Los valores son expresados como la media \pm SEM. *** $p < 0,001$; prueba T de Student pareada. (*Trpm8DTR* n= 7, *Trpm8DTR*⁺ n= 5).

Luego de la ablación de las neuronas TRPM8 positivas, se estudió si el pretratamiento con el oxaliplatino (6 mg/kg; i.p.) 3 días antes del ensayo, era capaz de afectar la sensibilidad al estímulo de frío con hielo seco. Con este tratamiento, los ratones *Trpm8DTR* sufrieron una disminución significativa en la latencia (de $4,01 \pm 0,6$ s a $2,7 \pm 0,2$ s; $p=0,02$) y en la temperatura teórica del cristal (de $21,8 \pm 0,7$ °C a $22,9 \pm 0,06$ °C; $p=0,047$) (Fig. 4.9b). Cuando se estudiaron los *Trpm8DTR*⁺, se observó que la administración de oxaliplatino produjo una disminución dramática en la latencia (de $17,3 \pm 0,9$ s a $9,2 \pm 2,6$ s; $p=0,017$) así como en la temperatura teórica del cristal (de $8,2 \pm 0,6$ °C a $16,2 \pm 2,8$ °C; $p=0,027$) (Fig. 4.9b).

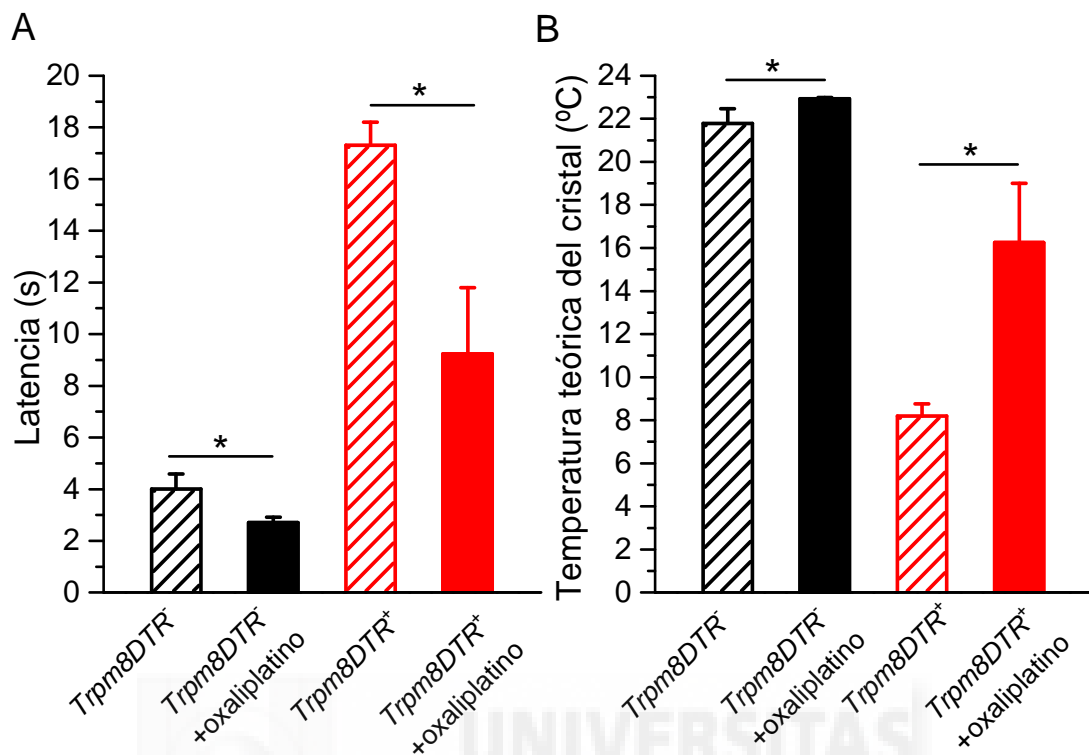


Fig. 4.9b. Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad al estímulo de frío con hielo seco de ratones carentes de neuronas TRPM8 positivas. En la figura se muestra la latencia de retirada de la pata trasera (A) y la temperatura teórica del cristal al momento de la retirada (B) tras la estimulación con la sonda de hielo seco en ratones *Trpm8DTR^{-/-}* y *Trpm8DTR^{+/+}*, antes y tres días después de la administración i.p. de oxaliplatino (6 mg/kg). Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; prueba T de Student pareada. (*Trpm8DTR^{-/-}* n= 7, *Trpm8DTR^{+/+}* n= 5).

Estos datos sugieren que ni el canal iónico TRPM8 ni las neuronas que lo expresan son necesarias para el desarrollo de la hipersensibilidad al frío inducida por la administración de oxaliplatino.

4.10. Efecto del oxaliplatino sobre las respuestas nocid defensivas evocadas por icilina.

La 3,4-Dihidro-3-(2-hidroxifenil)-6-(3-nitrofenil)-(1-H)-pirimidin-2-ona, o icilina (también conocida en la literatura como AG-3-5), es un compuesto sintético que produce una intensa sensación de frío tanto en animales como en humanos (Wei & Seid 1983). Estudios posteriores, realizados sobre canales expresados de forma heteróloga, demostraron que la icilina actúa como agonista del canal TRPM8 (Andersson et al 2004, McKemy et al 2002) y del canal TRPA1 (Story et al 2003). Sin embargo, los datos de experimentos *in vivo* sugieren que las distintas respuestas conductuales evocadas por la icilina son mediados por el canal TRPM8. Así, cuando este compuesto es administrado sistémicamente (i.p.) en ratas y ratones, produce repuestas conductuales que se asemejan al movimiento que realizan los perros para secarse, recibiendo el nombre de sacudidas de perro mojado (“wet dog shake” o WDS por sus siglas en inglés) (Dhaka et al 2007). Este tipo de conducta, considerada como una respuesta termogénica, y que involucra mecanismos que no están asociados a la nocicepción no se produce en animales deficientes en TRPM8 (Knowlton et al 2010). Adicionalmente, cuando se administrada de forma intraplantar, la icilina produce efectos dependientes del TRPM8 como la hipersensibilidad al frío (Gentry et al 2010) y el encogimiento de la pata inyectada (considerada como respuesta nocid defensiva) (Knowlton et al 2010).

Bajo la premisa de que la actividad del canal TRPM8 es necesaria y suficiente para la generación de respuestas nocid defensivas evocadas por la administración intraplantar de icilina (Knowlton et al 2010), se empleó esta herramienta farmacológica para intentar dilucidar el papel del TRPM8 y del TRPA1 en la hipersensibilidad al frío producida por la administración intraperitoneal de oxaliplatino. La inyección intraplantar de icilina (1,5 mg/ml; 10 μ l) provocó la aparición de respuestas nocid defensivas que alcanzaron un

valor máximo a los cinco minutos posteriores a su inyección, disminuyendo con el tiempo hasta alcanzar un mínimo a los veinte minutos (Fig. 4.10a-A). Tras la inyección intraplantar de icilina, no se observaron diferencias ni en el curso temporal ni en las respuestas nocidefensivas totales entre los ratones silvestres, silvestres pretratados con AP18 (21 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes del ensayo, *Trpa1*^{-/-} y, sorprendentemente, *Trpm8*^{-/-} (Fig. 4.10a-A). Cuando los ratones silvestres fueron pretratados con oxaliplatino (6 mg/kg; i.p.) tres días antes del ensayo, se observó un incremento significativo en las respuestas nocidefensivas inducidas por la icilina durante los primeros cinco minutos ($p=0,036$) y en las respuestas nocidefensivas totales ($p=0,005$) (Fig. 4.10a-B y C).

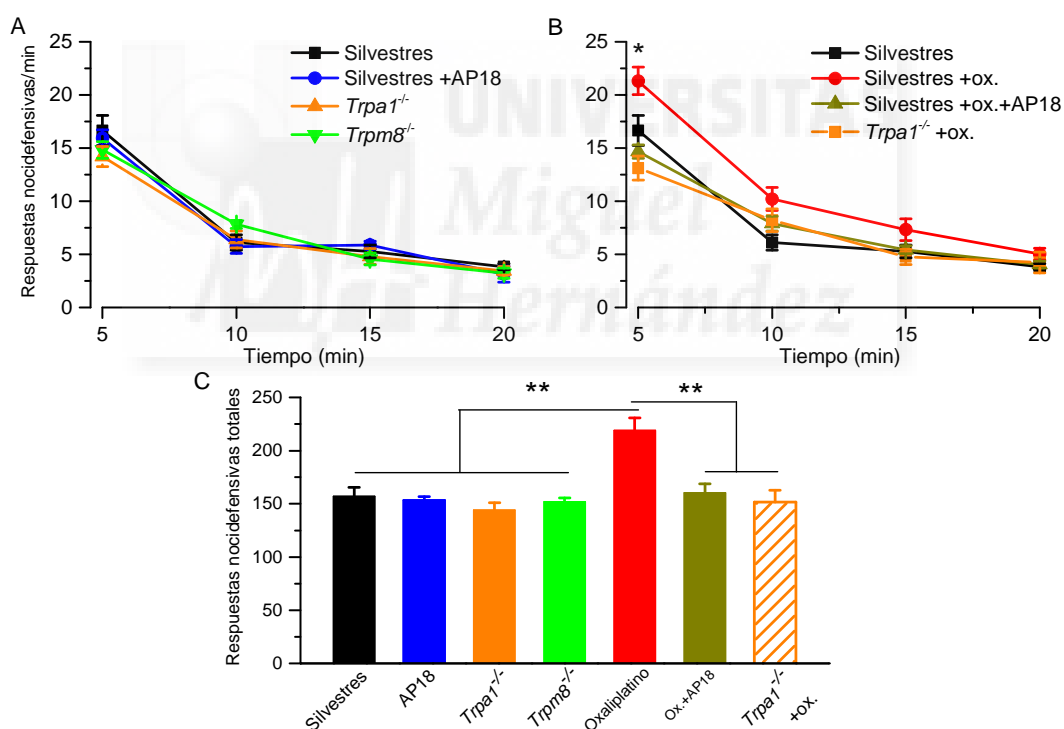


Fig. 4.10a. Respuestas nocidefensivas evocadas por la icilina. En la figura se muestra el curso temporal (paneles A y B) y el total (panel C) de las respuestas nocidefensivas (sacudidas, lamidas, mordidas) producidas por la administración intraplantar de icilina 1,5 mg/ml (10 μ l), tres días después de la administración i.p. de solución vehículo u oxaliplatino (ox.) (6 mg/kg). En los casos indicados, el bloqueante del TRPA1 (AP18, 21 mg/kg; i.p.) se administró 30 minutos antes del ensayo. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; ANOVA y Bonferroni. (Silvestres $n=6$; AP18 $n=3$; *Trpa1*^{-/-} $n=4$; *Trpm8*^{-/-} $n=8$; Oxaliplatino $n=8$; Ox+AP18 $n=8$; *Trpa1*^{-/-} +ox. $n=7$).

Este incremento no se observó ni en los ratones silvestres cuando recibieron AP18 (21 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes del ensayo ni en los ratones *Trpa1*^{-/-} (Fig. 4.10a-B y C). Estos datos podrían sugerir en primera instancia que las respuestas nocid defensivas evocadas por la inyección intraplantar de icilina no son específicas del canal iónico TRPM8. Aunque estos datos sugieren que dichas respuestas tampoco son específicas del TRPA1 en condiciones fisiológicas, la ausencia de este canal o su inhibición, resultan suficientes para prevenir el desarrollo de respuestas exacerbadas a la icilina como consecuencia del pretratamiento con oxaliplatino.



4.11. Efecto del oxaliplatino sobre el sistema trigeminal

Hasta ahora, todos los trabajos donde se han estudiado los efectos neuropáticos del oxaliplatino en mamíferos se han basado exclusivamente en el estudio de las respuestas evocadas a estímulos de frío mediadas por neuronas localizadas en los ganglios raquídeos (Descoeur et al 2011, Deuis et al 2013, Joseph et al 2008, Knowlton et al 2011, Ling et al 2007a, Ling et al 2007b, Nassini et al 2011). Sin embargo, uno de los síntomas más comunes y con gran impacto negativo sobre la calidad de vida de los pacientes bajo tratamiento con oxaliplatino es el dolor orofacial, el cual está mediado por el sistema trigeminal (Bennett et al 2012, Wilson et al 2002).

Para evaluar cambios en el umbral doloroso mediado por el sistema trigeminal, se utiliza con frecuencia el test de limpieza ocular. En este test, se aplica un agente nocivo sobre la superficie ocular y se cuantifican los frotamientos que realiza el ratón con su pata delantera ipsilateral sobre dicho ojo (Farazifard et al 2005). La aplicación de 10 μ l de solución vehículo (3,2 % DMSO en NaCl 0,9 %) a temperatura ambiente (22 °C) sobre la superficie ocular de ratones silvestres, produjo la aparición de frotamientos oculares, alcanzando un valor promedio de $4,8 \pm 0,5$ (Fig. 4.11a-A). Al examinar la sensibilidad de los ratones *Trpa1*^{-/-} y *Trpm8*^{-/-} al mismo estímulo, se observó que los frotamientos tendieron a disminuir pero los cambios no fueron estadísticamente significativos con respecto a los silvestres (*Trpa1*^{-/-} $3,0 \pm 0,4$; $p=0,25$ y *Trpm8*^{-/-} $2,9 \pm 0,6$; $p=0,21$) (Fig. 4.11a-A). Tanto en los ratones silvestres como en los *Trpa1*^{-/-}, la aplicación de 10 μ l de icilina (10 μ g/ml) a temperatura ambiente (22 °C) sobre la superficie ocular, produjo un incremento significativo en los frotamientos oculares en comparación con la solución vehículo. Por el contrario, la aplicación del mismo estímulo no produjo cambios significativos en los ratones *Trpm8*^{-/-} (Fig. 4.11a-A). Para poder comparar la sensibilidad a la icilina entre los distintos genotipos, se normalizaron las respuestas a icilina con respecto a las respuestas producidas por el vehículo. Se pudo observar entonces que el efecto de la

aplicación de 10 μ l de icilina (10 μ g/ml) a temperatura ambiente sobre la superficie ocular produjo un efecto similar en los ratones silvestres y *Trpa1*^{-/-} (Fig. 4.11a-B). En contraste, se pudo observar que la aplicación icilina en los ratones *Trpm8*^{-/-} tuvo un efecto significativamente inferior en comparación con los ratones silvestres (Fig. 4.11a-B).

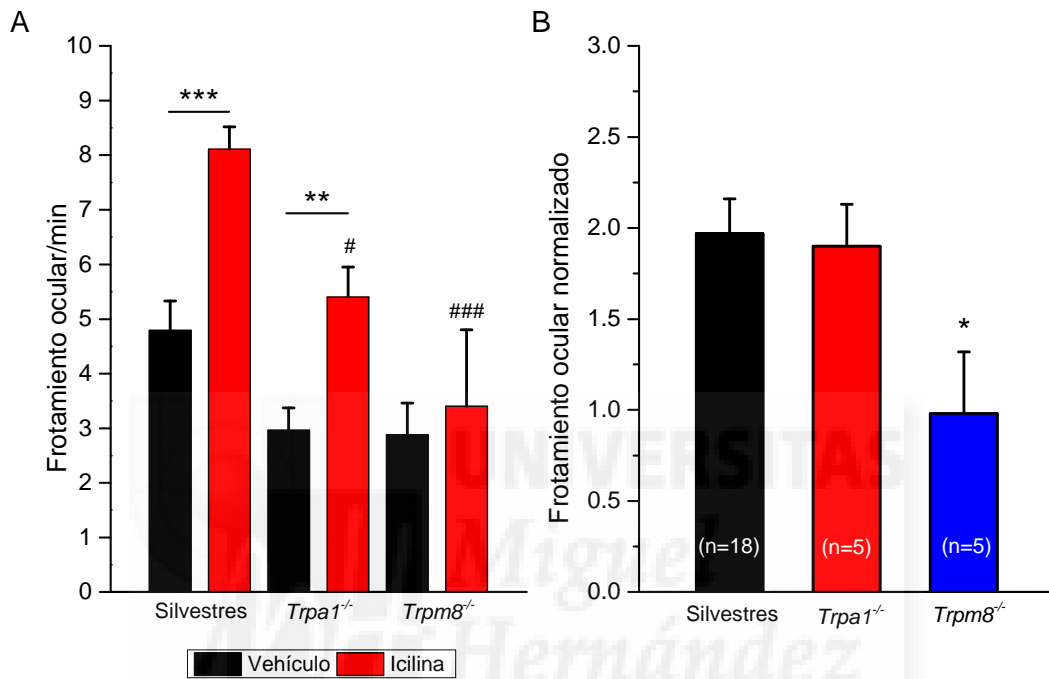


Fig. 4.11a. Sensibilidad ocular a la icilina. En la figura se muestra (A) el número de frotamientos oculares por minuto evocados por la aplicación de una gota (10 μ l) de solución vehículo (3,2 % DMSO en NaCl 0,9 %) o de icilina (10 μ g/ml), y (B) la normalización de las respuestas a icilina con respecto a las respuestas a solución vehículo. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. En A) (*) vehículo versus icilina, (#) condición versus equivalente en los ratones silvestres; en B) (*) versus silvestres. Un símbolo $p < 0,05$, doble símbolo $p < 0,01$ y triple símbolo $p < 0,001$; T de Student pareada (en panel A) y ANOVA + Bonferroni. (Silvestres $n=18$; *Trpa1*^{-/-} $n=5$; *Trpm8*^{-/-} $n=5$).

Una vez estudiada la sensibilidad basal a la aplicación ocular de la icilina, se estudió si la neuropatía inducida por el oxaliplatino era capaz de alterar dichas respuestas. Se observó que el pretratamiento de ratones silvestres con oxaliplatino (6 mg/kg; i.p.) tres días antes del ensayo, no produjo diferencias sobre la sensibilidad ocular tanto a solución vehículo (3,2 % DMSO en 0,9 % NaCl) como a la icilina (10 μ g/ml) (Fig. 4.11b).

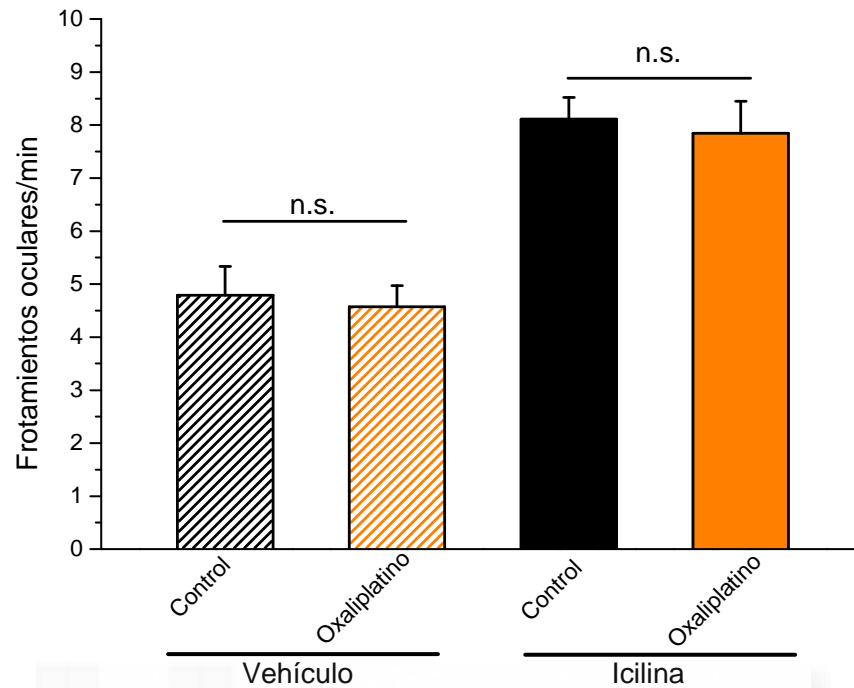


Fig. 4.11b. Efecto del oxaliplatino sobre la sensibilidad ocular a la icilina. En la figura se muestran el número de frotamientos oculares evocadas por la aplicación de una gota (10 μ l) de solución vehículo (3,2 % DMSO en NaCl 0,9 %) o de icilina (10 μ g/ml), antes y tres días después del pretratamiento con oxaliplatino (6 mg/kg; i.p.). Los valores son mostrados como la media \pm SEM. (Silvestres n=18).

Por tanto, estos resultados podrían sugerir que las respuestas de frotamiento ocular evocadas por la aplicación de icilina son mediadas principalmente por el canal TRPM8. Asimismo, estas respuestas no parecieran verse afectadas por el pretratamiento con oxaliplatino.

4.12. Efecto preventivo de la Acetil-L-Carnitina (ALCAR) sobre la sensibilización térmica y mecánica inducida por el oxaliplatino.

La Acetil-L-carnitina (ALCAR) es la forma acetilada del aminoácido L-carnitina, el cual participa en el transporte de ácidos grasos desde el citoplasma hacia las mitocondrias durante la β -oxidación. Además, distintos trabajos han mostrado que la ALCAR actúa como agente “fagocitador” de radicales libres que le confiere un efecto neuroprotector en distintas patologías, incluido el dolor neuropático (Chiechio et al 2006, De Grandis 2007, Ribas et al 2014).

Dado que existen datos previos, en modelos murinos, que implican al estrés oxidativo entre las causas implicadas en el desarrollo de los síntomas neuropáticos inducidos por la administración de oxaliplatino (Joseph et al 2008, Toyama et al 2014), se estudió el posible efecto preventivo de la ALCAR sobre la sensibilización, tanto a estímulos mecánicos como de frío, inducida por el oxaliplatino.

De acuerdo con los datos descritos anteriormente, el oxaliplatino produjo un incremento significativo en el número de respuestas producidas por el enfriamiento evaporativo a partir del tercer día posterior a su administración (Fig. 4.11a). Se pudo observar como el pretratamiento con una única dosis de ALCAR (50, 150 o 250 mg/kg) por vía oral un día antes de la administración de oxaliplatino, produjo un importante efecto preventivo, sobre las respuestas exacerbadas a la aplicación de acetona (Fig. 4.11 a).

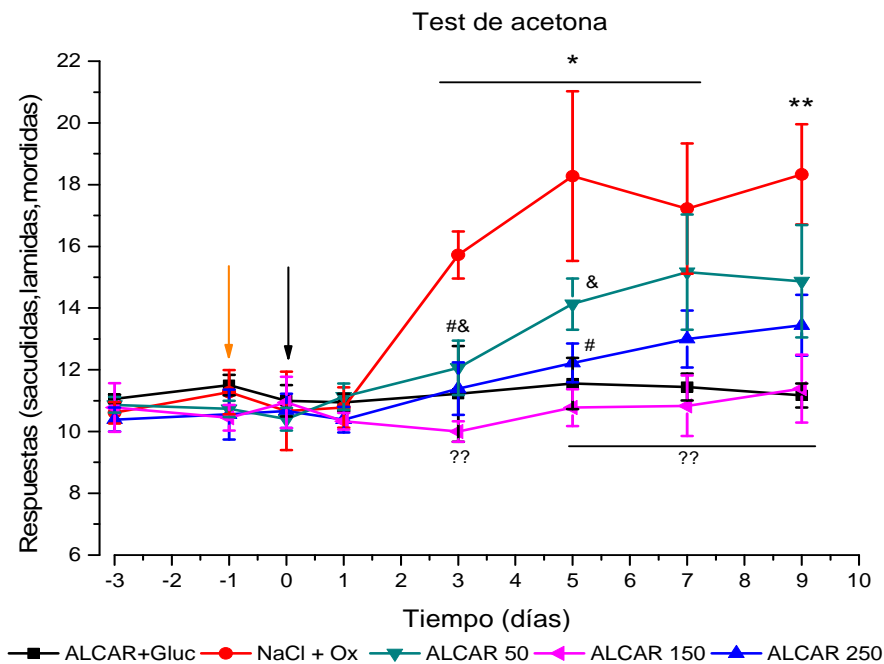


Fig. 4.12a. Efecto preventivo de la Acetil-L-carnitina (ALCAR) sobre la hipersensibilidad al enfriamiento evaporativo de la acetona inducida por oxaliplatino. En la figura se muestra el número de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo en ratones silvestres antes y después de la administración p.o. de distintas dosis de ALCAR (flecha naranja) e i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg) (flecha negra). Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) Oxaliplatino vs vehículo; (#) ALCAR 250 mg/kg, (?) ALCAR 150 mg/kg y (&) ALCAR 50 mg/kg vs 0,9 % NaCl. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA y Bonferroni. (n=6 por grupo).

Posteriormente, se examinó si la ALCAR podría afectar la tolerancia al enfriamiento. Mediante esta técnica, y en concordancia con lo descrito previamente, se observó que el pretratamiento de ratones silvestres con oxaliplatino (3 mg/kg; i.p.) tres días antes del ensayo, produjo un descenso significativo del umbral doloroso hacia temperaturas más elevadas (Fig. 4.12b). Este efecto fue bloqueado mediante el pre-tratamiento (en otro grupo de ratones silvestres) con la dosis más eficiente de ALCAR observada en el ensayo anterior (150 mg/kg, oral), un día antes de la inyección de oxaliplatino (Fig. 4.12b).

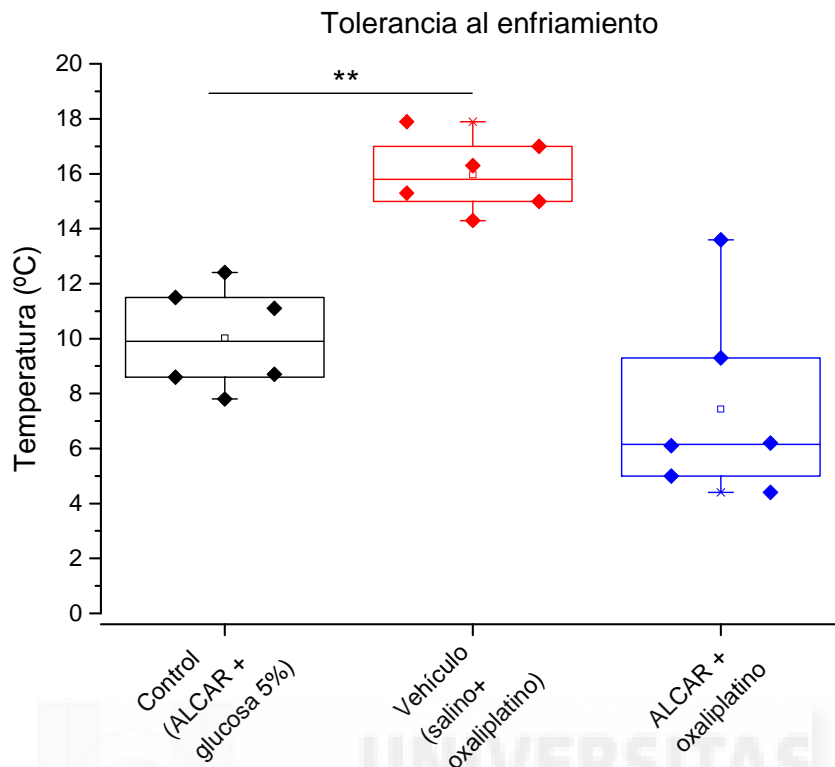


Fig. 4.12b. Efecto preventivo de la Acetil-L-carnitina (ALCAR) sobre la tolerancia al frío de ratones tratados con oxaliplatino. En la figura se muestra el umbral de temperatura a la cual los ratones silvestres muestran una respuesta de escape (salto) luego del tratamiento con ALCAR (150 mg/kg; p.o.), tres días después de oxaliplatino (3 mg/kg; i.p.) y tras la combinación de ALCAR + oxaliplatino (cuatro y tres días después, respectivamente). Los valores son expresados como la media \pm SEM (rectángulo) y la desviación estándar (barras). ** $p < 0,01$; ANOVA y Bonferroni. (n=6).

En los mismos animales en los que se examinó la sensibilidad al enfriamiento evaporativo, se estudió si la ALCAR tuvo también efectos sobre la sensibilidad mecánica (Fig. 4.12c). Así, se observó que la administración de oxaliplatino en animales pretratados con solución vehículo desarrollaron alodinia mecánica que se evidenció como una disminución en el umbral mecánico del $\sim 48\%$, a partir del quinto día posterior a la administración del fármaco (Fig. 4.12c). El tratamiento oral con ALCAR por sí solo no produjo ningún efecto sobre el umbral mecánico basal a ninguna de las dosis probadas (Fig. 4.12c). Sin embargo, el tratamiento oral con ALCAR a las tres dosis ensayadas (50, 150 y 250 mg/kg) un día antes de la administración del oxaliplatino, previno (o retrasó en el caso de la dosis de 50 mg/kg) el desarrollo de la alodinia mecánica durante todo el ensayo (Fig. 4.12c).

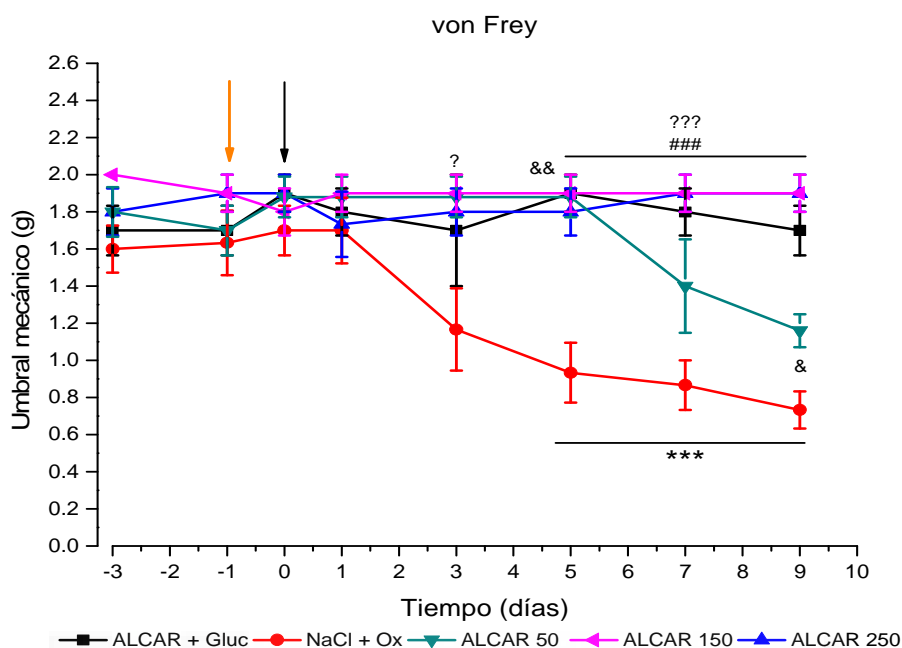


Fig. 4.12c. Efecto preventivo de la Acetil-L-carnitina (ALCAR) sobre la alodinia mecánica inducida por oxaliplatino. En la figura se muestra el umbral de fuerza a la cual los animales retiran la pata trasera estimulada con un filamento von Frey antes y después de la administración p.o. de distintas dosis de ALCAR (flecha naranja) e i.p. de oxaliplatino (3 mg/kg) (flecha negra). Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) Oxaliplatino versus vehículo; (#) ALCAR 250 mg/kg, (?) ALCAR 150 mg/kg y (&) ALCAR 50 mg/kg versus 0,9 % NaCl. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA y Bonferroni. (n=6 por grupo).

4.13. Papel del canal iónico TRPM8 en la termorregulación.

Debido a que el canal iónico TRPM8 está involucrado en la sensación de frío, se estudió si este canal también participa en los procesos de termorregulación, ya que las vías aferentes que utilizan ambos procesos homeostáticos dentro del SNC son diferentes. Para ello, se utilizaron ratones silvestres, ratones carentes del canal iónico TRPM8 (*Trpm8*^{-/-}) y ratones que expresan el receptor de toxina diftérica en las neuronas que sintetizan el TRPM8 (*Trpm8DTR*⁺). Con el fin de estudiar el papel del TRPM8 en los mecanismos termorreguladores, estos animales fueron sometidos a dos situaciones que inducen la activación del sistema termorregulador: el frío ambiental y la depleción energética (ayuno).

4.13.1. Frío ambiental

Para estudiar la respuesta termorreguladora producida por el frío, se registró cada 30 segundos la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de los ratones expuestos durante 5-7 días a distintas temperaturas ambientales (T_a), con libre acceso al agua y la comida y ciclos de luz/oscuridad (12:12). Se utilizaron tres temperaturas ambiente: 29 °C durante 7 días (límite inferior del intervalo de termoneutralidad), 21 °C durante 7 días (temperatura habitual de estabulación) y 17 °C durante 5 días (frío moderado). Los registros de T_i y A_m fueron representados en intervalos de 30 minutos durante 7 días para estudiar estas variables de forma cualitativa. Tal y como ha sido descrito en la literatura, los registros de la T_i describen una curva semejante a una función sinusoidal, por lo que estos datos pudieron ser ajustados a dicha función para realizar un análisis ritmométrico (Cornelissen 2014, Nagashima et al 2003). Esto permitió calcular los distintos parámetros inherentes a los ciclos como la temperatura media (mesor), la amplitud, la acrofase (tiempo estimado en la curva sinusoidal desde el inicio de la fase diurna hasta cuando se alcanza el pico máximo) y el período. Para estudiar de forma más detallada las variaciones

de la T_i y la A_m durante las fases diurna y nocturna, se realizó el análisis longitudinal-transversal y los datos fueron representados en intervalos de 15 minutos (ver Métodos).

En los ratones expuestos a 29 °C de temperatura ambiente, se observaron las oscilaciones circadianas típicas de la T_i y la A_m , las cuales están alineadas con el ciclo de luz/oscuridad (Fig. 4.13.1a). Estas oscilaciones consisten en la disminución tanto de la T_i como de la A_m durante la fase diurna, seguido de un marcado incremento de los niveles de ambas variables durante la fase nocturna (Fig. 4.13.1a). En la figura 4.13.1a se muestra un ejemplo de los registros individuales de tres ratones silvestres, para demostrar las escasas variaciones interindividuales que existen dentro de un mismo grupo experimental.

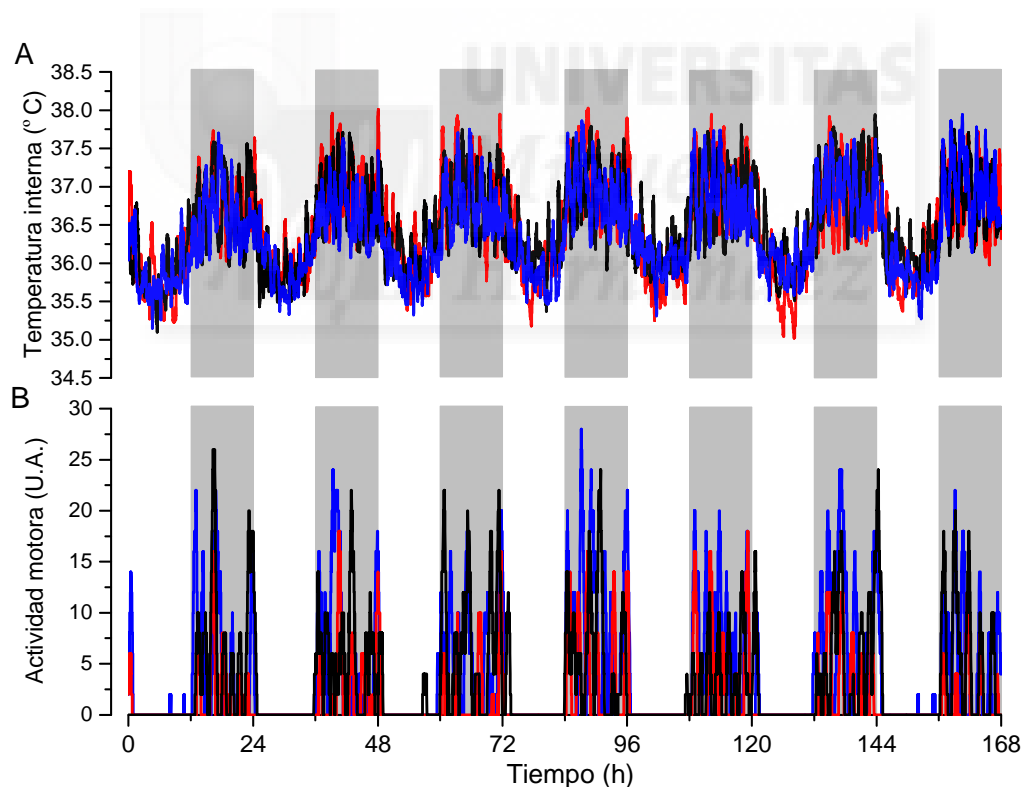


Fig. 4.13.1a. Ejemplos de registros individuales de temperatura corporal interna (T_i) y actividad motora (A_m) de ratones silvestres expuestos a 29 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestran los registros individuales cada 30 segundos de la T_i (A) y de la A_m (B) de tres ratones silvestres a lo largo de 7 días a 29 °C, con ciclos de luz/oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*. Las barras grises representan la fase nocturna.

Posteriormente, se compararon la T_i y la A_m de los ratones silvestres con las de los ratones $Trpm8^{-/-}$. A nivel cualitativo, no se apreciaron diferencias importantes en los registros de T_i y A_m entre ambos genotipos (Fig. 4.13.1b). Como se puede apreciar en la Tabla 4.13.1a, no se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre los ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$ a una temperatura ambiental de 29 °C.

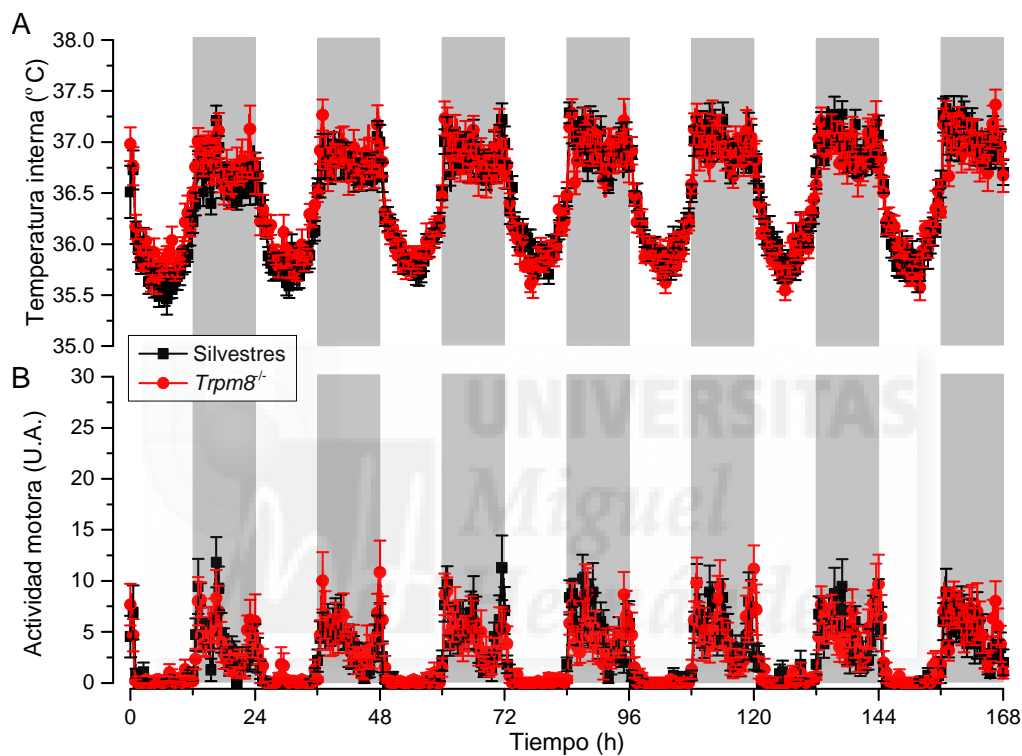


Fig. 4.13.1b. Registro de la temperatura corporal interna (T_i) y de la actividad motora (A_m) de ratones expuestos a 29 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el registro cada 30 minutos de la T_i (A) y la A_m (B) de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$ a lo largo de 7 días, a 29 °C con ciclos de luz/oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*. Los valores son mostrados como la media \pm SEM (Silvestres n=11, $Trpm8^{-/-}$ n=12).

| Parámetro | Silvestres | <i>Trpm8</i> ^{-/-} | <i>p</i> |
|---------------|-------------|-----------------------------|----------|
| Mesor (°C) | 36,4 ± 0,05 | 36,5 ± 0,05 | 0,73 |
| Amplitud (°C) | 0,6 ± 0,02 | 0,6 ± 0,04 | 0,58 |
| Acrofase (h) | 17,8 ± 0,1 | 17,7 ± 0,2 | 0,53 |
| Período (h) | 24,0 ± 0,03 | 24,0 ± 0,02 | 0,33 |

Tabla. 4.13.1a. Análisis de ritmometría de los cambios diarios en la temperatura corporal interna de ratones expuestos a 29 °C de temperatura ambiente. Los valores son mostrados como la media ± SEM. Prueba T de Student no pareada. (Silvestres n=11, *Trpm8*^{-/-} n=12).

Mediante el análisis longitudinal-transversal se pudo estudiar con más detalle las variaciones que ocurren durante las diferentes horas del día en la T_i y la A_m (Fig. 4.13.1c). Así, se pudo observar en ambos genotipos que la T_i disminuye gradualmente durante el inicio de la fase diurna, hasta alcanzar valores mínimos en la parte media de dicha fase. Posteriormente, los niveles de T_i comienzan a incrementarse hasta alcanzar un pico una hora después del inicio de la fase nocturna de $37,1 \pm 0,1$ °C en los silvestres y de $37,2 \pm 0,1$ °C en los *Trpm8*^{-/-}, manteniéndose relativamente estable durante el resto de la noche (Fig. 4.13.1c-A). Los niveles de actividad motora describen un patrón similar al observado en el registro de la T_i ; es decir, los niveles de A_m son bajos durante la fase diurna y aumentan durante la fase nocturna, donde alcanzan un pico una hora después del inicio de la fase nocturna de $8,5 \pm 1$ U.A. en los ratones silvestres y de $8,5 \pm 1,4$ U.A. en los *Trpm8*^{-/-} (Fig. 4.13.1c-B). Posteriormente, los niveles de actividad descienden pero vuelven a recuperarse los valores en las últimas horas de la fase nocturna (Fig. 4.13.1c-B). Al comparar estadísticamente la T_i y la A_m de los dos genotipos de ratones, no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Fig. 4.13.1c).

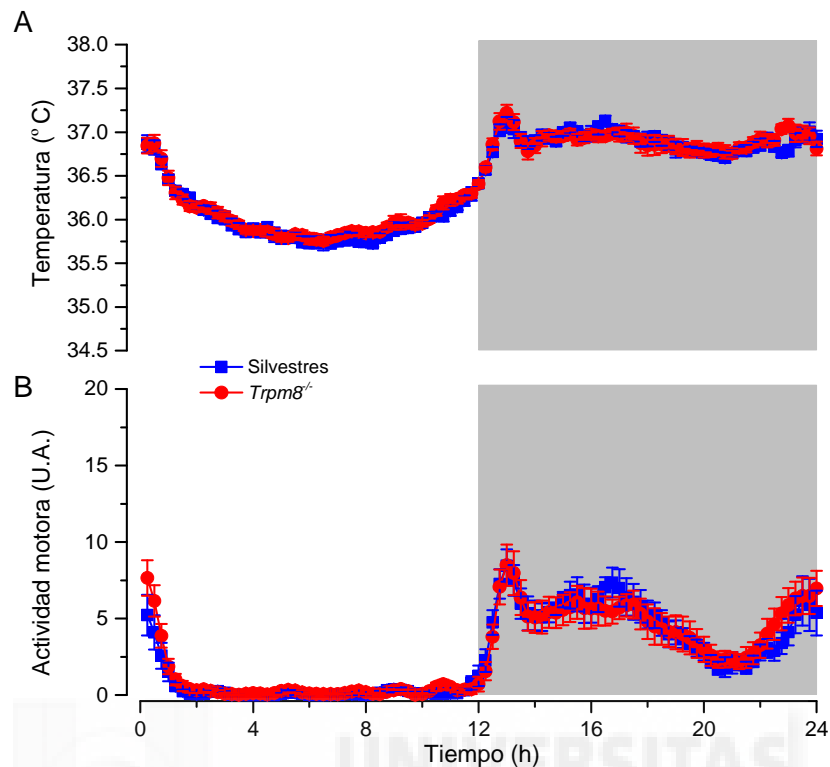


Fig. 4.13.1c. Variación media por día de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) en ratones expuestos a 29 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el promedio del registro de 7 días, representado cada 15 minutos, de la T_i (A) y la A_m (B) de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$. Los valores son expresados como la media \pm SEM. Prueba T de Student no pareada y corrección FDR (Silvestres $n=11$, $Trpm8^{-/-}$ $n=12$).

Estos datos demuestran que a temperaturas ambientales dentro del rango de termoneutralidad (29 °C), la T_i y la A_m no se encuentran alterados en animales carentes del canal iónico TRPM8.

A continuación, se estudió si este canal participa en la termorregulación cuando la temperatura ambiental baja de la zona de termoneutralidad. Se comenzó exponiendo a los ratones a un frío leve de 21 °C, temperatura ambiente normal de estabulación, en la cual se encuentra activo el canal iónico TRPM8. Durante la exposición a esta temperatura, se observaron ciclos normales de T_i y A_m , perfectamente sincronizados con las fases de luz/oscuridad y aparentemente similares entre los dos genotipos estudiados (Fig. 4.13.1d).

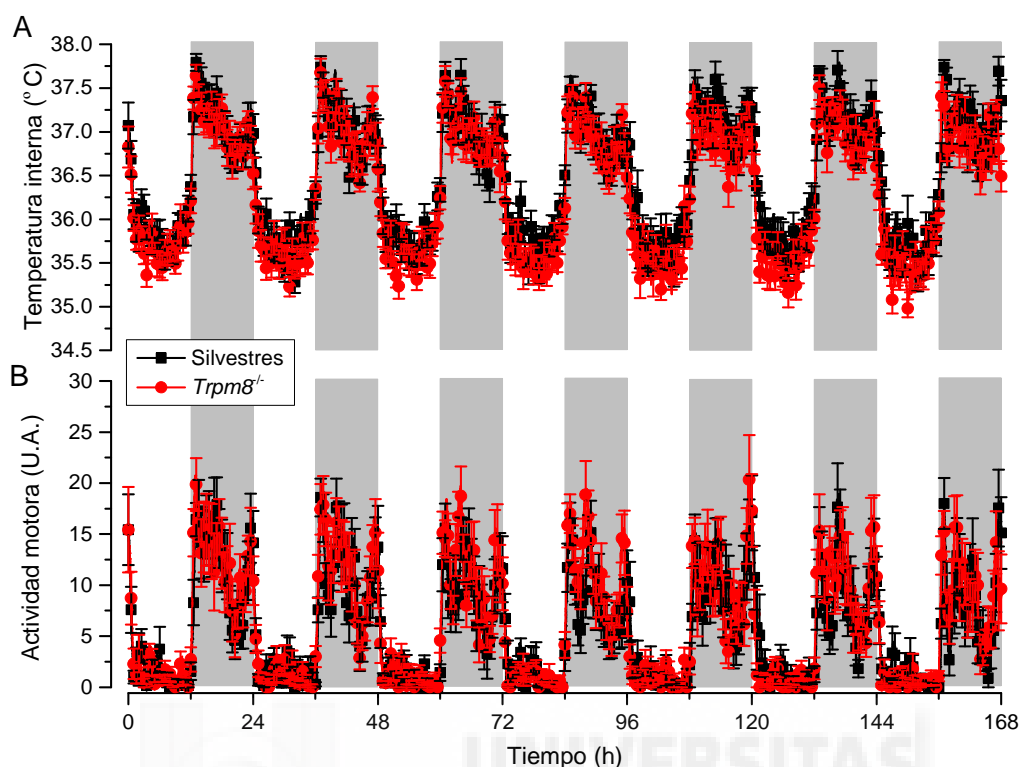


Fig. 4.13.1d. Registro de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el registro de la T_i (A) y la A_m (B), representado cada 30 minutos, de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$ a lo largo de 7 días, a 21 °C con ciclos de luz/oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. (Silvestres $n=14$, $Trpm8^{-/-}$ $n=14$).

El análisis ritmométrico de la T_i , no reveló diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros entre los ratones silvestres y los $Trpm8^{-/-}$ (Tabla 4.13.1b). No obstante, cabe mencionar que los valores del mesor fueron ligeramente inferiores en los ratones $Trpm8^{-/-}$, aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística.

| Parámetro | Silvestres | $Trpm8^{-/-}$ | p |
|---------------|-----------------|-----------------|------|
| Mesor (°C) | 36,4 \pm 0,10 | 36,2 \pm 0,05 | 0,08 |
| Amplitud (°C) | 0,8 \pm 0,03 | 0,9 \pm 0,03 | 0,11 |
| Acrofase (h) | 17,0 \pm 0,2 | 17,2 \pm 0,1 | 0,31 |
| Período (h) | 24,0 \pm 0,1 | 24,0 \pm 0,04 | 0,99 |

Tabla. 4.13.1b. Análisis de ritmometría de los cambios diarios en la temperatura corporal interna de ratones expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. Prueba T de Student no pareada. (Silvestres $n=14$, $Trpm8^{-/-}$ $n=14$).

A pesar de tratarse de una temperatura ambiental por debajo del intervalo de termoneutralidad, la T_i y la A_m de los ratones silvestres y los $Trpm8^{-/-}$ fueron similares entre sí (Fig. 4.13.1e). En ambos genotipos, la T_i y la A_m disminuyeron durante la fase diurna, alcanzando valores mínimos durante la parte intermedia de dicha fase. Ambos parámetros (T_i y A_m) se incrementaron durante la fase nocturna, alcanzando picos de $37,6 \pm 0,1$ °C y 16 ± 1 U.A. en los ratones silvestres y de $37,5 \pm 0,1$ °C y $16,4 \pm 1,4$ U.A. en los ratones $Trpm8^{-/-}$ (Fig. 4.13.1e). Hacia el final de la fase nocturna, se observó el descenso de la T_i y de la A_m , alcanzando valores mínimos de $36,7 \pm 0,1$ °C y $3,9 \pm 0,8$ U.A. en el grupo silvestre y de $36,7 \pm 0,1$ °C y $5,1 \pm 1$ U.A. en el grupo $Trpm8^{-/-}$. Este descenso fue seguido de la recuperación en los niveles de ambos parámetros antes del final de la fase nocturna (Fig. 4.13.1e).

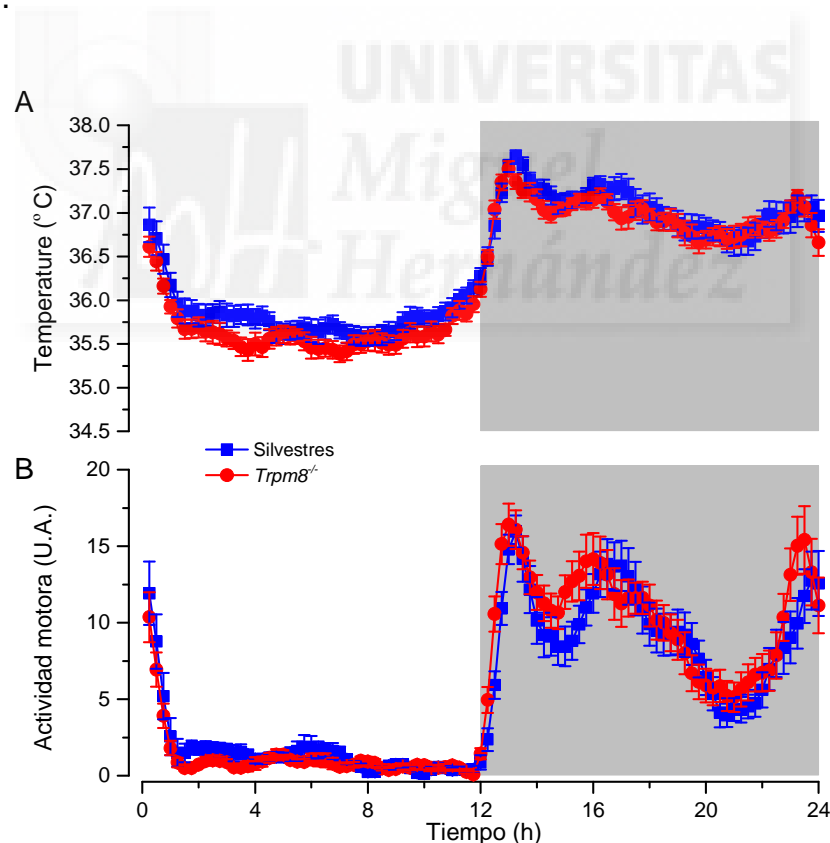


Fig. 4.13.1e. Variación media diaria de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el promedio de 7 días, representado cada 15 minutos, de la T_i (A) y la A_m (B) de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$. Los valores son expresados como la media \pm SEM. Prueba T de Student no pareada y corrección FDR (Silvestres $n=14$, $Trpm8^{-/-}$ $n=14$).

Estos datos muestran la ausencia de alteraciones importantes en la T_i y la A_m en ratones carentes del canal iónico TRPM8 cuando son expuestos a una temperatura ambiente de 21 °C. Esto parece sugerir que el mantenimiento de la temperatura corporal y los procesos termorreguladores, activados por la exposición a esta temperatura ambiental subneutral, no dependen de la actividad del canal iónico TRPM8 o son paliados por mecanismos compensatorios.

Finalmente, se repitió el registro de la temperatura corporal interna y la actividad motora pero descendiendo la temperatura ambiente hasta los 17 °C (frío moderado). Con esta temperatura se pretendía conseguir una mayor activación de los mecanismos termorreguladores. Al tratarse de una temperatura alejada de la termoneutralidad, se hipotetizó que los ratones *Trpm8*^{-/-} presentarían alteraciones en la termorregulación, por lo que la duración del registro se redujo a 5 días. Los registros de T_i y A_m presentaban un patrón circadiano típico, pero con algunas variaciones en ambos parámetros en los ratones *Trpm8*^{-/-}: una disminución significativa de la temperatura media (0,7 °C de diferencia) y una tendencia a disminuir en la amplitud y la acrofase, sin llegar a ser estadísticamente significativos (Fig. 4.13.1f y Tabla 4.13.1c).

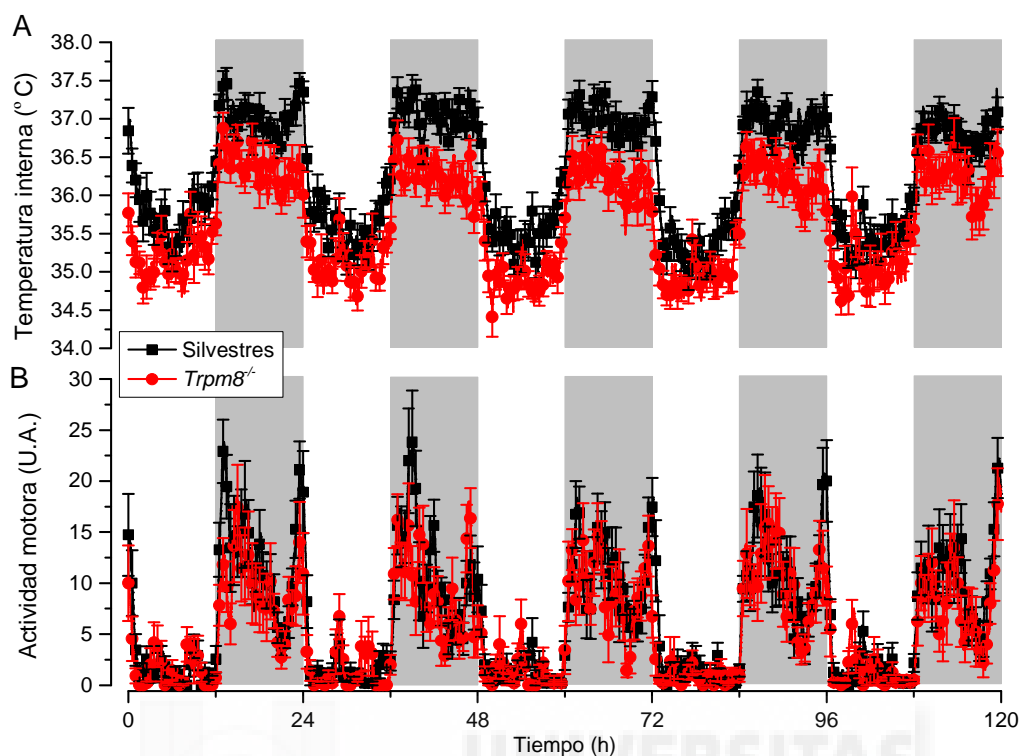


Fig. 4.13.1f. Registro de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones expuestos a 17 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el registro de la T_i y la A_m , representado cada 30 minutos, de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$ a lo largo de 5 días a 17 °C, con ciclos de luz/oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. (Silvestres $n=11$, $Trpm8^{-/-}$ $n=11$).

| Parámetro | Silvestres | $Trpm8^{-/-}$ | p |
|---------------|-----------------|---------------------|-------|
| Mesor (°C) | $36,3 \pm 0,1$ | $35,6 \pm 0,1^{**}$ | 0,001 |
| Amplitud (°C) | $0,9 \pm 0,1$ | $0,8 \pm 0,05$ | 0,08 |
| Acrofase (h) | $17,4 \pm 0,2$ | $17,0 \pm 0,2$ | 0,09 |
| Período (h) | $24,1 \pm 0,03$ | $24,07 \pm 0,1$ | 0,94 |

Tabla. 4.13.1c. Análisis de ritmometría de los cambios diarios en la temperatura corporal interna de ratones expuestos a 17 °C de temperatura ambiente. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. $^{**}p<0,01$; prueba T de Student no pareada. (Silvestres $n=11$, $Trpm8^{-/-}$ $n=11$).

Adicionalmente, el estudio longitudinal-transversal mostró que los ratones $Trpm8^{-/-}$ presentaban una disminución en la T_i tanto en la fase diurna como en la fase nocturna con respecto a los animales silvestres (Fig. 4.13.1g-A). Las diferencias se hicieron evidentes durante las primeras y últimas horas de la fase diurna y durante toda la fase nocturna (Fig. 4.13.1g-

A). En relación a la A_m , se observaron diferencias significativas entre los ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$ al principio de la fase diurna y hacia el final de la fase nocturna (Fig. 4.13.1g-B).

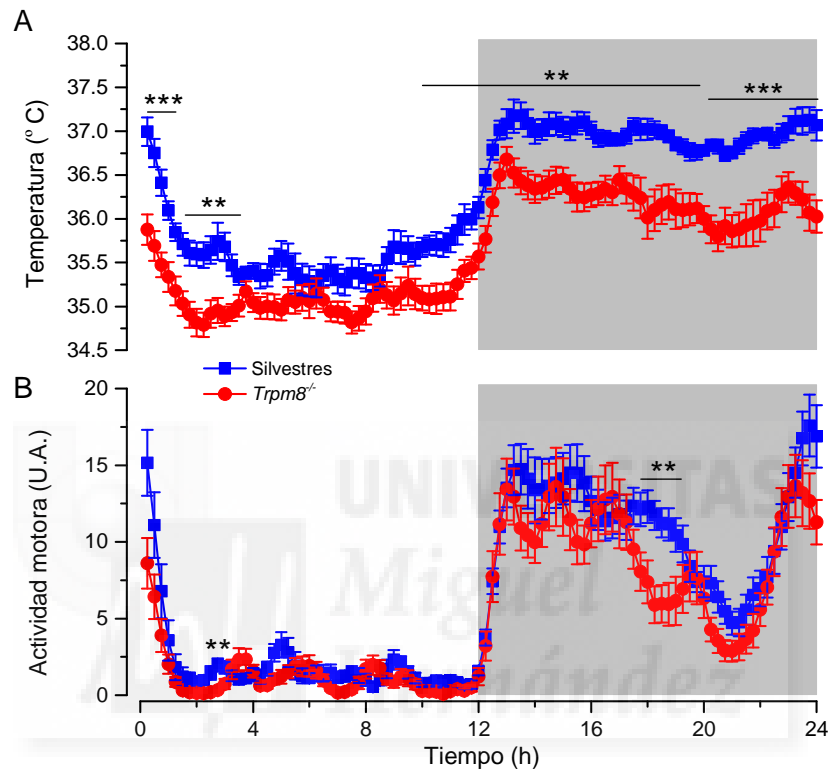


Fig. 4.13.1g. Variación media por día de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones expuestos a 17 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el registro promedio de 5 días, representado cada 15 minutos, de la T_i (A) y la A_m (B) de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$. Los valores son expresados como la media \pm SEM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$; prueba T de Student no pareada y corrección FDR. (Silvestres $n=11$, $Trpm8^{-/-}$ $n=11$).

La hipotermia sufrida por los ratones $Trpm8^{-/-}$ cuando fueron expuestos a una temperatura ambiental de 17 °C, sugiere una alteración en el funcionamiento de los mecanismos termorreguladores inducidos por la exposición a frío más intenso, y por tanto, al menos alguno de estos mecanismos efectores dependen de la actividad del canal TRPM8. Asimismo, la reducción en los niveles de actividad motora en estos animales, en comparación con los ratones silvestres, sugiere que la actividad motora,

mecanismo termorregulador comportamental, también se encuentra modulado por la activación de este canal iónico.

Para estudiar con más detalle cómo afectan el descenso en la temperatura ambiental la T_i y la A_m de los ratones de cada genotipo, silvestres y $Trpm8^{-/-}$, se compararon los diferentes parámetros de ambas variables a las distintas temperaturas ambientales. En los ratones silvestres, al descender la temperatura ambiente, la temperatura media corporal se mantiene y la amplitud de sus ciclos se hace significativamente mayor (Tabla 4.13.1d).

| Parámetro | 29 °C | 21 °C | 17 °C |
|---------------|-------------|-----------------------|------------------------|
| Mesor (°C) | 36,4 ± 0,0 | 36,4 ± 0,1 (p=1,0) | 36,3 ± 0,1 (p=0,63) |
| Amplitud (°C) | 0,6 ± 0,0 | 0,8 ± 0,0** (p=0,01) | 0,9 ± 0,1*** (p<0,001) |
| Acrofase (h) | 17,8 ± 0,1 | 17,0 ± 0,2* (p=0,013) | 17,4 ± 0,2 (p=0,58) |
| Período (h) | 24,0 ± 0,03 | 24,0 ± 0,1 (p=0,55) | 24,1 ± 0,03 (p=0,56) |

Tabla. 4.13.1d. Análisis de ritmometría de la temperatura corporal interna de ratones silvestres expuestos a distintas temperaturas ambientales. Los valores son mostrados como la media ± SEM. (*) Vs 29 °C; **p<0,01; ***p<0,001; ANOVA y test de Bonferroni. (29 °C n=11; 21 °C n=14; 17 °C n=11).

Los ratones $Trpm8^{-/-}$ presentaron alteraciones significativas en los parámetros de T_i , siendo especialmente acentuadas a 17 °C (Tabla 4.13.1e). Así, mientras que la exposición a 21 °C solo produjo un aumento significativo en la amplitud de los ciclos, la exposición a 17 °C produjo además una disminución significativa de la temperatura media corporal. (Tabla 4.13.1e).

| Parámetro | 29 °C | 21 °C | 17 °C |
|---------------|-------------|-------------------------|-------------------------------|
| Mesor (°C) | 36,5 ± 0,05 | 36,2 ± 0,05 (p=0,18) | 35,6 ± 0,1***### (p<0,001) |
| Amplitud (°C) | 0,6 ± 0,04 | 0,9 ± 0,03*** (p<0,001) | 0,8 ± 0,1* (p=0,01) |
| Acrofase (h) | 17,7 ± 0,2 | 17,2 ± 0,1 (p=0,07) | 17,0 ± 0,2** (p=0,005) |
| Período (h) | 24,0 ± 0,02 | 24,0 ± 0,04 (p=1,0) | 24,1 ± 0,09 (p=1,0) |

Tabla. 4.13.1e. Análisis de ritmometría de la temperatura corporal interna de ratones *Trpm8*^{-/-} expuestos a distintas temperaturas ambientales. Los valores son mostrados como la media ± SEM. (*) Vs 29 °C; (#) 21 vs 17 °C; un símbolo p<0,05; doble símbolo p<0,01 y triple símbolo p<0,001; ANOVA y test de Bonferroni. (29 °C n=12; 21 °C n=13; 17 °C n=11).

En el análisis longitudinal-transversal, se pudo observar que mientras los ratones silvestres mantuvieron su T_i relativamente estable, incluso al ser expuestos a una temperatura ambiente de 17 °C (exceptuando algunos momentos puntuales), los ratones *Trpm8*^{-/-} fueron incapaces de mantener su temperatura corporal en este rango de temperaturas frías (Fig. 4.13.1h-A y B). Tomando como punto de partida la temperatura ambiente de 29 °C, se observó que el descenso a una temperatura ambiente de 21 °C produjo una disminución de ~0,3 °C en la T_i , la cual fue significativa durante la fase diurna (Fig. 4.13.1h-B). Esta disminución de la T_i se incrementó a ~0,8 °C cuando estos ratones fueron expuestos a 17 °C de temperatura ambiente, siendo significativa tanto en la fase diurna como en la nocturna (Fig. 4.13.1h-B).

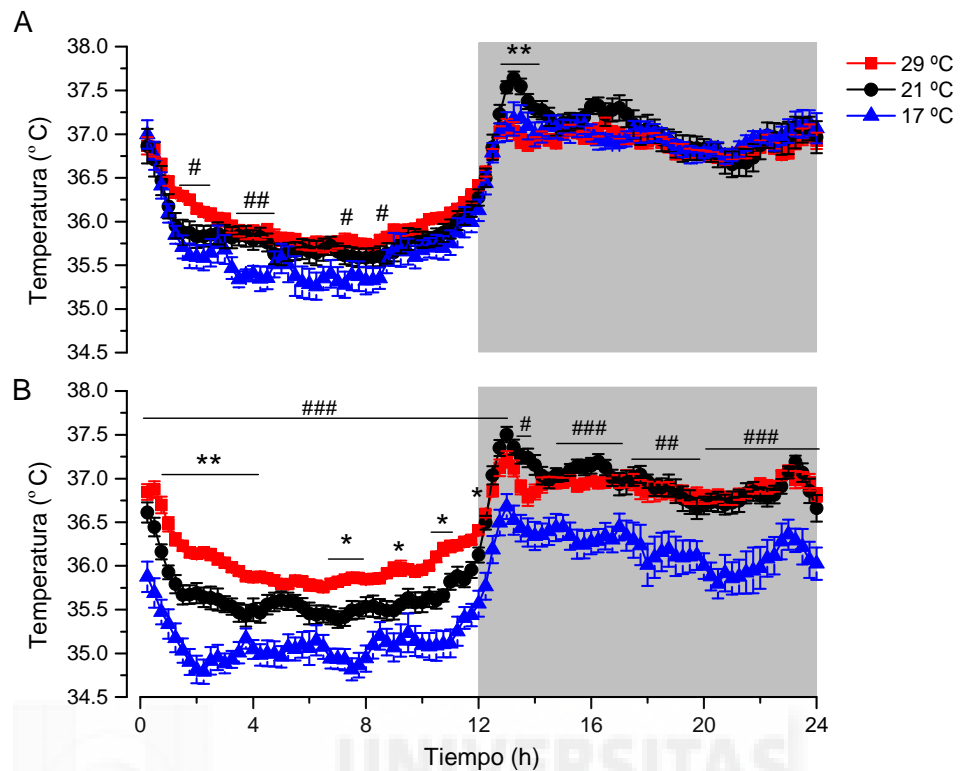


Fig. 4.13.1h. Efecto de las variaciones de la temperatura ambiental sobre la temperatura corporal interna (T_i) de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$. En la figura se muestran las variaciones a lo largo del día, representadas cada 15 minutos, de la T_i de ratones silvestres (A) y $Trpm8^{-/-}$ (B) expuestos a 29, 21 y 17 °C de temperatura ambiental. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. (*) 29 vs 21 °C, (#) 29 vs 17 °C; único símbolo $p < 0,05$, doble símbolo $p < 0,01$ y triple símbolo $p < 0,001$; ANOVA y test de Bonferroni. (Silvestres: 29 °C $n=11$, 21 °C $n=14$ y 17 °C $n=11$; $Trpm8^{-/-}$: 29 °C $n=12$, 21 °C $n=14$ y 17 °C $n=12$).

En ambos genotipos, el descenso en la temperatura ambiental indujo incrementos en la A_m , tanto en la fase diurna como en la nocturna (Fig. 4.13.1i). Estos incrementos se hicieron más evidentes durante las horas intermedias de la fase diurna y durante toda la fase nocturna (Fig. 4.13.1i). En los ratones $Trpm8^{-/-}$, el incremento en la A_m inducido por la exposición a 17 °C de temperatura ambiente, fue menos significativo que el observado en los ratones silvestres (Fig. 4.13.1i).

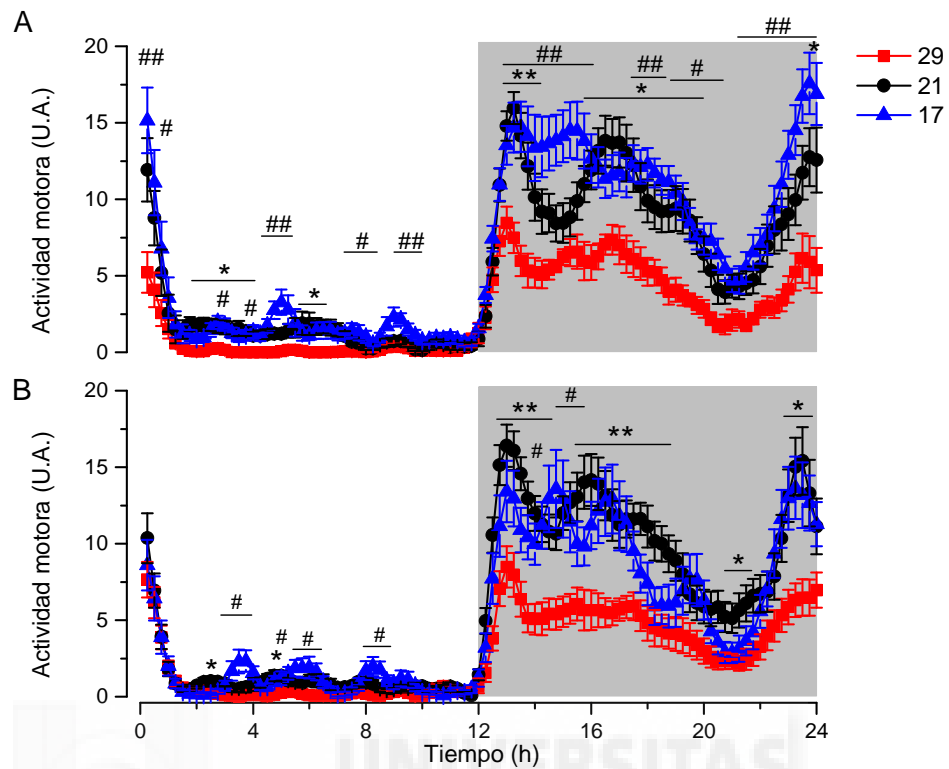


Fig. 4.13.1i. Variaciones de la temperatura ambiental sobre la actividad motora (A_m) de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$. En la figura se muestran las variaciones a lo largo del día, representado cada 15 minutos, de la A_m de ratones silvestres (A) y $Trpm8^{-/-}$ (B) expuestos a 17, 21 y 29 °C de temperatura ambiental. Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) 29 vs 21 °C, (#) 29 vs 17 °C; único símbolo $p < 0,05$, doble símbolo $p < 0,01$ y triple símbolo $p < 0,001$; ANOVA y test de Bonferroni. (Silvestres: 29 °C $n=11$, 21 °C $n=14$ y 17 °C $n=11$; $Trpm8^{-/-}$: 29 °C $n=12$, 21 °C $n=14$ y 17 °C $n=12$).

Para complementar los resultados obtenidos con los ratones $Trpm8^{-/-}$, los cuales se desarrollan sin este canal, y ello podría conllevar la aparición de mecanismos compensatorios, se utilizaron los ratones $Trpm8DTR$. En estos animales se estudió la T_i y la A_m a una temperatura ambiental de 21 °C antes y 1 semana después del tratamiento con la toxina diftérica (DT). Estos ratones poseen un fondo genético diferente al de los ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$, por lo que sus perfiles de T_i y A_m no son exactamente iguales a los mostrados en el apartado anterior. En primer lugar, se comprobó que el tratamiento con la DT no afectaba los parámetros a estudio (T_i y A_m). Para ello, se registró a ratones carentes del receptor para la toxina ($Trpm8DTR^{-/-}$), antes y después del tratamiento con la toxina. Se observó que la

administración de la DT no produjo cambios significativos sobre el patrón y parámetros de los ciclos de la T_i o la A_m (Fig. 4.13.1j y Tabla 4.13.1f)

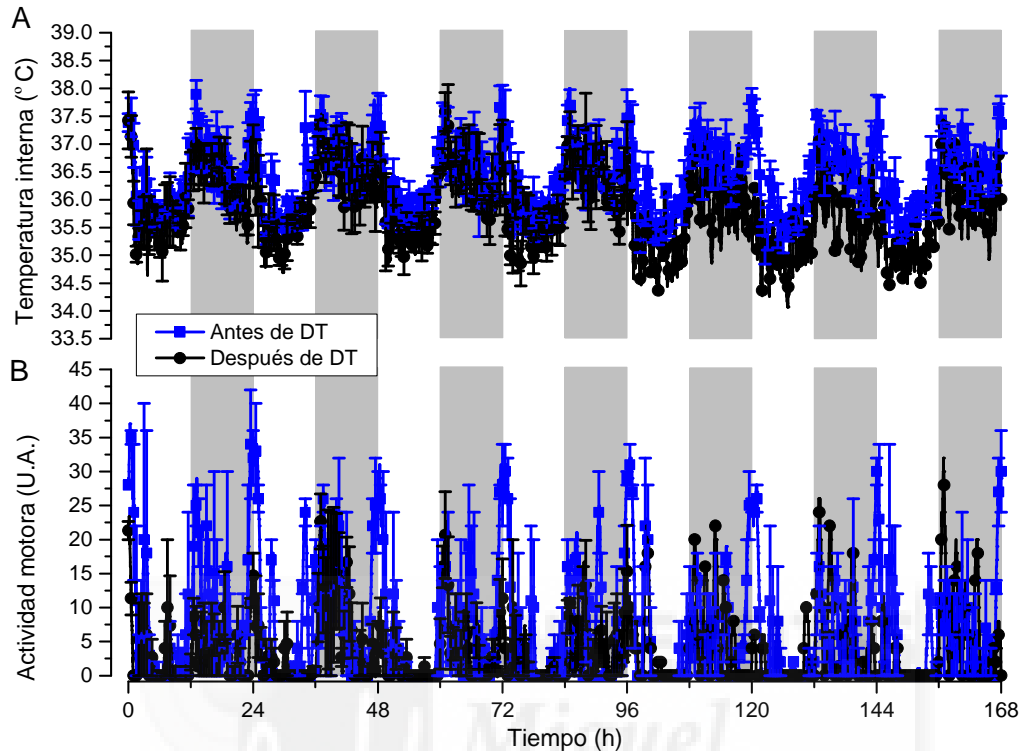


Fig. 4.13.1j. Registro de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones *Trpm8DTR* expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el registro de la T_i (A) y la A_m (B), representado cada 30 minutos, de ratones *Trpm8DTR*, a lo largo de 7 días a 21 °C, con ciclos de luz/oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*, antes y 1 semana después de recibir toxina diftérica (DT). Los valores mostrados son la media \pm SEM; (n=3).

| Parámetro | Antes de la toxina | Después de la toxina | p |
|---------------|--------------------|----------------------|------|
| Mesor (°C) | 36,4 \pm 0,1 | 36,0 \pm 0,2 | 0,13 |
| Amplitud (°C) | 0,5 \pm 0,03 | 0,6 \pm 0,05 | 0,2 |
| Acrofase (h) | 17,4 \pm 0,7 | 16,8 \pm 0,2 | 0,5 |
| Período (h) | 24,0 \pm 0,1 | 23,6 \pm 0,3 | 0,6 |

Tabla. 4.13.1f. Análisis de ritmometría de la temperatura corporal interna de ratones *Trpm8DTR* expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. Prueba T de Student pareada; (n=3).

En el análisis longitudinal-transversal de estos datos, no se observaron diferencias significativas en la T_i y la A_m tras la administración de DT (Fig. 4.13.1h).

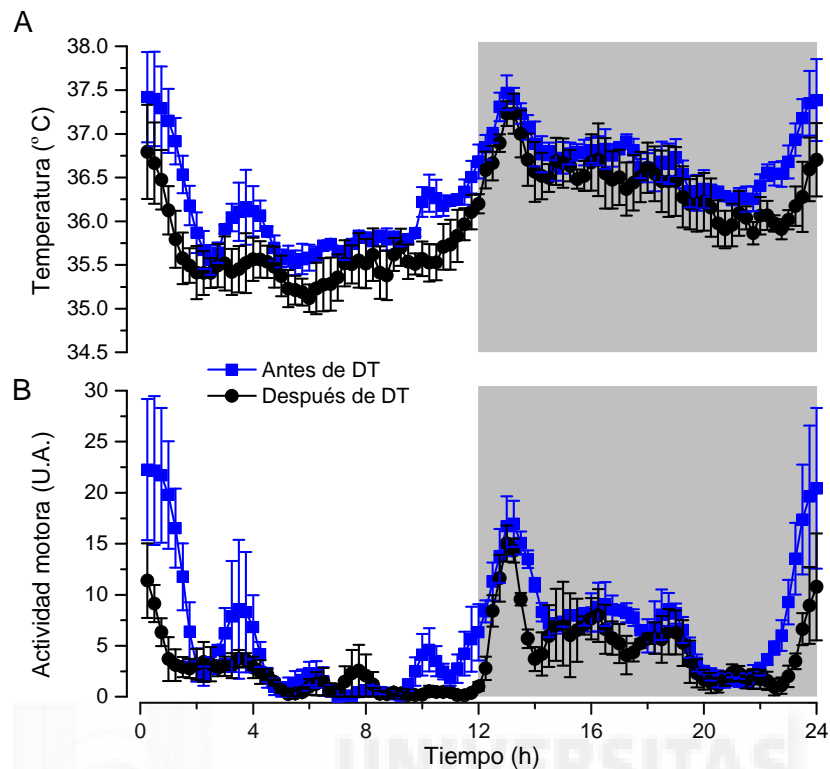


Fig. 4.13.1h. Variación media por día de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones *Trpm8DTR* expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el promedio de 7 días de la T_i (A) y la A_m (B), representado cada 15 minutos, de ratones *Trpm8DTR*, antes y 1 semana después de recibir la toxina diftérica. Los valores son expresados como la media \pm SEM. Prueba T de Student pareada y corrección FDR, (n=3).

Seguidamente, se estudió el efecto de la DT sobre la T_i y la A_m en los ratones que expresan el receptor de toxina diftérica en las neuronas TRPM8 positivas (*Trpm8DTR*⁺) expuestos a una temperatura ambiente de 21 °C. Estos ratones mostraron patrones y características normales en ambos parámetros antes de la administración de DT, tal y como se puede apreciar en la Fig. 4.13.1i. En estos animales, la administración de DT produjo la disminución significativa de la temperatura media corporal, con una tendencia a aumentar la amplitud de sus ciclos, aunque no llegó a alcanzar significancia estadística (Tabla 4.13.1d). Al analizar con más detalle cómo afectó la administración de DT a la T_i y la A_m , se pudo observar que la administración de DT produjo una hipotermia de $\sim 0,7$ °C, tanto por el día como por la noche (Fig. 4.13.1j).

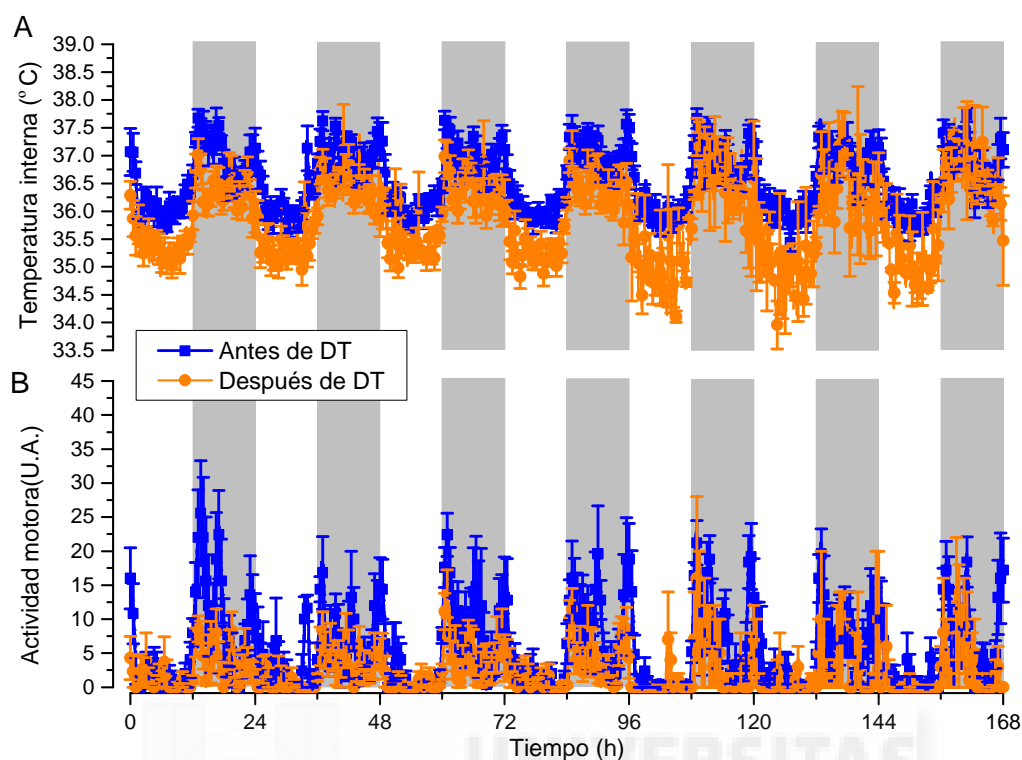


Fig. 4.13.1i. Registro de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones $Trpm8DTR^+$ expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el registro de la T_i (A) y la A_c (B) de ratones $Trpm8DTR^+$, a lo largo de 7 días representado cada 30 minutos, a 21 °C con ciclos de luz/oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*, antes y 1 semana después de recibir la toxina diftérica (DT). Los valores mostrados son la media \pm SEM; (n=7).

| Parámetro | Antes de la toxina | Después de la toxina | p |
|---------------|--------------------|----------------------|--------|
| Mesor (°C) | 36,6 \pm 0,1 | 35,8 \pm 0,1*** | <0,001 |
| Amplitud (°C) | 0,6 \pm 0,1 | 0,7 \pm 0,1 | 0,08 |
| Acrofase (h) | 17,4 \pm 0,2 | 17,2 \pm 0,2 | 0,32 |
| Período (h) | 24,0 \pm 0,03 | 24,1 \pm 0,1 | 0,73 |

Tabla. 4.13.1d. Análisis de ritmometría de los cambios diarios en la temperatura corporal interna de ratones $Trpm8DTR^+$ expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. Los valores son mostrados como la media \pm SEM. *** p <0,001; prueba T de Student pareada. (n=7).

A diferencia de lo observado sobre la T_i , la ablación de las neuronas TRPM8 positivas no produjo cambios significativos en la A_m . (Fig. 4.13.1j-B).

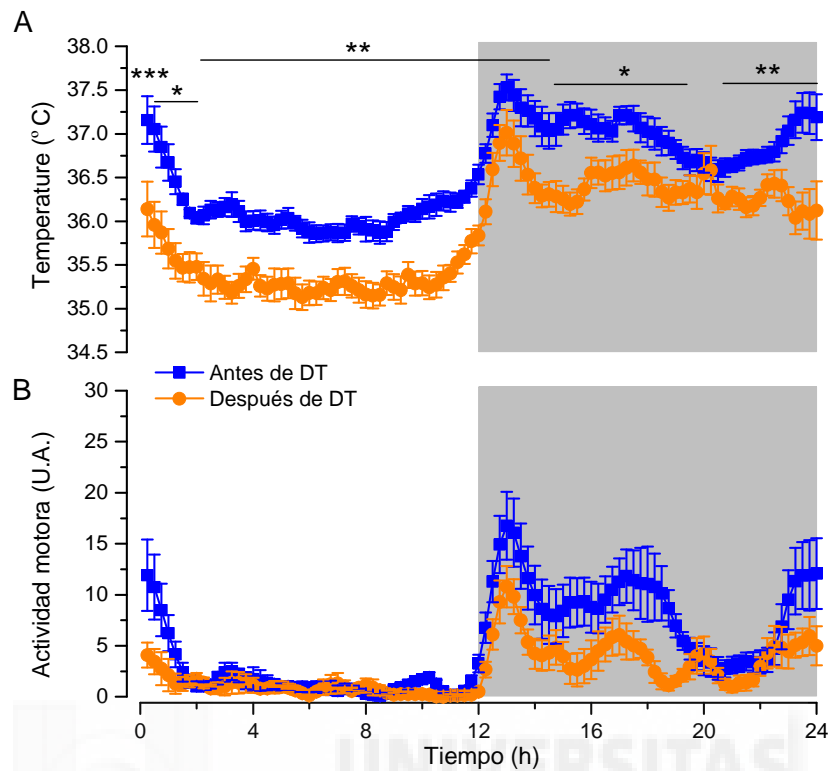


Fig. 4.13.1j. Variación media diaria de la temperatura corporal interna (T_i) y de la actividad motora (A_m) de ratones *Trpm8DTR⁺* expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. En la figura se muestra el registro promedio de 7 días, representado cada 15 minutos, de la T_i (A) y la A_m (B) de ratones *Trpm8DTR⁺*, antes y 1 semana después de recibir la toxina diftérica. Los valores son expresados como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$; prueba T de Student pareada y corrección FDR; (n=7).

En conjunto, estos datos sugieren que el canal TRPM8, así como las neuronas que lo expresan, participan en los mecanismos termorreguladores que son activados por el frío, y que resultan imprescindibles para el mantenimiento de la temperatura corporal.

4.13.2. Restricción calórica (ayuno)

Después de comprobar la importancia del canal iónico TRPM8 en el mantenimiento de la temperatura corporal durante condiciones de frío ambiental, se estudió si este canal termosensible también participaba en los mecanismos termorreguladores que se ponen en marcha durante la depleción energética. Como se mencionó en la introducción, en la condición de ayuno se produce un descenso controlado y circadiano de la temperatura corporal, asociado a una reducción del gasto energético. Para este estudio se registró la T_i y la A_m de ratones silvestres, $Trpm8^{-/-}$ y $Trpm8DTR$ en una situación de ayuno de 24 horas y a una temperatura estándar de estabulación (21 °C). En la figura 4.13.2a se muestran ejemplos de los registros de T_i y de A_m de ratones silvestres antes, durante y después de 24 horas de ayuno, en los cuales se puede comprobar la escasa variación interindividual. En estos ejemplos, se puede apreciar como la T_i presenta un patrón caracterizado por una caída progresiva de la temperatura durante la fase nocturna en forma de pérdidas y recuperaciones bruscas de la temperatura, alcanzando un mínimo en las primeras horas de la fase diurna. A partir de este momento, la temperatura se recupera a pesar del mantenimiento del ayuno (Fig. 4.13.2a-A). La A_m experimentó un aumento al inicio de la fase nocturna, la cual fue paulatinamente disminuyendo hasta alcanzar valores mínimos durante la fase diurna (Fig. 4.13.2a-B).

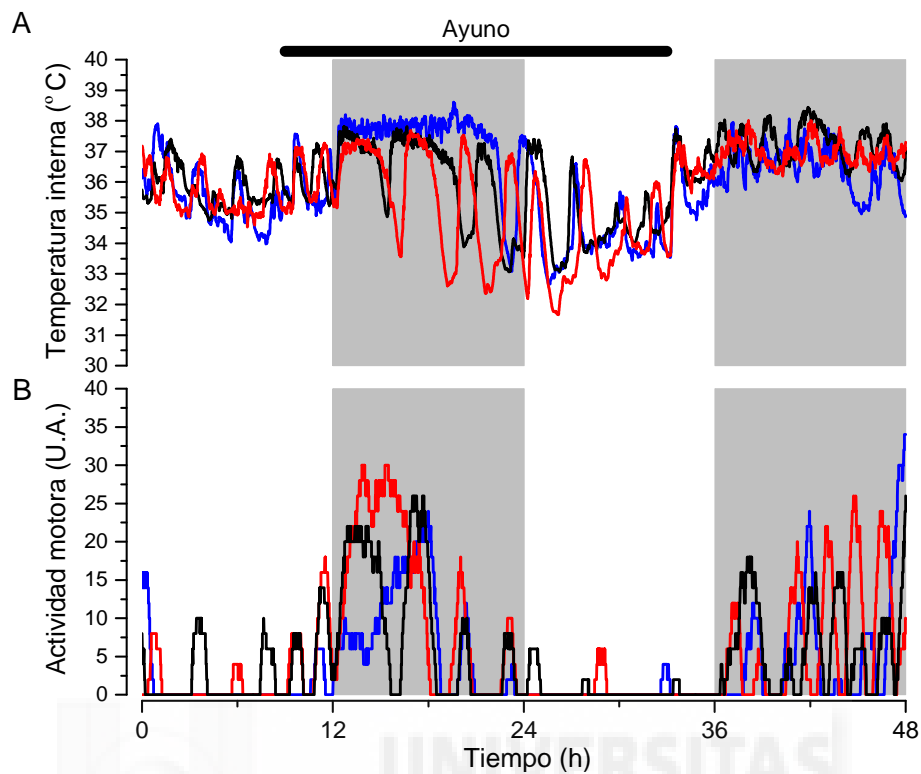


Fig. 4.13.2a. Ejemplos de registros individuales de temperatura corporal interna (T_i) y actividad motora (A_m) de ratones silvestres en ayuno de 24 h. En la figura se muestran tres registros tomados cada 30 segundos de T_i (A) y A_m (B), antes, durante y después de 24 h de ayuno a 21 °C de temperatura ambiente, ciclos de luz/oscuridad 12:12 y agua *ad libitum*.

Al comparar los ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$, se pudo demostrar que la caída en la T_i inducida por el ayuno, fue mucho más dramática en los ratones $Trpm8^{-/-}$ que en los silvestres, alcanzando valores de T_i significativamente más bajos (Figs. 4.13.2b-A, B y C). Las diferencias en la T_i entre ambos genotipos se hicieron evidentes desde el inicio del ayuno hasta la re-administración del alimento. El mayor grado de hipotermia sufrido por los ratones $Trpm8^{-/-}$, se observó al principio de la fase diurna alcanzando ~2,5 °C menos que los ratones silvestres; una diferencia de temperatura mayor que la observada durante la exposición al frío ambiental entre ambos genotipos (Fig. 4.13.2b-B y C). Además, las temperaturas corporales máximas, alcanzadas durante la fase nocturna del ayuno, fueron inferiores en los animales $Trpm8^{-/-}$ (Fig. 4.13.2b-C). A diferencia de lo observado en los registros de la T_i , la A_m no se vio afectada significativamente en los ratones

Trpm8^{-/-} por el estado de ayuno. En ambos genotipos, la condición de depleción energética ocasionó el incremento significativo de la *A_m* durante la fase nocturna, en comparación con la condición de alimentación *ad libitum* (*p*<0,05). Por el contrario no se observaron diferencias en la *A_m* durante la fase diurna entre estas dos condiciones.

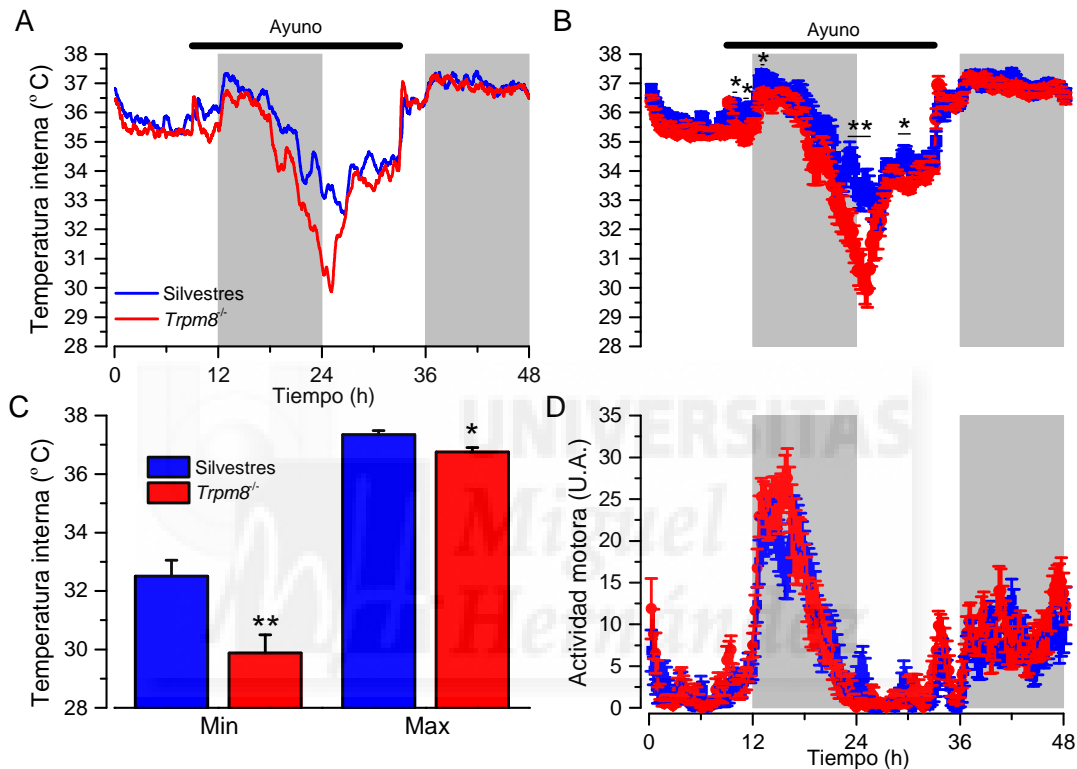


Fig. 4.13.2b. Efecto de 24 h de ayuno sobre la temperatura corporal interna (*T_i*) y la actividad motora (*A_m*) de ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-}. A) Registro cada 30 segundos de la media de *T_i*, de ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} en condición de ayuno. B) Registros promedios de la *T_i* de cada genotipo representados cada 15 minutos. C) Temperaturas corporales mínimas y máximas alcanzadas durante el ayuno. D) Registros promedios de la *A_m* de cada genotipo representados cada 15 minutos. En B, C y D se muestran los valores como media ± SEM **p*<0,05; ** *p*<0,01; prueba T de Student no pareada y corrección FDR. (Silvestres *n*=15, *Trpm8*^{-/-} *n*=14).

De igual manera a como se hizo en el estudio de la termorregulación inducida por frío ambiental, estos resultados también se complementaron utilizando el modelo de los ratones *Trpm8DTR*. Para ello, como primer control se registró la *T_i* y la *A_m* de los ratones *Trpm8DTR* al ser sometidos a 24 horas de ayuno, antes y 1 semana después de ser tratados con DT (Fig.

4.13.2c). La administración de DT no produjo cambios importantes en la T_i (Fig. 4.13.2c-A y B). No se observaron diferencias significativas en las temperaturas mínimas ($p=0,2$), pero sí una reducción de $\sim 0,8$ °C en las temperaturas máximas ($p=0,005$) alcanzadas durante el ayuno (Fig. 4.13.2c-C). No se observaron diferencias significativas sobre la A_m (Fig. 4.13.2c-D).

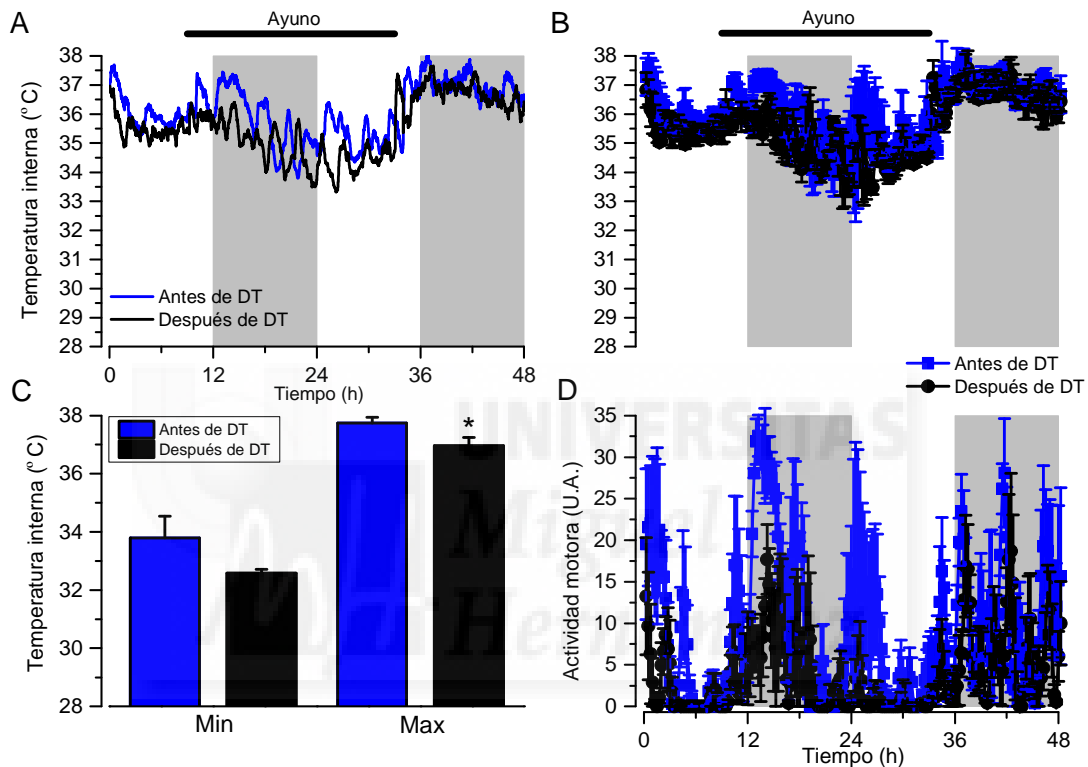


Fig. 4.13.2c. Efecto de 24 h de ayuno sobre la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones *Trpm8DTR^{-/-}* antes y después de la administración de DT. A) Registro cada 30 segundos de la media de T_i , de ratones *Trpm8DTR^{-/-}* en condición de ayuno. B) Registros promedios de la T_i representados cada 15 minutos. C) Temperaturas corporales mínimas y máximas alcanzadas durante el ayuno. D) Registros promedios de la A_m representados cada 15 minutos. En B, C y D se muestran los valores como la media \pm SEM; * $p < 0,05$; prueba T de Student pareada y corrección FDR; (n=3).

Seguidamente, se estudiaron los ratones *Trpm8DTR^{+/+}* tratados con DT. Tal y como se mostró previamente, la eliminación de las neuronas que expresan el canal TRPM8, produjo el desarrollo de hipotermia (Fig. 4.13.2d). Esta hipotermia se hizo mayor durante el ayuno, alcanzando temperaturas corporales mínimas ~ 1 °C inferiores a su control ($p=0,002$) (Fig. 4.13.2d-A, B y C). Es importante añadir que el perfil en el descenso mostrado por los

ratones *Trpm8DTR⁺* tratados con DT, fue semejante al observado en los ratones *Trpm8^{-/-}*, aunque la intensidad del efecto fue menor. Finalmente, el tratamiento con DT apenas produjo una disminución puntual de la actividad motora al principio de la fase nocturna (Fig. 4.13.2d-D).

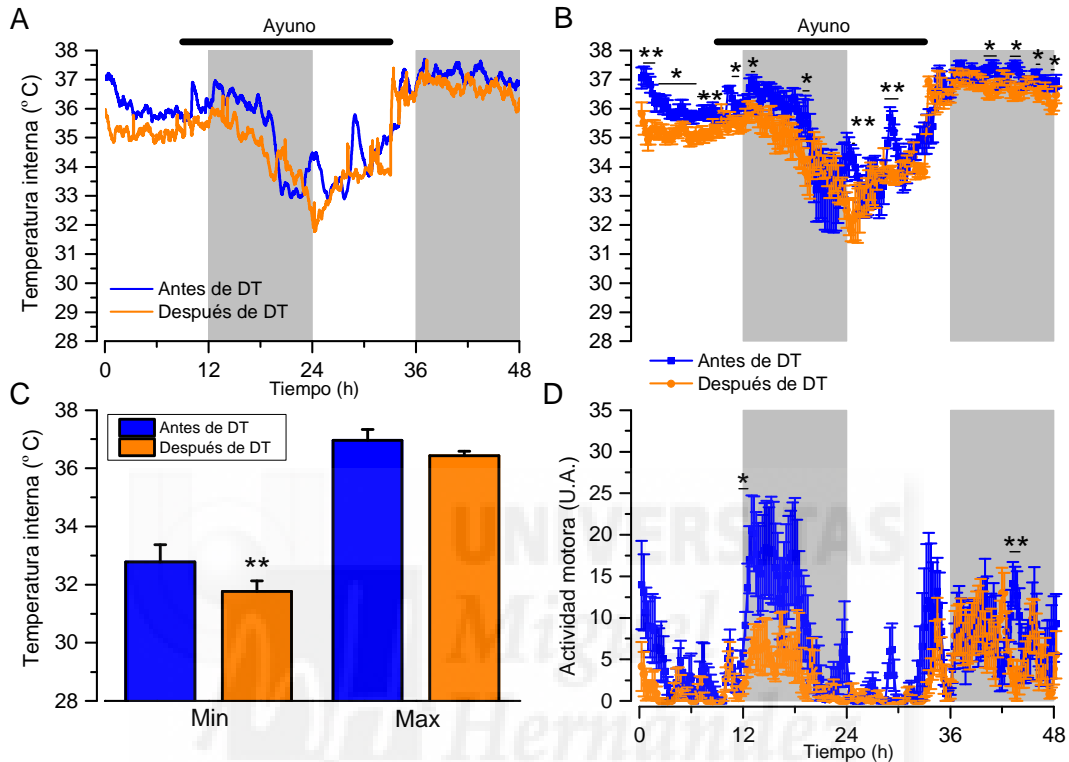


Fig. 4.13.2d. Efecto de 24 h de ayuno sobre la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m) de ratones *Trpm8DTR⁺* antes y después de la administración de DT. A) Registro cada 30 segundos de la media de T_i de ratones *Trpm8DTR⁺* en condición de ayuno. B) Registros promedios de la T_i representados cada 15 minutos. C) Temperaturas corporales mínimas y máximas alcanzadas durante el ayuno. D) Registros promedios de la A_m representados cada 15 minutos. En B, C y D se muestran los valores como la media \pm SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; prueba T de Student pareada y corrección FDR; (n=7).

En conjunto, estos resultados sugieren que el canal iónico TRPM8, así como las neuronas que lo expresan, están implicados en los mecanismos de termorregulación que se ponen en marcha durante el ayuno, limitando el descenso de la T_i .

4.13.3. Efecto del oxaliplatino sobre la termorregulación

Como se ha mostrado en el presente trabajo, la administración del agente quimioterapéutico oxaliplatino por vía intraperitoneal en ratones, induce el desarrollo de hipersensibilidad al frío. Por esta razón, se estudió si la administración de este fármaco altera la respuesta de los mecanismos de termorregulación y si lo hace a través del canal TRPM8. Para ello, se registró la T_i y la A_m de ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} expuestos a 21 °C de temperatura ambiental.

Antes de la administración del oxaliplatino, las oscilaciones diarias de T_i y A_m en ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} fueron prácticamente idénticas, tal y como fueron descritas en el apartado anterior para esta temperatura ambiental (Fig. 4.13.3a). La administración tanto del vehículo como del oxaliplatino produjeron una alteración transitoria en la T_i y la A_m , lo cual constituye un artefacto de la inyección (Fig. 4.13.3a). Posteriormente, solo los ratones que fueron tratados con oxaliplatino (silvestres y *Trpm8*^{-/-}), experimentaron alteraciones tanto en la T_i como en la A_m (Fig. 4.13.3a y 4.13.3b).

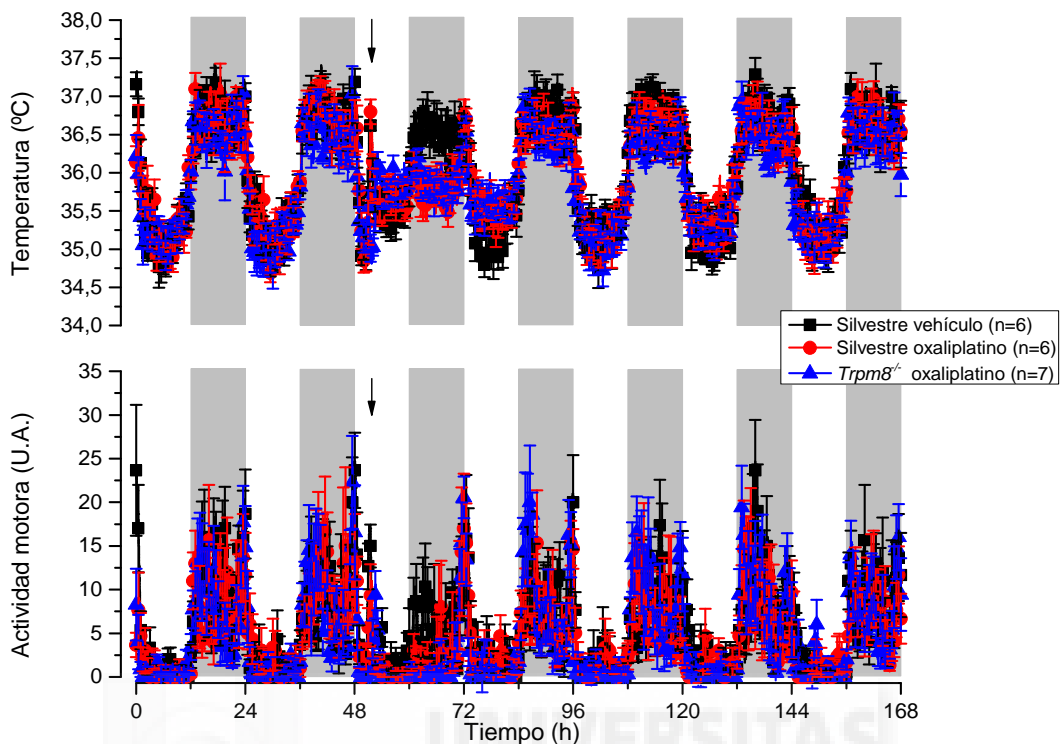


Fig. 4.13.3a. Efecto de la administración de oxaliplatino sobre la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m). En la figura se muestra el registro de la T_i (A) y la A_m (B) representado cada 30 minutos de ratones silvestres y $Trpm8^{-/-}$ antes y después de la administración intraperitoneal de vehículo u oxaliplatino (6 mg/kg), con ciclos de luz/oscuridad 12:12, agua y comida *ad libitum*. La flecha indica el momento de la inyección del agente quimioterapéutico. Los valores son expresados como la media \pm SEM. (Silvestres $n=6$, $Trpm8^{-/-}$ $n=7$).

Al analizar con mayor detalle el efecto de la administración de oxaliplatino, se pudo observar que el tratamiento de los ratones silvestres con este fármaco, produjo un aplanamiento del perfil típico de temperatura corporal durante el día de inyección, recuperando posteriormente niveles normales de T_i (Fig. 4.13.3b-B). La administración del oxaliplatino en los ratones $Trpm8^{-/-}$ produjo un efecto similar, aunque más duradero, ya que se detectaron alteraciones significativas en la T_i un día después de la inyección del fármaco (Fig. 4.13.3b-C). Tres días después de la inyección de este fármaco, se observó la recuperación de niveles normales de temperatura corporal (Fig. 4.13.3b-C).

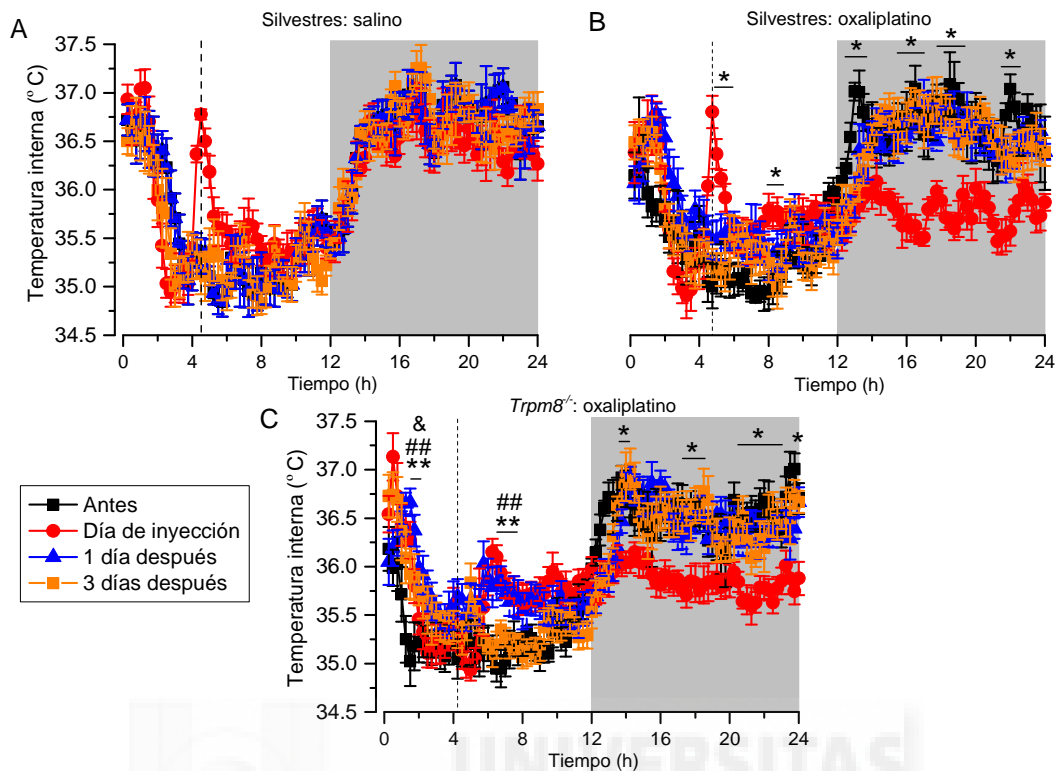


Fig. 4.13.3b. Efecto de la administración de oxaliplatino sobre la temperatura corporal interna (T_i). En la figura se muestra, representados cada 15 minutos: (A) el efecto de la administración i.p. de solución vehículo (glucosa 5%) en ratones silvestres, (B) el efecto de la administración i.p. de oxaliplatino (6 mg/kg) en ratones silvestres y (C) el efecto de la administración i.p. de oxaliplatino en ratones *Trpm8*^{-/-}. La administración de vehículo u oxaliplatino se señala con una línea punteada en el día indicado. Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) Antes versus día de inyección; (#) antes versus 1 día después de inyección; (&) antes versus 3 días después de inyección, un símbolo $p < 0,05$ y doble símbolo $p < 0,01$. Prueba ANOVA y Bonferroni. (Silvestres $n=6$, *Trpm8*^{-/-} $n=7$).

El efecto de la inyección de oxaliplatino sobre la A_m no fue tan pronunciado como sobre la T_i . Aunque la administración de este fármaco produjo una tendencia decreciente en la A_m , tanto en ratones silvestres como *Trpm8*^{-/-}, se detectaron pocas diferencias estadísticamente significativas durante el día de inyección, recuperándose en los días posteriores los niveles normales de A_m (Fig. 4.13.3c-B y C).

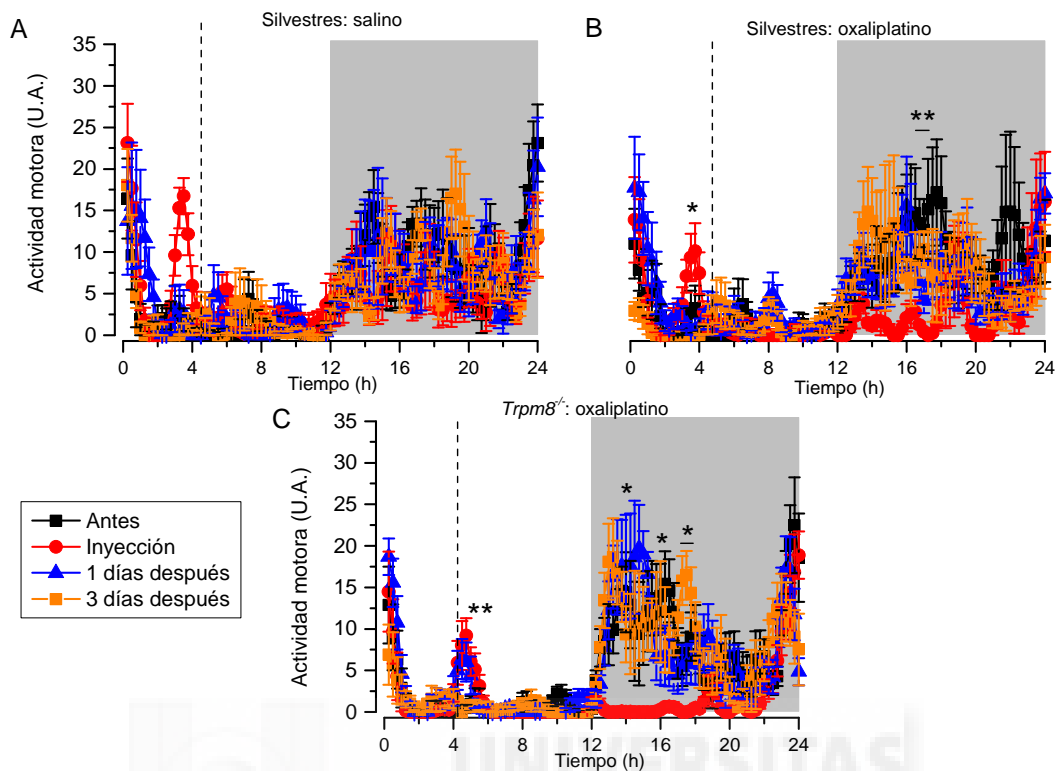


Fig. 4.13.3c. Efecto de la administración de oxaliplatino sobre la actividad motora (A_m). En la figura se muestra, representados cada 15 minutos, (A) el efecto de la administración i.p. de solución vehículo (glucosa 5 %) en ratones silvestres, (B) el efecto de la administración i.p. de oxaliplatino (6 mg/kg) en ratones silvestres y (C) el efecto de la administración i.p. de oxaliplatino (6 mg/kg) en ratones *Trpm8*^{-/-}. La administración de vehículo u oxaliplatino se señala con una línea punteada en el día indicado. Los valores son expresados como la media \pm SEM. (*) Antes versus día de inyección; (#) antes versus 1 día después de inyección; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. Prueba ANOVA y Bonferroni. (Silvestres $n = 6$, *Trpm8*^{-/-} $n = 7$).

Estos resultados sugieren que la administración de oxaliplatino por vía intraperitoneal, produce alteraciones transitorias sobre la temperatura corporal mediante un mecanismo independiente de la actividad del canal iónico TRPM8. Aun así, es importante añadir que estas alteraciones fueron más duraderas en los ratones *Trpm8*^{-/-} que en los silvestres.

5. Discusión

Los estudios realizados hasta la fecha acerca del papel que juegan los canales iónicos TRPA1 y TRPM8 en la termosensación y en la termorregulación muestran una gran heterogeneidad de resultados, lo cual afecta a las conclusiones que se derivan de los mismos. Por ello, es de gran importancia el intentar esclarecer la función de estos canales iónicos en estos procesos fisiológicos.

En el presente trabajo, mediante diversas estrategias experimentales conductuales, se estudiaron los roles del TRPM8 y del TRPA1 en la sensación de estímulos de frío inocuo y nocivo, tanto en condiciones fisiológicas como en un modelo de neuropatía inducida por el oxaliplatino. Estos experimentos revelaron al TRPM8 como el principal detector de estímulos de frío, mientras que el TRPA1 pareciera actuar como un modulador de la percepción de dichos estímulos, en función de la condición patofisiológica. Por otra parte, para estudiar el papel del TRPM8 en los mecanismos termorreguladores, se empleó el registro telemétrico de la temperatura corporal interna y de la actividad motora, en condiciones de frío ambiental o de restricción calórica (ayuno). Mediante esta aproximación experimental, se pudo observar que el canal iónico TRPM8 posee un modesto papel en el mantenimiento de la temperatura corporal interna, probablemente afectando distintos aspectos del sistema termorregulador.

5.1. Papel de los canales TRPM8 y TRPA1 como sensores de frío

5.1.1. TRPM8

En los primeros experimentos conductuales llevados a cabo con ratones *Trpm8*^{-/-}, se mostró que este canal participaba en la detección de frío, en un amplio intervalo de temperaturas. Sin embargo, la inactivación o eliminación de este canal en los ratones no anulaba su sensibilidad al frío

considerado como nocivo, lo que llevó a postular que debería existir algún otro sensor capaz de detectar los estímulos de frío nocivo (Bautista et al 2007, Colburn et al 2007, Dhaka et al 2007), papel que se asignó inicialmente al canal TRPA1 (Karashima et al 2009, Kwan et al 2006, Story et al 2003). Los resultados contradictorios con respecto a la termosensibilidad del canal TRPA1 han generado una controversia que justifican la re-evaluación del papel de TRPM8 en las sensaciones al frío.

Los experimentos mostrados en el presente trabajo reafirman la importancia del canal TRPM8, así como las neuronas que lo expresan, en la detección de estímulos de frío inocuo. En apoyo de esta conclusión, observamos una importante disminución en la sensibilidad al frío evaporativo tanto en ratones *Trpm8*^{-/-} como *Trpm8DTR*⁺, es decir ratones que carecen de neuronas TRPM8 positivas. Estos resultados son similares a los descritos por varios trabajos independientes, en los que se demostró una importante disminución en las respuestas a la aplicación de acetona (Bautista et al 2007, Dhaka et al 2007, Knowlton et al 2011, Knowlton et al 2013, McCoy & Zylka 2014). Por el contrario, Colburn y colaboradores empleando una metodología similar, no observaron diferencias entre los ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} en las respuestas a la aplicación de acetona (Colburn et al 2007). Estas discrepancias posiblemente residan en diferencias en la metodología empleada para la cuantificación de las respuestas, basado en un sistema de clasificación de respuestas en lugar del número total o duración de las respuestas como se ha mostrado en este trabajo o en el reportado por Dhaka y colaboradores (Dhaka et al 2007). La técnica de aplicación de acetona posee varias ventajas entre ellas el coste, la facilidad de realización y que además permite la estimulación independiente de las patas traseras con el enfriamiento evaporativo. Sin embargo, mediante esta técnica no se puede determinar un valor de temperatura umbral, además que no se puede descartar un posible efecto químico de la acetona (Brenner et al 2012, Dhaka et al 2007). Por este motivo, el empleo de la placa fría supone una ventaja pues evita el posible efecto químico de la acetona y permite elegir la temperatura de estimulación, pudiendo obtenerse umbrales de respuesta si

se realizan rampas de enfriamiento (Yalcin et al 2009). Empleando la placa fría en este trabajo se aportó evidencia que reafirma la importancia del canal iónico TRPM8 en la detección de bajas temperaturas dentro del rango nocivo (Colburn et al 2007, Knowlton et al 2010). Mediante la placa fría a una temperatura fija, se pudo observar un aumento en la latencia a la aparición de conductas termogénicas como el frotamiento de las patas delanteras y los escalofríos en los ratones carentes del TRPM8. A diferencia de lo reportado por Karashima y colaboradores, no se observaron saltos en los ratones silvestres en esta variante de la placa fría, lo cual podría deberse a la gran variabilidad que se observa mediante esta prueba (Barrot 2012, Karashima et al 2009). En un trabajo reciente, se ha mostrado que los escalofríos están presentes tanto en ratones silvestres tratados con un antagonista del TRPM8 así como en ratones *Trpm8*^{-/-}, por lo que los autores sugieren que estas conductas no dependen de la actividad de TRPM8 (Feketa et al 2013). Sin embargo, estos autores evaluaron la actividad electromiográfica tras diez minutos de exposición a 10 °C, pero no evaluaron que ocurre en los instantes iniciales de exposición al frío. Los datos mostrados en el presente trabajo, sugieren que la actividad de TRPM8 está implicada en la detección de los estímulos de frío que posteriormente conllevaran al desarrollo de las respuestas termogénicas, pero en ningún caso sugiere que dicha actividad sea necesaria para la generación de las conductas termogénicas. De hecho, en los experimentos realizados con los ratones *Trpm8DTR*⁺, aunque se observó un incremento en la latencia a los estímulos de frío, incluso mayor a la observada en los ratones *Trpm8*^{-/-}, las respuestas siguieron estando presentes. Mediante la prueba de tolerancia al frío y de estímulos de frío con hielo seco, se pudo mostrar que tanto el TRPM8 como las neuronas TRPM8 positivas, poseen una gran importancia en la detección de estos estímulos nocivos, en total concordancia con datos recientes en la literatura (Descoeur et al 2011, Knowlton et al 2013, Pogorzala et al 2013). Es importante añadir que los ratones *Trpm8DTR*⁺ parecieran ser ligeramente más sensibles al estímulo de frío con hielo seco que los ratones silvestres, lo cual probablemente se deba a que su fondo genético es diferente (B6;129 en

lugar de C57BL/6J). Finalmente, en este trabajo también se pudo describir el aporte del canal TASK3, el cual se expresa de manera diferencial en las neuronas TRPM8 positivas (Morenilla-Palao et al 2014), sobre la sensación de frío. En los ratones *Task3^{-/-}* se observó una sensibilidad ligeramente superior al estímulo de frío de alta intensidad en comparación con los ratones silvestres. A pesar de ser un canal no sensible a temperatura, esto sugiere que podría participar en la sintonización del umbral de frío de las neuronas TRPM8 positivas.

5.1.2. TRPA1

Como ya se ha mencionado en la introducción, la función del canal TRPA1 como sensor de frío *in vivo* es controvertida (Bautista et al 2006, Brenner et al 2014, Karashima et al 2009, Knowlton et al 2010, Kwan et al 2006). Nuestros resultados indican que la sensibilidad al frío inocuo de los ratones *Trpa1^{-/-}* y de los ratones silvestres es idéntica, coincidiendo con lo observado por Bautista y colaboradores (Bautista et al 2006). No obstante, estos datos contrastan con lo reportado por Kwan y colaboradores, los cuales observaron una importante reducción en la sensibilidad a este estímulo en los ratones carentes del canal TRPA1 (Kwan et al 2006). Es posible que esta discrepancia resida en diferencias en la metodología empleada; esto autores cuantificaron únicamente la duración de las sacudidas de la pata, sin tener en cuenta el resto de respuestas evocadas por el enfriamiento evaporativo de la acetona. En el presente trabajo tampoco se apreciaron diferencias en la latencia a la aparición de conductas termogénicas (como los escalofríos o el frotamiento de las patas delanteras) entre los ratones silvestres y los ratones *Trpa1^{-/-}* tras la exposición a frío nocivo, en concordancia con la literatura, lo cual sugiere que estas respuestas no dependen de este canal iónico (Bautista et al 2006, Karashima et al 2009). Cuando se estudiaron las respuestas consideradas nocidéfensas evocadas por la prueba de tolerancia al enfriamiento progresivo (ej. salto) o por el estímulo de frío intenso (ej. retirada), tampoco

se observaron diferencias en los umbrales nociceptivos entre los ratones silvestres y los ratones *Trpa1*^{-/-} como ha sido reportado (Brenner et al 2014). No obstante, es necesario resaltar que la proporción de ratones *Trpa1*^{-/-} que respondieron a la prueba de tolerancia al enfriamiento, fue ligeramente inferior a los silvestres, lo que podría indicar un modesto papel de este canal en la mediación de estas respuestas.

En su conjunto, los resultados mostrados en este trabajo sugieren de forma consistente que, en condiciones fisiológicas, la detección de estímulos de frío inocuo y nocivo está mediada mayoritariamente por las neuronas TRPM8 positivas, donde la actividad del TRPM8 juega un papel muy importante. Adicionalmente, dentro de este grupo de neuronas, el TASK3 tiene un modesto papel en la sintonización de la sensibilidad al frío.

5.2. Papel de los canales iónicos TRPM8 y TRPA1 en la hipersensibilidad al frío en la neuropatía inducida por oxaliplatino

El cáncer colorrectal es el segundo tipo de cáncer que más muertes produce cada año en países desarrollados, con una tasa de mortalidad de alrededor del 33% (Herszényi & Tulassay 2010, Parkin et al 2005). El principal agente antitumoral para tratarlo en la actualidad es el oxaliplatino, el cual induce el desarrollo de una neuropatía periférica caracterizada por una importante hipersensibilidad al frío (McWhinney et al 2009, Wilson et al 2002). En el presente trabajo, se reprodujo el modelo murino reportado por Ling y colaboradores basado en la administración de una única dosis de oxaliplatino por vía intraperitoneal (Ling et al 2007a). Estos animales desarrollaron una hipersensibilidad a estímulos de frío muy similar a la que ocurre en humanos bajo tratamiento con el oxaliplatino. Muchos pacientes refieren algunos efectos secundarios que aparecen incluso durante la infusión i.v. del fármaco antitumoral. En el modelo empleado en este trabajo, no se observó el desarrollo de hipersensibilidad aguda al frío poco después de la administración del fármaco. En un trabajo reciente, se observó el

rápido desarrollo de hipersensibilidad al frío tras la administración intraplantar de oxaliplatino (Deuis et al 2013), lo cual sugiere que este fenómeno dependería de la vía de administración. A pesar de esfuerzos previos para tratar de esclarecer los mecanismos moleculares que intervienen en la hipersensibilidad al frío durante el tratamiento con oxaliplatino, no existe unanimidad en las conclusiones. De hecho, los experimentos realizados en modelos animales ofrecen visiones divergentes, incluso contrapuestas. Por una parte, Gauchan y colaboradores observaron un incremento en la expresión del mRNA del TRPM8 tras la administración de oxaliplatino, sugiriendo que, al menos en parte, esto era una causa de la hipersensibilidad inducida por el fármaco quimioterapéutico (Gauchan et al 2009). Por el contrario, Descoeur y colaboradores no observaron estos cambios, aunque sí detectaron un incremento en el mRNA del TRPA1 tras el tratamiento con oxaliplatino (Descoeur et al 2011). En el presente trabajo se muestra que tanto la ausencia del canal iónico TRPM8, como su antagonismo con BCTC, no afectaron al desarrollo de las respuestas exacerbadas a estímulos de frío inocuo ni nocivo inducidas por el oxaliplatino. Por tanto, estos resultados difieren con lo reportado en 2009 por Gauchan y colaboradores, donde observaron en ratones que la administración de capsazepina, otro inhibidor no específico del TRPM8, producía una disminución significativa de la hipersensibilidad a la prueba de acetona, inducida por administración de la misma dosis oxaliplatino que la utilizada en el presente trabajo (Gauchan et al 2009). Esta diferencia podría residir en el antagonista empleado. La capsazepina es un antagonista inespecífico que actúa sobre el TRPV1 ($IC_{50}= 0,42 \mu M$) (Bevan et al 1992), canales de Ca^{+2} activados por voltaje ($IC_{50}= 1,4 \mu M$) (Docherty et al 1997) y el TRPM8 ($IC_{50}= 18 \mu M$) (Behrendt et al 2004), por lo que es difícil atribuir el efecto observado sobre la hipersensibilidad al frío únicamente a la inhibición del TRPM8. A pesar de que el BCTC utilizado en este trabajo también es un antagonista inespecífico, actuando sobre el TRPV1 ($IC_{50}= 0,04 \mu M$) (Valenzano et al 2003) y el TRPM8 (IC_{50} entre 0,14 y 0,8 μM) (Behrendt et al 2004, Madrid et al 2006, Weil et al 2005), su afinidad por el TRPM8 es

considerablemente mayor que la capsazepina. Adicionalmente, en otro estudio reciente, en el cual se empleó PBMC, un antagonista específico del canal TRPM8, los autores no observaron efectos significativos sobre las respuestas exacerbadas al enfriamiento evaporativo inducidas por el oxaliplatino, corroborando lo mostrado en este trabajo (Knowlton et al 2011). Estos datos sugieren que el desarrollo de la hipersensibilidad al frío inducida por la administración del oxaliplatino no depende de la actividad del TRPM8. Más aún, en este trabajo se muestra por primera vez que las neuronas que expresan el canal iónico TRPM8 no son necesarias para el desarrollo de esta hipersensibilidad al frío, pues la ablación de dichas neuronas no evitó el desarrollo de respuestas exacerbadas al frío nocivo.

Los datos presentados resaltan la importancia del canal TRPA1 en la neuropatía inducida por el oxaliplatino. Aquí se describe como la inhibición específica del TRPA1 mediante el AP18 fue suficiente para revertir transitoriamente las respuestas exacerbadas a estímulos de frío inocuo y nocivo inducidas por el agente quimioterapéutico, coincidiendo con lo observado por Nassini y colaboradores (Nassini et al 2011). En contraste, en otro estudio publicado recientemente empleando ratones sensibilizados con oxaliplatino, los autores no observaron cambios en la sensibilidad a estímulos de frío nocivo luego de la administración de HC030031, otro antagonista selectivo de TRPA1 (Descoeur et al 2011). Posiblemente, la falta de efecto se deba a la farmacocinética del HC030031, pues Descoeur y colaboradores administraron el antagonista 30 minutos antes de realizar las pruebas, sin embargo se ha mostrado que el pico de máxima acción del mismo, y donde han observado efectos significativos, ocurre a los 60 minutos post administración (Eid et al 2008, Nassini et al 2011). Adicionalmente, también se mostró como la administración de AP18 en ratones silvestres sanos no tuvo efectos sobre la sensación de estímulos de frío, tal y como ha sido reportado utilizando el HC-030031 (del Camino et al 2010, Eid et al 2008). En la línea que los experimentos con el antagonista AP18, y en plena concordancia con lo reportado por Nassini y colaboradores, en este trabajo se muestra como los ratones *Trpa1*^{-/-} fueron

resistentes al desarrollo de la hipersensibilidad a estímulos de frío y mecánicos inducida por la administración de oxaliplatino, sugiriendo un papel clave de este canal en el desarrollo de estos síntomas de hipersensibilidad (Nassini et al 2011). Es importante destacar que antes del tratamiento con el agente quimioterapéutico, el umbral mecánico determinado mediante la técnica de von Frey de los ratones *Trpa1*^{-/-} fue igual al de los ratones silvestres, lo cual sugiere que en condiciones fisiológicas este canal no participa de forma significativa en la mecanotransducción (Bautista et al 2006, Lumpkin & Caterina 2007). Alternativamente, podría participar en procesos mecanosensibles pero no sería determinante para el umbral de retirada.

Los resultados mostrados en este trabajo podrían sugerir que existe una interacción entre la información de frío mediada por TRPM8 y la actividad de TRPA1 en la neuropatía inducida por oxaliplatino. Por una parte, tanto la ausencia del TRPM8 como de la subpoblación neuronal que lo contiene, produce un déficit importante en la detección de estímulos de frío inocuo y nocivo, pero no es suficiente para prevenir el desarrollo de la sensibilización por la administración de oxaliplatino. Por otra parte, en condiciones fisiológicas el canal iónico TRPA1 no participa en la detección de estímulos cutáneos de frío *in vivo*, tanto inocuos como nocivos como se ha mostrado en el presente trabajo. Sin embargo, tanto su antagonismo como su ausencia, es suficiente para revertir o prevenir respectivamente el desarrollo de la hipersensibilidad a estímulos mecánicos y de frío inducida por el oxaliplatino. Considerando lo anterior, se podría plantear la hipótesis de que existe un punto de convergencia entre la información de frío mediada por TRPM8 y la actividad de TRPA1 en las neuronas de segundo orden. Según esta hipótesis, en condiciones fisiológicas la mayor parte de la información de frío sería mediada por aferentes primarios que expresan el TRPM8 y transmitida hasta las neuronas de amplio rango dinámico en la médula espinal, las cuales a su vez recibirían aferencias de neuronas que expresan TRPA1. En condiciones fisiológicas, el aporte de la actividad del TRPA1 a este circuito en respuesta a un estímulo de frío inocuo no sería

capaz de evocar dolor. Sin embargo, la administración de oxaliplatino podría inducir la generación de actividad espontánea del TRPA1, de forma similar a como ha sido reportado en otras condiciones patofisiológicas (Koivisto 2012, McGaraughty et al 2010). La consecuencia de esto sería el desplazamiento del potencial de reposo de las neuronas de amplio rango dinámico hacia valores más positivos, incrementando su excitabilidad. De esta forma, un estímulo de frío previamente inocuo, ahora sería capaz de alterar la frecuencia y patrón de disparo de las neuronas de amplio rango dinámico, siendo interpretado en última instancia como un estímulo doloroso. Para intentar obtener evidencia a favor de esta hipótesis, se empleó la icilina un compuesto capaz de activar *in vitro* tanto a TRPM8 como a TRPA1 (Andersson et al 2004, Fajardo et al 2008a, Story et al 2003), pero que se ha sugerido que sus efectos *in vivo* son mediados por TRPM8 (Colburn et al 2007, Gentry et al 2010, Knowlton et al 2010). En este trabajo se describe como la inyección intraplantar de este compuesto produjo respuestas nociceptivas, las cuales estuvieron presentes tanto en ratones *Trpa1*^{-/-} como *Trpm8*^{-/-}. Esto podría sugerir un solapamiento en la acción de este compuesto, donde en ausencia del TRPA1, la activación del TRPM8 podría ser suficiente para evocar las respuestas nociceptivas, y viceversa, coincidiendo con la activación de ambos canales observada en experimentos *in vitro* (Fajardo et al 2008a, Story et al 2003). Estos resultados difieren de lo reportado por Knowlton y colaboradores en 2010, los cuales observaron que las respuestas nociceptivas producidas por la inyección intraplantar de icilina eran totalmente dependientes del TRPM8 (Knowlton et al 2010). Esta diferencia podría residir en la cantidad de icilina administrada: 15 µg (en 10 µl) en comparación con los de 24 µg (en 10 µl) empleados por Knowlton y colaboradores. Al mismo tiempo, los datos de nuestro trabajo coinciden por lo reportado recientemente, donde a pesar de inyectar la misma cantidad de icilina que en el trabajo antes citado (pero un mayor volumen, 25 µl), no observaron un diferencias significativas entre los ratones *Trpm8*^{-/-} y los ratones silvestres en la cantidad de encogimientos de la pata inyectada (McCoy & Zylka 2014). Es importante añadir que la evidencia en la literatura

sugiere que la icilina posee múltiples efectos *in vivo*, observándose como la aplicación tópica de icilina es capaz de producir analgesia sobre estímulos de calor nocivo, mientras que es capaz de producir sensibilización sobre los estímulos mecánicos y de frío (Brignell et al 2008, Hagenacker et al 2014, Proudfoot et al 2006). En el presente trabajo también se muestra como el pretratamiento con oxaliplatino, produce un incremento de las respuestas nocidéfensas evocadas por la icilina, el cual no se observó en ratones *Trpa1*^{-/-} ni ratones silvestres tratados con AP18, sugiriendo que estas respuestas exacerbadas son mediadas por el TRPA1.

Por otra parte, se muestra por primera vez como la aplicación de icilina sobre la superficie ocular produjo el desarrollo de respuestas nocidéfensas (frotamiento ocular). En los animales *Trpm8*^{-/-} se pudo observar una disminución en dichas respuestas, sugiriendo que estas respuestas dependen parcialmente de la actividad del TRPM8. En un estudio previo, se mostró que la aplicación de una alta concentración de mentol (50 mM) sobre la superficie ocular provocaba respuestas nocidéfensas no dependientes en la actividad del TRPM8 (Robbins et al 2012). Es posible que esta diferencia resida en que, a pesar de que ambos compuestos son activadores del TRPM8, los mecanismos de activación son diferentes (Chuang et al 2004). De hecho, se ha reportado que la icilina puede bloquear la activación del TRPM8 por frío y por WS-12, otro agonista altamente específico de este canal (Kuhn et al 2009). En el presente trabajo también se mostró que el pretratamiento con oxaliplatino por vía intraperitoneal no tuvo ningún efecto sobre estas respuestas, sugiriendo que las neuronas que inervan la córnea y la región periocular no se ven afectadas por el agente quimioterapéutico.

El hecho de que los datos aquí mostrados parecen sugerir que la icilina no es una herramienta específica entre TRPM8 y TRPA1 *in vivo*, no permite evaluar correctamente la hipótesis de interacción entre la actividad de ambos canales iónicos. No obstante, los resultados presentados en este trabajo sugieren que la actividad del TRPA1 es suficiente y necesaria para el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica y a frío en este modelo de

neuropatía por oxaliplatino, tal y como se ha sugerido recientemente (Nativi et al 2013).

¿De qué forma el oxaliplatino podría alterar la actividad del TRPA1? El canal TRPA1 se activa por una gran variedad de compuestos potencialmente nocivos para el organismo, como la nicotina, la acroleína, las endotoxinas bacterianas y productos de peroxidación lipídica (Andersson et al 2008, Macpherson et al 2007a, Meseguer et al 2014, Talavera et al 2009). Se ha sugerido que el estrés oxidativo está implicado en la génesis de la neuropatía inducida por el oxaliplatino, por lo que es razonable considerar una interacción covalente entre los productos de peroxidación y el TRPA1 (Joseph et al 2008, MacPherson et al 2007b, Nassini et al 2011). Estudios previos han mostrado que la Acetil-L-Carnitina (ALCAR) posee un potente efecto antioxidante con efectos neuroprotectivos en distintas patologías (Chiechio et al 2006, De Grandis 2007, Ribas et al 2014). En el presente trabajo se describe por primera vez que el pretratamiento con una única dosis de ALCAR tiene un potente efecto profiláctico, dosis dependiente, sobre la hipersensibilidad a estímulos mecánicos y de frío inducida por el oxaliplatino en ratones, de forma similar a lo observado recientemente por Xiao y colaboradores en ratas (Xiao et al 2012). Esto sugiere que la administración de este antioxidante evitaría la formación de productos de peroxidación lipídica como el 4-HNE, evitando así modificaciones covalentes sobre las cisteínas reactivas del TRPA1 (Trevisani et al 2007). Adicionalmente a este efecto, se ha reportado que los transportadores de cationes orgánicos (OCTN) facilitan la incorporación tanto de la ALCAR como del oxaliplatino hacia el interior celular, por lo que es posible que la ALCAR pudiese actuar también como un inhibidor competitivo del transporte de oxaliplatino (Jong et al 2011, Sprowl et al 2013). Dado que no se ha observado la expresión de estos transportadores en células tumorales, la administración de ALCAR ayudaría a prevenir el desarrollo de hipersensibilidad mecánica y a frío sin afectar la efectividad del tratamiento (Katsuda et al 2010, Sprowl et al 2013). Otra posible consecuencia del tratamiento con oxaliplatino, podría ser la alteración del *splicing* del TRPA1

como ha sido mostrado en otros modelos de dolor (Zhou et al 2013). Por lo tanto, la administración del oxaliplatino podría alterar la expresión de ambas isoformas, la TRPA1a y la TRPA1b, incrementando la actividad neta del canal.

5.3. Participación del canal TRPM8 en los mecanismos de termorregulación

5.3.1. Papel del TRPM8 en la termorregulación activada por el frío ambiental

La termorregulación es un proceso fisiológico que es esencial para la supervivencia de los mamíferos. Esto les ha permitido desarrollarse en una amplia variedad de hábitats con climas muy distintos. No obstante, este proceso es muy costoso desde el punto de vista energético, por lo que está altamente controlado. Las propiedades como termosensor del canal iónico TRPM8, lo hacen un posible participante en la termorregulación. Sin embargo, este papel no ha sido explorado en profundidad, lo cual justifica que se realicen nuevos estudios que permitan arrojar más luz sobre este tema. En este trabajo se estudió la contribución de este canal iónico al mantenimiento de la temperatura corporal bajo condiciones que regulan el sistema termorregulador, como son el frío ambiental y el ayuno. Durante la exposición a frío ambiental, se analizaron las características de la temperatura corporal interna (T_i) y la actividad motora (A_m), observándose como ambos parámetros están perfectamente sincronizados con los ciclos de luz y oscuridad, obteniéndose en los ratones controles valores dentro de los rangos reportados en la literatura (Almeida et al 2012, Keeney et al 2001, McCoy et al 2013, Refinetti 2010, Solarewicz et al 2015). Para estudiar el posible papel del TRPM8 en los mecanismos termorreguladores que son inducidos por el frío ambiental, se registró cada 30 segundos la T_i y la A_m de ratones de peso similar, expuestos a tres temperaturas ambientales: 29 °C

(dentro del intervalo de termoneutralidad), 21 °C (frío leve y temperatura estándar de estabulación) y 17 °C (frío moderado).

Los ratones silvestres mantuvieron su temperatura corporal relativamente estable independientemente de la temperatura ambiental a la que fueron expuestos, lo que indica un funcionamiento adecuado de los mecanismos termorreguladores. Asimismo, la disminución de la temperatura ambiental produjo un incremento en la amplitud de los ciclos de la temperatura corporal de estos animales, debido a una disminución de la temperatura corporal interna durante la fase diurna y un incremento proporcional durante la fase nocturna. De este modo la temperatura media corporal se mantuvo constante. El incremento en la amplitud como consecuencia del descenso de la temperatura ambiental ha sido descrito previamente en distintas especies y se ha sugerido que está relacionado con un incremento en la actividad motora inducida por el frío (revisado en Refinetti 2010). De hecho, los cursos temporales de la actividad motora y la temperatura interna son generalmente similares. En animales nocturnos, ambos se incrementan durante la fase nocturna y posteriormente disminuyen durante la fase diurna, lo que ha llevado a hipotetizar que las variaciones en la temperatura corporal pudiesen constituir un efecto colateral de la actividad motora (Refinetti 2010). Sin embargo, estudios en ratones y en humanos han demostrado la persistencia de los ciclos diarios de temperatura corporal independientemente de los niveles de actividad motora (Krauchi & Wirz-Justice 1994, Weinert & Waterhouse 1998). En este trabajo se mostró que el descenso en la temperatura ambiental a 21 °C y 17 °C, produjo un incremento en la actividad motora en los ratones silvestres durante la fase diurna y nocturna, en relación a la condición de termoneutralidad (29 °C). Se ha sugerido que el frío ambiental induce el incremento en la actividad motora como una estrategia para incrementar la producción de calor, considerándose la locomoción como un mecanismo de termorregulación comportamental (Terrien et al 2011). Sin embargo, la evidencia reportada en la literatura acerca del efecto de la temperatura ambiental sobre la actividad locomotora es muy escasa y no del todo clara. Por ejemplo, se ha observado

en el lirón gris (*Glis glis*) que la disminución en la temperatura ambiental desde 25 °C hasta 15 °C, producía un importante incremento en la actividad motora (medida en la rueda para correr) (Pohl 1968). En la rata topo de Damara (*Fukomys damarensis*), se han observado niveles de actividad mínimos a 30 °C, máximos a 25 °C e intermedios a 20 °C (Oosthuizen & Bennett 2015). En ratones, se ha mostrado que la exposición aguda a 12 °C (partiendo de una temperatura de 24 °C) producía un incremento en la actividad locomotora espontánea (Ishii et al 1996), mientras que otros autores no observaron diferencias al estabular los animales durante tres días a distintas temperaturas ambientales (30, 26 y 22 °C) (Jhaveri et al 2007). Más recientemente, otro grupo mostró en ratones silvestres niveles mínimos de actividad motora a temperaturas ambientales de 33 °C y 4 °C, mientras que estos animales alcanzaron niveles mayores de actividad entre 30 y 12 °C (Abreu-Vieira et al 2015). La actividad motora es un mecanismo capaz de generar grandes cantidades de calor, pero es muy costoso a nivel energético (Abreu-Vieira et al 2015, Terrien et al 2011). Por lo tanto, se podría hipotetizar que el descenso en la temperatura ambiental, por debajo del intervalo de termoneutralidad, induciría un incremento en la actividad motora hasta que la demanda energética de este mecanismo fuera excesiva.

En este trabajo se demostró que la capacidad de mantener la temperatura corporal está alterada en los ratones *Trpm8*^{-/-}. Al igual que lo observado en los ratones silvestres, los animales con delección del canal iónico TRPM8 presentaron un incremento en la amplitud de los ciclos de temperatura interna y un aumento en la actividad motora como consecuencia del enfriamiento ambiental. A 21 °C, la temperatura corporal de estos ratones sufrió ligeras caídas principalmente durante la fase diurna, pero al ser expuestos a 17 °C, estos ratones experimentaron una hipotermia de ~0,7 °C, tanto en la fase diurna como nocturna. Datos de temperatura rectal obtenidos por nuestro grupo también han confirmado un descenso de 0.7 °C en los ratones con delección de TRPM8 tras exposiciones de 7 días a 10 °C y 6 horas a 4 °C. La utilización de los ratones *Trpm8*^{DT} permitió confirmar además la importancia de las neuronas que expresan el canal TRPM8 en la

puesta en marcha de los mecanismos termorreguladores durante el frío ambiental. En estos últimos ratones, en los que la ablación aguda de las neuronas que expresan el canal TRPM8 permite evitar mecanismos compensadores, se pudo demostrar una hipotermia de 0,8 °C al ser expuestos a 21 °C de temperatura ambiente. Esto sugiere la ausencia de canales termosensores de frío adicionales en estas neuronas o que su función en la regulación de la termorregulación es muy pequeña.

Otros grupos han descrito también la ausencia de diferencias en la temperatura corporal interna entre ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} expuestos a temperaturas ambientales ligeramente subneutrales (24-27 °C) (Almeida et al 2012, McCoy et al 2013, Tajino et al 2011). No obstante, tanto Almeida y colaboradores como Gavva y colaboradores observaron, a 26 ó 20 °C, respectivamente, el desarrollo de hipotermia en ratones y ratas tratados con antagonistas específicos del TRPM8 (Almeida et al 2012, Gavva et al 2012). La disminución en la temperatura corporal en los ratones *Trpm8*^{-/-} (0,7 °C) y la producida como resultado de la ablación de las neuronas TRPM8 positivas (0,8 °C) mostradas en el presente trabajo, son muy similares a la disminución reportada por Gavva y colaboradores tras la administración oral de un antagonista del TRPM8 (AMG2850, 100 mg/kg) en ratones (0,73 °C) (Gavva et al 2012), lo cual confirma un modesto papel de este canal en el mantenimiento de la temperatura corporal ante frío moderado. En otro trabajo reciente, los autores observaron un mayor grado de hipotermia (~2 °C) mediante la administración de un nuevo antagonista del TRPM8 (compuesto 5) y la exposición a una temperatura ambiental de 8 °C en ratones (Feketa et al 2014), aunque es necesario resaltar que estos autores emplearon una cepa de ratones (CD-1) diferente a la utilizada en nuestro estudio. En comparación con otros modelos experimentales, la disminución de la temperatura corporal observada en ausencia del TRPM8 o de las neuronas que expresan este canal iónico es pequeña. Por ejemplo, en ratones con un genotipo *ob/ob* o *db/db*, que presentan una mutación en el gen de leptina o de su receptor, respectivamente, el frío ambiental (4-10 °C) produce disminuciones en la temperatura corporal de aproximadamente 4 °C

(Cox & Powley 1977, Trayhurn 1979, Trayhurn et al 1977). La exposición de estos ratones a frío ambiental durante pocas horas (3 h a 4 °C), produce la muerte por hipotermia, lo cual pone de relieve la gran importancia del sistema de la leptina en el mantenimiento de la temperatura corporal.

La hipotermia experimentada por los ratones *Trpm8^{-/-}* y *Trpm8DTR*, cuando son expuestos a temperaturas ambientales moderadamente frías, es por tanto pequeña, pero estable y no se ve modificada en el tiempo. Entonces ¿qué aspectos de la termorregulación podrían estar alterados en ausencia de este canal? y ¿por qué el grado de hipotermia en estos animales no es más severo? Se ha demostrado que el canal iónico TRPM8 actúa como un termostato, cuyo umbral de activación se encuentra cercano a la termoneutralidad, de manera que cuando la temperatura de la piel cae por debajo de dicho valor como consecuencia del frío ambiental, se activarían los mecanismos termorreguladores para evitar que la temperatura corporal interna disminuya. Cabe la posibilidad de que existan otros termosensores que eviten un descenso más pronunciado de la temperatura corporal interna. Los datos aquí mostrados utilizando el modelo de los ratones *Trpm8DTR*, sugieren que las neuronas que expresan el canal TRPM8 no contienen un posible termosensor de respaldo que funcionase en ausencia del TRPM8. Por tanto, sería interesante estudiar si en los animales con la delección del *Trpm8*, existen cambios en la expresión de otras moléculas termosensibles que permitan arrojar más luz sobre este tema.

Como se mencionó en la introducción, los mecanismos termorreguladores responsables de la homotermia durante el frío ambiental se pueden agrupar en mecanismos autonómicos, hormonales y comportamentales que permiten minimizar la pérdida de calor, como la vasoconstricción cutánea, la adopción de diversas posturas y la búsqueda de lugares de abrigo, y en mecanismos de generación de calor como la termogénesis facultativa (ST y NST), la actividad motora y la ingesta. La vasoconstricción cutánea está regulada por el sistema nervioso simpático (Thomas & Palmiter 1997), y existe evidencia que apunta a que podría ser modulada por la actividad del TRPM8 (Johnson et al 2009). Así, Almeida y

colaboradores mostraron que la administración de un antagonista del TRPM8 en ratas, producía un retraso en la activación de la vasoconstricción cutánea estimulada por el frío, lo cual favorecería la pérdida de calor (Almeida et al 2012). Estudios de termografía de la cola de nuestros ratones expuestos a distintas temperaturas ambientales, nos ayudará a esclarecer si existen fallos en la vasoconstricción de los animales carentes del canal TRPM8. En nuestro estudio, no observamos diferencias entre la temperatura corporal interna de ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-} expuestos a 29 °C, lo cual parece sugerir que la termogénesis obligatoria no está alterada en los ratones con delección del canal TRPM8. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales como la determinación del gasto energético y de la conductividad térmica bajo las mismas condiciones, para poder alcanzar una respuesta concluyente.

El ratón *Trpm8*^{-/-} podría presentar alguna alteración en los mecanismos de termogénesis facultativa. Sin embargo, otros autores han demostrado que ratones carentes del canal TRPM8 o ratones silvestres tratados con antagonistas de dicho canal, no presentan alteraciones en el mecanismo de los escalofríos inducidos por el frío ambiental (Feketa et al 2013). Ello podría implicar que la activación del TRPM8 no es de gran relevancia en la termogénesis dependiente de escalofríos, o que algún otro termosensor es capaz de activar este mecanismo en su ausencia. En la actualidad miembros del grupo están realizando registros de EMG en ratones de estos grupos experimentales para estudiar con más detalle este aspecto. En relación a la termogénesis no dependiente de escalofríos (NST), se ha reportado la disminución de la función del BAT en ratas tratadas con un antagonista del TRPM8 (Almeida et al 2012) y en ratones *Trpm8*^{-/-} (Tajino et al 2011). Además, recientemente, se ha descrito la expresión funcional del canal TRPM8 en los adipocitos marrones (Ma et al 2012), relacionando de forma directa la actividad del TRPM8 con la NST. Es necesario destacar, sin embargo, que la alteración en la NST reportada por Tajino y colaboradores en los ratones *Trpm8*^{-/-}, fue medida utilizando enfriamiento agudo (1h a 10 °C), lo cual no es un sistema adecuado para medir la capacidad termogénica

del BAT, sino un modo de medir tolerancia al frío, la cual depende de la vasoconstricción, la conductancia térmica y de los mecanismos termogénicos (Cannon & Nedergaard 2011). Para determinar adecuadamente la actividad de la NST, es necesario mantener en frío a los animales durante un período de tiempo prolongado hasta que desaparezca por completo la actividad de la ST (Hart et al 1956). De hecho, experimentos preliminares de nuestro grupo en los que se administró un agonista de los receptores β_3 adrenérgicos (CL-316243) a ratones silvestres y *Trpm8*^{-/-}, con el fin de determinar el posible papel de este canal en la respuesta termogénica aguda del BAT, mostraron un incremento en la temperatura corporal similar en ambos genotipos. Ello parece indicar que la respuesta del BAT de los ratones carentes del canal TRPM8 no está alterada, aunque no se podrían descartar defectos en la activación simpática de este tejido.

Finalmente, también se podrían considerar alteraciones en los mecanismos termorreguladores comportamentales, principalmente la actividad motora y la ingesta. Como se mencionó anteriormente, el frío ambiental moderado induce el incremento de la actividad motora. En este sentido, el descenso de la temperatura ambiental produjo un aumento de la actividad motora, tanto en los ratones silvestres como en los *Trpm8*^{-/-}. Sin embargo, el incremento en la actividad motora fue ligeramente inferior en los ratones carentes del canal TRPM8, especialmente durante la exposición a 17°C de temperatura ambiente, lo que podría sugerir que esta variable está involucrada en el descenso de la temperatura interna sufrida por los ratones *Trpm8*^{-/-}. La determinación de la ingesta de estos animales a las diferentes temperaturas, nos ayudará a comprender los mecanismos que condicionan la modesta hipotermia experimentada por los ratones carentes del canal TRPM8 o de las neuronas que lo expresan.

5.3.2. Papel del TRPM8 durante la hipotermia inducida por el ayuno

Muchos animales, cuando se encuentran en condiciones ambientales desfavorables de restricción calórica (ayuno) y frío, entran en un estado hipometabólico e hipotérmico que favorece su supervivencia (Bechtold et al 2012, Geiser 2004, Nagashima et al 2003, Swoap 2008). Los mecanismos que rigen el desarrollo de este estado, altamente controlado, no se conocen con exactitud, pero existe evidencia de que la hipotermia inducida por ayuno presenta características circadianas, con un patrón temporal específico, observándose los máximos niveles de hipotermia y de disminución del gasto energético en las primeras horas de la fase diurna. La temporalidad viene condicionada por la actividad del SCN, ya que la eliminación de dicho núcleo ocasiona una ocurrencia aleatoria de este estado (Ruby & Zucker 1992). La hipotermia inducida por el ayuno en ratones se caracteriza por abruptas caídas y recuperaciones de la temperatura interna, que comienzan hacia el final de la fase nocturna y se extienden hasta el inicio de la fase diurna, recuperándose posteriormente los niveles normales de temperatura, a pesar de continuar la condición de ayuno (Bechtold et al 2012, Gluck et al 2006, Hudson & Scott 1978, Kanizsai et al 2009). En el presente trabajo, se observó este perfil hipotérmico tanto en ratones silvestres, como en ratones *Trpm8^{-/-}* y *Trpm8DTR⁺*, mediante un ayuno de 24 horas y a 21 °C de temperatura ambiente. Sin embargo, en los animales carentes del TRPM8 o de las neuronas que lo expresan, la hipotermia alcanzada fue más profunda que la observada en sus respectivos controles, alcanzando valores de temperatura corporal inferiores a 31 °C en el caso de los ratones *Trpm8^{-/-}*. En la literatura se ha definido el término torpor, como un estado hipometabólico e hipotérmico inducido por la depleción energética y el frío, en el que se alcanzan temperaturas corporales inferiores a 31 °C (revisado en Jensen et al 2013), por lo que se puede considerar que los ratones *Trpm8^{-/-}*, alcanzaron un estado tórpido bajo estas condiciones de ayuno. A pesar de que la inducción de la hipotermia por ayuno en ratones es independiente de

la temperatura externa, ya que se ha logrado inducir en un amplio rango de valores (16-28 °C), para lograr la entrada en un estado tórpido se requiere de bajas temperaturas ambientales y/o un ayuno más prolongado (3 días), aunque es necesario matizar que existen importantes diferencias entre cepas (Kanizsai et al 2009, Rikke et al 2003, Swoap et al 2006). En el caso de los ratones con delección de TRPM8, éstos entran en un estado tórpido durante un ayuno de solamente 24 horas a 21°C de temperatura ambiente. Datos preliminares nuestros indican que también entrarían en torpor cuando el ayuno se realiza a 23 °C. Aunque los mecanismos básicos que condicionan el estado de torpor no se conocen por completo, otros autores han demostrado que durante la condición de ayuno, hay una disminución del metabolismo basal (BMR), que es compensada por la activación de la vasoconstricción cutánea durante la fase nocturna. Sin embargo, durante la fase diurna la vasoconstricción cutánea estaría reducida, lo que incrementaría la pérdida de calor, permitiendo una mayor caída de la temperatura corporal (Nagashima et al 2003). De entrada se podría hipotetizar, entonces, que durante el ayuno, los ratones *Trpm8*^{-/-} y los *Trpm8DTR*⁺ podrían experimentar una disminución del BMR mayor que la de los ratones controles, produciéndose así un mayor descenso en la temperatura interna. No obstante, datos preliminares de nuestro grupo parecen indicar que la disminución en el BMR es similar entre los ratones silvestres y los ratones *Trpm8*^{-/-}, sugiriendo que el estado tórpido observado en estos animales depende de otras variables. Al igual que ocurre bajo frío ambiental, una posible función simpática vasoconstrictora defectuosa en los ratones *Trpm8*^{-/-}, actuaría a favor de un descenso excesivo de la temperatura corporal.

Se ha reportado que durante el ayuno, los niveles de las hormonas tiroideas están disminuidos, afectando al funcionamiento basal del metabolismo (Bechtold et al 2012, Coppola et al 2007). Adicionalmente, algunas hormonas relacionadas con el estado nutricional del organismo están directamente implicadas en el estado hipometabólico e hipotérmico inducido por el ayuno, como por ejemplo la ghrelina (Gluck et al 2006), la

leptina y la insulina (Ayala et al 2006, Gavrilova et al 1999, Moitra et al 1998, Swoap et al 2006). Por tanto, sería necesario descartar alteraciones en estos sistemas hormonales como participantes del estado tórpido en los ratones *Trpm8*^{-/-}.

Desde el punto de vista de la función canónica del TRPM8 como termorreceptor, ¿qué rol podría jugar en el desarrollo de esta hipotermia? Como se mencionó anteriormente, el estado hipometabólico e hipotérmico inducido por el ayuno está altamente controlado, y la temperatura corporal no es una excepción. Tal y como se muestra en nuestros registros, la caída en la temperatura corporal no es uniforme, sino que es interrumpida por episodios de recuperación (Heller et al 1977). Se hipotetiza que durante la entrada en el estado tórpido, la tolerancia que se presenta a esas temperaturas sub-eutérmicas se basa en el desplazamiento de la temperatura de referencia interna hipotalámica hacia valores inferiores, permitiendo que la temperatura corporal se aproxime a este nuevo valor mediante la reducción del metabolismo. Cuando la temperatura interna se acerca a esta nueva temperatura de referencia, el metabolismo se ve incrementado proporcionalmente para mantener la temperatura interna por encima de la referencia (revisado en Geiser 2004). Como se mencionó anteriormente, el TRPM8 actúa como un interruptor sensible a temperatura que se activa cuando la temperatura de la piel cae por debajo de un valor umbral cercano a la termoneutralidad (Tajino et al 2011). Los datos mostrados en el presente trabajo podrían sugerir que el TRPM8 también podría actuar como un termostato de la temperatura interna, controlando la caída de la temperatura durante el estado tórpido.

La recuperación espontánea de la temperatura corporal que ocurre durante la parte final del período diurno del ayuno, ocurre principalmente mediante la activación del BAT (Geiser 2004). Como se mencionó previamente, algunos autores han mostrado que la inhibición o la ausencia del TRPM8 podría resultar en una menor activación de la NST inducida por el frío ambiental (Almeida et al 2012, Tajino et al 2011). Sin embargo, en nuestros registros de temperatura en los animales en ayuno, se observa que

la recuperación de la temperatura corporal ocurre de forma similar en ratones de ambos genotipos, lo cual sugeriría que el funcionamiento de la NST no se encuentra muy alterado en los ratones carentes del canal TRPM8.

Finalmente, el término de torpor hace alusión, además de al estado hipometabólico e hipotérmico, al estado de inactividad. En nuestros registros se observó un incremento en la actividad motora de los ratones silvestres durante la fase nocturna del ayuno, con respecto a la condición de alimentación *ad libitum*, disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar valores mínimos durante la fase diurna, en concordancia con trabajos previos (Kanizsai et al 2009, Solymar et al 2015). La evidencia en la literatura sugiere que la actividad motora de ratones durante el ayuno puede variar dependiendo de distintos factores, como la duración de la restricción calórica, la temperatura ambiental, la forma de medición de la actividad motora (espontánea o en la rueda para correr) y la cepa de los ratones utilizada (Gelegen et al 2006, Overton & Williams 2004). Se ha sugerido la posibilidad de que este incremento en la actividad durante el ayuno tenga como objetivo la producción de calor, ya que dicho incremento no se observa en termoneutralidad (Overton & Williams 2004). El patrón de actividad mostrado por los ratones silvestres se observó también en los ratones *Trpm8*^{-/-}, sugiriendo que la actividad motora no está relacionada con el estado tórpido en estos animales. En los ratones *Trpm8DTR*⁺ apenas se detectaron disminuciones puntuales en la actividad motora durante el ayuno, lo que podría sugerir un papel muy modesto de estas neuronas sobre esta variable.

5.3.3. El oxaliplatino altera transitoriamente la termorregulación, de forma independiente al TRPM8.

Como se muestra en este trabajo, el desarrollo de la sensibilidad al frío inducida por el oxaliplatino no depende del canal iónico TRPM8. Sin embargo, este canal termosensible es el mediador de gran parte de las respuestas nocidéfensivas evocadas por el frío. Por ello, se estudió si la administración de este agente quimioterapéutico podría afectar la temperatura corporal. Aquí se describe como la administración de oxaliplatino por vía intraperitoneal, produce alteraciones transitorias de la temperatura corporal y la actividad motora a partir de dos horas tras de la inyección. A pesar de que este efecto se observó tanto en ratones silvestres como *Trpm8^{-/-}*, el efecto en estos últimos fue más duradero, observándose alteraciones en la temperatura interna incluso tres días después de la administración del fármaco. Otros autores, en un estudio previo, no demostraron cambios en la temperatura rectal de ratas tras cinco o siete días después de la administración intravenosa del oxaliplatino (17 mg/kg)(Boughattas et al 1989). Dado que dicho trabajo no estudió el efecto inmediato del oxaliplatino sobre la temperatura, ambos resultados pueden explicarse si tenemos en cuenta que el efecto del oxaliplatino sobre la temperatura es transitorio. La información disponible acerca del efecto de la quimioterapia sobre la termorregulación es escasa. Se ha reportado en algunos pacientes de linfomas malignos, la aparición de una hipotermia transitoria tras el tratamiento con cisplatino, otro fármaco quimioterapéutico basado en el platino (Gabrys & Mazur 1995). También se han reportado casos similares empleando distintos fármacos quimioterapéuticos como la vinblastina y prednisolona (Jackson et al 1983, Shepshelovich et al 2014), sugiriéndose como posible causa el desarrollo de neuropatías autonómicas, lo cual resultaría en la sobre-estimulación de la vasodilatación cutánea (Shepshelovich et al 2014). Adicionalmente, se ha reportado que el tratamiento con algunos agentes quimioterapéuticos puede disminuir la

producción de hormonas tiroideas (Fujiwara et al 2013, Huang et al 2013). Entre los síntomas más comunes asociados a una condición hipotiroidea en humanos, se encuentran la fatiga y la intolerancia al frío (Chakera et al 2012). La fatiga asociada a la quimioterapia, difiere de la fatiga normal ya que no es revertida por descanso y afecta entre 82 y el 96 % de los pacientes tratados (IOP 2004). Estos síntomas observados en humanos, podrían relacionarse, en parte, con la disminución en la actividad motora y la disrupción de la normotermia que hemos observado en los ratones tras el tratamiento con el oxaliplatino. Este estudio abre el camino para próximos estudios que permitan esclarecer el alcance del efecto del oxaliplatino sobre los mecanismos termorreguladores y de los mecanismos moleculares implicados.

5.4. Visión general

La evidencia mostrada en este trabajo ayuda a enfatizar la gran importancia que posee el canal iónico TRPM8 como el principal termosensor de frío. La utilización de ratones *Trpa1^{-/-}*, *Trpm8^{-/-}* y *Trpm8DTR⁺*, nos permitió aportar una perspectiva más completa acerca de los roles de estos canales iónicos en la termosensación. Más aún, nuestro estudio también permitió demostrar la participación del TRPM8 en los mecanismos termorreguladores que son activados por el frío ambiental y el ayuno. Toda esta evidencia invita a pensar en el potencial terapéutico que conllevaría su modulación selectiva. Por ejemplo, se podría aprovechar su inhibición para facilitar la inducción de una hipotermia controlada en pacientes de accidentes cerebrovasculares e infartos al miocardio; tratamiento que ha mostrado resultados positivos en la recuperación de dichos pacientes (Nolan et al 2003, Wu & Grotta 2013).

Debido a que la modulación del canal iónico TRPM8 puede producir alteraciones en la termorregulación, su modulación con fines analgésicos quizá no sea la mejor opción (Almeida et al 2012). Por el contrario, los datos presentados en este trabajo, en conjunto con la evidencia en la literatura, apuntan a que el canal iónico TRPA1 no participa como sensor de frío *in vivo*

ni está involucrado en la termorregulación (de Oliveira et al 2014). Asimismo, pudimos confirmar la vital importancia que tiene el canal TRPA1 en el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica y a frío características de la neuropatía inducida por el oxaliplatino. Otros trabajos también han mostrado un papel muy importante del TRPA1 en otras condiciones patológicas como en el dolor inflamatorio secundario producido infecciones bacterianas (Meseguer et al 2014), la neuropatía diabética (Wei et al 2010) entre otros (Nilius et al 2012). Por tanto, la evidencia sugiere que la modulación de la actividad TRPA1, incluyendo la administración de antioxidantes, podría representar una de las piedras angulares en tratamientos del dolor a corto y mediano plazo.



6. Conclusiones

1. A nivel periférico, tanto el canal iónico TRPM8 como las neuronas en las que se expresa, son los principales mediadores de las respuestas conductuales nocidefensivas activadas por frío, tanto en condiciones fisiológicas como durante la neuropatía inducida por oxaliplatino.
2. El canal de fuga de K^+ de doble poro TASK3, el cual presenta unos niveles de expresión elevados en las neuronas TRPM8 positivas, tiene un papel modesto en la modulación de la sensibilidad a estímulos de frío.
3. El canal iónico TRPA1 es suficiente y necesario para el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica y al frío inducido por el oxaliplatino. Es probable que involucre la participación de especies reactivas (ROS y RNS).
4. Las respuestas de frotamiento ocular activadas por la aplicación de icilina sobre la superficie ocular, son mediadas principalmente por el canal iónico TRPM8 y no son alteradas por la administración sistémica de oxaliplatino.
5. El canal iónico TRPM8, así como las neuronas que lo expresan, poseen un modesto papel en el mantenimiento de la temperatura corporal en una situación de frío ambiental. Sin embargo, este papel gana importancia durante condiciones de depleción energética.
6. La administración intraperitoneal de oxaliplatino en ratones produce alteraciones transitorias en la temperatura corporal y la actividad motora, mediante un mecanismo independiente del canal iónico TRPM8.

7. Referencias

- Abreu-Vieira G, Xiao C, Gavrilova O, Reitman ML. 2015. Integration of body temperature into the analysis of energy expenditure in the mouse. *Molecular metabolism*
- Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J, Lepier A, Eckel F, Lersch C. 2000. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na⁺ channel kinetics on rat sensory neurons. *European journal of pharmacology* 406: 8
- Almaraz L, Manenschijn JA, de la Pena E, Viana F. 2014. TRPM8 In *Mamalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, ed. B Nilius, V Flockerzi: Springer
- Almeida MC, Hew-Butler T, Soriano RN, Rao S, Wang W, et al. 2012. Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32: 2086-99
- Andersson DA, Chase HW, Bevan S. 2004. TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 6
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. 2008. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 2485-94
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. 2009. Cloquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8374-9
- Andersson DA, Nash M, Bevan S. 2007. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 3347-55
- Argyriou AA, Cavaletti G, Antonacopoulou A, Genazzani AA, Briani C, et al. 2013. Voltage-gated sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: results from a prospective multicenter study. *Cancer* 119: 3570-7
- Aschoff J. 1982. The circadian rhythm of body temperature as a function of body size In *Companion to animal physiology*, ed. CR Taylor, K Johansen, L Bolis, pp. 16. Cambridge: Cambridge Univ. Press
- Axelsson HE, Minde JK, Sonesson A, Toolanen G, Högestätt ED, Zygmunt PM. 2009. Transient receptor potential vanilloid 1, vanilloid 2 and melastatin 8 immunoreactive nerve fibers in human skin from individuals with and without Norrbottnian congenital insensitivity to pain. *Neuroscience* 162: 11
- Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP, Wasserman DH. 2006. Considerations in the Design of Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamps in the Conscious Mouse. *Diabetes* 55: 8
- Baker DE. 2003. Oxaliplatin: a new drug for the treatment of metastatic carcinoma of the colon or rectum. *Rev Gastroenterol Disord* 3: 8
- Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A. 2007. From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* 17: 490-7
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, et al. 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-57
- Barabas ME, Kossyrevva EA, Stucky CL. 2012. TRPA1 is functionally expressed primarily by IB4-binding, non-peptidergic mouse and rat sensory neurons. *PLoS one* 7

- Barclay JL, Tsang AH, Oster H. 2012. Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. *Progress in brain research* 199: 163-81
- Barrot M. 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211: 39-50
- Basbaum AI, Jessell TM. 2013. Pain In *Principles of Neural Sciences*, ed. E Kandel, J Schwartz, T Jessell, S Siegelbaum, AJ Hudspeth, pp. 1760: McGraw-Hill Medical
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, et al. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-82
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, et al. 2007. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448: 204-8
- Bechtold DA, Sidibe A, Saer BR, Li J, Hand LE, et al. 2012. A role for the melatonin-related receptor GPR50 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor. *Current biology : CB* 22: 70-7
- Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. 2004. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British journal of pharmacology* 141: 9
- Beijers AJ, Mols F, Vreugdenhil G. 2014. A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 22: 1999-2007
- Belmonte C, Brock JA, Viana F. 2009. Converting cold into pain. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 196: 13-30
- Belmonte C, Viana F. 2008. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular pain* 4: 14
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerfull Approach to Multiple Testing. *J R Statist Soc B* 1: 13
- Bennett BK, Park SB, Lin CS, Friedlander ML, Kiernan MC, Goldstein D. 2012. Impact of oxaliplatin-induced neuropathy: a patient perspective. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 20: 2959-67
- Benoit E, Brienza S, Dubois JM. 2006. Oxaliplatin, an anticancer agent that affects both Na⁺ and K⁺ channels in frog peripheral myelinated axons. *Gen Physiol Biophys* 25: 14
- Bereiter DA, Okamoto K, Bereiter DF. 2005. Effect of persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region on acute mustard oil-induced excitation of trigeminal subnucleus caudalis neurons in male and female rats. *Pain* 117: 58-67
- Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. 2008. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *The Journal of clinical investigation* 118: 1899-910
- Bessou P, Perl ER. 1969. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of neurophysiology* 32: 19
- Bevan S, Hothi H, Hughes G, James IF, Rang HP, et al. 1992. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British journal of pharmacology* 107: 9
- Bidaux G, Beck B, Zholos A, Gordienko D, Lemonnier L, et al. 2012. Regulation of activity of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel by its short isoforms. *The Journal of biological chemistry* 287: 2948-62

- Boughattas NA, Lévi F, Fournier C, Lemaigre G, Roulon A, et al. 1989. Circadian Rhythm in Toxicities and Tissue Uptake of 1,2-Diamminocyclohexane(*trans*-1)oxalatoplatinum(II) in Mice. *Cancer Research* 49: 8
- Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. 2008. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136: 8
- Boulant JA, Dean JB. 1986. Temperature Receptors in the Central Nervous System. *Ann Rev Physiol* 48: 20
- Brenner DS, Golden JP, Gereau RW. 2012. A Novel Behavioral Assay for Measuring Cold Sensation in Mice. *PLoS one* 7
- Brenner DS, Golden JP, Vogt SK, Dhaka A, Story GM, Gereau RW. 2014. A dynamic set point for thermal adaptation requires phospholipase C-mediated regulation of TRPM8 in vivo. *Pain*
- Briani C, Argyriou AA, Izquierdo C, Velasco R, Campagnolo M, et al. 2014. Long-term course of oxaliplatin-induced polyneuropathy: a prospective 2-year follow-up study. *J Per Nerv Sys* 19: 7
- Brignell JL, Chapman V, Kendall DA. 2008. Comparison of icilin- and cold-evoked responses of spinal neurones, and their modulation of mechanical activity, in a model of neuropathic pain. *Brain research* 1215: 87-96
- Broomand A, Jerremalm E, Yachnin J, Ehrsson H, Elinder F. 2009. Oxaliplatin neurotoxicity--no general ion channel surface-charge effect. *Journal of negative results in biomedicine* 8: 2
- Brzezinski A. 1997. Melatonin in Humans. *The New England journal of medicine* 336: 10
- Burgess PR, Perl ER. 1967. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *The Journal of physiology* 190: 20
- Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. 2015. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology* 6: 36
- Campero M, Serra J, Bostock H, Ochoa JL. 2001. Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin. *The Journal of physiology* 535: 11
- Cannon B, Nedergaard J. 2004. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 84: 83
- Cannon B, Nedergaard J. 2011. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *The Journal of experimental biology* 214: 242-53
- Cassidy J, Taberero J, Twelves C, Brunet R, Butts C, et al. 2004. XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22: 2084-91
- Caterina MJ. 2000. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science* 288: 306-13
- Caterina MJ. 2007a. Chemical biology: Sticky spices. *Nature* 445: 2
- Caterina MJ. 2007b. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: 13
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24
- Chakera AJ, Pearce SH, Vaidya B. 2012. Treatment for primary hypothyroidism: current approaches and future possibilities. *Drug design, development and therapy* 6: 1-11

- Chaparro LE, Wiffen PJ, Moore RA, Gilron I. 2012. Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 7
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53: 9
- Chaplan SR, Sorkin LS. 1997. Agonizing Over Pain Terminology. *Pain Forum* 6: 7
- Chen J, Joshi SK, DiDomenico S, Perner RJ, Mikusa JP, et al. 2011. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. *Pain* 152: 1165-72
- Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, et al. 2013. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nature communications* 4: 2501
- Chiechio S, Copani A, Nicoletti F, Gereau IV RW. 2006. L-Acetylcarnitine: A Proposed Therapeutic Agent for Painful Peripheral Neuropathies. *Curr Pharmacol* 4: 5
- Chuang HH, Neuhauser WM, Julius D. 2004. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* 43: 859-69
- Clapham DE. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 8
- Clapham JC. 2012. Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology* 63: 111-23
- Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. 2014. Structure of thermally activated TRP channels. *Current topics in membranes* 74: 181-211
- Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Jr., Wang Y, Lawrence D, et al. 2007. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54: 379-86
- Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, et al. 2007. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell metabolism* 5: 21-33
- Corey DP, García-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, et al. 2004. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432: 8
- Cornelissen G. 2014. Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 11: 24
- Cosens DJ, Manning A. 1969. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224: 3
- Cox JE, Powley TL. 1977. Development of obesity in diabetic mice pair-fed with lean siblings. *J Comp Physiol Psychol* 91: 12
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, et al. 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 5
- Davis KD. 1998. Cold-induced pain and prickle in the glabrous and hairy skin. *Pain* 75: 11
- Davis KD, Pope GE. 2002. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* 98: 7
- de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, et al. 2000. Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 18: 10
- De Grandis D. 2007. Acetyl-L-Carnitine for the Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *CNS Drugs* 21: 4
- de Oliveira C, Garami A, Lehto SG, Pakai E, Tekus V, et al. 2014. Transient receptor potential channel ankyrin-1 is not a cold sensor for autonomic thermoregulation in rodents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 4445-52
- De Petrocellis L, Starowicz K, Moriello AS, Vivese M, Orlando P, Di Marzo V. 2007. Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8):

- effect of cAMP, cannabinoid CB(1) receptors and endovanilloids. *Experimental cell research* 313: 1911-20
- del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, et al. 2010. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 15165-74
- Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, Francois A, Ling B, et al. 2011. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO molecular medicine* 3: 266-78
- Deuis JR, Zimmermann K, Romanovsky AA, Possani LD, Cabot PJ, et al. 2013. An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain* 154: 1749-57
- Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A. 2008. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 566-75
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. 2007. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54: 371-8
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology* 72: 517-49
- Digel I. 2011. Primary thermosensory events in cells. *Advances in experimental medicine and biology* 704: 451-68
- Djouhri L, Lawson SN. 2004. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain research. Brain research reviews* 46: 131-45
- Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. 1997. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *British journal of pharmacology* 121: 7
- Dubin AE, Patapoutian A. 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation* 120: 3760-72
- Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, et al. 2008. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Molecular pain* 4: 48
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. 2008a. TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 7863-75
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. 2008b. TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)* 2: 429-38
- Farazifard R, Safarpour F, Sheibani V, Javan M. 2005. Eye-wiping test: a sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. *Brain research. Brain research protocols* 16: 44-9
- Feketa VV, Balasubramanian A, Flores CM, Player MR, Marrelli SP. 2013. Shivering and tachycardic responses to external cooling in mice are substantially suppressed by TRPV1 activation but not by TRPM8 inhibition. *The American journal of physiology* 305: 11
- Feketa VV, Zhang Y, Cao Z, Balasubramanian A, Flores CM, et al. 2014. Transient receptor potential melastatin 8 channel inhibition potentiates the hypothermic response to

- transient receptor potential vanilloid 1 activation in the conscious mouse. *Critical care medicine* 42: e355-63
- Fernández-Peña C, Viana F. 2013. Targeting TRPM8 for pain relief. *Open J Pain* 6: 11
- Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, Ferrer-Montiel A. 2014. Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes* 4: 525-64
- Fields HL. 2011. The doctor's dilemma: opiate analgesics and chronic pain. *Neuron* 69: 591-4
- Flatters SJ, Bennett GJ. 2004. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109: 150-61
- Flockerzi V, Nilius B. 2014. TRPs: Truly Remarkable Proteins In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, pp. 16: Springer
- Foulkes T, Wood JN. 2007. Mechanisms of Cold Pain. *Channels* 1: 7
- Fujiwara Y, Chayahara N, Mukohara T, Kiyota N, Tomioka H, et al. 2013. Hypothyroidism in patients with colorectal carcinoma treated with fluoropyrimidines. *Oncology reports* 30: 1802-6
- Gabrys K, Mazur G. 1995. Hypothermia during chemotherapy for lymphomas. *Pol Arch Med Wewn* 93
- Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. 2009. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neuroscience letters* 458: 93-5
- Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Mason M, Castle AL, et al. 1999. Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. *PNAS* 96: 6
- Gavva NR, Davis C, Lehto SG, Rao S, Wang W, Zhu DX. 2012. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels are involved in body temperature regulation. *Molecular pain* 8: 36
- Gees M, Owsianik G, Voets T. 2012. TRP Channels.
- Geiser F. 2004. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annual review of physiology* 66: 239-74
- Gelegen C, Collier DA, Campbell IC, Oppelaar, Kas MJH. 2006. Behavioral, physiological, and molecular differences in response to dietary restriction in three inbred mouse strains. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: 8
- Gentry C, Stoakley N, Andersson DA, Bevan S. 2010. The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Molecular pain* 6: 4
- Gluck EF, Stephens N, Swoap SJ. 2006. Peripheral ghrelin deepens torpor bouts in mice through the arcuate nucleus neuropeptide Y signaling pathway. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 291: 7
- Gold MS. 2013. Molecular Biology of Sensory Transduction In *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, ed. SB McMahon, M Koltzenburg, I Tracey, D Turk. Philadelphia: ELSEVIER Saunders
- Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR. 2014. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nature Rev Immunol* 14: 15
- Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, Lapied B, Pelhate M, Gamelin E. 2001. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. *Journal of neurophysiology* 85: 5
- Hagenacker T, Lampe M, Schafers M. 2014. Icilin reduces voltage-gated calcium channel currents in naive and injured DRG neurons in the rat spinal nerve ligation model. *Brain research* 1557: 171-9

- Hammel HT, Elsner RW, Le Messurier DH, Andersen HT, Milan FA. 1959. Thermal and metabolic responses of the Australian aborigine exposed to moderate cold in summer. *J Appl Physiol* 14: 11
- Hammel HT, Hildes JA, Jackson DC, Andersen HT. 1963. *THERMAL AND METABOLIC RESPONSE OF THE KALAHARI BUSHMEN TO MODERATE COLD EXPOSURE AT NIGHT*. Arctic Wainwright, Alaska: Air Force Systems Command.
- Hany F, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. 2002. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29: 6
- Hart JS, Heroux O, Depocas F. 1956. Cold Acclimation and the Electromyogram of Unanesthetized Rats. *J Appl Physiol* 9: 5
- Heller HC, Colliver GW, Beard J. 1977. Thermoregulation during Entrance into Hibernation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 369: 5
- Hensel H. 1981. *Monographs of the Physiological Society: Thermoreception and Temperature Regulation*. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Herszényi L, Tulassay Z. 2010. Epidemiology of gastrointestinal and liver tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 14: 10
- Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. 2006. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 19564-8
- Honma S, Ono D, Suzuki Y, Inagaki N, Yoshikawa T, et al. 2012. Suprachiasmatic nucleus: cellular clocks and networks. *Progress in brain research* 199: 129-41
- Hua LH, Strigo IA, Baxter LC, Johnson SC, Craig AD. 2005. Anteroposterior somatotopy of innocuous cooling activation focus in human dorsal posterior insular cortex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: 7
- Huang J, Jin L, Ji G, Xing L, Xu C, et al. 2013. Implication from thyroid function decreasing during chemotherapy in breast cancer patients: chemosensitization role of triiodothyronine. *BMC cancer* 13: 12
- Huang W, Ramsey KM, Marcheiva B, Bass J. 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of clinical investigation* 121: 2133-41
- Hudson JW, Scott IM. 1978. Daily Torpor in the Laboratory Mouse, *Mus musculus* Var. Albino. *Physiol Zoology* 52: 14
- Iop A. 2004. Fatigue in cancer patients receiving chemotherapy: an analysis of published studies. *Annals of Oncology* 15: 712-20
- Ishii K, Kuwahara M, Tsubone H, Sugano S. 1996. The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature changes. *Laboratory animals* 30: 6
- Jackson MJ, Proctor SJ, Leonard RCF. 1983. Hypothermia during chemotherapy for Hodgkin's disease. *Br Med J* 286: 2
- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. 1999. An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 274: 9
- Jensen TL, Kiersgaard MK, Sorensen DB, Mikkelsen LF. 2013. Fasting of mice: a review. *Laboratory animals* 47: 225-40
- Jhaveri KA, Trammell RA, Toth LA. 2007. Effect of environmental temperature on sleep, locomotor activity, core body temperature and immune responses of C57BL/6J mice. *Brain Behav Immun* 21: 20

- Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P, Zholos AV. 2009. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 296: 10
- Jong NN, Nakanishi T, Liu JJ, Tamai I, McKeage MJ. 2011. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 338: 537-47
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, et al. 2004. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-5
- Joseph EK, Chen X, Bogen O, Levine JD. 2008. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 9: 463-72
- Julius D. 2013. TRP channels and pain. *Annual review of cell and developmental biology* 29: 355-84
- Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 8
- Kalsbeek A, Galidou ML, Palm IF, van der Vliet J, Simonneaux V, et al. 2000. Melatonin sees the light: blocking GABAergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin *The European journal of neuroscience* 12: 9
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. 2013. *Principles of Neural Science*. pp. 1760. McGraw-Hill Medical.
- Kanizsai P, Garami A, Solymar M, Szolcsanyi J, Szelenyi Z. 2009. Energetics of fasting heterothermia in TRPV1-KO and wild type mice. *Physiology & behavior* 96: 149-54
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, et al. 2009. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 1273-8
- Katsuda H, Yamashita M, Katsura H, Yu J, Waki Y, et al. 2010. Protecting Cisplatin-Induced Nephrotoxicity with Cimetidine Does Not Affect Antitumor Activity. *Biol Pharm Bull* 33: 5
- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. 2006. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Experimental neurology* 200: 112-23
- Keeney AJ, Hogg S, Marsden CA. 2001. Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. *Physiology & behavior* 74: 8
- Kiernan MC. 2007. The pain with platinum: Oxaliplatin and neuropathy. *Eur J Cancer* 43: 3
- Kingma BRM, Frijns AJH, Schellen L, van Marken Lichtenbelt WD. 2014. Beyond the classic thermoneutral zone. *Temperature* 1: 142-49
- Knowlton W, McKemy DD. 2011. TRPM8: From cold to Cancer, Peppermint to pain. *Curr Pharma Biotechnol* 12: 10
- Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD. 2010. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150: 340-50
- Knowlton WM, Daniels RL, Palkar R, McCoy DD, McKemy DD. 2011. Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice. *PLoS one* 6
- Knowlton WM, Palkar R, Lippoldt EK, McCoy DD, Baluch F, et al. 2013. A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold,

- cold pain, and cooling-mediated analgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 12
- Kobayashi S, Hori A, Matsumura K, Hosokawa H. 2006. Point: Heat-induced membrane depolarization of hypothalamic neurons: a putative mechanism of central thermosensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1479-80; discussion R84
- Koivisto A. 2012. Sustained TRPA1 activation in vivo. *Acta physiologica* 204: 248-54
- Koivisto A, Chapman H, Jalava N, Korjamo T, Saarnilehto M, et al. 2014. TRPA1: A Transducer and Amplifier of Pain and Inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114: 6
- Kraüchi K, Wirz-Justice A. 1994. Circadian rhythm of heat production, heart rate, and skin and core temperature under unmasking conditions in men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267: 11
- Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, et al. 2010. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66: 671-80
- Kuhn FJ, Kuhn C, Luckhoff A. 2009. Inhibition of TRPM8 by icilin distinct from desensitization induced by menthol and menthol derivatives. *The Journal of biological chemistry* 284: 4102-11
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, et al. 2006. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50: 277-89
- Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL. 2009. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 4808-19
- Labianca R, Beretta G, Gatta G, de Braud F, Wils J. 2004. Colon cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 51: 145-70
- Lashinger ESR, Steingra MS, Hieble P, Leon LA, Gardner SD, et al. 2008. AMTB, a TRPM8 channel blocker: evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: 8
- Lawson SN. 1996. Electrophysiological properties of neurones with CGRP-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia. *The Journal of comparative neurology* 365: 12
- Lehky TJ, Leonard GD, Wilson RH, Grem JL, Floeter MK. 2004. Oxaliplatin-induced neurotoxicity: acute hyperexcitability and chronic neuropathy. *Muscle Nerve* 29: 6
- Lema MJ, Foley KM, Hausheer FH. 2010. Types and epidemiology of cancer-related neuropathic pain: the intersection of cancer pain and neuropathic pain. *The oncologist* 15 Suppl 2: 3-8
- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504: 107-12
- Ling B, Authier N, Balayssac D, Eschalier A, Coudore F. 2007a. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain* 128: 10
- Ling B, Coudoré-Civialea MA, Balayssaca D, Eschaliera A, Coudoréa F, Authiera N. 2007b. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology* 234: 9
- Liu B, Linley JE, Du X, Zhang X, Ooi L, et al. 2010. The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels

- and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *The Journal of clinical investigation* 120: 13
- Liu B, Qin F. 2005. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 1674-81
- Loeser JD, Treede RD. 2008. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 137: 5
- Lumpkin EA, Caterina MJ. 2007. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 445: 858-65
- Ma Q. 2010. Labeled lines meet and talk: population coding of somatic sensations. *The Journal of clinical investigation* 120: 3773-8
- Ma S, Yu H, Zhao Z, Luo Z, Chen J, et al. 2012. Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *Journal of molecular cell biology* 4: 88-96
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, et al. 2007a. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445: 541-5
- MacPherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, et al. 2007b. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445: 6
- Madrid R, Donovan-Rodriguez T, Meseguer V, Acosta MC, Belmonte C, Viana F. 2006. Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 12512-25
- Mälkiä A, Madrid R, Meseguer V, de la Peña E, Valero M, et al. 2007. Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *The Journal of physiology* 581: 20
- McCarthy PW, Lawson SN. 1989. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience* 28: 9
- McCoy DD, Zhou L, Nguyen A-K, Watts AG, Donovan CM, McKemy DD. 2013. Enhanced insulin clearance in mice lacking TRPM8 channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: 11
- McCoy ES, Zylka MJ. 2014. Enhanced behavioral responses to cold stimuli following CGRP α sensory neuron ablation are dependent on TRPM8. *Molecular pain* 10: 9
- McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, Didomenico S, Kort ME, Kym PR. 2010. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Molecular pain* 6: 14
- McGlone F, Reilly D. 2010. The cutaneous sensory system. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34: 148-59
- McKemy DD. 2013. The molecular and cellular basis of cold sensation. *ACS chemical neuroscience* 4: 238-47
- McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 7
- McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk D. 2013. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Philadelphia: ELSEVIER Saunders.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, et al. 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 13525-30

- McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. 2009. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular cancer therapeutics* 8: 10-6
- Morrow M, Spoelstra K, Roenneberg T. 2005. The circadian cycle: daily rhythms from behaviour to genes. *EMBO Rep* 6: 930-5
- Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B, et al. 2014. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nature communications* 5: 3125
- Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodriguez T, et al. 2008. Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 576-86
- Milenkovic N, Zhao WJ, Walcher J, Albert T, Siemens J, et al. 2014. A somatosensory circuit for cooling perception in mice. *Nature neuroscience* 17: 1560-6
- Minke B, Wu C-F, Pak WL. 1975. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258: 4
- Moiseenkova-Bell VY, Stanciu LA, Serysheva II, Tobe BJ, Wensel TG. 2008. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 5
- Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, et al. 1998. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes & Development* 12: 14
- Montell C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005
- Montell C, Rubin GM. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Cell* 2: 11
- Moparthi L, Survery S, Kreir M, Simonsen C, Kjellbom P, et al. 2014. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 16901-6
- Morenilla-Palao C, Luis E, Fernandez-Peña C, Quintero E, Weaver JL, et al. 2014. Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a novel role of TASK-3 in thermosensation. *Cell Reports* 8: 12
- Morenilla-Palao C, Pertusa M, Meseguer V, Cabedo H, Viana F. 2009. Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *The Journal of biological chemistry* 284: 9215-24
- Morin C, Bushnell MC. 1998. Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: a psychophysical study. *Pain* 74: 7
- Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. 2014. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell metabolism* 19: 741-56
- Morrison SF, Nakamura K. 2011. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci*: 31
- Muggia FM. 2004. Recent updates in the clinical use of platinum compounds for the treatment of gynecologic cancers. *Semin Oncol* 6: 8
- Nadal X, Baños J-E, Kieffer BL, Maldonado R. 2006. Neuropathic pain is enhanced in δ -opioid receptor knockout mice. *The European journal of neuroscience* 23: 5
- Nagashima K, Nakai S, Matsue K, Konishi M, Tanaka M, Kanosue K. 2003. Effects of fasting on thermoregulatory processes and the daily oscillations in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1486-93

- Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. 2005. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 10
- Nakamura K, Morrison SF. 2008. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nature neuroscience* 11: 10
- Nakayama T, Hammel HT, Hardy JD, Eisenman JS. 1963. Thermal stimulation of electrical activity of single units of the preoptic region. *The American journal of physiology* 204: 5
- Nassini R, Gees M, Harrison S, De Siena G, Materazzi S, et al. 2011. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 152: 1621-31
- Nativi C, Gualdani R, Dragoni E, Di Cesare Mannelli L, Sostegni S, et al. 2013. A TRPA1 antagonist reverts oxaliplatin-induced neuropathic pain. *Scientific reports* 3: 2005
- Nelson DL, Cox MM. 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Nilius B, Appendino G, Owsianik G. 2012. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 464: 425-58
- Nilius B, Owsianik G. 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12: 11
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. 2005. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *The Journal of clinical investigation* 115: 2393-401
- Obregon MJ. 2007. Obesidad, termogénesis y hormonas tiroideas. *Rev Esp Obes* 5: 12
- Obregon MJ. 2014. Adipose tissues and thyroid hormones. *Frontiers in physiology* 5: 479
- Oosthuizen MK, Bennett NC. 2015. The effect of ambient temperature on locomotor activity patterns in reproductive and non-reproductive female Damaraland mole-rats. *J Zool* N/A
- Overton JM, Williams TD. 2004. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. *Physiology & behavior* 81: 749-54
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global Cancer Statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians* 55: 74-108
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, et al. 2010. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature medicine* 16: 1396-9
- Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature reviews. Neuroscience* 4: 529-39
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. 2015. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520: 511-7
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, et al. 2002. A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108: 10
- Perl ER. 2011. Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. *Progress in neurobiology* 94: 20-38
- Pertusa M, Madrid R, Morenilla-Palao C, Belmonte C, Viana F. 2012. N-glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons. *The Journal of biological chemistry* 287: 18218-29

- Petit T, Benider A, Yovine A, Bougnoux P, Spaeth D, et al. 2006. Phase II study of an oxaliplatin/vinorelbine combination in patients with anthracycline- and taxane-pre-treated metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs* 17: 7
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, et al. 2007. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Molecular pain* 3: 40
- Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. 2013. The Cellular Code for Mammalian Thermosensation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33: 9
- Pohl H. 1968. Einfluß der Temperatur auf die freilaufende circadiane Aktivitätsperiodik bei Warmblütern. *Z Vergleich Physiol* 58: 18
- Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, Rosie R, Anderson H, et al. 2006. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Current biology : CB* 16: 1591-605
- Raffa RB, Langford R, Pergolizzi Jr. JV, Porreca F, Tallarida RJ. 2013. *Chemotherapy-induced neuropathic pain*. CRC Press.
- Rajan S, Wischmeyer E, Xin Liu G, Preisig-Muller R, Daut J, et al. 2000. TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *The Journal of biological chemistry* 275: 16650-7
- Refinetti R. 2010. The circadian rhythm of body temperature. *Frontiers in Bioscience* 15: 31
- Reid G, Flonta ML. 2001a. Cold current in thermoreceptive neurons. *Nature* 413: 1
- Reid G, Flonta ML. 2001b. Cold transduction inhibition of background potassium conductance in rat primary sensory neurones. *Neuroscience letters* 297: 4
- Ribas GS, Vargas CR, Wajner M. 2014. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene* 533: 469-76
- Rikke BA, Yergli JE, Battaglia ME, Nagy TR, Allison DB, Johnson TE. 2003. Strain variation in the response of body temperature to dietary restriction. *Mechanisms of Ageing and Development* 124: 663-78
- Ringkamp M, Raja SN, Campbell JN. 2013. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception In *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, ed. SB McMahon, M Koltzenburg, I Tracey, D Turk. Philadelphia: ELSEVIER Saunders
- Robbins A, Kurose M, Winterson BJ, Meng ID. 2012. Menthol Activation of Corneal Cool Cells Induces TRPM8-Mediated Lacrimation but Not Nociceptive Responses in rodents. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 53: 9
- Romanovsky AA. 2007. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R37-46
- Romanovsky AA. 2014. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta physiologica* 210: 498-507
- Ruby NF. 2003. Hibernation: When Good Clocks Go Cold. *Journal of biological rhythms* 18: 275-86
- Ruby NF, Zucker I. 1992. Daily torpor in the absence of the suprachiasmatic nucleus in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 263: 10
- Schäffer K, Braun HA. 1990. Modulation of periodic cold receptor activity by ouabain. *Eur J Physiol* 417: 9
- Schepers RJ, Ringkamp M. 2010. Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34: 177-84

- Screnci D, McKeage MJ, Galettis P, Hambley TW, Palmer BD, Baguley BC. 2000. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *Br J Cancer* 82: 7
- Sellers EA, Scott JW, Thomas N. 1954. Electrical activity of skeletal muscle of normal and acclimatized rats on exposure to cold. *The American journal of physiology* 177: 5
- Shepshelovich D, Shpilberg O, Lahav M, Itchaki G, Yakimov M, et al. 2014. Hodgkin lymphoma and hypothermia: case report and review of the literature. *Acta haematologica* 131: 227-30
- Sherrington CS. 1906. *The Integrative Action of the Nervous System*. New York: Charles Scribner's Sons.
- Silva E. 2006. Thermogenic Mechanisms and Their Hormonal Regulation. *Physiol Rev* 86: 30
- Silverman JD, Kruger L. 1988a. Acid phosphatase as a selective marker for a class of small sensory ganglion cells in several mammals: spinal cord distribution, histochemical properties, and relation to fluoride-resistant acid phosphatase (FRAP) of rodents. *Somatosens Res* 5: 38
- Silverman JD, Kruger L. 1988b. Lectin and neuropeptide labeling of separate populations of dorsal root ganglion neurons and associated "nociceptor" thin axons in rat testis and cornea whole-mount preparations. *Somatosens Res* 5: 9
- Sittl R, Lampert A, Huth T, Schuy ET, Link AS, et al. 2012. Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6704-9
- Solarewicz JZ, Angoa-Perez M, Kuhn DM, Mateika JH. 2015. The sleep-wake cycle and motor activity, but not temperature, are disrupted over the light-dark cycle in mice genetically depleted of serotonin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: 8
- Solymar M, Petervari E, Balasko M, Szelenyi Z. 2015. The onset of daily torpor is regulated by the same low body mass in lean mice and in mice with diet-induced obesity. *Temperature* 2: 6
- Sprowl JA, Ciarimboli G, Lancaster CS, Giovinazzo H, Gibson AA, et al. 2013. Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 11199-204
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, et al. 2003. ANKTM1, a TRP like Channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-29
- Swoap SJ. 2008. The pharmacology and molecular mechanisms underlying temperature regulation and torpor. *Biochemical pharmacology* 76: 817-24
- Swoap SJ, Gutilla MJ, Liles LC, Smith RO, Weinshenker D. 2006. The full expression of fasting-induced torpor requires beta 3-adrenergic receptor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 241-5
- Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, Loprinzi CL, Low PA, Windebank AJ. 2010. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Molecular pain* 6: 15
- Ta LE, Low PA, Windebank AJ. 2009. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. *Molecular pain* 5: 9
- Tajino K, Hosokawa, H., Maegawa S, Matsumura K, Dhaka A, Kobayashi S. 2011. Cooling-Sensitive TRPM8 Is Thermostat of Skin Temperature against Cooling. *PLoS one* 6

- Tajino K, Matsumura K, Kosada K, Shibakusa T, Inoue K, et al. 2007. Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: 8
- Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, et al. 2011. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nature chemical biology* 7: 701-11
- Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, et al. 2008. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels* 2: 13
- Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD. 2007. Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 11
- Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JA, et al. 2009. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nature neuroscience* 12: 1293-9
- Talavera K, Voets T, Nilius B. 2008. Mechanism of Thermosensation in TRP Channels In *Sensing with ion channels*, ed. B Martinac: Springer
- Tattersall GJ, Sinclair BJ, Withers PC, Fields PA, Seebacher F, et al. 2012. Coping with thermal challenges: physiological adaptations to environmental temperatures. *Comprehensive Physiology* 2: 2151-202
- Terrien J, Perret M, Aujard F. 2011. Behavioral thermoregulation in mammals: a review. *Front Biosci* 16: 17
- Thomas SA, Palmiter RD. 1997. Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature* 387: 4
- Tominaga M. 2007. The Role of TRP Channels in Thermosensation In *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades.*, ed. WB Liedtke, S Heller. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. 2006. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 7: 9
- Toyama S, Shimoyama N, Ishida Y, Koyasu T, Szeto HH, Shimoyama M. 2014. Characterization of Acute and Chronic Neuropathies Induced by Oxaliplatin in Mice and Differential Effects of a Novel Mitochondria-targeted Antioxidant on the Neuropathies. *Anesthesiology* 120: 15
- Trayhurn P. 1979. Thermoregulation in the Diabetic-Obese (db/db) Mouse. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 380: 6
- Trayhurn P, Thurlby PL, James WPT. 1977. Thermogenic defect in pre-obese ob/ob mice. *Nature* 266: 3
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, et al. 2008. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70: 6
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, et al. 2007. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 13519-24
- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. 2001. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with Transient Receptor Potential calcium channel proteins. *Cancer Research* 61: 10

- Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, et al. 2003. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. in vitro characterization and pharmacokinetic properties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306: 377-86
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, et al. 2009. Cold-Activated BAT in Healthy Men. *The New England journal of medicine* 360: 9
- Vay L, Gu C, McNaughton PA. 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British journal of pharmacology* 165: 15
- Viana F, de la Pena E, Belmonte C. 2002. Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nature neuroscience* 5: 254-60
- Viana F, Ferrer-Montiel A. 2009. TRPA1 modulators in preclinical development. *Expert Opin Ther Patents* 19: 13
- Vilceanu D, Stucky CL. 2010. TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons. *PloS one* 5: e12177
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430: 748-54
- Von Frey M. 1896. Untersuchung über die Sinnesfunktionen der menschlichen Haut. *Abhandlungen der mathematisch-physischen Klasse der Königlich Saächsischen Gesellschaft der Wissenschaften*
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. 2012. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron* 73: 15
- Vriens J, Nilius B, Voets T. 2014. Peripheral thermosensation in mammals. *Nature reviews. Neuroscience*
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, et al. 1998. *The European journal of neuroscience* 10: 9
- Wechselberger M, Wright CL, Bishop GA, Boulant JA. 2006. Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal thermosensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: 12
- Wei ET, Seid DA. 1983. AG-3-5: a chemical producing sensations of cold. *J Pharm Pharmacol* 35: 3
- Weil A, Moore SE, Waite NJ, Randall A, Gunthorpe MJ. 2005. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRPV1 and TRPM8. *Molecular pharmacology* 68: 518-27
- Weinert D, Waterhouse J. 1998. Diurnally Changing Effects of Locomotor Activity on Body Temperature in Laboratory Mice. *Physiology & behavior* 63: 7
- Wilson RH, Lehyk T, Thomas RR, Quinn MG, Floeter MK, Grem JL. 2002. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. *J Clin Oncol* 20: 8
- Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, et al. 2004. Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 6410-5
- Woolf CJ. 2010. What is this thing called pain? *The Journal of clinical investigation* 120: 3742-4
- Xiao WH, Zheng H, Bennett GJ. 2012. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. *Neuroscience* 203: 194-206

- Xing H, Ling J, Chen M, Gu JG. 2006. Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *Journal of neurophysiology* 95: 1221-30
- Yalcin I, Charlet A, Freund-Mercier MJ, Barrot M, Poisbeau P. 2009. Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 10: 767-73
- Yudin Y, Rohacs T. 2012. Regulation of TRPM8 channel activity. *Molecular and cellular endocrinology* 353: 68-74
- Zhou Y, Suzuki Y, Uchida K, Tominaga M. 2013. Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. *Nature communications* 4: 2399
- Zotterman Y. 1935. Action potentials in the glossopharyngeal nerve and in the chorda tympani. *Skand Arch Physiol* 72: 3
- Zygmunt PM, Högestätt ED. 2014. TRPA1. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, ed. B Nilius, V Flockerzi: Springer

