



***Transcriptoma de las neuronas termosensibles:
caracterización molecular y funcional en condiciones
fisiológicas y en la neuropatía periférica inducida por el
agente quimioterapéutico oxaliplatino***

Tesis Doctoral presentada por

Ana Gómez del Campo Sancho

Director de Tesis:

Dra. Ana M.^a Gomis García

Co-director de Tesis:

Dr. Félix Viana de la Iglesia

Programa de Doctorado en Neurociencias

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández de Elche

- 2022 -





TESIS DOCTORAL POR FORMATO CONVENCIONAL

La presente Tesis Doctoral, titulada “Transcriptoma de las neuronas termosensibles: caracterización molecular y funcional en condiciones fisiológicas y en la neuropatía periférica inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino” se presenta bajo la modalidad de tesis convencional con los siguientes indicios de calidad:

- Fernández-Trillo, J. et al. (2020) ‘Piezo2 mediates low-threshold mechanically evoked pain in the cornea’, *Journal of Neuroscience*, 40(47), pp. 8976–8993. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0247-20.2020.



Sant Joan d'Alacant, 25 de abril 2022

La Dra. Dña. Ana Gomis García, directora, y el Dr. D. Félix Viana de la Iglesia, codirector de la tesis doctoral titulada “Transcriptoma de las neuronas termosensibles: caracterización molecular y funcional en condiciones fisiológicas y en la neuropatía periférica inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino”

INFORMAN:

Que Dña. Ana Gómez del Campo Sancho ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “Transcriptoma de las neuronas termosensibles: caracterización molecular y funcional en condiciones fisiológicas y en la neuropatía periférica inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino”, conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Sant Joan d'Alacant a 25 de abril de 2022.

Director/a de la tesis
Dra. Dña. Ana M^a Gomis García

Codirector/a de la tesis
Dr. D. Félix Viana de la Iglesia



Sant Joan d'Alacant, 25 de abril 2022

Dña. Elvira de la Peña García, coordinadora del programa de Doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

INFORMA:

Que Dña. Ana Gómez del Campo Sancho ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado "Transcriptoma de las neuronas termosensibles: caracterización molecular y funcional en condiciones fisiológicas y en la neuropatía periférica inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino" conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Sant Joan d'Alacant a 25 de abril de 2022.

Dra. Elvira de la Peña García

Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias

E-mail : elvirap@umh.es
www.in.umh.es

Tel: +34 965 919533
Fax: +34 965 919549

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



La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por la Beca predoctoral FPI 2014 (REF: BES-2014-070394), los proyectos I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIIN) SAF2013-45608-R, SAF2016-77233-R y PID-2019-108194RB-100, el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y por el Programa Severo Ochoa de Centros de Excelencia en I&D 2016-2019 (SEV-2015-0533). Además, la estancia internacional realizada durante el período de la Tesis Doctoral en el laboratorio del Dr. Patrik Ernfors, en el Instituto Karolinska de Estocolmo, ha sido financiada con la ayuda a la movilidad para estancias breves EEBB-I-18-13008.

ÍNDICE

RESUMEN	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUCCIÓN	20
1.1. El sistema somatosensorial: una visión general	22
1.2. Especialización funcional de las neuronas somatosensoriales	24
1.2.1. Clasificación de las neuronas sensoriales primarias según su velocidad de conducción	26
1.2.2. Nociceptores o neuronas de alto umbral	27
1.2.3. Mecanorreceptores y termorreceptores.....	28
1.3. Sensores de temperatura: la familia de canales iónicos de potencial transitorio (TRP) ..	31
1.3.1. El canal TRPV1	34
1.3.2. El canal TRPM8	37
1.3.3. El canal TRPA1	41
1.4. Detección del frío: mecanismos implicados	44
1.4.1. Papel de TRPM8 en la termosensación inocua y nociva del frío.....	47
1.4.2. Papel de TRPA1 en la termosensación y su activación por frío nocivo	49
1.4.3. Descubrimiento de nuevos termorreceptores candidatos para la termosensación nociva	51
1.4.4. Los canales de potasio K2P o de fuga y la transducción del frío	52
1.4.5. Canales dependientes de voltaje y la transducción del frío.....	54
1.5. Caracterización molecular de las neuronas sensoriales	56
1.5.1. Clasificación histológica de las neuronas sensoriales	56
1.5.2. Secuenciación masiva de ARN en la caracterización de neuronas sensoriales primarias	59
1.5.3. Principales grupos de neuronas sensoriales primarias identificados mediante el análisis de su transcriptoma.....	63
1.6. Resolviendo el papel de la heterogeneidad molecular: correlación entre función y tipo celular en las neuronas sensoriales primarias.	66
1.6.1. Neuronas peptidérgicas	66
1.6.2. Neuronas no peptidérgicas	68
1.6.3. Neuronas mielínicas LTMRs	70
1.6.4. Neuronas TRPM8 positivas	71
1.7. El dolor neuropático	77
1.7.1. Neuropatía periférica inducida por oxaliplatino (NPIO)	78

1.7.2.	Mecanismos de acción de la neuropatía inducida por oxaliplatino.....	80
1.7.3.	Canalopatías tras el tratamiento de oxaliplatino en el sistema nervioso periférico	83
1.7.4.	Alteraciones genéticas y estudios de transcriptómica en la neuropatía inducida por oxaliplatino.....	86
2.	OBJETIVOS.....	88
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
3.1.	Animales.....	93
3.2.	Pruebas de conducta	96
3.2.1.	Von Frey	96
3.2.2.	Prueba de la placa fría unilateral	97
3.3.	Inducción de la neuropatía por oxaliplatino	98
3.4.	Cultivo de neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos.....	99
3.5.	Purificación de neuronas fluorescentes por el método de citometría de flujo (FACS) ..	100
3.6.	Obtención de ARN total.....	102
3.7.	Preamplificación y preparación de librerías usando la tecnología Smart-Seq2	103
3.8.	Secuenciación de ARN	106
3.9.	Imagen de calcio intracelular mediante fluorescencia.....	107
3.10.	Hibridación in situ RNAscope.....	109
3.11.	Inmunohistoquímica	113
3.12.	Reactivos y compuestos	114
3.13.	Análisis de los datos.....	117
3.13.1.	Análisis de imagen de calcio.....	117
3.13.2.	Análisis de imagen confocal y epifluorescente	120
3.13.3.	Análisis bioinformático de la secuenciación de ARN “en bloque”	125
3.13.4.	Análisis bioinformático comparativo con otros estudios de expresión	131
3.13.5.	Programas informáticos utilizados y estadística	135
4.	RESULTADOS	136
4.1.	Caracterización funcional de las poblaciones TRPM8+, IB4+ y DN.....	138
4.1.1.	La co-expresión de TRPM8 e IB4 en neuronas sensibles al frío de los ganglios raquídeos es baja.....	138
4.1.2.	Diferencias en la sensibilidad al frío entre las poblaciones TRPM8+, IB4+ y DN	140
4.1.3.	Las neuronas TRPM8+, IB4+ y DN responden de forma diferente a agonistas específicos de los canales TRP.....	143
4.1.4.	TRPA1 es el principal sensor de la respuesta al frío en la población IB4+	146

4.2. Análisis del transcriptoma de las neuronas TRPM8+ e IB4+	154
4.2.1. Evaluación de la expresión del gen Trpm8 en la población fluorescente EYFP de DRG y TG	154
4.2.2. Aislamiento y secuenciación de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN	157
4.2.3. Análisis de la expresión diferencial en las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN	159
4.2.4. Estudio comparativo del transcriptoma de las poblaciones EYFP+ e IB4+ con diferentes bases de datos.....	164
4.3. Heterogeneidad molecular de las neuronas TRPM8+	169
4.3.1. Identificación de neuronas TRPM8+ de baja intensidad en diversos tejidos somatosensoriales.....	170
4.3.2. Validación de la heterogeneidad molecular de las neuronas TRPM8+.....	176
4.3.3. Validación de la expresión para marcadores nociceptivos en neuronas de baja expresión para EYFP+ y TRPM8+	187
4.4. Efecto del agente quimioterapéutico oxaliplatino en las neuronas EYFP+, IB4+ y DN ..	191
4.4.1. El oxaliplatino produce alodinia mecánica e hiperalgesia al frío	191
4.4.2. El oxaliplatino produce un aumento de la sensibilidad al frío in vitro.....	193
4.4.3. Estudio de las respuestas ante agonistas específicos de los canales TRP en neuronas EYFP+, IB4+ y DN obtenidas de ratones tratados con oxaliplatino	199
4.4.4. Perfil transcriptómico de las neuronas sensoriales tratadas con oxaliplatino .	204
4.4.5. El tratamiento con el oxaliplatino produce un aumento en la expresión del canal TRPM8 y de otros marcadores propios de la población TRPM8 de baja intensidad	212
5. DISCUSIÓN	218
5.1. Las neuronas TRPM8+ presentan una dualidad funcional y molecular	220
5.1.1. La población TRPM8+ de baja expresión pasa inadvertida en la mayoría de las líneas reporteras para TRPM8.....	222
5.1.2. Comparación del perfil molecular obtenido de la línea TRPM8 ^{BAC} EYFP mediante diferentes técnicas de expresión.....	225
5.1.3. Marcadores peptidérgicos en las neuronas TRPM8+.....	228
5.1.4. Las neuronas TRPM8+ con expresión intermedia: posibles mecanorreceptores tipo A δ	237
5.1.5. Las neuronas TRPM8+ de alta expresión y su posible vinculación con procesos de analgesia	241
5.2. El perfil molecular de las neuronas IB4+	244
5.3. Diferente sensibilidad térmica en neuronas de los DRG y su relación con su perfil molecular	245
5.3.1. La expresión de TRPM8 y TRPA1 define a las neuronas de bajo y alto umbral respectivamente.....	247

5.3.2.	La sensibilidad térmica en neuronas TRPA1+ no es específica de las neuronas IB4+	248
5.4.	Efecto de la NPIO en células de DRG según su alteración transcriptómica.....	250
5.4.1.	Activación del sistema inmunitario	251
5.4.2.	Efecto intracelular del oxaliplatino: metabolismo y desequilibrio energético e inducción de los procesos de muerte celular	253
5.4.3.	Reorganización de la matriz extracelular y reparación del daño axonal	256
5.4.4.	Efecto del oxaliplatino en las neuronas sensoriales.....	258
6.	CONCLUSIONES.....	268
	CONCLUSIONES	270
	CONCLUSIONS	271
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	272
8.	ANEXO 1: PUBLICACIÓN	310
9.	ANEXO 2: TABLAS Y DATOS SUPLEMENTARIOS	352
	AGRADECIMIENTOS.....	366

ABREVIATURAS

5-HT: serotonina
ADNc: ADN complementario
AHP: hiperpolarización tras el potencial de acción
AITC: alil-isotiocianato
ARN: ácido ribonucleico
BAC: cromosoma bacteriano artificial
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro
BKca: canales de potasio activado por calcio de gran conductancia
CAM: calmodulina
CCI: constricción del nervio ciático, del inglés "*chronic constriction injury*"
CGRP: péptido relacionado con la calcitonina
CMiHi: nociceptores mecanosensibles silentes
DACH: diaminociclohexano
DAG: diacilglicerol
DE: diferencialmente expresado
DRG: ganglio de la raíz dorsal
DTR: receptor de la toxina diftérica
DTT: ditioneitol
ECM: matriz extracelular
EGFP: proteína fluorescente verde "mejorada"
EYFP: proteína fluorescente amarilla "mejorada"
F340: fluorescencia emitida por el Fura-2 excitado con luz de longitud de onda de 340 nm
F380: fluorescencia emitida por el Fura-2 excitado con luz de longitud de onda de 380 nm
FACS: citometría de células activadas por fluorescencia, del inglés "*Fluorescence-activated cell sorting*"
FDR: *p*-valor ajustado, del inglés "*False Discovery Rate*"
FRAP: fosfatasa ácida resistente al fluoruro
Fura 2-AM: fura-2 acetoximetil ester F340
GCaMP: indicador de calcio libre modificado genéticamente
GCPR: receptor acoplado a proteínas G
GDNF: factor de crecimiento derivado de células gliales
GO: "*Gene Ontology*"
HBSS: "*Hank's balanced salt solution*"
HCN: canales catiónicos activados por la hiperpolarización
HT-CS: neurona sensible al frío de alto umbral
HTMR: mecanorreceptores de alto umbral o nociceptores mecánicos
IA: corriente mecánica de adaptación intermedia
IB4: ilsolectina B4
Icold: corriente de frío
Ih: corriente hiperpolarizante
IHQ: inmunohistoquímica
IKD: corriente rectificadora tardía o de freno
IL: interleucina
IP3: 1,4,5-trifosfato

ISH: hibridación *"in situ"*
JG: ganglio yugular
K2P: canales de potasio de doble dominio de poro o de fuga
KCl: cloruro potásico
KEGG: *"Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes"*
KO: ratones transgénicos *"knockout"*
K_v: canales de potasio dependientes de voltaje
LNA: *"Locked nucleic acid"*
LPS: lipopolisacárido
LT-CS: neurona sensible al frío de bajo umbral
LTMR: mecanorreceptores de bajo umbral
MACS: clasificación celular activada magnéticamente, del inglés *"Magnetic-activated cell sorting"*
MEM: *"Minimum Essential Medium"*
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
MHR: región de homología de la melastatina
Na_v: canales de sodio dependientes de voltaje
NF: neurofilamento
NG: ganglio nodoso
NGF: factor de crecimiento nervioso
NGS: Secuenciación de nueva generación, del inglés *"Next-generation sequencing"*
NPEP: neurona no peptidérgica
NPIO: neuropatía inducida por oxaliplatino
NT-3: neurotrofina-3
PA: potencial de acción
PACAP: polipéptido del adenilato ciclasa de la pituitaria
PB: tampón fosfato
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEP: neurona peptidérgica
PFA: paraformaldehído
PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, PI(4,5)P₂
PK: proteína quinasa
PLC: fosfolipasa C
Q10: sensibilidad térmica intrínseca
RA: corriente mecánica de adaptación rápida
RIN: *"RNA Integrity Number"*
RNA-Seq: secuenciación masiva de ARN
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR: retrotranscripción reversa basada en PCR cuantitativa
SA: corriente mecánica de adaptación lenta
scRNA-Seq: secuenciación masiva de ARN de células individuales
SGC: células gliales satélite
SKCa: canales de potasio activados por calcio de baja conductancia
SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico
SOC: depósitos intracelulares de calcio
SP: sustancia P
TG: ganglio trigémino
TGF: factor de crecimiento transformante
TH: tirosina hidroxilasa
TNF: factor de necrosis tumoral
TRP: canales iónicos de potencial transitorio
TTX: tetrodotoxina
UCP: placa fría unilateral, del inglés “unilateral cold plate”
VSLD: dominio sensor de voltaje, del inglés “*Voltaje-Sensor Like Domain*”

RESUMEN

El canal iónico TRPM8 (*“Transient Receptor Potential Melastatin 8”*) es el principal sensor del frío ambiental y se activa por descensos moderados de temperatura y compuestos refrescantes, como el mentol. En el sistema somatosensorial, el canal se expresa en un pequeño conjunto de neuronas sensoriales de pequeño tamaño donde determina un papel crucial en la detección del frío inocuo, aunque también se le ha relacionado con la detección del frío nocivo y la nocicepción. El uso de distintas líneas reporteras de ratones ha permitido caracterizar esta población neuronal, la cual no expresa los marcadores típicos de los nociceptores tales como CGRP o IB4. Además, se ha demostrado que, funcionalmente se distinguen dos tipos de neuronas sensibles al frío, un grupo que se activa por descensos suaves de la temperatura (neuronas de bajo umbral) y un segundo grupo que responde a temperaturas más bajas (neuronas de alto umbral). Estos estudios muestran, además, que las dos poblaciones presentan un patrón diferente en la expresión de marcadores nociceptivos, sugiriendo un papel fisiológico diferente en la transducción del frío inocuo y nocivo. Más recientemente, los estudios del transcriptoma también han encontrado diferencias moleculares entre las neuronas que expresan TRPM8, no obstante, no se ha podido relacionar con las dos clases identificadas funcionalmente. Por otro lado, se desconoce el papel de las neuronas TRPM8+ y los mecanismos genéticos alterados en el contexto del dolor patológico.

El objetivo general de este trabajo ha sido la caracterización molecular de las neuronas TRPM8+ y su papel en la neuropatía periférica inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino en un modelo murino, así como la identificación de posibles genes y mecanismos que desarrollen la sensibilidad al frío. Basamos nuestro estudio en el uso de técnicas de biología molecular y celular en un modelo reportero murino (la línea TRPM8BACEYFP), que permite identificar las neuronas TRPM8+ a través de una proteína fluorescente reportera.

El primer objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar el papel que juegan los canales TRPM8 y TRPA1 en los mecanismos de sensibilidad al frío en neuronas sensoriales. Para ello, realizamos experimentos de imagen de calcio in vitro en neuronas sensoriales disociadas procedentes de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), aplicando rampas de frío y agonistas químicos de los principales miembros de los TRPs. Los resultados de los experimentos muestran que la mayoría de las respuestas al frío están mediadas por TRPM8, aunque existe un pequeño porcentaje de respuestas dependientes de TRPA1. Asimismo, se comprobó que nuestro modelo transgénico identifica

a dos poblaciones TRPM8+ con una expresión variable para este gen. Estas dos poblaciones presentan características morfológicas y funcionales distintas, incluyendo el umbral de activación por temperatura para el estímulo del frío.

El segundo objetivo de esta tesis fue obtener el perfil transcriptómico, mediante de la secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq), de neuronas TRPM8+ y IB4+ aisladas mediante citometría activada por fluorescencia (FACS). Una vez secuenciado el ARN, se compararon ambos perfiles moleculares e identificamos un conjunto de genes diferencialmente expresados en ambas poblaciones. Se demostró además que el perfil molecular de la población TRPM8+ identifica a un subgrupo de nociceptores denominados peptidérgicos. Tras comparar nuestro trabajo con otros estudios de transcriptómica realizados en células individuales y la posterior validación de un conjunto de genes seleccionados usando la técnica de hibridación in situ (RNAscope), descubrimos que los marcadores peptidérgicos identifican a un grupo de neuronas TRPM8+ de baja expresión para este gen. Estas neuronas corresponden al grupo de neuronas sensibles al frío de alto umbral identificado por fluorescencia en la línea TRPM8BACEYFP, por lo que este modelo constituye una buena herramienta para el estudio de estos nociceptores sensibles al frío.

Por último, el objetivo final de tesis fue estudiar los cambios funcionales y moleculares en la sensibilidad al frío de las neuronas TRPM8+ y TRPA1+ en un modelo de dolor neuropático inducido por oxaliplatino. Este compuesto quimioterapéutico causa una neuropatía periférica caracterizada, entre otros síntomas, por su hipersensibilidad al frío. El desarrollo del modelo neuropático se evaluó a través de pruebas de conducta. Usando las mismas técnicas mencionadas para la condición fisiológica, demostramos que el oxaliplatino aumenta el número de neuronas sensibles en las poblaciones TRPM8+ y TRPA1+, alterando, además, su perfil genético. Las conclusiones del trabajo sugieren que la hipersensibilidad al frío inducida por la neuropatía puede estar causada por una sensibilización de un grupo de neuronas silentes TRPM8+ de baja expresión.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las neuronas TRPM8+ presentan una heterogeneidad molecular y revela los mecanismos moleculares alterados en la neuropatía inducida por oxaliplatino, lo cual sugiere un papel en la nocicepción y detección del frío nocivo.

ABSTRACT

The Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) ion channel is a well-established key molecular sensor of cool and cold environmental temperatures. TRPM8 is activated by moderate drops in temperature and by cooling compounds such as menthol. In the somatosensory system, its expression is principally restricted in a small subset of sensory neurons involved in innocuous cold transduction, although it is also related to harmful cold and nociception. According to reporter lines, the majority of TRPM8 neurons do not co-express nociceptive markers such as CGRP or IB4, and molecular and functional experiments suggest at least two distinct functional classes, a low-threshold population, and a high-threshold subpopulation. Likewise, these two populations present a different pattern in the expression of nociceptive markers and may be involved in different physiological roles for innocuous and noxious cold transduction. More recently, transcriptomics studies have also identified molecular differences among TRPM8-expressing neurons, however, they fail to correlate their molecular signature to their physiological roles. Additionally, the information about their molecular changes after a neuropathic injury is still limited. To explore this, we studied the role of TRPM8 expressing neuron in neuropathic conditions, performing a multidisciplinary approach of molecular and cell biology techniques. The use of murine the transgenic model TRPM8^{BAC}EYFP allowed us to identify the TRPM8+ expressing neurons by the fluorescent reporter protein EYFP.

The first objective of this thesis was to study the role of TRPM8 and TRPA1 channels in the mechanisms of cold sensitivity. For this purpose, we used the *in vitro* calcium imaging technique in primary sensory neurons dissociated from dorsal root ganglia (DRG). Cold ramps and different combinations of TRPs channels, including TRPM8 and TRPA1, were applied in the experiments. We observed that cold responses are mainly mediated by TRPM8, although a small percentage depends on TRPA1. We also identified two TRPM8+ populations with variable expression for this gene using our transgenic reported model. We further showed that these TRPM8+ neurons present different morphological and functional characteristics, including the activation threshold by temperature for the cold stimulus.

The second objective of this thesis was to obtain the transcriptomic profile of these populations using the high-throughput RNA sequencing technique of FACS-sorted TRPM8+ and IB4+ neurons. We identified a set of differentially expressed and regulated genes in both populations. Our findings support the transcriptome of TRPM8-expressing neurons identifies a subgroup of pep-

tidergic nociceptors. Then, we performed a bioinformatic analysis of our sequencing data, comparing it with molecular profiles of somatosensory neurons obtained by recent single-cell RNA-Seq studies. After validating selective molecular markers using RNAscope in situ hybridization, we demonstrate that the peptidergic markers identify the group of low-expressing TRPM8 neurons. Additionally, our experiments performed in TRPM8^{BAC}EYFP transgenic mice led us to establish that the reporter line identifies these nociceptive cold-sensitive neurons, suggesting that that is a good tool for its study.

Finally, we study the functional and molecular changes in cold sensitivity of TRPM8+ and TRPA1+ neurons in a model of neuropathic pain. The chemotherapeutic compound causes peripheral neuropathy, characterized by cold hypersensitivity. To establish an experimental model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, mice received three systemic intraperitoneal injections. We evaluated cold hypersensitivity through behavioral tests. Using the same techniques mentioned for physiological conditions, we demonstrated that oxaliplatin causes an increase in the number of sensory neurons in TRPM8+ and TRPA1+ populations, together with altering their transcriptomic profiles. Furthermore, the results conclude the sensitization of an emerging TRPM8+subpopulation may cause neuropathy-induced cold hypersensitivity.

In summary, our findings support the molecular diversity of TRPM8-expressing neurons and reveal specific alterations produced by oxaliplatin that suggest their involvement in neuropathic noxious cold detection.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sistema somatosensorial: una visión general

La capacidad de percibir nuestro entorno, lo que se conoce como percepción, es un instrumento vital para la supervivencia. La percepción se realiza a través del procesamiento de estímulos sensoriales que se monitorizan de forma constante. Los organismos, desde los más primitivos hasta los vertebrados, han desarrollado sistemas sensoriales de distinta complejidad que les permiten interactuar con el ambiente. Charles Sherrington, en su libro publicado en 1906, diferencia la información sensorial en 3 tipos: la propioceptiva o la información de la posición de nuestro cuerpo, la exteroceptiva, cuando la información proviene de receptores periféricos que detectan estímulos externos, y la interoceptiva, procedente de los órganos internos (Freeman and Sherrington, 1907).

Conocemos por sistema somatosensorial al conjunto de estructuras encargadas de detectar los estímulos fisicoquímicos que alcanzan la piel y otros tejidos periféricos. Es un sistema que engloba la percepción consciente del tacto, presión, temperatura, la posición de las extremidades y su movimiento, y se considera parte del sistema nervioso periférico (SNP). Está compuesto por nervios sensoriales que se extienden fuera de la médula espinal y del tronco del encéfalo. Los nervios, a su vez, se componen de los axones de las neuronas sensoriales primarias que morfológicamente poseen una estructura singular, pseudounipolar. Es decir, sus axones se bifurcan en dos ramas, una rama periférica y otra central. La rama periférica o terminal aferente se extiende hasta la superficie de la piel y otros tejidos tales como músculos, tendones, huesos, glándulas, articulaciones u órganos internos, mientras que la central o eferente se proyecta hacia el sistema nervioso central.

La transducción sensorial es el proceso celular por el cual las neuronas sensoriales convierten los estímulos externos en señales eléctricas. El proceso de transducción se inicia con la activación de las terminaciones nerviosas periféricas en respuesta al estímulo y su despolarización. Una vez alcanzado un umbral de voltaje, se produce la descarga de potenciales de acción que se propagan a lo largo del axón (revisado por Belmonte, 2012). Esta señal eléctrica se transmite por la raíz dorsal hasta la médula espinal donde hace sinapsis con neuronas sensoriales de segundo orden. En el caso del nervio trigémino, la señal puede transmitirse hacia los primeros segmentos de la médula espinal, en el núcleo inferior o núcleo espinal (Spv), o directamente en estructuras superiores del tallo cerebral: El más alto es el núcleo mesencefálico en la calota, y a nivel pontino el núcleo principal (PrV), localizado en la protuberancia. La señal continúa hasta la corteza cerebral para su posterior codificación e interpretación y cuyo resultado final es la generación de una percepción. Además, en respuesta a los distintos

estímulos, el sistema nervioso central también puede generar una respuesta efectora, ya sea una contracción muscular involuntaria como mecanismo de huida o protección, o la liberación de sustancias (p.e. sudor) mediante activación de las glándulas secretoras (Kaas, 2012). (**Figura 1A**).

Los somas de las neuronas sensoriales primarias se encuentran agrupados en los ganglios sensoriales. Dependiendo del área corporal inervada, podemos distinguir entre los ganglios craneales del trigémino o de Gasser (TG), localizados en la porción petrosa del hueso temporal y que se encargan de la sensibilidad facial, los ganglios yugulares y nodosos (JG y NG respectivamente), localizados en la zona cervical formando parte del nervio vago, siendo los encargados, principalmente, de la inervación visceral (Freeman and Sherrington, 1907) y, por último, encontramos los ganglios raquídeos (DRG). Estos forman una cadena a ambos lados de la columna vertebral, alcanzando la médula espinal a través de la raíz dorsal y se dividen, dependiendo de la zona del cuerpo que inervan, en ganglios cervicales, torácicos, lumbares y sacros. El número total de ganglios raquídeos varía entre especies; en ratones hay 8 ganglios cervicales (C1-C8), 13 torácicos (T1-T13), 6 lumbares (L1-L6) y 4 sacros (S1-S4) mientras que en humanos hay 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares y 5 sacros (**figura 1B**). Los ganglios raquídeos contienen neuronas que inervan los órganos de la zona abdominal y pélvica, además de músculos y la piel de los miembros inferiores y superiores (Robinson and Gebhart, 2008; Ordovas-Montanes *et al.*, 2015). Los DRG son más numerosos que los ganglios trigéminos, nodosos o yugulares y contienen una mayor proporción del total de neuronas sensoriales, siendo esta una de las razones por la que son ampliamente utilizados como sistema modelo en los estudios sobre la transducción somatosensorial (Krames, 2014).

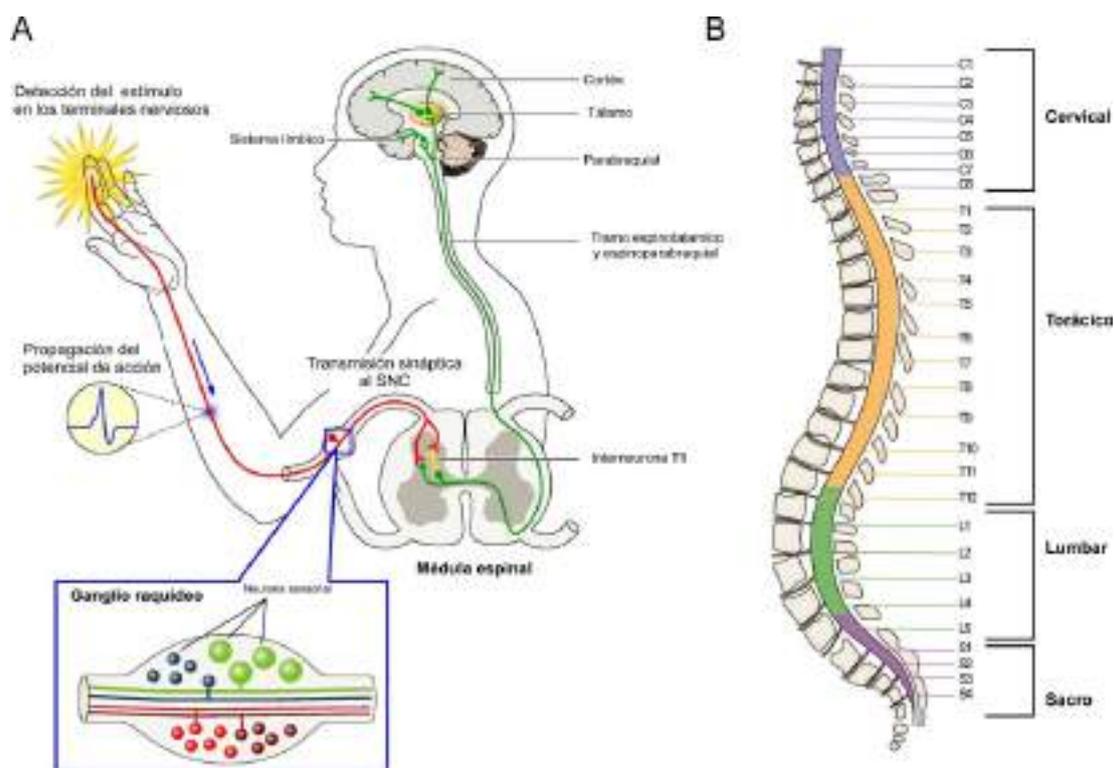


Figura 1. Transducción y transmisión de los estímulos somatosensoriales. A) Representación esquemática de la sensación somática ante un estímulo externo. Se muestra la detección por parte de los receptores localizados en los terminales periféricos, la transducción del estímulo en una respuesta eléctrica y su propagación en forma de potencial de acción hacia el soma de las neuronas sensoriales primarias en los ganglios raquídeos (DRG). Sus nervios espinales están formados por las raíces aferentes (sensitivas o periféricas) y se encargan de inervar la piel, músculos, vísceras o glándulas. Los somas de las neuronas sensoriales se localizan en los ganglios raquídeos (ver inserto), donde aparecen distintos subtipos en función de la expresión de moléculas transductoras, la morfología, las propiedades biofísicas y la expresión molecular. Las proyecciones eferentes llegan centralmente hasta el asta dorsal de la médula espinal, donde establecen la primera sinapsis con las neuronas sensoriales de segundo orden, continuando la transmisión hasta la corteza sensorial primaria. Modificado de Bourinet *et al.*, 2014. B) Distribución anatómica de los ganglios raquídeos a lo largo de la columna vertebral en humanos. Según su localización rostro-caudal, los DRGs se clasifican en cervicales, torácicos, lumbares y sacros, que van a inervar distintas partes del cuerpo. Adaptado de Servier Medical Art.

1.2. Especialización funcional de las neuronas somatosensoriales

Las sensaciones generadas por un estímulo externo pueden ser de naturaleza muy diversa, en función de las características e intensidad de dicho estímulo. La mayoría de los seres vivos podemos reaccionar a cambios de temperatura, presión, osmolaridad y la presencia de distintos compuestos químicos. Es más, como hemos comentado anteriormente, la información detectada puede provenir del entorno exterior pero también del interior del cuerpo, como es el caso de la información sobre la posición relativa de las extremidades a través del sentido de la

propiocepción. Los propioceptores se encuentran en músculos, articulaciones, ligamentos y piel, y básicamente informan sobre el estiramiento y contracción muscular para el correcto control del equilibrio y la coordinación (Gandevia, 2008).

Las neuronas somatosensoriales son capaces de detectar los distintos estímulos a través de proteínas altamente especializadas llamadas sensores moleculares, particularmente canales iónicos sensoriales. Al activarse, estos canales iónicos desencadenan una despolarización local al permitir el paso de iones a través de la membrana, lo que se conoce como potencial generador. El flujo de iones en la terminación nerviosa es proporcional a la intensidad del estímulo y cuando se alcanza el umbral, se produce el potencial de acción. Existen distintas formas de clasificar estos receptores moleculares tales como la naturaleza del estímulo que detecten (p.e. temperatura, voltaje), la especie permeable del ion (p.e. Na^+ , K^+), o su estructura. Las neuronas somatosensoriales muestran distintos grados de especialización en su respuesta a los estímulos; existen neuronas que responden exclusivamente a fuerzas mecánicas, los llamados mecanorreceptores, termorreceptores si responden a cambios de temperatura o quimiorreceptores si son sensibles a compuestos químicos. Por el contrario, otras neuronas sensoriales primarias pueden responder a más de un tipo de estímulo, bien porque expresan diferentes tipos de receptores moleculares, bien porque dichos receptores se puedan activar por distintos estímulos. La capacidad de responder a estímulos de distinta clase es conocida como polimodalidad (Bessou and Perl, 1969).

La polimodalidad ha sido ampliamente caracterizada en el soma de las neuronas sensoriales en estudios funcionales *in vitro*, debido a la dificultad para acceder a las terminaciones en algunos casos, y realizar la aplicación de estímulos de diferente naturaleza. En estas condiciones, más del 50 % de las neuronas sensoriales analizadas son polimodales, siendo la mayoría neuronas mecano-sensibles que también responden al calor o a compuestos irritantes (Sneddon, 2002). En menor número encontramos neuronas sensibles al frío que responden también a estímulos mecánicos y/o al calor (Cain, Khasabov and Simone, 2001). Sin embargo, en un estudio reciente del grupo de investigación del Dr. John Wood, en el que se realizaron registros *in vivo* de neuronas sensoriales utilizando ratones transgénicos fluorescentes para indicadores de calcio libre (GCaMP), se demostró que menos del 25 % de las neuronas responden a fuerzas mecánicas y a estímulos térmicos (55 °C) (Emery *et al.*, 2016). El trabajo defiende que las neuronas sensoriales son mucho más especializadas y la polimodalidad es una condición experimental artificial, fruto de la sensibilización que sufren las neuronas axotomizadas al estudiarlas en cultivos celulares. No obstante, en otros trabajos posteriores en los que usaron la misma

metodología, se observaron un gran número de neuronas polimodales, alcanzando incluso el 50-60 % en algunos casos (Chisholm *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

1.2.1. Clasificación de las neuronas sensoriales primarias según su velocidad de conducción

Los axones de las neuronas somatosensoriales están recubiertos por un tipo especial de célula glial conocido como célula de Schwann y, según el diámetro del axón, se pueden dividir en dos tipos. Aquellos axones con mayor calibre están rodeados por células de Schwann que producen mielina, un material lipoproteico en su membrana plasmática. Estas células de Schwann se enrollan alrededor de los axones (axones mielínicos) y permiten la transmisión del estímulo nervioso con mayor rapidez, ya que actúa como un aislante para evitar la disipación de la señal eléctrica. Cuanto mayor grosor tenga la vaina de mielina que recubre el axón, mayor será la velocidad de conducción del potencial de acción (Purves *et al.*, 2018). En el caso de los axones de menor diámetro, las células de Schwann los rodean formando pequeños manojos (Remak “*bundle*” en inglés), sin formar vainas de mielina, por lo que se conocen como axones amielínicos. En el sistema nervioso periférico, la mayoría de los axones de las neuronas sensoriales se caracterizan por carecer de mielina y por su baja velocidad de conducción (Kidd, Ohno and Trapp, 2013).

En el sistema somatosensorial encontramos cuatro tipos de axones, clasificados por Erlanger y Gasser en función de su velocidad de conducción, parámetro directamente relacionado con su diámetro; A α , A β , A δ y C, siendo las fibras alfa las más rápidas y C las más lentas (Erlanger and Gasser, 1924, 1937). Posteriormente, se demostró que la velocidad de conducción es también proporcional al tamaño de sus somas (Yoshida and Matsuda, 1979; Harper and Lawson, 1985; Cameron, Leah and Snow, 1986), de modo que las fibras A α se corresponden con las neuronas de gran tamaño, con un área aproximada de 800 μm^2 y presentan un mayor calibre de sus axones periféricos. Su principal función es la propiocepción y sus terminaciones sensoriales se encuentran en los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi (Lam and Pearson, 2002), cuya función es retroalimentar al sistema nervioso información sensorial sobre la longitud y tensión de las fibras musculares y tendones. Junto con las fibras A α , las fibras A β transmiten las sensaciones no dolorosas como el tacto o la vibración mecánica, mientras que las neuronas sensoriales de pequeño y mediano tamaño definen una población sin mielina o escasamente mielinizada que corresponde a las fibras C y A δ respectivamente.

Función sensorial	Tipo de receptor	Tipo de aferente axonal	Diámetro del axón	Velocidad de conducción
Propiocepción	Huso neuromuscular	A α	13-20 μ m	80-120 m/s
Tacto	Meissner, Pacini, Ruffini y células de Merkel	A β	6-12 μ m	35-75 m/s
Dolor, temperatura	Terminaciones libres	A δ	1-5 μ m	5-30 m/s
Dolor, temperatura, prurito, tacto no discriminativo	Terminaciones libres (no mielinicas)	C	0.2-1.5 μ m	0.5-2 m/s



Tabla 1. Clasificación de las neuronas sensoriales según su diámetro axonal. A mayor diámetro del axón, mayor velocidad de conducción. El diámetro del axón se correlaciona con el grosor de la vaina de mielina que lo rodea. Modificado de Purves et al., 2018.

1.2.2. Nociceptores o neuronas de alto umbral

Las neuronas sensoriales también pueden clasificarse en función de la intensidad, es decir, el umbral de activación del estímulo al que responden. En 1903, Sherrington describe la existencia de una neurona sensorial primaria que se activa por estímulos que causan dolor tisular, acuñando el término nociceptor para definirla en 1906 (Sherrington, 1903; Freeman and Sherrington, 1907). Los nociceptores (noci- se deriva del latín “*nocere*” que significa herir, dañar), responden a estímulos capaces de dañar el tejido y que dan lugar a una sensación desagradable o dolorosa. La sensación dolorosa puede evocarse por receptores mecánicos, térmicos o químicos cuando se activan a altas intensidades. Más tarde, se confirma que estas neuronas son, en general, de pequeño diámetro y están compuestas de fibras nerviosas tipo C y A δ (Merskey and Bogduk, 1994). En condiciones fisiológicas, tienen un umbral muy alto de activación, que puede ser alterado tras procesos de inflamación o lesión que los sensibilizan, permitiendo entonces su activación a umbrales más bajos. Según su localización, se describen tres tipos de nociceptores; cutáneos, viscerales y aquellos que se encuentran en los músculos y las articulaciones. Los nociceptores cutáneos han sido los más estudiados debido a su mayor accesibilidad.

Cuando hablamos del tipo de sensación dolorosa, es común distinguir dos tipos bien diferenciados. En primer lugar, hay un tipo de dolor agudo, muy localizado, que produce una sensación punzante y de menor latencia. Estas señales se transmiten a través de fibras A δ , ligeramente mielinizadas. Por otro lado, se describe otro tipo de dolor sordo, más difícil de localizar y que produce una sensación de quemazón siendo mucho más tardío su aparición tras el estímulo. Estas señales se transmiten por un grupo de nociceptores tipo C, amielínicos, cuyas terminaciones se encuentran a mayor profundidad en la piel (entre 20 a 500 nm), y que se caracterizan por ser polimodales ya que responden a compuestos irritantes y/o temperaturas nocivas además de estímulos mecánicos. Los receptores polimodales tipo C tienen un umbral para la estimulación

mecánica ligeramente inferior al umbral de los nociceptores puros y pueden sensibilizarse ante un estímulo repetitivo o en presencia de mediadores inflamatorios (Belmonte and Giraldez, 1981). Existe además un último grupo de nociceptores, conocido como nociceptores silentes, que no responden a estímulos en condiciones normales. Estos nociceptores sólo se activan tras la aplicación persistente de un estímulo o en condiciones patológicas como en procesos de inflamación (Schaible and Schmidt, 1985; revisado por Schmidt, 2006).

Como ya hemos mencionado, las neuronas sensoriales primarias procedentes de los DRGs transmiten la información desde la periferia hasta el asta dorsal de la médula espinal, donde hacen sinapsis con neuronas sensoriales de segundo orden, las cuales están organizadas anatómicamente en distintas capas. De este modo, las proyecciones de los nociceptores tipo C terminan mayoritariamente en la lámina interior II o en la lámina I (la más superficial). Los nociceptores con fibras miélicas, tipo A δ , pueden acabar tanto en la lámina I junto con las fibras C o en capas más profundas como la lámina V (Woodbury, Ritter and Koerber, 2000).

1.2.3. Mecanorreceptores y termorreceptores

La mecanocepción es la capacidad sensorial que permite detectar cambios en la presión o la distorsión tras ejercer una fuerza. La percepción mecánica también puede clasificarse según la intensidad del estímulo detectado, que depende de la activación de mecanorreceptores de alto umbral (HTMRs o nociceptores mecánicos), o de bajo umbral (LTMRs) (ver **figura 2A**) (revisado por Roudaut *et al.*, 2012).

Los LTMRs responden a estímulos mecánicos de baja intensidad como por ejemplo el tacto suave, los cosquilleos o pequeñas vibraciones. Una característica de los LTMRs es que sus terminaciones cutáneas suelen estar asociadas a órganos o estructuras especializadas o corpúsculos que permiten detectar mínimas variaciones de presión. Tradicionalmente se pensaba que estas estructuras especializadas eran necesarias para generar el potencial generador ante los estímulos mecánicos. Sin embargo, el descubrimiento de canales iónicos que se activan por fuerzas mecánicas demuestra que la mecanotransducción ocurre a través de canales iónicos y cada morfotipo de las estructuras asociadas a los LTMRs permite refinar distintas submodalidades del tacto (revisado por Abaira and Ginty, 2013). En la piel glabra o sin pelo, podemos encontrar diferentes modalidades asociadas a estas estructuras como los corpúsculos de Pacini, las terminaciones de Ruffini, los corpúsculos de Meissner y los discos de Merkel. Todos ellos están asociados a fibras A β , de gran diámetro. En la piel vellosa en cambio, podemos encontrar, rodeando los folículos pilosos, formas lanceoladas circunferenciales. Ocasionalmente se asocian también los discos de Merkel, conocidos como cúpulas táctiles o

“touch domes” y más raramente los corpúsculos de Pacini (Woodbury and Koerber, 2007). Sus terminaciones nerviosas son fibras tipo A β o A δ , conocidas comúnmente como “D-hair” o “Guard-hair” respectivamente (revisado por Cobo *et al.*, 2020). Según la frecuencia de disparo y su capacidad de adaptarse o mantener la respuesta al estímulo mecánico podemos clasificarlas en receptores de adaptación lenta (SA, “slowly adapting”), intermedia (IA, “intermediate adapting”) y rápida (RA, “rapidly adapting”), que a su vez puede subdividirse en tipo I y tipo II. Así, podemos distinguir entre receptores de adaptación rápida tipo I y tipo II (RAI y RAII) que se asocian a los corpúsculos de Meisner y Pacini. Los primeros detectan objetos en movimiento o roces sobre la piel y los segundos responden a pequeñas vibraciones. El grupo de adaptación lenta tipo I se asocia a células de Merkel, especializados en detectar el tacto suave, mientras que los SAII están formados por estructuras de Rufini y detectan mayoritariamente fuerzas de tensión en la piel. Los propioceptores que inervan los husos neuromusculares comparten muchas de las propiedades fisiológicas con los SAII-LTMRs. Finalmente, el grupo intermedio lo constituye principalmente un conjunto de fibras tipo C conocidas como C-LTMRs, encargadas de detectar la detección del tacto delicado (**figura 2A**). Este grupo es muy peculiar porque sus fibras están compuestas por axones no mielínicos, siendo las únicas neuronas tipo C que transmiten información no dolorosa. Otra característica única es que sólo se encuentran en la piel vellosa formando estructuras lanceoladas libres alrededor del folículo (Olson *et al.*, 2016).

Por otro lado, los HTMR, son receptores mecano-sensibles con fibras A δ o C, que se activan por estímulos nocivos. Aquellos que son fibras tipo C también pueden responder a otros estímulos, como el calor nocivo y productos químicos exógenos (revisado por Belmonte and Cervero, 2012), y muchos de ellos están implicados en la generación del prurito, una sensación desagradable que provoca un reflejo de rascado en respuesta a la presencia de sustancias irritantes (Paus *et al.*, 2006). Inicialmente, las terminaciones de los HTMRs eran consideradas libres al no tener asociadas estructuras especializadas (Roudaut *et al.*, 2012). No obstante, dos estudios recientes del grupo de investigación del Dr. Patrik Ernfors cuestionan este hecho, ya que han descubierto que los aferentes nociceptivos tienen una gran vinculación con las terminaciones de células de Schwann no mielínicas. Las terminaciones de ambos tipos celulares se asocian formando un órgano especializado glio-neuronal con forma de “malla” en la zona subepidérmica de la piel y detectan los estímulos dolorosos mecánicos y térmicos. La pérdida de las células de Schwann provoca la retracción de los nervios, mientras que la ablación de los terminales nerviosos también genera alteraciones morfológicas en las células de Schwann. En ambos casos, el resultado funcional es la generación de una hipersensibilidad mecánica (Abdo *et al.*, 2019; Rinwa *et al.*, 2021).

Tal como hemos comentado, los HTRMs están formados por fibras de velocidad de conducción lenta, que transmiten la información nociva de los estímulos mecánicos. Sin embargo, un estudio reciente de Arcourt y colaboradores, ha identificado un grupo de neuronas A β -LTMRs positivas para el gen *Maf* y responsables de coordinar el reflejo de retirada ante un estímulo mecánico nociceptivo. Este hecho es muy singular ya que todos los demás LTMRs participan en la mecano-sensación no nociva (Arcourt *et al.*, 2017).

Con respecto a la termocepción, se conoce como la capacidad de percibir y codificar las temperaturas ambientales e internas. Se han descrito distintos termorreceptores, capaces de detectar temperaturas en un amplio rango que va de los de 0 °C hasta los 55 °C. A diferencia de los mecanosensores, los termorreceptores no requieren estructuras especializadas en sus terminaciones, que finalizan en la piel, mucosas, vasos sanguíneos y folículos pilosos y la mayoría lo constituyen fibras C y algunas fibras A δ (**figura 2B**) (Schepers and Ringkamp, 2010).

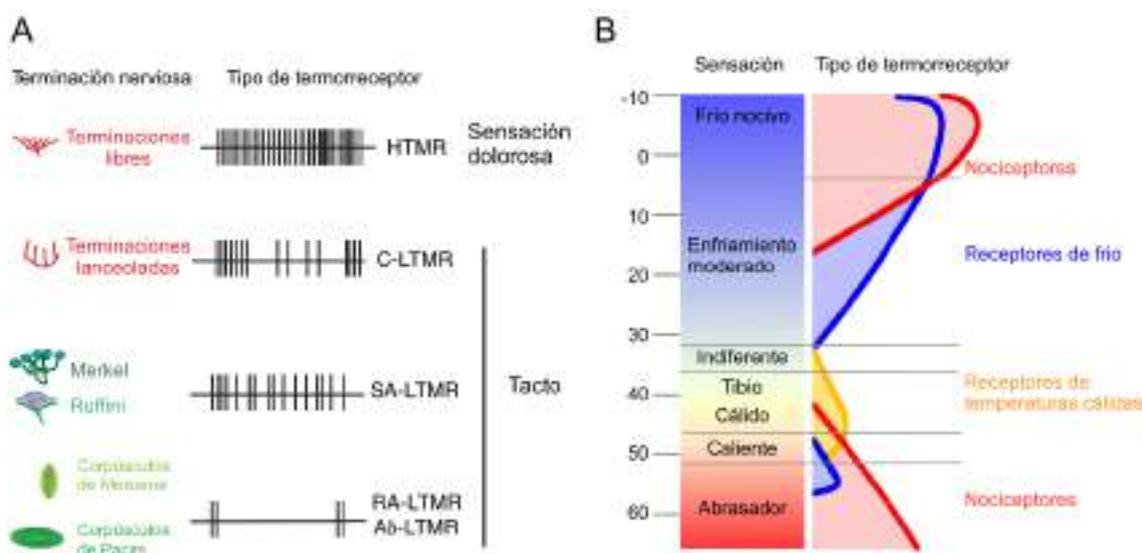


Figura 2 Clasificación funcional de los mecanorreceptores y los termorreceptores y su rango de activación fisiológico. A) Los mecanorreceptores pueden clasificarse en HTMRs que detectan estímulos mecánicos de alto umbral o nocivos y LTMRs, encargados de la sensación del tacto. Éstos últimos pueden ser del tipo α , β , δ y C según el diámetro de las fibras que los inervan. En sus terminales, cada receptor se asocia a un tipo de estructura especializada. Los HTMR en cambio tienen terminaciones libres. Modificado de Gatto *et al.*, 2019. B) Los termorreceptores pueden clasificarse según el rango de temperaturas que detectan. Modificado de Belmonte and Viana, 2008.

1.3. Sensores de temperatura: la familia de canales iónicos de potencial transitorio (TRP)

En las últimas décadas se ha avanzado en el conocimiento de los distintos mecanismos de la transducción sensorial. En gran medida estos avances se asocian a la caracterización de la familia de canales iónicos TRP (Clapham, 2003). Su nombre proviene de estudios utilizando como modelo experimental la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, donde se describió por primera vez la función de estos canales. En registros del electroretinograma, ciertos mutantes exhibían un potencial eléctrico transitorio ante la exposición a pulsos lumínicos y de ahí su nombre (del inglés “*Transient receptor potential channels*”) (Cosens and Manning, 1969; Montell and Rubin, 1989). Esta familia está compuesta, mayormente, por canales iónicos no selectivos. Los canales iónicos TRP se agrupan en distintas subfamilias TRPC (*canonical*), TRPA (*ankyrin*), TRPV (*vallinoid*), TRPM (*melastatin*), TRPML (*mucoipin*) y TRPP (*polycistin*), en función de la homología de su secuencia, tal como se muestra en la **figura 3**. Estructuralmente, los canales TRP están formados por cuatro subunidades proteicas formando poros permeables a cationes, generalmente a Ca^{2+} , a excepción de los miembros TRPM4 y TRPM5 (Gees *et al.*, 2012; Boonen *et al.*, 2018). Aunque la mayoría forman homotetrámeros, se ha observado la capacidad para formar heterómeros entre miembros distintos de la misma subfamilia (Cheng, Sun and Zheng, 2010). Cada subunidad presenta seis segmentos transmembrana (S1-S6), una región permeable a los cationes entre los segmentos S5 y S6 que conforman un poro hidrofóbico, y los dominios amino y carboxilo terminal que se encuentran en el medio intracelular (revisado por Hellmich and Gaudet, 2014). Además, pueden poseer un dominio de repeticiones de anquirinas en el extremo amino terminal, con longitud variable entre los distintos miembros de la familia TRP (Lishko *et al.*, 2007), y el denominado dominio TRP, una secuencia altamente conservada en el extremo C terminal (Clapham, Runnels and Strübing, 2001; Venkatachalam and Montell, 2007; Cao, Cordero-Morales, *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2013). En mamíferos, la expresión de algunos canales TRP predomina principalmente en las neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico, aunque también se ha detectado su expresión en el sistema nervioso central donde se cree que realizan funciones relacionadas con la termorregulación y en otros tipos celulares con origen no neuronal (Gavva, 2008; Shibasaki, Tominaga and Ishizaki, 2015; Kamm and Siemens, 2017; Ordás *et al.*, 2021).

Funcionalmente, muchos canales TRP presentan un carácter polimodal, debido generalmente a su capacidad quimiorreceptora o mecanorreceptora, pero la mayoría son conocidos por su termosensibilidad.

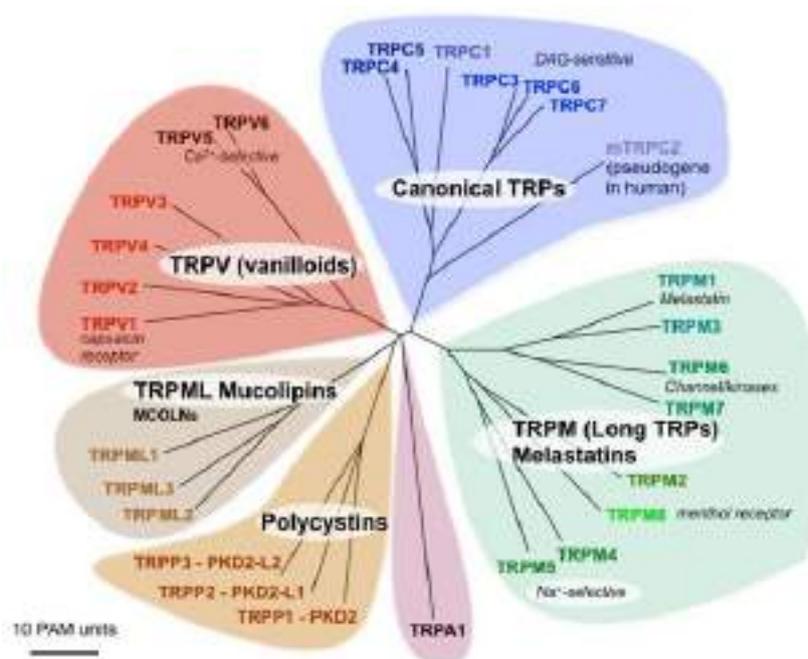


Figura 3. Árbol filogenético de la familia de canales iónicos TRP en mamíferos. Se muestran representadas cada una de las subfamilias en función de su homología de su secuencia. Las longitudes de las ramas representan la distancia evolutiva en unidades PAM (*Point Accepted Mutation*, es decir, la probabilidad de sustituir un aminoácido por otro cada 100 residuos). Abreviaturas: DAG, diacilglicerol. Modificado de Clapham, 2003.

Aunque la temperatura influye en la actividad de todas las neuronas y canales iónicos, ya sea indirectamente por desnaturalización o inactivación por bajas temperaturas, se consideran termosensores aquellos canales iónicos que muestran una especial termosensibilidad determinada a través del valor Q10, que indica la tasa de variación de un proceso biológico o de una reacción química cuando la temperatura se incrementa en 10 grados centígrados (Ovchinnikov, 1981). Existen diversos tipos de proteínas termosensibles, pero los más estudiados pertenecen a la familia de canales TRP. Además, de acuerdo a Voets, para que un canal iónico pueda ser considerado un termosensor, debería cumplir tres criterios: tener una dependencia térmica con un valor de Q10 mayor o igual a 5, expresarse funcionalmente en distintos tipos celulares que estén expuestos a cambios bruscos de temperatura como terminaciones nerviosas, mucosas o queratinocitos y tener evidencias de su relevancia biológica, es decir, cuando su alteración desencadena alguna respuesta fisiológica (Voets, 2012). En este caso, sólo encontramos siete miembros de la familia TRP que cumplen los tres requisitos, también conocidos como termo-TRPs: TRPV1, TRPM2, TRPM3, TRPM5, TRPC5, TRPM8 y TRPA1, generalmente con valores de 20 para el valor Q10, e incluso alcanzando 200 para TRPA1 en algunas isoformas del mosquito *Anopheles gambiae* (Kang *et al.*, 2012). No obstante, otros miembros dentro de esta familia presentan una gran

dependencia térmica como TRPV2, TRPV3 o TRPV4, aunque su relevancia biológica como termosensor no ha sido completamente demostrada (revisado por Dhaka, Viswanath and Patapoutian, 2006; Vay, Gu and McNaughton, 2012). Cabe señalar que no todos los canales TRP poseen propiedades termosensibles. Por ejemplo, la familia TRPP, no posee ningún miembro.

La sensibilidad térmica de los termo-TRPs abarca el rango de temperaturas de 5 a 55 °C. En roedores, los canales TRPV1, TRPV2, TRPM3 se activan por calor, en el rango de temperaturas consideradas nocivas (mayores de 42 °C en el caso de TRPV1, superiores a 52 °C para TRPV2 y mayores de 40 °C para TRPM3) (Caterina *et al.*, 1997; Leffler *et al.*, 2007; Vriens *et al.*, 2011). La activación de TRPM2, TRPV3 y TRPV4 ocurre en un rango de temperaturas cálidas, de entre 25 y 42 °C (Peier, Reeve, *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002; Togashi *et al.*, 2006). Por otro lado, entre los TRPs sensibles al enfriamiento se encuentran TRPC5 y TRPM8, activados a temperaturas entre 37-25 °C para TRPC5 y menores de 27°C en el caso de TRPM8 (McKemy, Neuhauser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2011). TRPA1, a su vez detecta temperaturas frías que evocan sensaciones dolorosas a valores menores de 17 °C (Story *et al.*, 2003; Sawada *et al.*, 2007; Karashima *et al.*, 2009). Los rangos térmicos aquí expuestos hacen referencia a la especie murina y a condiciones experimentales concretas, cómo es la expresión en sistemas heterólogos.

La sensibilidad térmica puede variar entre ortólogos, como en el caso de TRPA1, en el que las isoformas presentes en reptiles, aves, orugas, mosquitos y en la mosca de la fruta han demostrado tener sensibilidad al calor y no al frío (Saito *et al.*, 2012, 2014; Wei *et al.*, 2015). En primates, por otro lado, TRPA1 parece ser insensible a la temperatura (Chen *et al.*, 2013), aunque posteriormente se ha demostrado una termosensibilidad intrínseca del canal al frío y calor (Moparthi *et al.*, 2016). TRPM8, en comparación, es sensible al frío en todas las especies identificadas (Myers, Sigal and Julius, 2009; Matos-Cruz *et al.*, 2017; Pertusa *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020) y es considerado como el principal detector de la sensación de frío inocuo (Bautista *et al.*, 2007; Colburn *et al.*, 2007; Dhaka *et al.*, 2007, **figura 4**).

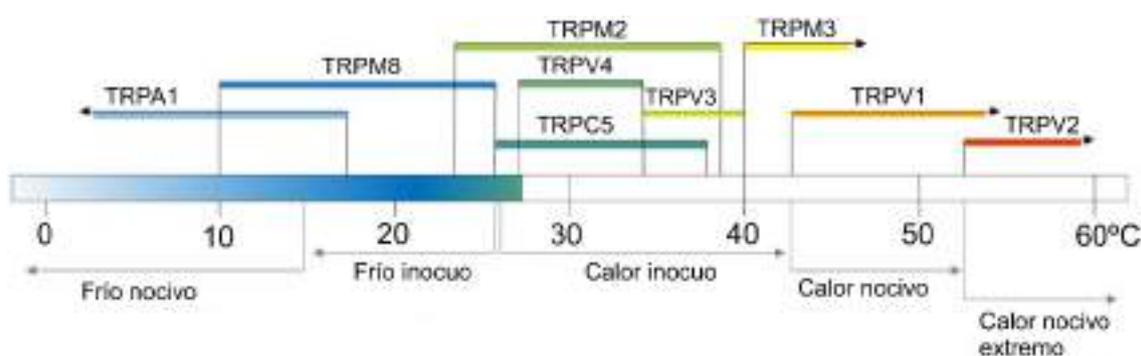


Figura 4. Rango térmico de actividad de los canales TRP termosensibles en la especie murina. Se muestra el rango de sensibilidad térmica para cada uno de los miembros de los termo-TRPs. TRPA1 (< 17 °C), TRPM8 (10–26 °C), TRPM2 (23–28 °C), TRPC5 (26–38 °C), TRPV4 (27–34 °C), TRPV3 (33–40 °C), TRPM3 (> 40 °C), TRPV1 (> 42 °C), TRPV2 (> 52 °C). Modificado de Hoffstaetter, Bagriantsev and Gracheva, 2018.

Tal como se ha comentado anteriormente, muchos canales TRP son polimodales, siendo sensibles a sustancias aromáticas o irritantes, generalmente alimentarias como por ejemplo el chile o guindilla para el canal TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997), la mostaza en el caso de TRPA1 (Jordt *et al.*, 2004) o la menta para TRPM8 (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002). Algunos de sus miembros también pueden activarse por otros agentes físicos, como fuerzas mecánicas, pudiendo tener también un papel en la mecanotransducción. Por ejemplo, TRPV4, TRPV2 y TRPM3 se activan por edema celular (Grimm *et al.*, 2003; Muraki *et al.*, 2003; Vriens *et al.*, 2004) y los miembros TRPC3 y TRPC6 son esenciales para la mecanotransducción en las células ciliadas y la eliminación de ambos produce déficits en la sensación auditiva (Quick *et al.*, 2012). A continuación, se repasan las características de algunos de los principales canales TRP implicados en la termocepción y la nocicepción.

1.3.1. El canal TRPV1

El canal TRPV1 es uno de los seis miembros de la familia vaniloide (TRPV) y posiblemente, el TRP mejor caracterizado. Fue el primer canal TRP clonado en mamíferos y el primero de la familia que se demostró polimodal por su activación por pH ácido (pH 6), temperaturas superiores a 42 °C, hiperosmolaridad y por diferentes sustancias químicas, muchas de ellas con un papel inflamatorio, incluida la capsaicina (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998), y muy utilizado como marcador molecular para nociceptores polimodales. TRPV1 se expresa en nociceptores de pequeño y mediano tamaño en los ganglios raquídeos, del trigémino y nodoso. También se expresa funcionalmente en neuronas postsinápticas de la médula espinal, en neuronas glutamatergicas y GABAérgicas (Zhou *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012), en y varias regiones del cerebro (Tóth *et al.*, 2005; Cristino *et al.*, 2006; Chávez, Chiu and Castillo, 2010). Además, el canal está presente en células no neuronales como queratinocitos, astrocitos o tejido vascular, aunque los niveles son mucho más bajos y sus funciones no están completamente definidas (Doly *et al.*, 2004; Tóth *et al.*, 2005; Sand, Grant and Nandi, 2015). Recientemente, el Dr. David Julius fue galardonado con el premio Nobel de Medicina por el descubrimiento e investigación sobre el canal TRPV1. El galardón fue compartido con el Dr. Ardem Patapoutian y sus hallazgos relacionados con el descubrimiento y función del canal mecanosensible PIEZO2, también expresado en neuronas sensoriales.

En humanos, la proteína TRPV1 se codifica por 839 aminoácidos y al igual que otros miembros de la familia de los canales TRPs, el canal funcional está formado por cuatro subunidades idénticas, cada una de ellas compuesta por seis segmentos transmembrana (S1-S6) y los extremos, amino y carboxilo situados en el espacio intracelular. Entre los dominios S5 y S6 se sitúa un tramo anfipático que conforma el poro del canal, permitiendo el flujo de iones Na^+ y Ca^{2+} con mayor permeabilidad para este último. Los primeros estudios sobre la estructura atómica tridimensional del canal se realizaron por medio de cristalografía de rayos X, identificándose en el extremo amino una región de repeticiones con 6 anquirinas (**figura 7A**). Las anquirinas juegan un papel presuntamente clave en la modulación de ligandos como sitios de anclaje y/o para la interacción de proteínas (Lishko *et al.*, 2007). En el caso de TRPV1, el ATP sensibiliza al canal intracelularmente y su sitio de unión se encuentra en esta región, por lo que se ha señalado el papel de las anquirinas en la modulación endógena de TRPV1 (Kwak *et al.*, 2000). El sitio de unión de la calmodulina, un sensor de calcio que lo desensibiliza en respuesta a un aumento de la concentración de Ca^{2+} , se localiza también en esta región del extremo N-terminal (Rosenbaum *et al.*, 2004; Lishko *et al.*, 2007). No obstante, se ha descrito un sitio de unión adicional en el extremo carboxilo y que igualmente interviene en la regulación del canal (Numazaki *et al.*, 2003; Lau, Procko and Gaudet, 2012).

Los estudios posteriores de crio-microscopía electrónica (Crio-EM), fueron claves para determinar la estructura tridimensional a gran resolución (Liao *et al.*, 2013). Estos autores mostraron que las subunidades estructurales se disponen simétricamente alrededor del poro central con una topología similar a los canales catiónicos dependientes de voltaje, y con un dominio voltaje-sensor que consiste en un grupo de cuatro hélices alfa transmembrana (S1-S4). Además, demostraron que la “caja” o dominio TRP se encuentra situado de forma que puede interaccionar con el lazo S4-S5; dicha interacción tiene un papel crítico en la modulación alostérica del canal (Cao, Liao, *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2013).

Como ya se ha mencionado, el canal TRPV1 se activa por un gran número de ligandos y compuestos químicos. Su agonista más conocido y utilizado es la capsaicina, componente activo de los pimientos picantes, muestra una gran selectividad y lo activa a concentraciones del orden nanomolar ($\text{EC}_{50} \sim 9.1 \text{ nM}$). La resiniferatoxina (RTX), un compuesto irritante que se encuentra en algunas plantas del género *Euphorbia*, es todavía más potente con una $\text{EC}_{50} \sim 0.15 \text{ nM}$ (Correll *et al.*, 2004). TRPV1 también se activa por protones, además de por varios ácidos grasos y cannabinoides entre otros (revisado por Jara-Oseguera, Simon and Rosenbaum, 2010). Su activación también está modulada por una variedad de sustancias endógenas como factores de creci-

miento y mediadores inflamatorios, tales como el ATP, ya mencionado previamente, la prostaglandina E₂ (PGE₂) y la histamina (Shin *et al.*, 2002; Moriyama *et al.*, 2005; Shim *et al.*, 2007). En la **figura 5A** se representan, además, de forma esquematizada algunos de los agonistas y moduladores principales que activan el canal. Estos mediadores se liberan en caso de lesiones tisulares, aumentando la probabilidad de activación del canal y explicando así la sensación de quemazón que se genera tras un daño inflamatorio (Devesa *et al.*, 2011).

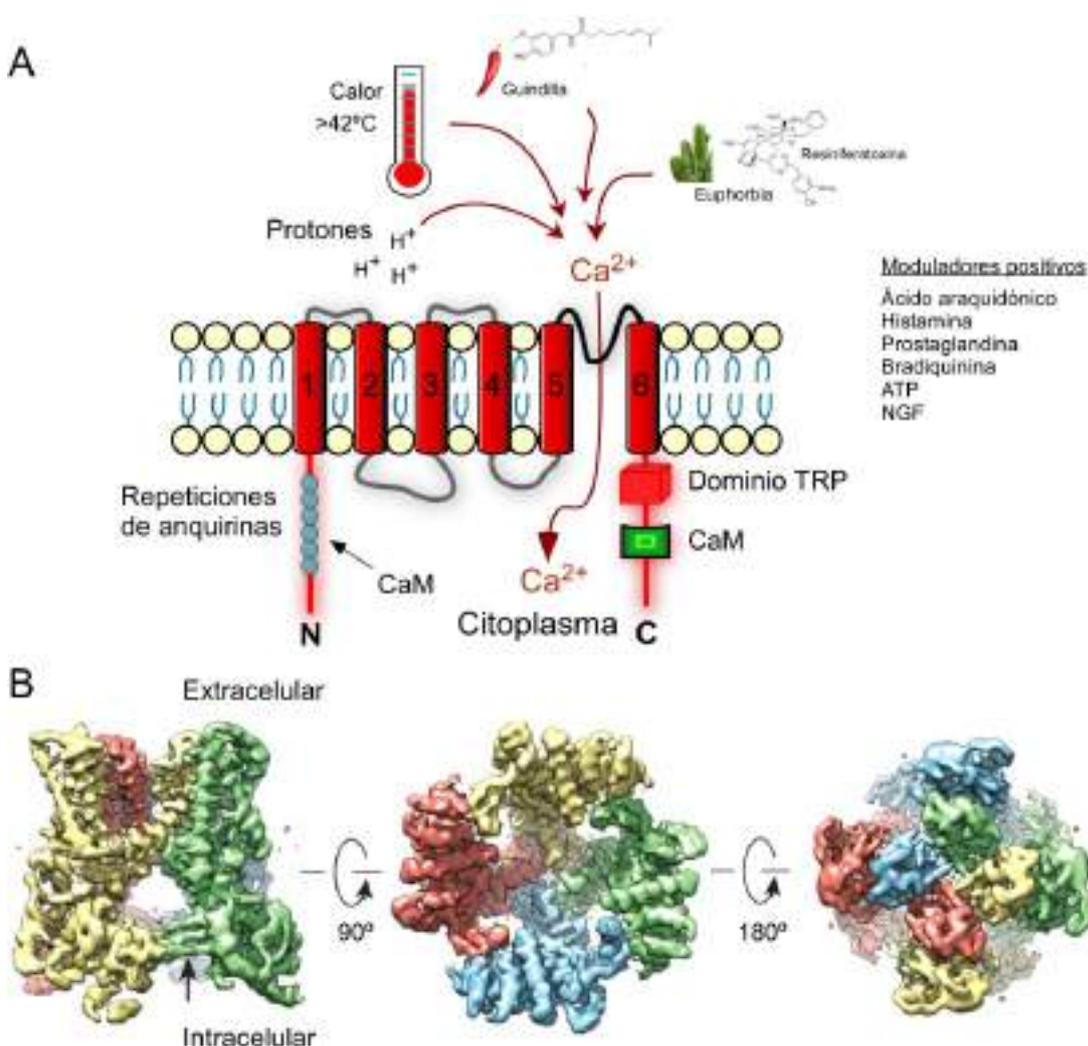


Figura 5. Estructura del canal TRPV1 y su activación por ligandos y agentes físicos. A) Representación esquemática de una subunidad del canal y conjunto de agentes físicos y ligandos, tanto naturales como endógenos, que lo activan o modulan. Se indican las regiones estructurales de las repeticiones con anquirinas, el dominio TRP y el sitio de unión a la calmodulina (CaM). Adaptado de Méndez-Reséndiz *et al.*, 2020. B) Reconstrucción tridimensional del canal TRPV1 por la técnica de crio-EM. Modificado de Liao *et al.*, 2013.

1.3.2. El canal TRPM8

Cuando tratamos los mecanismos moleculares de transducción del frío, uno debe necesariamente referirse al canal TRPM8. Esta proteína se identificó inicialmente en tejido canceroso de la próstata (Tsavalier *et al.*, 2001). Poco después, en el año 2002, dos trabajos independientes identificaron su presencia en una subpoblación de neuronas sensoriales primarias de pequeño tamaño, demostrándose su activación por frío a temperaturas inferiores a 27 °C y compuestos refrescantes como el mentol (McKemy, Neuhauser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002).

Al igual que TRPV1, el canal TRPM8 es un canal catiónico no selectivo con preferencia por el Ca²⁺, posee seis segmentos transmembrana, dos extremos terminales amino y carboxilo y un dominio TRP en el extremo carboxilo. TRPM8 se activa por voltaje, aunque su voltaje-dependencia es débil, comparada con los canales de potasio dependiente de voltaje (K_v) o de sodio (Na_v). Tiene una topología similar a los canales de potasio K_v (Dragoni, Guida and McIntyre, 2006; Phelps and Gaudet, 2007; Voets *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2010; Janssens and Voets, 2011). Un rasgo característico, que comparte con otros miembros de la familia de canales TRPM, es la falta de dominios de anquirina en su terminal amino. Además, posee una región formada por 693 aminoácidos en el dominio amino-terminal que comparte secuencias homólogas con otros miembros de la familia TRPM (Regiones de Homología de la Melastatina, MHRs, **figura 6A**) (Fleig and Penner, 2004). Las regiones MHRs están compuestas por repeticiones de una secuencia conservada, aunque sin una funcionalidad descrita. Los primeros 40-86 residuos parecen ser importantes para el ensamblaje y el tráfico del canal a la membrana plasmática (Phelps and Gaudet, 2007). En el extremo amino terminal también se ha identificado una secuencia de 30 aminoácidos situada concretamente en la región MHR4, que contribuye a la apertura del canal por los estímulos de frío y mentol (Pertusa *et al.*, 2018). Las diferencias en la secuencia entre los ortólogos de TRPM8 sugieren que puede contribuir en cambios importantes en la función del canal (Matos-Cruz *et al.*, 2017; Pertusa *et al.*, 2018). Al igual que TRPV1, cada subunidad presenta un sitio de unión para la calmodulina que lo sensibiliza en función de los niveles de calcio intracelular (Sarria *et al.*, 2011).

La arquitectura atómica del canal no se resolvió hasta 2018, cuando se publicaron las primeras estructuras por Crio-EM para la especie aviar *Ficedula albicollis*, ampliada en estudios posteriores (**figura 6B**) (Yin *et al.*, 2018, 2019; Diver, Cheng and Julius, 2019). En estos trabajos se describe que los extremos terminales forman un anillo citosólico que interactúa con los segmentos transmembrana S1-S4, formando una cavidad submembranal que es donde se sitúa el dominio sensor de voltaje, VSLD (*Voltaje-Sensor Like Domain*).

En el trabajo publicado en 2019 por Ying Yin y colaboradores se describe la estructura tridimensional del canal cuando está unido a diferentes agonistas químicos tales como la icilina o el compuesto WS-12 (véase más adelante para más detalles sobre los agonistas químicos identificados para TRPM8). Hasta entonces, la búsqueda de sitios de unión para los diferentes ligandos se había abordado a través de la mutagénesis dirigida de diferentes residuos del canal; los principales sitios de unión para agonistas y antagonistas químicos se identificaron en los segmentos transmembrana, mientras que en la región C-terminal se encuentran elementos estructurales importantes para la apertura del canal dependiente de la temperatura (Rohács *et al.*, 2005; Brauchi *et al.*, 2007). Destaca el residuo Y745 en el segmento S1 y el residuo R842 en S4, importantes para la unión al mentol, e Y1005 y L1009, localizados en el dominio TRP y relacionados también con la unión al mentol y además importantes para la apertura del canal (Bandell *et al.*, 2006; Voets *et al.*, 2007). También se han identificado mutaciones en el segmento S2-S3 (N799 D802 y G805), que tienen importancia como sitio de unión de la icilina (Chuang, Neuhausser and Julius, 2004). No obstante, gracias a la Crio-EM se determinó que el sitio de unión para la mayoría de los agonistas con acción refrescante se localiza en el elemento transmembrana S1, pero dentro de la cavidad VSLD (Yin *et al.*, 2019). Eso explicaría por qué el frío y los agonistas químicos pueden desplazar el rango de activación por voltaje hacia valores más hiperpolarizados, cambiando por tanto las propiedades de apertura del canal (Voets *et al.*, 2007).

La estructura Crio-EM también determinó el sitio de unión para el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, $PI(4,5)P_2$, PIP_2 , un sustrato lipídico de la membrana celular y que actúa como modulador (Zakharian, Cao and Rohacs, 2010). El sitio de unión es único dentro de la familia TRP y forma un nexo entre el dominio pre-S1, la unión entre los segmentos S4 y S5, el dominio TRP y la región de homología MHR4. De acuerdo a los datos de Crio-EM, la unión de PIP_2 genera la reordenación de la cavidad submembranal, lo que permite a su vez un cambio alostérico para facilitar la unión de ligandos y la apertura del canal (Yin *et al.*, 2019).

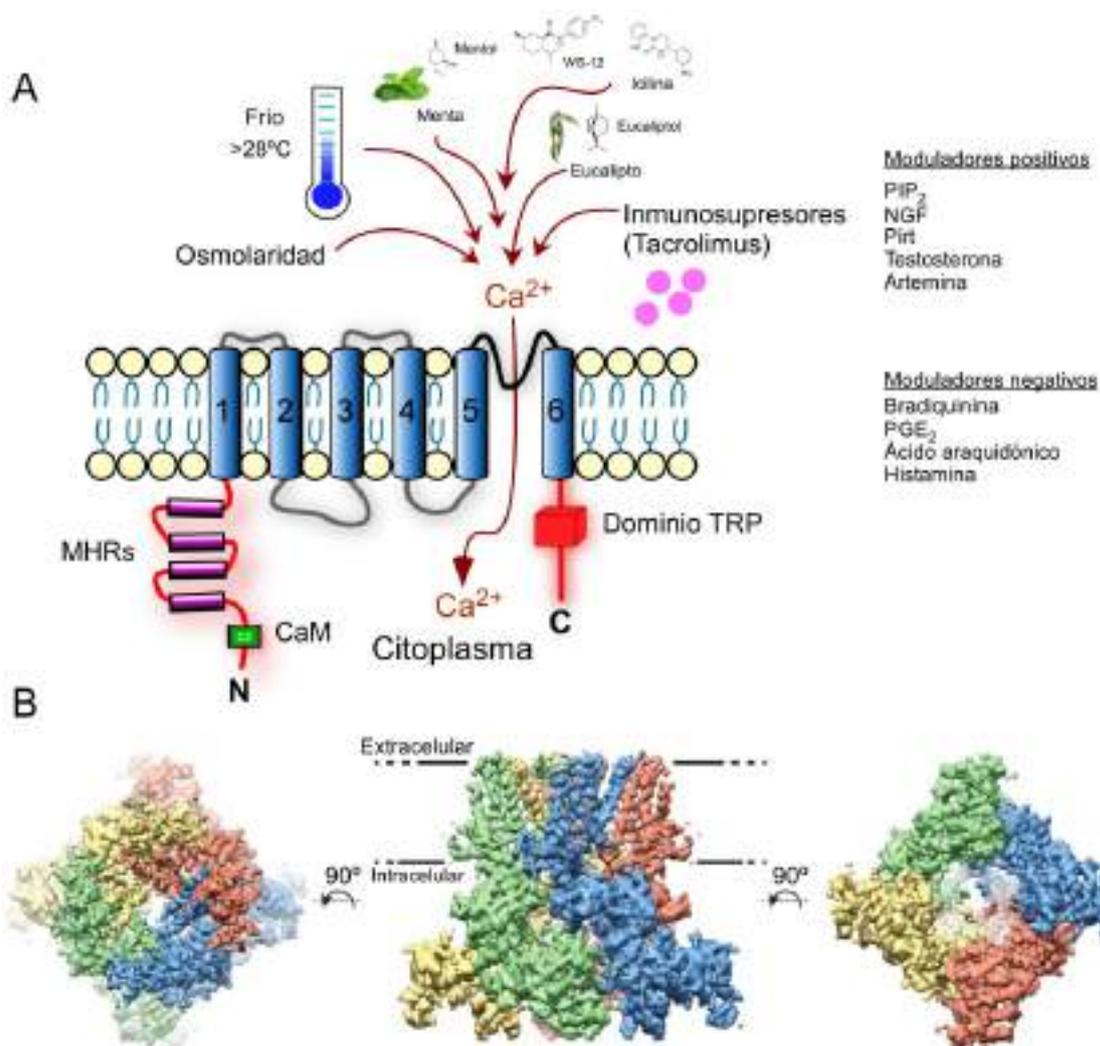


Figura 6. Estructura del canal TRPM8 y su activación por ligandos y agentes físicos. A) Representación esquemática de una subunidad del canal y conjunto de agentes físicos y ligandos, tanto naturales como endógenos, que lo activan o modulan. Se indica las regiones estructurales del dominio de homología con la familia TRPM, MHR, el dominio TRP y el sitio de unión a la calmodulina (CaM). Adaptado de Méndez-Reséndiz *et al.*, 2020. B) Reconstrucción tridimensional del canal TRPM8 por la técnica de crio-EM. Modificado de Yin *et al.*, 2018.

En los últimos años ha progresado notablemente el descubrimiento de nuevos agonistas de TRPM8 (revisado por González-Muñiz *et al.*, 2019). Los primeros identificados, y más utilizados hasta la fecha, son el mentol y la icilina, con valores estimados de EC₅₀ de ~66.7 μM y ~360 nM, respectivamente (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002). Posteriormente, se han identificado agonistas artificiales derivados del mentol con mayor potencia, como es el caso de WS12, con una EC₅₀ de ~193 nM (Bödding, Wissenbach and Flockerzi, 2007), ver **figura 7**.

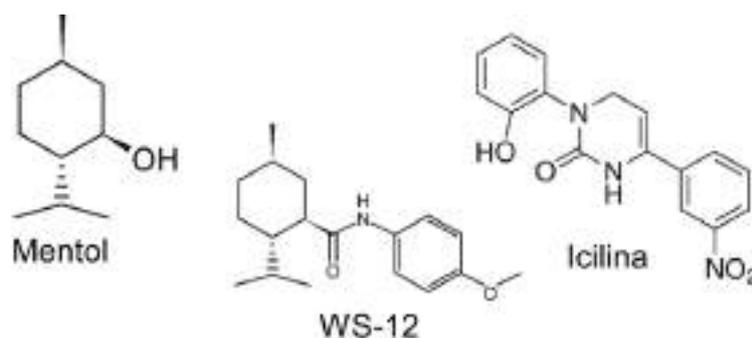


Figura 7. Estructura química de 3 de los principales agonistas del canal TRPM8. De González-Muñiz et al., 2019.

Otros agonistas naturales conocidos del canal TRPM8 incluyen aceite de eucalipto, borneol, hidroxicitronelal, rotundifolona, otro componente de la especie genérica *Mentha* L, helional, geraniol, linalool, alcanfor (revisado por González-Muñiz *et al.*, 2019). Muchos de estos agonistas no son específicos de TRPM8 y a altas concentraciones pueden activar otros miembros de la familia TRP.

TRPM8 también se puede activar por algunas sustancias endógenas como la testosterona (Asuthkar *et al.*, 2015) o el factor neurotrófico artemina (Lippoldt *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado que la expresión de Pirt (“*Phosphoinositide Interacting Regulator of Transient Receptor Potential Channels*”), una proteína de membrana expresada en la mayoría de las neuronas nociceptivas (Decosterd and Woolf, 2000; Kim *et al.*, 2008), aumenta las respuestas del canal TRPM8 a sus agonistas mentol y frío, aunque los detalles de su función moduladora no se conocen (Tang *et al.*, 2013).

Además, la proteína quinasa C (PKC) y la fosfolipasa C (PLC), mediadores que intervienen en la señalización celular de muchos procesos como la inflamación, modulan negativamente al canal. El mecanismo de acción de PKC se piensa que es debido a la activación de una fosfatasa específica, PP1, que a su vez media la desfosforilación de TRPM8 inactivándolo funcionalmente (Premkumar *et al.*, 2005). En cambio, la PLC, reduce la cantidad disponible de PIP₂ (Rohács *et al.*, 2005; Daniels, Takashima and McKemy, 2009). Asimismo, los mediadores inflamatorios bradiquinina, prostaglandina PGE₂, ácido araquidónico e histamina producen la desensibilización del canal y reducen las respuestas al frío y al mentol (**figura 6A**) (Premkumar *et al.*, 2005; Linte *et al.*, 2007). Es interesante mencionar que los agentes moduladores citados generan el efecto contrario en el canal TRPV1. Por tanto, la sensibilización del canal TRPV1 inducida por inflamación se agrava paradójicamente por la regulación negativa de TRPM8, ya que se necesita aplicar

un estímulo de frío más intenso para contrarrestar la sensación de ardor por una afección inflamatoria.

En línea con estos datos, el canal TRPM8 se ha vinculado con un posible papel analgésico en estados de inflamación, dolor crónico o lesión nerviosa (Proudfoot *et al.*, 2006; Dhaka *et al.*, 2007; B. Liu *et al.*, 2013; Knowlton *et al.*, 2013). Asimismo, es bien conocida la utilización del mentol, aplicado de forma tópica, para tratar la inflamación tras una lesión. Aunque los mecanismos asociados a este proceso analgésico no se conocen, se piensa que es debido a una inhibición a nivel central tras la sensibilización de los receptores periféricos (Proudfoot *et al.*, 2006). En esta misma línea, un trabajo previo en nuestro laboratorio describió la activación de TRPM8 por el inmunosupresor Tacrolimus (Arcas *et al.*, 2019), usado en el tratamiento del eczema, particularmente dermatitis atópica. La activación de TRPM8 por inmunosupresores e inmunomoduladores evidencia aún más sus propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias que podrían además explicar el efecto de analgesia inducida por el mentol.

Además de su expresión en el sistema nervioso periférico, se ha demostrado la presencia de TRPM8 en áreas muy delimitadas del SNC, donde podría tener una función termo y osmorreguladora (Camila Almeida *et al.*, 2012; Reimúndez *et al.*, 2018; Ordás *et al.*, 2021). En línea con estos hallazgos, además de su activación química y por temperatura, el canal TRPM8 puede detectar cambios de osmolaridad e hidratación en la superficie del ojo (Quallo *et al.*, 2015). En terminaciones nerviosas de la córnea, se ha demostrado que TRPM8 regula el correcto lagrimeo regulado a su vez por el enfriamiento producido tras la evaporación de la lágrima (Parra *et al.*, 2010). Se ha sugerido que una disfunción del canal podría asociarse al desarrollo del síndrome del ojo seco (revisado por Belmonte *et al.*, 2017).

1.3.3. El canal TRPA1

TRPA1 es el único miembro de la subfamilia TRPA. Aunque se identificó originalmente en cultivos de células tumorales mesenquimales y fibroblastos (Jaquemar, Schenker and Trueb, 1999), hasta el año 2003 no se estableció su papel como canal iónico sensorial (Story *et al.*, 2003). El canal TRPA1 se distribuye ampliamente en neuronas tipo A δ y C de los ganglios DRG, TG, NG, donde co-localiza frecuentemente con TRPV1 y prácticamente nada con TRPM8. También se ha descrito su expresión en regiones del cerebro como la corteza somatosensorial y cerebelo (Doihara *et al.*, 2009; Kheradpezhohu *et al.*, 2017). Fuera del sistema nervioso, además de en fibroblastos, también se ha identificado en linfocitos T, macrófagos, glía, células endoteliales y epiteliales, y en células del músculo liso (Nassenstein *et al.*, 2008; Bautista, Pellegrino and Tsunozaki, 2013; Bertin *et al.*, 2017; Kheradpezhohu *et al.*, 2017; Khalil *et al.*, 2018).

Al igual que en todos los canales TRPs, cada subunidad está formada por un dominio transmembrana, compuesto por seis hélices, los extremos amino y carboxilo y el poro/bucle localizado entre los elementos transmembrana S5 y S6 (Paulsen *et al.*, 2015). Un aspecto característico de este canal es la presencia de un elevado número de repeticiones de anquirinas en el terminal amino y que, de hecho, le da su nombre original (ANKTM1) (ver **figura 8A-B**). Se conocen 14 repeticiones en ratón y 16 en humano, contrastando con las únicamente seis que posee TRPV1 (Gaudet, 2008). La eliminación de las anquirinas altera el tráfico hacia la membrana plasmática pero no altera su funcionalidad (Moparthi *et al.*, 2014; Paulsen *et al.*, 2015).

Existe una amplia bibliografía sobre la reactividad química del canal TRPA1, en la que se incluyen un gran número de hierbas y especias naturales (para más información se puede consultar la revisión de Talavera *et al.*, 2019). En líneas generales, podemos resumir los tipos de agonistas para TRPA1 en electrofílicos, y no electrofílicos. El primer grupo, incluye compuestos que deben su reactividad a la unión covalente con los residuos de cisteína y lisina situados en el extremo amino terminal (Hinman *et al.*, 2006; Pozsgai, Bátaí and Pintér, 2019). En este grupo encontramos a los isotiocianatos, de los cuales el más conocido es el alil-isotiocianato (AITC) componente de la mostaza y del rábano y wasabi, la alicina y el dialil-disulfido presentes en el ajo o el cinaldehído en la canela, el jengibre, entre otros (Bandell *et al.*, 2004; Jordt *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2016). Los agonistas no electrofílicos se unen al canal de forma no covalente y algunos ejemplos los encontramos en el carvacrol, aceite esencial del orégano o la icilina y sus derivados (**figura 8A**) (Macpherson *et al.*, 2007). TRPA1 también puede activarse por el agonista de TRPM8, mentol; su activación parece ser bimodal, estimulando el canal en el rango micromolar pero con un efecto inhibitorio a altas concentraciones (Karashima *et al.*, 2007).

TRPA1 puede además activarse por muchas de las sustancias que se liberan tras una lesión tisular (revisado por Viana, 2016). Por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) producidas en condiciones de estrés oxidativo o un metabolismo aeróbico intenso, también pueden activar TRPA1. Se ha demostrado experimentalmente que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el óxido nítrico (NO), dos gases que actúan como neuromoduladores en el sistema nervioso y que juegan un papel importante en la sensibilización dolorosa causada por la inflamación, activan a TRPA1 directamente (Miyamoto *et al.*, 2009; Eberhardt *et al.*, 2014). Asimismo, la endotoxina LPS (lipopolisacárido), que forma parte de la pared de las bacterias Gram negativas y es el componente responsable principal de la activación del sistema inmune ante estos patógenos, activa directamente al canal TRPA1 (Meseguer *et al.*, 2014). Otros agonistas conocidos de TRPA1 son productos que se generan en situaciones de estrés oxidativo, cómo por ejemplo el 4-hidroxyalquenal, 4-HNE, originado tras la peroxidación de lípidos en las

células, o fosfolípidos oxidados, OxaPAC. Ambos compuestos inducen dolor agudo con la liberación de péptidos pronociceptivos y el desarrollo de inflamación neurogénica (Trevisani *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2016). Además de todos los productos naturales mencionados, TRPA1 se activa por una gran variedad de compuestos reactivos sintéticos, desde el gas mostaza hasta la acroleína (revisado por Viana, 2016).

TRPA1 interviene, de forma directa o indirecta, en muchas de las vías de señalización relacionadas con nocicepción. Por ejemplo, los mediadores proinflamatorios liberados por células no neuronales como la bradiquinina, la prostaglandina PGD₂ A₂/J₂ y el calcio intracelular activan directamente el canal (Doerner *et al.*, 2007; Cruz-Orengo *et al.*, 2008). De igual modo, el ATP, la histamina, el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), la interleucina-1 β (IL-1 β) y 6 (IL-6), también activan indirectamente el canal TRPA1 a través de su acción sobre receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs): activan la fosfolipasa C (PLC), dando lugar a la formación del 1,4,5-trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG). IP3 promueve a su vez la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático, que activa a TRPA1 (Bandell *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2006; Taylor-Clark *et al.*, 2008; El Karim *et al.*, 2015).

En último término, la activación de TRPA1 genera la estimulación de distintas vías de señalización en los nociceptores retroalimentando su sensibilización. Por ejemplo, la activación de TRPA1 da lugar a la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina CGRP y vasodilatadores que a través de las vías de señalización proteína quinasa y fosfolipasa (PKA/PLC) facilitan la transmisión nociceptiva y la liberación de las sustancias previamente mencionadas, contribuyendo a mantener un estado hiperreactivo del canal (Schmidt *et al.*, 2009; Eberhardt *et al.*, 2014). Asimismo, el entorno ácido y básico y la hipoxia e hiperoxia también sensibilizan al canal (**figura 8A**) (Brierley *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011). Con esta carta de presentación, no sorprende que muchos textos sugieran que el canal TRPA1 sería más bien un noci-sensor, activo en condiciones patológicas y ante cualquier indicio de desequilibrio celular, pero inactivo en condiciones normales (revisado por Viana, 2016). Tal como hemos mencionado previamente, además de la temperatura que explicaremos con detalle en los apartados sucesivos, TRPA1 puede activarse por otros estímulos físicos como la presión mecánica; varios grupos han evidenciado corrientes del canal TRPA1 activadas mecánicamente en neuronas de DRG, y su ausencia provoca déficits en la mecanosensación (Kwan *et al.*, 2009; Vilceanu and Stucky, 2010). Además, la inhibición del canal también reduce las respuestas mecánicas usando un modelo de registro en la piel conocido como “*skin nerve*” (Kerstein *et al.*, 2009).

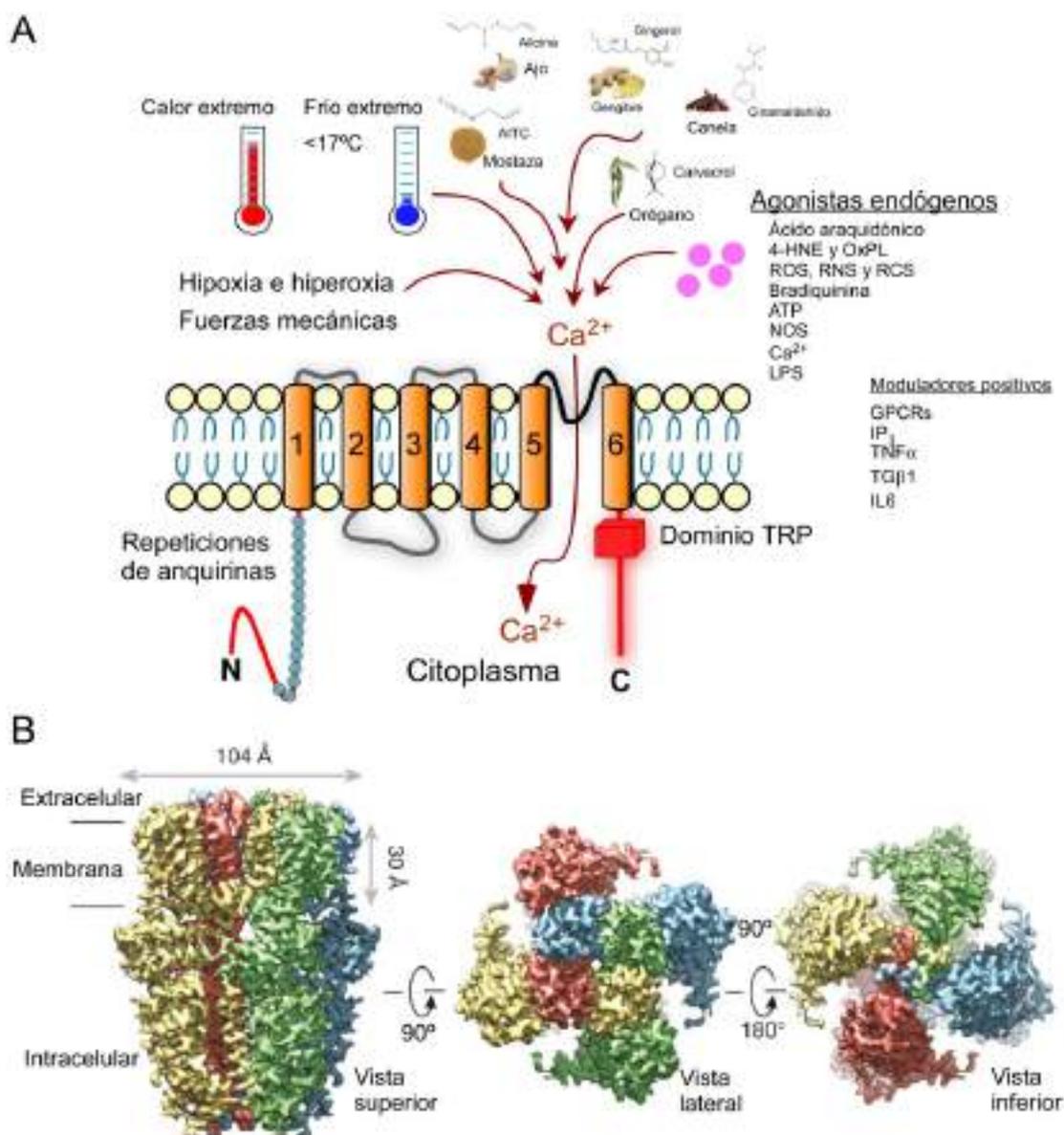


Figura 8. Estructura del canal TRPA1 y su activación por ligandos y agentes físicos. A) Representación esquemática de una subunidad del canal y conjunto de agentes físicos y ligandos, tanto naturales como endógenos, que lo activan o modulan. Se indica las regiones estructurales de las repeticiones de anquirina y el dominio TRP. Adaptado de Méndez-Reséndiz *et al.*, 2020. **B)** Reconstrucción tridimensional del canal TRPA1 por la técnica de crio-EM. Modificado de Paulsen *et al.*, 2015.

1.4. Detección del frío: mecanismos implicados

La capacidad para percibir cambios en la temperatura externa y los mecanismos implicados en la regulación de la temperatura corporal dependen de la expresión de canales termosensores en las terminaciones de las neuronas sensoriales. Tal como hemos visto anteriormente, se considera a la familia de canales TRP como los principales responsables de la detección térmica

cutánea, tanto del frío como del calor, generando la señal eléctrica que se transmitirá al sistema nervioso central. No obstante, también podemos encontrar otras familias de canales iónicos que entran dentro de la definición de termosensores y además, se han descrito otros tipos de canales iónicos que también pueden modular el potencial de acción (PA) en respuesta a los cambios de temperatura; la temperatura en sí, puede generar alteraciones fisiológicas en la generación y frecuencia del PA, debido principalmente a la inactivación que genera el frío en muchos de los canales iónicos (Hoffstaetter, Bagriantsev and Gracheva, 2018) (**figura 9**). Entre ellos, se incluyen los canales de sodio dependientes de voltaje o Na_v , un grupo de canales iónicos clave para la excitabilidad neuronal, ya que su apertura permite la despolarización rápida del potencial de membrana (Dib-Hajj, Geha and Waxman, 2017). Otro grupo importante que interviene en la modulación de la señal eléctrica está formado por los canales de potasio, que a su vez se subdividen en diferentes familias con un papel en la excitabilidad neuronal muy diverso, ya que, acorde con sus diferentes propiedades biofísicas, contribuyen a regular las diferentes fases del PA. En líneas generales, el potencial de reposo se mantiene principalmente gracias a la actividad de los canales de potasio K_{2P} , mientras que en la fase de repolarización del PA participan mayoritariamente los canales dependientes de voltaje (K_v) y los canales de potasio activados por calcio de gran conductancia, (BK_{Ca}). El periodo de poshiperpolarización que sigue al potencial de acción está mediado, principalmente, por canales de potasio activados por calcio de baja conductancia (SK_{Ca}) y por canales catiónicos activados por la hiperpolarización (HCN). Estos canales permiten el flujo tanto de Na^+ como de K^+ , aunque presentan una mayor permeabilidad para este último ion (Tsantoulas and McMahon, 2014). A continuación, comentamos los principales canales cuyo desequilibrio en la expresión o funcionalidad afectan al correcto funcionamiento de la transducción del estímulo de frío.

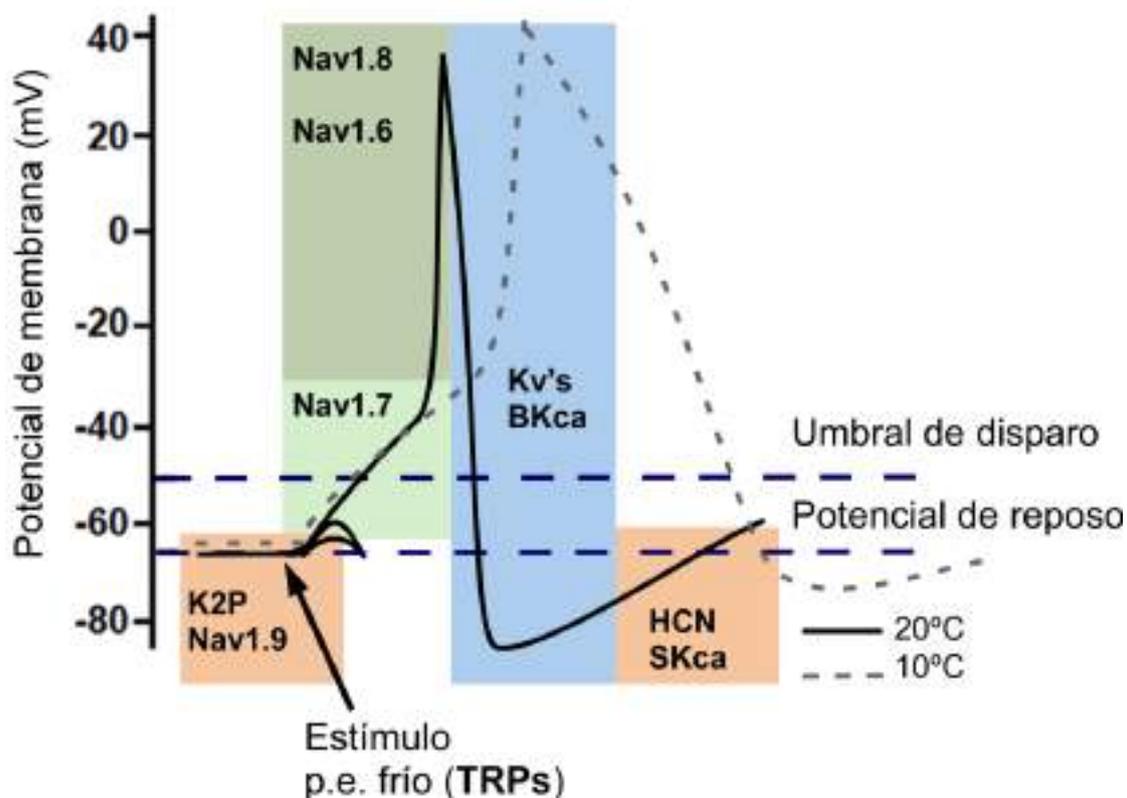


Figura 9. Principales componentes moleculares del potencial de acción en neuronas sensoriales. Se muestra la forma típica del AP en una neurona sensorial a temperatura ambiente (trazo negro). Las regiones coloreadas indican la participación de los canales iónicos indicados en la actividad de las distintas fases del PA. Si la despolarización alcanza un voltaje determinado, conocido como umbral de disparo, tiene lugar la generación del potencial de acción. El canal Nav1.7 contribuye a la despolarización temprana mientras que Nav1.8 o Nav1.6, dependiendo de la población neuronal, generan la corriente de entrada y una ráfaga rápida. Nav1.9, en cambio, disminuye el potencial umbral permitiendo un aumento en el disparo del PA y una hiperexcitabilidad neuronal. Los canales de potasio K2P estabilizan el potencial de membrana en valores de voltaje por debajo del umbral de disparo (potencial de reposo). En general, la despolarización induce la apertura de los canales de potasio dependiente de voltaje (Kv) permitiendo un flujo de iones K^+ que repolariza el potencial de membrana en la fase de caída y por tanto regulan la duración y la frecuencia del PA. Por último, la familia de canales de potasio activados por calcio se activa durante la repolarización y en la fase hiperpolarizante. En esta última fase intervienen también los canales HCN, activados por hiperpolarización y limitan la duración de esta fase en las terminaciones nerviosas, reduciendo así el periodo refractario. A temperaturas más bajas (trazo discontinuo) se generan PAs mucho más amplios y lentos debido a los cambios en la actividad de los canales. Incluso las neuronas que no expresan canales termosensibles pueden sufrir cambios en la transmisión de la información debido a una inactivación paulatina de los canales iónicos por la bajada de la temperatura. Adaptado de Hoffstaetter, Bagriantsev and Gracheva, 2018.

1.4.1. Papel de TRPM8 en la termosensación inocua y nociva del frío

Aunque no fue hasta el año 2002 cuando se descubrió el papel de TRPM8 como receptor en la termosensación del frío, Hensel y Zotterman ya habían propuesto, 50 años antes, la existencia de una proteína con conductividad a cationes que desencadenaba la respuesta celular ante las bajas temperaturas y el compuesto refrescante mentol (Hensel and Zotterman, 1951; McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002). Durante la caracterización del canal tras su clonaje, se observó que la isoforma de rata conservaba las mismas propiedades biofísicas que cuando se expresaba de forma nativa en neuronas sensoriales, incluyendo selectividad iónica, la potenciación por mentol y la voltaje dependencia durante la activación por frío y mentol (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Brauchi, Orio and Latorre, 2004). Cabe destacar que el umbral de activación del canal por temperatura en sistemas heterólogos presenta valores más bajos que cuando se compara con experimentos similares realizados en cultivos de neuronas sensoriales (alrededor de 25 °C y 27 °C respectivamente) (de la Peña *et al.*, 2005; Madrid *et al.*, 2006; Mälkiä *et al.*, 2007; Orio *et al.*, 2012). Este umbral es incluso mayor, alrededor de 33-35 °C en aferentes cutáneos (Reid, 2005). La variabilidad presente en los diferentes sistemas sugiere que las neuronas y las terminaciones nerviosas presentan algún elemento adicional que modula la apertura del canal.

El estudio del canal en ratones transgénicos “knockout” (KO) o deficientes para TRPM8, demostró de forma convincente su papel esencial en la termosensación al frío. Así, en 2007, se publicaron tres trabajos independientes en los que se demostró que estos animales eran incapaces de detectar temperaturas en el rango del frío inocuo; cuando se les exponía al frío en la prueba de preferencia térmica, donde se permite que el animal se mueva libremente entre dos placas dispuestas a diferente temperatura, en este caso a 30° C y 18° C, aquellos que eran silvestres evitaron las temperaturas bajas. En contraste, aquellos que eran deficientes para el canal, pasaban el mismo tiempo en ambas zonas. Los ratones carentes de TRPM8 presentaban además un fenotipo atenuado en la respuesta a acetona, un compuesto que se usa para evaluar la sensibilidad al frío. La acetona aplicada tópicamente, generalmente en las extremidades traseras del animal, provoca, debido al descenso de temperatura producido por su evaporación, respuestas aversivas. En otras pruebas conductuales, se observó además la ausencia de comportamientos de huida inducidos por la administración intraplantar del compuesto de icilina. No obstante, los animales seguían presentando sensibilidad al frío con una latencia similar a los silvestres cuando eran expuestos a temperaturas por debajo de los 10 °C en la prueba de la placa fría. Esta prueba consiste en situar al animal a una superficie con una temperatura fija y contabilizar el número de respuestas aversivas o el tiempo que tarda el animal

en generar la primera respuesta nocifensiva (Bautista *et al.*, 2007; Colburn *et al.*, 2007; Dhaka *et al.*, 2007).

Estos resultados demuestran que TRPM8 no es el responsable de la detección del frío a temperaturas nocivas, indicando por tanto la existencia de otros termosensores en dicho rango de temperatura. Sin embargo, estudios posteriores no han logrado replicar alguno de los hallazgos. En concreto, varios estudios demostraron déficits en la detección del frío en el rango de temperaturas nocivas en ratones TRPM8^{KO} (Gentry *et al.*, 2010; Descoeur *et al.*, 2011; Knowlton *et al.*, 2013; Pogorzala, Mishra and Hoon, 2013).

Independientemente de la mayor o menor contribución de TRPM8 en la detección del frío nocivo, existe consenso en afirmar que su eliminación reduce enormemente la capacidad de los animales para detectar el enfriamiento moderado. La sensibilidad que tenían los ratones TRPM8^{KO} podría ser considerada como residual ya que sólo era visible cuando los animales eran expuestos a temperaturas muy bajas. Además, hasta la fecha, no se ha logrado verificar de forma sólida otro canal responsable de la temotransducción al frío nocivo en condiciones fisiológicas. En algunos estudios, los animales deficientes para el canal TRPA1, uno de los principales candidatos propuestos para la detección del frío nocivo, o el doble KO para ambos canales TRPM8 y TRPA1 no parecía agravar el fenotipo observado para para la línea transgénica TRPM8^{KO} al usar la prueba de preferencia térmica (Knowlton *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios más recientes han reproducido estos experimentos usando un gradiente térmico circular. Esta metodología permite evaluar la conducta de preferencia en un rango de temperatura determinado. Además, la estructura circular evita los bordes, lo que proporciona mayor libertad en la exploración y más precisión, ya que al seguir una distribución simétrica, un mismo valor de temperatura está repetido en los dos semicírculos que forman el gradiente. Los autores observaron una reducción mayor de las respuestas evasivas por bajas temperaturas en los animales KO para TRPA1 y TRPM8 que en los animales KO por separado (Touska *et al.*, 2016).

En otros trabajos, se estudió el papel de TRPM8 en la detención del frío nocivo utilizando líneas transgénicas TRPM8^{DTR}. Estos animales expresan el receptor de la toxina diftérica bajo el promotor de TRPM8, con lo que se consigue eliminar las neuronas TRPM8+ al administrar la toxina (Knowlton *et al.*, 2013; Pogorzala, Mishra and Hoon, 2013). En ambos estudios, se observa que los animales DTR tratados con la toxina presentan latencias más altas en respuesta a estímulos de frío, a las temperaturas de 0 °C, 5 °C y 10 °C. Un dato interesante es que la ablación del canal TRPM8 usando animales deficientes KO resulta en un fenotipo mucho menos severo que la eliminación de las neuronas TRPM8+ al utilizar las líneas transgénicas DTR, lo cual indica

que las propias neuronas TRPM8+ poseen sensores térmicos adicionales o elementos moduladores que intervienen a través del canal.

La relevancia del canal TRPM8 para la detección de bajas temperaturas en condiciones patológicas también ha sido ampliamente estudiada. Así, algunos estudios en roedores han vinculado al canal con el desarrollo de la hipersensibilidad al frío, tanto en diferentes modelos de dolor inflamatorio como de dolor neuropático (Colburn *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2007; Knowlton and McKemy, 2010; Descoeur *et al.*, 2011; Knowlton *et al.*, 2013; González *et al.*, 2017; Piña *et al.*, 2019). En líneas generales, los animales muestran un aumento exacerbado de las respuestas nociceptivas a la estimulación leve y nociva del frío que se atenúan mediante el bloqueo selectivo del canal o su ablación genética.

1.4.2. Papel de TRPA1 en la termosensación y su activación por frío nocivo

A diferencia de su rol bien establecido como sensor de irritantes químicos, el papel del canal TRPA1 en la transducción del frío está menos claro. En 2003, en un primer estudio usando técnicas de imagen de calcio y electrofisiología, se describió la activación de TRPA1 por temperaturas inferiores a 17 °C (Story *et al.*, 2003). No obstante, existen discrepancias con estos resultados en estudios posteriores. Por un lado, varios trabajos mostraban que TRPA1 no se activaba tras el estímulo de frío (Bautista *et al.*, 2006; Jordt *et al.*, 2004; Nagata *et al.*, 2005), mientras que otros autores sí han conseguido demostrar la sensibilidad de TRPA1 al frío en las isoformas de ratón y humano (Bandell *et al.*, 2004; Macpherson *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 2007; Fajardo *et al.*, 2008; Karashima *et al.*, 2009; Camino *et al.*, 2010). Es más, se identificó una población sensorial sensible a temperaturas menores de 17 °C que responde al compuesto AITC, pero no a mentol tanto en cultivos de TG y DRG (Story *et al.*, 2003; Sawada *et al.*, 2007; Wang, Chang and Liman, 2010).

A diferencia de lo descrito en los ganglios somatosensoriales de DRG y TG, en las neuronas sensoriales vagales procedentes del ganglio nodoso (NG), muchas respuestas a frío parecen estar mediadas por TRPA1 (Fajardo *et al.*, 2008). En este contexto, donde no existe apenas expresión de TRPM8, un 79 % de las neuronas sensibles al frío respondían también al cinamaldehído, y el uso de bloqueantes específicos y animales TRPA1^{KO} reducían casi por completo el número de respuestas. Es interesante añadir que, en este estudio, se observó también que prácticamente todas las neuronas sensibles a cinamaldehído respondían además al mentol, agonista para TRPM8, el cual ya hemos mencionado que no se expresa en neuronas sensoriales de NG. La distinta naturaleza de los ganglios sensoriales puede ser clave para entender la sensibilidad al frío por parte de TRPA1. Es posible que TRPA1 sea mucho más sensible en NG, por lo que puede

ser activado por estímulos definidos como “débiles” para el canal que son el caso del frío y mentol. En cambio, los ganglios TG y DRG donde está presente TRPM8, hace que TRPA1 no sea tan necesario para la detección del frío por lo que presenta menor activación. En línea con esto, el trabajo realizado por Karashima *et al.*, 2009, sugiere que una mayor expresión del canal otorga la capacidad a una neurona TRPA1+ de responder a estos estímulos, tal como observaron en su estudio donde aquellas neuronas que presentaban una mayor entrada de calcio hacia el citoplasma tras aplicar AITC respondían también a los estímulos de frío y mentol.

Adicionalmente, en 2009 se demostró la activación de TRPA1 por el calcio intracelular y se sugirió que la activación de TRPA1 por estímulos fríos podía deberse a una activación indirecta a través de la liberación de calcio de depósitos intracelulares y pudiera activar el canal a través del dominio estructural EF (Zurborg *et al.*, 2007). Sin embargo, realizando registros de canal único para la isoforma de ratón y de humano en un sistema de bicapa lipídica, se demostró que el canal era intrínsecamente termosensible (Moparthi *et al.*, 2014). Además, en el estudio de Karashima en 2009, se estableció que la activación por frío es independiente de la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares y que efectivamente la temperatura desencadena la apertura del canal (Karashima *et al.*, 2009).

Los resultados *in vivo* mediante experimentos conductuales tampoco han logrado aclarar la participación de TRPA1 en la sensación al frío. Por un lado, algunos estudios indican que los ratones TRPA1^{KO} presentan una clara deficiencia para detectar bajas temperaturas respecto a los animales silvestres, con una reducción de respuestas aversivas ante la acetona o una mayor latencia de la retirada de la pata o la cola cuando se exponen a temperaturas bajas (Kwan *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2009; Karashima *et al.*, 2009; Gentry *et al.*, 2010). Sin embargo, otros grupos de investigación no encontraron diferencias en las respuestas de estos animales al frío nocivo (Bautista *et al.*, 2006; Knowlton *et al.*, 2010; Brenner *et al.*, 2014). Más recientemente, el desarrollo de la técnica de imagen de calcio en ratones anestesiados (registro de calcio *in vivo*), ha permitido estudiar la reactividad de las neuronas sensoriales en un sistema más fisiológico. En este contexto, el trabajo publicado por Yarmolinsky *et al.*, 2016, usando esta técnica de imagen en ratones transgénicos GCaMP muestra que las neuronas TRPA1+ no contribuyen a la transducción del frío a ninguna temperatura, incluso a aquellas extremadamente bajas de 1 °C. Por extraño que parezca, sí observaron que un gran número de neuronas TRPA1+ respondían tras un estímulo de calor (Yarmolinsky *et al.*, 2016). Este estudio va de la mano con el descubrimiento posterior de que la isoforma TRPA1 humana es un sensor del calor o frío en humanos influenciado por el ambiente redox y ligandos endógenos (Moparthi *et al.*, 2016).

A pesar de las discrepancias encontradas en los estudios de TRPA1 como posible sensor de frío en condiciones fisiológicas, en modelos experimentales de dolor especialmente de ratas y ratones, la detección del frío mediada por TRPA1 está sólidamente apoyada por distintos resultados. Así, varios estudios muestran que la administración intraplantar de agonistas para TRPA1 también aumentan las respuestas aversivas cuando se estudia la hipersensibilidad al frío en pruebas conductuales (Gentry *et al.*, 2010; Tsagareli *et al.*, 2010; Andersson, Gentry and Bevan, 2012). Además, está ampliamente demostrado que el bloqueo selectivo o eliminación del canal alivia la hipersensibilidad al frío producida en condiciones patológicas (Obata *et al.*, 2005; Katsura *et al.*, 2006; da Costa *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Nassini *et al.*, 2011; Barriere *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Nativi *et al.*, 2013; K. Yamamoto *et al.*, 2015; Hiyama *et al.*, 2018).

1.4.3. Descubrimiento de nuevos termorreceptores candidatos para la termosensación nociva

En los últimos años, el estudio de la termosensibilidad se ha revolucionado con el descubrimiento y la caracterización de nuevas moléculas transductoras para el frío. En los apartados previos, hemos comentado la capacidad de las neuronas sensoriales para responder aún a bajas temperaturas tras la delección del canal TRPM8 y la controversia que rodea a la activación directa o indirecta del canal TRPA1. Estos datos sugieren la existencia de otros mecanismos que participan en la detección del frío a temperaturas nocivas. Es más, distintos autores han descrito la existencia de una población neuronal sensible al frío, la cual no se activa ni por mentol ni por AITC y de la que se desconoce el termorsensor implicado (Babes, Zorzon and Reid, 2004; Hjerling-Leffler *et al.*, 2007; Munns, AlQatari and Koltzenburg, 2007; Ran, Hoon and Chen, 2016; Memon *et al.*, 2017; Michot, Lee and Gibbs, 2018; Leijon *et al.*, 2019).

Además de los canales de potasio y sodio, de los cuales hablaremos en más detalle en los siguientes apartados, el canal TRPC5 se activa por descensos de temperatura en un rango de entre los 37 °C y 25 °C (Zimmermann *et al.*, 2011). Recientemente, se ha descubierto que su termosensibilidad es crucial en el frío dental (Bernal *et al.*, 2021). En este estudio, los autores demostraron que la ablación del canal prevenía el dolor inflamatorio derivado de un modelo de pulpitis y reducía el número de respuestas al frío aproximadamente a la mitad en registros *ex vivo* del nervio mandibular. Además, la expresión del canal aumentaba tras la inflamación, específicamente en los odontoblastos, células responsables de la formación de la dentina y situados en la periferia de la pulpa dentaria, adyacentes a los nervios sensoriales de los plexos de Raschkow. Los autores proponen que TRPC5 es el principal termorreceptor del frío en los odontoblastos y cuya señal se transmite a los nervios sensoriales.

En neuronas sensoriales en cambio, el papel del canal TRPC5 en la termosensibilidad no está tan clara, ya que, aunque su expresión está presente en los ganglios TG y DRG, los ratones TRPC5^{KO} no reducían significativamente el número de respuestas al frío ni mostraron déficits en comportamientos relacionados con la sensibilidad al frío (Zimmermann *et al.*, 2011; Bernal *et al.*, 2021). No obstante, en el estudio del 2011, sí se observaron alteraciones que involucraban al canal TRPM8 y posiblemente un papel modulador por parte de TRPC5 (Zimmermann *et al.*, 2011).

Otro de los mecanismos propuestos para detectar el frío implica a los canales operados por depósitos intracelulares de calcio (SOC) mediante la interacción de las proteínas STIM/ORAI (Xiao *et al.*, 2011). La molécula STIM1 puede activarse por temperatura donde se agrupa en la membrana del retículo endoplasmático e interacciona con los canales catiónicos ORAI, desencadenando una liberación del calcio intracelular. Aunque inicialmente el complejo STIM/ORAI se le relacionó solamente en el proceso de calentamiento (Xiao *et al.*, 2011; Xiaoling Liu *et al.*, 2019), se ha observado que también media un tipo de respuestas a frío a través de la inhibición de ORAI (Buijs, 2018). Es interesante añadir que las neuronas que expresan el complejo STIM/ORAI son un subgrupo de neuronas TRPA1+, lo que puede indicar una activación del canal TRPA1 por este mecanismo.

Recientemente, mediante un proceso de cribado se identificó el receptor de glutamato GLR-3 expresado en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y su homólogo en mamíferos, GluK2 (receptor ionotrópico glutamatérgico de kainato tipo 2), como canales termosensibles a temperaturas inferiores a 18 °C. Su termosensibilidad es independiente de su función ionotrópica como canal activado por glutamato, pero requieren de la señalización a través de las proteínas G para transmitir las señales evocadas por el frío tanto *in vitro* como *in vivo* (Gong *et al.*, 2019). Otros termosensores descubiertos incluyen los canales de sodio epiteliales (ENaC), activados por temperaturas menores de 25 °C (Askwith *et al.*, 2001), y el canal CNGA3 (Cyclic Nucleotide-Gated Channel Alpha 3), principalmente expresado en el SNC, en la región del hipotálamo donde se sugiere un función termoreguladora (Feketa *et al.*, 2020).

1.4.4. Los canales de potasio K2P o de fuga y la transducción del frío

Los canales de potasio son otro de los componentes moleculares identificados en la cascada de transducción de los estímulos de frío. En los estudios independientes de Reid y Flonta, en 2001 y Viana, De la Peña y Belmonte, en 2002, se demostró que el estímulo de frío causaba el cierre de canales de potasio de fuga o “leak” que se activan a potenciales de reposo, resultando en la despolarización y el disparo de las neuronas termosensibles. Aunque en su momento no pudo

identificarse la identidad molecular del canal responsable, uno de los principales candidatos sugeridos fue TREK1 (codificado por el gen *Kcnk2*), un miembro de la familia de canales de potasio K2P o dominio en tándem (Reid and Flonta, 2001; Viana, De la Peña and Belmonte, 2002).

Los canales de potasio de fuga o “leak” (K2P) regulan la excitabilidad neuronal a través de la estabilización del potencial de reposo (revisado por Mathie and Veale, 2015; Lamas, Rueda-Ruzafa and Herrera-Pérez, 2019). De acuerdo con su homología de secuencia, se dividen en las subfamilias TWIK, THIK, TREK, TASK y TALK. Hasta la fecha se han identificado como termosensibles y/o relacionados con los procesos de transducción al frío las siguientes isoformas: TREK1 (en las especies de ratón y rata, codificado por el gen *Kcnk2*), TREK2 (en las especies de rata y humano, *Kcnk10*), TRAAK (rata, *Kcnk4*), TASK3 (ratón, rata y humano, *Kcnk9*) y TRESK (ratón, *Kcnk18*) (Lesage *et al.*, 2000; Maingret *et al.*, 2000; Kang, Choe and Kim, 2005; Noël *et al.*, 2009; Morenilla-Palao *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Castellanos *et al.*, 2020). Hay que mencionar que su sensibilidad térmica intrínseca (Q10) es muy variable.

TREK1, TREK2 y TRAAK pertenecen a la subfamilia de canales TREK, los cuales muestran una fuerte activación por el calor nocivo, provocando la hiperpolarización de la membrana y el freno a la activación de la neurona. En contraste, el frío los inhibe permitiendo la despolarización y mayor excitabilidad de los termorreceptores a temperaturas bajas (Lamas, Rueda-Ruzafa and Herrera-Pérez, 2019). Aunque los tres miembros mencionados tienen propiedades biofísicas similares, se ha demostrado que tienen papeles distintos en la termosensación. Por un lado, el canal TREK2 contribuye a la detección de frío inocuo en el rango de temperaturas entre 25 °C y 20 °C. Los ratones deficientes para el canal presentan menor latencia a estas temperaturas en las pruebas conductuales de retirada de la cola y una mayor predilección por temperaturas cálidas en la prueba de preferencia. En registros *in vitro* obtenidos de fibras sensoriales en estos ratones KO, la hipersensibilidad al frío se correlacionó con un aumento de las respuestas al frío en termorreceptores tipo C (Pereira *et al.*, 2014). Por otro lado, en este mismo trabajo observaron que la eliminación conjunta de TREK2 y de otros miembros de la familia, TREK1 y TRAAK no agrava la hipersensibilidad en este rango de temperatura. No obstante, la ausencia de TREK1 y TRAAK también aumenta las respuestas al frío y los ratones mostraron una hipersensibilidad en un rango de temperaturas más amplio, de entre 25 °C y 5 °C. Este fenotipo no fue observado cuando eliminaban estos dos canales por separado (Noël *et al.*, 2009).

Con respecto a TRESK y TASK3, aunque su termosensibilidad intrínseca es baja, también se les ha implicado en los mecanismos de termotransducción. El canal TRESK (*TWIK-related spinal cord K⁺*) se expresa principalmente en las neuronas sensoriales y su delección provoca una hipersensibilidad al frío, observada tanto en pruebas conductuales como en registros de

aferencias cutáneas (Castellanos *et al.*, 2020). Por último, la ablación genética de TASK3 también genera un fenotipo de hipersensibilidad al frío, existiendo además una alta co-localización con el canal TRPM8 en neuronas sensoriales de los DRG (Morenilla-Palao *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2019). La caracterización funcional de TASK3 en neuronas TRPM8+ demostró que su bloqueo despolariza el potencial de membrana y aumenta su excitabilidad en respuesta al estímulo de frío. Además, existe un desplazamiento del umbral de temperatura hacia valores más altos que se correlaciona con lo observado en experimentos conductuales en animales TASK3^{KO}, donde éstos animales presentan mayor sensibilidad al frío (Morenilla-Palao *et al.*, 2014).

1.4.5. Canales dependientes de voltaje y la transducción del frío

Nuestro grupo de investigación identificó componentes moleculares adicionales presentes en neuronas termorreceptoras de frío (Viana, De la Peña and Belmonte, 2002). Por un lado, se señaló la presencia de canales activados por hiperpolarización, responsable de la corriente hiperpolarizante (*I_h*) cuyas propiedades biofísicas definían a los canales HCN (Viana, De la Peña and Belmonte, 2002; Orio *et al.*, 2009). La *I_h* no se inactiva por la temperatura, pero modula la capacidad de disparo de las células sensibles al frío; a diferencia de otros canales dependientes de voltaje, los HCN se activan por la hiperpolarización de la membrana, permitiendo la entrada de cationes y facilitando el regreso del potencial de membrana al valor umbral de disparo. Su eliminación o bloqueo causa una reducción de la actividad espontánea y del disparo en ráfagas, un rasgo característico en los receptores de frío (Braun, Bade and Hensel, 1980). También se observó una disminución de las respuestas al frío en pruebas conductuales. No obstante, su eliminación parece ser no esencial para la transmisión de la señal ya que no se observaron cambios en el umbral de temperatura ni en el número de respuestas totales (Orio *et al.*, 2009).

Asimismo, se identificó otro elemento generador de la corriente denominada de freno, *IKD*, mediada principalmente por los canales K_v1.1 y/o K_v1.2 (codificados por los genes *Kcna1* y *Kcna2*, respectivamente). Su activación causa una hiperpolarización, actuando como un freno de la excitabilidad neuronal (Viana, De la Peña and Belmonte, 2002). La *IKD* se expresa a niveles altos en neuronas insensibles al frío. En las neuronas sensibles al frío, su expresión es variable y muestra una correlación inversa con el umbral de temperatura (Madrid *et al.*, 2009). Este trabajo demostró que la mayor o menor expresión de los canales K_v1.1/2, junto con la expresión variable de TRPM8, modula el rango térmico de activación de las neuronas sensibles al frío; el umbral de temperatura se define por tanto con estos dos tipos de elementos de tal forma que menos *IKD* y más *Icold* proporciona una mayor sensibilidad a pequeños cambios de temperatura mientras que las neuronas con umbrales de frío altos poseen más *IKD* y/o menos *Icold* (Madrid *et al.*,

2009). Además, el bloqueo farmacológico de los canales $K_v1.1/2$ provoca una termosensibilidad *di novo* en neuronas que originariamente eran insensibles al estímulo y que podría explicar la aparición de neuronas sensibles al frío silentes en condiciones patológicas (González *et al.*, 2017; Pertusa and Madrid, 2017; MacDonald *et al.*, 2021). Aunque el mecanismo de la corriente de freno *IKD* se demostró originalmente en neuronas TRPM8+, en el trabajo de Memon del 2017, demostraron que el bloqueo farmacológico de $K_v1.1/2$ en neuronas TRPA1+ generaba el mismo fenómeno, una sensibilización con un aumento de las respuestas al frío (Memon *et al.*, 2017).

La transmisión del estímulo nervioso no sería posible sin los canales de sodio dependientes de voltaje o Na_v . Con su apertura contribuyen de manera esencial a la corriente de entrada necesaria para la rápida despolarización de la membrana neuronal (Hodgkin and Huxley, 1952; Liu and Wood, 2011).

Los canales Na_v pueden clasificarse según su sensibilidad o resistencia a la toxina tetrodotoxina (TTX). En líneas generales, la activación de cualquier miembro de esta familia sería necesaria para la propagación del impulso nervioso, pero, a temperaturas menores de 10 °C los canales Na_v que son sensibles a TTX se inactivan gradualmente impidiendo la despolarización. Por el contrario, el canal resistente a TTX $Na_v1.8$ (codificado por el gen *Scn10a*), tiene la particularidad de mantenerse activo cuando la temperatura decae, permitiendo la generación del potencial de acción a bajas temperaturas, contribuyendo así a la termotransducción (Zimmermann *et al.*, 2007). La ablación del canal demostró que, efectivamente, su ausencia reducía el número de respuestas aversivas cuando la temperatura baja a menos de 10 °C en registros *in vitro*. No obstante, para demostrar los mismos efectos *in vivo* fue necesario bajar la temperatura por debajo de 0 °C (Zimmermann *et al.*, 2007; Abrahamsen *et al.*, 2008; Luiz *et al.*, 2019). Otro miembro de la familia resistente a TTX, el canal $Na_v1.9$ (codificado por el gen *Scn11a*), ha sido relacionado también con el mecanismo de termotransducción al frío, dado que su apertura genera una corriente de entrada constante debido a su lenta inactivación, lo cual se traduce en una duración más prolongada del potencial de acción tras la activación por el frío en neuronas termorreceptoras (MacDonald, Wood and Emery, 2020). Su papel en la termotransducción al frío también ha sido demostrado en condiciones patológicas, donde su eliminación alivia la hipersensibilidad al frío producida en modelos neuropáticos (Lolignier *et al.*, 2015). Ambos canales se expresan en nociceptores que no expresan TRPM8, por lo que su posible contribución a la transducción del frío se limita a aquellas neuronas TRPM8- que detecten el frío nocivo (Lolignier *et al.*, 2015; Luiz *et al.*, 2019).

1.5. Caracterización molecular de las neuronas sensoriales

Aparte de la heterogeneidad que podamos encontrar en su especialización para detectar y transducir un determinado tipo de estímulo, numerosos estudios han demostrado que las neuronas sensoriales manifiestan una gran diversidad en cuanto a su expresión génica y proteica, lo que ha permitido establecer clasificaciones basadas en su perfil molecular. El uso de técnicas histológicas y moleculares, tales como la inmunodetección o la hibridación *in situ* y más recientemente las técnicas de secuenciación masiva de ARN, han permitido identificar nuevos subgrupos neuronales dependiendo de la expresión o no, de marcadores moleculares específicos. Este tipo de clasificación no está basada en su funcionalidad, aunque los grupos de neuronas que comparten las mismas propiedades moleculares presentan también funciones similares. La primera aproximación para su caracterización molecular se ha basado principalmente en la identificación de un número limitado de proteínas detectadas mediante técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

1.5.1. Clasificación histológica de las neuronas sensoriales

Históricamente, lo que conocemos sobre la identidad molecular de las neuronas del sistema nervioso periférico proviene de la caracterización de la expresión de un número limitado de marcadores. Ejemplos de los marcadores clásicos incluyen el gen relacionado con el péptido de la calcitonina (CGRP), la isolectina B4 (IB4) y los neurofilamentos (NF).

Los NF, por ejemplo, son proteínas que forman parte de la estructura del citoesqueleto presente en el citoplasma de las neuronas, y fueron uno de los primeros marcadores utilizados. Existen distintas proteínas dentro de la familia de los NF, agrupadas por su peso molecular y cuya composición varía ampliamente entre neuronas (Goldstein, House and Gainer, 1991). Las neuronas mielínicas son mecanorreceptores de gran tamaño y expresan el neurofilamento de cadena pesada con una masa molecular aparente de 200 kDa, NF200 (codificado por el gen *Nefh*), mientras que las neuronas de pequeño tamaño carecen de neurofilamentos de cadena pesada o lo expresan en menor cantidad (neuronas tipo C y A δ respectivamente). En su lugar, expresan el neurofilamento periferina, de 56 kDa (codificado por el gen *Prph*) (Parysek and Goldman, 1988). Los nociceptores tipo C y A δ expresan periferina, mientras que NF200 se expresa en neuronas tipo A α , A β y A δ .

Las neuronas tipo C o nociceptores pueden clasificarse, además, en dos grupos no solapantes, neuronas peptidérgicas y no peptidérgicas, según la expresión o no de la sustancia P (SP, codificada por el gen *Tac1*) o CGRP, codificado por el gen *Calca*. Ambos marcadores son péptidos

que se liberan tras la inflamación neurogénica y actúan como moduladores de la nocicepción, activando diversos procesos como la vasodilatación, la inflamación, el sistema inmune o la sensibilización de los nociceptores, etc (Saria, 1984; Edvinsson *et al.*, 1987; Brain and Williams, 1989). Asimismo, estas neuronas también expresan otros neuropéptidos, como la galanina (Gal) y la somatostatina (Sst), el receptor de neurotrofina (TrkA), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el receptor para la artemina, GFR α 3 (Skofitsch and Jacobowitz, 1985b; Averill *et al.*, 1995; Orozco *et al.*, 2001; Stantcheva *et al.*, 2016).

En cambio, las neuronas no peptidérgicas, como su nombre indica, tienen una expresión muy baja de neuropéptidos y un gran porcentaje se marcan con la isolectina IB4, una glicoproteína de membrana de 114 kDa promoviendo así su separación entre nociceptores peptidérgicos IB4- y nociceptores no peptidérgicos IB4+ (Vulchanova *et al.*, 1998; Dirajlal, Pauers and Stucky, 2003). Anatómicamente, las neuronas IB4+ también presentan diferencias con el grupo peptidérgico, ya que sus fibras inervan generalmente dianas cutáneas, mientras que las terminaciones peptidérgicas están presentes en mayor grado en músculos y vísceras. Las neuronas IB4+ se caracterizan por no depender de NGF para su supervivencia sino del factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF). Entre los marcadores que las definen se encuentran algunos receptores tróficos, tales como GFR α 1 y GFR α 2; la fosfatasa ácida resistente al fluoruro (FRAP), el receptor purinérgico P2X3 y el receptor heterotrimérico MRGRPD (Zylka, Rice and Anderson, 2005; Zylka *et al.*, 2008; Rau *et al.*, 2009; Kupari and Airaksinen, 2014). Las neuronas IB4+ expresan CGRP en un porcentaje muy pequeño junto con otros marcadores como la somatostatina o histamina (**figura 10**) (Bennett *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2013).

Las neuronas con expresión de mielina y NF200 constituye un tercer gran grupo de neuronas sensoriales, con una expresión única de marcadores para factores neurotróficos como TrkB y TrkC, receptores del BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y NT-3 (neurotrofina-3), respectivamente (Lamballe, Klein and Barbacid, 1991; Soppet *et al.*, 1991). TrkB es un marcador específico de neuronas A δ y algunas pueden expresar también CGRP y otros marcadores peptidérgicos como TrkA (nociceptores mielínicos). Se han identificado también neuronas tipo A β en este grupo pero son mucho menos comunes (revisado por Djouhri and Lawson, 2004). El resto de las fibras A δ se especializan en la detección de estímulos mecánicos de bajo umbral (**figura 10**).

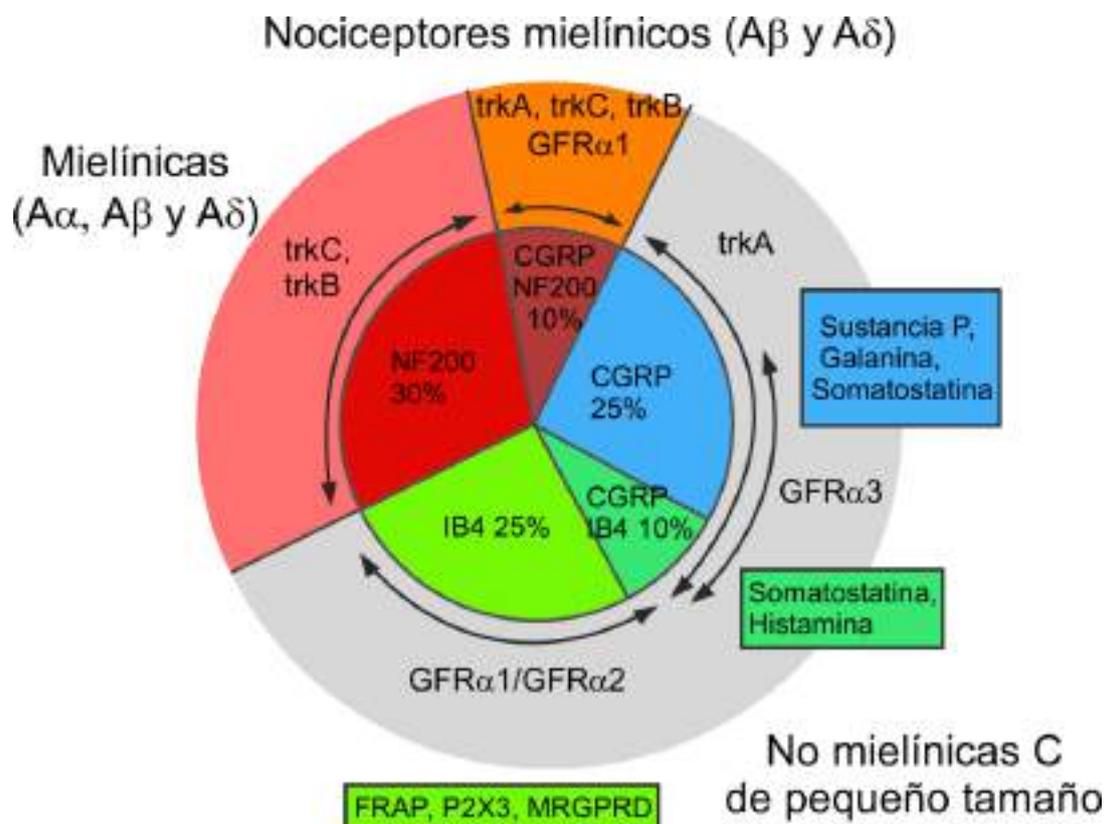


Figura 10. Gráfico de sectores que resume la clasificación neuroquímica de las principales neuronas encontradas en el ganglio raquídeo. Las neuronas de tipo C carecen de mielina. Estas neuronas son principalmente nociceptores y comprenden dos poblaciones; una población que se caracteriza por su unión a la lectina IB4 y otro grupo de neuronas que expresan CGRP. Existe un pequeño subconjunto de neuronas que pueden expresar ambos marcadores. También existe otro pequeño solapamiento de neuronas CGRP y NF200 positivas que corresponde a un grupo reducido de fibras nociceptivas (nociceptores mielínicos). Las neuronas tipo $A\alpha$ y $A\beta$ presentan altos niveles de mielina y expresan NF200. El grupo de neuronas $A\delta$ expresan también NF200, aunque en menor cantidad. Se muestra, además, la expresión de los neuropéptidos y los receptores neurotróficos. Modificado de Priestley, 2009.

Las funciones sensoriales de las poblaciones neuronales definidas por estos marcadores se examinaron mediante la combinación de líneas transgénicas reporteras y técnicas fisiológicas. En algunos casos, estos estudios lograron establecer una correlación entre el marcador específico expresado y la modalidad del estímulo detectado. Así, por ejemplo, se pudo demostrar que tanto las neuronas peptidérgicas como no peptidérgicas son nociceptores, aunque con matices diferentes. En el caso de las neuronas no peptidérgicas se demostró que contribuyen en mayor medida a la mecano-sensación de alto umbral y la generación del prurito, mientras que una proporción de las neuronas peptidérgicas expresan el canal TRPV1 y tienen un papel más relevante a la respuesta antes estímulos nocivos térmicos (revisado por Jankowski and Koerber, 2009).

Conforme avanzó la investigación en este campo, se descubrieron nuevos marcadores que definían grupos de neuronas más especializadas, como por ejemplo para la vía de la señalización del picor y que están definidas por los marcadores moleculares excluyentes, MRGPRA3 y NPPB (Han *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2018). Otro ejemplo lo podemos encontrar con la caracterización molecular de los mecanorreceptores de bajo umbral tipo C (C-LTMR, verse de nuevo **sección 1.2.3**), que están definidas por la expresión muy específica de la tirosina hidroxilasa (TH), una enzima responsable en la conversión de L-DOPA en DOPA, precursor del neurotransmisor dopamina (Li *et al.*, 2011). Estas neuronas responden de forma rápida al enfriamiento, pero no al calentamiento, aunque se desconoce el canal responsable de su sensibilidad al frío ya que no expresan TRPM8 según los estudios inmunohistoquímicos (Reimúndez *et al.*, 2018).

1.5.2. Secuenciación masiva de ARN en la caracterización de neuronas sensoriales primarias

Durante los últimos años, se ha avanzado notablemente en la caracterización de la diversidad molecular de las distintas poblaciones neuronales del sistema nervioso. Esto tiene especial interés ya que existe una relación entre los perfiles genéticos de las subpoblaciones y su especialización funcional. Sin embargo, hasta ahora, estos estudios se habían basado en un número limitado de marcadores que proporcionan una visión sesgada y simplificada de su especialización.

En este contexto, la aparición de nuevos métodos de secuenciación basados en las plataformas de “*Next Generation Sequencing*” (NGS) (Wang, Gerstein and Snyder, 2009), ha permitido determinar con gran precisión la composición molecular presente en el tejido y/o células individuales de una forma objetiva (revisado por Hernández *et al.*, 2020). El término NGS se popularizó a partir del año 2004 cuando se lanzó al mercado una nueva versión de la pirosecuenciación por 454 Science, que permitía reducir en unas seis veces el coste comparado con anterior el método de Sanger, utilizado ampliamente durante la década de los 90 para secuenciar el genoma humano (Barba, Czosnek and Hadidi, 2013; Green, Watson and Collins, 2015). En los años siguientes, aparecieron nuevas estrategias de secuenciación. En concreto, la plataforma de secuenciación Illumina, monopolizó prácticamente el mercado con su técnica de secuenciación en “*clusters*” (Schadt, Turner and Kasarskis, 2010). Para consultar más detalladamente las diferencias entre los tipos de secuenciación NGS véase la sección de materiales y métodos.

Previamente a la irrupción de esta tecnología, los estudios de expresión se habían basado mayoritariamente en, aparte de las técnicas de hibridación *in situ* o las técnicas inmunohistoquímicas, en el uso de la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y, posteriormente, en la técnica de micromatrices (“microarray”). Ambas se basan en la hibridación del material genético a través de oligonucleótidos específicos, previamente seleccionados para detectar la expresión del gen de interés. La hibridación de estos oligos establece la cantidad de moléculas presentes para un determinado gen en la muestra **figura 11A(a)**. En contraste, las técnicas de secuenciación de ARN están basadas en un principio diferente (**figura 11A(b-c)**). En este caso el ADNc se fragmenta entre 10-300 pares de bases y a continuación se amplifican clonalmente y se agrupan en función de secuencias conocidas o adaptadores que se añaden a sus extremos, lo que se conoce como una librería de ADN. Los adaptadores actúan como un código de barras que permite identificar los fragmentos que provienen de una misma muestra y la secuenciación se realiza al incorporar todos los fragmentos en una superficie sólida usando una variable de la tecnología de amplificación de la polimerasa en ciclos de terminación reversible (CRT): cada vez que se incorpora un nucleótido la reacción se para para permitir “fotografiar” las bases. Esto se logra ya que los tipos de nucleótidos están marcados con diferentes fluoróforos y por tanto en cada ciclo podemos conocer la base incorporada en cada fragmento (revisado por Metzker, 2010) (verse **figura 11B**). Una vez que se obtiene la secuencia nucleotídica para cada fragmento de ADN, conocidas como lecturas o “*reads*”, es necesario localizarlas mediante técnicas bioinformáticas en el mapa genético del organismo estudiado. El proceso es conocido como alineamiento, utilizando lo que se conoce como genoma de referencia.

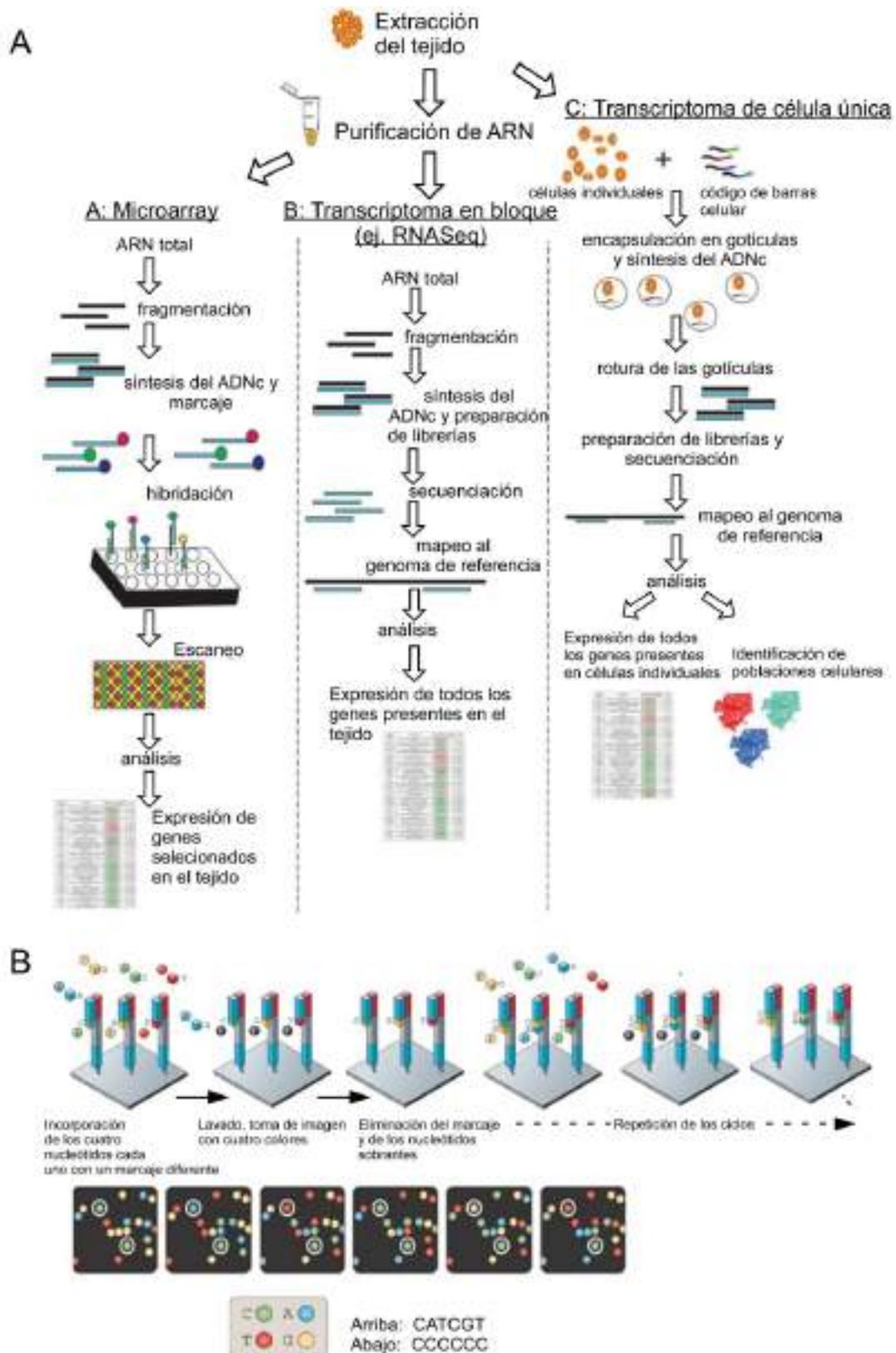


Figura 11. Técnicas usadas en los estudios de expresión génica. A) Diagrama simplificado de los procedimientos experimentales y bioinformáticos que engloban las tres principales técnicas del estudio transcripcional. La técnica de micromatrices (“microarray”), la secuenciación masiva “en bloque” (RNA-Seq) y la secuenciación masiva en célula única (sc-RNASeq). El primer paso para el estudio por

“microarrays” es la transcripción reversa del ARN en ADNc (ADN cíclico) y, posteriormente, tiene lugar su hibridación con oligos previamente seleccionados para los genes de interés. En la secuenciación de ARN en bloque, el ARN se transforma en ADNc y posteriormente se fragmenta, generando librerías que se identifican por adaptadores unidos a sus extremos con una secuencia específica. La secuenciación por célula única es similar pero la retrotranscripción tiene lugar por separado, generalmente en pequeñas gotículas (“*Dropseq*”) donde también se incorpora una secuencia única que identifica a cada célula. Tras la rotura de las gotículas, el proceso de secuenciación es similar al realizado para el tejido en bloque. Modificado de Starobova et al., 2018. B, panel superior), La amplificación en ciclos de terminación reversible (CRT) que usa la plataforma de secuenciación Illumina utiliza la química de 3'-O-azidometil nucleótidos que son terminadores reversibles fluorescentes (cada base nitrogenada tiene un tipo de fluorescencia diferente) de la reacción de la polimerasa. Los fragmentos de ADN se agrupan en “*clusters*” a lo largo de la superficie del secuenciador y en cada ciclo se incorpora un nucleótido más en la nueva cadena de ADN. En cada ciclo tiene lugar la toma de una imagen y posteriormente se elimina el marcaje fluorescente y se regenera el grupo 3'-OH usando un agente reductor. Esto permite incorporar el siguiente nucleótido en un nuevo ciclo. B, panel inferior), Representación de las imágenes tomadas en cada ciclo con el código de color fluorescente para cada base nitrogenada. Modificado de Metzker, 2010.

Una vez alineadas las secuencias, se realiza la cuantificación de las lecturas; para cada gen, se contabilizan el número de lecturas que “caen” dentro de su secuencia, de manera que, a mayor número de lecturas, más abundante será la expresión de dicho gen. Este valor, conocido como conteo o “*counts*”, debe normalizarse a la longitud del gen para indicarnos su abundancia relativa.

Las técnicas de secuenciación masiva permiten, potencialmente, identificar y cuantificar todos los genes expresados en una célula o tejido, y con un coste asequible. Dan lugar a una enorme cantidad de datos que, en ocasiones excede, 1 billón de lecturas por experimento, además de que la técnica funciona con unas cantidades muy bajas de material de partida. Finalmente, su principal ventaja es que no se necesita un conocimiento previo de los genes expresados. Este requerimiento es necesario en las técnicas de microarray, lo cual obliga a preseleccionar un número limitado de genes. En contrapartida, se requiere disponer de unos conocimientos avanzados de bioinformática, para poder aplicar adecuadamente las técnicas estadísticas durante el análisis.

Al igual que en muchos otros ámbitos de la biología, la secuenciación masiva de ARN ha revolucionado el estudio del sistema somatosensorial. Los primeros intentos en realizar estudios de expresión de las neuronas sensoriales utilizaron el enriquecimiento celular, mediante técnicas de fluorescencia o citometría por fluorescencia (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) de un determinado tipo celular, identificado mediante la expresión de un marcador molecular específico en líneas transgénicas. Estos estudios revelaron el patrón molecular de distintas subpoblaciones neuronales con expresión de marcadores como *Trpv1*, *Scna10* (Na_v1.8), *Mrgprd*,

Mrgpra3, *Th* y *Pvalb*, expresados en diferentes tipos de neuronas sensoriales incluyendo nociceptores peptidérgicos y no peptidérgicos, C-LTMRs y propioceptores (Chiu *et al.*, 2014; Goswami *et al.*, 2014; Thakur *et al.*, 2014; Reynders *et al.*, 2015; Xing *et al.*, 2019). La identificación de los perfiles genéticos de distintas subpoblaciones ha generado una ingente cantidad de información y ha permitido la comparación detallada del panorama transcripcional de los ganglios DRG y TG en distintas especies como ratón y humano (Flegel *et al.*, 2015; Lopes, Denk and McMahon, 2017; LaPaglia *et al.*, 2018; Ray *et al.*, 2018; Megat *et al.*, 2019; Wangzhou *et al.*, 2020).

En todos los trabajos mencionados previamente, el ARN necesario para la secuenciación proviene de un conjunto de células enriquecidas o una muestra de un tejido concreto, por lo que puede existir una mezcla de los diferentes tipos celulares que constituyen la muestra. Este tipo de secuenciación, denominada *Bulk-Sequencing* o “en bloque o en masa”, es ampliamente utilizada y muy útil en la transcriptómica comparativa. Además, este abordaje permite reducir la variabilidad y aumentar la sensibilidad, ya que, al tener un mayor número de células, se tiene mayor probabilidad de detectar genes con bajo nivel de expresión. Sin embargo, no permite la identificación de los tipos celulares y la expresión diferencial de genes concretos puede quedar oculta si el tejido contiene una muestra heterogénea de células no deseadas como satélites, epiteliales, fibroblastos, glía o células del sistema inmune dentro del tejido neuronal. Este problema se ha podido solventar mediante la secuenciación de células individuales (scRNA-Seq, *single cell RNA sequencing*) (verse de nuevo la **figura 11**). La técnica se ha ido perfeccionando año tras año, permitiendo la secuenciación de un número cada vez mayor de células, lo que permite obtener una imagen más completa y detallada de los posibles grupos celulares (Macosko *et al.*, 2015).

1.5.3. Principales grupos de neuronas sensoriales primarias identificados mediante el análisis de su transcriptoma

La aplicación de las tecnologías de secuenciación de ARN de célula única ha permitido conocer con gran precisión la composición molecular de las neuronas sensoriales primarias. El estudio llevado a cabo en 2014 por Chiu y colaboradores, mediante una combinación de técnicas de secuenciación en bloque y qPCR de célula única fue el primero en ampliar la división tradicional de los tres grupos de neuronas somatosensoriales, tradicionalmente definidos como nociceptores peptidérgicos (PEP, con marcador típico CGRP), no peptidérgicos (NPEP, con unión a la isolectina IB4) y neuronas miélicas (NF, NF200). Según este estudio, se redefinieron 7 nuevos grupos, denominados grupos I-VII (Chiu *et al.*, 2014). No obstante, el trabajo muestra algunas

limitaciones que es importante señalar. En primer lugar, los estudios en célula única se realizaron sólo para 80 genes candidatos por técnicas PCR (“*single cell*” qPCR, sc-qPCR), limitando así mucho el trasfondo molecular disponible para cada neurona. Estos 80 genes habían sido seleccionados previamente como los más enriquecidos dentro de las tres subpoblaciones neuronales no solapantes (peptidérgicas, no peptidérgicas y mielínicas) purificadas mediante la secuenciación “*bulk sequencing*” y representadas por sus respectivos marcadores (Na_v1.8+/IB4+, Na_v1.8+/IB4- y PVALB+).

Posteriormente, el grupo del Dr. Patrik Ernfors y sus colaboradores del Instituto Karolinska secuenciaron las neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos lumbares a escala individual, obteniendo el transcriptoma de cada una de ellas de una forma no sesgada y objetiva (Usoskin *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, desarrollaron una plataforma online y de acceso libre que permite una visualización sencilla de los niveles de expresión de cada gen por célula, siendo un recurso muy útil para la comunidad científica (<http://linnarssonlab.org/drg/>). En este trabajo, se identifican 11 grupos diferentes de neuronas sensoriales primarias, dividiendo los grandes grupos de neuronas peptidérgicas, no peptidérgicas y mielínicas en los siguientes subgrupos: PEP1, PEP2, NP1, NP2, NP3, TH, NF1, NF2, NF3, NF4 y NF5 (verse, **figura 12**)

Los estudios posteriores en el campo, realizados sobre un número muestral más alto o con técnicas de mayor sensibilidad que permiten detectar una región más amplia del exoma, lo que se traduce en la identificación de más genes en cada célula, han permitido refinar los resultados obtenidos en el trabajo de Usoskin y colaboradores. (Li *et al.*, 2016; Zeisel *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2020; Kupari *et al.*, 2021; La Manno *et al.*, 2021), incluyendo en los trabajos de Sharma y La Manno la caracterización de las neuronas sensoriales en estado embrionario. Todos ellos coinciden en la identificación de los grupos neuronales más abundantes, aunque existen algunas diferencias. Por ejemplo, en el trabajo realizado por el grupo de Li y colaboradores, caracterizan en mayor detalle las neuronas NPEP y NF con un total de 14 subgrupos neuronales (Li *et al.*, 2016). En el trabajo de Amit Zeisel, realizado por el grupo de Sten Linnarsson, en colaboración de nuevo con el grupo de Patrik Ernfors, identifican en cambio 17 grupos, también con un mayor detalle de las neuronas NPEP y PEP. En un trabajo más reciente realizado por Sharma y colaboradores, identificaron a dos nuevos grupos dentro del conjunto de neuronas PEP2, correspondientes a las neuronas sensoriales peptidérgicas tipo Aδ. Por último, en un nuevo estudio del transcriptoma de DRG en la especie de Macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), el grupo de Ernfors ha identificado los mismos subgrupos de neuronas sensoriales identificados en ratón (Kupari *et al.*, 2021).

La heterogeneidad molecular de las neuronas sensoriales primarias ha sido estudiada en otros ganglios sensoriales como el trigémino, el nodoso, el yugular, el coclear y el geniculado (Dvoryanchikov *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017; Petitpré *et al.*, 2018; Kupari *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). En el caso del ganglio trigémino (TG), se identificaron prácticamente los mismos grupos neuronales descritos en el ganglio raquídeo (revisado por Gatto *et al.*, 2019), aunque otros trabajos han puntualizado algunas diferencias en la expresión entre ambos tejidos (Lopes, Denk and McMahon, 2017; Sapio *et al.*, 2020). Los ganglios yugulares también presentan una distribución similar a los ganglios raquídeos aunque, no así los ganglios nodosos, (Kupari *et al.*, 2019). En la **figura 12** se describen los correspondientes tipos de neuronas y su nomenclatura identificadas mediante técnicas del análisis transcriptómico en DRG y su equivalente en TG y yugular.

Clasificación transcriptómica de las neuronas sensoriales

	Marcaje	Chen et al. (2014) (C1-L3 DRG)	Ussner et al. (2015) S4-L3 DRG	Li et al. (2015) L1-L3 DRG	Larsson et al. (2016) C1-L3 DRG	Nielsen et al. (2017) Trigeminal (TG)	Kupari et al. (2019) UG	Shenoy et al. (2020) DRG	
Neuronas de pequeño y mediano tamaño	FRÍO	TRPM8	PEP1?	C1-17 C6-17 C8-27	Trpm8 1 (PSPCP4) Trpm8 2 (PSPCP7) Trpm8 3 (PSPCP8)	C1 C2	JG6	TrpM8	
	NOCICEPTORES PEPTIDÉRGICOS <i>Mecano/cálido</i>	CGRP (C-noc)	II	PEP1	C1	PEP1.1 (PSPCP4) PEP1.2 (PSPCP5) PEP1.3 (PSPCP3) PEP1.4 (PSPCP2)	C9 C10 C8 C7	JG4	CGRP-α CGRP-β CGRP-γ CGRP-δ
		CGRP (Aδ-noc)		PEP2	C10	PEP2 (PSPCP1)	C6	JG5	CGRP-ζ CGRP-η
	NOCICEPTORES NO PEP <i>Puro/insensibles/cálido</i>	NPPB (Sst ⁺ C-noc)	VI	NP3	C2	NP3 (PSPMP6)	C11		Set
MRGPRA3 (Mrgpra3 ⁺ C-noc)		II	NP2	C4	NP2.2 (PSPMP5) NP2.1 (PSPMP4)	C12	JG3	CGRP-τ	
MRGPRD (IB4 ⁺ C-noc)		I	NP1	C6 C5	NP1.2 (PSPMP2) NP1.1 (PSPMP3)	C13	JG2	Non pep nociceptors	
C-LMTR	TH/VGLUT3 (C-LTMRs)	V	TH	C3	TH (PSPMP1)	C3	JG1	C-LTMRs	
Neuronas de gran tamaño	LMTR	TrkB (Aδ-LMTR)		NF1	C9	NF1 (PSPMP4)	C5		Aδ-LTMRs
		TrkC (Aγ-LMTR)		NF2	C8	NF2 (PSPMP3)	C4	JG5	Aβ-RA-LTMRs Aβ-Field
		Pvalb (Propioceptores)	VII	NF4 NF5	C7	NF3 (PSPMP2)			Propioceptores

Figura 12. Esquematación de los diferentes tipos de neuronas sensoriales identificadas por la técnica de secuenciación de célula única en la especie murina. La clasificación tradicional en neuronas peptidérgicas, no peptidérgicas y mielínicas se ha ido expandiendo con más subgrupos en los estudios posteriores (Chiu *et al.*, 2014; Usoskin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2017; Zeisel *et al.*, 2018; Kupari *et al.*, 2019; Nguyen, Le Pichon and Ryba, 2019; Sharma *et al.*, 2020). En rojo se ha indicado los posibles grupos a los que podrían pertenecer las neuronas sensoriales TRPM8+ según sus autores antes de ser identificadas como un grupo independiente. Modificado de Gatto *et al.*, 2019.

1.6. Resolviendo el papel de la heterogeneidad molecular: correlación entre función y tipo celular en las neuronas sensoriales primarias.

Entre los retos actuales en el estudio del sistema somatosensorial está el intentar correlacionar los diferentes grupos sensoriales, descubiertos mediante los estudios de expresión descritos previamente, con las propiedades fisiológicas y morfológicas de estos mismos grupos de neuronas. Hasta la fecha, no ha sido posible identificar de una forma nítida y consistente la funcionalidad de cada uno de estos grupos. Además, debemos tener en cuenta que las aferencias que inervan a una zona corporal específica presentan perfiles moleculares singulares, lo que complica aún más la tarea de desentrañar la funcionalidad de cada uno de estos subgrupos. Ejemplos de esto lo encontramos en las neuronas sensoriales de DRG que inervan el colon, o aquellas neuronas del nervio vago que inervan los pulmones. Su perfil transcriptómico reveló que el patrón genético difiere de los grupos generales encontrados en DRG, nodoso y yugular (Hockley *et al.*, 2019; Mazzone *et al.*, 2019).

Aun así, en líneas generales, la clasificación molecular concuerda bastante bien con estudios previos basados en mielinización, velocidad de conducción y respuesta ante diferentes estímulos. A continuación, describiré cada uno de los grupos establecidos tras los estudios de expresión, sus marcadores más relevantes y su posible función. La nomenclatura usada se refiere a aquella descrita en la revisión publicada recientemente por Emery y Ernfors (Emery and Ernfors, 2018).

1.6.1. Neuronas peptidérgicas

El conjunto de neuronas denominadas en los estudios de expresión como PEP1 y PEP2 pertenecen a los nociceptores peptidérgicos, clásicamente identificadas por su inmunodetección positiva para TrkA y CGRP (codificados por los genes *Ntrk1* y *Calca* respectivamente). Otros marcadores enriquecidos en estas poblaciones incluyen Na_v1.8 (*Scn10a*), Na_v1.9 (*Scn11a*), GFR α 3, el gen *Kit* y TRPV1 (Skofitsch and Jacobowitz, 1985a; Bennett

et al., 2006). La expresión de TRPV1 explica la sensibilidad de estas neuronas a temperaturas altas. Según su perfil molecular, PEP1 puede subdividirse a su vez en los grupos PEP1.1, PEP1.2, PEP1.3 y PEP1.4 (Zeisel *et al.*, 2018), que difieren de PEP2 en su expresión para la sustancia P y *Nefh*. Estos datos sugieren que PEP1 y sus subgrupos pertenecen a los aferentes cutáneos tipo C, mientras que PEP2 constituye las fibras mielínicas nociceptivas (Treede, Meyer and Campbell, 1998).

La relevancia fisiológica de cada uno de los subgrupos moleculares que constituyen las neuronas PEP1 aún no ha sido esclarecida. Es posible que esto sea debido a la gran heterogeneidad que los estudios funcionales han encontrado en las propiedades biofísicas y morfológicas de las neuronas CGRP+, y que impiden definir las con precisión. Estas características incluyen diferencias de tamaño, forma y duración del PA o su reactividad a distintos agonistas como capsaicina, AITC, ATP, serotonina y otros compuestos que generan prurito (McCoy *et al.*, 2013; Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018; Zheng *et al.*, 2019). Aun así, la identificación de algunos marcadores específicos para cada subpoblación nos permite entrever la posible función de cada uno de los grupos. Por ejemplo, PEP1.1 está enriquecido en polipéptido del adenilato ciclasa de la pituitaria, PACAP, codificado por el gen *Adcyap1* y en el receptor de somatostatina tipo 2 (*Sstr2*); ambos están implicados en la señalización del dolor (Mabuchi *et al.*, 2004; Prasoon *et al.*, 2015). Asimismo, los grupos PEP1.2 y PEP1.4 expresan una combinación única de los canales TRPA1, TRPV1 y TRPM3, ausente en otros grupos de neuronas sensoriales. Tal y como se describe en el trabajo de Vandewauw de 2018, la ablación conjunta de estos tres canales suprime totalmente la capacidad de detectar temperaturas mayores de 52 °C, por lo que podemos concluir que PEP1.2 y PEP1.4 constituyen las neuronas termosensibles responsables de la detección del calor nocivo (Vandewauw *et al.*, 2018).

Las neuronas pertenecientes al grupo PEP2 están constituidas presumiblemente por neuronas de tipo A δ ó β mielínicas que responden a estímulos mecánicos y térmicos nocivos, de las cuales se tienen constancia en ciertos estudios (Koltzenburg, Stucky and Lewin, 1997; Cain, Khasabov and Simone, 2001; Woodbury and Koerber, 2003; McIlwrath *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 2008). También se ha demostrado que la sustancia P está ausente en las fibras A δ nociceptivas, lo que coincide con la baja expresión de *Tac1* en el grupo PEP2 (Lawson, Crepps and Perl, 1997). En un trabajo más reciente, realizado por Sharma *et al.*, 2020, se distinguen dos grupos de neuronas diferentes dentro de las neuronas PEP2, denominadas en dicho trabajo como CGRP- η y CGRP- ζ (Sharma *et al.*, 2020; Kupari *et al.*, 2021). Existen datos que demuestran la existencia de un conjunto de neuronas mielínicas positivas para Na v 1.8 y TrkA (Shields *et al.*, 2012). Según estudios más recientes, se ha podido caracterizar al menos dos tipos de fibras mielínicas Na v 1.8+ con

distinta especialización. Uno de estos grupos, denominados como A δ -HTMR, se han descrito por el trabajo de Ghitani *et al.*, 2017, como terminaciones circunferenciales y mecanosensibles de alto umbral que rodean la base del folículo piloso (Circ-HTMRs), las cuales han sido caracterizadas electrofisiológicamente en un estudio posterior (Ghitani *et al.*, 2017; Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018). Este grupo parece corresponderse con las neuronas CGRP- ζ identificadas en el trabajo de Sharma ya mencionado, ya que presentan una mayor expresión del receptor de serotonina tipo 3, *Htr3a* (Ghitani *et al.*, 2017; Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018; Sharma *et al.*, 2020). El otro grupo CGRP- η , podría representar las pocas fibras tipo A β nociceptivas, descritas en varios estudios, que expresan los marcadores comunes de las neuronas peptidérgicas TrkA, CGRP, además de ASIC3 y NPY2R (Arcourt *et al.*, 2017; Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018; Adelman *et al.*, 2019).

1.6.2. Neuronas no peptidérgicas

Las neuronas no peptidérgicas se dividen en cuatro grandes grupos, NP1, NP2, NP3 y TH, y algunos de estos se dividen en subgrupos adicionales (verse de nuevo la **figura 12**). A diferencia de las neuronas peptidérgicas, cada uno de estos grupos tiene propiedades moleculares claramente asociadas con funciones sensoriales únicas. Los tres primeros grupos, NP1, NP2 y NP3, además de ser sensibles al calor y a estímulos mecánicos de alto umbral, participan en la génesis del prurito por vías de señalización distintas (Liu *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2013; Solinski *et al.*, 2019). Las neuronas del grupo TH corresponden, a su vez, con un grupo funcional muy particular, los llamados C-LTMRs, neuronas tipo C con sensibilidad mecánica de bajo umbral, previamente mencionados en la **sección 1.2.3** (Li *et al.*, 2011).

El grupo NP1 está constituido por un conjunto de nociceptores polimodales no peptidérgicos con marcaje para la isolectina B4. Las neuronas de este grupo inervan exclusivamente la capa más superficial de la epidermis (*stratum granulosum*) y expresan el receptor MRGPRD, que se activa por β -Alanina (Zylka, Rice and Anderson, 2005). La inyección cutánea de β -Alanina provoca irritación y sensación de picor. Estos datos indican que las neuronas NP1, constituyen uno de los grupos celulares implicados en la generación del prurito independiente de la molécula de histamina (Rau *et al.*, 2009). Igualmente, las neuronas MRGPRD+ son capaces de responder a ATP debido a la expresión del canal purinérgico P2X3. También son sensibles a estímulos mecánicos de alta intensidad y temperaturas nocivas, tanto al frío como al calor (Dussor *et al.*, 2008; Rau *et al.*, 2009; Adelman *et al.*, 2019). La eliminación de esta población en líneas transgénicas DTR produce un déficit en las respuestas a estímulos mecánicos y térmicos (Cavanaugh *et al.*, 2009; Rau *et al.*, 2009; Pogorzala, Mishra and Hoon, 2013). Su termosensibilidad puede deberse

a la expresión de los canales iónicos TRPA1 y TRPM3. En cambio, no expresan ni TRPV1 ni TRPM8, acorde con los resultados obtenidos en experimentos de hibridación *in situ* y su baja reactividad a los agonistas capsaicina y mentol en condiciones fisiológicas (Stucky, 2006; Dussor *et al.*, 2008; Cavanaugh *et al.*, 2009; Pogorzala, Mishra and Hoon, 2013). Es interesante añadir que, en el caso de TRPV1, la reactividad de estas neuronas a la capsaicina aumenta en condiciones de inflamación o en presencia de protones (Breese *et al.*, 2005).

Acorde con los datos de secuenciación, existen dos grupos molecularmente distintos de neuronas NP1, aunque se desconoce la especialización funcional de cada uno de ellos. El subgrupo NP1.1 tiene una mayor expresión de la subunidad beta-1 del canal de potasio activado por calcio MaxiK, también conocido como BKca y codificado por el gen *Kcnmb1*, además del receptor de acetilcolina neuronal alfa-6 (*Chrna6*) y TrkA. NP1.1 es el subgrupo menos abundante, representando tan sólo el 20 % del total de neuronas MRGPRD+ secuenciadas. En comparación, el subgrupo NP1.2 expresa el receptor 3 de ácido lisofosfatídico (*Lpar3*), implicado en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos (Ma *et al.*, 2009). Con respecto a su perfil funcional, algunos estudios también han identificado a dos tipos de neuronas MRGPRD+, unas sensibles a calor, estímulos mecánicos y al agonista β -Alanina y otras que son puramente mecano-sensibles (Liu *et al.*, 2012). Otro estudio electrofisiológico encontró diferencias respecto a la forma del AHP y el porcentaje de respuestas a ATP, AITC y 5-HT (serotonina) dentro de la población MRGPRD+. Sin embargo, estas características no permite clasificarlas en un perfil molecular concreto (Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018).

En el grupo NP2 se incluyen las neuronas MRGPRA3+, responsables de generar el prurito evocado por la cloroquina y la histamina (McCoy *et al.*, 2013). Presentan unas características muy particulares, con un marcaje débil a la isolectina IB4 (representan el 20 % de las neuronas IB4+) y expresión de CGRP. No obstante, siguen siendo consideradas como no peptidérgicas ya que no expresan sustancia P (Han *et al.*, 2013). Otro rasgo característico de estas neuronas es que expresan el canal TRPV1 y todas ellas son sensibles al calor y estímulos mecánicos de alto umbral (Liu *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2013). Aunque estas neuronas responden a estímulos nocivos y son consideradas nociceptores, la ablación selectiva de estas neuronas no altera la vía de señalización del dolor, sino que reduce drásticamente la sensación de picor causada por los pruritógenos mencionados o el causado en condiciones patológicas como en la dermatitis crónica y la psoriasis, (Paus *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2013). Al igual que para el grupo NP1, el análisis transcriptómico ha identificado dos subpoblaciones MRGPRA3+ distintas, NP2.1 y NP2.2 aunque se desconoce la relevancia biológica de ambos subgrupos.

Los grupos de neuronas NP3.1 y NP3.2 son IB4-/CGRP- y expresan somatostatina (*Sst*) junto con un amplio conjunto de genes con propiedades pruritogénicas como, por ejemplo, el péptido natriurético B, el receptor A de interleucina 31, la neurotensina, el receptor 1F de la serotonina, (5-HT) codificados por los genes *Npbb*, *Il31ra*, *Nts*, *Htr1f*; respectivamente (Ma *et al.*, 2020). Estas neuronas también son capaces de evocar el prurito a través de una vía independiente de la histamina a través de la activación de mastocitos (Huang *et al.*, 2018; Solinski *et al.*, 2019), y expresan una combinación única de canales termosensibles: TRPA1, TRPV1, TRPV2 y TRPM2. Aunque en un principio se identificaron como neuronas tipo C, existe cierta controversia ya que las neuronas NP3 expresan el receptor 2 del neuropéptido Y2 (*Npy2r*), un marcador que comparten con un grupo de neuronas mielínicas CGRP+ con propiedades nociceptivas (Usoskin *et al.*, 2015; Zeisel *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2020).

Finalmente, entre las neuronas no peptidérgicas encontramos el grupo de las neuronas TH. Estas neuronas se caracterizan por expresar la tirosina hidroxilasa (TH), enzima en la vía de síntesis de las catecolaminas, la cual se conoce desde hace años que identifica al grupo de mecanorreceptores de bajo umbral de tipo C (C-LTMR), los cuales no expresan ni CGRP+ ni TRKA+, no se unen a la isolectina B4 y no poseen propiedades pruritogénicas (Li *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2019). Además, expresan otros marcadores típicos de neuronas mecanosensibles como la citoquina FAM19A4 y VGLUT3 (codificado por los genes *Tafa4*, *Slc17a8*, respectivamente) y *Piezo2* (Usoskin *et al.*, 2015).

1.6.3. Neuronas mielínicas LTMRs

El conjunto de los grupos NF1, NF2, NF5 y NF4 constituyen las neuronas sensoriales mielínicas mecanorreceptoras de bajo umbral (A-LTMRs) tipo A δ / β . Morfológicamente, estos grupos se caracterizan por poseer un gran diámetro celular, PAs de corta duración, altas velocidades de conducción, insensibilidad térmica por su ausencia de TRPs y expresión de receptores de los factores neurotróficos TrkB, TrkC, y canales de sodio sensibles a la TTX como Na_v1.1 y Na_v1.6 (Zheng *et al.*, 2019).

Dentro de las fibras A-LTMRs, las neuronas A δ -LTMRs y un conjunto de las A β -LTMRs muestran una alta adaptación en su frecuencia de disparo ante un estímulo mecánico mantenido (RA, *rapidly adapting*) y se identifican molecularmente como NF1 y NF2 (revisado por (Emery and Ernfors, 2018). El grupo NF1 lo forman las neuronas tipo δ (A δ -LTMRs) que expresan TRKB, pero no *Ret* junto con niveles más bajos de *Nefh*, lo que indica que poseen una mielinización más pobre que el resto de los A-LTMRs (Li *et al.*, 2011; Rutlin *et al.*, 2014). Por otro lado, el grupo NF2 define a los mecanorreceptores tipo β que expresan niveles más bajos de TRKB, CALB y RET, y

con terminaciones especializadas de Meissner, Pacini y lanceoladas (Wende, Lechner and Birchmeier, 2012). El grupo NF3 lo constituyen el resto de las neuronas tipo A β identificadas, las cuales expresan TRKC. En este subgrupo, se incluyen diferentes tipos de mecanorreceptores de adaptación lenta con inervación a las células de Merkel (Airaksinen *et al.*, 1996; McIlwrath *et al.*, 2007) y por otro lado, un conjunto de neuronas LTMR con terminaciones circunferenciales, denominados “*field LTMRs*” que expresan ASIC1, ASIC3 y TRKC pero no CGRP (Horch, Tuckett and Burgess, 1977; Bai *et al.*, 2015).

Por último, los grupos NF4 y NF5 lo constituyen las neuronas propioceptivas que inervan husos musculares y órganos tendinosos de Golgi. Todas ellas expresan el marcador parvalbumina, PVALB. Además, expresan TRKC aunque a niveles más bajos que el grupo NF3 (Ichikawa *et al.*, 1994; Honda, 1995; Arber *et al.*, 2000; Hippenmeyer *et al.*, 2005). Aunque en un primer momento se identificaron como grupos separados, ambos subgrupos tienen el mismo perfil molecular, diferenciándose únicamente en los distintos niveles de expresión de algunos marcadores.

1.6.4. Neuronas TRPM8 positivas

Las neuronas TRPM8 positivas constituyen un subconjunto de neuronas sensoriales de pequeño diámetro que representan alrededor de un 5-10 % y un 10-15 % del total de neuronas de los ganglios raquídeos y del trigémino respectivamente (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2005). Estas neuronas se activan con agentes mentolados y la disminución de la temperatura entre 20-30 °C, generando un incremento rápido del calcio intracelular (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002; Viana, De la Peña and Belmonte, 2002; Madrid *et al.*, 2006). Las neuronas sensibles al frío tienen unas propiedades moleculares particulares; no presentan marcadores clásicos de nociceptores, tanto peptidérgicos como no peptidérgicos, tales como CGRP, IB4, TRPA1 y los canales de sodio resistentes a TTX, Na_v1.8 y Na_v1.9 (Peier, Moqrich, *et al.*, 2002; Story *et al.*, 2003; Lolignier *et al.*, 2015; Luiz *et al.*, 2019). Sin embargo, expresan *Tac1* y *periferina* (Takashima *et al.*, 2007; Dhaka *et al.*, 2008) y muestran una co-localización variable con el canal TRPV1 (Viana, De la Peña and Belmonte, 2002; Dhaka *et al.*, 2007; Hjerling-Leffler *et al.*, 2007; Morenilla-Palao *et al.*, 2014).

En un intento por desvelar el perfil genético de estas neuronas, nuestro grupo de investigación fue el primero en definir la expresión molecular de la subpoblación de neuronas TRPM8+, purificadas a través de la tecnología de FACS (Morenilla-Palao *et al.*, 2014). Este estudio demostró una expresión elevada y específica de los canales de potasio de fuga TASK3 (codificado por el gen *Kcnk9*) en las neuronas TRPM8 positivas, resultados confirmados en trabajos posteriores (Liao *et al.*, 2019; Luiz *et al.*, 2019). Otros canales expresados en neuronas TRPM8+

también identificados en este estudio fueron TREK1, codificado por el gen *Kcnk2*, los miembros de la familia ASIC, ASIC2, ASIC3 y ASIC4, y los canales de sodio sensibles a la TTX, $Na_v1.3$ y $Na_v1.5$ (codificados por los genes *Scn3a* y *Scn5a* respectivamente). Sin embargo, el estudio no pudo determinar el perfil genético de estas neuronas en su totalidad, ya que se seleccionaron únicamente 94 genes, mayoritariamente canales iónicos y receptores de membrana, para su cuantificación por medio de la tecnología de TaqMan array.

Si revisamos los estudios de secuenciación de ARN posteriores y citados en la sección anterior, encontramos que estas neuronas no se identificaron usando la técnica de secuenciación masiva hasta muy recientemente, a pesar de que su función como termorreceptores de frío está bien definida desde hace dos décadas. En el trabajo de Usoskin y colaboradores, las neuronas TRPM8+ se incluían dentro de las neuronas peptidérgicas (PEP1) (Usoskin et al., 2015), mientras que en el de Li y colaboradores describieron las neuronas TRPM8+ como una población indeterminada, expresada dentro del grupo peptidérgico, no peptidérgico o mielínico (Li et al., 2016), (C1-1, C6-1, C8-2, verse de nuevo **figura 12**). No fue hasta más tarde, en estudios que secuenciaban un mayor número de células, cuando se logró identificar a dos grupos específicos de neuronas TRPM8 positivas en los ganglios trigéminos (Nguyen et al., 2017) y a tres en los ganglios raquídeos (Zeisel et al., 2018). Una de las principales diferencias entre los distintos subgrupos identificados, es la expresión variable de *Nefh*, algunos neuropéptidos como por ejemplo *Gal*, *Tac1* y la expresión de GFR α 3 o TRPV1 (expresados en los grupos denominados como C1 o PEP6-8 en el caso de TG y DRG en los trabajos mencionados, respectivamente). Su mayor expresión de *Nefh* las identifica como un posible subgrupo de fibras A δ (revisado por Emery and Ernfors, 2018). Recientemente, la publicación del transcriptoma de neuronas sensoriales del macaco Rhesus, describen un grupo de neuronas TRPM8+ sin expresión de los principales marcadores peptidérgicos, similar a lo observado en ratón (denominado como TRPM8^{high} según la nomenclatura del trabajo original).

Aunque la expresión de TRPV1 es variable entre los subgrupos de neuronas TRPM8+ identificados, está presente en todos ellos para la especie de ratón y primate, dato que no parece observarse en humanos; el laboratorio de investigación del Dr. Theodore J. Price ha logrado desarrollar la secuenciación *in situ* a nivel de célula única en rodajas de tejido humano (Tavares-Ferreira et al., 2021). Estos autores identificaron que el grupo de neuronas TRPM8+ expresaba bajos niveles del gen *Trpv1*. Curiosamente, el grupo expresaba, en cambio, altos niveles de $Na_v1.8$ y se definió como neuronas nociceptoras. Estos resultados son similares a los obtenidos tras la secuenciación de célula única de núcleos de neuronas sensoriales de DRG humanas, obtenidos recientemente (Nguyen et al., 2021). En este estudio, los autores describen

dos tipos de neuronas TRPM8+, unas con propiedades nociceptivas que expresan los marcadores $Na_v1.8$, $Na_v1.9$ o *Piezo2*, entre otros. El otro grupo presentan un perfil de expresión similar al obtenido en la especie murina.

Existen varios factores que podrían explicar la dificultad para identificar a las neuronas TRPM8+ en los estudios originales de transcriptómica de células únicas, como la baja cobertura, y el número de células secuenciadas. La cobertura, también conocida como profundidad de lectura, puede definirse como el número medio de veces que se lee y se alinea un nucleótido en una posición específica del genoma en los ciclos de la secuenciación y es un indicador de resolución y sensibilidad. Aumentar la cobertura de la secuenciación permite detectar más genes por neurona, incluidos aquellos con menor nivel de expresión (menor número de copias de mRNA), lo que a su vez permite identificar tipos de neuronas con poca representación como las neuronas que expresan *Trpm8*, que además es un gen cuya expresión es relativamente baja. El trabajo de Nguyen y colaboradores en 2017, analizando los núcleos de neuronas del ganglio trigémino en ratón, es el más completo en cuanto a la cobertura y la secuenciación de las células para identificar las neuronas TRPM8+ y fueron los primeros autores en identificar los genes *Foxp2*, *Pnoc* y *Scn1a* (éste último codifica el canal de sodio $Na_v1.1$) como marcadores exclusivos de esta población, posteriormente validados en otros estudios (Zeisel *et al.*, 2018; Griffith, Docter and Lumpkin, 2019).

Al igual que lo observado en estudios de expresión, la población de neuronas TRPM8+ es funcionalmente heterogénea. Inicialmente, la existencia de diferentes poblaciones de neuronas sensoriales activadas por el frío ha sido descrita en un gran número de estudios electrofisiológicos en fibras y en diferentes especies (Bessou and Perl, 1969; Iggo, 1969; Hensel and Iggo, 1971; Dubner, Sumino and Wood, 1975; Kress *et al.*, 1992). En estos estudios, se describen dos tipos de fibras sensibles al frío. Un primer tipo unimodal que responde a temperaturas inocuas y constituye un subgrupo de fibras C y A δ . Una característica específica es que poseen actividad espontánea a la temperatura fisiológica (~30-32 °C), pero su frecuencia de disparo se incrementa cuando la temperatura decae. Generalmente, son insensibles a estímulos mecánicos y tienen un umbral de activación de aproximadamente 30 °C. Una vez activadas se adaptan rápidamente de una manera estable. El otro grupo lo forman los nociceptores para el estímulo de frío, integrado únicamente por fibras tipo C con umbrales de activación mucho más bajos (alrededor de 20 °C). Normalmente son quiescentes a temperaturas fisiológicas y muestran una menor frecuencia de disparo y una respuesta más tardía al estímulo. Este grupo es, además, generalmente sensible a estímulos mecánicos de alto umbral y pueden responder al calor nocivo (Simone and Kajander, 1997).

Los estudios *in vitro* de neuronas sensoriales han confirmado la existencia de estos dos tipos de neuronas sensibles al frío y se ha avanzado más en la caracterización de sus propiedades físico-químicas (Thut, Wrigley and Gold, 2003; Xing *et al.*, 2006; Madrid *et al.*, 2009; Teichert *et al.*, 2012). Por ejemplo, en el trabajo de Xing, se identificaron patrones de activación diferente con respecto a varios agonistas como capsaicina, protones y ATP entre distintas neuronas sensibles al frío procedentes de DRG. En aquellas con reactividad a todos los agonistas mencionados, que generalmente se relacionan con propiedades nociceptivas, los incrementos del calcio intracelular son menores tras aplicar el estímulo de mentol (Xing *et al.*, 2006).

Posteriormente, en el trabajo de Madrid *et al.*, 2009, se clasificaron las neuronas sensibles al frío procedentes de TG en bajo umbral (LT-CS), con una temperatura de activación alrededor de 26.5 °C representando el 68.9 % de la población neuronal sensible al frío y de alto umbral (HT-CS) con sólo un 31.1% del porcentaje total de neuronas sensibles a frío (Madrid *et al.*, 2009). La distinción entre neuronas LT y HT-CS viene determinada, aunque no exclusivamente, por una expresión diferencial de los canales $K_v1.1/2$, siendo mínima en las neuronas LT-CS y muy alta en HT-CS, responsables de la de la corriente *IKD* que actúa como freno a la despolarización durante el estímulo de frío (Viana, De la Peña and Belmonte, 2002; Madrid *et al.*, 2009; revisado por Pertusa and Madrid, 2017) (verse de nuevo la **sección 1.4.5**). Además, en este mismo estudio se observó también que los niveles de calcio y las corrientes evocadas por el compuesto mentol eran mayores en las neuronas LT-CS lo que sugiere una mayor expresión del canal TRPM8. En 2012, los resultados obtenidos en trigémino se validaron en neuronas de DRG utilizando estrategia de cribado farmacológico (del inglés “*unbiased constellation pharmacology screen*”) (Teichert *et al.*, 2012). En este trabajo, se determinó que el grupo de neuronas HT-CS presenta además un mayor porcentaje de respuesta a AITC, además de los agonistas mencionados previamente. El trabajo también identifica, a través de la aplicación de antagonistas después de la despolarización de las neuronas con un pulso de KCl, que las LT-CS expresan predominantemente canales Na_v sensibles a TTX y Ca_v1 (canales de calcio dependiente de voltaje). Por el contrario, las neuronas HT-CS expresan canales Na_v resistentes a TTX y los canales de calcio Ca_v1 y $Ca_v2.1$, además de una mayor expresión de los canales K_v (**figura 13A**).

Los canales $K_v1.1/2$ no son los únicos componentes que establecen el umbral de temperatura en las neuronas sensibles al frío. Tal como ya comentamos previamente, el canal de potasio K2P, TASK3, también está presente en las neuronas TRPM8+ (Morenilla-Palao *et al.*, 2014). Si bien su bloqueo produce un desplazamiento del umbral de temperatura hacia valores más altos, en ese trabajo no se analizó si existe alguna correlación entre los niveles de expresión TASK3 y TRPM8, y la corriente *IKD* en las neuronas LT y HT-CS.

No obstante, en el estudio posterior de Luiz y colaboradores identificaron el perfil molecular de las neuronas activadas por frío y demostraron que los niveles de expresión de $K_v1.1$, $K_v1.2$, eran más altos en neuronas $Na_v1.8+$ que no respondieron al estímulo de frío que aquellas neuronas sensibles al frío $Na_v1.8$ -/TRPM8+ (Luiz *et al.*, 2019). La caracterización funcional de las neuronas $Na_v1.8+$ demuestran que pertenecen a un tercer grupo de neuronas de frío silentes que sólo responden en condiciones patológicas o cuando se elimina la corriente de freno resultante de los canales de potasio K_v (González *et al.*, 2017; MacDonald *et al.*, 2021). Básicamente, este grupo suele tener mayor tamaño y ser mecanosensibles y además de expresar el canal $Na_v1.8$, expresan $Na_v1.6$ y el marcador CGRP. Asimismo, su activación por bajas temperaturas en condiciones fisiológicas, realizada en registros de imagen de calcio *in vivo*, es alrededor de 0-1 °C y se desconoce si sus respuestas están mediadas por el canal TRPM8 (ver **figura 13A**). (Luiz *et al.*, 2019; MacDonald *et al.*, 2021)

Mediante la técnica de imagen de calcio *in vivo* también se han identificado distintos patrones de respuesta al frío en neuronas TRPM8+ (Ran, Hoon and Chen, 2016; Yarmolinsky *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Leijon *et al.*, 2019). En un estudio reciente realizado por Yarmolinsky y col., se describen tres tipos de respuestas al frío dependientes de TRPM8 en neuronas procedentes del ganglio trigémino. En el trabajo, utilizan una línea reportera TRPM8-Cre cruzada con otra línea que expresa el sensor de calcio GCaMP5 (Yarmolinsky *et al.*, 2016). El primer grupo de neuronas responde a descensos de temperatura suaves, pero se inactivan por debajo del rango inocuo. El segundo grupo tiene umbrales más altos y las neuronas muestran una respuesta sostenida al estímulo, sin llegar a adaptarse a temperaturas muy bajas mientras que el tercer tipo de respuesta es una mezcla de las dos anteriores (**figura 13B**). Posteriormente se volvieron a identificar los tres tipos de neuronas sensibles a frío en un estudio independiente usando la misma metodología (Leijon *et al.*, 2019). Adicionalmente, en este estudio identificaron un cuarto grupo de neuronas que respondían durante la fase de recuperación de un estímulo de calor, independientemente de la temperatura absoluta antes del estímulo. Este grupo ya se había observado previamente en registros electrofisiológicos usando la preparación “*skin nerve*” (Paricio-Montesinos *et al.*, 2020) y presenta propiedades comunes a los tres grupos anteriormente mencionados. Los autores, además, separaron las neuronas de frío en función de su umbral de temperatura basándose en la clasificación de LT-CS y HT-CS (Madrid *et al.*, 2009), encontrándose con una proporción de neuronas analizadas muy similar entre ambos estudios (Leijon *et al.*, 2019). Por último, se exploró la reactividad de las neuronas sensibles al frío para los agonistas de TRPs, mentol, capsaicina y AITC. No se observaron diferencias significativas en el número de células que respondieron a AITC o capsaicina entre los grupos LT-CS y HT-CS, pero

sí encontraron un mayor número de neuronas que respondieron a mentol para las neuronas de bajo umbral.

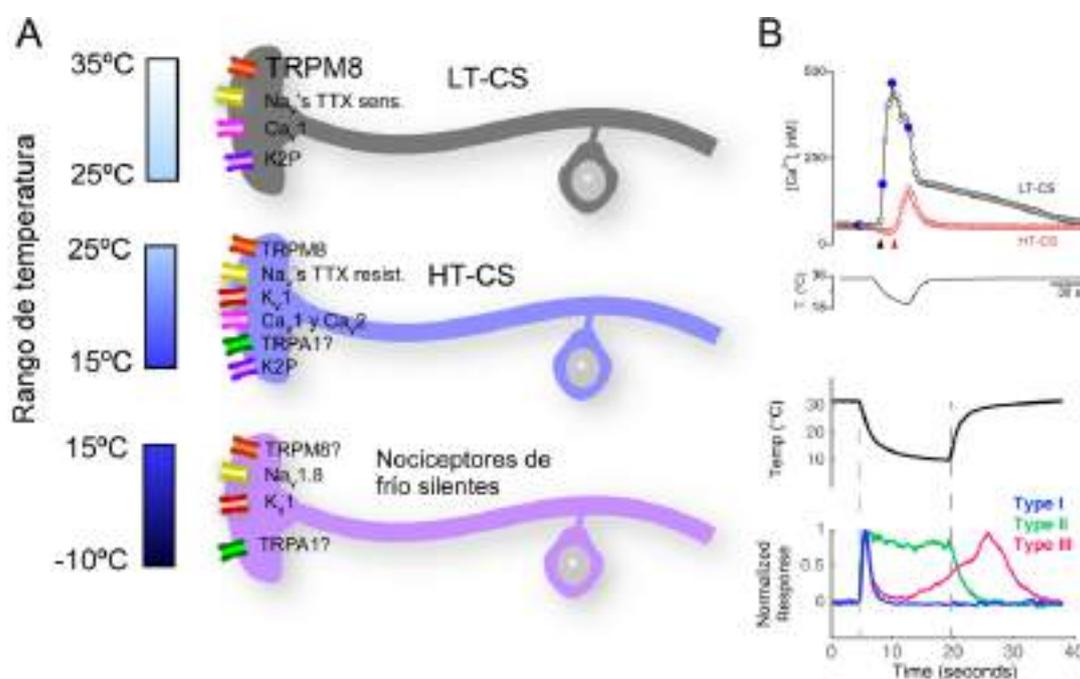


Figura 13. Tipos de neuronas sensoriales sensibles al frío en función de su umbral de temperatura. A) Representación esquemática de los distintos canales iónicos implicados en la detección del frío en cada tipo de neurona termosensible, identificada en estudios funcionales, según su umbral de activación. Adaptado de Madrid *et al.*, 2009. B) Tipos de respuesta ante el estímulo de frío encontrados en registros de imagen de calcio de neuronas sensoriales de TG. Arriba se muestra un registro realizado en cultivos celulares donde se observa el aumento del calcio de una neurona LT-CS y HT-CS registradas simultáneamente (Madrid *et al.*, 2009). Abajo se muestran los trazos de calcio de un experimento equivalente realizado en animales vivos (calcio *in vivo*). Se observa la respuesta de tres tipos de células sensibles al frío según su umbral de activación y su adaptabilidad al estímulo. De Yarmolinsky *et al.*, 2016.

Existe un tercer trabajo donde se han caracterizado las respuestas de neuronas sensibles al frío usando registros de calcio *in vivo* (Wang *et al.*, 2018). En este caso, se describen tres poblaciones sensibles al frío que respondían a umbrales de temperatura de 6 °C, 15 °C y 20 °C. Un dato sorprendente es que la gran mayoría de las neuronas de frío se activaban en un rango muy estrecho de temperaturas, es decir, respondían específicamente a una u otra temperatura. Una vez activadas y a medida que baja la temperatura se adaptan y decrece la amplitud de su respuesta (niveles de calcio) (denominadas en este trabajo como no monotónicas).

Otro de los interrogantes que rodea a las neuronas sensibles al frío es su supuesta sensibilidad mecánica. Aunque está ampliamente demostrado que las terminaciones sensoriales sensibles al frío también suelen responder a la estimulación mecánica, no se ha observado este fenómeno

en el soma de las neuronas TRPM8 positivas (Fernández-Trillo *et al.*, 2020; von Buchholtz *et al.*, 2021). Hasta la fecha, sólo un estudio ha demostrado la mecanosensibilidad en el soma de las neuronas termorreceptoras al frío. En el trabajo de Wang y colaboradores observaron que el 57 % de las neuronas sensibles al frío eran mecánicamente sensibles en registros de calcio *in vivo* (Wang *et al.*, 2018). Por otro lado, la expresión de *Nefh* en los grupos moleculares TRPM8+, junto con los canales de sodio Na_v1.1 y Na_v1.6, los cuales se expresan generalmente en neuronas mielínicas LTMRs y mecanosensibles, indican una posible pertenencia a la población neuronal mecanorreceptora.

1.7. El dolor neuropático

El dolor es una percepción sensorial y emocional desagradable necesaria para protegernos ante un daño. El neurólogo George Riddoch menciona sobre el dolor que “en circunstancias normales sólo se experimenta de forma intermitente, sus mecanismos neuronales permanecen latentes, pero vigilantes, listos para ser despertados si los tejidos del cuerpo se ven amenazados” (Riddoch, 1938). El dolor comprende tres categorías: dolor fisiológico o nociceptivo en respuesta a una estimulación breve de los nociceptores, dolor inflamatorio causado principalmente por un daño tisular importante y dolor neuropático. En los dos primeros casos el dolor cumple generalmente una función protectora, actuando como señal de alarma del tejido dañado hasta su curación, sin embargo, una lesión puede también ocasionar el desarrollo de un dolor maladaptativo, conocido como el dolor neuropático.

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), el dolor neuropático se define como un “dolor causado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso somatosensorial” y engloba un tipo de dolor anormal causado por diversas patologías como por ejemplo la compresión o axotomía de un nervio, daños causados por una disfunción metabólica (como la diabetes mellitus), neurotoxicidad o procesamiento anormal alterado por parte de la médula espinal o el encéfalo. Es una patología frecuente, que afecta a cerca del 7 % de la población mundial (Attal *et al.*, 2010). Los mecanismos implicados en la génesis del dolor neuropático son muy diversos e incluyen, entre otros, la sensibilización de las neuronas aferentes o del sistema central, anormalidades en el tejido endotelial, disfunción en las células de Schwann y desmielinización, malformaciones vasculares, alteraciones en la barrera hematoencefálica, apoptosis, un elevado estrés oxidativo, daño del ADN mitocondrial, la pérdida axonal de neurofilamentos terminales o alteraciones en el transporte axonal (revisado por Colloca *et al.*, 2017; Finnerup, Kuner and Jensen, 2021).

En los casos clínicos de dolor neuropático, los pacientes suelen presentar cuadros de sensibilización de diferente tipología, incluyendo un dolor provocado por el tacto o la temperatura. La hipersensibilidad térmica es frecuente en los pacientes que sufren dolor neuropático. Concretamente, la alodinia, o dolor inducido por un estímulo que normalmente no provoca dolor, es común ante estímulos de frío en el rango de temperaturas inocuas. También es común la alodinia y la hiperalgesia (cuando aumenta la sensación de un estímulo ya de por sí doloroso) ante estímulos mecánicos, un síntoma que comparte con otros tipos de dolor como el inflamatorio (Loeser and Treede, 2008; Baron, 2009).

1.7.1. Neuropatía periférica inducida por oxaliplatino (NPIO)

Entre las distintas formas de dolor neuropático, se incluye la neuropatía generada por los agentes quimioterapéuticos utilizados en las terapias contra el cáncer. Esta neuropatía representa uno de los principales efectos secundarios al uso de estos fármacos, lo que constituye una de sus mayores limitaciones. La neuropatía se asocia a la administración de distintas clases de quimioterapéuticos: antineoplásicos con base de platino (en particular oxaliplatino y cisplatino), vinca-alcaloides (en particular vincristina y vinblastina), epotilonas (ixabepilona), taxanos (paclitaxel, docetaxel), inhibidores de la proteasa (bortezomib) y medicamentos inmunomoduladores (talidomida) (revisado por Farquhar-Smith and Brown, 2016). Aunque los mecanismos de acción y dianas moleculares de los agentes mencionados son distintos, la neuropatía que producen comparten algunas similitudes, como manifestaciones predominantemente sensoriales que afectan inicialmente a los axones distales de los nervios periféricos (Quasthoff and Hartung, 2002; Han and Smith, 2013). Aquí nos centraremos en los efectos producidos por el oxaliplatino, ya que es el compuesto que hemos estudiado en este trabajo.

El oxaliplatino es un agente antineoplásico derivado del platino, análogo del cisplatino y carboplatino, que se utiliza actualmente en el tratamiento de algunos tumores sólidos, en especial en estadios avanzados del cáncer colorrectal. En clínica, se usa en combinación con ácido folínico y 5-fluorouracilo como parte de un protocolo de quimioterapia combinada (FOLFOX) y se administra en forma de perfusión intravenosa generalmente durante 12 ciclos (6 meses) con un periodo de descanso entre ellos de quince días (Wilkes, 2007) (**figura 14**).

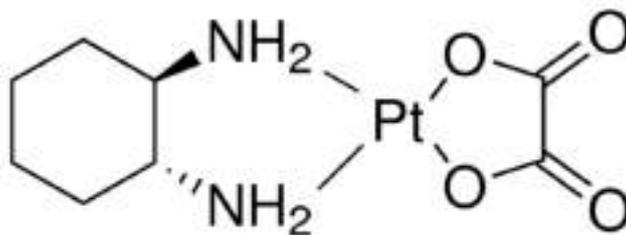


Figura 14. Estructura molecular del compuesto oxaliplatino. Extraído del catálogo comercial de Sigma-Aldrich.

El oxaliplatino presenta algunas ventajas con respecto a otros derivados del platino, como ser menos nefrotóxico y tener un mayor rango de actividad, siendo muy efectivo en líneas celulares resistentes a otros fármacos como el cisplatino (Yu *et al.*, 2015). Si bien la tasa de pacientes tratados que sobreviven es mayor, un alto porcentaje desarrolla efectos secundarios adversos producidos por la neurotoxicidad en el sistema nervioso periférico y con una mayor incidencia en tratamientos prolongados. El desarrollo de la NPIO puede conducir a la reducción de la dosis administrada o, en algunos casos, a la suspensión completa del tratamiento, lo que limita la efectividad del fármaco.

Según la evolución de la neuropatía se describen dos fases, aguda y crónica, fácilmente reconocibles por la distinta sintomatología que presentan. En la fase aguda los efectos neurotóxicos se producen rápidamente, horas o días después de la administración del fármaco. Es un fenómeno recurrente, que manifiestan alrededor del 90 % de los pacientes tratados con oxaliplatino, pero reversible, desapareciendo antes de la administración del siguiente ciclo de tratamiento. Los síntomas más frecuentes consisten en una hipersensibilidad al frío y disestesias periféricas, incluyendo parestesias o sensación de cosquilleo en las manos y los pies (distribución en “guante y calcetín”) (Argyriou, Cavaletti, Briani, *et al.*, 2013). La fase crónica es más frecuente en pacientes que reciben una administración repetida y por tanto dosis acumulativas más altas del fármaco. En esta fase de la neuropatía los síntomas se asemejan bastante a la fase aguda, siendo más frecuentes las disestesias y parestesias no relacionadas con la sensibilidad térmica. También aumenta la incidencia del hormigueo y el entumecimiento en los dedos de los pies y manos que puede incapacitar a los pacientes para el trabajo o realizar las actividades cotidianas. Cuando la dosis excede los 780 mg/m², se suelen producir disfunciones en la propiocepción, que pueden afectar a actividades de coordinación motora fina (Cersosimo, 2005; Saif and Reardon, 2005). Estos síntomas están presentes en el 50-70 % de los pacientes tratados, manifestándose durante largos periodos de tiempo que pueden superar el año o volverse permanentes en algunos casos (Saif and Reardon, 2005; Bano, Najam and Mateen, 2013). Alrededor de un 20%

de los pacientes también desarrollan ataxia sensorial e incrementa la susceptibilidad a mareos (vértigos) aumentando el riesgo de caídas (Velasco *et al.*, 2021)

Los pacientes que presentan una mayor intensidad de los síntomas asociados a la fase aguda son propensos a desarrollar la fase crónica. Otros factores de riesgo asociados al desarrollo de la neuropatía, tanto aguda como crónica, son el bajo peso corporal, la edad y mutaciones en los genes asociados a la enzima glutatión S-transferasa, *Gstp1* y *Gstm1* (Saif and Reardon, 2005; Alejandro *et al.*, 2013).

El oxaliplatino también puede producir otros síntomas neurológicos como disestesias faringolaríngeas, los espasmos mandibulares, el dolor ocular, la ptosis, los calambres musculares, ototoxia, cambios de voz y retención urinaria (Cersosimo, 2005; Windebank and Grisold, 2008).

1.7.2. Mecanismos de acción de la neuropatía inducida por oxaliplatino

Aunque su mecanismo de acción sobre las células cancerosas está bien documentado, el efecto producido en el sistema nervioso sigue siendo poco conocido. Tras su administración, el oxaliplatino se hidroliza de manera no enzimática, produciendo los productos citotóxicos diaminociclohexano (DACH) de platino y oxalato (**figura 15**). Los aductos DACH de platino que se forman, inhiben la replicación y transcripción del ADN en las células cancerosas, induciendo su apoptosis o necrosis (Kweekel, Gelderblom and Guchelaar, 2005; Fuertes *et al.*, 2012). El oxalato generado durante la hidrólisis, es la marca distintiva que lo diferencia de otras terapias quimioterapéuticas y algunos estudios sugieren que es el responsable de la hipersensibilidad al frío característica del oxaliplatino en su fase aguda (Deuis *et al.*, 2013). Los resultados de estos estudios no son concluyentes, planteándose la posibilidad de que otros metabolitos generados tras la hidrólisis participen en el desarrollo de la NPIO.



Figura 15. Esquema de la hidrólisis del oxaliplatino.

El oxaliplatino puede cruzar la barrera hematoencefálica, aunque con baja eficiencia, de ahí que produzca una mayor vulnerabilidad sobre el SNP, incluidos los ganglios raquídeos. Numerosos trabajos han descrito alteraciones en el SNP tras su administración, afectando a procesos como la excitabilidad axonal, alteración de la homeostasis del calcio intracelular, disfunción glial, estrés oxidativo y muerte celular (revisado por Sañat, 2020). En algunos estudios, la apoptosis celular de las neuronas sensoriales está directamente relacionada con el grado de acumulación del platino en sus somas (Ta *et al.*, 2006). La asimilación de platino por parte de las neuronas sensoriales se modula por la actividad de algunos transportadores de drogas como MATE1 (“*Multidrug and toxin extrusion 1*”, codificado por el gen *Slc47a1*) y los miembros de la familia OCT y OCTN (“*organic cation transporters*” y “*organic cation transporter novel*”, respectivamente) (Ceresa and Cavaletti, 2012; Sprowl *et al.*, 2013; Fujita *et al.*, 2019b). Específicamente, el transportador de cobre 1 y miembro de la familia OCT, CTR1 (codificado por el gen *slc31a1*), ha sido propuesto como uno de los principales responsables del mantenimiento de la concentración del platino intracelular mediante procesos de absorción y eliminación de metales ya que, en humanos, una mayor expresión de este gen es indicativo de una mayor supervivencia y reactividad ante la quimioterapia en pacientes de cáncer (Sun *et al.*, 2017). Sin embargo, los ratones deficientes para CTR1 muestran una acumulación residual de oxaliplatino, lo que indica la existencia otros mecanismos para la absorción del metal (Wei *et al.*, 2021). Junto a CTR1 se han señalado otros transportadores catiónicos como OTC1 (*slc22a1*) y OCT2 (*slc22a2*), además de OCTN1 (*slc22a4*) y OCTN2 (*slc22a5*). En particular, la ablación genética y farmacológica de OCT2 (codificado por el gen *slc22a2*) previene el desarrollo de la hipersensibilidad mecánica y al frío tras administrar el oxaliplatino (Ceresa and Cavaletti, 2012; Sprowl *et al.*, 2013).

Al igual que con el ADN nuclear, el DACH de platino puede unirse al ADN mitocondrial y producir aductos de ADN. Ya que los mecanismos de reparación del material genético son poco eficientes en las mitocondrias, estos aductos de platino dañan gravemente la replicación y transcripción mitocondrial generando errores en la cadena respiratoria y aumentando el estrés oxidativo (Canta, Pozzi and Carozzi, 2015). Distintos estudios han confirmado este proceso, al observar que el oxaliplatino incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido, la peroxidación lipídica y proteica y la oxidación del DNA, generando compuestos como la 8-oxoguanina (Di Cesare Mannelli *et al.*, 2013; Kelley *et al.*, 2014). A su vez, los mayores niveles de ROS producen un aumento de la permeabilidad al calcio en las mitocondrias y desencadena una serie de cascada de señalización que terminan con la activación de vías apoptóticas, incluyendo la activación de p53, Bax, liberación del citocromo c, activación

de la caspasas 3 y 9, y un incremento de la producción de citoquinas proinflamatorias (MacDonald, 2002; Bulua *et al.*, 2011). En este contexto, existe un gran interés por identificar compuestos que puedan reducir los niveles de ROS producidos en las células. La administración de los antioxidantes acetyl-L-carnitina, el ácido alfa lipoico o la vitamina C reducen la hiperalgesia inducida por el oxaliplatino, apoyando el papel clave que ejerce el estrés oxidativo en el desarrollo de la neuropatía (Carvalho, Silva and Carvalho, 2017). Otros fármacos usados en clínica y con propiedades antioxidantes que se están evaluando para el tratamiento de la neuropatía son el Calmangafodipir y el Monosialotetrahexosylgangliósido (GM1) (Glimelius *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020). Finalmente, la enzima endonucleasa apurinica/apirimidinica 1 (APE1), encargada de la reparación de bases nucleotídicas dañadas, y la proteína BCLW, miembro de la familia de los reguladores de apoptosis BCL2, son otros dos ejemplos de dianas terapéuticas relacionadas con la disfunción mitocondrial investigadas en la prevención de la NPIO (Colak *et al.*, 2014; Kelley *et al.*, 2016).

El oxaliplatino también causa degeneración axonal, que se manifiesta en la pérdida de fibras intra-epidérmicas, así como la inhibición del crecimiento de neuritas de las neuronas sensoriales (Dougherty *et al.*, 2004; Xiao, Zheng and Bennett, 2012; López-González *et al.*, 2018; Livni *et al.*, 2019). El estudio de Xiao y colaboradores en 2012 demuestra que la degeneración axonal presente en las fibras intra-epidérmicas se debe principalmente a alteraciones en los nociceptores de tipo C y A, produciendo un aumento de su excitabilidad y la generación de PAs espontáneos. Por el contrario, otros estudios indican que son las fibras tipo A mielínicas, y no las C, las que desarrollan mayor sensibilidad al frío. (Kagiava *et al.*, 2008; Sittl *et al.*, 2010, 2012). En concordancia con estos resultados, el bloqueo de fibras de gran diámetro reduce la alodinia al frío en la neuropatía en humanos (Forstenpointner *et al.*, 2018). Asimismo, algunos estudios también han identificado un proceso de desmielinización, que produce cambios morfológicos en neuronas mielínicas de gran tamaño, sin llegar a apreciarse una pérdida en el número total de éstas (Jamieson *et al.*, 2005; Guillaumot *et al.*, 2019). Los mecanismos moleculares que provocan las alteraciones axonales descritas aún no están resueltos, aunque se piensa que también pueden estar relacionados con la disfunción mitocondrial dado que el número de mitocondrias vacuoladas es significativamente mayor en los axones de estas fibras (Zheng, Xiao and Bennett, 2011; Xiao, Zheng and Bennett, 2012).

Por otro lado, cada vez existen más evidencias que demuestran la infiltración de células del sistema inmune en los ganglios sensoriales durante el tratamiento con oxaliplatino, que pudieran ser partícipes de la generación del dolor neuropático. De hecho, el oxaliplatino no provoca inmunosupresión y tiene la capacidad de estimular al sistema inmune, con aumento de

los niveles de interferón- γ , TNF- α y mayor proporción de células T (CD4+, CD8+) circulantes (Tesniere *et al.*, 2010; Stojanovska *et al.*, 2019; Makker *et al.*, 2020). También se ha observado que en la neuropatía, la hiperalgesia mecánica y la pérdida de fibras puede ser prevenida por minociclina, un antibiótico que inhibe los macrófagos, monocitos y la microglía (Raghavendra, Tanga and Deleo, 2003; F. X. Zhang *et al.*, 2010; Boyette-Davis and Dougherty, 2011). Además, en algunos estudios, la administración de oxaliplatino o paclitaxel causa una mayor expresión del ligando de quimiocina 2 (CCL2) y su receptor, CCR2 (Makker *et al.*, 2017; Illias *et al.*, 2018), una proteína quimio-atrayente que recluta monocitos, células T y células dendríticas en áreas inflamadas. Además, el bloqueo del receptor previene el desarrollo de la alodinia mecánica inducida por la neuropatía (Illias *et al.*, 2018). Por último, varios agentes quimioterapéuticos como el oxaliplatino y el cisplatino aumentan también los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-1 β , las cuales pueden sensibilizar a los nociceptores produciendo el desarrollo de la hiperalgesia (revisado por Starobova and Vetter, 2017).

1.7.3. Canalopatías tras el tratamiento de oxaliplatino en el sistema nervioso periférico

En las últimas dos décadas, muchos estudios han investigado el papel que juegan diferentes canales iónicos en los mecanismos del dolor neuropático causado por el oxaliplatino. Ya inicialmente se observó que el bloqueo de los canales de sodio activados por voltaje reducía los comportamientos nocifensivos en animales que desarrollaban la NPIO (Ling *et al.*, 2007; Egashira *et al.*, 2010). Una de las principales hipótesis propuestas para explicar la acción del oxaliplatino es que el metabolito oxalato, resultante de la hidrólisis del oxaliplatino, afecta a diversos canales iónicos, entre ellos los canales de sodio. En concreto, se ha propuesto que el oxalato ralentiza la cinética de inactivación de estos canales, lo cual prolonga su apertura, lo que se traduce en una mayor excitabilidad de las neuronas sensoriales (Adelsberger *et al.*, 2000; Grolleau *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2008).

Referente a los canales de sodio, los primeros estudios apuntaban al canal Na_v1.6 como el principal responsable de las manifestaciones agudas, ya que su inhibición selectiva o ablación evitaba la sintomatología. Se observó también que el oxaliplatino genera un aumento de las corrientes de Na_v1.6 en neuronas de gran tamaño, resultando en la generación de potenciales de acción en ráfaga, indicativo de una mayor excitabilidad (Sittl *et al.*, 2012; Deuis *et al.*, 2013). Más recientemente, registros de calcio *in vivo* también han demostrado la participación de Na_v1.6, ya que tras su inhibición selectiva se reduce el número de neuronas sensibles al frío. En concreto, se reduce el número de neuronas silentes, es decir, aquellas que presentaban exclusivamente

una sensibilidad al frío tras la inyección intra-epidérmica de oxaliplatino, sin llegar a tener efectos en aquellas neuronas sensibles a frío en condiciones basales (MacDonald *et al.*, 2021). Igualmente, se ha estudiado la contribución de otros miembros de la familia de canales Na_v a la neuropatía, comprobándose que tanto el bloqueo de $Na_v1.7$ como la ablación de $Na_v1.9$, bien genética o mediante oligonucleótidos previene, en roedores, la alodinia mecánica en el caso de $Na_v1.7$ (Ghelardini *et al.*, 2010), o la hipersensibilidad al frío en el caso de $Na_v1.9$ (Lolignier *et al.*, 2015). Estudios similares con $Na_v1.8$ también sugieren su participación en la alodinia al frío (Urru *et al.*, 2020). Estos resultados tienen un especial interés ya que $Na_v1.8$ se expresa en la mayoría de los receptores de frío silentes, mientras que la eliminación de las neuronas $Na_v1.8+$ no afecta a la sensibilidad al frío a temperaturas inocuas (Luiz *et al.*, 2019). Asimismo, los niveles de ARNm para $Na_v1.8$ se encuentran sobreexpresados tras una única inyección de oxaliplatino (Descoeur *et al.*, 2011). Diversas mutaciones en los canales Na_v también han sido relacionadas con la neuropatía. Así, los pacientes con polimorfismos para $Na_v1.4$ (SCN4A-rs2302237) y $Na_v1.8$ (SCN10A-rs1263292) presentan una mayor incidencia de la neuropatía aguda (Argyriou, Cavaletti, Antonacopoulou, *et al.*, 2013), mientras que aquellos que presentan el polimorfismo SCN9A-rs6746030 para $Na_v1.7$ desarrollan la neuropatía con menor nivel de gravedad (Serenio *et al.*, 2017). No obstante, también hay evidencias de que la neuropatía puede desarrollarse con independencia de $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$ y que la activación de estos canales no es suficiente para inducir la sensibilidad al frío en neuronas silentes (Minett *et al.*, 2014; MacDonald *et al.*, 2021).

Otros estudios han identificado algunos canales de potasio entre los componentes moleculares alterados en las neuronas sensoriales tras la inyección de oxaliplatino. En 2008, Kagiava y colaboradores demostraron que el oxaliplatino provoca alteraciones en la forma del PA pero no en la amplitud o en el tiempo en alcanzar la amplitud máxima (tiempo al pico) (Kagiava *et al.*, 2008). De acuerdo con los resultados, los autores sugieren una implicación de los canales de potasio dependientes de voltaje y no de los canales de sodio, donde el oxaliplatino tendría un efecto similar al bloqueo farmacológico de los canales K_v por 4-AP. La participación de los canales K_v1 ya ha sido observada en el tratamiento con oxaliplatino y en otros modelos de dolor neuropático (González *et al.*, 2017; MacDonald *et al.*, 2021). De hecho, estudios de expresión indican una disminución en los niveles de ARNm para $K_v1.1$ tras la neuropatía (Descoeur *et al.*, 2011). Además, se han encontrado evidencias para otros miembros de la familia de canales de potasio voltaje-dependientes, como los canales K_v7 (KCNQ-M). Su activación mediante flupirtina reduce la hiperexcitabilidad inducida por oxaliplatino en los axones de las fibras tipo A (Sittl *et al.*, 2010). Posteriormente, se demostró que el tratamiento afecta específicamente al canal

K_v7.2 (KCNQ2), el cual reduce su expresión en TG tras el tratamiento con oxaliplatino (Ling *et al.*, 2017). Asimismo, los canales HCN1 y HCN2 juegan también un papel en la neuropatía ya que su inhibición farmacológica previene la hipersensibilidad al frío tanto *in vitro* como *in vivo* (Descoeur *et al.*, 2011; Dini *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). Además, los niveles de ARNm para HCN1, pero no para HCN2, aumentan tras el tratamiento (Descoeur *et al.*, 2011). Igualmente, en este mismo estudio se observó además una disminución de los niveles de expresión de los canales TREK1 y TRAAK. Estos canales, junto a otros miembros de la familia K2P, TREK2 y TRESK, reducen el fenotipo de la alodinia al frío (Noël *et al.*, 2009; Descoeur *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014; Castellanos *et al.*, 2020).

Muchos autores han analizado la posible alteración de los canales TRPM8 y TRPA1 y su papel en el desarrollo de la hipersensibilidad al frío en modelos de dolor neuropático. Por un lado, numerosos trabajos demuestran que la ablación farmacológica o genética de TRPA1 previene la sintomatología en el modelo inducido por oxaliplatino (Nassini *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Nativi *et al.*, 2013; K. Yamamoto *et al.*, 2015). En los estudios independientes de Nassini en 2011, y Zhao en 2012, la hiperalgesia al frío se redujo tras la administración del antagonista de TRPA1, HC-030031. Además, la aplicación de AITC aumentaba el número de respuestas nocifensivas en los experimentos conductuales de animales tratados y observaban un porcentaje mayor de neuronas sensibles a AITC. Es importante mencionar que las neuronas fueron incubadas con oxaliplatino dos horas antes de los registros *in vitro*, mientras que para los experimentos conductuales la administración se realizó vía intraperitoneal y las pruebas se efectuaron entre dos horas hasta 7 días después de la inyección (Zhao *et al.*, 2012). En este mismo estudio, la administración de mentol generó el mismo efecto que AITC *in vivo*, pero no *in vitro* y el bloqueo farmacológico por HC-030031 disminuyó el comportamiento evocado por el mentol. Estos resultados van en línea con los obtenidos en el trabajo de Anand y colaboradores, donde observaron un aumento en el número de respuestas ante otro agonista de TRPM8, la icilina, pero no a WS-12 (Anand, Otto and Anand, 2010). Dado que el mentol y la icilina pueden activar también a TRPA1 se sugirió que el aumento del número de respuestas al mentol tras el tratamiento con el oxaliplatino se debe a su acción sobre TRPA1. La implicación de TRPM8 se descartó también en el estudio de Knowlton en 2011, donde el bloqueo selectivo no aminoraba la neuropatía (Knowlton and McKemy, 2010). En contrapartida, otros autores sí defienden su participación (Gauchan *et al.*, 2009; Descoeur *et al.*, 2011; Bertamino *et al.*, 2018; Journigan *et al.*, 2020).

Los estudios de expresión tampoco han sido concluyentes. Algunos trabajos describen un aumento en los niveles de ARNm para TRPA1 pero no para TRPM8 (Descoeur *et al.*, 2011; K. Yamamoto *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017) en respuesta a la inyección de oxaliplatino. En otro se

describe un aumento para TRPM8 (Gauchan *et al.*, 2009). Finalmente, algunos estudios describen el aumento en los niveles de ambos (Kato *et al.*, 2014; Mizuno *et al.*, 2014). En contraste, no se han observado cambios en los niveles de expresión de TRPV1 en DRG. Este resultado es consistente con la ausencia de una hiperalgesia al calor en los pacientes tratados con oxaliplatino (Cata *et al.*, 2006). No obstante, en el estudio de Chukyo *et al.*, 2018, señalan que existe una remodelación en el patrón de expresión de estos tres canales. Mediante experimentos inmunohistológicos, estos autores demuestran que, tras el tratamiento con oxaliplatino, se observa una mayor co-localización de TRPA1 con TRPV1 y con IB4 en neuronas sensoriales de pequeño tamaño. Curiosamente, también observan que las neuronas TRPM8+ expresan más neurofilamento NF200 (existe un mayor grado de co-localización) (Chukyo *et al.*, 2018). La implicación de las neuronas TRPA1+/ IB4+ en la neuropatía coincide con las conclusiones alcanzadas del trabajo de Joseph y colaboradores donde demuestran que la eliminación selectiva de las neuronas IB4+ previene la NPIO (Joseph *et al.*, 2008).

La variabilidad en los resultados obtenidos puede explicarse, en parte, debido al uso de diferentes modelos experimentales de neuropatía. Estas diferencias incluyen las formas de aplicar el fármaco (sistémico o local), la frecuencia de administración (una o múltiples dosis), el intervalo entre las dosis, la dosis acumulada, etc. La gran variabilidad documentada dificulta las comparaciones entre los distintos estudios, y también hace difícil diferenciar las dos fases clínicas de la neuropatía. Se ha propuesto que en la fase aguda interviene predominantemente una sensibilización del canal TRPA1, a través del oxaliplatino o su metabolito oxalato, que sería responsable de la hipersensibilidad inmediata tras la infusión del fármaco en pacientes. En fases más tardías de la enfermedad, cuando la acumulación del platino causa daños celulares, se producirían alteraciones en la regulación genética que podrían afectar a los niveles de expresión de TRPA1 y TRPM8, entre otros muchos canales iónicos ya nombrados (revisado por Nakagawa and Kaneko, 2017).

1.7.4. Alteraciones genéticas y estudios de transcriptómica en la neuropatía inducida por oxaliplatino

Las nuevas técnicas, basadas en el análisis del transcriptoma, han tratado de definir la base molecular que subyace al dolor neuropático, utilizando distintos modelos experimentales de lesión. A pesar de utilizarse distintos modelos, se ha observado que algunos cambios en la expresión génica se repiten (Hu *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2016; Bangash *et al.*, 2018; Cobos *et al.*, 2018; Finno *et al.*, 2019; Megat *et al.*, 2019; Nguyen, Le Pichon and Ryba, 2019; Renthal *et al.*, 2020; Starobova *et al.*, 2020). Entre los genes alterados de forma consistente en los distintos modelos,

encontramos un aumento de la expresión de neuropéptidos, como la galanina (*Gal*), el neuropéptido Y (*Npy*), la neurotensina (*Nts*), el péptido intestinal vasoactivo (*Vip*), citoquinas como el factor estimulante de colonias 1 (*Csf1*), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Egfr*) y factores de transcripción como el *Atf3* o genes de supervivencia y muerte celular.

En referencia al oxaliplatino, hasta el momento, existen muy pocos estudios que hayan examinado cambios en la expresión génica. En los trabajos de Bangash *et al.*, 2018 y Starobova *et al.*, 2020, se analizó la expresión génica en muestras de tejido de DRG tratadas con oxaliplatino y se compararon con otros modelos de dolor neuropático (Bangash *et al.*, 2018; Starobova *et al.*, 2020). En líneas generales, observaron que la NPIO conlleva la disminución de un mayor número de genes en comparación con otras patologías. Además, por extraño que parezca, el número de genes diferencialmente expresados era bajo y no encontraron diferencias en la expresión entre los canales iónicos, sistema inmune, o procesos inflamatorios, al contrario que los estudios realizados mediante otras técnicas. Entre los nuevos genes identificados en estos trabajos podemos destacar el descenso en la expresión de *Hba-a1*, *Hba-a2* (“Hemoglobin Alpha, adult chain”) y *Alas2* (“Aminolevulinic acid synthase 2, erythroid”). *Hba-a1*, *Hba-a2* y *Alas2* tienen funciones conocidas en eritrocitos, donde intervienen en el metabolismo de metales y procesos mitocondriales. Estudios previos los han relacionado con alteraciones en comportamientos nocifensivos (Stankiewicz *et al.*, 2014, 2015; Y. Yamamoto *et al.*, 2015). En un estudio posterior, se confirmó la desregulación de estos mismos genes tras el tratamiento con oxaliplatino (Gould *et al.*, 2021). Además, dejaban de estar diferencialmente expresados en una línea transgénica deficiente para *SARM1*, una ADNasa que participa en un tipo característico de degeneración axonal conocido como degeneración Walleriana (WLDS) (Gerdtts *et al.*, 2016), y cuya eliminación se ha comprobado que protege frente la degeneración axonal en otros modelos neuropáticos testados (Osterloh *et al.*, 2012; Geisler *et al.*, 2016, 2019; Turkiew *et al.*, 2017).

En resumen, aunque la secuenciación masiva de ARN es una herramienta que ha revolucionado la manera de estudiar los perfiles de expresión génica y existe mucha información de la naturaleza molecular de las neuronas sensoriales, los estudios de expresión en diferentes modelos de dolor son limitados, sin conclusiones relevantes para futuras dianas terapéuticas. Por ello, sigue siendo necesario estudiar los mecanismos celulares y moleculares implicados en distintas patologías, como por ejemplo en la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

La caracterización molecular de las neuronas TRPM8+ y su papel en la neuropatía periférica inducida por el agente quimioterapéutico oxaliplatino en un modelo murino, así como la identificación de posibles genes y mecanismos que desarrollen la sensibilidad al frío.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el perfil molecular de las neuronas TRPM8+ y su estudio comparativo con la población de nociceptores no peptidérgicos IB4+. Esta población expresa el canal TRPA1, el cual es considerado como el principal candidato termosensor para las temperaturas al frío nocivas.
- 2) Validar nuevos marcadores moleculares que permitan identificar a las neuronas TRPM8+.
- 3) Caracterizar a nivel celular, mediante la técnica de imagen de calcio, los mecanismos implicados en la detección del frío en las neuronas TRPM8+ y TRPA1+, así como su perfil quimiosensible a los principales agonistas de los canales TRM8, TRPA1 y TRPV1.
- 4) Estudiar la sensibilidad mecánica y al frío en ratones silvestres tratados con oxaliplatino y la implicación de las neuronas TRPM8+ y TRPA1+ en esta neuropatía.
- 5) Estudiar los cambios producidos en el perfil del transcriptoma tras la inducción de la neuropatía e identificar posibles mecanismos clave alterados tras el tratamiento.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones silvestres, en el ratón transgénico TRPM8^{BAC}EYFP y en los ratones deficientes para los canales iónicos TRPM8 (TRPM8^{KO}) y TRPA1 (TRPA1^{KO}); se utilizaron ratones de ambos sexos de entre 1 a 1.5 meses de edad.

Las líneas TRPM8^{BAC}EYFP, TRPM8^{KO} y TRPA1^{KO} se establecieron en el animalario RMG del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández-CSIC, y se mantuvieron con la temperatura controlada, con un ciclo de luz y oscuridad de 12/12 horas y con comida y agua *ab libitum*. Todos los procesos experimentales se realizaron bajo el Real Decreto Español 53/2013 y la directiva del Consejo de la Unión Europea 2010/63/EU que regula el uso de animales en la investigación y se aprobaron por los Comités de Ética del Instituto de Neurociencias y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, así como por la Consellería de Presidencia, Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua de la Generalitat Valenciana.

Los experimentos descritos en la **sección 4.3.2** de los resultados se realizaron durante mi estancia investigadora en el Instituto Karolinska (Suecia). En este caso, se utilizaron animales silvestres (C57BL/6JRj, Janvier Labs). Los procedimientos se aprobaron por la directiva del Consejo de la Unión Europea 2010/63/EU y el Comité de Ética local “*Stockholms djurförsöksetiska nämnd*”, la Ley del Bienestar Animal de Suecia “*Djurskyddslagen*”, SFS 1988:534, y la Ordenanza del Bienestar Animal de Suecia “*Djurskyddsförordningen*” SFS 1988:539, para la utilización de animales para uso científico: DFS 2004:15 and SJVFS 2012:26.

1. La línea TRPM8^{BAC}EYFP se generó en el laboratorio y se caracteriza por expresar la proteína fluorescente amarilla (EYFP) bajo la regulación del promotor del gen *Trpm8* murino (Morenilla-Palao *et al.*, 2014). Para ello, se incorporó un cromosoma artificial bacteriano (BAC, por sus siglas en inglés) en el genoma de animales silvestres C57BL/6J. Como resultado, estos animales poseen una expresión endógena de la proteína EYFP en neuronas que expresan el gen *Trpm8*. En la **figura 16** puede verse la estrategia genética utilizada para incorporar la proteína EYFP detrás del promotor del gen. Este ratón transgénico ha sido extensamente caracterizado en nuestro laboratorio y en colaboración con otros grupos de investigación (Alcalde *et al.*, 2018; Arcas *et al.*, 2019; Ordás *et al.*, 2019; Piña *et al.*, 2019).

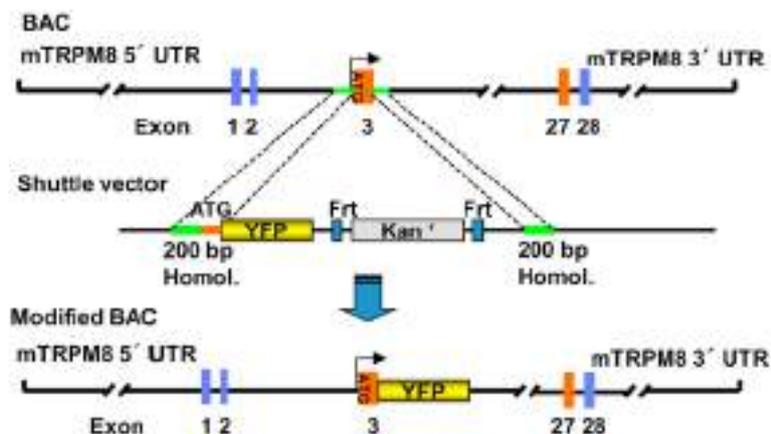


Figura 16. Línea transgénica TRPM8^{BAC}EYFP. Esquema de la estrategia de incorporación del cromosoma artificial BAC, el cual contiene el locus completo del gen *Trpm8*. En el exón 3 del gen, se insertó la proteína fluorescente amarilla intensificada (EYFP). Modificado de Morenilla-Palao et al., 2014.

- La línea de ratones TRPM8^{EGFPf}, donada por el Dr. Ardem Patapoutian (Dhaka *et al.*, 2007), se usó para estudiar el fenotipo de ratones deficientes para el gen *Trpm8* (TRPM8^{KO}). Para la generación de esta línea también se usó un BAC modificado genéticamente que codifica para la proteína fluorescente verde farnesilada (EGFPf), es decir, que está fusionada a un grupo farnesil de unión a membrana, limitando así su localización en esta región; la proteína se intercala a partir del primer codón de inicio del gen *Trpm8* usando recombinación genética. Concretamente, se elimina la secuencia de los residuos entre las posiciones 2-29 y se intercambia por la proteína fluorescente EGFP. Por tanto, los animales TRPM8^{EGFPf} tienen interrumpidas una o las dos copias del gen *Trpm8* dependiendo si su genotipo está en hemicingosis (TRPM8^{EGFPf/+}) u homocingosis (TRPM8^{EGFPf/EGFPf}). Los animales con una sola copia expresan tanto la proteína fluorescente como el canal TRPM8 funcional, mientras que aquellos animales con las dos copias de la proteína EGFP son completamente deficientes en la expresión del canal TRPM8 (**figura 17**). Tal como describen en un trabajo posterior, para potenciar la fluorescencia de la proteína EGFPf se eliminó el casete de expresión recombinante de neomicina, flanqueado por las secuencias lox-P (Dhaka *et al.*, 2008).

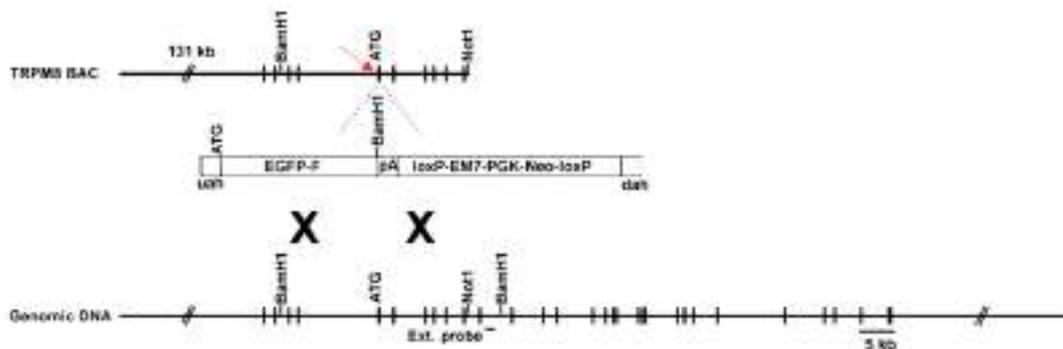


Figura 17. Línea transgénica TRPM8-EGFPf. Esquema de la estrategia de incorporación de la proteína fluorescente EGFP, justo por detrás del promotor *Trpm8* (indicado con una fecha roja). El BAC generado se introdujo en la zona del mapa genómico marcadas con una X. Modificado de Dhaka *et al.*, 2007.

3. Los ratones deficientes para el gen *Trpa1* ($TRPA1^{KO}$) fueron donados por el Dr. David Corey (Kwan *et al.*, 2006). Para generar un canal no funcional, se eliminó la región que forma el poro del canal por una secuencia no codificante. Concretamente se eliminaron los segmentos transmembrana S5 y S6 y el bucle del poro (**Figura 18**).

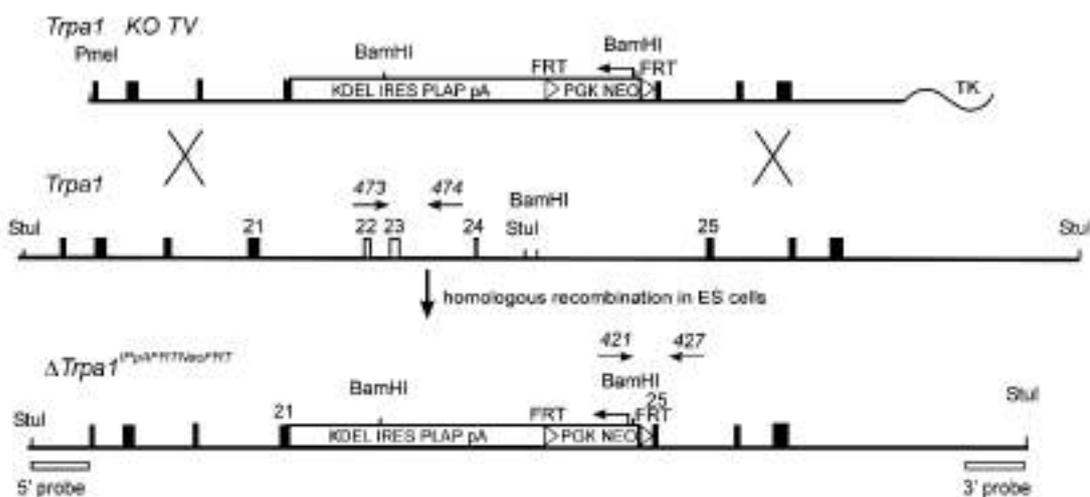


Figura 18. Línea transgénica TRPA1^{KO}. Esquema de la estrategia de incorporación de la secuencia no codificante entre los exones 21-25 que corresponden a los segmentos transmembrana S5 y S6 del gen *Trpa1*. Modificado de Kwan *et al.*, 2006.

3.2. Pruebas de conducta

Las pruebas conductuales se realizaron en ratones TRPM8^{BAC}EYFP. La evaluación y el análisis se realizó en ciego para los animales inyectados con oxaliplatino o su vehículo.

3.2.1. Von Frey

La prueba conductual de von Frey se realizó con el objetivo de medir la alodinia mecánica. Los ratones se colocaron individualmente en cajas de metacrilato sobre una malla metálica, con perforaciones cuadradas de 5x5 mm (Ugo Basile SRL), elevada en una plataforma. Los animales se aclimataron en la misma sala donde se realizaron los experimentos dos o tres días previos y al menos una hora antes de la evaluación conductual (**figura 19B**). La prueba consistió en evaluar la sensibilidad mecánica en la superficie plantar de ambas extremidades traseras a través de la aplicación de los filamentos von Frey (BIO-VF-M model, Bioseb-In vivo Research Instruments, France). El filamento se posiciona perpendicularmente a la superficie plantar y se ejerce una presión hasta curvarlo (**figura 19A y C**). En este trabajo hemos empleado una modificación del paradigma “*up-down*” originalmente propuesto por Chaplan et al., 1994 y Dixon, 1980. El protocolo fue descrito por la Dra. Llorián-Salvador y colaboradores (Llorián-Salvador *et al.*, 2016) y se explica brevemente a continuación: se utilizaron los filamentos catalogados por Bioseb según el diámetro del filamento (mm) 2.44, 2.83, 3.22, 3.61, 4.08, 4.56 que equivale a una fuerza ejercida de 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 1 y 4 gramos respectivamente según la ecuación $\text{Log}(10 \cdot \text{fuerza}(\text{mg}))$; BioSeb).

Para la primera medida se utilizó siempre el filamento 3.61 que corresponde con un valor medio en el rango de fuerzas utilizadas. Si se obtuvo una respuesta positiva con dicho filamento (retirada o desplazamiento de la pata trasera), se aplicó el siguiente filamento más fino (en este caso 3.22), mientras que una respuesta negativa conlleva utilizar el siguiente más grueso (en este caso 4.08). Para establecer el umbral, se tomaron 6 medidas en cada extremidad por animal y los resultados se expresaron como el 50 % del umbral de respuesta, calculado con la siguiente fórmula:

$$50\% \text{ g threshold} = \frac{(10X_f + \kappa\delta)}{10.000}$$

Donde X_f es el valor del último filamento aplicado (fuerza ejercida); κ , el factor de corrección para el patrón de respuestas (tabla de calibración de Dixon, Dixon, 1965) y δ , la distancia media en unidades logarítmicas entre los filamentos usados.

La presión ejercida sobre la superficie plantar se mantuvo durante tres segundos y tras una respuesta positiva, al animal se le permitió descansar al menos 1 minuto para evitar la hipersensibilización de la zona plantar (**figura 19C**). Tras finalizar la aplicación de los filamentos en una de las extremidades traseras en todos los animales del grupo experimental, se repitió el procedimiento para la otra extremidad. El valor final para cada medida se determinó como el promedio entre ambas extremidades.

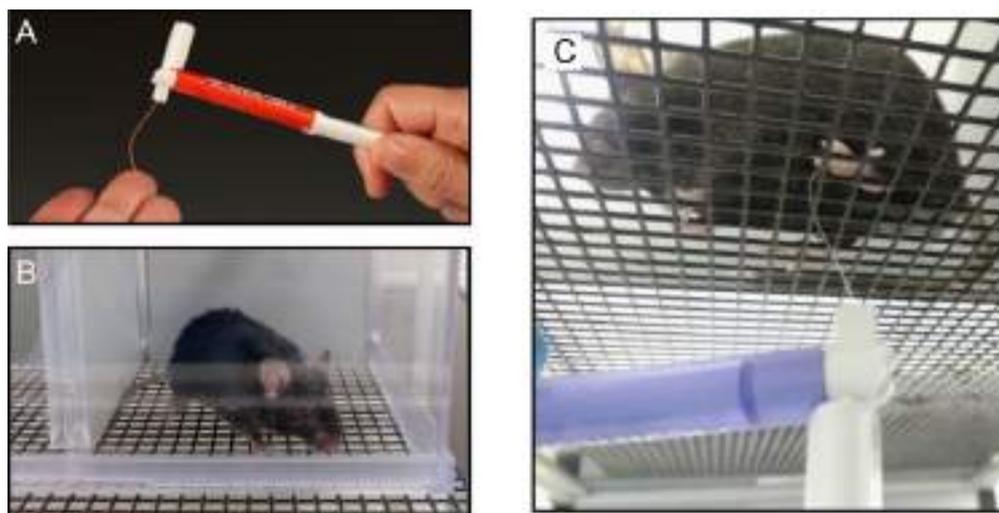


Figura 19. Prueba de conducta de von frey. A) Ejemplo de la presión ejercida usando un filamento de von Frey hasta llegar a curvarlo. B) El animal se coloca individualmente en un receptáculo con libre disponibilidad de movimiento en una malla elevada. C) Desde la parte inferior de la plataforma se le aplica el filamento en las dos patas traseras.

3.2.2. Prueba de la placa fría unilateral

El objetivo de esta prueba fue evaluar la sensibilidad al frío utilizando la prueba de la placa fría unilateral (Menendez *et al.*, 2002). Para ello, se usó un equipo que consta de una placa metálica acoplada a un sistema Peltier (IITC, Life Sciences modelo PE34) que permite regular la temperatura, 0 °C en nuestro caso. Los ratones se inmovilizaron sujetándolos suavemente por el cuello forzándoles a apoyar una de las dos patas traseras en la placa (**figura 20**), y se midió el tiempo que el animal tardó en retirar la pata de la superficie. La medida se realizó en ambas patas de forma alterna, permitiendo al animal recuperarse al menos 2 minutos entre cada medida, promediando las latencias de ambas patas. Si la retirada de la pata no fue suficientemente clara, se repitió la prueba en cada pata. Si no se observó ningún intento de retirada en 30 seg, interrumpimos el experimento para evitar posibles lesiones en la superficie plantar y se anotó este tiempo como medida límite.



Figura 20. Prueba de la placa fría unilateral (Unilateral Cold Plate, UCP) a 0 °C para la evaluación de la hiperalgesia al frío.

3.3. Inducción de la neuropatía por oxaliplatino

Para generar el modelo experimental de dolor neuropático inducido por agentes quimioterápicos, se administraron tres inyecciones intraperitoneales (i.p.) del fármaco oxaliplatino (TOCRIS™2623) a una concentración de 6 mg/kg en días alternos, como se indica en la **figura 21**. Según las indicaciones del prospecto, la solución stock de oxaliplatino se preparó en agua destilada a una concentración de 5 mM y se conservó a -20 °C hasta 1 año. Para preparar la solución a inyectar, la concentración stock de oxaliplatino a 5 mM (2 mg/ml) se diluyó en la solución vehículo (5 %, p/v, de glucosa disuelta en agua; Sigma-Aldrich) y se inyectó el volumen correspondiente al peso del ratón (10 ml/kg). A los animales en condiciones control, se les administró el mismo volumen de una solución de glucosa al 5 %. La solución final de oxaliplatino se preparó el mismo día de su administración.

Para evaluar el desarrollo de la neuropatía, se realizaron las pruebas conductuales de von Frey y de la placa fría, los días 7 y 8 contando desde la primera inyección. Para la prueba von Frey se obtuvo además una medida basal, antes de la primera inyección, tanto en los ratones tratados como en sus controles.

Los animales se aclimataron a la zona experimental donde se realizaron las pruebas conductuales durante dos o tres días previamente a las inyecciones. Aquellos animales con un fenotipo claro de desarrollo de la neuropatía se utilizaron para experimentos posteriores. En ocasiones, se repitió la prueba de la placa fría para asegurarnos de que los efectos de la neuropatía seguían presentes en los días 8-14 post inyección (**figura 21**). De forma similar a las pruebas conductuales, las inyecciones se llevaron a cabo en ciego.

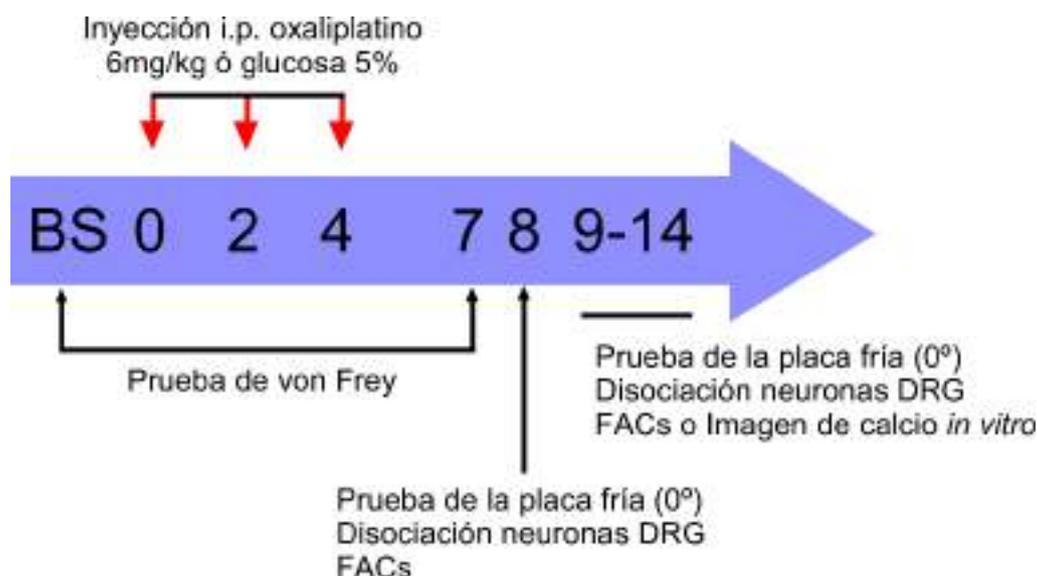


Figura 21. Protocolo de inducción de la neuropatía por administración de oxaliplatino. Los valores basales (BS) para la prueba de comportamiento de von Frey se obtuvieron antes de la inyección intraperitoneal y una vez que los animales estuvieron aclimatados a la sala. En los días 0, 2 y 4 se realizaron las inyecciones intraperitoneales de oxaliplatino, 6 mg/kg o glucosa al 5 %. El día 7 se evaluó la presencia de alodinia mecánica con la prueba von Frey. El día 8 post-inyección se realizó la prueba de la placa fría unilateral (UCP) a 0°C para evaluar la presencia de hiperalgesia al frío. En los días 8-14 se realizó la extracción de los ganglios raquídeos para realizar cultivos celulares o purificación de las neuronas mediante FACS.

3.4. Cultivo de neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos

Los cultivos primarios se obtuvieron de ratones adultos (entre 1.5 a 3.5 meses de edad), que se anestesiaron con isoflurano y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical seguida por decapitación. Se extrajo la columna vertebral y bajo un microscopio estereoscópico se separaron los ganglios raquídeos de la médula espinal que se fueron depositando en una placa Petri con una solución fría de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Gibco™14170-088). Una vez que se aislaron los ganglios, se eliminó el tejido que los rodea, así como los nervios espinales y posteriormente se incubaron en una solución con 900U/ml de colagenasa tipo XI (Sigma), 5.31 U/ml dispasa II (GIBCO) durante 30-45 min a 37°C con 5 % de CO_2 . Después de la disociación enzimática, los ganglios se lavaron con HBSS suplementado con 5 % de FBS, 1 % MEM-Vit en ausencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} y se disgregaron mecánicamente resuspendiendo la solución con una punta de pipeta de 1 ml, de 10 a 15 veces. La suspensión de células se filtró con un filtro de nailon de 70 μm y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min para su recolección. El sedimento se resuspendió en medio MEM (Gibco™11095-080) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, Gibco™16000-044), 1 % MEM-Vit (Gibco™11120-037) y 1 % de los antibióticos

penicilina y estreptomycin (Gibco™PL15140122). Las células disociadas se sembraron en cristales de 6 mm² de diámetro tratados con poli-L-lisina. Los experimentos de imagen calcio se realizaron entre 12 a 24 h después del sembrado.

3.5. Purificación de neuronas fluorescentes por el método de citometría de flujo (FACS)

La técnica de citometría de flujo FACS, del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, permite la selección y purificación de células procedentes de una mezcla heterogénea en dos o más contenedores, usando como parámetros de separación diferentes características de dispersión, como el tamaño, la complejidad y la fluorescencia. Con el objetivo de estudiar el perfil molecular de tres poblaciones neuronales distintas, obtuvimos las neuronas de los ratones TRPM8^{BAC}EYFP, que se incubaron con la isolectina GS-IB4 Alexa Fluor™ 568 (Invitrogen™ I21412) para separar y aislar las neuronas EYFP+, IB4+ y dobles negativas (DN; EYFP-/IB4-) (**figura 22A**).

Para la técnica de separación por FACS utilizamos ratones de ambos sexos, de entre 1 a 2 meses; el procedimiento de separación es agresivo para las células por lo que muchas de ellas se dañan por las fuerzas de cizallamiento a la que se ven sometidas, por ello usamos animales más jóvenes ya que las neuronas son más resistentes (Saxena *et al.*, 2012). Los ganglios raquídeos se extrajeron en el menor tiempo posible, ya que es un paso crítico en el procedimiento. Una vez extraídos, se incubaron con colagenasa tipo XI (1800U/ml; Sigma), dispasa II (5.31U/ml, Sigma) y ADNasa I (200U; Invitrogen™18047019) durante 20 min en una solución HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ a 37°C con 5% de CO₂.

Después de la incubación enzimática, los ganglios se lavaron con solución HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ suplementada con 5 % de FBS, 1 % MEM-Vit y se disgregaron mecánicamente pasando la solución cuidadosamente a través de una punta de pipeta de 1 ml, de 5 a 8 veces. Las células se filtraron con un filtro de 40 µm (BD Falcon) y se centrifugaron a 1250 rpm durante 7 min. El sobrenadante se eliminó y el sedimento resultante se resuspendió en HBSS frío con 1 µl/ml de isolectina GS-IB4 y 1 µl/ml de ADNasa I. Inmediatamente después, se realizó la separación por fluorescencia para su purificación, con un citómetro (FACSAria III, BD Biosciences) en el Servicio de Ómicas del Instituto de Neurociencias. Las células atravesaron una boquilla de 100 µm a baja presión (20 p.s.i y 1 como unidad arbitraria de velocidad de flujo) y se excitaron a las longitudes de onda 488 nm y 561 nm separando por fluorescencia (ver esquema de la **figura 22A**). En la **figura 22B** se muestra un ejemplo del análisis del FACS obtenido de células de DRG disociadas

para separar en las poblaciones EYFP+, IB4+ y la DN. Cada punto indica un evento (célula o partícula) separada en función de su fluorescencia para las dos longitudes de ondas de emisión utilizadas (Alexa 568 nm para las muestras IB4+ y 530 nm para EYFP+). Las regiones señaladas en azul indican las ventanas de separación utilizadas para obtener células purificadas EYFP+, IB4+ o DN que, como se observa, son poblaciones no solapantes. Asimismo, para verificar la correcta separación de las poblaciones neuronales fluorescentes, se realizó el mismo procedimiento en un animal silvestre, C57BL/6, de la misma edad y sin incubar con 1 µl/ml de isolectina GS-IB4 y no encontramos eventos localizados en las ventanas de separación establecidas por fluorescencia para las poblaciones EYFP+ y IB4+ (**figura 22C**).

Las células una vez separadas se recolectaron en tubos distintos, con HBSS frío suplementado con 50 % de FBS y 1 % MEM-Vit; antes de congelar las muestras se verificó bajo el microscopio si obtuvimos una correcta separación por fluorescencia (**figura 22D**), y posteriormente centrifugamos a 2000 rpm durante 7 min. El sedimento se resuspendió en solución de lisis e inmediatamente se congeló a -80 °C para preservar el perfil transcripcional dado que las células se usarán posteriormente para la secuenciación de ARN.

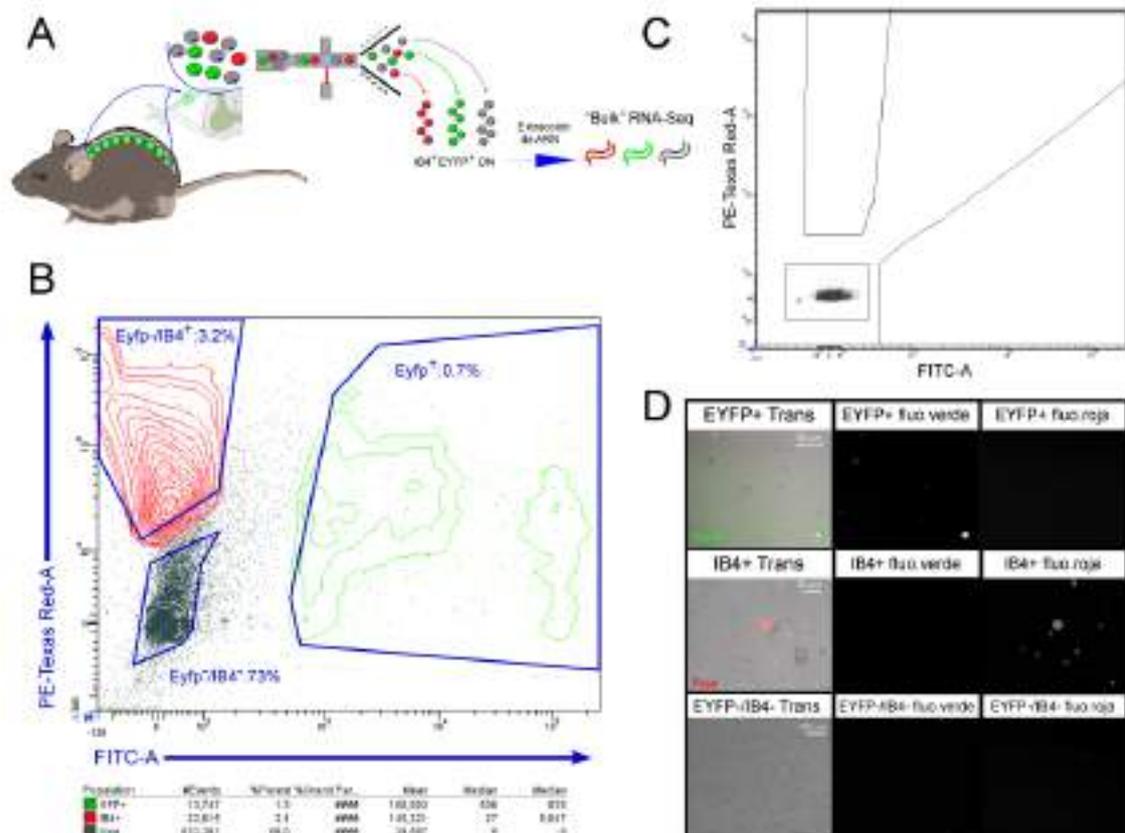


Figura 22. Separación de las poblaciones no solapantes EYFP+, IB4+ y DN usando la línea transgénica TRPM8^{BAC}EYFP. A) Esquema representativo del proceso de purificación de las tres poblaciones de interés. B) Gráfico de puntos mostrando la estrategia de purificación en función de la fluorescencia (roja, PE-Texas Red y verde, FITC); las ventanas indican las delimitaciones de las poblaciones no solapantes EYFP+/Alexa568⁻ e EYFP-/Alexa568⁺ (EYFP+, IB4+). La tercera población que se obtuvo correspondió a las neuronas no fluorescentes y por tanto negativas para EYFP e IB4 (DN). C) Mismo ejemplo para células procedentes de un ratón silvestre donde no se añadió la isolectina IB4 antes de procesarlas por el FACS. D) Imágenes de epifluorescencia y luz transmitida de las células tras su separación.

3.6. Obtención de ARN total

La purificación del ARN se realizó utilizando dos kits comerciales en función del número de eventos obtenidos tras el FACS:

- PicoPure RNA Isolation (Applied Biosystems™KIT0204) para un número de eventos menor de 50.000. Las células se lisaron en 50 µl de la solución XB.
- Kit Micro RNeasy RNA Isolation (Quiagen™74004) para más de 50.000 eventos. Las células se lisaron en 100 µl de la solución RLT.

En ambos casos, la extracción del ARN total a partir del lisado celular se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

1) Para el kit PicoPure RNA Isolation, antes de su congelación, el lisado celular se incubó a 42 °C durante 30 min en un baño. Tras el primer lavado con el “*buffer 1*”, la columna se incubó con 5 µl de DNAsa I junto con 35 µl de la solución RDD (Kit Micro RNeasy RNA Isolation, Quiagen™74004) durante 15 min y se prosiguió con un segundo lavado siguiendo con el protocolo comercial. El ARN purificado se eluyó en un volumen final de 12 µl.

2) Para el kit Micro RNeasy RNA Isolation, el lisado celular se pasó varias veces por una jeringa del calibre 20 G y en el proceso de purificación la columna se incubó con DNAsa I procedente del kit siguiendo las indicaciones del protocolo comercial.

Las muestras se preservaron directamente a -80 °C tras obtener el ARN purificado para evitar la degradación de las muestras.

Previo a la secuenciación, la integridad del ARN total se cuantificó con el chip de ARN PicoChip (Agilent™5067-1513) usando el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent). Este equipo permite determinar la calidad del ARN a través de una microelectroforesis usando nanocapilares, por lo que minimiza la cantidad de ARN necesaria que se necesitaría en un gel convencional de poliacrilamida o agarosa. Además, su software permite obtener un algoritmo denominado RIN (del inglés, *RNA Integrity Number*) que estandariza y cuantifica los parámetros obtenidos para el patrón de

bandas del ARN ribosómico 16S y 28S, lo cual informa sobre la integridad del ARN (Mueller and Schroeder, 2004). Un valor de RIN menor de 3-4 indica una baja o nula visibilidad de estas bandas, que a su vez se relacionan con la desnaturalización del ácido nucleico (**figura 23**). Las muestras con un RIN menor de 4 y por tanto desnaturalizadas se descartaron para su secuenciación.

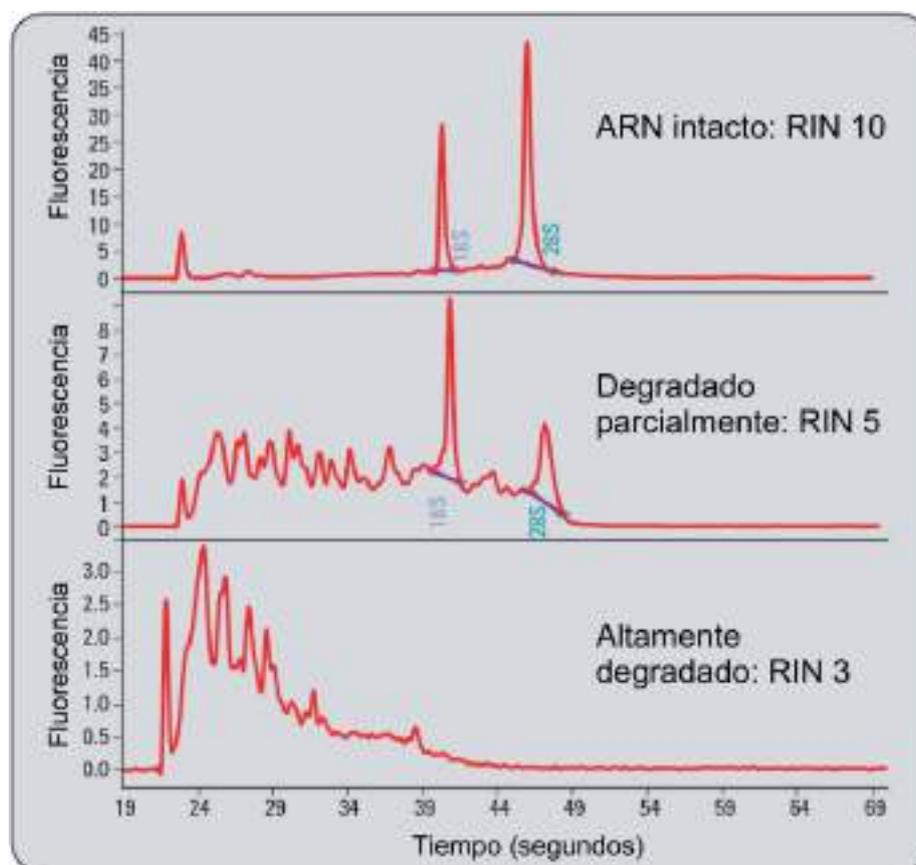


Figura 23. Valores de integridad de ARN (RIN). Ejemplos típicos del valor de RIN para ARN de diferente integridad; ARN intacto, parcial y altamente degradado (en este último caso sin visualización de las bandas ribosómicas 16S y 28S). Modificado de Mueller and Schroeder, 2004.

3.7. Preamplificación y preparación de librerías usando la tecnología Smart-Seq2

El proceso de generación de librerías y la secuenciación se llevó a cabo por el servicio EMBL GeneCore (<https://www.genecore.embl.de/index.cfm>), en Heidelberg, Alemania, bajo la supervisión técnica de Dinko Pavlinic y del Dr. Vladimir Benes, donde realicé una estancia de 3 semanas para aprender las técnicas y las herramientas informáticas necesarias para el análisis bioinformático de la expresión diferencial de genes.

La síntesis del ADNc y la preparación de las librerías se realizaron siguiendo el protocolo Smart-Seq2, desarrollado por Picelli et al., 2013, usando el kit Nextera XT DNA Library Prep (Illumina) (Picelli et al., 2013). El proceso permite la retrotranscripción reversa y la preamplificación con cebadores que hibridan tanto en el extremo 5' en la región de poli adeninas como en el extremo 3' en la caperuza de citosinas. A continuación, se detalla el protocolo estándar utilizado y basado en el estudio de Picelli y colaboradores, que se utilizó para el procesamiento de nuestras muestras y representado en la **figura 24**. Los pasos del protocolo se detallan en la figura:

1. Tras verificar la calidad del ARN de las muestras, éste se aísla y se retrotranscribe en su ácido desoxirribonucleico (ADNc) por productos de amplificado de PCR. Para ello, se incuban generalmente 2.4 µg del ARN durante 3 min a 72 °C; a continuación, se añade al vial de ARN 1 µl de cebadores oligodT (5'–AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3'; Bio-mers.net), 1 µl de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) a 10 mM y se mantiene a 4 °C. Este cebador se une a la cola poli A característica del ARNm, de manera que queda unido a todas las moléculas de ARNm por el extremo 5' (**paso 1** de la **figura 24**).
2. A continuación, se añade al vial con ARN la siguiente mezcla:
 - 0.5 µl 100 mM (DTT),
 - 2 µl 1M de betaína (Sigma-Aldrich, cat. no. 61962),
 - 0.1 µl 6 mM de MgCl₂,
 - 0.25 µl del inhibidor de ARNasas (40 U/µl; Clontech, cat. no. 2313A)
 - 2 µl del tampón del kit Nextera (5X)
 - 0.5 µl (200 U/µl) de la enzima retrotranscriptasa Superscript™II procedentes del kit comercial Superscript II (Invitrogen, cat. no. 18064-014)
 - 0.1 µl del cebador oligo (TSO) (Exiqon), que lleva dos riboguanosinas (rG) y una guanosina LNA modificada (Locked Nucleic Acids, +G) en el extremo 3'. Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) presentan una gran estabilidad durante la hibridación y permiten, en este protocolo, aumentar la afinidad de secuencias en la caperuza de citocinas en el extremo 3' (Petersen and Wengel, 2003).

Una vez completada la mezcla y ajustado a un volumen total 6.4 µl con agua libre de ARNasas, se realiza una incubación en un termociclador durante 90 min a 42 °C, seguidos de 10 ciclos de 2 min a 50 °C y 2 min a 42 °C, para acabar con 15 min a 70 °C (**paso 2** de la **figura 24**).

3. Después de esta reacción, 10.8 µl del ADNc se amplifica durante 18 ciclos usando 12.5 µl de la polimerasa KAPA HiFi (KAPA Biosystems, cat. no. KK2601) con 0.2 µl de los cebadores ISPCR (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'), que reconocen la secuencia complementaria

presente en los oligos TSO y dT usados previamente (**paso 3** de la **figura 24**). Una vez amplificado, el producto de PCR se limpia con perlas magnéticas. A continuación, se estudia la calidad del ADNc usando los chips de ADN para alta sensibilidad del sistema Bioanalyzer (Agilent).

- Seguidamente tiene lugar la creación de librerías o fragmentos de ADN, usando el kit comercial Nextera XT (Illumina). La preparación de la librería es un paso crítico, ya que la fragmentación tiene que producirse de una forma no sesgada para obtener un extracto representativo del material genético a secuenciar. En nuestro caso, se llevó a cabo la fragmentación y etiquetado con oligonucleótidos sintéticos del ADN usando una variante de las enzimas transposasas Tn5 en un proceso conocido como tagmentación (**paso 4** de la **figura 24**). Un último ciclo de PCR prepara la librería de ADN con un código específico para cada muestra. Posteriormente, tras purificar el amplicón con las perlas magnéticas, se mide la concentración del ADN de las librerías con el fluorímetro Qubit (Invitrogen, cat. no. Q32866) o similar, para preparar las muestras a una concentración final de 2 nM.

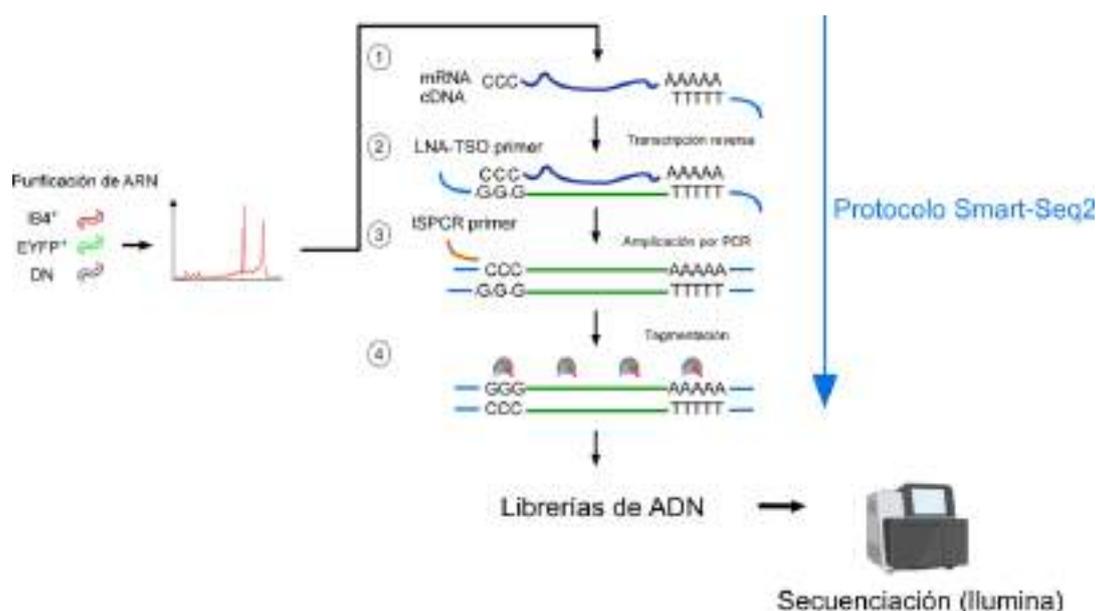


Figura 24. Protocolo de secuenciación de ARN total usando el método de Smart-Seq2. Una vez purificado el ARN total, en este caso de las muestras EYFP+, IB4+ y DN, se comprueba la calidad a través del cálculo del parámetro RIN al observar los picos ribosómicos 18S y 28S. Las muestras se procesaron en el servicio de genómica EMBL GeneCore siguiendo el protocolo Smart-Seq2 y se secuenciaron con la tecnología Illumina. Los números indicados en la figura hacen referencia a los pasos descritos en el párrafo anterior.

3.8. Secuenciación de ARN

El uso de los nuevos métodos de secuenciación de alto rendimiento conocidos como “*High-Throughput Sequencing*” (HTS) o “*Next Generation Sequencing*” (NGS), empezaron a desarrollarse a partir de la década de los años 2000, dejando obsoletos los métodos de determinación directa por pirosecuenciación, como era el método de Sanger, usado ampliamente desde la década de los años 70 (revisado por Heather and Chain, 2016). La secuenciación NGS no se basa en sólo un tipo de tecnología, sino que se han desarrollado diferentes métodos. No obstante, todos requieren de la fragmentación del material genético (ADNc), lo que se conoce como librerías y una pre-amplificación, mediante un proceso de PCR para poder obtener las lecturas secuenciadas del mismo.

En función del tipo de PCR, podemos distinguir entre la amplificación por emulsión, donde la PCR tiene lugar en nanoesferas y es característico de la secuenciación por ligación, desarrollada por SOLiD (del inglés, *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) (**figura 25A**) o la amplificación en puente o “*clusters*” (**figura 25B**). En este último grupo, los fragmentos a secuenciar se colocan en una superficie sólida separada por carriles, que están provistos de secuencias complementarias a los adaptadores de cada fragmento para anclarlos en la plataforma, desarrollada por Solexa (posteriormente Illumina). Recibe el nombre de síntesis de “*clusters*” porque tras la amplificación, los fragmentos idénticos se agrupan conjuntamente a partir de una primera hebra primaria (Leong, Skinner and Love, 2014).

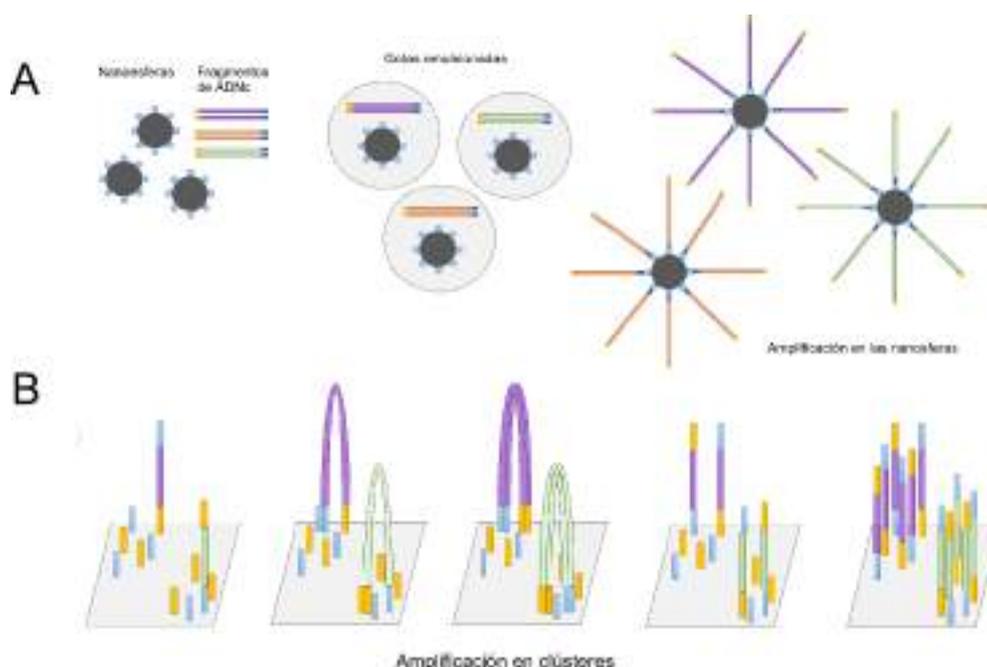


Figura 25. Tipos de amplificación de librerías para la secuenciación de ARN. A) En la secuenciación por emulsión, la PCR se realiza en nanopartículas que están encapsuladas con el ADN en gotas emulsionadas de agua. Tras la emulsión se lleva a cabo la amplificación de tal forma que cada nanoesfera está recubierta por copias del mismo material genético amplificado. B) En la PCR por puente, también denominada por “*cluster*”, los fragmentos de ADN se anclan en una superficie sólida a través de adaptadores complementarios a su secuencia formando un puente. La amplificación por la polimerasa conlleva la síntesis de la cadena complementaria que, tras su desnaturalización, buscará anclarse de nuevo con adaptadores circundantes libres. Tras varios ciclos se obtiene una agrupación de secuencias idénticas en la misma zona de la plataforma. Modificado de Leong et al., 2014.

Además de las técnicas descritas, en los últimos años han aparecido nuevos procedimientos de secuenciación de ARN, consideradas como la tercera generación y que es importante mencionar. SMRT (del inglés, *single molecule real time sequencing*, desarrollada por PacBio), es el método más reciente y permite detectar a tiempo real la secuenciación de un molde de ADN. Su principal ventaja es que puede secuenciar moléculas mucho más largas sin necesidad de fragmentarlas, además de que permite re-secuenciar el material genético creando un molde de ADN circular (ADNc). Esto hace que sea ideal para la generación de genomas *de novo* y secuenciación de genomas de calidad alta con una gran cobertura y resolución.

Los principales métodos descritos constan generalmente de tres fases: la primera es la preparación de una librería de fragmentos de ADN, ya mencionada previamente en la sección anterior, la secuenciación de éstos y por último el análisis de imágenes (verse de nuevo la **sección 1.5.2** de la introducción), ya que la mayoría de los métodos (a excepción de la metodología Ion Torrent no descrita en esta memoria), depende de nucleótidos modificados y sistemas ópticos basados en quimioluminiscencia o fluorescencia para determinar las bases nucleicas secuenciadas.

En este trabajo, se ha realizado la secuenciación masiva por *clúster* utilizando la tecnología Illumina, muy expandida en el uso de trabajos de investigación para los modelos en roedores o en muestras humanas. Las librerías se agruparon y se secuenciaron en varias tandas usando el equipo NextSeq500 (Illumina) bajo la modalidad de 75 bp a una dirección (“*single-end sequencing*”). Los resultados se exportaron en formato Fastaq.

3.9. Imagen de calcio intracelular mediante fluorescencia

La caracterización funcional de neuronas de DRG se realizó monitorizando los cambios en la concentración del calcio intracelular (Ca^{2+}) con el uso del indicador de calcio fluorescente Fura-2-acetoximetil éster (Fura-2AM; Invitrogen™F1221). Las características fisicoquímicas del Fura-2AM permiten que, tras su incubación con células, éste atraviese la membrana plasmática hacia el citoplasma celular. Además, las esterasas citosólicas inespecíficas hidrolizan el grupo éster

AM, haciendo que el Fura-2 se acumule dentro del citosol y se una al calcio libre en dicho compartimento. Fura-2 es una molécula fluorescente cuyo pico de excitación cambia en función de su unión al calcio (Grynkiewicz, Poenie and Tsien, 1985). El Fura-2 tiene dos picos de excitación, uno a la longitud de onda de 362 nm, cuando la sonda no está unida al calcio y otro pico alrededor de 335 nm cuando se une al calcio (**figura 26**); sin embargo, el espectro de emisión del Fura-2 libre o unido a calcio no varía. Si excitamos la sonda a dos longitudes de onda diferentes 340nm y 380nm, podemos calcular la razón de la intensidad de fluorescencia emitida a esas dos longitudes de onda (F_{340}/F_{380}), lo que es directamente proporcional a la concentración del calcio libre intracelular.

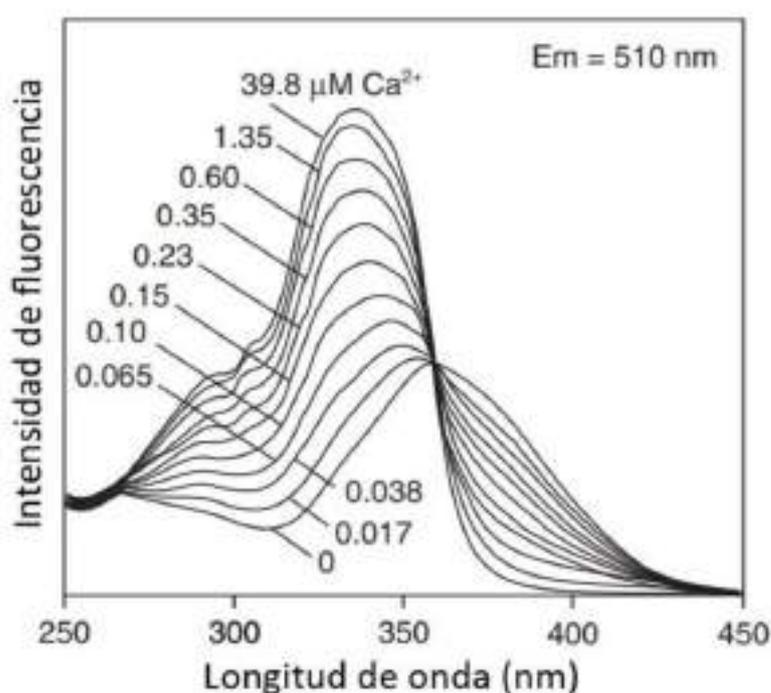


Figura 26. Espectro de excitación de la molécula Fura-2 en diferentes soluciones con concentraciones de calcio libre que van de 0 a 39.8 μM . Modificado de las especificaciones de producto del Fura-2AM (Invitrogen™ REF. F1221).

Los registros de imagen de calcio se realizaron a partir de 12 horas en cultivo, incubando las células con Fura-2AM a una concentración de 5 μM , junto con 0.04 % de ácido plurónico (Invitrogen™P6867) durante 45 min a 37 °C en la solución extracelular (**tabla 2** en la **sección 3.12**). Las células se transfirieron a una camarita de registro en un microscopio de epifluorescencia invertido (Leica DMI 3000B) y se visualizaron con un objetivo de inmersión en agua 20x. El Fura-2 se excitó de forma alterna a las longitudes de onda 340 y 380 nm, usando una rueda de filtros

(Lambda 10-2) y una lámpara de xenón LAMBDA LS (Sutter Instruments). La fluorescencia emitida se filtró con un filtro de paso de banda de longitud de onda larga de 510 nm, la cual se detectó con una cámara Orca ER CCD camera (Hamamatsu Photonics K.K). Las imágenes se adquirieron cada 3 seg y la razón de las dos longitudes de onda F340/F380, se monitorizó a tiempo real con el programa Metafluor (Molecular Devices). Previamente a cada experimento, se adquirieron además imágenes del campo con luz transmitida y de la fluorescencia emitida al excitar con las longitudes de onda 460nm y 568nm (100 ms de exposición), para identificar las poblaciones de neuronas EYFP+ e IB4+, respectivamente.

La temperatura de la solución se mantuvo a 33 ± 1 °C mediante un sistema Peltier refrigerado por agua y controlado por un dispositivo de retroalimentación conectado a un digitalizador (Digidata 1322A AD converter; Molecular Devices), usando una termo-prueba (Physytemp modelo BAT-12) situada en la cámara de registro. En los experimentos presentados en este trabajo, hemos realizado dos estímulos térmicos que consistieron en la aplicación de una rampa de frío de 50-80 s de duración, hasta alcanzar aproximadamente los 12 °C (~ 0.5 °C/s); los registros cuya temperatura no alcanzó al menos 14.5 °C se descartaron.

La estimulación con los diferentes agonistas se realizó con un sistema de perfusión por gravedad mediante llaves de 3 vías, sin interrumpir el flujo. Los compuestos se prepararon el mismo día, en soluciones stock conservadas a -20 °C. Para determinar la viabilidad de las neuronas, se aplicó un pulso de 30 mM KCl al final de cada registro. En la **sección 3.12** de este apartado se detallan los reactivos y las soluciones utilizadas.

3.10. Hibridación in situ RNAscope

El sistema RNAscope® es una tecnología puntera de hibridación *in situ* basada en el diseño de sondas patentadas y comercializada por la compañía *Advanced Cell Diagnostics* (ACD). Se basa en un nuevo diseño de sondas “ZZ” en combinación con un sistema de amplificación de la señal que elimina ruido inespecífico en la imagen, a la vez que aumenta la sensibilidad (**figura 27**); en condiciones óptimas es posible visualizar y cuantificar moléculas únicas de ARN como puntos fluorescentes o “dots” (Wang *et al.*, 2012).

Otra de las ventajas de esta nueva técnica es que las sondas pueden hibridar en torno a 1000 pb del ARN, lo que aumenta la cobertura del gen de interés que se traduce en mayor especificidad. En nuestro caso hemos utilizado el kit RNAscope Fluorescent Multiplex (ACD) que permite detectar hasta tres sondas fluorescentes en la misma muestra.

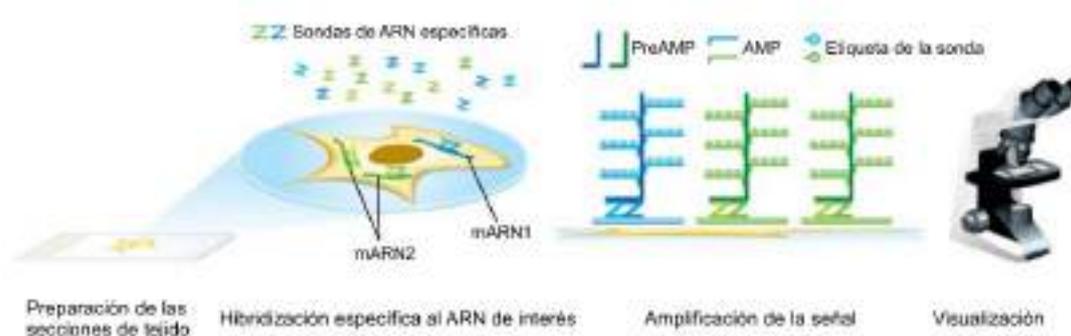


Figura 27. Protocolo usado para la técnica de hibridación in situ fluorescente. La técnica de RNAscope incorpora cuatro pasos de amplificación para aumentar la señal fluorescente y mejorar su cuantificación. Modificado de Wang et al., 2012.

Después de su extracción, los ganglios raquídeos y trigéminos de ratones adultos de ambos sexos se empaparon en OCT (*Optimal Cutting Temperature*) y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. La hibridación del tejido se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (ACD). En esta Tesis se ha usado la tecnología RNAscope en tres bloques de experimentos diferentes. A continuación, se detalla brevemente los pasos comunes del protocolo realizados y posteriormente se indica las variantes de cada uno de los bloques experimentales:

Las rodajas de tejido fresco se obtuvieron con un criostato (las especificaciones comerciales se indican posteriormente según el bloque experimental) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobre el portaobjetos. Tras un lavado rápido con tampón fosfato salino (PBS), las secciones se deshidrataron progresivamente a temperatura ambiente con etanol al 50 %, 70 % y 100 % durante 5 min para cada grado de alcohol. Posteriormente, se delimitó el tejido usando un rotulador hidrofóbico con el fin de utilizar el menor volumen posible de reactivos y se dejaron secar las muestras. A continuación, las muestras se incubaron con proteasa IV, procedente del kit ACD, durante 15-20 min a temperatura ambiente para permitir la permeabilización del tejido. Tras 4 lavados con PBS, se llevó a cabo la hibridación de las sondas con el ARN de los genes de interés que se detallan en la **sección 3.12 (tabla 3)**. El kit de fluorescencia multiplex permite la hibridación de hasta tres sondas simultáneas en un mismo tejido cada una optimizada en un canal diferente (C1, C2 o C3). Las sondas C2 y C3 que se encuentran concentradas en un stock 50X, se diluyen en la sonda C1, ya preparada para usarse directamente en el tejido. En nuestro caso, realizamos el estudio para una sonda o una combinación de 3 sondas utilizando pipeteando 1 volumen de las sondas C2 y C3 y 50 volúmenes de la sonda C1 (o la solución blanca "Probe Diluent", del kit ACD en el caso de no utilizar la sonda C1).

La mezcla se añadió sobre la superficie delimitada en las rodajas y se incubaron en un horno durante 2 horas a 40 °C. Después de la hibridación, se realizaron dos lavados con el tampón de lavado procedente del kit a concentración 1X (“*Wash Buffer Reagent*”) y se amplificó la señal de hibridación usando los reactivos Amp FL en una serie sucesiva de incubaciones a 40 °C (30 min para los reactivos Amp 1 y 3, y 15°C para Amp 2 y 4). Entre cada incubación se realizaron dos lavados con el tampón del kit. El reactivo Amp 4 contiene los fluoróforos Alexa 488, Atto 555 o Atto 647 que se unirán al sistema de amplificación para excitar en las longitudes de onda correspondientes y usadas habitualmente en los microscopios de fluorescencia confocal. Cada sonda es detectada mediante un fluoróforo diferente asociado a cada uno de los canales mencionados anteriormente (C1, C2 y C3). Dependiendo del reactivo Amp 4 usado, podemos modificar el orden de los fluoróforos para cada canal. En nuestro caso, el gen *Trpm8* siempre se dispuso en la longitud de onda correspondiente al rojo lejano (Atto 647).

Finalmente, las secciones se tiñeron con DAPI procedente también del kit, durante 15-30 seg a temperatura ambiente y se procedió al montaje con medio fluorescente (las especificaciones comerciales se indican en los párrafos siguientes según el bloque experimental). Los cortes montados se protegieron de la exposición a la luz y se almacenaron a 4 °C hasta su visualización en un microscopio confocal.

1. Para la validación de la expresión de diferentes genes en las distintas poblaciones de neuronas sensoriales (referente a la **sección 4.3.2.** de los resultados). Se usaron sondas para los siguientes genes: *Pnoc*, *Trpv1*, *Ntrk2*, *Foxp2*, *Calca*, *Kcnk9*, *Gfra3*, *Nefh*, *Asic1*, *Htr3a*, *P2ry1*, *Cacna1h*, *Cplx1*, *Tac1*, *Gal*, *Asic3*, *Oprm1*, *Kcnk2*, *Th*, *Cacna2d1*, *Scn11a*, *Scn8a*, *Trpa1*, *Piezo2*, *Kcnn2* y *Wfcd2*, en una modalidad de triple combinación donde en todas ellas se usó la sonda *Trpm8*. Las especificaciones comerciales de cada sonda se indican en la **tabla 3** de la **sección 3.12** de este apartado. Este primer bloque de experimentos se realizó en rodajas de DRGs de animales silvestres (C57BL/6JRj), durante mi estancia de investigación en el Instituto Karolinska (Suecia) y bajo la supervisión del Dr. Patrik Ernfors. Los DRG, separados en cervicales, torácicos y lumbares, se cortaron en secciones de 10 µm de grosor usando el criostato (CryoStar™ NX70, Thermo Fisher Scientific) para posteriormente preservarlas a -80 °C hasta el momento de su utilización. Las secciones se incubaron en el horno HybEZ (ACD) y se montaron en cubres usando el medio de montaje fluorescente de Dako (Dako Omnis). Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 20x y almacenadas con una reducción óptica del 0.5x usando un microscopio confocal Zeiss (LSM 800 Airyscan).
2. Tras mi estancia formativa, el siguiente objetivo fue poner a punto la técnica RNAscope en el laboratorio y para ello colaboré en un proyecto de mi grupo de investigación realizando

los experimentos para identificar la expresión del canal iónico mecanosensible *Piezo2* en neuronas de los ganglios trigéminos. Los resultados se incluyeron en una publicación de la que soy co-autora (Fernández-Trillo et al., 2020). Mi contribución en este proyecto permitió validar y cuantificar la expresión del canal PIEZO2 en neuronas sensoriales de animales silvestres y *Piezo2^{ckO}*, tal como puede verse en la **figura 28**, obtenida del artículo original. En este caso, se utilizó la sonda Mm-*Piezo2* (ref 400191, ACD) en secciones de los ganglios trigéminos de 20 μm de grosor usando un criostato (MNT, SLEE Medical). Las secciones se incubaron en un horno de calor (EN400, Nüve) y se montaron en cubres usando el medio de montaje fluorescente Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de 20x usando un microscopio confocal Olympus (FV1200 IX81) y el software FV10-ASW.

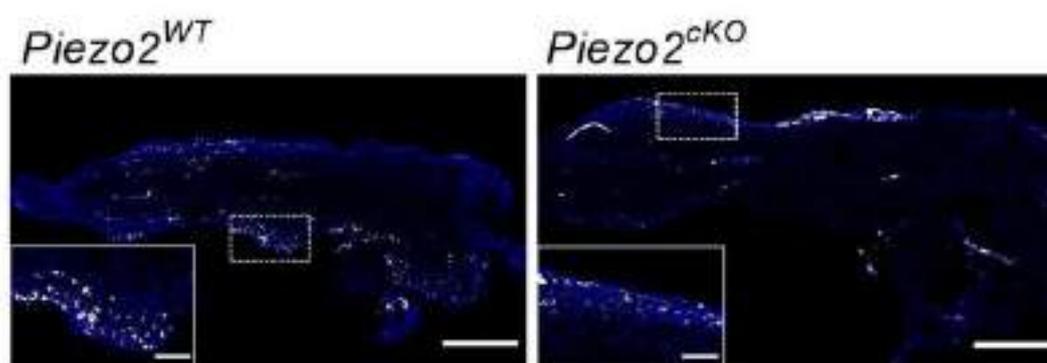


Figura 28. Imágenes representativas de secciones de los ganglios trigéminos procedentes de ratones silvestres de la misma camada (“littermates”, *Piezo2*^{WT}) y animales deficientes para el canal iónico *Piezo2* (*Piezo2^{ckO}*). La señal en blanco corresponde a la sonda para el gen *Piezo2* y en azul la tinción de DAPI. Barra de escala 500 μm . Las inserciones muestran los detalles de las regiones enmarcadas en los recuadros punteados. Barra de escala 100 μm . De Fernández-Trillo et al., 2020.

3. La puesta a punto de la tecnología RNAscope me permitió posteriormente validar la especificidad del marcaje EYFP en las neuronas sensoriales del ratón transgénico TRPM8^{BAC}EYFP, herramienta fundamental en mi Tesis Doctoral, así como la validación de la expresión de otros genes de interés (verse las **secciones 4.2.1.** y **4.3.3.** de los resultados). En estos experimentos, los ganglios DRG no se separaron por nivel de inervación (cervical, torácico y lumbar) y el grosor de las rodajas fue de 20 μm usando un criostato MNT (SLEE Medical), se incubaron con el horno EN400 (Nüve) y su montaje con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Las imágenes se adquirieron en la configuración “Z-stack”, en planos de

1 μm con un objetivo de inmersión en aceite de 25x usando un microscopio confocal Zeiss (LSM 880 Airyscan) y el software ZEN.

Para el análisis de co-localización de los bloques de experimentos **1** y **3**, se seleccionaron campos de microscopía con señal fluorescente para la sonda *Trpm8* (**sección 4.3.2.**) o *Egfp* (**secciones 4.2.1.** y **4.3.3.**), respectivamente. La elección de los campos fue aleatoria para los demás genes a estudiar.

3.11. Inmunohistoquímica

Los ganglios DRGs se fijaron, inmediatamente después de su extracción, en PFA al 4 % durante 2 h a 4 °C. A continuación, se criopreservaron durante 12 h en una solución de sacarosa al 30 % y, tras lavarse con PBS, se embebieron en OCT para congelarlos a -80 °C.

Las rodajas del tejido se cortaron con un criostato MNT (SLEE Medical) a un grosor de 20 μm y se secaron en un horno (EN400, Nüve) a 37 °C durante 30 min. Tras realizar 2 lavados de 10 min cada uno con PB (tampón fosfato 0.1M; 190 ml de fosfato monosódico 0.1M y 810 ml de fosfato bisódico 0.1M), las rodajas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % y Triton-X100 al 0.5 % en una solución con Ca^{2+} para fortalecer la unión de la lectina (solución extracelular, ver la **tabla 2** de la **sección 3.12**). A continuación, se incubaron durante la noche a 4 °C con solución de bloqueo incorporando los anticuerpos primarios anti-GFP y anti-TUJ1 (β -tubulina III) a las concentraciones 1:2000 y 1:1000 respectivamente (**tabla 4** de la **sección 3.12**).

Finalmente, se lavaron las secciones 4 veces durante 15 min por lavado con solución PB y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-chicken Alexa 488 y anti-mouse Alexa 647 junto con la isolectina GS-IB4 Alexa Fluor™ 568, a las concentraciones 1:800, 1:1000 y 1:1000, respectivamente, en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras otra serie de lavados con PB, las secciones se tiñeron con 0.5 $\mu\text{l/ml}$ de Hoechst 33342 (**tabla 4** de la **sección 3.12**) y se montaron con el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Todos los lavados se realizaron en agitación continua y a temperatura ambiente salvo los pasos indicados. A partir de la incubación con los anticuerpos secundarios, los cortes se protegieron de la exposición a la luz.

Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal vertical Leica SPEII, con un objetivo 20x y el software LasX con módulo Navigator en modalidad “Z-stack” y mosaico.

3.12. Reactivos y compuestos

En las siguientes tablas se indican los reactivos, sondas, anticuerpos, compuestos y soluciones utilizados:

Tabla 2: Composición de la solución extracelular

Solución extracelular	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	3
CaCl ₂	2.4
MgCl ₂	1.3
HEPES	10
Glucosa	10
pH 7.4	
Osmolaridad \approx 290mOsm/kg	

Tabla 3: Reactivos utilizados para RNAscope® ISH

Reactivos	Distribuidor	Identificador
RNAscope Fluorescent Multiplex Reagent Kit v2	ACD	Cat#320850
RNAscope® Probe- Mm-Trpv1	ACD	Cat#313331

RNAscope® Probe- Mm-Car8-C2	ACD	Cat#514171-C2
RNAscope® Probe- Mm-Ntrk2-C3	ACD	Cat#423611-C3
RNAscope® Probe- Mm-Foxp2-C3	ACD	Cat#433211-C3
RNAscope® Probe - Mm-Calca-alltv-C3	ACD	Cat#417961-C3
RNAscope® Probe - Mm-Calca-tv2tv3	ACD	Cat#420361
RNAscope® Probe- Mm-Kcnk9	ACD	Cat#475681
RNAscope® Probe- Mm-Gfra3-C2	ACD	Cat#467191-C2
RNAscope® Probe- Mm-Nefh-C3	ACD	Cat#495131-C3
RNAscope® Probe- Mm-Asic1-E2E3	ACD	Cat#462381
RNAscope® Probe- Mm-Htr3a-C2	ACD	Cat#411141-C2
RNAscope® Probe- Mm-P2ry1-C2	ACD	Cat#406061-C2
RNAscope® Probe- Mm-Cacna1h-C3	ACD	Cat#459751-C3
RNAscope® Probe- Mm-Cplx1-C3	ACD	Cat#482531-C3
RNAscope® Probe- Mm-Gal-C2	ACD	Cat#400961-C2
RNAscope® Probe- Mm-Asic3-O1-C3	ACD	Cat#480541-C3
RNAscope® Probe- Mm-Oprm1	ACD	Cat#315841
RNAscope® Probe- Mm-Kcnk2-C2	ACD	Cat#440421-C2
RNAscope® Probe- Mm-Th-C2	ACD	Cat#317621-C2
RNAscope® Probe- Mm-Cacna2d1	ACD	Cat#417141
RNAscope® Probe- Mm-Scn11a	ACD	Cat#403531

RNAscope® Probe- Mm-Trpa1	ACD	Cat#400211
RNAscope® Probe- Mm-Piezo2-C2	ACD	Cat#400191-C2
RNAscope® Probe- Mm-Kcnn2	ACD	Cat#427971
RNAscope® Probe- Mm-Wfdc2	ACD	Cat#440031
RNAscope® Probe- Mm-Scn10a-C1	ACD	Cat#426011
RNAscope® Probe - EGFP-C2	ACD	Cat#400281-C2
RNAscope® Probe - Mm-Trpm8-TRPM8-C3	ACD	420451-C3
RNAscope® Probe - Mm-Trpm8-TRPM8-C2	ACD	420451-C2

Tabla 4: Anticuerpos primarios y secundarios y marcadores

Anticuerpos y marcadores	Distribuidor	Identificador
anti-TUJ1 (mouse)	Biolegend	801201
anti-GFP (chicken)	Abcam	13970
anti-chicken Alexa 488	Jackson IR	703545155
anti-mouse Alexa 647	Invitrogen	A21237
isolectin GS-IB4 Alexa Fluor™ 568	Invitrogen	I21412
Hoechst 33342	Invitrogen	H1399

Tabla 5: Agentes químicos y reactivos

Agentes químicos	Distribuidor	Identificador	Concentración de trabajo	Concentración "stock"
Mentol	Scharlau	Cat#Me065	100 μ M	300 mM
WS-12	Alomone	Cat#W-105	1 y 10 μ M	20 mM
AITC	Sigma	Cat#377430	100 μ M	100 mM
Capsaicina	Sigma	Cat#M2028	100 nM	100 μ M
Oxaliplatino	TOCRIS	Cat#2623	6 mg/kg	5 mM

3.13. Análisis de los datos

3.13.1. Análisis de imagen de calcio

Las células se seleccionaron manualmente, definiendo la región de interés (ROI, del inglés "*region of interest*") para cada una de ellas usando el programa Metafluor. Posteriormente, los valores de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.) se exportaron a tablas de Excel y se utilizaron algoritmos escritos en lenguaje R personalizados para calcular la amplitud y el porcentaje de respuesta, la temperatura umbral y la latencia de las respuestas ante los estímulos químicos o térmicos (según corresponda).

Para el cálculo de la amplitud de las respuestas a los diferentes estímulos se identifica el valor máximo del cociente de fluorescencia (F340/F380) en el tiempo en que se aplicó el estímulo. A dicho valor se le resta el valor de la fluorescencia basal promedio durante los 30 segundos anteriores a la aplicación del estímulo (ver **figura 29**). Para considerar una respuesta positiva usamos dos criterios, que la amplitud de la respuesta sea mayor de 0.05 y que dicha amplitud debe ser también superior a 4 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal. Las células que no respondieron a ningún estímulo, incluido KCl, se consideraron no viables o no neuronales y se descartaron del análisis.

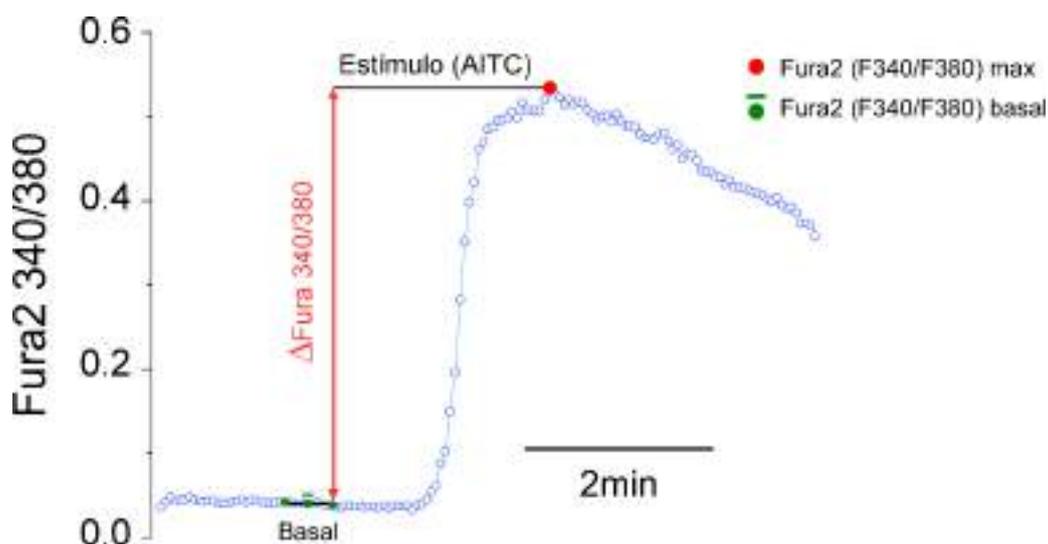


Figura 29. Cálculo de la amplitud de la respuesta para un determinado estímulo. Curso temporal de la respuesta de una neurona a la aplicación de un estímulo, indicado por la barra superior. La flecha roja indica la amplitud de la respuesta entre el máximo valor (punto rojo y la media del valor basal (puntos verdes).

En el análisis de las neuronas sensibles al frío, se calculó el umbral de temperatura a la que la célula responde. Para ello se alinearon los trazos de fluorescencia y de temperatura y se identificó el valor de la temperatura que corresponde al valor de la fluorescencia previo al valor en el cual la fluorescencia es 4 veces mayor de la desviación estándar de su fluorescencia basal (**figura 30 (1)**). En otras palabras, se buscó el valor de temperatura correspondiente al primer punto del F340/F380 previo a cuando éste empieza a incrementarse. El tiempo en alcanzar el valor máximo de la respuesta se consideró como la diferencia de tiempo entre el valor máximo de la ratio de fluorescencia (F340/F380) y el del umbral (**figura 30 (2)**).

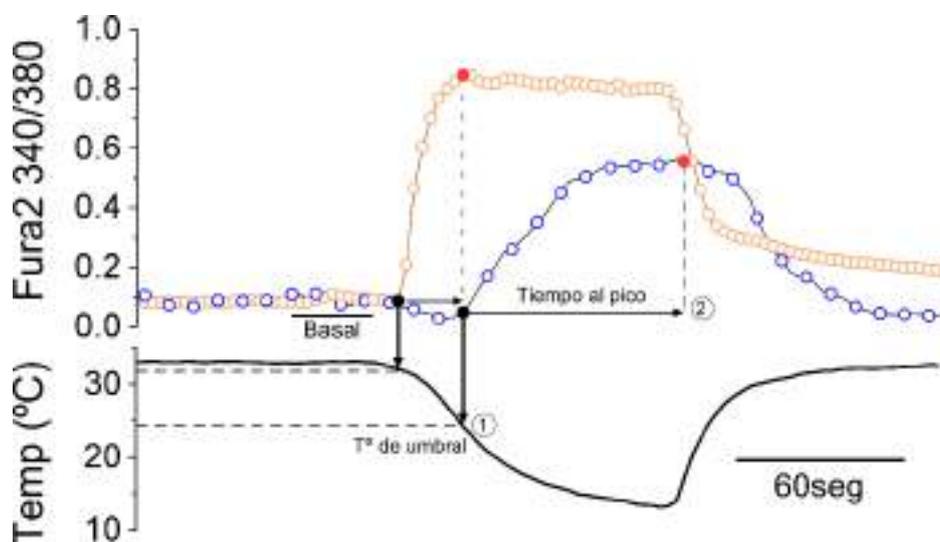


Figura 30. Cálculo del umbral de temperatura y tiempo al pico máximo para el estímulo de frío. En la figura se representan dos neuronas sensibles al frío con un perfil térmico diferente. Para el cálculo de la temperatura umbral se buscó el valor correspondiente de la temperatura donde empieza a incrementarse la fluorescencia respecto a su valor basal (valor previo a superar cuatro veces la desviación estándar del valor basal). El tiempo al pico se calcula como el tiempo que tarda desde dicho valor en alcanzar su máximo del cociente (F340/F380). Los círculos corresponden al valor de fluorescencia adquirido cada 3 seg.

Las respuestas al estímulo conjunto de los compuestos mentol o WS-12 y frío se consideraron como respuestas acumuladas del efecto del frío en presencia de mentol o WS-12. Por tanto, para calcular la amplitud y considerar una respuesta positiva, se identificó el valor máximo del cociente de fluorescencia (F340/F380) durante el tiempo de aplicación de los estímulos del frío y los compuestos (**figura 31 (1)**). El valor basal para este estímulo se considera los 30 segundos previos a la aplicación del mentol o WS12 (**figura 31 (2)**). Para calcular la temperatura umbral en presencia de mentol y frío, dado que existen células que ya respondieron a mentol previamente, se buscó el valor correspondiente en la temperatura en la que la amplitud empieza a incrementarse inmediatamente después de aplicar el estímulo de frío (**figura 31 (3)**). En este caso, el umbral de temperatura es una medida del incremento de la actividad neuronal más bien que un umbral de activación, pero se ha mantenido el mismo término a lo largo de la Tesis.

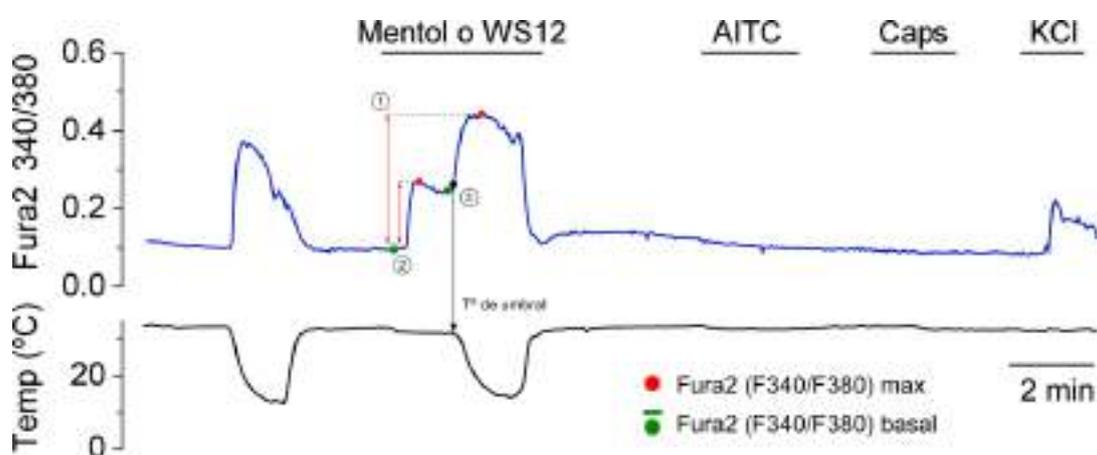


Figura 31. Ejemplo representativo del cálculo de la amplitud de la respuesta para el estímulo de mentol o WS12 y frío. Para el estímulo de mentol/WS-12 + frío, el valor basal se consideró el mismo que para el estímulo de mentol. El umbral de temperatura en este caso se estableció como el valor correspondiente de la temperatura para el cual la fluorescencia (F340/F380) comienza a incrementarse tras la aplicación del frío. La flecha roja indica la amplitud de la respuesta entre el máximo valor (punto rojo (1) y la media del valor basal, punto verde (2)). Para calcular la temperatura umbral para el estímulo de mentol/WS-12 + frío, el punto verde (3) indica el valor correspondiente donde se inicia la aplicación del frío.

3.13.2. Análisis de imagen confocal y epifluorescente

Para cuantificar las imágenes de microscopía confocal y de epifluorescencia obtenidas en los experimentos de ISH (RNAscope), inmunohistoquímica y de la fluorescencia endógena de las neuronas en cultivo registradas en los experimentos de imagen de calcio utilizamos el software de uso libre ImageJ (Fiji, ImageJ version 1.53c). El cálculo de los parámetros de fluorescencia (intensidad media e integrada, área, etc.) se obtuvieron de imágenes en la escala 8-bits (0-256) sin ninguna otra manipulación. En las imágenes que se tomaron en configuración “z-stack” se analizó el resultado de sus proyecciones máximas.

a) *Cuantificación de los puntos fluorescentes en RNAscope*

La cuantificación de ARN como puntos fluorescentes se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor ACD (“Guidelines of RNAscope® Fluorescent Assay Results, SOP 45-006, Technical note”). En esta guía nos indica en líneas generales el procedimiento que se debe realizar, siendo necesario calcular las regiones de interés (ROIs) para cada célula, ROIs para los puntos fluorescentes individuales y la eliminación de la señal de fondo (**figura 32A**). En este trabajo hemos adaptado el procedimiento, el cual se detalla a continuación para los bloques experimentales **1** y **3** mencionados en la **sección 3.10** de este apartado. Para ello, con ayuda del lenguaje IJ1 Macro, se automatizaron los comandos utilizados con ImageJ creando un “script” personalizado. Los pasos se indican en la **figura 32B**. El análisis para el bloque experimental **2**. puede consultarse en la publicación original que se adjunta en el anexo 1 de este manuscrito:

1. El primer paso fue definir las regiones de interés (ROIs) para cada célula. Para ello, se superpuso la fluorescencia del canal DAPI con la señal de fluorescencia de las sondas de los tres genes a estudiar. Partiendo de la imagen superpuesta de las sondas utilizadas, se ajustó el contraste hasta definir el perímetro de las células individuales por sobresaturación (**número 1** de la **figura 32B**).
2. Seguidamente, se creó una imagen binaria (máscara) y se delimitaron los límites de cada región celular usando la función “watershed” del ImageJ. Las regiones se revisaron manualmente y se corrigieron en el caso de no definir correctamente las células (**número 2** de la **figura 32B**). Además, se eliminaron las células que, por tamaño ($100 \mu\text{m}^2$), no expresan ninguna de las sondas y sólo detectan la señal nuclear por DAPI.
3. A partir de la señal de fluorescencia de cada sonda se crea una máscara, es decir, se delimitan las ROIs para los puntos fluorescentes individuales en cada canal de fluorescencia (**número 3** de la **figura 32B**).

Consideramos señal de ruido cuando la intensidad es menor del 25 % del máximo de intensidad. Para substraer dicha señal a la de fluorescencia, establecemos el valor mínimo de fluorescencia por encima de este valor en el rango de intensidades del histograma a escala 256 píxeles (imágenes a 8 bits). Una vez restada la señal de ruido de las imágenes, se calcula también la intensidad media de las áreas de la imagen que están fuera de los ROIs para los puntos fluorescentes (Intensidad media del fondo)

4. Usando las regiones creadas en el paso 2, se calculó la intensidad media e integrada (**número 4** de la **figura 32B** panel izquierdo) y el área para los puntos fluorescentes (**número 4** de la **figura 32B**, panel derecho) de las células para cada sonda independiente en las imágenes no procesadas a escala 8-bits
5. Para cada región celular (ROIs creadas en el punto 2), hemos contado el número de “puntos” individuales usando la máscara calculada en el punto (ROIs creadas en el punto 3, (**número 4** de la **figura 32B**, panel derecho).

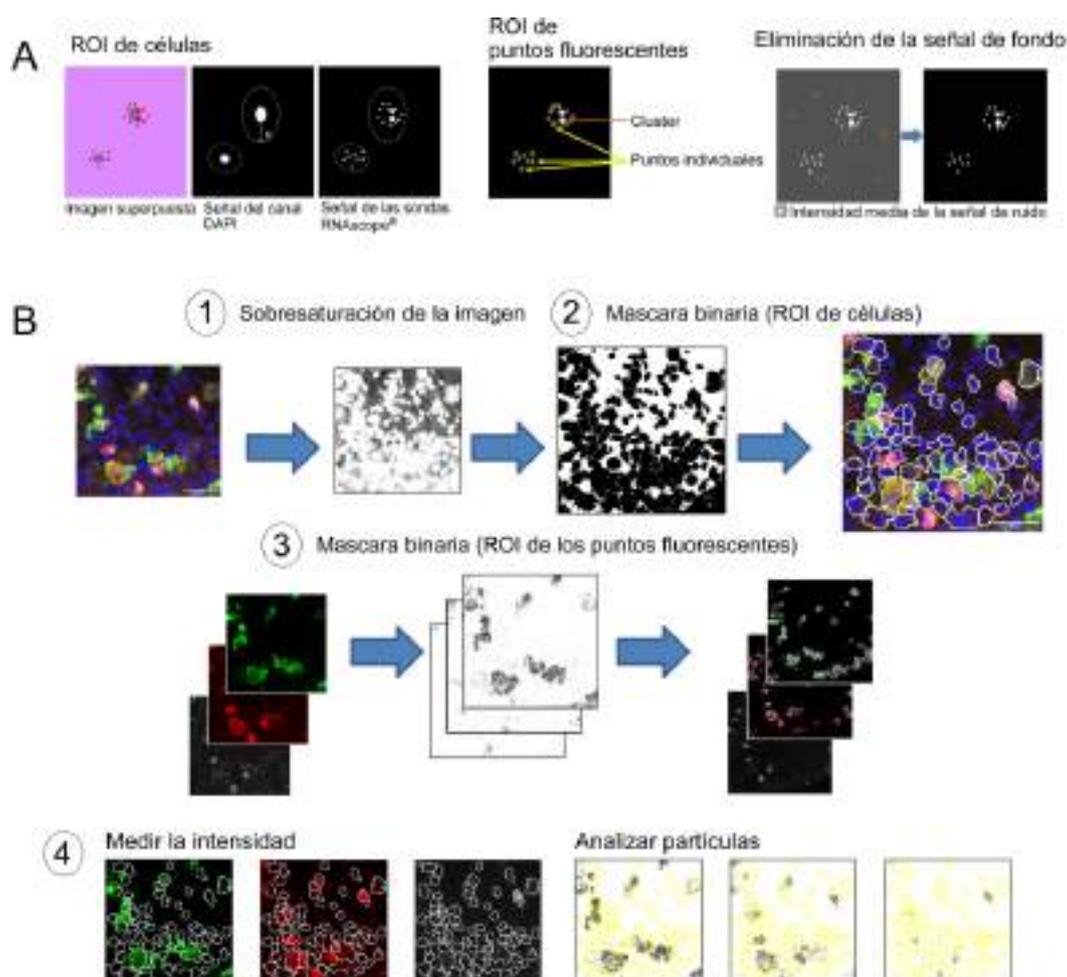


Figura 32. Protocolo de análisis para las imágenes obtenidas por RNAscope. A) Imágenes representativas para la creación de las regiones de interés y de los puntos fluorescentes individuales y la eliminación de la señal de fondo. Modificado de la guía para el análisis de imagen de la casa comercial ACD, SOP 45-006. B) Esquema adaptado que muestra el flujo de trabajo utilizado para cuantificar las imágenes adquiridas tras la hibridación in situ (RNAscope). Los pasos 1, 2, 3 y 4 mencionados en el texto están indicados en la figura.

6. El número corregido de “puntos” reales por célula (número total de puntos en la región de interés), se calcula primeramente con la intensidad media de todos los puntos fluorescentes seleccionados, utilizando la siguiente ecuación:

Intensidad media por punto individual =

$$\frac{\sum \text{Intensidad integrada de los puntos seleccionados} - \text{Intensidad media del fondo} \times \sum \text{Area de los puntos seleccionados}}{\text{Número de puntos seleccionados}}$$

Las variables para calcular la ecuación (intensidad media, área, número de los puntos fluorescentes e intensidad media del fondo) se obtienen de las ROIs creadas en el punto 3.

7. Una vez calculada la intensidad media por punto individual se puede estimar un valor promedio de los puntos fluorescentes que tenemos en cada región celular (ROI delimitada en el punto 2), usando la ecuación que se indica a continuación. Esta corrección se usa para evitar el error que pueda generar las imágenes con agrupaciones de puntos o “clústeres” (figura 32A, imagen central) donde no se puede distinguir puntos fluorescentes individuales.

Numero total de puntos en la región de interés =

$$\frac{\text{Intensidad total en la región de interés} - \text{Intensidad media del fondo} \times \text{Area total}}{\text{Intensidad media por punto individual}}$$

El número total de puntos obtenidos se normalizó por el área de cada célula (puntos fluorescentes / célula). A su vez, se normalizó por el valor máximo de intensidad de fluorescencia para cada canal, expresándose en forma de porcentaje para cada canal fluorescente (sonda hibridada). Cuando encontramos mucha dispersión de los datos, es decir, cuando existe una gran diferencia entre el valor máximo y el siguiente valor más alto y sin ser producto de señal inespecífica o artefacto, normalizamos los valores de fluorescencia por la media de los tres valores máximos de cada imagen.

En los experimentos donde separamos los DRGs en ganglios cervicales, torácicos y lumbares (bloque 1, sección 3.10), se analizaron al menos dos imágenes por cada nivel anatómico, de al menos dos animales para cada triple combinación de sondas.

En el bloque experimental **3 (sección 3.10)**, donde no se separaron los ganglios según su nivel anatómico, se analizaron al menos 2 imágenes de un mínimo de dos animales para cada combinación estudiada (EYFP-TRPM8-*Scn10a* y EYFP-TRPM8-*Calca*). De forma similar, se analizaron el mismo número de imágenes para el estudio en los ganglios TG.

b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia amplificada por pruebas de inmunohistoquímica

Para la cuantificación de la co-expresión de la fluorescencia de la GFP, amplificada por el anticuerpo Alexa 488 y de la isolectina B4 Alexa Fluor™ 568, se fotografiaron secciones de los ganglios raquídeos con la ayuda de mosaicos de microscopía. Todas las imágenes se tomaron con los mismos parámetros de adquisición para cada canal de fluorescencia.

Las regiones celulares de interés se establecieron usando sólo la señal de la β -tubulina III con un protocolo similar al descrito en el apartado anterior. En este caso, se crearon las regiones celulares a través de una imagen binaria (máscara) aumentando el brillo y el contraste en la señal hasta delimitar potencialmente la región de cada neurona. Se midió la intensidad media y el área para cada región celular en cada uno de los canales originales y se normalizó por el valor máximo de fluorescencia para cada animal.

c) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia endógena en microscopía de epifluorescencia

Las imágenes de epifluorescencia obtenidas antes de comenzar los registros de imagen de calcio se analizaron para estudiar la intensidad de la fluorescencia endógena y la co-localización de las neuronas TRPM8+ (señal de fluorescencia para la proteína EYFP) con aquellas IB4+. La región celular se estableció en este caso manualmente, usando de guía la luz transmitida tomada del mismo campo. Se obtuvo la intensidad de fluorescencia media y el área para cada célula. La señal de fluorescencia procedente de EYFP se normalizó al valor máximo. En el caso de la señal IB4 Alexa Fluor™ 568, la normalización se realizó por el valor máximo de cada campo, para evitar la variabilidad en la fluorescencia que pueda presentarse en cada cristal, dado el que se incorpora un nuevo volumen de la lectina en cada experimento.

d) Análisis de las imágenes y cuantificación de células positivas

Una célula se consideró positiva cuando, al representar la función gaussiana de la señal de fluorescencia para todas las células analizadas (intensidad media o puntos fluorescentes normalizados según si los experimentos se realizaron por técnicas IHQ o ISH), su valor superaba dos veces la desviación estándar del valor inmediatamente del pico inferior.

Por tanto, en la cuantificación de la fluorescencia endógena para DRGs de ratones de la línea TRPM8^{BAC}EYFP (referente a la **sección 4.1.1.** de resultados), se consideraron neuronas EYFP+ si superaban el 2 % del valor máximo, dado que prácticamente no visualizamos señal de fondo (**figura 33A**, gráfico izquierdo). Para los datos de IHQ, este valor se estableció en >25 % (**figura 33A**, gráfico central) y en para los experimentos de ISH el límite fue una intensidad >30 % (**figura 33A**, gráfico derecho). El uso de la línea transgénica TRPM8^{BAC}EYFP nos permite distinguir además entre las neuronas con fluorescencia alta (IF) o baja (WF). Para determinar el punto de corte que define a las neuronas IF-EYFP+, se estableció el mismo criterio para el segundo pico una vez consideradas la población fluorescente EYFP+ (verse **figura 33B**). El valor de corte se estableció en 40 % para las imágenes de epifluorescencia y un valor > 45 % y > 60 % en los experimentos de IHQ e ISH, respectivamente. Todas las células con valores inferiores a estos porcentajes se consideraron de baja intensidad (WF).

En la sección **4.2.1.** y **4.3.3.** de resultados se realizaron cortes de ganglios TG. En este caso, el valor de intensidad mínimo para considerar una célula IF en los experimentos realizados en ISH se determinó en un 70 % en vez del 60 %, y 55 % en vez de 30% para considerarla EYFP+. Además, se verificó que la elección de estos valores de corte implicaba una proporción similar entre neuronas EYFP+ de alta y baja intensidad dentro de un mismo tejido.

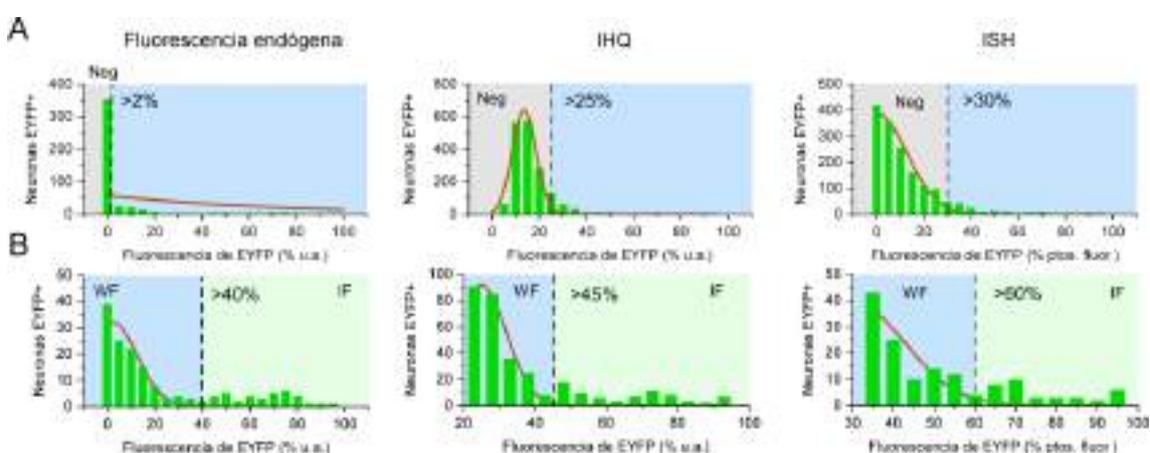


Figura 33. Distribución de las neuronas de los ganglios raquídeos de la línea TRPM8^{BAC}EYFP en función de la fluorescencia endógena de EYFP expresado en forma de porcentaje. A) Distribución del punto de corte para considerar una neurona EYFP+ de DRG en función de su intensidad de fluorescencia (panel izquierdo y del medio) o de los puntos fluorescentes por célula (expresión de EYFP, panel derecho) para las imágenes obtenidas por epifluorescencia (señal endógena), inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación *in situ* (ISH) respectivamente. B) Misma representación, ilustrando el corte para considerar una neurona IF-EYFP+ dentro de la población EYFP+.

Para estudiar la co-localización de varios marcadores en neuronas EYFP+, se estableció un valor de corte >25 % para las sondas *Scn10a* y *Calca*, >10 % para *Trpm8* en los experimentos de ISH que se realizaron en nuestro laboratorio siguiendo el mismo criterio mencionado en el párrafo anterior (**sección 3.10.**, bloque experimental **3.** para los experimentos de RNAscope y referente a la **sección 4.3.3.** de resultados). En los experimentos que se realizaron durante mi estancia en Suecia (bloque experimental **1.**, **sección 4.3.2.** de los resultados), el valor de corte se estableció en > 60 %, para la sonda *Trpm8* y todos los marcadores para los que se estudiaron su co-expresión, ya que obtuvimos una señal más intensa del fondo. Establecimos estas diferencias porque los experimentos se realizaron en diferentes condiciones experimentales (incluyendo la configuración “Z-stack” realizada sólo en el bloque experimental **3.**, **sección 3.10.**).

Para el marcaje con IB4+, el valor mínimo para considerar a una célula positiva se estableció en > 30 % para los experimentos de epifluorescencia y > 40 % en IHQ.

3.13.3. Análisis bioinformático de la secuenciación de ARN “en bloque”

Una vez secuenciadas las muestras y previo a realizar el alineamiento de secuencias, se verificaron los archivos de control de calidad de FastQC para cada muestra y se eliminaron las secuencias correspondientes a los adaptadores Illumina usando el programa Trimmomatic (versión 0.36). Las secuencias se alinearon al genoma de referencia *Mus musculus* Ensembl 97 (GRCm38) usando el programa STAR (versión 2.5.2b) y el conteo de los genes ensamblados se llevó a cabo con el programa HT-SEQ (versión 0.6.1p1, *mode union*). Las secuencias también se alinearon a la secuencia *Eyfp* como control de calidad y pureza de las muestras usando Bowtie (versión 2.3.4.1). Los análisis posteriores se llevaron a cabo a través de “*scripts*” en base al lenguaje de programación R (punto **1** de la **figura 34**).

Para la visualización de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN, se usó la unidad de expresión TMM (trimmed mean of M values) como método de normalización de los conteos de muestras con distribuciones diferentes. Se usó la función *ComBat()* del paquete *sva()* y así reducir el ruido técnico entre las muestras. Los transcritos por millón (TPM) se calcularon de los conteos normalizados usando la siguiente fórmula (Li *et al.*, 2012):

$$RPKM_i = \frac{X_i}{\left(\frac{\tilde{l}}{10^3}\right)\left(\frac{N}{10^6}\right)} = \frac{X_i}{\tilde{l} N} \cdot 10^9$$

$$TPM_i = \left(\frac{RPKM_i}{\sum_j RPKM_i}\right) \cdot 10^6$$

Donde X_i se refiere a los conteos o número de lecturas mapeadas, \tilde{l} , la longitud del gen y N , el número de fragmentos secuenciados.

Antes de realizar el cálculo de la expresión diferencial, se filtraron los genes de baja expresión; aquellos que tenían un valor de CPM (unidad de expresión de conteo por millón) inferior a 2 en al menos tres muestras aleatorias se descartaron. Los genes diferencialmente expresados (*DE*) en las poblaciones EYFP+, IB4+ y la DN (análisis de expresión en condición control), fueron identificados a través de una comparación por pares entre las poblaciones neuronales usando el paquete estadístico EdgeR (Robinson, McCarthy and Smyth, 2009) e incluyendo como co-variable el “efecto de tanda” en el diseño del experimento y en los pasos de los análisis sucesivos. Nótese que para el análisis de expresión diferencial no se utilizó la corrección de la función *ComBat()*, ya que el algoritmo genera la transformación logarítmica de los conteos. Dado que se aconseja usar los datos originales sin normalizar, el efecto de tanda se corrigió incorporándose como una co-variable más en la matriz del diseño experimental.

Los genes se determinaron como diferencialmente sobreexpresados, al comparar dos poblaciones, si el valor de la expresión relativa expresado en escala logarítmica es dos veces mayor ($\text{Log}_2FC > 1$) y con un valor p estadístico ajustado menor del 5% ($FDR < 0.05$, *False Discovery Rate*), ajustado por el método de Benjamini-Hochberg. Los genes diferencialmente expresados (*DE*) en una población con respecto las otras dos se consideraron exclusivos para esa población (punto 2 de la **figura 34**).

En la **sección 4.4.5** de los resultados, quisimos comparar si los genes *DE* entre las poblaciones estudiadas cambian en la condición tratada con el compuesto oxaliplatino. Para ello, realizamos el mismo análisis que acabamos de explicar para las muestras tratadas. Los parámetros y los criterios fueron los mismos que para la condición control.

Para identificar los genes diferencialmente expresados en animales tratados con oxaliplatino en cada población sólo se consideraron las tandas de animales donde se obtuvieron muestras en condición control y tratadas (referente a la **sección 4.4.4** de los resultados). Los genes *DE* también se identificaron usando el paquete EdgeR de manera similar a la descrita previamente, aunque con algunas variaciones: la normalización RUV se llevó a cabo usando la función *RUVg()* del

paquete RUV seq (Risso *et al.*, 2014) para incluir el factor de variación no deseado en la distribución negativa binomial GLM del test EdgeR. Para ello, se buscan los genes negativos o “housekeeping” con los que normalizar los datos. Tal y como aconsejan en el protocolo del paquete estadístico, se consideraron los 5000 primeros genes con menor variación según los resultados de un primer análisis diferencial usando EdgeR. Los genes se consideraron como diferencialmente expresados si el valor de la expresión relativa fue dos veces mayor o menor con un $|Log2FC| > 1$ y con un p -valor estadístico ajustado (FDR) menor del 5 % tras el tratamiento con el oxaliplatino (punto 3 de la figura 34).

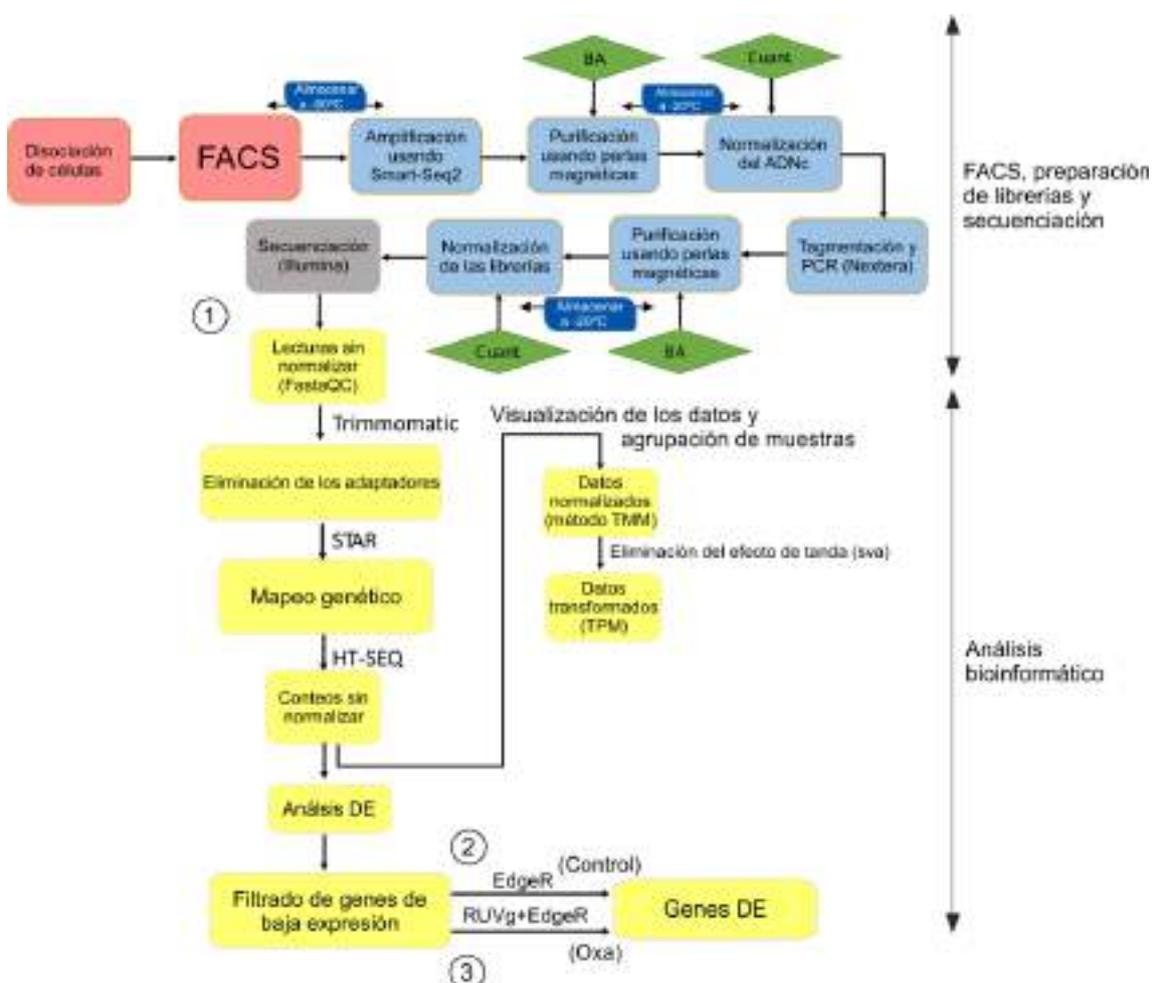


Figura 34. Flujo de trabajo utilizado en la generación de los datos por secuenciación de ARN. Los pasos de disociación celular y separación utilizando la técnica FACS están indicados en rojo y se han descrito previamente en la **sección 3.5** de este apartado. Los pasos de amplificación molecular y la generación de librerías, realizados en el servicio EMBL GeneCore en Heidelberg, Alemania, se indican en azul (referente a las secciones **3.7** y **3.8**). En verde se señalan los controles de calidad que se realizaron en el proceso, donde se cuantificó el parámetro del RIN o la concentración de ARN o ADNc por el sistema Bioanalyzer y Qubit (descrito en las **secciones 3.6** y **3.7**). Después de la secuenciación (panel gris), el análisis bioinformático está indicado en los paneles amarillos donde se incluye la eliminación de las secuencias de adaptadores, alineamiento y la obtención de la matriz de conteo; el análisis de expresión diferencial se realizó

usando el paquete EdgeR. En el caso del estudio de las alteraciones genéticas producidas por el oxaliplatino, los conteos se normalizaron usando como control negativo genes “housekeeping” obtenidos a través del paquete RUVg. Para visualizar y agrupar las muestras, los datos se expresaron en TPM (transcriptos por millón) y se ha corregido el efecto de tanda. Abreviaciones: BA, Bioanalyzer, Cuant, Cuantificación (Qubit).

Los análisis de ontología de genes (GO, términos BP, “*Biological process*”) se realizaron usando por un lado la herramienta online Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>), para obtener el valor de significancia expresado como el logaritmo negativo del p -valor ($-\log(p \text{ value})$) (sección 4.2.3. de los resultados) y por otro, el programa de Cytoscape v3.8.1 (Shannon *et al.*, 2003), una herramienta para la visualización de grafos usada para la identificación de funciones específicas de una u otra subpoblación a través del “plug-in” ClueGO v2.5.8 (Bindea *et al.*, 2009) (sección 4.4.4 de los resultados). En este último caso, se representaron los términos con mayor valor de significancia encontrados en cada grupo ontológico definido por el software.

Además, en esta misma sección, se representó la interacción genética de los términos GO y la Enciclopedia de Kyoto sobre genes y genomas (KEGG), especializada en vías de señalización intracelular. Los datos de entrada consistieron en los genes diferencialmente expresados para la condición de tratamiento con oxaliplatino que además eran comunes o específicos en cada subpoblación. En este caso el análisis se realizó de forma similar al descrito en el párrafo anterior; usamos el programa Cytoscape y el plug-in ClueGO, pero además incluimos el plug-in Cluepedia para identificar los genes que forman parte de cada término ontológico (v1.5.8). Las redes de interacción se representaron con la opción de visualización “localización celular” prevista en el programa (figura 64C-D de la sección 4.4.4).

La figura 64E en la sección 4.4.4 de resultados representa una esquematización de la vía “Neuroactive ligand-receptor interaction”, con el código mmu04080 de la base de datos KEGG (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?mmu04080). Se representaron sólo los receptores o ligandos donde se encontraron genes alterados tras la condición por oxaliplatino. Para ello, los genes DE ($|Log_2FC| > 1$ y $FDR < 0.05$) y su expresión relativa se cotejaron con la vía mencionada (mmu04080) a través de la función *pathview()* del paquete en base R de este mismo nombre.

El llamado análisis GSEA (del inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*) llevado a cabo en la sección 4.4.4, se realizó con el programa GSEA (versión 4.1.0), desarrollado por “The Molecular Signatures Database” (MSigDB) (Subramanian *et al.*, 2005). Este método nos permitió determinar si los genes alterados tras la inducción de la neuropatía por oxaliplatino, se distribuyen al azar o si existe una correlación en función del fenotipo (en este caso la condición de tratado o vehículo),

para diferentes conjuntos de genes de interés; en nuestro caso, genes relacionados con el dolor y su sintomatología en clínica (Liberzon *et al.*, 2015). Cada gen recibe una puntuación que permite decidir si estará en la lista final de genes significativos. En la **figura 35** se representa la descripción general del GSEA y su interpretación. Los parámetros para el análisis fueron “*classic*” para la estadística de enriquecimiento y la métrica usada fue la diferencia entre clases (Diff_of_classes; Veh-Oxa). El tipo de permutación fue “*gene_set*” y el número de permutaciones 500. El análisis se hizo por separado para cada población neuronal (EYFP+, IB4+ y DN) para los genes *DE* alterados tras el tratamiento con el oxaliplatino ($|Log2FC| > 1$, $FDR < 0.05$). Las bases de datos utilizadas relacionadas con el dolor se descargaron del portal MSigDB (sólo para la especie humana, aportada por el grupo HPO, “*Human Phenotype Ontology*”, de “*The Jackson Laboratory*” (JAX)) y se creó una base conjunta englobando las siguientes sintomatologías:

Nombre de la base de datos	Nº Genes
<i>HP ABDOMINAL PAIN</i>	252
<i>HP ABNORMALITY OF PAIN SENSATION</i>	69
<i>HP ANGINA PECTORIS</i>	33
<i>HP ARTHRALGIA OF THE HIP</i>	6
<i>HP BACK PAIN</i>	58
<i>HP BONE PAIN</i>	78
<i>HP CERVICAL CORD COMPRESSION</i>	7
<i>HP CHEST PAIN</i>	95
<i>HP CHRONIC PAIN</i>	5
<i>HP DYSMENORRHEA</i>	13
<i>HP DYSPAREUNIA</i>	38
<i>HP EAR PAIN</i>	15
<i>HP EPIGASTRIC PAIN</i>	7
<i>HP EPISODIC ABDOMINAL PAIN</i>	34
<i>HP EXERCISE INDUCED MYALGIA</i>	24
<i>HP FLANK PAIN</i>	6
<i>HP GAIT DISTURBANCE</i>	1008
<i>HP HEADACHE</i>	250
<i>HP HIP PAIN</i>	8
<i>HP IMPAIRED PAIN SENSATION</i>	55
<i>HP LIMB PAIN</i>	31
<i>HP LOW BACK PAIN</i>	6
<i>HP LOWER LIMB PAIN</i>	22

<i>HP_MIGRAINE_WITHOUT_AURA</i>	6
<i>HP_MUSCLE_STIFFNESS</i>	74
<i>HP_MYALGIA</i>	144
<i>HP_NEURALGIA</i>	12
<i>HP_OCULAR_PAIN</i>	14
<i>HP_SHOULDER_PAIN</i>	5
<i>HP_SPONTANEOUS_PAIN_SENSATION</i>	5
<i>HP_RECURRENT_PAROXYSMAL_HEADACHE</i>	32
<i>HP_PAIN_IN_HEAD_AND_NECK_REGION</i>	32
<i>HP_PHOTOPHOBIA</i>	228

Además, se comparó con la base de datos HP_PAIN para el término general del dolor con 642 genes.

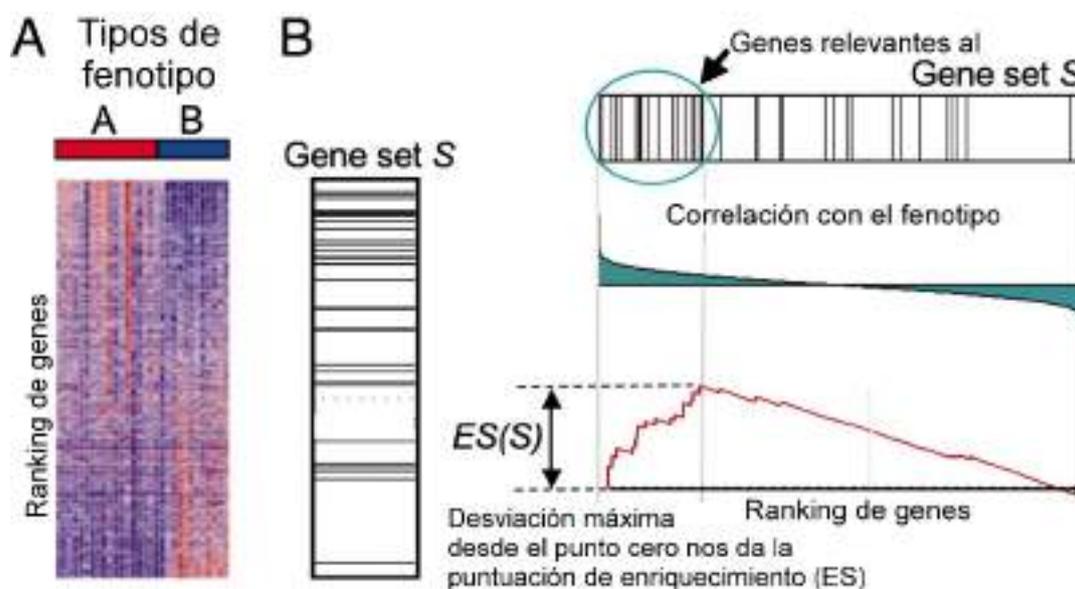


Figura 35. Esquema de resultados del método GSEA. A) En primer lugar se puntúa la lista de genes a estudiar con sus valores de expresión en función de dos fenotipos o condiciones (en nuestro caso vehículo y oxaliplatino) y su correlación con una lista de genes de interés (Gene set S, en nuestro caso las bases de datos obtenidas del portal MSigDB relacionadas con el término dolor). Los genes más relevantes, es decir, con mayor correlación se sitúan al principio o al final de la lista "Gene set S". El valor ES ("Enrichment score") se define como la desviación máxima encontrada en todo el listado de genes. Si el valor se encuentra al principio de la lista será positivo y el fenotipo enriquecido será A. Por el contrario si ES es negativo se situará al final de la lista y el fenotipo relacionado con las bases de datos será B. Modificado de Subramanian *et al.*, 2005.

3.13.4. Análisis bioinformático comparativo con otros estudios de expresión

Una parte importante del trabajo presentado en esta memoria ha consistido en la comparación del perfil genético generado tras el aislamiento por FACS y posterior secuenciación de nuestras muestras con las bases de datos de expresión de genes en neuronas sensoriales publicados por otros laboratorios. El análisis comparativo se ha realizado usando estudios de secuenciación en bloque, donde las neuronas se aislaron por metodología FACS o MACS (del inglés, “*Magnetic Cell Sorting*”; Thakur et al., 2014) y estudios más recientes donde se realizó la secuenciación de células individuales.

a) Análisis comparativo con otros trabajos realizados por secuenciación en bloque

En primer lugar, determinamos si los genes expresados diferencialmente en nuestro estudio presentan un origen neuronal o en su lugar derivan de células satélites (referente a las **secciones 4.2.3.** de los resultados). Para ello se usó el material suplementario presentado en los trabajos de (Thakur *et al.*, 2014; Lopes, Denk and McMahon, 2017), indicado con los respectivos números de identificación de la base de datos GEO (del inglés “*Gene Expression Omnibus*”); GSE100175 y GSE62424 respectivamente. En estos estudios, se consideraron los genes como neuronales o no neuronales de acuerdo con el cociente de la expresión de cada gen entre las neuronas DRGs purificadas con la tecnología MACS o por FACS, ya que las neuronas purificadas por esta última técnica contienen alrededor de un 30 % de células satélites (Lopes, Denk and McMahon, 2017). En este estudio, establecieron que un valor menor o igual a 0.25 en el cociente indica que el gen a estudiar está especialmente enriquecido en células de origen no neuronal. El listado de genes identificados en este estudio, junto con su asignación en origen neuronal o no neuronal se compararon con los genes *DE* obtenidos del análisis diferencial para las poblaciones EYFP+, IB4+ y la DN. Esta clasificación se complementó con otros subtipos neuronales que pudieran estar subestimados en el trabajo de Lopes y colaboradores y que corresponden a las neuronas Nav1.8+/IB4+, Nav1.8+/IB4- y PVALB+ identificadas en los trabajos de Chiu *et al.*, 2014, los genes identificados en el trabajo de Reynders et al., 2015, que pertenecen a la población C-LTMR (separada usando los marcadores Ginip+/Mrgprd-) y los marcadores positivos para la población IB4+ (Ginip+/MRGPRD+). Los genes que no pudieron ser clasificados como genes expresados en neuronas o células satélites, se los consideró inespecíficos.

Al estudiar los genes *DE* tras la inducción de la neuropatía por oxaliplatino, nos interesamos además en conocer si los genes alterados con origen no neuronal son marcadores del sistema

inmunitario, más concretamente, si su expresión está presente en células T y macrófagos. Existen numerosos estudios que indican la relevancia de las células del sistema inmune en el dolor, más específicamente en la hiperalgesia producida tras un daño o lesión, que puede ser causada por una infiltración de células del sistema inmune (Cobos *et al.*, 2018). Es por ello por lo que se usó la base de datos de macrófagos (GSE28621, F4/80+, CD11b+ inflammation-associated macrophages 72 hours post stimulation) del estudio realizado por (Rosas *et al.*, 2014) y las células T (GSE60354, CTL_YFP_IFNG y DNRAR_YFP_IFNG Interferon stimulated T cells), del estudio de (Brown *et al.*, 2015). Para estandarizar los resultados, el análisis de expresión diferencial se realizó de nuevo frente a sus respectivos controles usando la herramienta online GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/geo2r.html>), y se identificaron los genes diferencialmente expresados con un valor dos veces mayor $|Log2FC| > 1$ y un valor p estadístico menor de 0.05 (FDR, Benjamini & Hochberg). En el diagrama de la **figura 36** se indica los pasos seguidos para la comparación entre bases de datos de estudios externos con nuestro el transcriptoma obtenido para la comparación entre las poblaciones EYFP+, IB4+ y la DN en condiciones control y tras la inducción de la neuropatía.

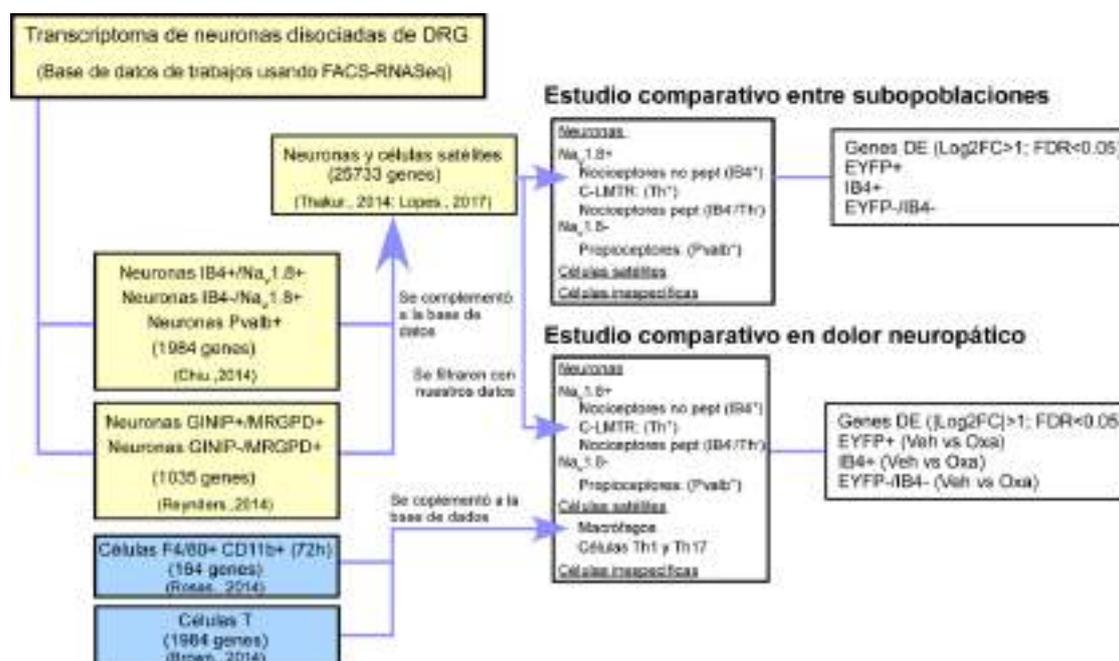


Figura 36. Esquemización de los pasos para el análisis comparativo con estudios de expresión en “bulk”. Las listas de genes de los respectivos estudios mencionados previamente se compararon y filtraron con los resultados obtenidos del análisis de expresión diferencial al comparar las poblaciones EYFP+, IB4+ y la DN. Los genes *DE* obtenidos al comparar entre poblaciones o entre las muestras control y tratadas se les asignó un origen neuronal, no neuronal (derivado de células satélites) e inespecífico. A su vez el grupo neuronal se subdividió en Nav1.8+/IB4-, Nav1.8+/IB4+, C-LTMRs y PVALB+ que son las principales subpoblaciones no solapantes obtenidas mediante la técnica de FACS-RNASeq. En el estudio de expresión

tras la inducción de la neuropatía por el compuesto de oxaliplatino se examinaron también aquellos genes de origen no neuronal que identificaban a marcadores propios de macrófagos y células T (células Th1 y Th17). Se indican entre paréntesis el número de genes encontrado en cada estudio.

b) Análisis comparativo con otros trabajos realizados por secuenciación en célula única

Para investigar a qué subpoblación neuronal se asemeja el perfil molecular obtenido de nuestras neuronas de DRGs EYFP+, en la **sección 4.2.4** de los resultados hemos agrupado y normalizado las células secuenciadas de las bases de datos de (Usoskin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Zeisel *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2020), en un conjunto de 12.435 células totales. Para ello, seguimos el protocolo de análisis bioinformático publicado en el artículo Ma *et al.*, 2020 y nos hemos basado en el lenguaje Python usando el paquete SCANPY (1.7.2). El código completo puede encontrarse en "<https://github.com/JonETJakobsson/Npy2r-neurons-in-DRG>".

Los pasos seguidos fueron prácticamente iguales al trabajo original, con la excepción de que en esta Tesis se han incluido los datos obtenidos del trabajo de Sharma *et al.*, 2020, que ha sido el estudio más reciente de secuenciación por célula única (*scRNA-Seq*) de neuronas sensoriales murinas de DRG. Brevemente, los datos de la expresión génica para las neuronas sensoriales DRG se obtuvieron de las base de datos GEO (GSE59739, GSE63576 y GSE139088) a excepción de los datos de Zeisel, que se obtuvieron directamente en formato loom (I6_Peripheral_sensory_neurons.loom) y posteriormente exportados a una matriz Excel de la página web del laboratorio de Linnarsson (<http://loom.linnarssonlab.org/>).

El número de conteos para cada célula se normalizó al valor medio de la suma de las lecturas para todas las células y posteriormente se transformaron a escala logarítmica (*sc.pp.log1p*). Se detectaron los 5.000 primeros genes más variables para cada base de datos y la variabilidad preexistente en estos 5.000 genes por el efecto de tanda entre los distintos trabajos, se corrigió por el método de vecinos mutuos más próximos (*matching mutual nearest neighbors, MNN*) (Haghverdi *et al.*, 2018).

En los trabajos originales encontramos diferencias en la nomenclatura y subtipos de neuronas sensoriales primarias identificadas, ya que no todos los subtipos están definidos. Para estandarizar las nomenclaturas utilizadas en todas las neuronas secuenciadas disponibles, los subgrupos identificados en los trabajos de Zeisel *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2020, se usaron como modelo para entrenar un clasificador y volver a asignar un tipo neuronal a aquellas neuronas secuenciadas en los trabajos más antiguos de Usoskin *et al.*, 2015 y Li *et al.*, 2016. En este trabajo hemos definido los siguientes grupos:

- neuronas mecanorreceptoras de bajo umbral (LTMR) tipo A β , A δ y C, y propioceptores (A β -LTMR, A δ -LTMR, C-LTMR y NF4, respectivamente)
- neuronas no peptidérgicas MRGPRD+, MRGPRA3+ y SST+ (NP1, NP2, NP3).
- neuronas peptidérgicas tipo C (PEP1.1, PEP1.2, PEP1.3 y PEP1.4) y tipo A δ (PEP2), junto con las neuronas de frío.

Nótese que en algunos casos los subgrupos se agruparon, por simplicidad, para tener la misma clasificación descrita en el trabajo de Gatto *et al.*, 2019. Por ejemplo, en el trabajo de Sharma, los autores definen dos tipos de neuronas peptidérgicas molecularmente distintas de tipo A δ (denominadas CGRP- θ , y CGRP- η) que en nuestro caso están agrupadas conjuntamente dentro de las PEP2; o el grupo de neuronas de frío está definido por tres subgrupos en el trabajo de Zeisel *et al.* (PEP8.1, PEP8.2 y PEP8.3). Tras catalogar cada célula en los diferentes tipos celulares se mapearon de nuevo en los datos sin escalar (previo a corregir los datos por el método MNN).

Los gráficos circulares (referente a la **figura 47B** sección **4.2.4** de los resultados) se generaron usando función *dotplot* de SCANPY, para los subtipos neuronales definidos en el párrafo anterior.

En la **sección 4.3.1.** de los resultados realizamos una nueva agrupación de las neuronas TRPM8+ procedentes de ganglios de DRG y TG. Para el análisis bioinformático usamos los datos del estudio de secuenciación en célula única de neuronas sensoriales de TG (Nguyen *et al.*, 2017) obtenidos de la base de datos GSE101984. Para realizar el mismo análisis en DRG, se utilizaron los datos derivados del análisis explicado en el párrafo anterior, tras agrupar las neuronas secuenciadas de diferentes trabajos de investigación. En ambos casos, hemos utilizado el programa Seurat (v4.0.3) (Stuart *et al.*, 2019) que está basado en base R y cuyo protocolo puede consultarse en el siguiente enlace; "<https://satijalab.org/seurat/>". A continuación, se explican los principales pasos del análisis:

Los datos crudos se filtraron para dejar solo las células con expresión para el transcrito *Trpm8* > 0 y el análisis de "*clustering*" se realizó siguiendo las recomendaciones de sus desarrolladores (Satija Lab) y descritas en el tutorial para el paquete bioinformático Seurat. Las células se filtraron según su nivel de contaminación mitocondrial (se ajustó un 1 % como corte para TG y 0.5 % para DRG) y el número de genes detectados por célula (se consideraron viables si tenían un número entre 8500 y 200). Los datos se escalaron antes de realizar la reducción dimensional *NormalizeData()* y *ScaleData()* y las funciones *JackStrawPlot()* y *ElbowPlot()* se usaron para comparar la distribución de análisis de componentes principales (PCA) y encontrar la verdadera di-

mensionalidad de los datos. En este trabajo, hemos establecido un corte de 10 para los componentes principales. La agrupación en subgrupos (usando la función *FindClusters; object = so, resolution = 0.5*) y su visualización, se llevó a cabo usando una distribución “t Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE) (usando la función *RunTSNE; object = so, dims = 1:5*). Para identificar los marcadores específicos para cada clúster, se usó la prueba Wilcox ajustado a un valor de $|\text{Log}_2FC| > 0.25$ al comparar con los subgrupos restantes.

Para el análisis de reproducibilidad de los resultados, usamos el programa estadístico *MetaNeighbor* (Crow *et al.*, 2018). Para ello se combinaron en una única matriz los datos de las neuronas TRPM8+ para TG y DRG, que previamente se habían escalado en el análisis de “clustering” descrito en el párrafo anterior. Los genes más variables en función de su expresión media en su último cuartil al comparar los subgrupos de neuronas TRPM8+ de DRG vs TG se identificaron con la función *variablegenes()*, seleccionando 100 genes. A partir de estos genes pudimos comparar la similitud entre los subtipos celulares de TG y DRG. El programa *Metaneighbor* se utilizó en su modalidad no supervisada según las instrucciones de sus desarrolladores (“<https://github.com/maggiecrow/MetaNeighbor#unsupervised>”).

3.13.5. Programas informáticos utilizados y estadística

Los datos estadísticos están representados como la media \pm error estándar de la media (SEM) a no ser que se especifique lo contrario. Los gráficos se generaron usando los programas Origin 2019 (OriginLab®) y GradPad Prism 8 (GradPad®). Los mapas de calor o “*heatmaps*” se realizaron usando el lenguaje R con la función *pheatmap()* y con las unidades escaladas a las filas (*scale='row'*), salvo que se especifique lo contrario. Todos los gráficos se ilustraron y adaptaron usando CanvasX (Canvas GFX®). Para el análisis estadístico de los datos se usó el software GraphPad Prism 8 a excepción del análisis bioinformático llevado a cabo para el estudio de los datos de secuenciación tal como se detalla en sus respectivos apartados. La prueba estadística y el nivel de significancia se indican en los pies de las figuras en el apartado de resultados. Si no se especifica, el análisis estadístico está calculado como prueba de dos hipótesis (a dos colas).

4.RESULTADOS

4.1. Caracterización funcional de las poblaciones TRPM8+, IB4+ y DN

En este bloque de experimentos realizamos una caracterización funcional de las neuronas de DRG sensibles al frío en cultivo, mediante la técnica de fluorimetría de calcio. Con este fin, se utilizó la línea transgénica reportera TRPM8^{BAC}EYFP y el marcaje con la isolectina GS-IB4 para así identificar las poblaciones neuronales TRPM8+ e IB4+ (TRPM8-/IB4-). Adicionalmente, en la **sección 4.1.4**, examinamos el papel del canal TRPA1 en la transducción al frío.

4.1.1. La co-expresión de TRPM8 e IB4 en neuronas sensibles al frío de los ganglios raquídeos es baja

Previo a la caracterización funcional, se analizaron los niveles de fluorescencia endógena de las neuronas EYFP+ en cultivos de DRG obtenidos de animales TRPM8^{BAC}EYFP. Las imágenes de epi-fluorescencia revelan un marcaje fluorescente variable, siendo posible separar las neuronas en dos grupos, en función de su intensidad de fluorescencia y su tamaño (**figura 37A-B**). Las neuronas EYFP+ con una fluorescencia menor del 40 % de la intensidad máxima se consideraron de baja intensidad y se denominaron WF-EYFP+ (*“weakly fluorescent”*), representando el 83 % (378/453) de las neuronas EYFP+ (**figura 37B**; gráfico circular). Aquellas con una intensidad mayor del 40 % de la intensidad máxima se denominaron IF-EYFP+ (*“intensely fluorescent”*) y representan el 17 % (75/453) del total de neuronas EYFP+. Asimismo, la población EYFP+ representa el 29.4 % (453/1540) del total de neuronas analizadas. En las imágenes de la **figura 37A** y en el gráfico de dispersión de puntos de la **figura 37B**, se muestran además las neuronas doblemente positivas para el marcaje de IB4 y EYFP y su cuantificación está representada en la **figura 37C**; la co-expresión de IB4 y EYFP solo se detecta en un 9.7 % de las neuronas (87/882). Además, observamos que la mayoría de las neuronas doblemente positivas pertenecen a la subpoblación WF-EYFP+ (10 %, 80/807) y apenas llegó al 1.4 % (7/504) en el caso de las IF-EYFP+.

A continuación, se analizó el tamaño de todas las neuronas en cultivo y constatamos que la población IF-EYFP+ tienen un tamaño medio menor (diámetro de $16.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$) que las WF-EYFP+ ($21.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$). Las células IB4+ y las doble negativas (DN) presentan un tamaño intermedio, de $19 \pm 0.2 \mu\text{m}$ y $19.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ respectivamente (**figura 37D**). En este gráfico y en los análisis de caracterización funcional que se describen en la siguiente sección, se han excluido los datos de las neuronas EYFP+/IB4+ por lo que, a no ser que se indique lo contrario, la población EYFP+ refiere a las neuronas EYFP+/IB4- y la población IB4+ a aquellas EYFP-/IB4+.

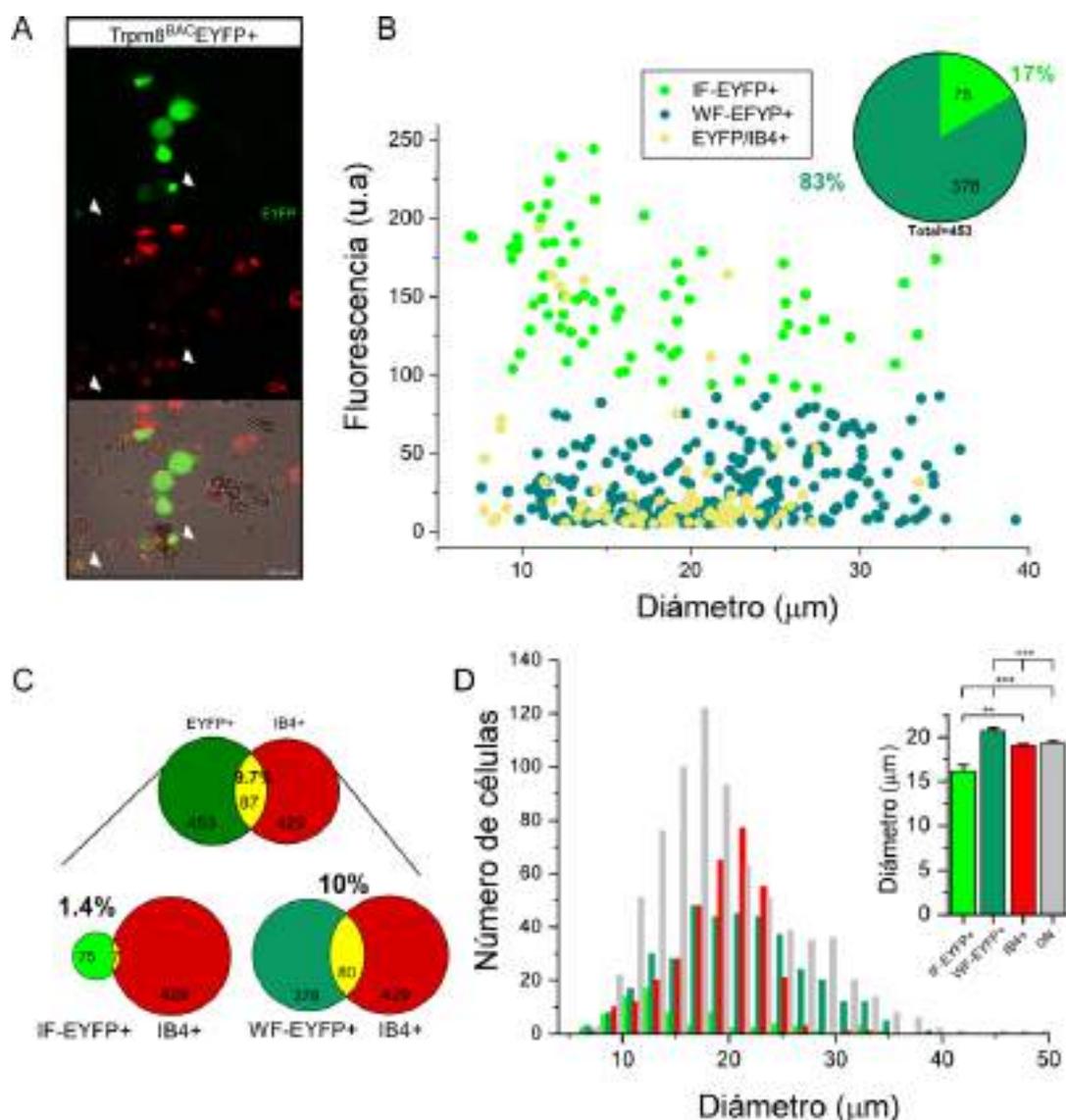


Figura 37 Distribución de las poblaciones TRPM8+, IB4+ y DN en cultivos de ganglio raquídeo del ratón TRPM8^{BAC}EYFP. A) Imágenes de epifluorescencia de las neuronas EYFP+ (excitación a 480nm de longitud de onda), e IB4+ (excitación a 568 nm) y la superposición de ambas imágenes con luz transmitida. Las flechas indican casos infrecuentes de co-localización de EYFP e IB4 en la misma neurona. Barra de escala: 50 μm . B) Diagrama de dispersión en función del tamaño e intensidad de fluorescencia de las neuronas EYFP+ separando aquellas con alta intensidad (IF > 40% de la intensidad máxima de fluorescencia, verde claro) y baja intensidad (WF < 40%, verde oscuro). En amarillo se indican además aquellas neuronas doblemente marcadas EYFP+/IB4+. El gráfico de sectores circulares indica el porcentaje de neuronas IF-EYFP+ y WF-EYFP+ dentro de la población EYFP+. C) Datos de co-localización con IB4 de la población de neuronas EYFP+ (gráfico superior) y tras separarlas en IF y WF (gráfico inferior). D) Distribución y valor medio del diámetro (inserto) de las neuronas EYFP+, IB4+/EYFP-, DN (doblemente negativas). (** $p < 0.001$, ** $p = 0.0032$, prueba ANOVA-Tukey). 1540 neuronas analizadas, n=10 ratones.

4.1.2. Diferencias en la sensibilidad al frío entre las poblaciones TRPM8+, IB4+ y DN

La caracterización funcional de las neuronas sensoriales se realizó mediante experimentos de imagen de calcio *in vitro*. Para ello, las células se cargaron con la sonda fluorescente Fura-2AM y se aplicó una rampa de temperatura desde un valor basal de ~ 33 °C hasta 12-14 °C. Tras la estimulación por frío, se evaluó también su estimulación química a diferentes agonistas de los principales canales TRPs. La **figura 38A** muestra un ejemplo representativo del incremento en el calcio intracelular, expresado como el cociente de las intensidades de fluorescencia (F340/380), de varias neuronas registradas de forma simultánea en respuesta a un estímulo de frío. En esta sección se describen sólo los resultados analizados de la respuesta al frío y el protocolo completo de estimulación se detalla en la siguiente sección (**sección 4.1.3**).

La mayoría de las neuronas IF-EYFP+ respondieron al frío (75 %, 24/32), una proporción significativamente mayor en comparación con las poblaciones WF-EYFP+ (12.7 %, 13/102), IB4+/EYFP- (10.6 %, 13/122) y DN (3.5, % 9/254) (23 experimentos independientes de 7 ratones TRPM8^{BAC}EYFP; $p < 0.001$, prueba exacta de Fisher, **figura 38B**).

Estudios previos han demostrado que las neuronas TRPM8+ presentan un tamaño medio inferior al resto de la población celular (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002). Al separar las neuronas IF-EYFP+ y WF-EYFP+ por tamaño, observamos claramente que aquellas de pequeño tamaño (< 20 μm) y alta fluorescencia tienen mayor porcentaje de respuesta al frío, alcanzando casi el 90 % (88.5 % (23/26), **figura 38C**).

El promedio de la amplitud de la respuesta de las neuronas IF-EYFP+ también fue significativamente mayor (0.42 ± 0.06) comparando con la población IB4+/EYFP- (0.14 ± 0.02) y con la DN (0.012 ± 0.02 , $p = 0.006$ y $p = 0.012$ respectivamente, prueba ANOVA a una vía y análisis *post-hoc* Tukey) (**figura 38D**). La amplitud de la respuesta en las neuronas WF-EYFP+ fue de 0.27 ± 0.07 , aunque no se encontraron diferencias significativas al comparar con las poblaciones restantes.

Los estudios funcionales clasifican a los termorreceptores sensibles al frío como de bajo y alto umbral, en función de su temperatura de activación (Madrid *et al.*, 2009; Teichert *et al.*, 2012; Gers-Barlag *et al.*, 2021). Basándonos en estos trabajos, las neuronas sensibles al frío se clasificaron en bajo umbral (LT, *Low-Threshold*, > 26.5 °C), alto umbral (HT, *High-Threshold*, 26.5-19 °C), y muy alto umbral (vHT, *very High-Threshold*, < 19 °C). Según esta clasificación, encontramos que las neuronas IF-EYFP+ presentan umbrales bajos, mientras que las poblaciones IB4+ y DN son prácticamente neuronas de muy alto umbral (**figura 38E**). La población WF-EYFP+ en cambio,

presenta un perfil mixto, con representación de las tres poblaciones neuronales sensibles al frío (figura 38F).

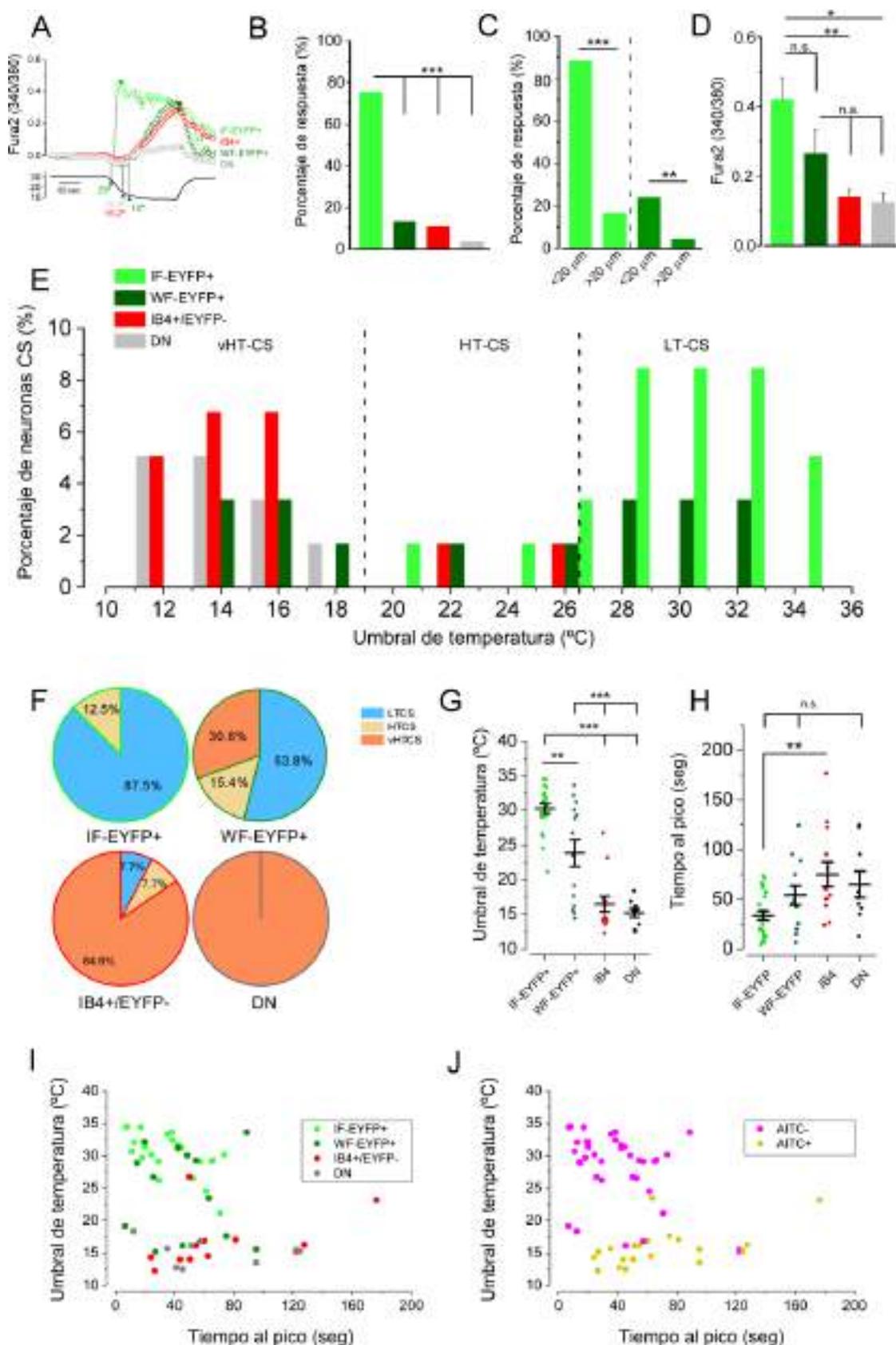


Figura 38. Perfil termosensible de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN en respuesta al frío. A) Trazos representativos de los incrementos del calcio intracelular en neuronas de las cuatro poblaciones estudiadas en respuesta al estímulo de frío. Las poblaciones WF-EYFP+, IB4 y DN presentan una cinética de respuesta más lenta para alcanzar el valor máximo comparado con las IF-EYFP+. B) Cuantificación del porcentaje de respuesta en cada población y C), al separar la población IF y WF-EYFP+ según el tamaño celular (mayor o menor de 20 μm de diámetro celular) ($***p < 0.001$ y $**p < 0.01$, prueba exacta de Fisher). D) Amplitud (F340/380) de la respuesta al estímulo de frío ($*p < 0.05$ y $**p < 0.01$, prueba ANOVA-Tukey), E), histograma mostrando la distribución del umbral de temperatura y F) cuantificación del porcentaje de neuronas sensibles al frío (“CS, cold sensitive”) de bajo umbral (LT-CS, Low-Threshold, $>26.5^\circ\text{C}$), alto umbral (HT-CS, High-Threshold, $26.5\text{-}19^\circ\text{C}$) y muy alto umbral (vHT-CS, very High-Threshold, $<19^\circ\text{C}$), para para las poblaciones IF-EYFP, WF-EYFP+, IB4+/EYFP- y DN. G) Valor medio de la temperatura de activación (umbral) en las diferentes poblaciones, ($**p < 0.01$ y $***p < 0.001$, prueba ANOVA-Tukey) y H) valor medio del tiempo al pico tras la activación por frío (n.s. $**p > 0.01$, prueba ANOVA-Tukey). I) Distribución de las neuronas en función del umbral de temperatura y el tiempo al pico y J), mismo análisis representando las neuronas AITC- y AITC+. Neuronas sensibles al frío analizadas $n=24$ IF-EYFP+, $n=13$ WF-EYFP+, $n=11$ IB4 y $n=9$ DN; $n_{\text{total}}=534$ neuronas analizadas de 7 animales.

Los valores promedio del umbral de temperatura de las diferentes poblaciones fueron de $30.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$ (IF-EYFP+), $24.5 \pm 1.9^\circ\text{C}$ (WF-EYFP+), $16.5 \pm 1.1^\circ\text{C}$ (IB4+/EYFP-) y $15.2 \pm 0.6^\circ\text{C}$ (DN, **figura 38G**), siendo significativamente distintos al comparar ambas poblaciones EYFP+ respecto de las IB4+ y DN y al comparar el umbral medio entre las poblaciones IF-EYFP+ y WF-EYFP ($p < 0.001$ y $p = 0.002$, respectivamente, prueba ANOVA a una vía y análisis post-hoc Tukey).

También analizamos el tiempo que transcurre hasta que la amplitud de la respuesta al frío alcanza el máximo de amplitud (tiempo al pico). Al analizar el valor promedio, las diferencias fueron significativas al comparar la población IF-EYFP con la población IB4+ ($p = 0.0042$, prueba ANOVA a una vía y análisis post-hoc Tukey, **figura 38H**). En la **figura 38I** se representaron los valores medios de la amplitud de respuesta en función de su umbral de temperatura y se observa que las neuronas IF-EYFP+ tienen una cinética rápida, mientras que en las poblaciones con umbrales más altos (responden a temperaturas más bajas) la cinética es más lenta, propiedad característica de neuronas nociceptivas (Thut, Wrigley and Gold, 2003; Babes, Zorzon and Reid, 2004). Todas las neuronas sensibles al frío que respondieron a AITC presentaron una cinética más lenta (76.05 ± 9.17 seg vs 40.78 ± 4.44 seg, $p < 0.001$, prueba t-Student no pareada) y umbrales de activación más altos ($16.85 \pm 0.92^\circ\text{C}$ vs $27.7 \pm 0.83^\circ\text{C}$, $p < 0.001$, prueba t-Student no pareada, **figura 38J**).

4.1.3. Las neuronas TRPM8+, IB4+ y DN responden de forma diferente a agonistas específicos de los canales TRP

Para profundizar en la caracterización funcional de las subpoblaciones de neuronas, tras la estimulación con frío aplicamos una batería de agonistas de los principales canales TRPs termosenesibles. La **figura 39A** muestra las imágenes en pseudocolor de la fluorescencia de YFP e IB4 (primera imagen) y de las respuestas de calcio a los diferentes estímulos aplicados (frío, mentol, mentol y frío, AITC, capsaicina y KCl). En la **figura 39B** se representan trazos representativos del incremento en el calcio intracelular en neuronas EYFP+, IB4+/EYFP- y DN del experimento en la **figura 39A**. En esta caracterización usamos mentol como agonista del canal TRPM8 y AITC y capsaicina como agonistas de los canales TRPA1 y TRPV1 respectivamente (Caterina *et al.*, 1997; Bandell *et al.*, 2004). Como se indica en la parte superior del gráfico, aplicamos KCl (30 mM) al final del protocolo de estimulación para confirmar la viabilidad de las neuronas que no hubieran respondido a los estímulos previos.

Al igual que con el estímulo de frío (75 % de respuesta), que hemos vuelto a representar en la **figuras 39C y D**, un 62.5 % (20/32) y un 78.1 %, (25/32) de las neuronas IF-EYFP+ respondieron a mentol y al frío en presencia de mentol, siendo estos porcentajes significativamente mayores al compararlos con las poblaciones IB4+/EYFP- y DN ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher); un 28.1 % (9/32) de neuronas IF-EYFP respondieron a capsaicina y sólo un 6.25 % (2/32) respondieron a AITC, consecuente con la baja co-expresión de TRPA1 y TRPM8 demostrada en varios estudios, tanto funcionales como de expresión (Story *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005; Usoskin *et al.*, 2015).

La proporción de neuronas WF-EYFP+ que respondieron a los agonistas de TRPM8 fue significativamente menor y similar al resto de la población EYFP- con un 11.8 % (12/102) para mentol y un 24.5 % (25/102) para el frío en presencia de mentol. Un 20.6 % (21/102) y un 35.3 % (36/102) de las neuronas respondieron a AITC y capsaicina respectivamente.

Como era esperable, el porcentaje de neuronas IB4+/EYFP- que respondieron a AITC fue muy alto y significativamente mayor al compararlo con el resto de las subpoblaciones (73.8 % 90/122, $p < 0.001$ prueba exacta de Fisher). En esta subpoblación, un 34.4 % (42/122) respondió a mentol en presencia del frío y menos de un 15 % respondieron a los agonistas por separado (un 10.6 % (13/122) para frío, como ya indicamos en el apartado anterior y 13.1 % (16/122) para mentol). Sorprendentemente, solamente un 12.3 % (15/122) respondió al estímulo de capsaicina y en menor proporción que las demás poblaciones ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher). Finalmente,

un 24.4 % (62/254) y un 32.7 % (83/254) de las neuronas DN respondieron a AITC y capsaicina respectivamente y muy pocas neuronas respondieron a los agonistas de TRPM8 (**figura 39C**).

Los incrementos de calcio en respuesta a los diferentes estímulos fueron similares entre las distintas poblaciones (**figura 39D**) exceptuando el estímulo de frío ya mencionado en la sección anterior.

Cómo ya comentamos en la introducción, se ha descrito que el canal TRPA1 puede activarse por temperaturas bajas, en el rango nocivo, y por mentol. Por ello, analizamos el número de neuronas sensibles al frío o mentol que responden a AITC para cada población (**figura 39E**). Se observó que la mayoría de las neuronas que responden al frío y al AITC pertenecen a las poblaciones IB4+/EYFP- o DN, las cuales supuestamente no expresan el canal TRPM8 (el 84.6 % (11/13) de las neuronas IB4+/EYFP- y el 66.7 % (6/9) de las DN sensibles al frío respondieron al AITC). Por otro lado, no se encontraron neuronas IF-EYFP+ sensibles al frío y a AITC y solo un 30.7 % (4/13) de las WF-EYFP+ respondieron al frío y al AITC (**figura 39E**, izquierda).

De igual manera, ninguna neurona IF-EYFP que respondió al mentol lo hizo a AITC, frente al 93.7 % (15/16) y 83.3 % (10/12) de respuesta observado en las poblaciones IB4+/EYFP- y DN respectivamente; solo un 25 % (3/12) de las neuronas WF-EYFP+ que respondieron al mentol, también respondieron al AITC. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre las neuronas EYFP+ y EYFP-, especialmente para la población IB4+/EYFP- ante ambos agonistas ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher).

No obstante, cuando analizamos el número de neuronas sensibles al frío o al mentol dentro de la población AITC+, encontramos que menos del 20 % respondieron a ambos agonistas (**figura 39F**). Estos datos sugieren que parte de la respuesta al frío o al mentol en las subpoblaciones IB4+/EYFP- y DN estaría mediada por el canal TRPA1, pero no todas las neuronas AITC+ responden a estos agonistas.

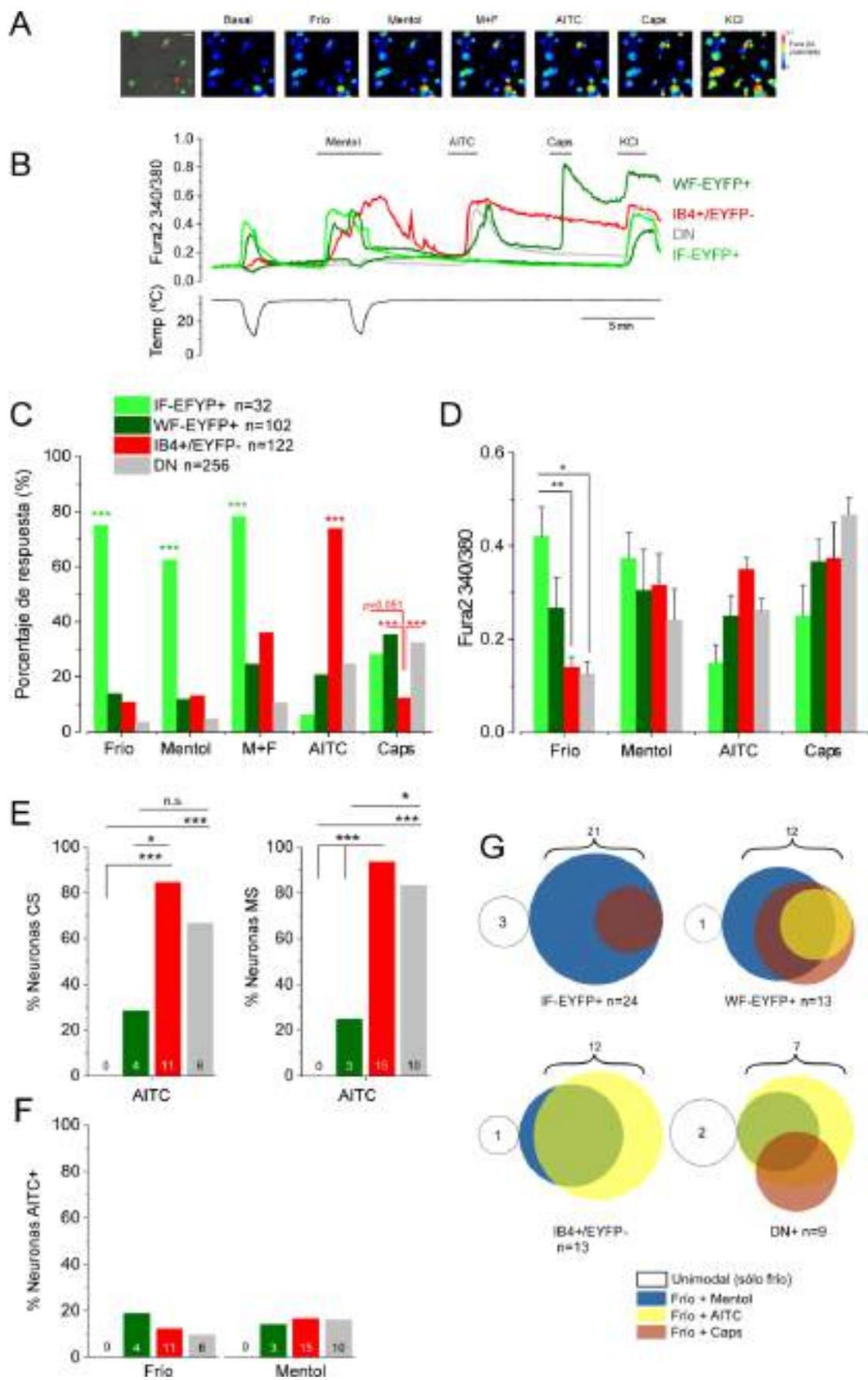


Figura 39. Caracterización funcional de las neuronas EYFP+, IB4+ y DN en respuesta al frío y distintos agonistas de canales TRP. A) (primera imagen), superposición de las imágenes de epifluorescencia de EYFP e IB4 (excitación a 480nm y 568 nm respectivamente) e imágenes en pseudo color, indicando el valor de la razón de fluorescencia para 340 y 380 nm, de neuronas de DRG en cultivo. Barra de escala 10 μ m. B) Curso temporal de los cambios en el nivel de calcio intracelular para neuronas representativas de las distintas subpoblaciones, registradas en A. Los estímulos aplicados se indican en la parte superior del gráfico y corresponden a las imágenes en A. C) Cuantificación del porcentaje de respuesta a los estímulos de frío, mentol (100 μ M), mentol + frío (M+F), AITC (100 μ M) y capsaicina (100 nM) en las subpoblaciones estudiadas; (***) p <0.001 al comparar las respuestas a frío, mentol y M+F de la población IF-EYFP+ con las poblaciones restantes indicado en verde. (***) p <0.001 al comparar la población IB4+/EYFP- con las restantes, para los estímulos de AITC y capsaicina, indicado en rojo, prueba exacta de Fisher). D) Amplitud de las respuestas (F340/380) a los diferentes estímulos (* p <0.05 y ** p <0.01, prueba ANOVA-Tukey al comparar la población IF-EYFP+ con IB4+/EYFP- y DN, respectivamente). E) Porcentaje de neuronas sensibles al frío (“CS, cold sensitive”, izquierda) o mentol (“MS, menthol sensitive”, derecha) que respondieron a AITC en las distintas subpoblaciones (* p <0.05, (***) p <0.001 al comparar las neuronas IB4+/EYFP- y DN con las dos poblaciones EYFP+, prueba exacta de Fisher). F) Número de neuronas AITC+ que respondieron a frío o mentol. G) Diagramas de Venn mostrando la proporción de neuronas polimodales y unimodales en base al estímulo de frío. El círculo en blanco representa el número de neuronas que sólo respondieron al estímulo de frío mientras que los círculos coloreados en azul, amarillo y marrón representan a las también sensibles a los agonistas mentol, AITC y capsaicina respectivamente. El número total de neuronas sensibles al frío se indica debajo de cada diagrama de Venn. n_{total} =534 neuronas analizadas de 7 animales.

En los diagramas de Venn de la **figura 39G** se ha representado un resumen de la caracterización funcional de las neuronas termosensibles según su respuesta al mentol, AITC y capsaicina; las poblaciones se han dividido en función de si sólo responden al estímulo del frío o también a los distintos agonistas químicos. La mayoría de las neuronas sensibles al frío analizadas presentan un carácter polimodal para los agonistas testados, siendo muy pocas las que sólo responden al frío (un 12.5 % (3/24), 14.3 % (1/13), 7.7 % (1/13) y 22.2 % (2/9) para las neuronas IF-EYFP+, WF-EYFP+, IB4+/EYFP- y las DN respectivamente). Dentro de la población WF-EYFP+, se observa que todas las neuronas sensibles al frío y al AITC responden además a capsaicina (30.7 % (4/13)), mientras que la mayoría de las neuronas que responden al frío y a capsaicina son también sensibles a mentol. Para la población IB4+/EYFP- no encontramos neuronas termosensibles que respondan a capsaicina, contrastando con la población DN, donde encontramos neuronas que pueden responder a capsaicina o bien AITC o ambos agonistas.

4.1.4. TRPA1 es el principal sensor de la respuesta al frío en la población IB4+

Los resultados presentados hasta ahora demuestran que una fracción de las neuronas EYFP- y por ende TRPM8-, respondieron al estímulo del frío y al mentol. En general, estas neuronas presentan umbrales de activación para la temperatura más bajos (< 19 °C) y responden al AITC, lo

que sugiere el papel del canal TRPA1 en dicha respuesta. Para confirmar esta hipótesis, caracterizamos las respuestas al frío y a diferentes agonistas en ratones deficientes para los canales TRPA1 o TRPM8, y comparamos los resultados con los obtenidos previamente en animales silvestres, *WT* (en esta sección, se considera como animales *WT* a los ratones transgénicos de la línea TRPM8^{BAC}EYFP, véase de nuevo materiales y métodos).

Se ha descrito que el canal TRPA1 puede activarse por mentol a concentraciones del orden micromolar (Karashima *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008). Por ello, para evitar la activación cruzada de TRPM8 y TRPA1 por el mentol, en este bloque de experimentos usamos el compuesto WS-12, un agonista de TRPM8 con mayor afinidad (EC₅₀ de ~193 nM) y especificidad (Bödding, Wissenbach and Flockerzi, 2007). Para confirmar la eficacia del WS-12, realizamos imagen de calcio y analizamos las respuestas de las diferentes poblaciones a la aplicación de WS-12 (1 μM y 10 μM) en ratones TRPM8^{BAC}EYFP y las comparamos con las respuestas a mentol 100 μM. A excepción del cambio de WS-12 por mentol, el protocolo de estimulación fue idéntico al realizado en la sección anterior.

En la **figura 40A** se representan trazos representativos del incremento en el calcio intracelular de tres neuronas con respuesta al frío y a WS-12 1 μM y 10 μM y mentol obtenidos de experimentos independientes. La concentración de WS-12 10 μM, activó a un porcentaje mayor de neuronas IF-EYFP+, aunque las diferencias no fueron significativas con respecto a la concentración de 1 μM y mentol (**figura 40B**). Sin embargo, WS-12 a 10 μM no activó ninguna neurona en la subpoblación IB4+/EYFP- (0/151), a diferencia del pequeño, pero significativamente diferente, porcentaje de neuronas que respondieron a mentol (3 % (16/534); $p = 0.029$ prueba exacta de Fisher, **figura 40B**). Esto sugiere que la expresión del canal TRPM8 es mínima en la población IB4+/EYFP- y que sus respuestas al mentol podrían ser debidas a la activación de TRPA1. Por ello, en esta serie experimental decidimos usar WS-12 10 μM para activar de manera más selectiva al canal TRPM8.

Asimismo, no observamos cambios en los porcentajes de neuronas que responden al AITC en las que se había aplicado previamente WS-12 y mentol (**figura 40C**), por lo que, aunque el mentol pudiera activar a TRPA1, no afecta a la respuesta al AITC.

A continuación, realizamos la caracterización funcional de las neuronas en cultivo obtenidas de ratones deficientes para los canales TRPM8 (TRPM8^{KO}) y TRPA1 (TRPA1^{KO}). En la **figura 40D** se muestran dos ejemplos representativos de los cambios en el calcio intracelular en respuesta a los diferentes agonistas según el protocolo de estimulación que se indica en la parte superior de las gráficas. Los resultados se compararon con los obtenidos de animales *WT* (TRPM8^{BAC}EYFP) en los que se aplicó el mismo protocolo de estimulación.

Debido a que la población IB4+ presenta el porcentaje más elevado de neuronas sensibles a AITC, centramos el análisis en esta subpoblación por lo que separamos entre neuronas IB4+ e IB4-. Es importante mencionar que el ratón TRPM8^{KO} utilizado pertenece a la línea transgénica TRPM8GFP^{f/f} (Dhaka *et al.*, 2007), que a diferencia del ratón TRPM8^{BAC}EYFP, sólo permite detectar las neuronas TRPM8+ intensamente fluorescentes, tal como han demostrado estudios previos de nuestro grupo de investigación (Ordás Fernández, 2019). Por otro lado, el ratón TRPA1^{KO} no presenta marcaje específico fluorescente (Kwan *et al.*, 2006). Para una comparación equivalente entre las tres líneas utilizadas, no se ha tenido en cuenta el marcaje fluorescente de EYFP, lo que implica que la mayoría de las neuronas TRPM8+ estarían representadas dentro de la población IB4- (trazos azules de las **figuras 40D**).

En los ratones *WT*, la proporción de neuronas sensibles al frío es similar comparando el total de neuronas IB4+ e IB4- (9.5 % (4/42) y 12.2 % (14/110) ($p = 0.78$, prueba exacta de Fisher), aunque obviamente la proporción de neuronas que responden al frío es mucho mayor en las neuronas IB4- respecto al total de neuronas analizadas (9.2 % (14/152) y 2.6 % (4/152) respectivamente) (**figura 40E**), dado que esta población engloba a las neuronas TRPM8+ (recuérdese que para comparar entre genotipos no separamos por el marcaje de fluorescencia EYFP en el *WT*).

Cuando comparamos las respuestas entre las distintas líneas, la eliminación de TRPM8 o TRPA1 redujo la proporción de neuronas IB4- que responden al frío con respecto al total de neuronas analizadas de ratones *WT*, 3.9 % (19/491) en el ratón TRPM8^{KO} y 4.4 % (26/592) en el TRPA1^{KO} ($p < 0.05$ para ambos genotipos, prueba exacta de Fisher), lo que indica que ambos canales iónicos contribuyen a la respuesta al frío de esta población. En las neuronas IB4+ no se observaron cambios en la respuesta al frío para los ratones TRPM8^{KO} (2.6 % *WT* vs 3.7 % (18/491) TRPM8^{KO}, $p = 0.78$, prueba exacta de Fisher), lo que es consistente con la ausencia de TRPM8 en dicha subpoblación.

Por el contrario, la proporción de neuronas IB4+ sensibles al frío de ratones TRPA1^{KO} disminuyó drásticamente con respecto al *WT* sobre el total de neuronas analizadas (2.6 % *WT* vs 0.5 % (3/592) TRPA1^{KO}, $p = 0.035$, prueba exacta de Fisher), y sugiere que la respuesta al frío en esta subpoblación estaría mediada mayoritariamente por TRPA1 (**figura 40E**).

Finalmente, analizamos el umbral de temperatura en respuesta al frío de las poblaciones IB4- e IB4+ en los distintos genotipos. Dado que el frío fue el primer estímulo utilizado en nuestros protocolos de estimulación, se juntaron los datos de las tres tandas de los experimentos realizados (WS-12 a ambas concentraciones y mentol) para la condición silvestre. Los resultados obtenidos fueron muy informativos. En la **figura 40F**, se representa la temperatura media de acti-

vación para las neuronas IB4- e IB4+ de ratones *WT*, *TRPM8*^{KO} y *TRPA1*^{KO}. Las neuronas IB4- sensibles al frío de ratones *WT* se activan en un amplio rango de temperaturas, abarcando mayoritariamente umbrales bajos y muy altos. En contraste y tal como observamos en la sección anterior, la población IB4+ sensible al frío es mayoritariamente de alto umbral, es decir, responde principalmente a temperaturas muy bajas, menores de 19 °C. Así, el valor medio del umbral para la población IB4- resultó significativamente más bajo que para la población IB4+ (24.1 ± 0.75 °C IB4- vs 18.45 ± 1.11 °C IB4+, $p = 0.0002$ prueba ANOVA a una vía y análisis *post-hoc* Sidak, **figura 40F**).

En las neuronas IB4- de ratones *TRPM8*^{KO} desaparecen las respuestas al frío de bajo umbral, por lo que el umbral promedio de temperatura disminuyó significativamente al compararlo con las neuronas de animales silvestres (24.1 ± 0.75 °C *WT* vs 16.88 ± 0.5 °C *TRPM8*^{KO}, $p < 0.001$ prueba ANOVA a una vía y análisis *post-hoc* Sidak). En las neuronas IB4+ no se produjeron cambios en el umbral. Tampoco se encontraron diferencias cuando comparamos los umbrales de las neuronas *TRPM8*^{KO} IB4+ e IB4- (**figura 40F**). Esto es debido a que las respuestas de bajo umbral (> 26.5 °C) son mediadas por el canal *TRPM8*. En cambio, no hemos observado diferencias para las neuronas IB4+, que no expresan el canal *TRPM8*, pero sí *TRPA1*.

En los animales *TRPA1*^{KO} se produjo el cambio opuesto en la sensibilidad térmica de las neuronas IB4-, aumentando significativamente su umbral de temperatura con respecto a los animales silvestres (24.1 ± 0.75 °C *WT* vs 28.5 ± 1.1 °C *TRPA1*^{KO}, $p = 0.012$, prueba ANOVA a una vía y análisis *post-hoc* Sidak, **figura 40F**). Este cambio se debe a que desaparecen las respuestas al frío de muy alto umbral.

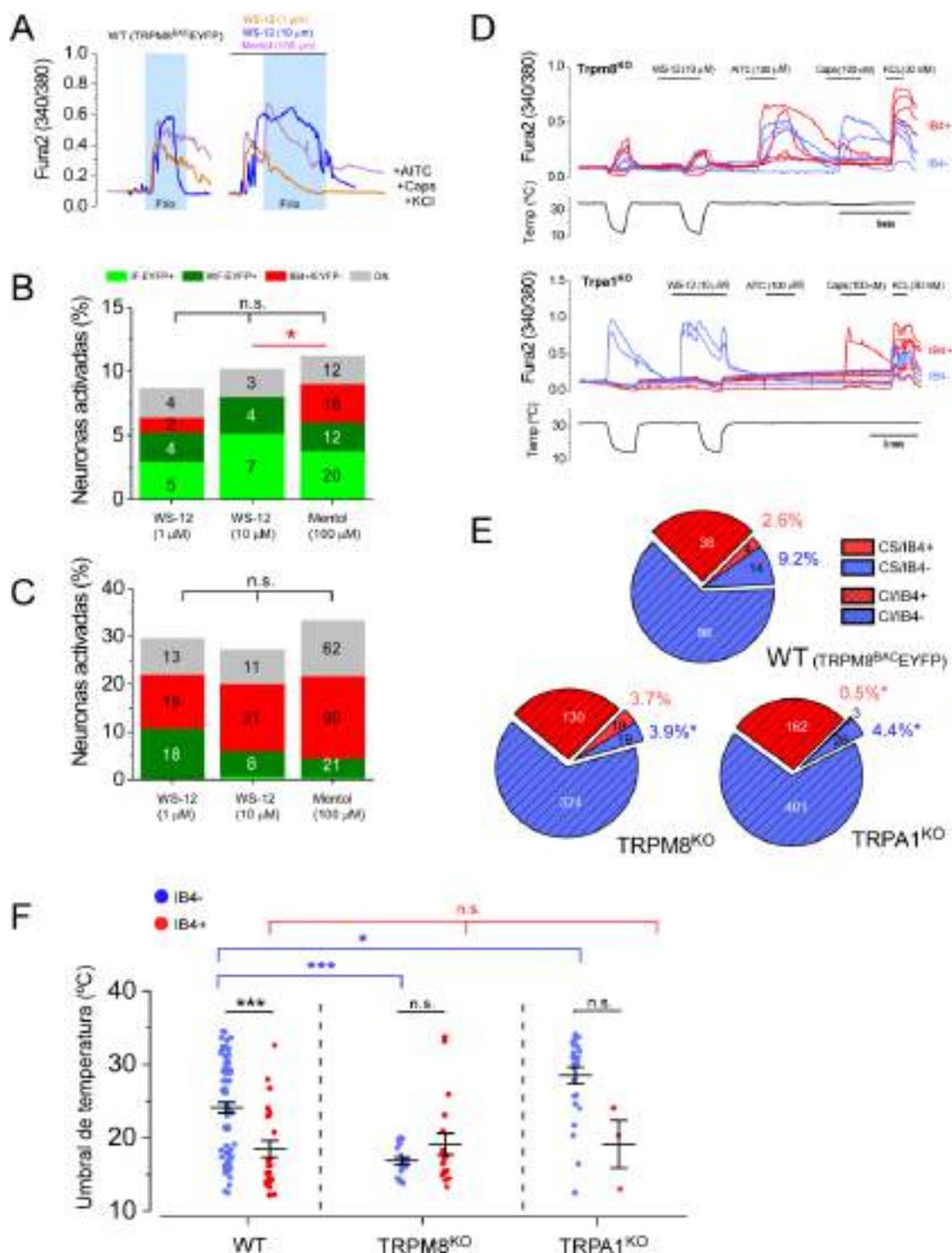


Figura 40. La eliminación de los canales TRPM8 y TRPA1 reduce las respuestas a frío en las poblaciones IB4- e IB4+. A) Trazos representativos de los incrementos del calcio intracelular (F340/380) en neuronas sensibles a mentol (100 μM) y WS-12 (a 1 μM y 10 μM) de tres registros independientes de ratones WT (TRPM8^{BAC}EYFP). La zona sombreada en azul representa el tiempo de aplicación de la rampa de frío. El eje X (tiempo, seg), se ha cortado para permitir alinear la longitud de los trazos. En los tres protocolos, tras la aplicación conjunta de WS-12/mentol y frío las neuronas se estimularon con AITC (100 μM), capsaicina (Caps, 100 nM) y KCl (30 mM) en este orden. B) Histograma comparativo de los porcentajes de respuesta a los agonistas del canal TRPM8, WS-12 (1 μM y 10 μM) y mentol (100 μM), en distintas subpoblaciones

de neuronas en ratones *WT* (*Trpm8*^{BAC}EYFP) marcados con la isolectina IB4, normalizado con respecto del número total de neuronas analizadas por cada tipo de estímulo. C) Mismo análisis que en B, para los porcentajes de respuesta al AITC para cada concentración testada de WS-12 (1 μ M y 10 μ M) y mentol (100 μ M). En las columnas se indica en número de neuronas que responden en cada subpoblación IF-EYFP+ (verde claro), WF-EYFP+ (verde oscuro), IB4+/EYFP- (rojo) y DN (gris). $n_{total}=172$ WS-12 (1 μ M), $n_{total}=152$ WS-12 (10 μ M) y $n_{total}=534$ mentol (100 μ M) neuronas analizadas de $n=2$ ratones para cada concentración de WS-12 y $n=7$ para el agonista mentol ($*p<0.05$ al comparar las respuestas a WS-12 (10 μ M) y mentol de la población IB4+/EYFP- indicado en rojo, prueba exacta de Fisher). D) Trazos representativos del cambio en el calcio intracelular de neuronas IB4+ (rojo) e IB4- (azul) obtenidas de un ratón *TRPM8*^{KO} (gráfico superior) y *TRPA1*^{KO} (gráfico inferior) en respuesta a los estímulos aplicados que se indican en la parte superior de la gráfica: frío ($\approx 12^{\circ}\text{C}$), WS-12 (10 μ M), AITC (100 μ M), capsaicina (100 nM) y KCl (30 mM). E) Gráficos de sectores circulares representado el porcentaje de neuronas IB4- e IB4+ que responden al frío (“CS, cold sensitive” y “CI, cold insensitive”) en ratones *WT*, *TRPM8*^{KO} y *TRPA1*^{KO} sobre el total de neuronas analizadas (azul y rojo respectivamente) ($*p<0.05$ al comparar el total de las respuestas al frío en los ratones deficientes respecto al *WT*, indicado en rojo o azul según corresponda a la población IB4- ó IB4+, prueba exacta de Fisher). F) Umbral promedio de temperatura ($***p<0.001$, $*p<0.05$, ANOVA-Sidak) para neuronas IB4- (azul) e IB4+ (rojo). $n_{total} = 152$ para *WT*, $n_{total} = 492$ para *TRPM8*^{KO}, $n_{total} = 592$ para *TRPA1*^{KO}; 2 ratones por genotipo.

Los resultados demuestran que la eliminación de los canales *TRPM8* y *TRPA1* afecta a la activación por frío de neuronas de bajo y alto umbral respectivamente, y dado que la población IB4- puede expresar *TRPM8* o *TRPA1*, decidimos separar la población sensible al frío en AITC- y AITC+. Tal como hemos comentado previamente, los datos para los ratones *WT* descritos en la **figura 40F** provienen de un conjunto de varias tandas de experimentos en los que usamos los agonistas mentol y WS-12. No obstante, previamente concluimos que la aplicación de mentol o WS-12 no afecta a dichas respuestas por lo que los datos incluyen las distintas tandas experimentales (véase de nuevo **figura 40C**).

En la **figura 41A** se muestra el porcentaje de neuronas AITC- y AITC+ sensibles al frío en función de su umbral de temperatura (LT-CS, HT-CS y vHT-CS). Las diferencias entre los genotipos son similares a lo observado cuando separamos en neuronas IB4- e IB4+. Para la población AITC-, las respuestas al frío de bajo umbral desaparecen en los ratones *TRPM8*^{KO} (6.76 % (39/577) *WT* vs 0.29 % (1/348) *TRPM8*^{KO}, $p < 0.001$, prueba exacta de Fisher), sugiriendo que *TRPM8* media estas respuestas ($> 26.5^{\circ}\text{C}$). Nótese que en la población AITC- también se reduce el número de las neuronas LT-CS y vHT-CS en los ratones *TRPA1*^{KO}, sugiriendo un posible mecanismo modulador de *TRPA1* sobre otros tipos de respuestas al frío no dependientes del canal, incluidas aquellas dependientes de *TRPM8* (Yamaki *et al.*, 2021) (**figura 41A**, gráfico superior). Por el contrario, al eliminar *TRPM8*, no hemos observado cambios en el número de neuronas sensibles al frío en las poblaciones HT-CS y vHT-CS para las neuronas AITC- y AITC+ (**figura 41A**, ambos gráficos). Asimismo, la ablación de *TRPA1* elimina completamente las respuestas al frío en neuronas AITC+ (**figura 41A**, gráfico inferior).

La **figura 41B** muestra el mismo análisis representado en la **figura 40F** separando a su vez en IB4- e IB4+ para las neuronas AITC- y AITC+ de ratones *WT*, *TRPM8^{KO}* y *TRPA1^{KO}*. Estos datos confirman que las neuronas AITC+ pertenecen a la población de alto umbral independientemente de si se unen o no a IB4, mientras que la población AITC- presentan temperaturas umbrales altas, > 26.5 °C. Curiosamente, seguimos viendo un aumento en el valor promedio del umbral en la población IB4-/AITC- de los ratones *TRPA1^{KO}* con respecto a los animales silvestres, aunque la diferencia no resultó significativa en este caso (26.3 ± 0.79 °C *WT* vs 28.5 ± 1.1 °C *TRPA1^{KO}*, $p = 0.44$, prueba ANOVA a una vía y análisis *post-hoc* Sidak, **figura 41B**).

Los diagramas de la **figura 41C** resumen los resultados, clasificando las neuronas sensibles a frío en función de su marcaje con IB4 y su respuesta a AITC. La ablación de *TRPM8* afecta casi exclusivamente a las neuronas sensibles al frío IB4-/AITC- (**figura 41C**); el porcentaje de esta población de neuronas disminuyó significativamente de un 9.4 % (59/631) en el grupo silvestre a un 2.3 % (8/343) en ratones *TRPM8^{KO}* sobre el total de neuronas analizadas ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher), indicando que *TRPM8* es el principal responsable de la detección del frío en esta población. La población IB4+ no se vio afectada en los animales *TRPM8^{KO}*, conservándose el porcentaje de neuronas activadas por frío y su sensibilidad a AITC.

Además, hemos observado que existe aún un pequeño porcentaje de neuronas AITC- que respondieron al frío en los ratones *TRPM8^{KO}*, tanto para la población IB4+ como IB4- (2.3 % (8/343) y 2.7 % (4/148) respectivamente). Estos datos son coherentes con otros resultados de estudios previos, donde se han observado algunas respuestas al frío independientes de la activación de *TRPM8* o *TRPA1*, lo que sugiere la existencia de un mecanismo adicional en la transducción del frío (Babes, Zorzon and Reid, 2004; Hjerling-Leffler *et al.*, 2007; Munns, AlQatari and Koltzenburg, 2007; Ran, Hoon and Chen, 2016; Memon *et al.*, 2017; Michot, Lee and Gibbs, 2018; Leijon *et al.*, 2019).

Finalmente, en los animales *TRPA1^{KO}* disminuyó significativamente la proporción de neuronas sensibles al frío, tanto entre las IB4- como las IB4+ con respecto a los animales *WT*. Como era de esperar, este descenso se debe a la completa desaparición de la población sensible al frío AITC+, (3.2 % (20/631) *WT* vs 0 % (0/427) en la población IB4-; y 8 % (18/227) vs 0 % (0/165) para la población IB4+, $p < 0.0001$ prueba exacta de Fisher, **figura 41C**), lo que evidentemente indica que la respuesta al frío en estas neuronas está mediada por *TRPA1*. Además, la ablación de *TRPA1* reduce el número de neuronas AITC- sensibles al frío en la población IB4-, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa (9.4 % (59/631) *WT* vs 6 % (26/427), $p = 0.06$), prueba exacta de Fisher). Este cambio ya se había observado en las **figuras 41A y B**, y sugiere un posible efecto modulador de *TRPA1* en neuronas sensibles al frío AITC-.

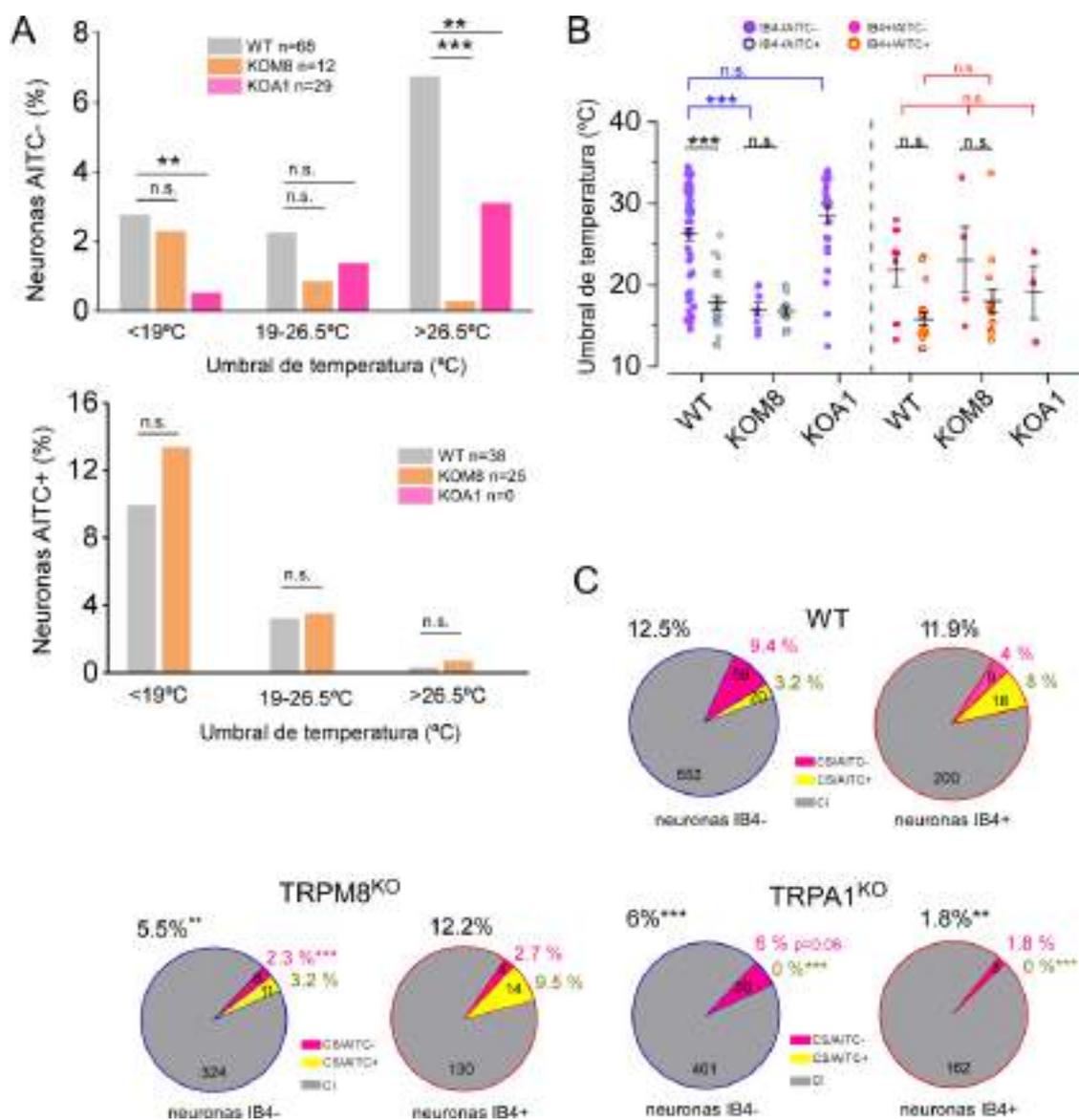


Figura 41. Las respuestas al frío de alto umbral en las neuronas AITC+ están mediadas por TRPA1. A) Porcentaje de neuronas sensibles al frío AITC- (gráfico superior) y AITC+ (gráfico inferior) en función de los distintos rangos de umbral de temperatura ($***p < 0.001$, $**p < 0.01$ prueba exacta de Fisher). B) Umbral promedio de temperatura de las neuronas AITC- y AITC+ en las poblaciones IB4- e IB4+ ($***p < 0.001$, ANOVA-Sidak). C) Gráficos de sectores circulares representado el porcentaje de neuronas IB4- e IB4+ que responden al frío (“CS, cold sensitive”, “CI, cold insensitive”) y a AITC en ratones WT, TRPM8^{KO} y TRPA1^{KO} sobre el total de neuronas analizadas (rosa o amarillo respectivamente). ($***p < 0.001$ y $**p < 0.01$, al comparar el total de las respuestas al frío en los ratones deficientes respecto al WT indicado en negro, y $***p < 0.001$ al comparar la población CS/AITC- (rosa) o CS/AITC+ (amarilla) de los ratones KO con el WT, prueba exacta de Fisher).

4.2. Análisis del transcriptoma de las neuronas TRPM8+ e IB4+

Tras caracterizar funcionalmente las poblaciones TRPM8+, IB4+ y DN en los ganglios raquídeos, nos planteamos obtener sus perfiles moleculares a través de la técnica RNA-Seq. Posteriormente, se realizó un análisis comparativo de estos resultados con otros estudios del transcriptoma de neuronas sensoriales.

4.2.1. Evaluación de la expresión del gen *Trpm8* en la población fluorescente EYFP de DRG y TG

Como ya se ha mencionado, la población de neuronas TRPM8+ se obtuvo mediante la purificación de neuronas EYFP+ en la línea transgénica TRPM8^{BAC}EYFP. Por ello, lo primero que hicimos fue verificar la especificidad del marcaje EYFP en este ratón transgénico. En el bloque experimental anterior, observamos que la proporción de neuronas WF-EYFP+ sensibles al frío y mentol es significativamente menor que en la población IF-EYFP+. Para confirmar que las diferencias funcionales se deben a la expresión variable del canal TRPM8, realizamos experimentos de doble hibridación *in situ* (RNAscope®) con las sondas EGFP y TRPM8 en rodajas de los ganglios DRG y trigéminos (TG) del ratón adulto (**figura 42A**). De este modo, constatamos que la co-expresión de ambos genes es alta: en DRG, el 63.6 % (124/195) del total de neuronas EYFP+ son TRPM8+, subiendo la co-expresión al 87 % (74/85) en el TG.

Al igual que en el análisis de la fluorescencia endógena, realizado en neuronas en cultivos, en este bloque de experimentos se pudo clasificar a las neuronas EYFP+ según su nivel de fluorescencia: en este caso, en función de la cantidad de “puntos fluorescentes” como medida de expresión del gen *Eyfp* (consultar detalles en materiales y métodos). Esto nos ha permitido establecer un paralelismo entre la población WF-EYFP+ caracterizada funcionalmente y la población con baja expresión del gen *Eyfp* identificada en los experimentos de hibridación *in situ*. La proporción de neuronas IF y WF-EYFP+ fue similar a la encontrada en los cultivos celulares, siendo menos abundantes las neuronas IF con un 21.5 % (42/195, DRG) y un 40 % (34/85, TG), mientras que las WF-EYFP+ constituyen el 78.5 % (153/195, DRG) y el 60 % (51/85, TG) del total de la población fluorescente.

Además, observamos que los niveles de expresión de *Eyfp* fueron directamente proporcionales a la expresión de *Trpm8*; en la **figura 42B** se calculó la correlación entre ambos genes ($R^2 = 0.59$ y $R^2 = 0.33$ en DRG y TG respectivamente). Esta relación fue estadísticamente significativa ($p <$

0.001, prueba de correlación de Pearson) y coherente con los resultados obtenidos en los experimentos de imagen de calcio, donde la población IF-EYFP+, que expresa más TRPM8, presenta amplitudes de respuesta más altas tras la aplicación de los estímulos de mentol y frío.

La representación de los porcentajes de co-expresión de *Eyfp* y *Trpm8* indican que un 93 % (39/42) y un 97 % (33/34) de las neuronas IF-EYFP+ expresan *Trpm8* mientras que el 56 % (85/153) y un 80 % (41/51) lo expresan en las neuronas WF-EYFP+, para DRG y TG respectivamente (**figura 42C**, gráficos circulares). La expresión media de *Trpm8* en las neuronas EYFP+ fue significativamente mayor en la población IF al compararla con la WF (62.6 ± 4.5 y 70 ± 4.7 para IF-EYFP+ vs 26.1 ± 1.7 y 51.3 ± 3.3 para WF-EYFP+, en DRG y TG, respectivamente, $p < 0.001$ para DRG y TG, prueba t-Student no pareada) (ver **figura 42C**, histogramas).

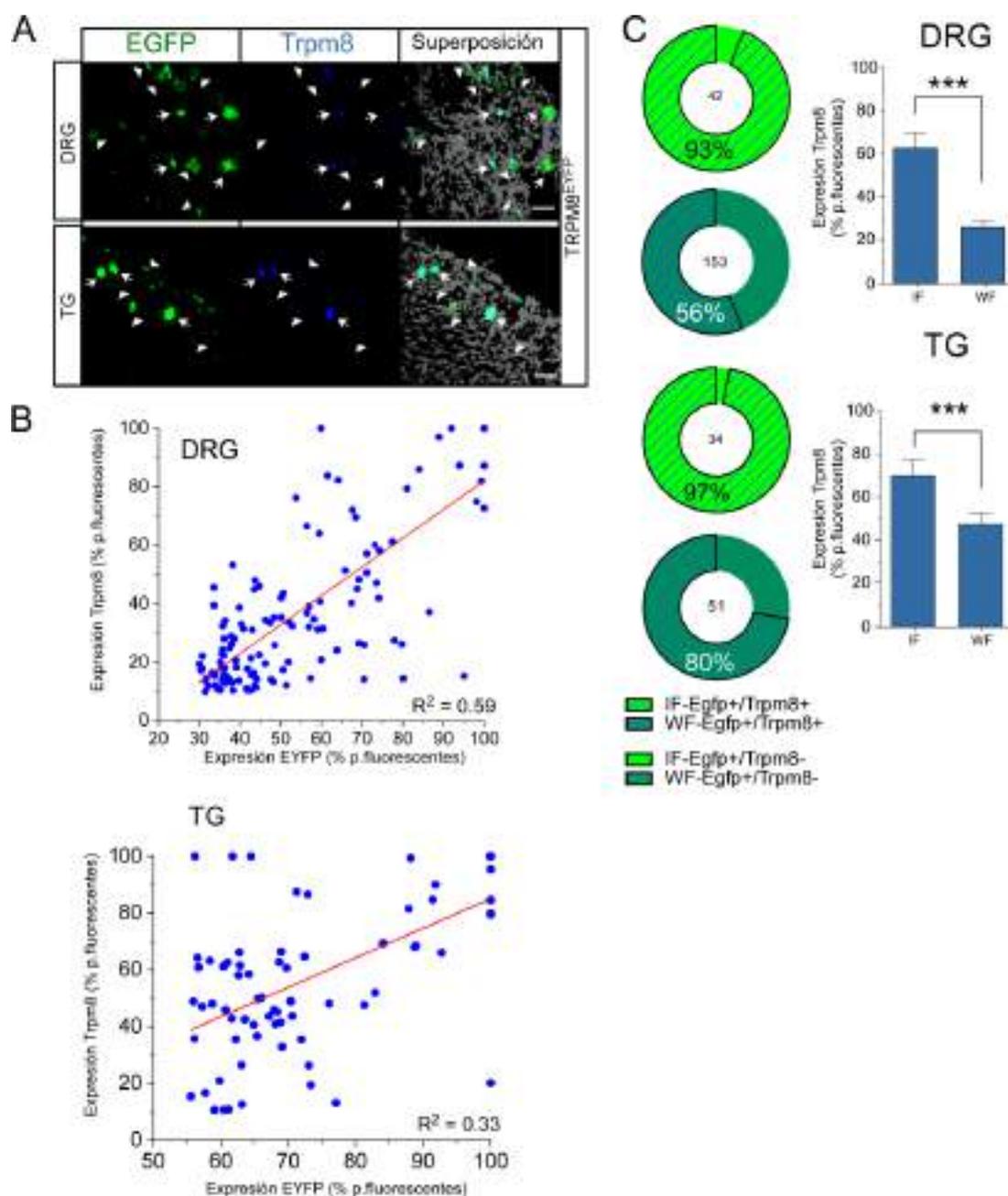


Figura 42. Correlación entre la expresión de *Trpm8* y EYFP en neuronas sensoriales de animales TRPM8^{BAC}EYFP. A) Imágenes representativas en microscopía confocal de la detección de ARNm de *Trpm8* y *Eyfp* con RNAscope en rodajas de DRG y TG de ratones TRPM8^{BAC}EYFP. Las imágenes de los paneles a la derecha muestran la fluorescencia superpuesta con el marcaje DAPI (en gris). Las flechas y las puntas de flecha indican neuronas consideradas como IF-EYFP+ y WF-EYFP+ respectivamente. Barra de escala: 50 μ m. B) Correlación de la expresión de *Eyfp* y *Trpm8* (puntos fluorescentes). Se indica el coeficiente de determinación (R^2) en ambos casos. C, izquierda) los sectores circulares muestran el porcentaje de neuronas TRPM8+ para las poblaciones IF-EYFP+ y WF-EYFP+ en ambos ganglios. C, derecha) expresión media del gen *Trpm8* (puntos fluorescentes normalizados) en neuronas doblemente positivas para *Trpm8* y *Eyfp* con expresión alta y baja de *Eyfp* (IF y WF respectivamente). (***) $p < 0.001$, prueba t-Student no pareada). $n = 125$ ($n_{total} = 1471$) y $n = 74$ ($n_{total} = 2007$) neuronas EYFP+/TRPM8+ de $n = 10$ y $n = 11$ rodajas de $n = 3$ ratones para DRG y TG respectivamente.

4.2.2. Aislamiento y secuenciación de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN

Tras validar la especificidad del ratón transgénico TRPM8^{BAC}EYFP para el marcaje de TRPM8, procedimos al estudio del perfil genético de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN. Para ello, aislamos dichas poblaciones usando la técnica de FACS, purificamos el RNA y posteriormente se realizó la secuenciación masiva del transcriptoma (**figura 43A**).

El ensayo de *RNA-Seq* se llevó a cabo usando la plataforma Illumina NextSeq500 para $n = 8$, $n = 7$ y $n = 7$ réplicas biológicas de las poblaciones enriquecidas de neuronas EYFP+, IB4+ y DN respectivamente. Tras la secuenciación de las librerías, se llevó a cabo un alineamiento de las lecturas frente al genoma de referencia de *Mus musculus*, usando el programa STAR. El detalle de los parámetros de calidad determinados para cada librería está indicado en la **tabla 6** del anexo 2.

En el panel de la izquierda de la **figura 43B**, se muestra un ejemplo de visualización del mapeo genético con las coordenadas del gen *Trpm8* para cada población neuronal, usando el programa *UCSC Genome Browser*. En ella, se representa el número de “lecturas” o fragmentos secuenciados que se alinean en la secuencia del genoma donde se localiza el gen *Trpm8*. Hay que señalar que solo se detectan trazos de secuencias que cubren dichas coordenadas en las muestras EYFP+ (rectángulo). Asimismo, para verificar la correcta separación de las neuronas, también se mapearon las lecturas de la secuencia de la proteína EYFP (**figura 43B** panel derecho).

La cuantificación de los niveles de expresión para el gen *Trpm8* (unidad de expresión en transcritos por millón, TPM) e *Eyfp* (unidad de expresión CPM, conteo por millón, dado que para la proteína fluorescente no normalizamos por la profundidad de la secuenciación) en cada población, se muestran en la **figura 43C**. Las muestras enriquecidas para la población EYFP+ expresaban niveles de expresión significativamente más altos del gen *Trpm8* y de *Eyfp* respecto a las poblaciones IB4+ y DN (**figura 43C**, $p < 0.01$ $p < 0.05$, prueba ANOVA-Tukey). En la **figura 43D**, se puede apreciar además que las muestras EYFP+ también expresan niveles más altos para la proteína fluorescente y presentan una correlación directa para los niveles de *Trpm8* ($R^2 = 0.94$, $p < 0.001$ prueba de coeficiente de correlación de Pearson).

También analizamos la asociación entre muestras de la misma población neuronal mediante el coeficiente de correlación de Spearman. En la **figura 43E** se observa un mapa de calor con los coeficientes de correlación para cada una de las réplicas biológicas secuenciadas. Para la población EYFP+ observamos una correlación más estrecha entre sus replicados biológicos que en las poblaciones IB4+ y DN (recuadros coloreados en amarillo).

Cuando realizamos el análisis de componentes principales (*PCA*), representado en la **figura 43F**, también observamos una agrupación más estrecha de las muestras EYFP+. El *PCA* es un análisis matemático que simplifica la dimensionalidad de las muestras y elimina las variables redundantes presentes en el estudio. Las características útiles se extraen de las variables originales y se combinan linealmente, reduciendo el número variables, ahora definidas como transformadas o componentes principales (*PC*). Su representación gráfica se basa en situar las muestras en función de su varianza, es decir, a mayor distancia entre las muestras mayor componente de la variable y por tanto mayor varianza. En esta figura se muestran las dos primeras dimensiones con mayor nivel de varianza (*PC1* representa el 37 % de la varianza del estudio y *PC2* 12 %). Dado que la dimensión *PC1* integra un porcentaje mayor, es el componente que más influye en la agrupación de las muestras, especialmente en la población EYFP+ (verde). Esto contrasta con la dispersión de las poblaciones IB4+ y la DN y se traduce a una mayor variabilidad. La dimensión *PC2* es la que define principalmente la segregación entre las muestras IB4+ y la DN.

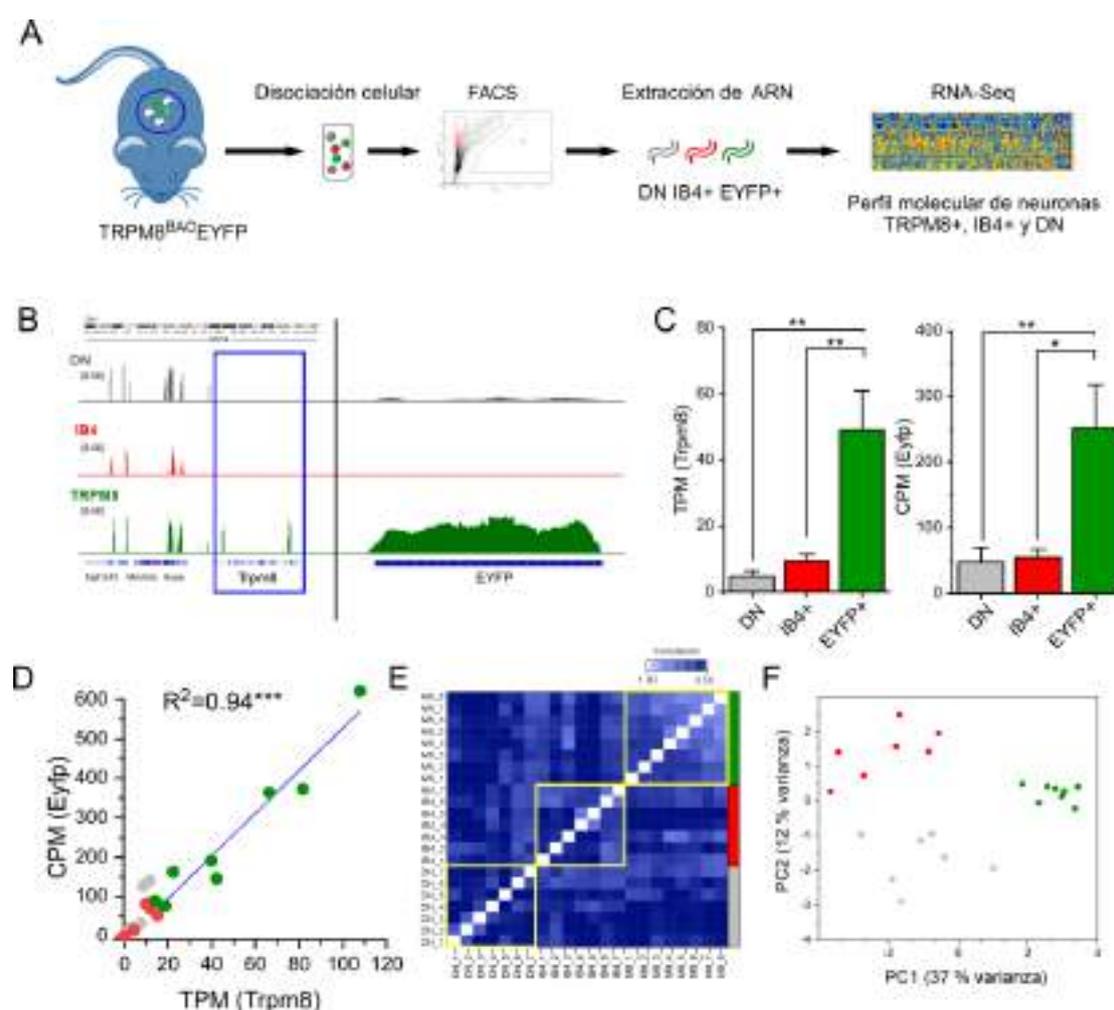


Figura 43. Mapeo genético y análisis exploratorio de los resultados obtenidos tras la secuenciación de las muestras EYFP+, IB4+ y DN. A) Esquema representativo del proceso seguido para el aislamiento y secuenciación de neuronas EYFP+, IB4+ y DN. B) Cobertura del genoma para la sección del cromosoma donde se localiza el gen *Trpm8* en un ejemplo de cada tipo de muestras DN, IB4+, EYFP+ (izquierda). A la derecha puede verse las mismas muestras alineadas localmente a la secuencia de la proteína fluorescente EYFP. C) Expresión media del gen *Trpm8* y *Eyfp* para las muestras secuenciadas de cada población. Unidad de expresión, TPM (transcrito por millón) y CPM (conteos por millón) (** $p < 0.01$ y * $p = 0.012$. Prueba ANOVA-Tukey). D) Correlación entre las unidades de expresión para ambos genes (*Eyfp* y *Trpm8*). Se muestra la regresión lineal con su coeficiente de determinación, $R^2 = 0.94$ ($p < 0.001$ ***, prueba de correlación de Pearson). E) Mapa de calor del coeficiente de correlación (Spearman) entre las muestras (unidad, conteos normalizados) y F) el análisis del componente principal (PCA, unidad de expresión \log_2 CPM) muestra una segregación diferente del transcriptoma para las tres poblaciones purificadas en los dos ejes. Número de replicados biológicos EYFP+ $n = 8$, IB4+ $n = 7$ y DN $n = 7$.

4.2.3. Análisis de la expresión diferencial en las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN

A continuación, a partir de los datos generados tras la secuenciación de las muestras, procedimos a identificar los genes diferencialmente expresados (*DE*) en cada población. El análisis diferencial se realizó comparando por pares, usando el paquete estadístico EdgeR (Robinson, McCarthy and Smyth, 2009); los resultados del análisis se representan en los diagramas “volcán” de la **figura 44A**. En el eje X se representan los valores, en base logarítmica (\log_2FC , FC “fold change”), de la expresión relativa que se obtuvieron para cada gen en las poblaciones neuronales indicadas. El valor p , corregido por el método *Benjamini-Hochberg* o FDR (False Discovery Rate), se representa en el eje Y como $-\log FDR$ para una mejor visualización de los datos, de manera que los genes con valores más altos tienen mayor poder estadístico; aquellos genes con un cambio logarítmico mayor de 1 ($\log_2FC > 1$) y un p -valor < 0.05 están coloreados en rojo y se consideraron como *DE*. Además, los gráficos de esta figura indican que existe una asimetría en la dispersión de los datos y se traduce en que el número de genes *DE* identificados fue mayor en las poblaciones IB4+ y DN respecto a la población EYFP+ (**figura 44A**).

En la población EYFP+ identificamos 85 genes diferencialmente sobreexpresados, es decir, genes *DE* positivamente con un $\log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$ con respecto a la población IB4+ y 212 al compararla con la población no fluorescente (DN). En cambio, en la población IB4+ encontramos 1536 genes con alta probabilidad de estar diferencialmente expresados con respecto a la población EYFP+ y 314 genes comparando con la población no fluorescente DN (**figura 44B**). Los genes diferencialmente sobreexpresados ($\log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$) al comparar ambas poblaciones se consideraron marcadores enriquecidos para esa población, siendo 43 para EYFP+ y 208 para IB4+.

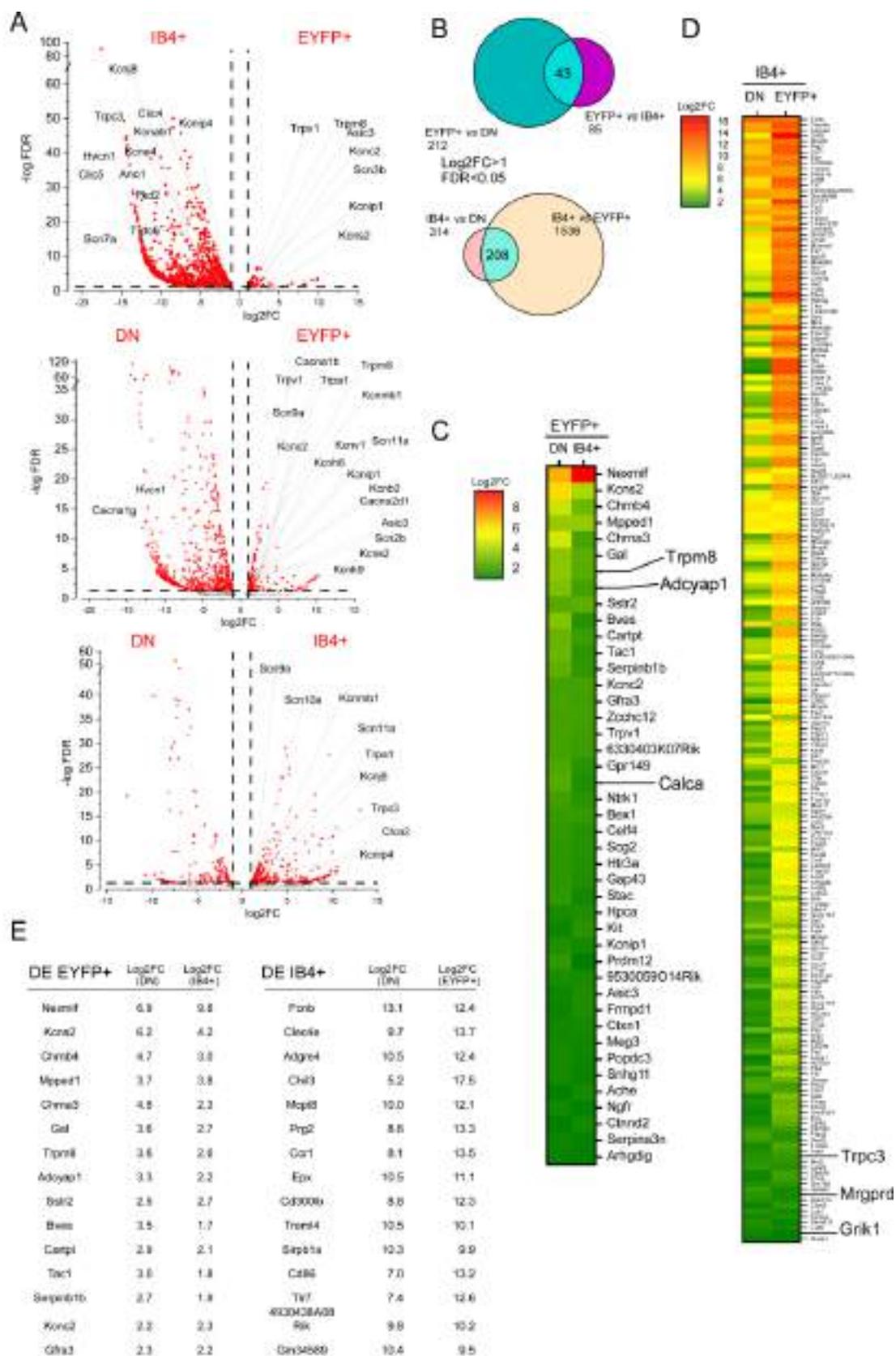


Figura 44. Análisis de expresión génica diferencial en las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN. A) Gráficos tipo volcán representando los genes diferencialmente expresados (*DE*) en cada una de las comparaciones realizadas por pares. Los puntos rojos representan genes diferencialmente expresados con un umbral $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$ y $\text{FDR} < 0.05$ (línea punteada). Se indican además los nombres de los canales iónicos diferencialmente expresados. B) Diagramas de Venn y C-D), mapas de calor, representando los genes diferencialmente sobreexpresados en las poblaciones EYFP+ e IB4+ ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ y $\text{FDR} < 0.05$ al compararlas con las otras dos poblaciones). La escala de color representa la unidad de expresión relativa (Log_2FC), siendo rojo el valor máximo y verde el mínimo. E) Tabla con los 15 primeros genes *DE* más abundantes según el Log_2FC para la población EYFP+ y IB4+.

En las **figuras 44C-D**, los genes enriquecidos para las poblaciones EYFP+ e IB4+ se representan con sus valores de expresión diferencial (Log_2FC al compararlos con las poblaciones restantes). Véase también la **tabla 44E** donde se indican los 15 genes más abundantes en función de su Log_2FC para las poblaciones EYFP+ e IB4+.

Los resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial ofrecen una lista muy heterogénea de moléculas, canales iónicos, neuropéptidos y factores de transcripción que están potencialmente enriquecidos en las neuronas EYFP+ e IB4+. En este listado aparece, como era de esperar, el gen *Trpm8* en las neuronas EYFP+ y el gen *Mrgrpd* en las IB4+ (Zylka, Rice and Anderson, 2005). También identificamos en la población EYFP+ el gen *Calca*, que codifica al neuropéptido CGRP o PACAP (*Adcyap1*) y son marcadores conocidos de nociceptores peptidérgicos (Zhang *et al.*, 1996).

En el análisis, nos centramos en el patrón de expresión de genes de familias de canales iónicos, receptores moleculares y neuropéptidos mediadores de la somatosensación y la nocicepción, que están diferencialmente expresados en las poblaciones EYFP+ e IB4+ (**figura 45A**). En general, la población EYFP+ muestra una elevada expresión en las familias de canales iónicos y moléculas analizadas, a excepción de algunos receptores GABAérgicos. Dentro de las distintas familias de canales iónicos podemos destacar las subunidades reguladoras KChIP1 (*Kcnip1*), Kv8.1 (*Kcnv1*) para los canales de potasio y *Asic3* de la familia de canales de sodio ASIC. El canal TASK3 (*Kcnk9*), cuya expresión en las neuronas TRPM8+ ya ha sido validada en estudios previos (Morenilla-Palao *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2019), se encuentra principalmente expresado en las muestras EYFP+. La población IB4+ se define, como cabría esperar, por la baja expresión de neuropéptidos. Además, destaca su enriquecimiento en receptores GABAérgicos, el receptor MRGPRD, la subunidad KChIP4 (*Kcnip4*) y el canal de potasio con rectificación interna (Kir), KIR6.1 (codificado por el gen *Kcnj8*). En cuanto a la familia de canales de sodio dependientes de voltaje, ambas poblaciones expresan canales TTX resistentes, particularmente interesante es la expresión de $\text{Na}_v1.8$ (*Scn10a*) y $\text{Na}_v1.9$ (*Scn11a*) en la población EYFP+, de la que no se tiene constancia en otros estudios de expresión. En relación con la familia de canales TRP, encontramos que los canales

TRPM8 y TRPV1 se expresan esencialmente en la población EYFP+, mientras que TRPA1 y TRPC3 presentan niveles elevados de expresión en la población IB4+. No obstante, nuestros datos también muestran expresión de TRPA1 en la población EYFP+, un resultado que contrasta con la baja o nula co-expresión de ambos canales que se evidencia en la literatura, dato que coincide con la baja reactividad de las neuronas EYFP+ al compuesto AITC (referente a la **sección 1** de los resultados).

También realizamos un análisis adicional, agrupando los genes en un contexto funcional. Para ello, analizamos si los genes *DE* de las poblaciones EYFP+ e IB4+ definen algún término ontológico en la categoría de proceso biológico (*BP*) de la base de datos *Gene Ontology* (*GO*). Estos términos constituyen una nomenclatura genérica para describir las funciones de genes con características comunes, en base a tres categorías: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares y es especialmente útil para detectar cambios en el perfil genético que puedan pasar inadvertidos con el análisis individual de genes. Nuestro interés se centró en agrupar los genes *DE* según su función para las poblaciones EYFP+ y IB4+ (genes sobreexpresados, $\log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$ al compararlos con la población negativa DN). El análisis inicial reveló que la población EYFP+ está relacionada con múltiples funciones neuronales como neurotransmisión, actividad iónica, señalización sináptica o percepción sensorial (**figura 45B**, histograma en verde). En comparación, la población IB4+ estaba significativamente enriquecida (p -valor < 0.05) con términos relacionados con el sistema inmune (p.e. “*Neutrophil mediated immunity*”, “*Neutrophil degranulation*”, “*Neutrophil activation involved in immune response*”, etc) (verse los términos del histograma coloreado en rojo de la **figura 45B**).

Debido al posible enriquecimiento de células no neuronales, evaluamos la pureza de las muestras analizadas clasificando los genes *DE* en función de su origen neuronal, no neuronal o inespecífico (véase materiales y métodos para más detalles). La población EYFP+ presenta el mayor grado de pureza con más del 85 % de los genes identificados de origen neuronal. Por el contrario, la población IB4+ presenta una menor cantidad de genes identificados como neuronales (24 %) siendo la mayoría inespecíficos (42 %) (Thakur *et al.*, 2014; Lopes, Denk and McMahon, 2017) o células satélites (34 %) (**figura 45C**). La presencia de un mayor porcentaje de genes con origen no neuronal puede ser debido a la adhesión de células endoteliales a la isolectina-B4 (Alroy, Goyal and Skutelsky, 1987). En la **tabla 7** del anexo 2 se indica el listado completo de genes.

Una vez reasignados los genes en función de su origen celular, realizamos de nuevo el análisis de ontología para los genes *DE* neuronales de las poblaciones EYFP+ e IB4+. Los términos con mayor poder estadístico fueron “*Chemical synaptic transmission*” y “*Anterograde trans-synaptic signaling*” para la población EYFP+, que son términos relacionados con la actividad neuronal.

Para la población IB4+ muchos de los términos encontrados están relacionados con la regulación del calcio intracelular (p.e. “Calcium-ion regulated exocytosis” o “Calcium ion-regulated exocytosis of neurotransmitter”). También encontramos términos que agrupan genes relacionados con funciones neuronales (“Neuronal action potential”, “Regulation of dopamine secretion”) o somatosensación o dolor (“Sensory perception of pain”). Nótese que los resultados para la población EYFP+ prácticamente no cambian en cuanto a los términos enriquecidos GO tras su filtrado, lo que apoya una gran pureza de esta población neuronal.

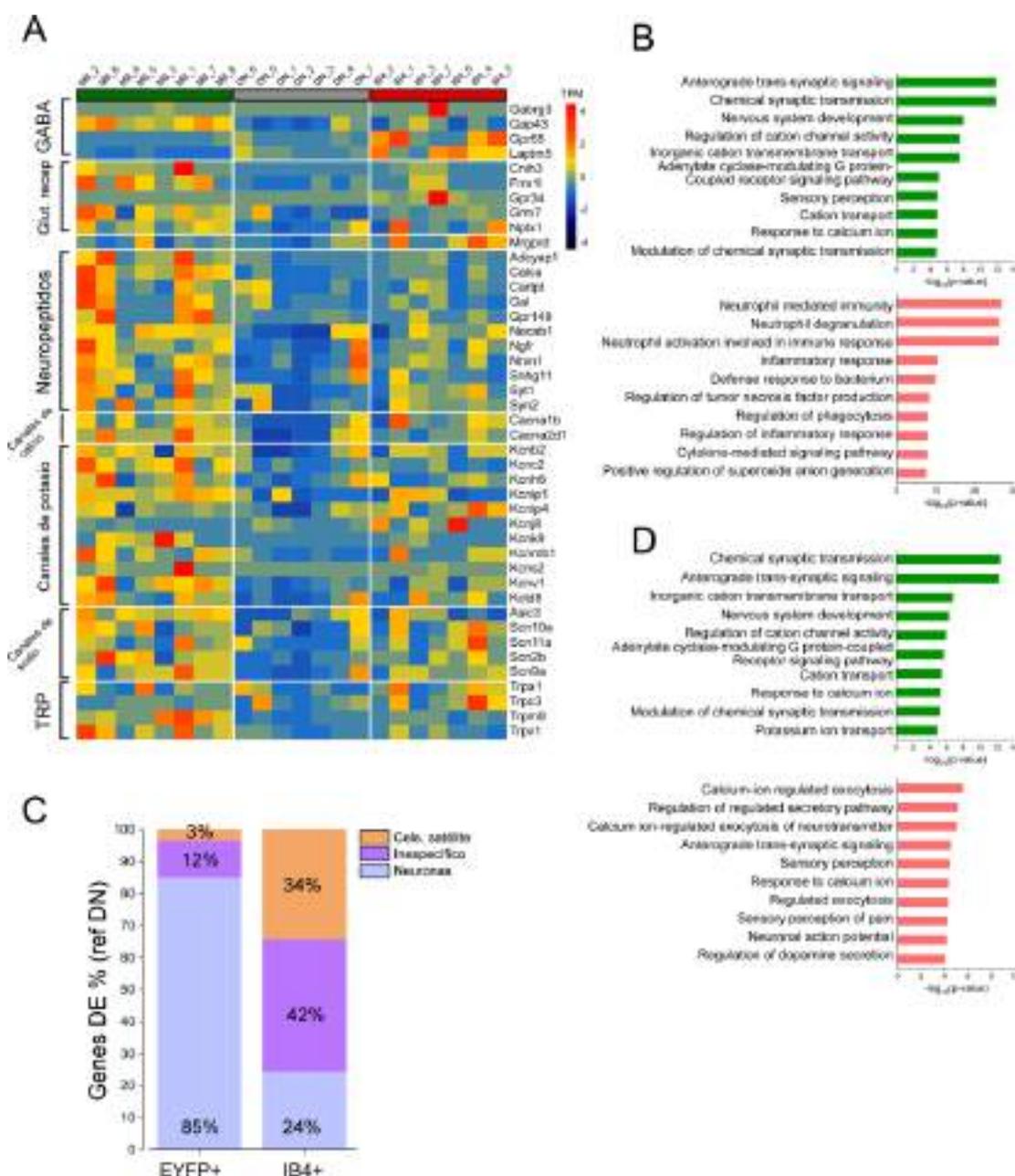


Figura 45. Perfil genético de las muestras EYFP+, IB4+ y DN. A) Mapa de calor de expresión de los transcritos (TPM) de genes *DE* de la población EYFP+ o IB4+ ($\log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$) para receptores glutamatergicos (Glut. recep.) o gabaérgicos (GABA), neuropéptidos y canales iónicos en las tres poblaciones de neuronas purificadas; las columnas muestran las muestras individuales y las filas los transcritos específicos. La escala de color representa los niveles de expresión, rojo indica expresión alta y azul expresión baja (unidad de expresión normalizada en TPM). B) Análisis de ontología genes *DE* al comparar por pares las poblaciones EYFP+ (verde) y IB4+ (rojo) respecto a la población DN con los 10 mejores términos en la categoría de proceso biológico (BP) de la base de datos GO. Se expresa en valor $-\log(p\text{-value})$. C) Porcentaje de genes de origen neuronal, no neuronal o indeterminado para los genes diferencialmente expresados de la población EYFP+ y IB4+ con respecto a la población control DN. D) Mismo análisis que en B teniendo en cuenta únicamente los genes con origen neuronal.

4.2.4. Estudio comparativo del transcriptoma de las poblaciones EYFP+ e IB4+ con diferentes bases de datos

A la vista de los resultados obtenidos, en los que observamos una expresión inesperada de neuropéptidos y otros marcadores de nociceptores en la población EYFP+, principalmente CGRP y canales de sodio resistentes a TTX, nos propusimos identificar la población TRPM8+ en las bases de datos de otros estudios. Para ello, comparamos el patrón de expresión obtenido de las poblaciones EYFP+ e IB4+ con los datos del transcriptoma de las principales subpoblaciones de neuronas que identifican a los grupos PEP, NPEP y NF de dichas bases de datos, tanto en trabajos de expresión poblacional como en estudios de expresión en célula única.

En una primera aproximación, los datos que obtuvimos para las poblaciones EYFP+ e IB4+ se compararon con la población IB4+/Na_v1.8+ e IB4-/Na_v1.8+, enriquecidas con el canal Na_v1.8+ de acuerdo con su fenotipo nociceptivo (Chiu *et al.*, 2014), y con la población de los mecanorreceptores tipo C de bajo umbral (C-LTMRs), también enriquecida con el canal Na_v1.8+ y principalmente identificada por la expresión de los marcadores *Th*, *VGLUT3* (Reynders *et al.*, 2015). Además, contrastamos nuestros datos con la población de los propioceptores que expresan el marcador parvalbumina (*Pvalb*), también aislada en el trabajo de Chiu y colaboradores y que corresponde a un conjunto de neuronas dentro de la población NF200 (NF) (véase materiales y métodos para más detalle).

En el mapa de calor de la **figura 46A** se representa, en unidades TPM, los genes enriquecidos en las poblaciones EYFP+ e IB4+ (genes *DE* enriquecidos con $\log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$ al compararlas con las poblaciones restantes), que son además marcadores específicos para las poblaciones Na_v1.8+/IB4+, Na_v1.8-/IB4-, C-LTMRs o propioceptores, identificados en sus respectivos estudios (Chiu *et al.*, 2014; Reynders *et al.*, 2015); en la barra lateral izquierda, se indica la identidad de cada subpoblación de la base de datos con la que estamos comparando nuestros datos (C-

LTMRs amarillo, rojo $Na_v1.8+/IB4+$, $Na_v1.8+/IB4-$ azul y propioceptores en verde). Su cuantificación puede verse además en la **figura 46B**. En ella se observa que todos los marcadores de nuestra población EYFP+ se identifican en la población $Na_v1.8+/IB4-$ de la otra base de datos que comparamos. En cambio, nuestra población IB4+ se define mayoritariamente por marcadores propios de la población $Na_v1.8+/IB4+$, junto con un menor número de otros genes que pertenecen a la población $Na_v1.8+/IB4-$ y prácticamente no encontramos marcadores comunes con los de las poblaciones C-LTMRs y propioceptores.

De los estudios mencionados, en el realizado por Chiu y colaboradores, examinan directamente la expresión diferencial entre las neuronas $Na_v1.8+/IB4-$ y $Na_v1.8+/IB4+$. Así pues, establecimos una relación para la unidad de expresión diferencial (en valor de $Log2FC$) obtenida de su estudio al comparar $Na_v1.8+/IB4-$ vs $Na_v1.8+/IB4+$ con nuestros datos cuando comparamos las poblaciones EYFP+ vs IB4+. Si la población EYFP+ identifica al conjunto de neuronas $Na_v1.8+/IB4-$ deberíamos observar una buena correlación entre los cambios en la expresión diferencial de ambos estudios. No obstante, y tal como puede observarse en la **figura 46C**, no encontramos una relación directa entre ambas bases de datos. Esto sugiere que, aunque la población EYFP+ presenta marcadores específicos comunes a la población $Na_v1.8+/IB4-$ no la representa en su totalidad.

Los resultados de la secuenciación muestran además una alta expresión del canal TRPV1 en nuestra población EYFP+. Está descrito que TRPV1 se expresa en un 40 % de las neuronas TRPM8+ (Lippoldt *et al.*, 2013; Morenilla-Palao *et al.*, 2014) y en aproximadamente el 26 % de las neuronas $Na_v1.8+$, siendo la mayoría positivas dentro de la población TRPV1+ (sólo el ~5 % de las neuronas TRPV1+ no expresan el canal) (Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018). Por consiguiente, decidimos contrastar nuestra población EYFP+ con la población TRPV1+, aislada también mediante la técnica de *FACS-Seq*, en el trabajo de (Goswami *et al.*, 2014). En este caso, se ha comparado el valor medio de la unidad de expresión en TPM o RPKM ("*Reads per kilo base per million mapped reads*") para las muestras TRPM8+ y TRPV1+ respectivamente, ya que los trabajos presentan estrategias de separación celular diferente: en nuestro caso, separamos en las tres poblaciones EYFP+, IB4+ y DN, mientras que en el estudio de Goswami y cols, separan sólo en dos (TRPV1- y TRPV1+). Así pues, no podemos analizar la expresión diferencial, sino que tenemos que comparar ambas poblaciones en función de su expresión absoluta. La correlación entre ambas unidades de expresión fue alta y estadísticamente significativa ($p < 0.001$, prueba de correlación de Pearson) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.697 (**figura 46D**).

En resumen, la comparación con otros estudios de expresión realizado por *FACS-Seq* concluye que:

- La población EYFP+ expresa marcadores específicos de la población nociceptiva Nav1.8+/IB4- (estudio de Chiu y cols). No obstante, la correlación entre las poblaciones indica que el perfil de expresión de las neuronas EYFP+ no representa a la población Nav1.8+/IB4- sino más bien una subpoblación de ésta.
- La comparación con el trabajo de Goswami y cols, junto con la alta expresión del canal TRPV1 indica que la población EYFP+ es molecularmente semejante a la población de neuronas TRPV1+, que también expresa Nav1.8+. Si bien es cierto que se ha demostrado la expresión de TRPV1 en las neuronas TRPM8+, parece estar presente en algo menos de la mitad de la población, sin mencionar que la co-expresión de Nav1.8+ y TRPM8 es prácticamente inexistente según lo descrito en la bibliografía.

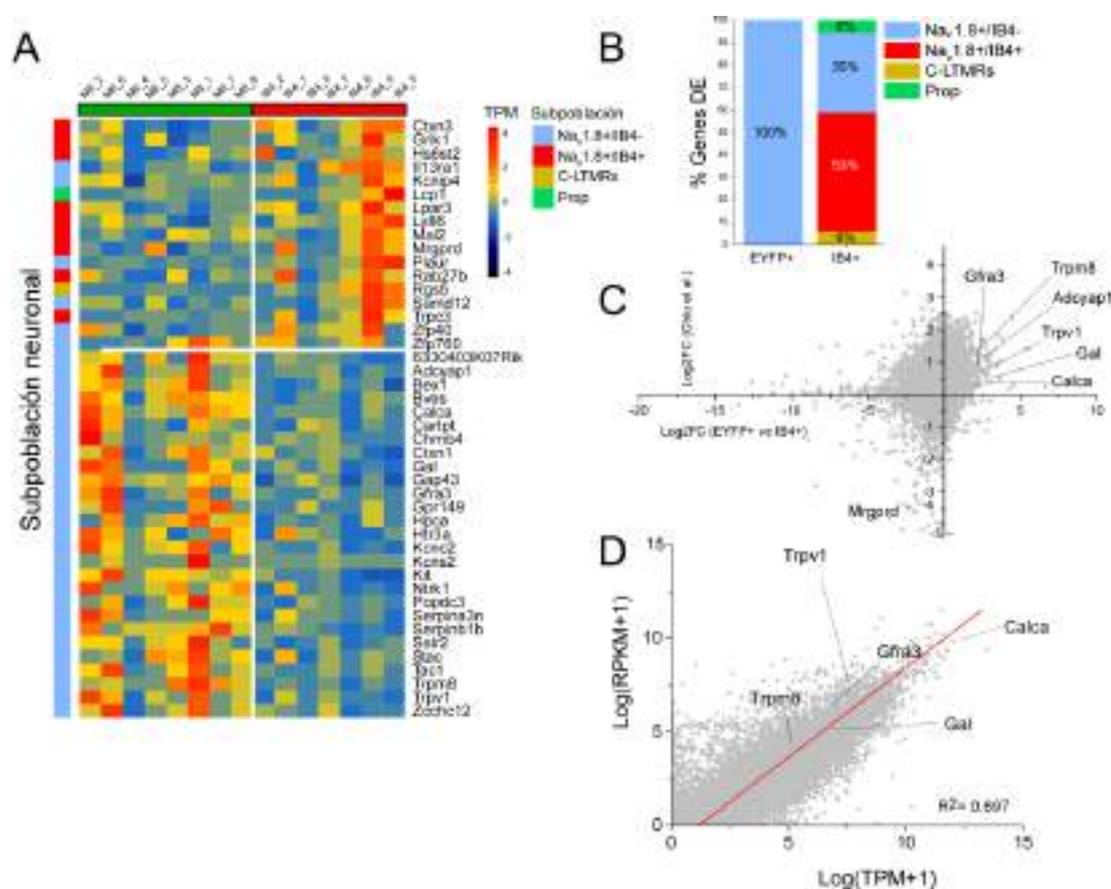


Figura 46. Comparación del perfil genético de nuestras muestras IB4+ y EYFP+ con otras bases de datos de FACS-Seq. A) Mapa de calor representando la unidad de expresión en TPM de los genes DE para la población EYFP+ o IB4+ (genes DE con $\log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$ al compararlos con las otras dos poblaciones) que son además marcadores para las neuronas Nav1.8+/IB4- (azul), Nav1.8+/IB4+ (rojo), mecanorreceptores de bajo umbral tipo C (C-LTMRs, amarillo) o propioceptores *Pvab1+* (Prop, verde). Escala de color en unidad de expresión normalizada (TPM) que representa en rojo expresión alta y azul expresión baja. B) Histogramas apilados mostrando el porcentaje de los genes DE para la población EYFP+ y IB4+ que son

marcadores específicos para las poblaciones mencionadas de otros estudios. C) Gráfico de dispersión representando la unidad de expresión diferencial (Log_2FC) al comparar las poblaciones Nav1.8+/IB4- vs Nav1.8+/IB4+ del trabajo de Chiu et al, con la expresión diferencial entre neuronas EYFP+ vs IB4+ de nuestro estudio. D) Correlación de los valores de expresión para la población TRPV1+ ($\text{Log}_2(\text{RPKM}+1)$, *Read per kilobase million*, eje Y) del trabajo de Goswami et al., 2014, con la población EYFP+ de nuestro estudio ($\text{Log}_2(\text{TPM}+1)$, eje X). *** $p < 0.001$, prueba de correlación de Pearson, $R^2 = 0.697$.

Debido a que los trabajos más recientes de transcriptómica están identificando cada vez más subpoblaciones neuronales molecularmente distintas, quisimos comprobar además si el patrón genético observado en la población EYFP+ coincide con los subgrupos moleculares identificados en los estudios de secuenciación de célula única. Aunque generalmente, se detecta un menor número de genes que en la secuenciación en bloque, la secuenciación de célula única permite identificar grupos poblacionales más selectivos.

Para el análisis comparativo con los trabajos de secuenciación de célula única, se combinaron las bases de datos procedentes de diferentes estudios, (Usoskin et al., 2015; Li et al., 2016; Zeisel et al., 2018; Sharma et al., 2020) siguiendo el protocolo de análisis descrito en el trabajo de Ma et al., 2020, aumentando así el número de neuronas sensoriales analizadas disponibles. Brevemente, las neuronas de DRG secuenciadas se agruparon y se normalizaron en función del tamaño de las librerías (valor medio de la suma de las lecturas para todas las células) y la variabilidad preexistente por efecto de lote entre los distintos trabajos se corrigió por el método “*matching mutual nearest neighbors*”, (MNN, verse materiales y métodos). Dado que en los diferentes estudios mencionados identificaron distintos subgrupos celulares, y con el objetivo de unificarlos, reasignamos de nuevo los tipos neuronales de las neuronas secuenciadas en los primeros trabajos publicados de Li y Usoskin. Para ello, un predictor de clases a partir de un modelo inicial, utilizó como referencia los subgrupos identificados en los trabajos más recientes de Zeisel y Sharma (véase materiales y métodos para más detalles).

Los gráficos de las **figuras 47A**, muestran parte del protocolo de normalización y la identificación de los subgrupos neuronales; en los dos primeros gráficos se representan la relación de los componentes principales (PC) para las neuronas individuales secuenciadas antes y después de su normalización y la transformación por el método MNN. Obsérvese que antes del análisis, las neuronas se agrupaban según pertenezcan a un estudio u otro, indicando claramente un efecto de lote de cada condición experimental. Una vez realizada la transformación, las neuronas se agrupan independientemente del trabajo del que procedan. El último gráfico muestra la distribución de las neuronas analizadas tras la identificación y agrupación en función de los subgrupos neuronales. El gráfico está representado utilizando el algoritmo estadístico t-SNE (“*T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*”), un proceso de reducción de dimensionalidad derivado del

análisis de componente principal (PCA). Este tipo de análisis permite una mejor visualización de distintos subgrupos en bases de datos complejas, como es en el caso de la secuenciación por célula única. En el gráfico se indican los principales subgrupos moleculares de neuronas sensoriales identificados en la mayoría de los trabajos publicados sobre *scRNA-Seq* (“A β -LTMR”, “C-LTMR”, “Neuronas de frío”, “NF1 (A δ -LTMRs)”, “NF4 (propioceptores)”, “NP1 (Mrgprd-noci)”, “NP2 (Mrgpra3-pruriceptores)”, “NP3 (Sst-pruriceptores)”, “PEP1.1 (C-noci)”, “PEP1.2 (C-noci)”, “PEP1.3 (C-noci)”, “PEP1.4 (C-noci)”, “PEP2 (A δ -noci)”).

A continuación, se obtuvo el nivel de expresión medio y el número de neuronas positivas en cada nuevo subgrupo neuronal identificado, que expresaban algunos de los marcadores (genes sobreexpresados de la población EYFP+ con respecto a IB4+ y la DN), que se identificaron en la sección anterior (referente a la **figura 44C**). En la **figura 47B**, los círculos representan la expresión de cada gen *DE* de nuestra población EYFP+ en cada una de las nuevas poblaciones identificadas en el análisis de célula única. Las poblaciones peptidérgicas PEP1.1-4 y PEP2 están enriquecidas para muchos de los marcadores de la población EYFP+. Esto contrasta con la expresión del gen *Trpm8*, restringida solamente dentro del grupo de “neuronas de frío”.

Análogamente, cuando contrastamos qué genes *DE* identificados para las poblaciones EYFP+ e IB4+ son marcadores específicos para cada subpoblación neuronal, observamos que las subpoblaciones de neuronas peptidérgicas contienen una proporción mayor de marcadores coincidentes para la población EYFP+ (**figura 47C**, histograma, verde). Por otro lado, el perfil molecular de la población IB4+ está constituido en gran parte por marcadores de la población MRGPRD+ y seguidamente por neuronas MRGPRA3+. También se puede apreciar que encontramos marcadores específicos de otras subpoblaciones en menor proporción.

En conclusión, el estudio comparativo en este bloque de experimentos nos ha permitido definir el carácter molecular de las poblaciones neuronales EYFP+ e IB4+ aisladas tras el FACS. Contrario a nuestras expectativas, la población EYFP+ define además un conjunto de neuronas Nav1.8+ peptidérgicas con alta expresión para el canal TRPV1, sugiriendo un perfil nociceptivo no identificado en los estudios de expresión. Por su parte, la población IB4+ purificada presenta cierto grado de contaminación por células de origen no neuronal, como pueda ser glía o células satélites. No obstante, aún somos capaces de asociar el perfil de expresión con la población neuronal IB4+, tanto en estudios llevados a cabo usando *FACS-Seq* cómo *scRNASeq*.

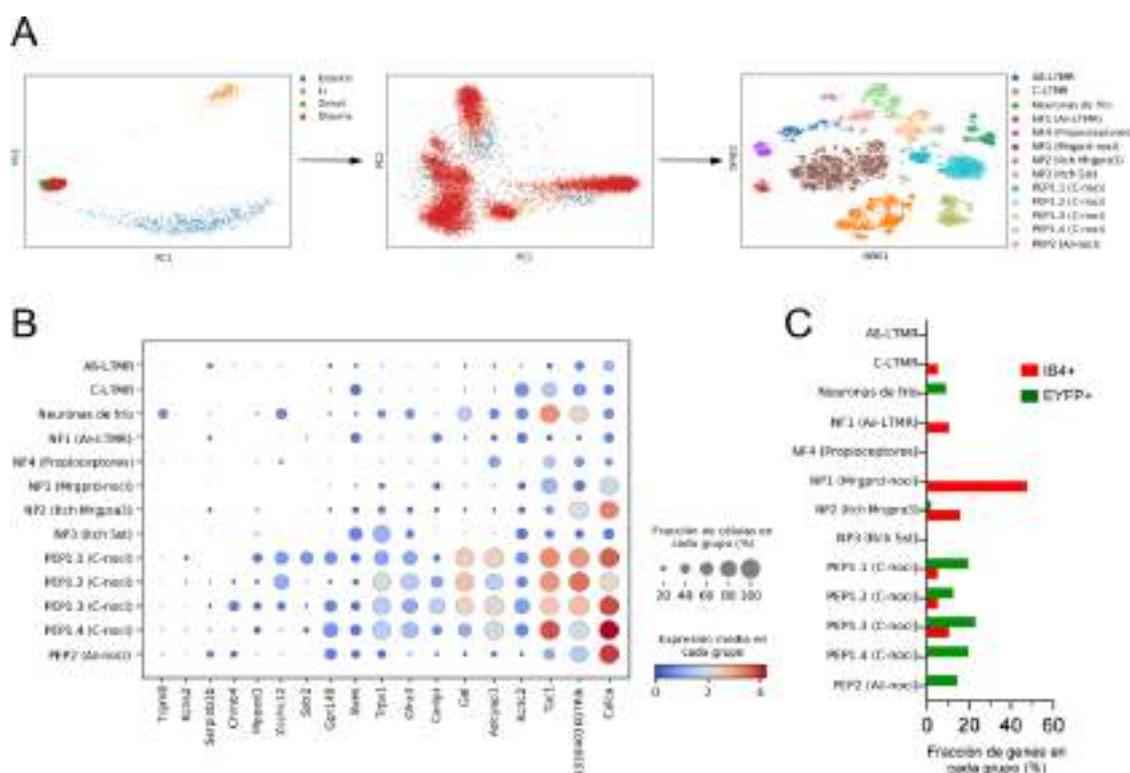


Figura 47. Comparación del perfil genético de nuestras muestras IB4+ y EYFP+ con otras bases de datos de *scRNA-Seq* de neuronas sensoriales. A) Los datos del transcriptoma de célula única de los estudios de Usoskin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Zeisel *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2020, se transformaron y normalizaron por el método *MNN*. El gráfico PCA de la izquierda muestra dos componentes principales para las neuronas secuenciadas de la base de datos de Usoskin (azul), Li (naranja), Zeisel (verde) y Sharma (rojo) anterior y posterior a su normalización (gráfico PCA central). Nótese que el número de neuronas del trabajo de Sharma es mucho mayor que el del resto (Usoskin $n=622$, Zeisel $n=1580$, Li $n=204$ y Sharma $n=10029$ células). A la derecha se muestra un gráfico t-SNE tras la normalización, identificando los principales tipos celulares encontrados en los trabajos de *scRNA-Seq* para neuronas de DRG (Gatto *et al.*, 2019). B) Distribución de la expresión de algunos de los genes *DE* de nuestra población EYFP+, en función de cada uno de los subgrupos neuronales identificados por análisis *scRNA-Seq*. El porcentaje de células positivas en cada subpoblación que expresa dicho gen (unidad de expresión > 0) está representado por el tamaño del círculo y el valor medio de la expresión del gen se representa por el color del círculo. C) Porcentaje de genes *DE* para la población EYFP+ (verde) e IB4+ (rojo) ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$, $\text{FDR} < 0.05$ al compararlas con las otras dos poblaciones), que identifican a los 100 primeros marcadores específicos de cada tipo celular según su Log_2FC .

4.3. Heterogeneidad molecular de las neuronas TRPM8+

En la literatura, no existen datos que demuestren de manera consistente la co-expresión de las neuronas TRPM8+ con marcadores nociceptivos como $\text{Na}_v1.8$ y/o CGRP, entre otros. No obstante, los estudios de expresión más recientes sugieren la presencia de una población con baja expresión para el gen *Trpm8* que no ha sido caracterizada en su totalidad (Nguyen *et al.*, 2017; Kupari *et al.*, 2021). Para validar si el perfil molecular de nuestra población EYFP+ que aislamos

por FACS corresponde a esta población, nos propusimos primero identificarla *in silico* en trabajos recientes de secuenciación de célula única. La diversidad de las neuronas TRPM8+ se confirmó posteriormente en los experimentos de hibridación *in situ* que realizamos en ratones WT (C57BL/6Jrj) y transgénicos para la línea TRPM8^{BAC}EYFP.

4.3.1. Identificación de neuronas TRPM8+ de baja intensidad en diversos tejidos somatosensoriales

En el bloque experimental previo, obtuvimos el perfil génico de las neuronas sensoriales EYFP+ e IB4+ purificadas en el ratón TRPM8^{BAC}EYFP y observamos que la población EYFP+ posee una gran similitud con los nociceptores Nav1.8+ peptidérgicos. En línea con este novedoso resultado, otros estudios han observado que una pequeña fracción de neuronas TRPM8+ expresan el neuropéptido CGRP (*Calca*), marcador de neuronas peptidérgicas (Lippoldt *et al.*, 2013; De Jong *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2017). En concreto, Nguyen *et al.*, 2017, observaron una subpoblación de neuronas TRPM8+/CGRP+ al secuenciar a nivel de célula única el transcriptoma de las neuronas sensoriales del ganglio trigémino. Estas neuronas no se clasificaron dentro de los dos subgrupos TRPM8+ identificados, denominados en el trabajo como C1 y C2, posiblemente debido a que dichas neuronas presentaban niveles de expresión para *Trpm8* muy bajos.

Con esta premisa, utilizamos la base de datos de este estudio para identificar la población de neuronas TRPM8+ peptidérgicas de nuestro trabajo. Los datos originales de Nguyen y cols, se representan en el inserto de la **figura 48A** y marcada con un círculo rojo se indican las subpoblaciones TRPM8+. También se ha marcado en un círculo azul a los subgrupos donde se asignaron las neuronas TRPM8+/CGRP+. Para identificar la población de neuronas con baja expresión del gen, re-analizamos los datos del estudio considerando que una célula es positiva para *Trpm8* si expresa cualquier valor de expresión > 0 y volvimos a determinar los subgrupos moleculares mediante el análisis de agrupación o “*clustering*” exclusivamente en las neuronas TRPM8+. Así, nos aseguramos de que todas las neuronas TRPM8+ se clasifiquen independientemente de otros grupos celulares. Tras definir los componentes principales que determinan la complejidad de los datos, las células se agruparon en función de su perfil molecular mediante el algoritmo de Seurat Lovain, véase materiales y métodos para más detalle). La **figura 48A** muestra la nueva agrupación de las neuronas TRPM8+ visualizadas con el método de reducción de dimensionalidad tSNE. El análisis detecta cuatro subpoblaciones molecularmente distintas. El primer dato interesante es que los cuatro grupos encontrados presentan un nivel variable de expresión para el gen

Trpm8, lo cual sugiere que su función como termorreceptores también es distinta. Se denominaron HighM8, M1M8 y M2M8 (“M”, “medium”) y LowM8; la expresión media para el gen fue 2.3 ± 0.05 , 1.82 ± 0.04 , 1.79 ± 0.05 y 1.1 ± 0.07 respectivamente (unidad de expresión RPM, “reads per million”, gráfico violín de la **figura 48A**).

Los 10 genes con mayor expresión en función de su *Log2FC* para cada subgrupo se indican en el mapa de calor de la **figura 48B**, donde se representan sus valores de expresión en unidad RPM. En el eje horizontal se representan las neuronas TRPM8+ reagrupadas en función de los subgrupos identificados. Resaltamos que el grupo LowM8 posee una alta expresión para genes con propiedades nociceptivas, siendo *Calca* uno de los más abundantes en unidad de expresión media. Otro marcador específico de esta población es el canal de sodio $\text{Na}_v1.9$ (*Scn11a*), expresado también en la población EYFP+ según el análisis de expresión diferencial (véase de nuevo la **figura 45A**).

Respecto a las otras poblaciones TRPM8+, no pudimos deducir su posible función a partir de los marcadores más abundantes, aunque destacamos la expresión del péptido galanina (*Gal*) en uno de los dos grupos de neuronas con expresión media (M2M8). *Gal* es también un marcador expresado en nuestra población EYFP+ y en la población TRPM8+ según otros estudios de expresión de neuronas sensoriales primarias, en los que se encuentra el trabajo original de Nguyen y colaboradores (Nguyen *et al.*, 2017; Zeisel *et al.*, 2018; Hockley *et al.*, 2019). Por otro lado, los subgrupos HighM8 y M1M8 son semejantes molecularmente hablando, dado que poseen una expresión similar media para muchos de los genes identificados. Con todo, destaca una expresión elevada de la enzima glutatión peroxidasa 1 (*Gpx1*) o el neurofilamento de cadena media (NF-M), codificado por el gen *Nefm*, en el grupo HighM8. En contraste, el marcador de propioceptores *Pvab1* y el polipéptido ligero de neurofilamento (NF-L, *Nefl*) se encuentran más expresados en la población M1M8. Cabe destacar que el grupo M1M8 también expresa la subunidad β del canal de sodio *Scn4b*, comúnmente conocido como marcador de neuronas PVALB+ (Chiu *et al.*, 2014).

Dado que el trabajo de Nguyen y cols. está realizado en neuronas procedentes del ganglio trigémino, realizamos el mismo análisis de “clustering” para el conjunto de neuronas de DRG de las bases de datos que proceden de la combinación de los trabajos de Usoskin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Zeisel *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2020, obtenidos por secuenciación de célula única y analizados en el apartado anterior. Si bien hay un número mayor de células secuenciadas en DRG, el número de neuronas TRPM8+ fue similar en ambos ganglios, lo que concuerda con una mayor expresión de TRPM8 en el TG.

Tras el análisis, logramos identificar cuatro subgrupos de neuronas con expresión variable de *Trpm8* en unidades RPM (1.58 ± 0.03 , 1.34 ± 0.02 , 1.3 ± 0.04 y 0.9 ± 0.03 , gráfico violín de la **figura 48C**) y que denominamos igualmente, HighM8, M1M8, M2M8 y LowM8. Similar al estudio en TG, en el mapa de color de la **figura 48D** se representan los 10 genes más abundantes en cada subgrupo en función de su *Log2FC*. De nuevo, el grupo de baja expresión para *Trpm8* LowM8_DRG, presenta también marcadores nociceptivos, destacando *Calca*, *Nav1.8 (Scn10a)* y *Nav1.9 (Scn11a)*. En cambio, las poblaciones TRPM8+ con expresión media y alta para el gen, no comparten los marcadores encontrados en las neuronas del trigémino, indicando que su naturaleza molecular es distinta. El gen de la pronociceptina *Pnoc*, se expresa especialmente en las neuronas de DRG de alta expresión y ya había sido identificado previamente como marcador del subgrupo PEP7 en el trabajo de Zeisel y cols del 2018.

Los resultados obtenidos en el bloque 2 de experimentos indican que las neuronas EYFP+ aisladas por FACS poseen una expresión elevada de marcadores nociceptivos, incluidos *Calca*, *Snc11a* o *Scn10a*, también presentes en los grupos LowM8 de neuronas TG y DRG. Estos datos sugieren que la mayoría de las neuronas EYFP+ aisladas pertenecen al grupo LowM8. Para explorar esta hipótesis, en los mapas de calor de las **figuras 48E** se muestra la expresión de los genes *DE* identificados en la población EYFP+ para las neuronas analizadas por scRNA-Seq. Tal como se observa, la mayoría de los marcadores presentan una expresión más alta en el grupo LowM8.

Además, en los histogramas de las **figuras 48E**, hemos cuantificado el número de genes *DE* para la población EYFP+ que son también marcadores específicos para los subgrupos M8 según el análisis de los datos por célula única. Se aprecia que los genes *DE* de la población EYFP+ definen principalmente al grupo LowM8.

En resumen, estos datos sugieren que el perfil nociceptivo de la población EYFP+ se debe a la existencia de un subgrupo de neuronas con baja expresión de TRPM8 que expresan también CGRP y *Nav1.8* entre otros muchos. Esta población no había sido identificada previamente y su baja expresión para el gen *Trpm8* sugiere que se trata de neuronas WF-EYFP+ caracterizadas en la línea TRPM8^{BAC}EYFP. Las neuronas WF-EYFP+ representan el 80 % de las neuronas EYFP+, lo que a su vez explica el hecho de que la mayoría de los genes *DE* identificados tras su aislamiento pertenezcan al grupo LowM8, dado que es la población más abundante.

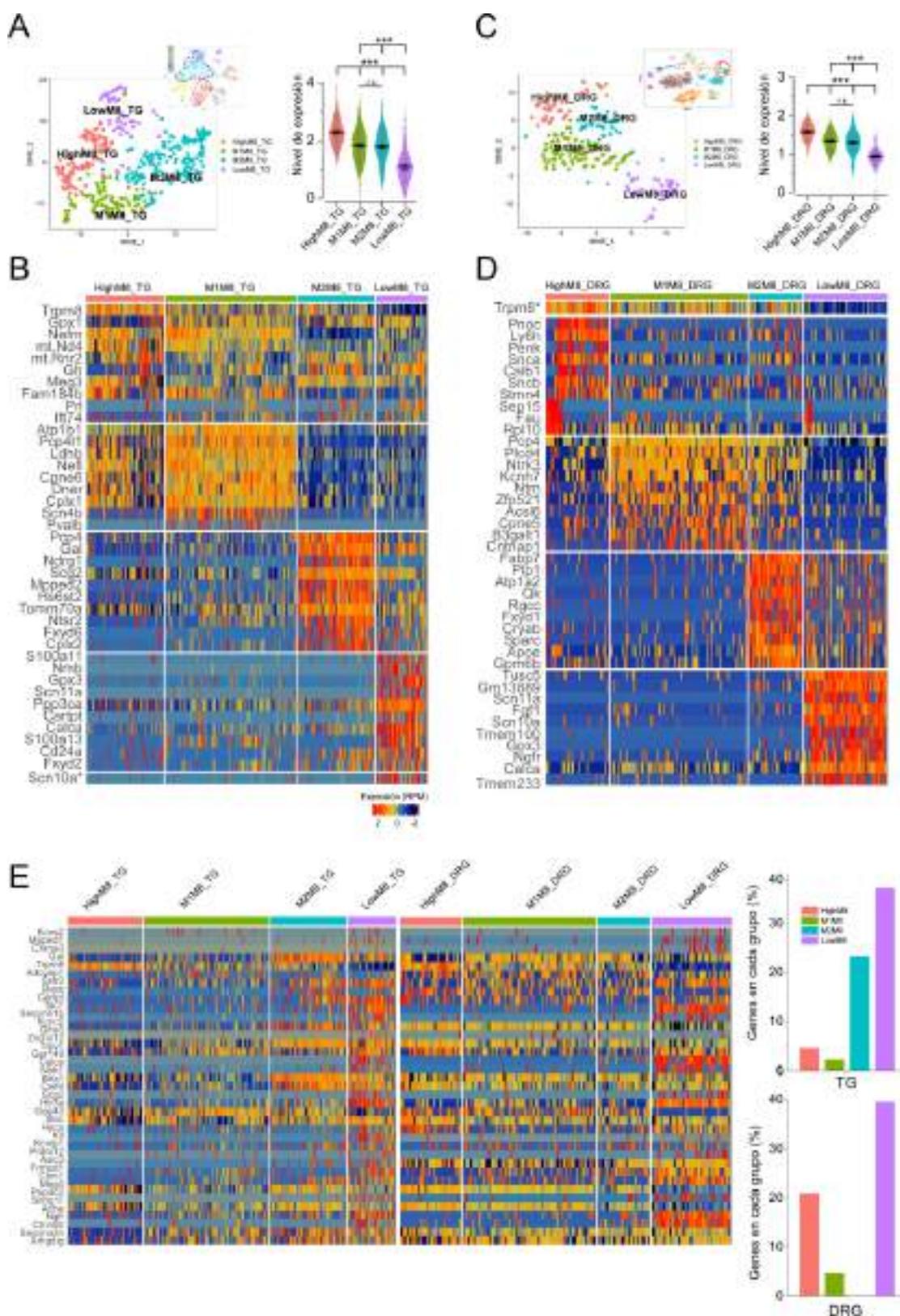


Figura 48. Identificación molecular de diferentes subgrupos de neuronas TRPM8+. A) Gráficos t-SNE, representando la agrupación de las subpoblaciones de neuronas TRPM8+: HighM8, M1M8, M2M8 y LowM8, identificadas a partir de los datos originales de las poblaciones C1 y C2 del estudio de Nguyen y colaboradores en TG, señalado en rojo en el inserto. A la derecha se muestra un gráfico violín con la expresión media del gen *Trpm8* para cada uno de los subgrupos identificados (unidad de expresión RPM,

*** $p < 0.01$, prueba ANOVA-Tukey). B) Mapa de calor representando la unidad de expresión (RPM, escala de color, azul mínimo y rojo máximo) de los 10 genes con mayor expresión diferencial (Log_2FC) para cada subgrupo TRPM8+ identificado de neuronas TG. C, D) Mismo análisis realizado en A y B para las neuronas DRG analizadas en la **sección 4.2.4** que se obtuvieron a partir de la agrupación y normalización de las bases de datos de los trabajos de Usoskin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Zeisel *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2020. En el inserto en C se indica con un círculo rojo la población TRPM8+ identificada en este análisis. Debido a su relevancia en este trabajo, la expresión de los genes *Scn10a* para TG y *Trpm8* para DRG, se representaron también en los mapas de calor de en B y D (*). Estos genes son también marcadores para los grupos LowTRPM8 y HighTRPM8, respectivamente, pero no entraron dentro de los 10 mejores según su Log_2FC . E) Expresión (RPM) de los genes *DE* identificados para la población EYFP+ y obtenidos en la **sección 4.2.3**, en cada uno de los subgrupos TRPM8+ obtenidos por *scRNA-Seq*; los histogramas a la derecha muestran la proporción de genes *DE* identificados de la población EYFP+ en la **sección 4.2.3** que identifican a marcadores de los subgrupos de TRPM8+ (para considerarse marcador la expresión debe superar el $log_2FC > 0.25$ al comparar con los subgrupos restantes). El porcentaje está expresado sobre el total de genes *DE* de la población EYFP+ (n=43).

Seguidamente analizamos en más detalle el perfil molecular de los grupos de alta y media expresión de TRPM8. A excepción del grupo LowM8, tal como se aprecia a simple vista en la figura anterior, no observamos marcadores comunes entre las neuronas TRPM8+ de DRG y TG. Por ello, con el objetivo de determinar si las subpoblaciones de neuronas TRPM8+ identificadas en los distintos ganglios son similares entre ambos tejidos, evaluamos su analogía usando el programa estadístico *MetaNeighbor* (Crow *et al.*, 2018). El método es una variante del realizado en la **sección 4.2.2**, **figura 43E**, para análisis de célula única. En este caso se calcula el coeficiente de correlación Spearman entre células individuales vecinas en vez de por muestra o replicado biológico. Posteriormente, el algoritmo intenta predecir el tipo celular asignado en función del coeficiente y puntúa la semejanza entre dos grupos con el valor AUC o AUROC (área bajo la curva ROC, "Receiver Operating Characteristic"). Cuanto más cercano a 1 sea el valor AUROC mayor probabilidad de que ambos grupos sean idénticos, mientras que un valor de 0.5 nos indica una relación aleatoria.

En la **figura 49A** se representa una matriz con los valores AUROC obtenidos tras el análisis de *Metaneighbor* de las subpoblaciones de neuronas TRPM8+ del TG y de DRG. Las poblaciones LowM8 de TG y DRG son las que presentan una correlación más estrecha con un valor AUROC > 0.9. Por el contrario, las poblaciones de alta y media expresión tienen una menor correlación, lo que indica que existen diferencias entre los subgrupos TRPM8+ de alta y media expresión cuando comparamos entre TG y DRG en cuanto a su perfil molecular.

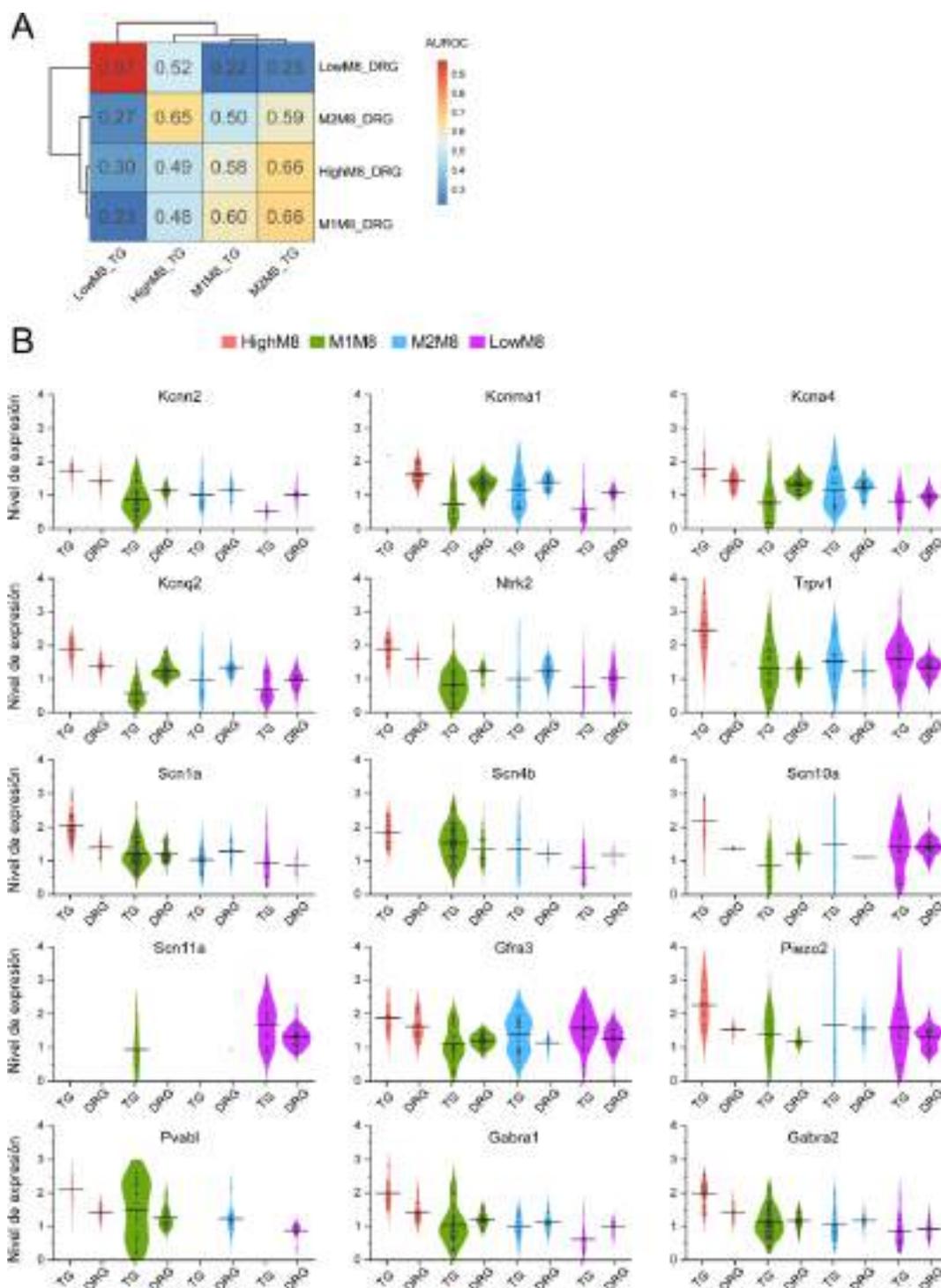


Figura 49. Comparación de composición molecular de los subgrupos de neuronas TRPM8+ de TG y DRG.

A) Mapa de calor mostrando los resultados tras el análisis *MetaNeighbor* en versión no supervisada. En el eje vertical se indican los subgrupos TRPM8+ en DRG y en horizontal los subgrupos en TG. Los números dentro de las celdas indican el valor AUROC para cada comparación. La escala de color indica el valor AUROC normalizado, siendo rojo el máximo valor y por tanto máxima similitud y azul el mínimo y mayor diferencia. B) Gráficos violín representando la expresión media de los genes con una expresión variable entre los subgrupos de TG y DRG.

El análisis de *Metaneighbor* nos permite identificar, además, los genes específicos que son variables entre TG y DRG para cada subgrupo (HighM8, M1M8, M2M8 o LowM8). En los gráficos de violín de la **figura 49B**, se muestran algunos de estos marcadores, encontrándose que muchas de las diferencias moleculares entre los subgrupos TRPM8+ en DRG y TG se debe a una expresión diferencial de canales iónicos. Podemos destacar los canales de potasio activados por calcio o Kca BKca1.1 (*Kcma1*) y SKca (*Kcnn2*), con valores de expresión más altos en las neuronas HighM8 de DRG y TG, respectivamente. Además, los canales K_v7 (*Kcna2*), Trpv1, Na_v1.1 (*Scn1a*), la subunidad beta tipo 4 (*Scn4b*), o el canal mecanosensible PIEZO2 y las subunidades alfa 1 y 2 de los receptores GABAérgicos (Gabra1 y Gabra2), tienen mayor nivel de expresión en las neuronas HighM8 del TG en comparación con los DRG.

4.3.2. Validación de la heterogeneidad molecular de las neuronas TRPM8+

En la sección anterior, demostramos mediante el re-análisis de las bases de datos de célula única existentes que los subgrupos de neuronas TRPM8+ presentan diferencias moleculares entre sí, tanto en TG como DRG. Para validar estos resultados, realizamos experimentos de hibridación *in situ* fluorescente (RNAscope) en cortes histológicos de DRG en animales silvestres (C57BL/6JRj) para intentar identificar la expresión de los marcadores en los distintos subgrupos. Se seleccionaron, por un lado, genes expresados diferencialmente en la población LowM8 de DRG (con baja expresión de TRPM8+ según el análisis de la sección anterior, **sección 4.3.1**). En concreto, estudiamos la expresión de los genes *Cacna2d1*, *Calca*, *Gfra3*, *Trpv1*, *Scn11a*, *Trpa1*, *Htr3a* y *Piezo2*. La mayoría de estos genes están expresados diferencialmente en nuestra población EYFP+ obtenida por la técnica de *FACS-RNASeq* (véase de nuevo las **figura 44C** y **45** del bloque 2 de experimentos), y son además conocidos marcadores peptidérgicos. En el caso del receptor de serotonina tipo 3 (*Htr3a*) y *Piezo2* también se expresan en neuronas mielínicas (Ranade *et al.*, 2014; Ritter and Southard-Smith, 2016; Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018). Por otro lado, seleccionamos marcadores para los grupos de alta y media expresión de TRPM8+ (HighM8, M1M8 y M2M8), algunos de ellos validados en la población general, según otros estudios, TRPM8+: *Cplx1*, *Foxp2*, *Gal*, *Nefh*, *Tac1* y *Pnoc* (Kobayashi *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2017; Zeisel *et al.*, 2018), además del canal ASIC1 y TREK-1, codificado por los genes *Asic1* y *Kcnk2* (Yamamoto, Hatakeyama and Taniguchi, 2009; Morenilla-Palao *et al.*, 2014; Adelman *et al.*, 2019). También estudiamos su co-expresión con dos marcadores que definen poblaciones mecanorreceptoras de bajo umbral (LTMRs), que supuestamente están sobreexpresados en el grupo intermedio M2M8 (*Th* y *Ntrk2*).

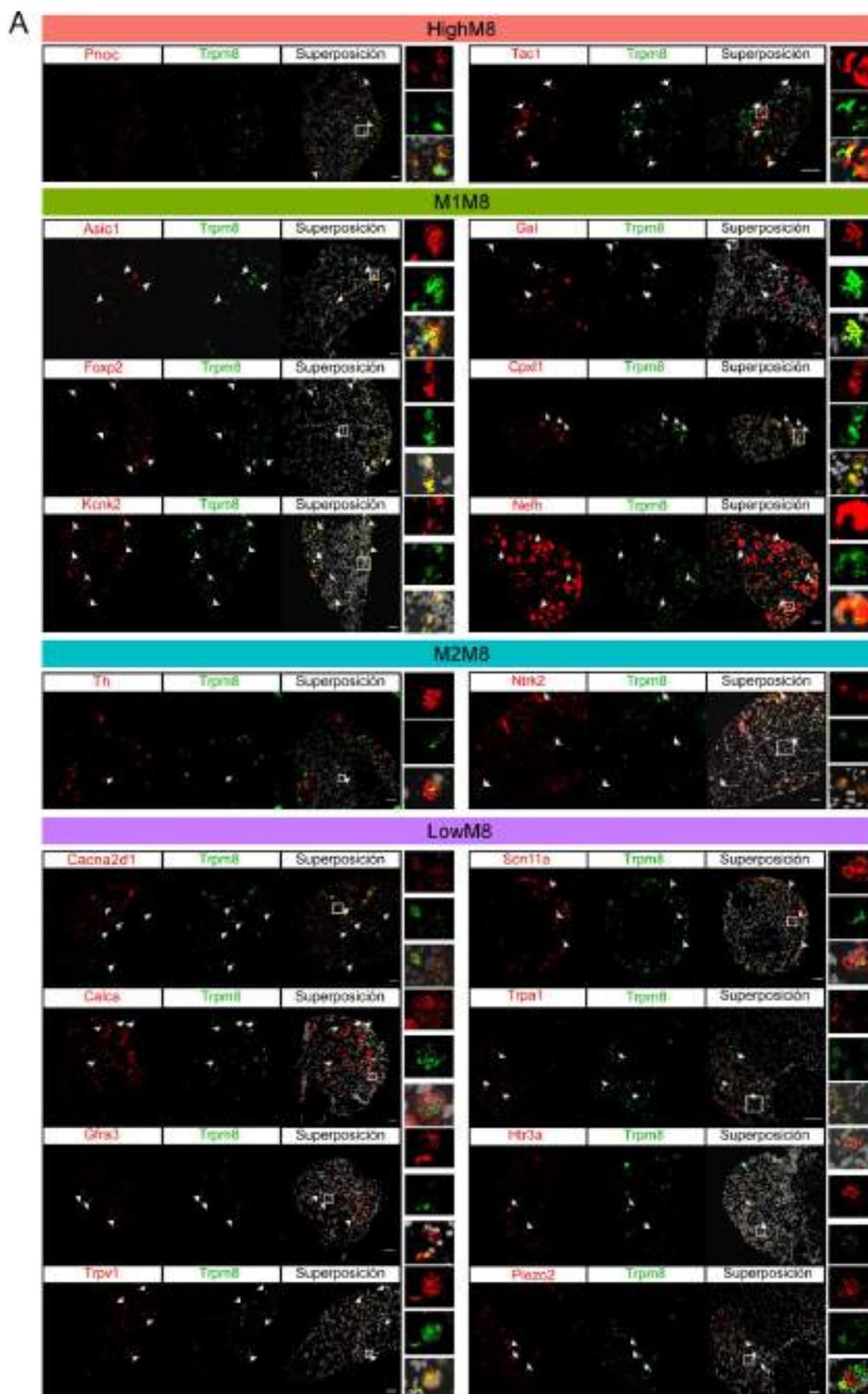
La **figura 50A** muestra imágenes representativas del doble marcaje para cada gen expresado en los distintos grupos TRPM8+, indicado en la parte superior de la imagen, de *Trpm8* y de la imagen superpuesta de ambos marcajes. Las neuronas que expresan los dos marcadores se indican con las flechas y los insertos ampliados muestran ejemplos de co-expresión con *Trpm8*.

Obsérvese también que en el mapa de calor de la **figura 50B** se representan los valores de expresión de las neuronas de DRG en función de los subgrupos TRPM8+, obtenidos del re-análisis de los datos en la sección anterior (referente a la **figura 48D**), para cada marcador estudiado en esta sección.

Los histogramas de la **figura 50C** indican la proporción de neuronas que co-expresan *Trpm8* y el gen seleccionado tras la cuantificación de las imágenes obtenidas por RNAscope. Su cuantificación muestra mayor co-localización de los marcadores identificados para los genes *Pnoc* y *Foxp2*, seguido por *Kcnk2*, *Cplx1* y *Ntrk2*, para los grupos de expresión alta e intermedia (HighM8, M1M8 y M2M8, respectivamente). Destaca el elevado porcentaje de neuronas con expresión de *Trpm8* y TrkB+ (*Ntrk2*). Este resultado puede ser considerado como anómalo ya que no se ha descrito previamente la co-expresión de estos dos genes, incluso inconsistente según ciertos estudios en la especie murina (Kobayashi *et al.*, 2005; Nickolls *et al.*, 2020).

Para *Asic1*, *Nefh* y *Gal*, su porcentaje de co-expresión fue bajo aunque coherente con los datos de otros estudios ya que se conoce su expresión en neuronas de gran tamaño con propiedades mecanosensibles (Cheng, Jiang and Chen, 2018), mielínicas y peptidérgicas respectivamente.

Por el contrario, los marcadores para las neuronas con baja expresión de TRPM8+, exhiben porcentajes de co-expresión bajos con *Trpm8*, siendo los más altos para *Cacna2d1* (subunidad del canal Ca_v, $\alpha\delta 1$), *Trpv1* y *Scn11a*. Estos datos son coherentes con lo publicado en la literatura, ya que son marcadores conocidos de nociceptores peptidérgicos. Por tanto, podemos concluir que las neuronas TRPM8+ de baja expresión representan una fracción muy pequeña del conjunto de neuronas peptidérgicas.



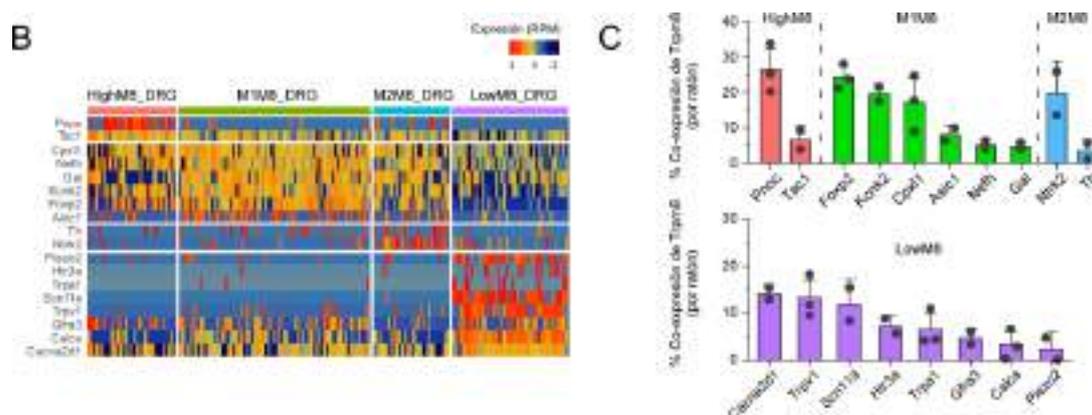


Figura 50. Identificación de marcadores específicos para las neuronas de alta-media y baja expresión de *Trpm8*. A) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando la co-expresión de *Trpm8* y otros marcadores seleccionados en rodajas de DRG usando la técnica de hibridación *in situ* (RNAscope). Se muestra la expresión de genes identificados en neuronas HighM8 y los grupos M1M8 y M2M8 (*Pnoc*, *Tac1*, *Asic1*, *Gal*, *Foxp2*, *Cpx1l*, *Kcnk2*, *Nefh*, *Th* y *Ntrk2*) (expresión alta y media de TRPM8) y los identificados en neuronas LowM8 (baja expresión de TRPM8; *Cacna2d1*, *Scn11a*, *Calca*, *Trpa1*, *Gfra3*, *Htr3a*, *Trpv1* y *Piezo2*). Barra de escala 50 μ m. Las flechas indican neuronas doblemente positivas para ambos marcajes y los insertos ampliados muestran ejemplos de la co-expresión de estos marcadores en neuronas TRPM8+. B) Mapa de calor con la expresión para los marcadores testados en los experimentos de hibridación *in situ* en las neuronas TRPM8+ de DRG analizadas en la sección anterior. Se indican los cuatro grupos identificados (referente a la **sección 4.3.1**). Unidad de expresión (RPM). C) Promedio del porcentaje de neuronas que co-expresan *Trpm8* con los genes estudiados. Cada gen se testó en 2-3 rodajas de animales diferentes (n=2-3 animales) y los círculos indican los valores individuales del porcentaje de co-expresión de los genes por animal.

Asimismo, ampliamos nuestro estudio a otros seis genes, algunos relevantes en la nocicepción como son *Oprm1*, *Kcnn2*, *Asic3* y otros identificados como marcadores para alguna de las poblaciones LTMRs, descritas en la introducción (*Wdcn2*, *Cacna1h*, *P2ry1* y *Scn8a*). Al igual que en la anterior figura, imágenes representativas y los porcentajes de co-expresión para cada gen se muestran en la **figura 51**. Por un lado, observamos una co-expresión elevada de *Trpm8* con el receptor opiáceo Mu 1 (*Oprm1*) (23.1 %) y con el canal de potasio activado por calcio de pequeña conductancia SK2 (*Kcnn2*) (19.1 %), ambos relacionados con la nocicepción (Sun *et al.*, 2019; Smith, 2020). La expresión de otro miembro de la familia SK, en concreto SK3, ya había sido comprobada en un estudio anterior de nuestro grupo de investigación (Morenilla-Palao *et al.*, 2014), así como la expresión de *Oprm1* en neuronas TRPM8+ (Shapovalov *et al.*, 2013). Las neuronas TRPM8+ presentan además, co-expresión con el canal de potasio TASK3 (*Knck9*) (18.1 %) que también había sido validado en el estudio previamente mencionado (Morenilla-Palao *et al.*, 2014).

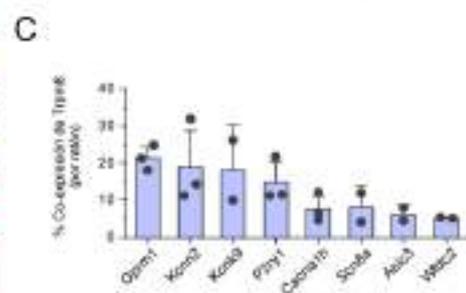
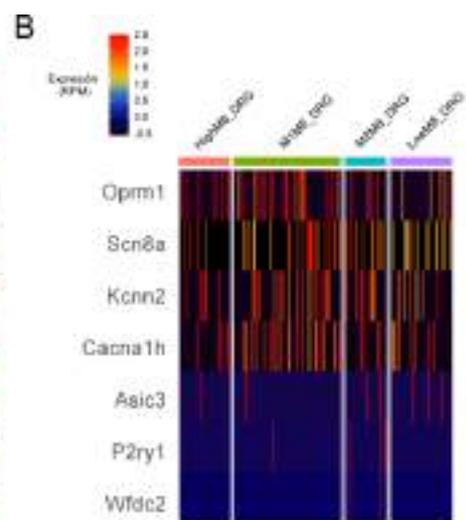
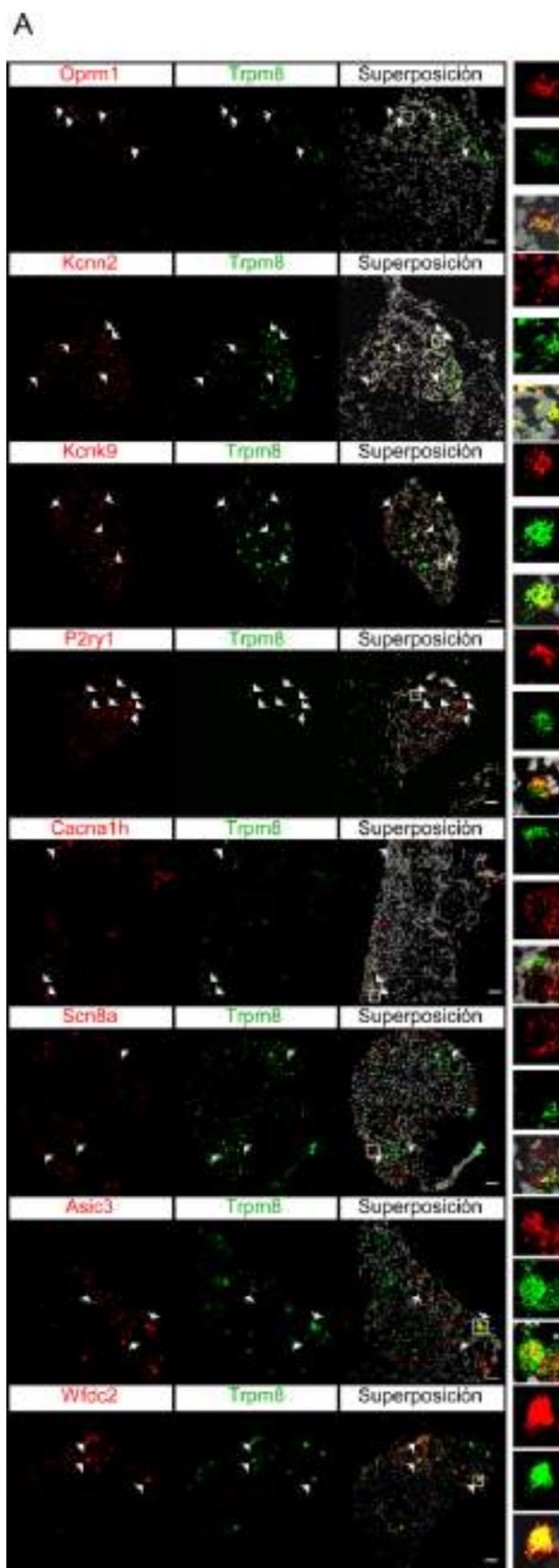
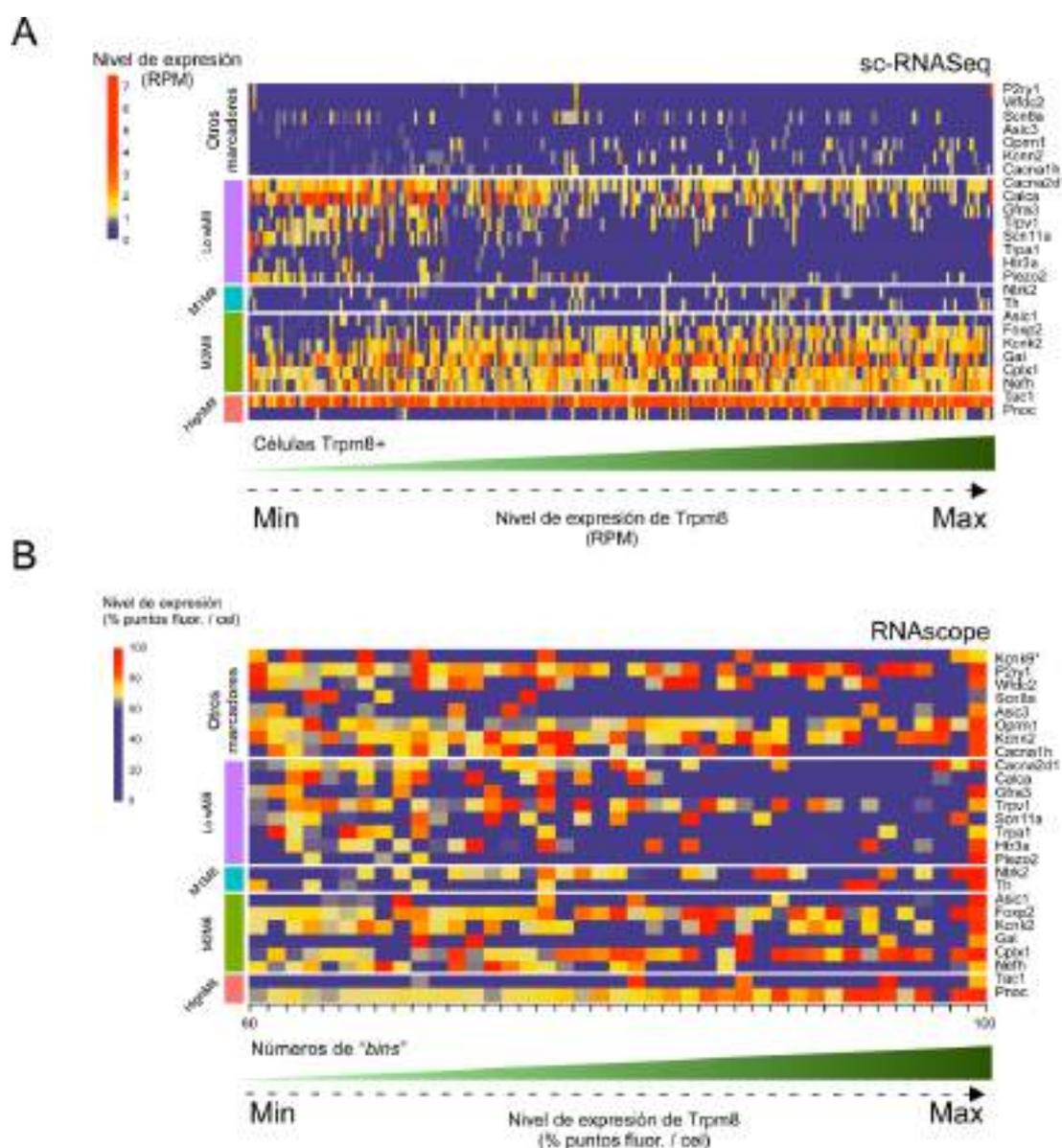


Figura 51. Identificación de otros marcadores específicos para nociceptores y mecanorreceptores en las neuronas TRPM8+. A) Imágenes representativas de microscopía confocal de la expresión de *Trpm8* y de los genes indicados en la parte superior de las imágenes, en rodajas de DRG, usando la técnica de hibridación *in situ* (RNAscope). Barra de escala 50 μ m. Las flechas indican neuronas doblemente positivas para ambos marcajes y los insertos ampliados ejemplos de la co-expresión de estos marcadores en neuronas TRPM8+. B) Mapa de calor con los niveles de expresión de los marcadores testados en los experimentos de hibridación *in situ* en las neuronas TRPM8+ de DRG secuenciadas en los principales trabajos de scRNA-Seq. Se indican los cuatro grupos identificados (referente a la **sección 4.3.1**). Unidad de expresión (RPM). C) Promedio del porcentaje de neuronas que co-expresan *Trpm8* con los genes estudiados. Cada gen se testó en 2-3 rodajas de animales diferentes (n=2-3 animales) y los círculos indican los valores individuales del porcentaje de co-expresión de los genes por cada animal.

Dado que el perfil molecular de las neuronas TRPM8+ varía en función de su nivel de expresión, analizamos el porcentaje de neuronas positivas para cada gen estudiado en función de la expresión de *Trpm8*, cuantificando el número de puntos fluorescentes por célula. En el mapa de calor de la **figura 52A** se ha vuelto a representar el nivel de expresión (RPM) de las neuronas TRPM8+ analizadas en la **sección 4.3.1**, y que proviene de los datos de *scRNA-Seq* para los genes que estudiamos por RNAscope. Las células TRPM8+ están ordenadas de menor a mayor expresión del gen *Trpm8* (de izquierda a derecha), indicado en el eje horizontal. Los genes se agruparon según su clasificación como marcadores de las poblaciones LowM8, M1M8, M2M8, HighM8 o ninguno de los grupos anteriores (“Otros marcadores”) obtenidos tras el análisis de la sección anterior.

En cambio, en la **figura 52B** se muestra la distribución de la expresión para cada gen proveniente del análisis de imagen de los experimentos de RNAscope y expresados como puntos fluorescentes en función de la expresión de *Trpm8*. Dado que en los experimentos de RNAscope nos limitamos a un máximo de tres sondas estudiadas por célula, en vez de células, en este gráfico cada celda en el eje horizontal representa un rango de valores o “bins” para la distribución del nivel de expresión de *Trpm8* (izquierda mínima expresión, derecha máxima). Los genes interrogados muestran la misma ordenación establecida que la mostrada con los datos de scRNA-Seq. Además, en los gráficos de dispersión de la **figura 52C**, puede visualizarse individualmente los niveles de expresión (puntos fluorescentes) de los genes estudiados al comparar con la expresión de *Trpm8*. En las combinaciones donde existe una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$ en la prueba de correlación de Pearson) se indican los coeficientes de determinación (R^2). En conjunto, se aprecia que muchos de los genes presentan una distribución similar para ambas técnicas al comparar los dos mapas de calor de las **figuras 52A-B**. Destaca, por ejemplo, que los marcadores del grupo LowM8 *Calca*, *Scn11a*, *Piezo2* y *Trpa1* presentan valores de expresión más altos en neuronas con niveles bajos para *Trpm8*. Para *Gfra3*, *Cacna2d1* y *Htr3a* se observa que

también se expresan en neuronas de alta expresión, aunque seguimos encontrando más neuronas positivas con niveles de expresión mínimos para *Trpm8* (véase también la **figura 52C**). En contraste, la mayoría de los marcadores de los grupos intermedios junto con *Pnoc*, se expresan en todo el rango de expresión y con niveles especialmente altos en aquellas de máxima expresión. Para otros genes, en cambio, los resultados de *scRNA-Seq* y RNAscope no concuerdan. Por ejemplo, *P2ry1*, *Ntrk2*, presentan una correlación alta con los niveles de *Trpm8* en la técnica de RNAscope que no observamos en los estudios de *scRNA-Seq*. En el caso de los genes *Oprm1* y *Kcnn2*, aunque la correlación es muy débil, encontramos más células que co-expresan con *Trpm8* en los experimentos de RNAscope que para los estudios de secuenciación de célula única. Asimismo, sorprende el bajo número de neuronas TAC1+ y GAL+ encontradas en la población TRPM8+ tras los experimentos de RNAscope.



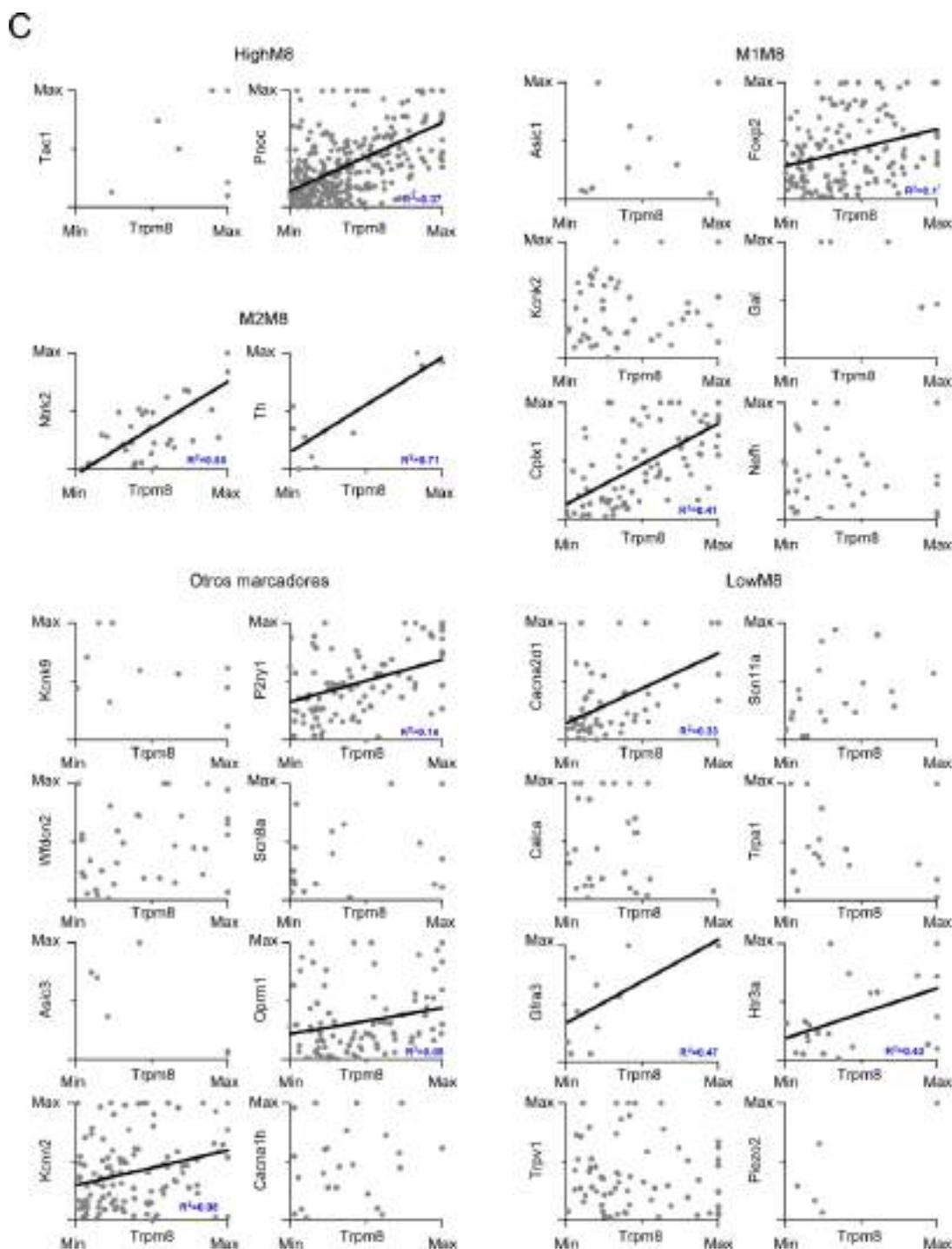


Figura 52. Los experimentos de hibridación *in situ* demuestran que la co-expresión de los marcadores estudiados varía en función del nivel de expresión de *Trpm8*. A) Mapa de calor con los niveles de expresión de los marcadores en los experimentos de hibridación *in situ* (RNAscope) en las neuronas TRPM8+ de DRG secuenciadas en los principales trabajos de *scRNA-Seq* (referente a la **sección 4.3.1**). Las células TRPM8+ ($n=222$) se han ordenado en el eje horizontal en función de su nivel expresión de *Trpm8*. La escala de color indica la expresión media sin normalizar (RPM) para cada célula. Los genes están ordenados según su pertenencia a los cuatro grupos identificados en la **sección 4.3.1** o como otros marcadores. B) Mapa de calor representando la expresión obtenida (puntos fluorescentes) en los experimentos de RNAscope para los mismos genes que en A, en función de la expresión de *Trpm8*. La escala de color indica la expresión media de cada gen (puntos fluorescentes) en el rango de valores para la expresión de *Trpm8*

(eje horizontal). La expresión del gen *Kcnk9* sólo se representa en los gráficos de los datos obtenidos por RNAscope ya que su expresión fue mínima para scRNA-Seq (*). C) Correlación de los valores de expresión (puntos fluorescentes) para dichos genes en neuronas TRPM8+ según los experimentos de RNAscope. Se indica el coeficiente de determinación (R^2) y la regresión lineal en aquellas combinaciones con un p -valor < 0.05 para la prueba de correlación de Pearson.

Por último, ampliamos el estudio de expresión molecular en las neuronas TRPM8+ analizando la expresión conjunta de algunos de los genes que hemos identificado previamente. En la **figura 53A-B**, se muestran las imágenes superpuestas de las combinaciones estudiadas y la cuantificación de sus porcentajes de co-localización en neuronas TRPM8+. En la **figura 53C** hemos representado la distribución de las neuronas positivas para los genes estudiados en función de su expresión de *Trpm8*.

De estos resultados queremos destacar que los marcadores *Pnoc*, *Foxp2* y *Cplx1* co-expresan en un porcentaje más alto en neuronas TRPM8+ de alta y media expresión (**figura 53C**). Además, el 83.7 % (77/92) de las neuronas FOXP2+/TRPM8+ y un 71.6 % (63/88) para CPLX1+/TRPM8+ son PNOC+, sugiriendo que estos marcadores identifican al mismo grupo de neuronas TRPM8+ (**figura 53B**). No obstante, existe un porcentaje considerable de neuronas PNOC+/TRPM8+ que no co-localiza con *Foxp2* y *Cplx1* (38.4 %, 40/125 para *Pnoc-Foxp2* y un 68.7 %, 138/201 para *Pnoc-Cplx1*), perteneciendo principalmente a neuronas de baja expresión para *Trpm8* (**figuras 53C**). Ambos resultados contrastan con una expresión mucho más restringida de *Pnoc* según los datos obtenidos en los trabajos de scRNA-Seq, donde sólo se expresa en neuronas de alta expresión de *Trpm8* (veáse de nuevo **figura 52A**). Si bien es cierto que los niveles de expresión para *Pnoc* son más altos en neuronas TRPM8+ de alta expresión, tal como demuestra las correlaciones entre los marcadores estudiados y *Trpm8* representadas en la **figura 52C**.

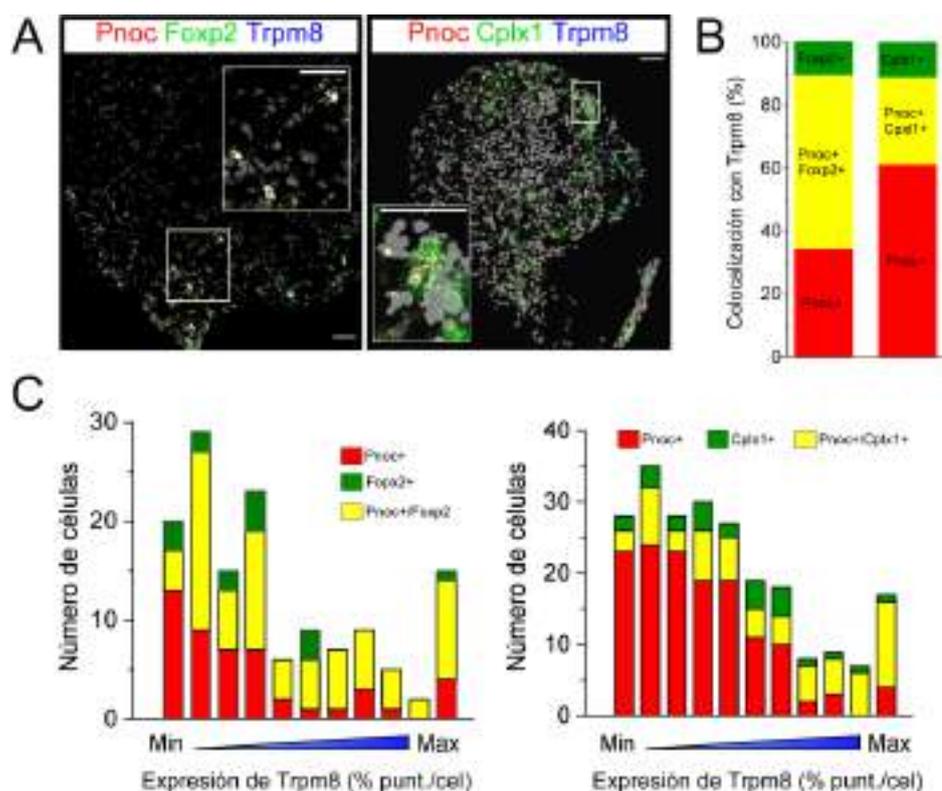


Figura 53. Co-expresión y distribución de marcadores con alta y media expresión en neuronas TRPM8+. A) Imágenes de microscopía confocal representativas de RNAscope para los genes indicados. Los insertos muestran, ampliados, ejemplos de la co-expresión de estos marcadores en neuronas TRPM8+. Barra de escala 50 μ m. B) Porcentaje de neuronas positivas y C), su distribución en función del nivel de expresión de *Trpm8* para los genes correspondientes. Número de neuronas TRPM8+ para cada combinación; *Foxp2-Pnoc* n=255, *Pnoc-Cplx1* n=423.

Seguidamente, en la **figura 54** se representan distintas combinaciones de marcadores de baja y media expresión e identificamos, por ejemplo, que *Nefh* y *Cacna2d1* co-expresan en un porcentaje bajo (12.3 %, 9/73 del total de neuronas TRPM8+) (**figura 54B**). El resultado es coherente con estudios de expresión donde muestran que estos dos marcadores identifican neuronas mielínicas y nociceptivas tipo C respectivamente (Chiu *et al.*, 2014). Otro de los marcadores nociceptivos estudiados, el canal $\text{Na}_v1.9$ (*Scn11a*) se expresa también únicamente en neuronas de bajo nivel de expresión de *Trpm8*, y contrasta con la expresión más extendida de *Foxp2* (marcador del subgrupo M1M8), en todas las neuronas TRPM8+. En el caso de *Calca* (CGRP), co-expresa en neuronas TRPV1+ (el 60 %, 9/15 de la población CALCA+ expresa *Trpv1* dentro de la población TRPM8+) principalmente en neuronas con valor de expresión baja para *Trpm8* (grupo LowM8). No obstante, destaca también el número de neuronas TRPV1+ en el rango medio y alto de expresión para *Trpm8* dado que este gen se identificó como un marcador del grupo LowM8 en la sección anterior (véase **figura 54C**). Es más, TRPV1 presenta un elevado porcentaje de co-localización con *Kcnk2* (TREK-1), marcador del grupo intermedio M1M8, en neuronas TRPM8+ con

distintos niveles expresión para este gen, siendo el 94.2 % (33/35) de las neuronas TRPV1+/TRM8+ positivas para TREK-1.

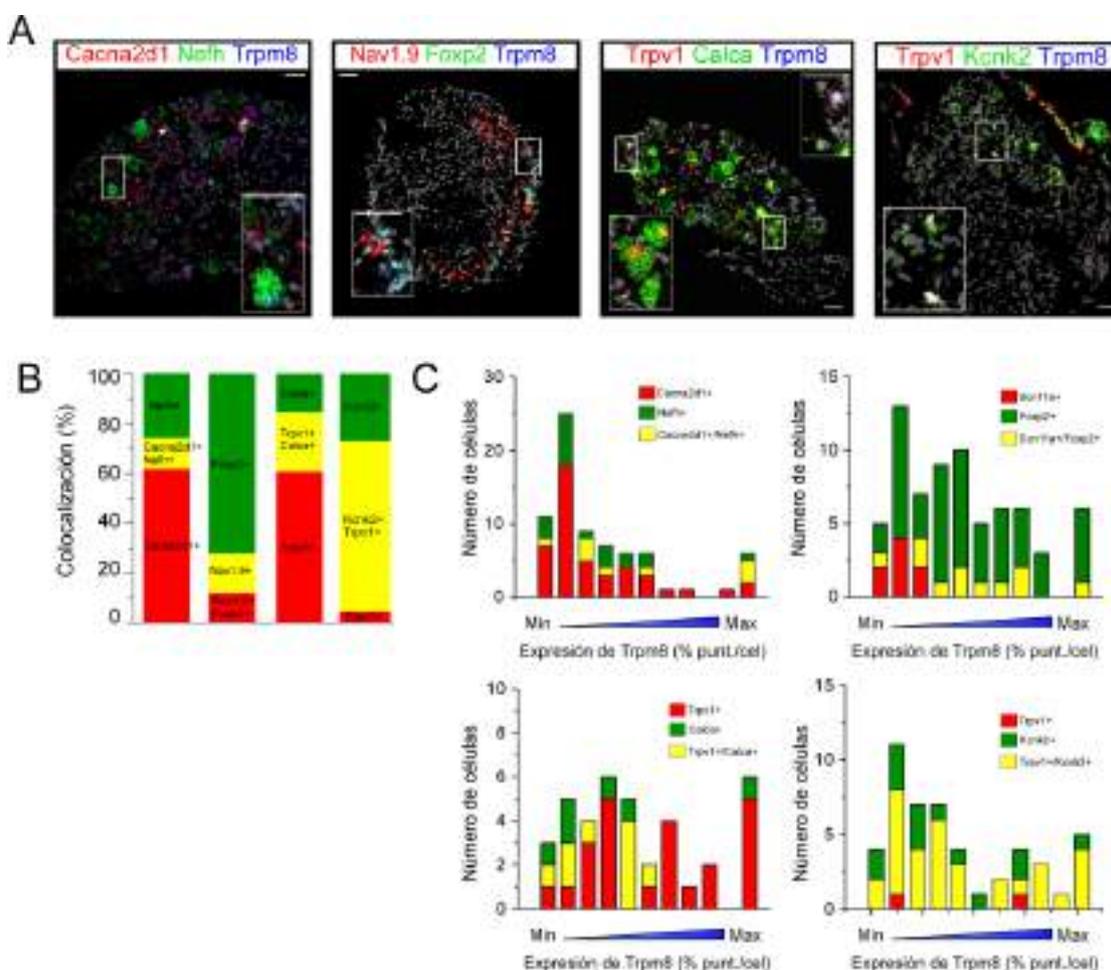


Figura 54. Co-expresión y distribución de marcadores con baja y media expresión en neuronas TRPM8+. A) Imágenes de microscopía confocal representativas de RNAscope para los genes indicados. Los insertos muestran, ampliados, ejemplos de la co-expresión de estos marcadores en neuronas TRPM8+. Barra de escala 50 μ m. B) Porcentaje de neuronas positivas y C), su distribución en función del nivel de expresión de Trpm8 para los genes correspondientes. Número de neuronas TRPM8+ para cada combinación; *Nefh-Cacna2d1* n=145 células, *Nav1.9-Foxp2* n=122, *Trpv1-Calca*- n=138 y *Trpv1-Kcnk2* n= 77.

En resumen, mediante experimentos de hibridación *in situ* hemos podido verificar la heterogeneidad molecular que advertimos en los análisis de expresión diferencial de los principales trabajos de secuenciación por célula única. Además de la existencia de distintas subpoblaciones de neuronas TRPM8+ ya descrita en los trabajos originales, los resultados expuestos en esta sección demuestran que las neuronas TRPM8+ poseen un perfil molecular diferente que varía en función del nivel de expresión del gen *Trpm8*. En líneas generales, la población con niveles más bajos de

Trpm8 presenta mayores niveles de expresión y co-localización de distintos marcadores nociceptivos, principalmente peptidérgicos y canales iónicos como *Trpa1*, $\text{Na}_v1.9$ o *Piezo2*, este último relacionado además con la mecanosensación (Ranade *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2015; Florez-Paz *et al.*, 2016). Paradójicamente, las neuronas con altos niveles para *Trpm8* expresaban marcadores típicos de LTMRs como *P2ry1* o *Ntrk2*, aunque los niveles de *Nefh* se mantuvieron relativamente constantes en neuronas de alta y baja expresión para *Trpm8*.

4.3.3. Validación de la expresión para marcadores nociceptivos en neuronas de baja expresión para EYFP+ y TRPM8+

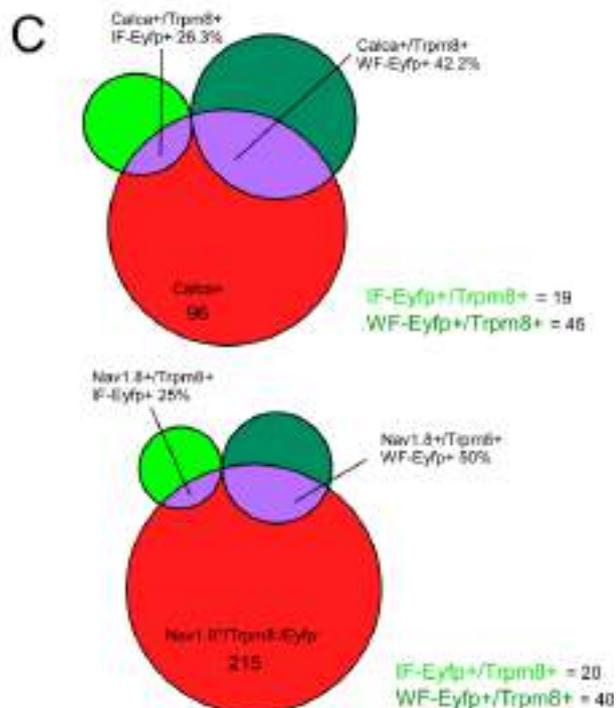
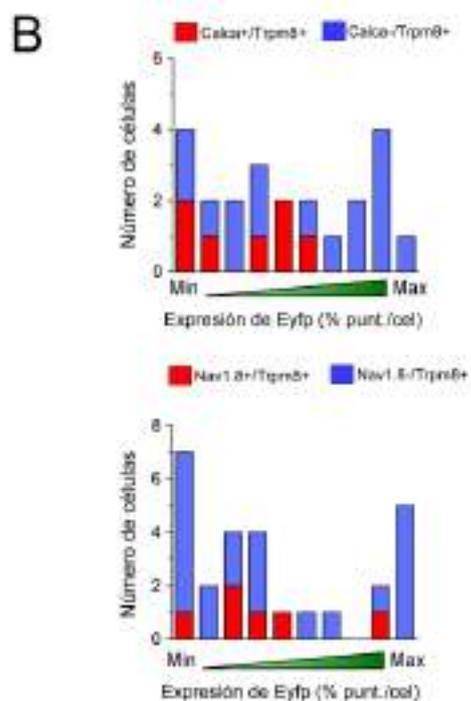
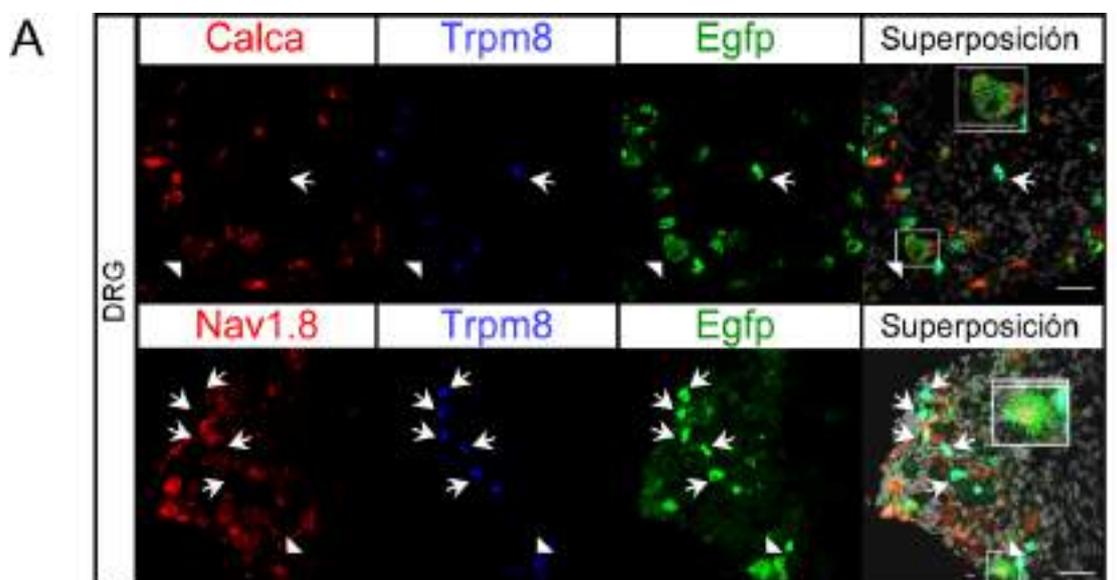
Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran un patrón molecular diferente en las neuronas TRPM8+ de alta expresión en comparación con las de baja expresión, presentando estas últimas un patrón nociceptivo. Estos resultados, junto a los datos funcionales, de correlación entre TRPM8 y EYFP y de expresión génica (*FACS-Seq*) sugieren que las neuronas inicialmente denominadas como WF-EYFP+ se corresponden con las clasificadas como LowM8. En la sección anterior, demostramos que el perfil molecular de las neuronas TRPM8+ varía en función de su expresión para *Trpm8*. No obstante, no estudiamos directamente la co-expresión del marcaje reportero ya que estos experimentos se realizaron en animales silvestres (C57BL/6JRj).

Por ese motivo, nos propusimos validar dos de los marcadores nociceptivos específicos de las neuronas LowM8 según el análisis realizado en la **sección 4.3.1**, CGRP (*Calca*) y $\text{Na}_v1.8$ (*Scn10a*), mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (RNAscope) en rodajas de DRG y TG obtenidas de animales de la línea TRPM8^{BAC}EYFP. Dado que el objetivo es estudiar comprobar que el marcaje fluorescente de nuestro modelo reportero es capaz de identificar las neuronas TRPM8+ nociceptivas, usamos el nivel de *Eyfp* (puntos fluorescentes) como clasificador, separándolas en IF y WF (véase los mosaicos de las **figuras 55A y D**). Asimismo, también confirmamos la especificidad de la proteína fluorescente con la sonda *Trpm8*. Las neuronas IF y WF-EYFP+ positivas también para *Trpm8* se indican con las flechas y las puntas de flechas respectivamente.

Al cuantificar los resultados, observamos que las neuronas positivas para *Calca* y $\text{Na}_v1.8$ presentaban niveles de expresión bajos para *Eyfp* tal como se observa en las distribuciones de las **figuras 55B y E**, encontrándose muy pocas neuronas EYFP+ a niveles máximos.

Cuando contabilizamos la co-localización de *Calca* y $\text{Na}_v1.8$ en neuronas EYFP+/TRPM8+ positivas, encontramos que el 42.2 % (19/45) de las neuronas WF-EYFP+/TRPM8+ de DRG expresan *Calca* y el 50 % (20/40) expresan $\text{Na}_v1.8$. Estos porcentajes fueron más altos que para la población IF-EYFP+/TRPM8+, con un porcentaje de co-localización del 26.3 % (5/19) y de un 25 %

(5/20) para *Calca* y $Na_v1.8$ respectivamente (**figura 55C**). Los datos para TG muestran una tendencia similar, encontrándose más neuronas positivas para la población WF-EYFP+, con un 41.7 % (5/12) y un 65.5 % (19/29) para *Calca* y $Na_v1.8$ que para la población IF (8.3 % (1/12) y 38 % (8/21) respectivamente (**figura 55F**).



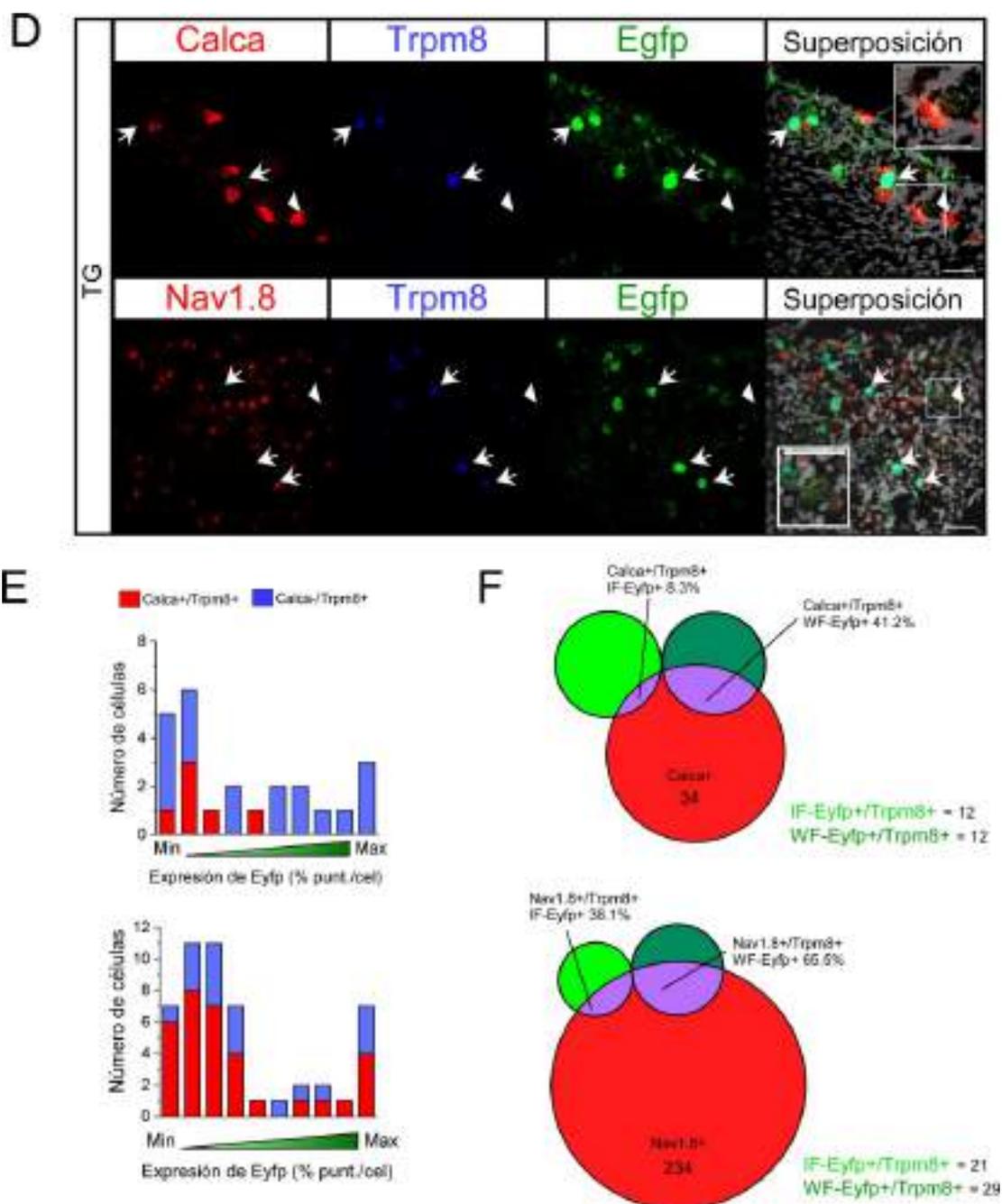


Figura 55. El marcaje EYFP del ratón TRPM8^{BAC}EYFP identifica a neuronas nociceptivas TRPM8+ que expresan los marcadores CGRP (*Calca*) y Na_v1.8 (*Scn10a*) en los ganglios sensoriales DRG y TG. A) Imágenes representativas de experimentos de hibridación *in situ* para la co-expresión de *Calca* y *Scn10a* en las neuronas EYFP+/TRPM8+ en rodajas de DRG del ratón transgénico TRPM8^{BAC}EYFP. Las flechas y las puntas de flecha indican neuronas consideradas como IF-EYFP+/TRPM8+ y WF-EYFP+/TRPM8+ respectivamente y los recuadros muestran ejemplos ampliados de co-localización entre los marcajes. Barra de escala 50 μ m. B) Distribución del número de neuronas TRPM8+ que son, además, *Calca*+ o Na_v1.8+ (rojo, según proceda) o negativas para estos genes (azul), en función de la expresión de EYFP+. C) diagramas de Venn mostrando los porcentajes de co-localización de *Eyfp-Trpm8* para *Calca* y *Scn10a* en neuronas de DRG, respectivamente. D), E) y F) mismo análisis que en A, B y C para neuronas del TG. Número de ratones n=2 usados para cada combinación de DRG y TG respectivamente.

En resumen, los resultados obtenidos en ratones TRPM8^{BAC}EYFP arrojaron datos muy similares a los comentados en la sección anterior para ratones silvestres. Los datos de RNAscope también mostraron que TRPV1 se expresa además en neuronas TRPM8+ con expresión media y alta. Para confirmar la co-expresión de TRPM8 con el canal TRPV1 aprovechamos su reactividad específica ante el compuesto capsaicina y que ya hemos estudiado funcionalmente mediante imagen de calcio en el primer bloque experimental. Asimismo, ampliamos el estudio para el canal TRPA1 dado que nuestro protocolo de estimulación incluía la aplicación de AITC. Al analizar todos los datos obtenidos en la línea TRPM8^{BAC}EYFP para los agonistas mencionados observamos que la proporción de neuronas WF-EYFP+ que respondieron a capsaicina (34.8 %; 64/184) y a AITC (20.6 %; 38/184) fue mayor que en la población IF-EYFP+, 22.8% (13/57) y 5.3% (3/57) respectivamente. Esta diferencia fue estadísticamente significativa para AITC, pero no para capsaicina, aunque muestra una clara tendencia de aumento ($p = 0.035$, $p = 0.06$ prueba exacta de Fisher a una vía) (figura 56A).

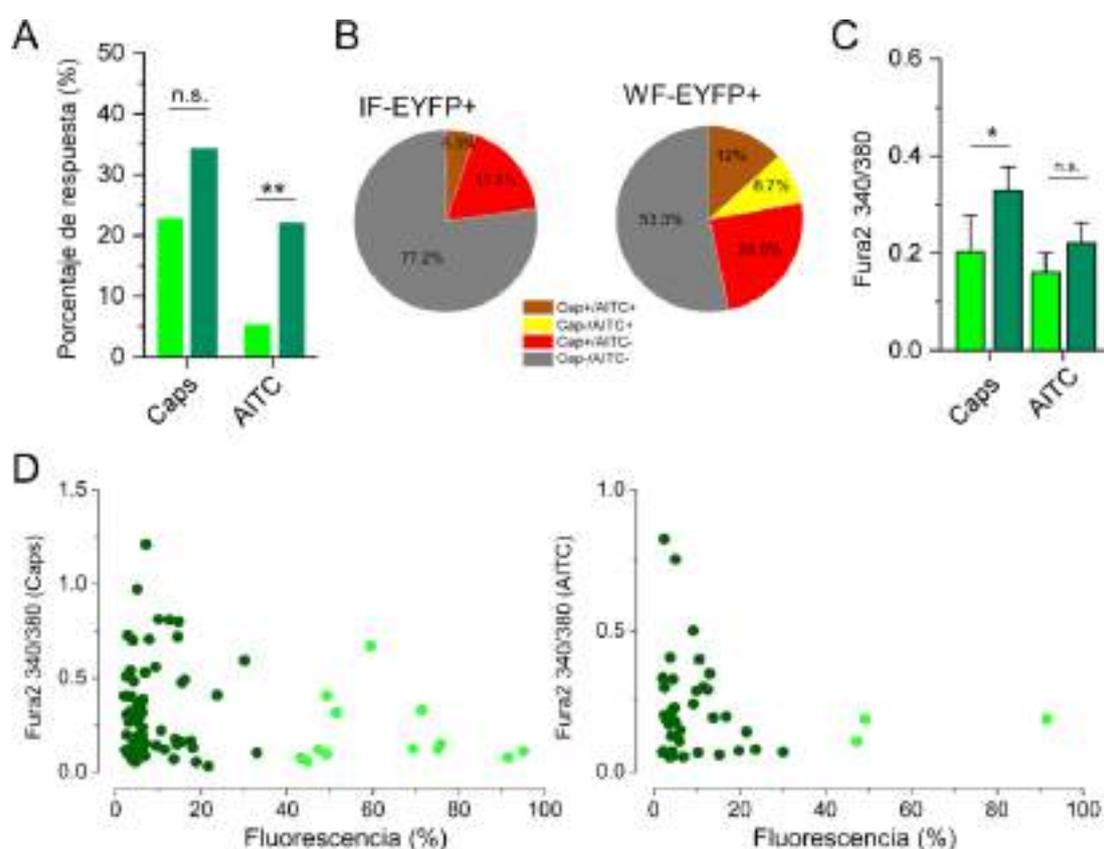


Figura 56. Las neuronas WF-EYFP+ responden más a los agonistas capsaicina y AITC. A) porcentaje de respuesta a los agonistas capsaicina (Caps, 100 nM) y AITC (100 μ M) en las poblaciones IF-EYFP+ (verde claro) y WF-EYFP+ (verde oscuro) ($*p < 0.05$, prueba exacta de Fisher a una vía). B) Proporción de neuronas que respondieron sólo a AITC (Caps-/AITC+), sólo a capsaicina (Caps+/AITC-), o a ambos agonistas (Caps+/AITC+). C) Valor medio de la amplitud (F340/380 de la respuesta y D), amplitud en función de la

intensidad de fluorescencia para las neuronas IF y WF-EYFP+. Número de células IF-EYFP+ analizadas n=57 y WF-EYFP n=184.

En la **figura 56B** se detalla además el porcentaje de neuronas que respondieron a ambos estímulos, siendo el porcentaje mayor en las neuronas WF-EYFP+, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa (12% (22/184) vs 5.3% (3/57), $p = 0.21$, prueba exacta de Fisher a una vía).

Se comparó además la amplitud de las respuestas ante AITC y capsaicina, como medida indirecta de la expresión de los canales TRPA1 y TRPV1. En este caso, hemos observado diferencias en el valor medio de la amplitud de la respuesta al estímulo de capsaicina entre las poblaciones IF y WF-EYFP+ (0.2 ± 0.05 (IF-EYFP+) vs 0.33 ± 0.03 (WF-EYFP+), $p=0.048$, prueba t-Student a una vía) (**figura 56C**). Cuando representamos el incremento en el calcio intracelular en función de la fluorescencia EYFP (**figura 56D**), no vemos una correlación clara, aunque llama la atención que las neuronas WF-EYFP+ presentaron valores más altos para ambos agonistas.

En suma, los genes asociados comúnmente a neuronas con propiedades nociceptivas, como TRPA1, TRPV1, CGRP (*Calca*) y $Na_v1.8$, se expresan en mayor medida en neuronas doblemente positivas para EYFP+/TRPM8+ con baja expresión/fluorescencia para la proteína fluorescente EYFP y coincidiendo con los datos de los experimentos de RNAscope en ratones silvestres, donde observamos este patrón molecular en neuronas con baja expresión de *Trpm8*. Por tanto, el ratón transgénico TRPM8^{BAC}EYFP nos permite identificar el grupo complementario de neuronas TRPM8+, no descritas previamente en la literatura.

4.4. Efecto del agente quimioterapéutico oxaliplatino en las neuronas EYFP+, IB4+ y DN

En este bloque de experimentos nos centramos en el estudio funcional y molecular de la neuropatía inducida por el compuesto quimioterapéutico oxaliplatino. Previo a la caracterización de su efecto en neuronas sensoriales primarias, se llevó a cabo el desarrollo de este modelo de dolor neuropático en animales de la línea transgénica TRPM8^{BAC}EYFP.

4.4.1. El oxaliplatino produce alodinia mecánica e hiperalgesia al frío

Para inducir la neuropatía, se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) tres dosis de 6 mg/kg de oxaliplatino los días 0, 2 y 4 en ratones TRPM8^{BAC}EYFP de ambos sexos (n = 26 vehículo y n = 30 oxaliplatino) (véase de nuevo materiales y métodos para consultar más detalle del protocolo utilizado). El desarrollo de la neuropatía se confirmó mediante la prueba de von Frey y la prueba

de la placa fría unilateral para evaluar la alodinia mecánica e hiperalgesia al frío, respectivamente, los días 7 y 8 tras la inyección de oxaliplatino.

En las **figuras 57A y B** se muestra que la administración sistémica de oxaliplatino produce un descenso del umbral mecánico y de latencia al frío. Para evaluar el desarrollo de la sensibilidad mecánica, previo a la inducción de la neuropatía, se midieron los umbrales basales (“basal”, el día 0, antes de la primera inyección), sin observar diferencias significativas entre los animales controles y los que se usaron con el tratamiento (0.65 ± 0.05 g vehículo vs 0.63 ± 0.04 g oxaliplatino, $p = 0.72$, prueba no paramétrica Mann Whitney no pareada). A día 7, el promedio del umbral mecánico de los ratones tratados disminuyó significativamente respecto a su valor basal (0.63 ± 0.04 g basal vs 0.26 ± 0.03 g D7, $p < 0.0001$, prueba no paramétrica Wilcoxon pareada).

En el grupo control (vehículo) también observamos un descenso en el umbral mecánico a día 7 (0.65 ± 0.05 g basal vs 0.4 ± 0.05 g D7, $p = 0.0008$, prueba no paramétrica Wilcoxon pareada), no obstante, el descenso sigue siendo mayor en el grupo tratado con oxaliplatino observando diferencias significativas entre ambos (0.4 ± 0.05 g vehículo vs 0.26 ± 0.03 g oxaliplatino, $p=0.047$, prueba no paramétrica de Mann-Whitney) (**figura 57A**).

Para la prueba de la placa fría unilateral a 0°C , medida a día 8 tras la primera inyección, se produjo un descenso significativo en la latencia de la respuesta al estímulo de frío en los animales tratados con oxaliplatino respecto al grupo control (18.8 ± 1 seg vehículo vs 13.6 ± 0.9 seg oxa, $p = 0.0003$, prueba t-Student no pareada) (**figura 57B**).

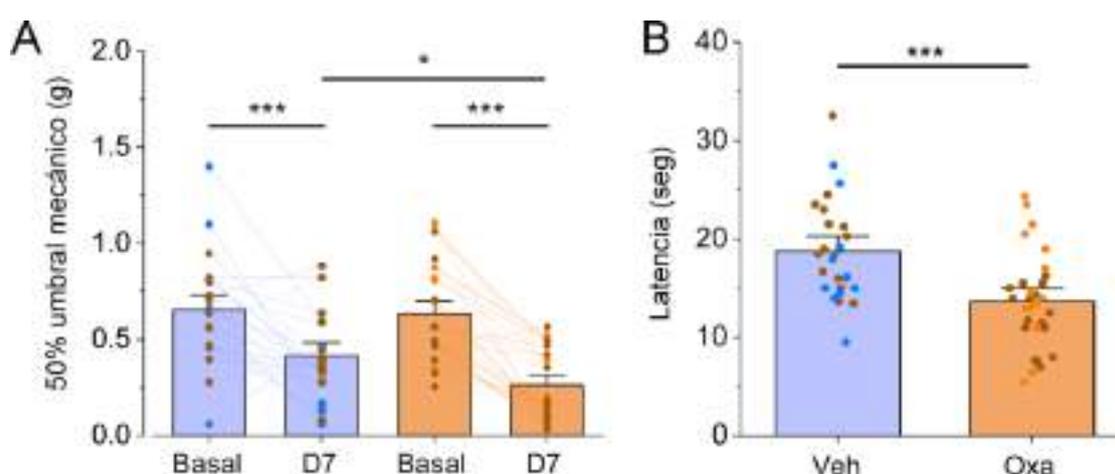


Figura 57. El oxaliplatino produce hipersensibilidad al frío y a estímulos mecánicos. A) Umbral mecánico (g) con la prueba de von Frey en ratones, previamente (“basal”) y al día 7 (D7) después de la primera inyección i.p. de vehículo (azul) o de oxaliplatino (naranja) (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, prueba Mann Whitney con respecto al grupo control y prueba Wilcoxon pareada con respecto a su valor basal. B) Latencia en segundos para la prueba de la placa fría a 0°C de los ratones control y tratados al día 8 tras la primera

administración del compuesto (***) $p < 0.001$, prueba t-Student no pareada). Los puntos representan el valor obtenido en cada animal ($n=26$ y $n=30$ veh y oxa, respectivamente). Los puntos coloreados en marrón indican los animales que se usaron posteriormente para el estudio de imagen funcional por calcio y análisis de expresión.

Tras examinar el efecto del oxaliplatino en las pruebas conductuales, aquellos animales que presentaban un fenotipo más marcado de hipersensibilidad mecánica y al frío fueron sacrificados junto con sus controles para extraer los ganglios DRG y realizar experimentos funcionales y de expresión (en la **figura 57B** se indican en marrón los animales utilizados para los estudios post conductuales).

4.4.2. El oxaliplatino produce un aumento de la sensibilidad al frío *in vitro*

El estudio funcional *in vitro* se realizó mediante imagen de calcio en cultivos primarios de DRG de ratones tratados y sus controles, caracterizándose las poblaciones de neuronas EYFP+, IB4+ y DN usando el mismo protocolo utilizado en la **sección 4.1.3** (ver diagrama de la **figura 58A** y los trazos representativos de la **figura 58B**).

En una primera exploración de los datos, observamos que las neuronas de los animales tratados con oxaliplatino son más sensibles a los estímulos del frío (12.7 % (68/534 vehículo vs 19 % 105/552 oxaliplatino), mentol (12.7 % 68/534 vehículo vs 19.6 % 108/552 oxaliplatino) y al estímulo conjunto de frío y mentol (24.5 % 131/534 vs 34.6 % 191/552), sobre el número total de neuronas analizadas (**figura 58C**). Estos aumentos fueron significativos para los tres estímulos ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, prueba exacta de Fisher). Por el contrario, no se observaron diferencias en las respuestas a los estímulos con AITC y capsaicina (34.6 % (185/534) vehículo vs 34.2 % (189/552) oxaliplatino; 28.5 % (152/534) vehículo vs 28.8 % (159/552) oxaliplatino, para los estímulos de AITC y capsaicina respectivamente ($p = 0.89$ y $p = 0.94$, prueba exacta de Fisher). Tampoco se observaron diferencias en la amplitud media del aumento de fluorescencia (fura2 340/380) ante los diferentes estímulos (**figura 58D**, prueba ANOVA-Sidak).

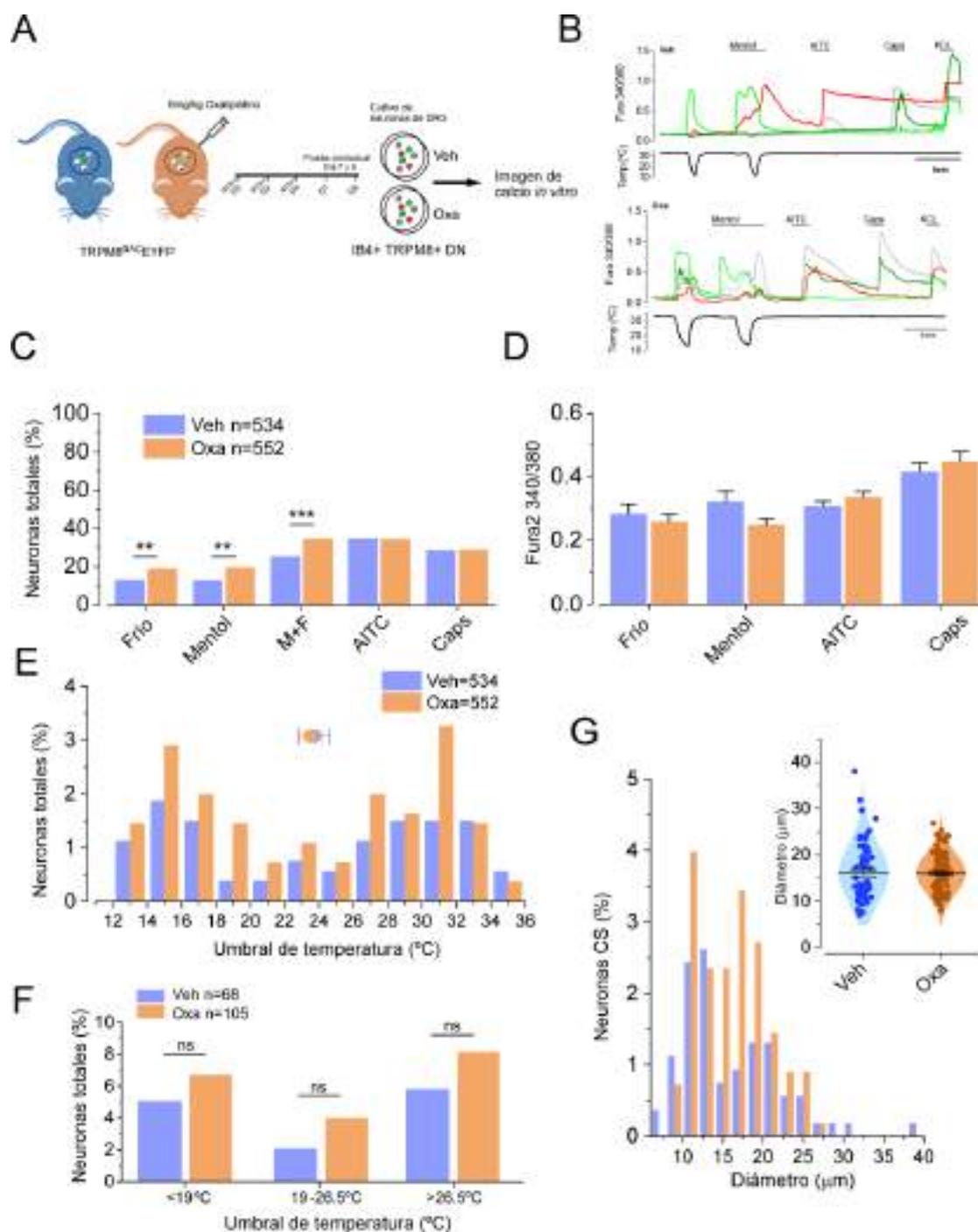


Figura 58. Efecto del oxaliplatino sobre neuronas cultivadas de DRG. A) Protocolo simplificado para la obtención de neuronas de DRG en los experimentos de imagen de calcio *in vitro* de ratones tratados con oxaliplatino y con vehículo. B) Trazos representativos de los incrementos del calcio intracelular de neuronas de las cuatro subpoblaciones estudiadas (verde claro IF-EYFP+, verde oscuro WF-EYFP+, rojo IB4+/EYFP- y gris DN) del grupo tratado (oxa) y control (veh). C) Cuantificación del porcentaje de respuesta y D) amplitud (F340/380) para los estímulos estudiados (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$, prueba exacta de Fisher). E) Distribución del porcentaje (referenciado al total de células analizadas) y valor medio del umbral de neuronas que responden al frío en función del rango para su umbral de temperatura (prueba ANOVA-Sidak) y F), agrupándose según sean umbrales muy altos (vHT <19 °C), umbrales altos (HT 19-26.5 °C) y

umbrales bajos ($LT > 26.5$ °C) de ratones tratados y sus controles (prueba t-Student no pareada). G) Distribución y valor medio del diámetro (inserto) de las neuronas sensibles al frío (“CS, cold sensitive”) analizadas para ambos grupos. $n_{total}=534$ (vehículo) y $n_{total}=552$ (oxaliplatino) de neuronas analizadas en $n=7$ ratones para cada condición experimental.

Cuando analizamos la temperatura de activación en respuesta al estímulo de frío, no encontramos diferencias en el valor promedio entre el grupo control y tratado (23.7 ± 0.9 °C vehículo vs 23.5 ± 0.69 °C oxaliplatino, $p = 0.83$, prueba t-Student no pareada). Además, al distribuir las respuestas al frío en rangos de temperatura, se observa que el aumento del número de neuronas sensibles en la condición tratada es uniforme en todas las temperaturas estudiadas (**figura 58E y F**). Asimismo, tampoco hubo cambios significativos en el diámetro medio de las neuronas sensibles al frío (**figura 58G**).

A continuación, clasificamos las neuronas que responden al frío y mentol en función de su respuesta al AITC, separándolas en neuronas AITC+ y AITC- (**figura 59A**, gráfico superior); el porcentaje de neuronas AITC- sensibles al frío resultó significativamente mayor en el grupo tratado comparado con su vehículo sobre el total de neuronas analizadas (12 % (66/552) vs 8 % (43/534), $p = 0.034$, prueba exacta de Fisher).

Igualmente, al estudiar las respuestas a mentol, se observó una mayor proporción de neuronas AITC- y AITC+ que respondieron al frío en el grupo tratado respecto al control (10.3 % (57/552) oxaliplatino vs 6.7 % (36/534) vehículo para la población AITC-, $p = 0.04$ prueba exacta de Fisher) (9.2 % (51/552) oxaliplatino vs 6 % (32/534) vehículo para AITC+). No obstante, la población sensible al AITC y mentol presentó una clara tendencia clara de aumento respecto a los controles ($p = 0.052$, prueba exacta de Fisher) (**figura 59A**, gráfico inferior).

Adicionalmente, se estudió si el oxaliplatino altera la reactividad ante los diferentes agonistas de las neuronas sensibles al frío o mentol (**figura 59B**). El número de neuronas sensibles al frío que responden al AITC, capsaicina o al mentol es similar en ambos grupos 36.7 % (25/68), 32.3 % (22/68) y 70.6 % (48/68) en el grupo vehículo y 37.1 % (39/105), 29.5 % (31/105) y 65.7 % (69/105) en neuronas tratadas, respectivamente. Los resultados fueron similares entre las neuronas sensibles a mentol (47.1 % (32/68), 30.9 % (21/68) y 70.6 % (48/68) grupo vehículo y 47.2 % (51/108), 19.4 % (21/108) y 63.9 % (69/108) grupo tratado para AITC, capsaicina y frío). Estos datos sugieren que el aumento de las respuestas al frío y al mentol no es específico de ninguna población sensible a los agonistas estudiados. No obstante, en la población AITC+ observamos un aumento significativo en el número de neuronas sensibles al mentol (17.3 % (32/185) control vs 27 % (51/189) oxaliplatino, $p = 0.026$, prueba exacta de Fisher) y presenta una tendencia para el estímulo del frío (13.5 % (25/185) vehículo vs 20.6 % (39/189) oxaliplatino, $p = 0.07$, prueba

exacta de Fisher) (verse **figura 59C**). No se observaron cambios en la población sensible a capsaicina.

En su conjunto, el tratamiento con oxaliplatino produce, un incremento de las respuestas al frío y al mentol en neuronas AITC-, aunque también observamos una tendencia de aumento en las neuronas AITC+. Además, el número de neuronas sensibles al mentol aumenta en esta población (véase de nuevo **figura 59A y C**), sugiriendo que el fármaco produce también una sensibilización en el canal TRPA1. En consecuencia, para estudiar más exhaustivamente el efecto del oxaliplatino en las respuestas a frío, dividimos las neuronas sensibles en cinco clases en función de su perfil quimio-sensible y térmico (**figura 59D**) (Gers-Barlag, 2020). Tal como mostramos en esa sección, las respuestas mediadas por TRPA1 presentan umbrales altos (< 19 °C), mientras que las respuestas al frío mediadas por TRPM8, presentan umbrales más bajos y pertenecen a neuronas que responden a mentol:

1. “Tipo TRPM8”: neuronas que responden a frío con una temperatura de activación > 19 °C, además de activarse con mentol, pero no con AITC.
2. “Tipo TRPM8/TRPA1”: neuronas que responden a frío con una temperatura de activación > 19 °C, además de AITC.
3. “Tipo TRPA1”: neuronas que responden al frío con una temperatura de activación < 19 °C, además de AITC.
4. Neuronas reclutadas por mentol: Neuronas que no respondieron al primer estímulo de frío, pero respondieron al frío en presencia de mentol. En este grupo hemos incluido neuronas que respondieron individualmente a mentol si dicha respuesta es mayor al aplicar el estímulo combinado. Se incluyen neuronas AITC+ y AITC-.
5. Sólo frío: neuronas que responden a frío, pero no a mentol o AITC. Solo se incluyeron aquellas en las que no observamos un aumento en la amplitud de la respuesta al aplicar mentol y frío cuando comparamos con el primer pulso de frío aplicado individualmente.

En la **figura 59D** puede observarse que el principal efecto sobre las neuronas de frío tras el tratamiento con oxaliplatino consiste en un aumento en el número de neuronas reclutadas cuando aplicamos el estímulo conjunto de mentol y frío (11.2 % (60/534) vehículo vs 15.8 % (87/552) oxaliplatino, $p = 0.033$, prueba exacta de Fisher). De éstas, el 40.2 % (35/87) respondieron sólo a AITC, el 18.4 % (16/87) sólo a capsaicina y 18.4 % (16/87) a ambos estímulos en la condición de oxaliplatino, siendo las proporciones muy similares al comparar con el vehículo y sin diferencias significativas para ningún otro grupo (prueba exacta de Fisher) (**figura 59E**). Las neuronas

reclutadas no responden al primer estímulo de frío y constituyen parte del incremento observado tras aplicar mentol más frío en el grupo tratado; los ejemplos de trazos para el incremento de calcio para cada tipo de perfil pueden observarse en la **figura 59F**.

No observamos diferencias significativas entre los otros tipos de respuesta, aunque el porcentaje es siempre mayor en la condición tratada (**figura 59E**).

En las **figuras 59G-H** hemos comparado la amplitud y el umbral de temperatura de las respuestas al frío (F) y mentol + frío (M+F) para las neuronas individuales de los grupos vehículo (azul) y oxaliplatino (naranja). Las neuronas control “tipo TRPM8”, “TRPA1/TRPM8” y “TRPA1” muestran un incremento del calcio en las respuestas al frío + mentol en comparación con sólo frío. En la condición tratada la sensibilización al frío por el agonista mentol se observa también en las neuronas “tipo TRPM8” y “TRPA1” pero no en “TRPM8/TRPA1”. Asimismo, la amplitud al segundo estímulo de frío es mayor en neuronas reclutadas por mentol y tratadas con oxaliplatino que en la condición control (0.12 ± 0.013 vs 0.18 ± 0.016 , $p = 0.0073$, prueba t-Student).

Los valores medios de la temperatura umbral se desplazaron a valores más altos para el estímulo M+F en la población, TRPM8+ y en la supuestamente TRPM8-, “tipo TRPA1” para ambas condiciones. También se observa un desplazamiento del umbral de temperatura hacia valores más altos para la población “reclutada” en comparación con el grupo vehículo (24.9 ± 0.99 °C vehículo vs 27.7 ± 0.76 °C oxaliplatino). Este cambio resultó significativo ($p = 0.025$, prueba t-Student, **figura 59H**).

En conjunto, estos resultados demuestran que el oxaliplatino produce una sensibilización al frío a nivel celular, consistente con lo observado en las pruebas conductuales. Cuando estudiamos su patrón de respuesta ante agonistas para los canales TRP, el incremento es debido principalmente a actividad en neuronas AITC-. A su vez, el oxaliplatino produce también un incremento en el número de respuestas a mentol predominantemente en la población AITC-, sugiriendo que el efecto es independiente de TRPA1 (véase de nuevo **figura 59A**). No obstante, hemos observado que el oxaliplatino es capaz de sensibilizar a neuronas TRPA1+ en respuesta a mentol (referente a la **figura 59C**), y, además, se produce un aumento de la respuesta al frío en presencia de mentol (neuronas reclutadas) tanto en neuronas AITC+ y AITC-. Estas neuronas presentan una amplitud y umbrales de temperatura más altos que en la condición control por lo que no podemos descartar un posible efecto de la neuropatía también sobre el canal.

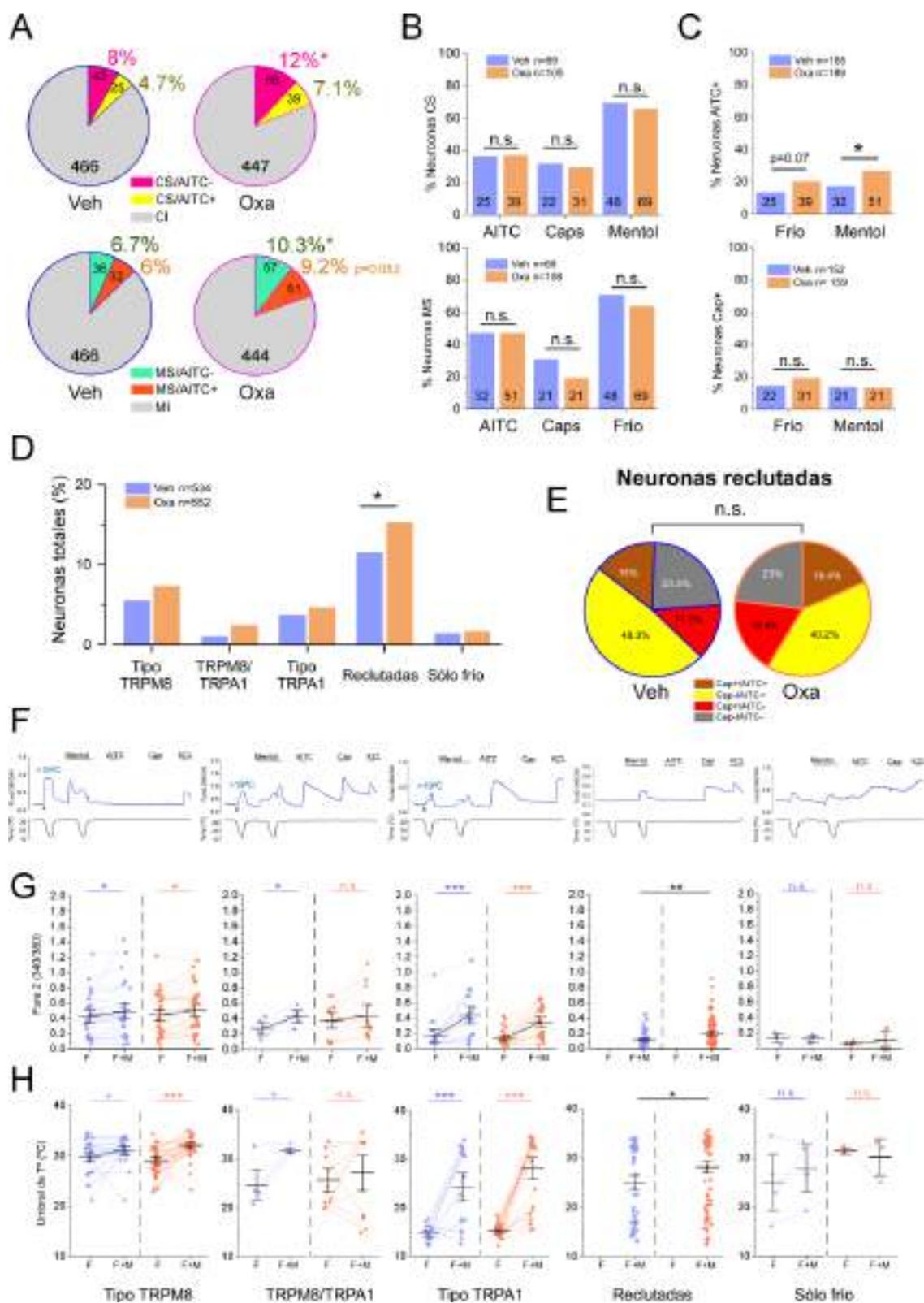


Figura 59. Las neuronas sensibles al frío alteradas tras la inducción de la neuropatía por oxaliplatino presentan diferentes perfiles quimio-sensibles. A) Gráficos de sectores circulares representando el porcentaje de neuronas AITC+ e AITC- que responden al frío (gráfico superior) o a mentol (gráfico inferior). Abreviaturas: “CS, cold sensitive”, “MS, mentol sensitive”, “CI, cold insensitive” y “MI, menthol insensitive” (* $p < 0.05$, al comparar las respuestas entre control (veh) y oxaliplatino (oxa), prueba exacta de Fisher). B)

Porcentaje de neuronas sensibles al frío (arriba) o mentol (abajo) que respondieron a los estímulos AITC, capsaicina y frío o mentol (según corresponda) (prueba exacta de Fisher). C) Número de neuronas AITC+ (arriba) y Caps+ (capsaicina) que respondieron al frío o mentol ($*p < 0.05$, prueba exacta de Fisher). D) Número de neuronas con distinto perfil termoquímico expresado sobre el total de neuronas analizadas ($*p < 0.05$, prueba exacta de Fisher). E) Proporción de las neuronas denominadas como “reclutadas” en función de su respuesta a AITC, capsaicina (Caps), o ambos agonistas. Número de neuronas “reclutadas” $n=60$ grupo control y $n=87$ grupo tratado (prueba exacta de Fisher). F) Trazos representativos de los distintos tipos funcionales en los que hemos clasificado a las neuronas sensibles al frío. H) Amplitud y G) umbral de temperatura para las respuestas al frío (“F”) y frío + mentol (F+M) de neuronas individuales control (azul) o tratadas (naranja). Para los tipos “TRPM8”, “TRPM8/TRPA1”, “TRPA1” y “sólo frío” se representan las neuronas que respondieron a los dos pulsos de frío (individualmente y en presencia de mentol), $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, prueba exacta t-Student pareada y $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ prueba t-Student no pareada indicado en negro. Número de neuronas $n=30$ control y $n=43$ tratado para “tipo TRPM8”, $n=5$ control y $n=13$ tratado para “TRPM8/TRPA1”, $n=20$ control y $n=26$ tratado para “tipo TRPA1”, $n=7$ control, $n=60$ control y $n=87$ tratado para “reclutadas” y $n=9$ tratado para “sólo frío”.

4.4.3. Estudio de las respuestas ante agonistas específicos de los canales TRP en neuronas EYFP+, IB4+ y DN obtenidas de ratones tratados con oxaliplatino

Tras estudiar el efecto general de la neuropatía inducida por oxaliplatino sobre la población de neuronas DRG, procedimos a investigar si los cambios se circunscriben a alguno de los grupos de neuronas caracterizadas en el bloque 4.1, clasificando las neuronas presentadas en la sección anterior en IF-EYFP+, WF-EYFP+, IB4+/EYFP- o DN.

Los histogramas de la **figura 60A**, resumen la cuantificación de las respuestas ante los agonistas utilizados para cada una de las subpoblaciones neuronales. Se indica además el número de neuronas AITC- o AITC+ sensibles al frío. El efecto del tratamiento con oxaliplatino, observado para la población total de neuronas, no es específico para ninguna población estudiada y en todas se aprecia un aumento del porcentaje de respuestas al frío y al mentol.

Dentro de la población IF-EYFP+, el aumento es significativo para las respuestas al estímulo de frío que aumentó de un 75 % (24/32) en condición control vs 92.3 % (36/39) en neuronas tratadas con oxaliplatino ($p = 0.047$, prueba exacta de Fisher a una cola). Las respuestas a mentol fueron un 62.5 % (20/32) vs 87.2 % (34/39) en la condición de oxaliplatino, siendo este cambio estadísticamente significativo ($p = 0.016$, prueba exacta de Fisher a una cola), mientras que para el estímulo de mentol y frío también se observa un aumento en la condición tratada, aunque el cambio no fue estadísticamente significativo (78.1 % (25/32) vs 92.3 % (36/39), $p = 0.086$, prueba exacta de Fisher a una cola).

Para la población WF-EYFP+ no observamos cambios significativos en la respuesta a ninguno de los estímulos estudiados; aunque en el estímulo de M+ F se aprecia una mayor tendencia de

aumento en la proporción de neuronas que responden en el grupo tratado con oxaliplatino (33.6 %; 42/125) respecto al control (24.5 %; 25/102, $p = 0.88$, prueba exacta de Fisher a una cola).

El número de neuronas que responden al frío en la población IB4+/EYFP- también aumentó (10.7 % 13/122 vs 20.2 % 25/124, $p = 0.029$, prueba exacta de Fisher a una cola). Para el mentol, el aumento también fue significativo (13.1 %, 16/122 vs 28.2 %, 35/124, $p = 0.0027$, prueba exacta de Fisher), y para M+F (34.4 % 42/122 vs 46.8 % 58/124, $p = 0.033$ prueba exacta de Fisher a una cola). Al separar las neuronas sensibles al frío en AITC- y AITC+, observamos que dicho aumento es debido a una mayor proporción de neuronas que responden a AITC y por tanto que expresan TRPA1 (9 % (11/122) vs 16.1 % (20/124) para el frío.

Respecto a las neuronas DN, el incremento en porcentaje de respuesta para el estímulo de frío y M+F, resultó estadísticamente significativo (3.5 % (9/254) vs 7.6 % (18/237), para el estímulo de frío y 10.2 % (26/254) vs 14.8 % (44/237) para M+F, $p = 0.038$ y $p = 0.006$ respectivamente, prueba exacta de Fisher a una cola). Para los demás agonistas el aumento no llegó a ser significativo (**figura 60A**).

De manera similar a la clasificación realizada en la **figura 59D**, analizamos el perfil quimio-sensible de las neuronas sensibles al frío para cada subpoblación en el grupo control y el tratado con el oxaliplatino. Así, separamos en “tipo TRPM8”, “tipo TRPA1”, “tipo TRPM8/TRPA1”, “reclutadas” y “sólo frío” (**figura 60B**). Dentro de la población IF-EYFP+, la mayoría de las neuronas sensibles al frío que contribuyen al aumento en la condición oxaliplatino, presentan una respuesta propia de TRPM8, mostrando una clara tendencia de aumento en el grupo tratado (59.4 % (19/32) vs 77.9 % (31/39), $p = 0.056$, prueba exacta de Fisher a una vía). Las poblaciones WF-EYFP+ y DN presentan principalmente un aumento de neuronas reclutadas (11.8 % (11/102) control vs 20.8 % (26/125) tratado, $p = 0.031$ para WF-EYFP+; y 5.9 % (15/254) control vs 10.97 % (26/237) tratado, $p = 0.031$, prueba exacta de Fisher a una vía). Además, el número de neuronas “tipo TRPM8/TRPA1” aumenta significativamente en la población DN tratada (0 % (0/254) control vs 20.8 % (5/237) tratado, $p = 0.026$, prueba exacta de Fisher a una vía). En la población IB4+ se observa un incremento de la respuesta al frío típica dependiente de TRPA1 (8.2 % (10/122) control vs 13.7 % (17/124) tratado, $p = 0.12$) y en las neuronas reclutadas (21.3 % (26/122) vs 24.2 % (30/124), $p = 0.34$), aunque en ambos casos, no llegó a ser estadísticamente significativo. Adicionalmente, analizamos el perfil de respuestas de las neuronas reclutadas para los agonistas AITC y capsaicina. Tal como se muestra en la **figura 60C**, los perfiles quimiosensibles fueron muy similares entre poblaciones sin diferencias significativas para la condición tratada y su control.

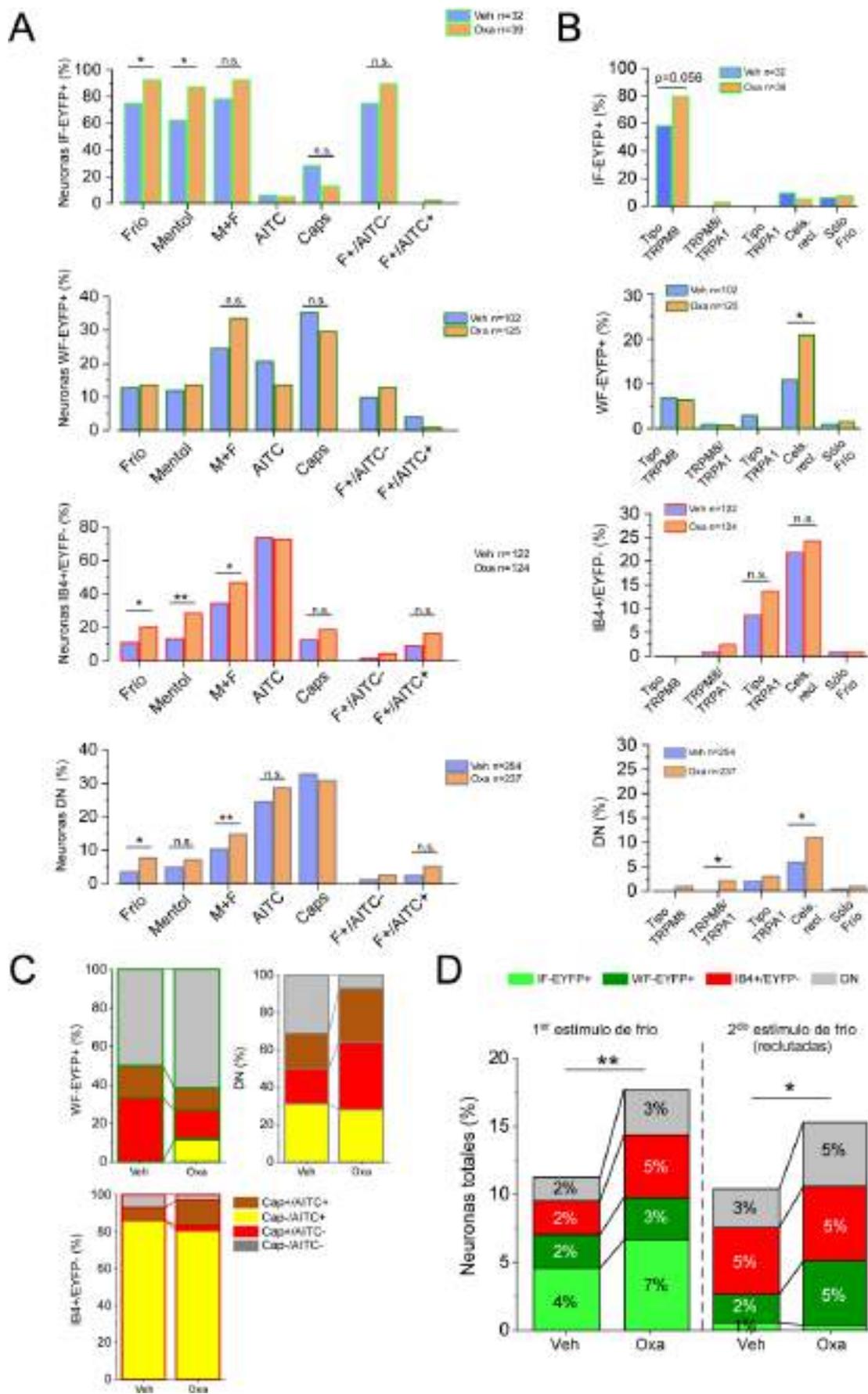


Figura 60. Perfil quimio-sensible y efecto del oxaliplatino sobre las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN. A) Cuantificación del porcentaje de respuesta para cada subpoblación (** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$, prueba exacta de Fisher a una cola). Abreviaturas: “F, frío”. B) porcentaje del número de neuronas que responden a frío en cada grupo establecido en la sección anterior y expresado como el porcentaje sobre el número total de neuronas de cada población. Para IF-EYFP, $n=32$ control y $n=39$ oxaliplatino, WF-EYFP+ $n=102$ control y $n=125$ oxaliplatino, IB4+/EYFP- $n=122$ control y $n=124$ oxaliplatino, DN $n=254$ control y $n=237$ oxaliplatino (* $p < 0.05$, prueba exacta de Fisher a una cola). C) Proporción de las neuronas denominadas como “reclutadas” en función de su reactividad a AITC, capsaicina (Caps), o ambos agonistas. Número de neuronas “reclutadas” $n=11$ (WF-EYFP+), $n=26$ (IB4+/EYFP-), $n=15$ (DN) para el grupo control (veh), y $n=26$ (WF-EYFP+), $n=30$ (IB4+/EYFP-), $n=26$ (DN) en el grupo tratado. D) Histograma comparativo de los porcentajes de respuesta al estímulo de frío; primer estímulo y tras su reclutamiento con mentol (neuronas “reclutadas”) para las poblaciones IF-EYFP+, WF-EYFP+, IB4+/EYFP- y DN, sobre el total de neuronas analizadas (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ al comparar el número de respuestas totales, prueba exacta de Fisher).

En resumen, los datos expuestos indican que, cuando separamos las neuronas sensibles al frío en subpoblaciones IF-EYFP+, WF-EYFP+, IB4+/EYFP- y DN existe una sensibilización más marcada en la población IF-EYFP+ y IB4+/EYFP- ante el estímulo del frío y mentol. Junto con las DN, contribuyen al incremento de las respuestas al frío. En cambio, las poblaciones WF-EYFP+ y DN se sensibilizan en presencia de mentol, aumentando el número de neuronas reclutadas (responden más al segundo estímulo de frío) (**figura 60D**). No obstante, no encontramos diferencias notables en el perfil termoquímico. Pese a que los resultados no fueron concluyentes a nivel poblacional, es cierto que, globalmente, se aprecia un aumento generalizado en el número de respuestas ante estos agonistas.

Por último, analizamos el umbral de activación para el estímulo de frío en las distintas subpoblaciones. En la **figura 61A** se representa el porcentaje acumulativo de neuronas que responden al estímulo de frío en neuronas control (**figura 61A**, izquierda) y tratadas (**figura 61A**, derecha). Tal como se observa, la curva para la población DN muestra un desplazamiento hacia valores de temperaturas más altos; su valor promedio aumenta de 15.2 ± 0.6 °C a 19.6 ± 1.1 °C ($p=0.016$, prueba t-Student no pareada, **figura 61B**) y se debe a la aparición de neuronas sensibles al frío en los rangos de temperatura para los umbrales bajos y altos (véase **figura 61C** y **D**). No se observaron cambios significativos en el umbral de temperatura para las poblaciones restantes.

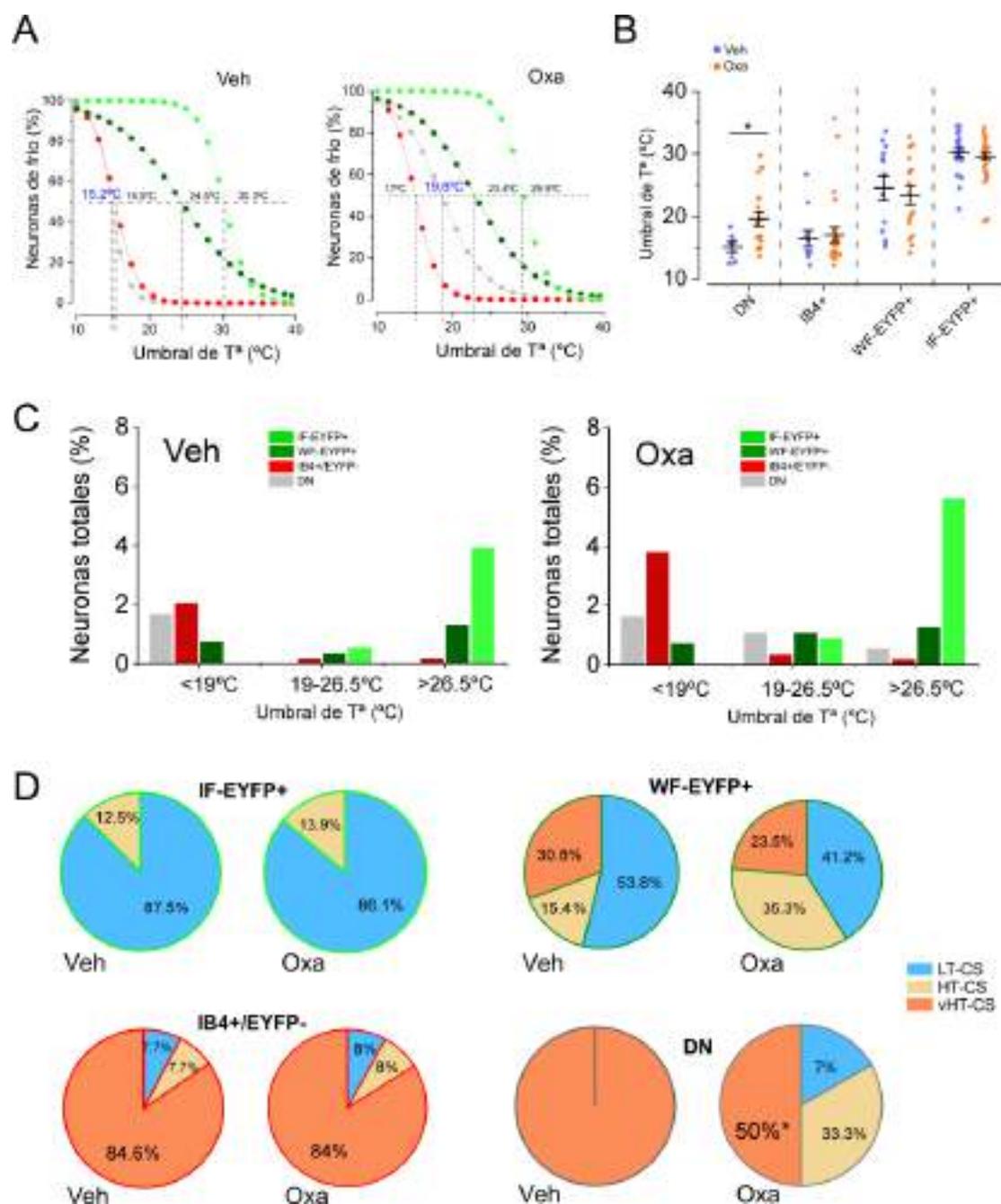


Figura 61. Variabilidad en el umbral de temperatura entre las poblaciones estudiadas tras el tratamiento con el oxaliplatino. A) Número acumulado de neuronas sensibles al frío en función de su umbral de temperatura. La intersección de línea punteada horizontal y las líneas verticales señalan la temperatura umbral para el 50% de cada subpoblación. B) Valor medio con su error estándar para cada subpoblación (* $p < 0.05$ prueba t-Student). C) Porcentaje de neuronas sensibles al frío en el rango indicado expresado sobre el total de neuronas analizadas y D), cuantificación del número de neuronas de bajo umbral (“LT-CS, *Low-Threshold*”, >26.5 °C), alto umbral (“HT-CS, *High-Threshold*”, $26.5-19$ °C) y muy alto umbral (“vHT-CS, *very High-Threshold*”, <19 °C), para para las poblaciones IF-EYFP, WF-EYFP+, IB4+/EYFP- y DN en ambas condiciones. Número de neuronas sensibles al frío $n=9$ (DN), $n=13$ (IB4+/EYFP-), $n=13$ (WF-EYFP+) y $n=24$ (IF-EYFP+) para la condición control (veh) y $n=18$ (DN), $n=25$ (IB4+/EYFP-), $n=17$ (WF-EYFP+) y $n=36$ (IF-EYFP+) para la tratada, $n_{total}=534$ y $n_{total}=552$ para control y tratado respectivamente.

4.4.4. Perfil transcriptómico de las neuronas sensoriales tratadas con oxaliplatino

La caracterización funcional de la neuropatía inducida por oxaliplatino mediante los experimentos de imagen funcional de calcio in vitro, muestra que existe una sensibilización de las neuronas de DRG a los estímulos de frío y mentol. Estos resultados son coherentes con aquellos obtenidos por conducta, donde los animales exhiben una hipersensibilidad al frío en la prueba de la placa fría. Sin embargo, el papel de TRPM8 en la neuropatía no se pudo determinar con claridad, dado que encontramos un aumento generalizado y una sensibilización de las respuestas a frío y mentol incluso en neuronas presuntamente TRPM8 negativas; los resultados de la sección anterior sugieren que las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN están de algún u otro modo involucradas.

Así pues, nos planteamos un abordaje distinto para identificar los mecanismos moleculares que pudieran estar alterados en las distintas subpoblaciones de neuronas sensoriales. Al igual que en la **sección 4.2.2**, realizamos la secuenciación masiva de neuronas aisladas por FACS para las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN, en este caso centrándonos en la comparación dentro de la misma subpoblación entre animales control y tratados con oxaliplatino (ver esquema del paradigma experimental en la **figura 62A**); las librerías de ARN se prepararon y secuenciaron utilizando la plataforma Illumina NextSeq500 para n=6, n=5 y n=3 réplicas biológicas en condición control y n=6, n=6 y n=3 del grupo tratado para las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN, respectivamente. Con el objetivo de identificar los cambios génicos después del tratamiento con oxaliplatino, en el análisis se comparó la misma población control y tratada, por lo que el análisis estadístico usando el paquete *EdgeR* se realizó por separado para cada población.

El análisis bioinformático fue similar al protocolo utilizado en la **sección 4.2.2** con pequeñas variaciones; realizamos una normalización mediante controles negativos o “*housekeeping*” donde se calculó el factor de variación no deseada a través del paquete estadístico *RUVSeq* antes del realizar el análisis diferencial (para más detalle véase de nuevo la **sección 3.13.3** de materiales y métodos). En la **figura 62B** se ha representado la primera y la segunda dimensión del componente principal (PCA) después de la normalización. Se aprecia una agrupación en función de la condición (control o tratada) para cada una de las tres poblaciones estudiadas, lo que indica que el oxaliplatino afecta a nivel transcriptómico las neuronas seleccionadas.

Al igual que en la **sección 4.2**, los genes se consideraron diferencialmente expresados (*DE*) si presentan un $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$ como unidad de expresión relativa, y un *p*-valor ajustado < 0.05 (FDR, “False Discovery Rate”). Los genes *DE* para cada población pueden observarse en los diagramas “volcán” y en los mapas de calor de las **figuras 62C y D**. Una primera exploración de los datos nos indica que los genes alterados tras el tratamiento permiten una correcta segregación de las

muestras según su tratamiento. Además, nótese que el número de genes *DE* identificados varían dependiendo de la subpoblación neuronal examinada, sugiriendo que el oxaliplatino afecta de manera distinta según el tipo celular y actuando posiblemente sobre mecanismos celulares diversos. La población inespecífica DN presenta el mayor número de genes diferencialmente expresados, la mayoría de ellos sobreexpresados (en total 1796 genes *DE* identificados). La población IB4+ presenta 794 genes diferencialmente alterados tras el oxaliplatino, mientras que en la población EYFP+ encontramos un menor número de genes alterados, 663 (**figura 62D**). Este menor número podría también ser coherente con la mayor pureza de la población EYFP+. De entre los genes *DE* destaca la sobreexpresión de *Trpm8* en la población IB4+ y DN, pero no en la EYFP+ (véase de nuevo la **figura 62C**).

A continuación, exploramos en más detalle la relevancia biológica de los datos obtenidos, usando varios tipos de análisis de enriquecimiento de genes. El primero de estos procedimientos se conoce como “*Gene Set Enrichment Analysis*” (GSEA) (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005). A diferencia de otros análisis de enriquecimiento, algunos ya usados en esta memoria, como los términos de “*Gene ontology*” (GO), este método permite puntuar los genes según su nivel de expresión diferencial de acuerdo con una lista de genes de interés. Una de las ventajas de este tipo de análisis es que no nos limitamos a usar una base de datos ya establecida, por lo que pudimos comparar nuestros genes *DE* con estudios de asociación de genoma humano completo (GWAS) relacionados con patologías del dolor (véase en más detalle la **sección 3.13.3** de materiales y métodos).

Las **figuras 62E** y **F** muestran los resultados obtenidos del análisis, tras puntuar los valores de expresión obtenidos de los experimentos de *RNA-Seq* con las distintas bases de datos seleccionadas. En la **figura 62E** se han representado dos ejemplos con la mejor correlación (en función del *p*-valor ajustado por el método Benjamini & Hochberg, FDR_{GSEA}) al comparar los distintos fenotipos de patologías humanas; las poblaciones IB4+ y DN son las que presentaron una relación más estrecha en los términos asociados a “*Headache*” y “*Limb pain*”, respectivamente (véase también **figura 62F**).

En la **figura 62F** también se indica la puntuación del enriquecimiento (“*Enrichment score*”, *ES*, en este caso denominado *NES*, “*Normalized Enrichment Score*”, ya que está normalizado al tamaño muestral de las bases de datos utilizadas); un valor *NES* positivo indica que la base de datos está enriquecida al principio del “*ranking*” que obtenemos tras puntuar los genes *DE* (y por tanto enriquecida en genes sobreexpresados en las muestras control), mientras que un valor negativo indica el enriquecimiento al final, es decir, en muestras tratadas con oxaliplatino y por tanto genes sobreexpresados en la condición de oxaliplatino.

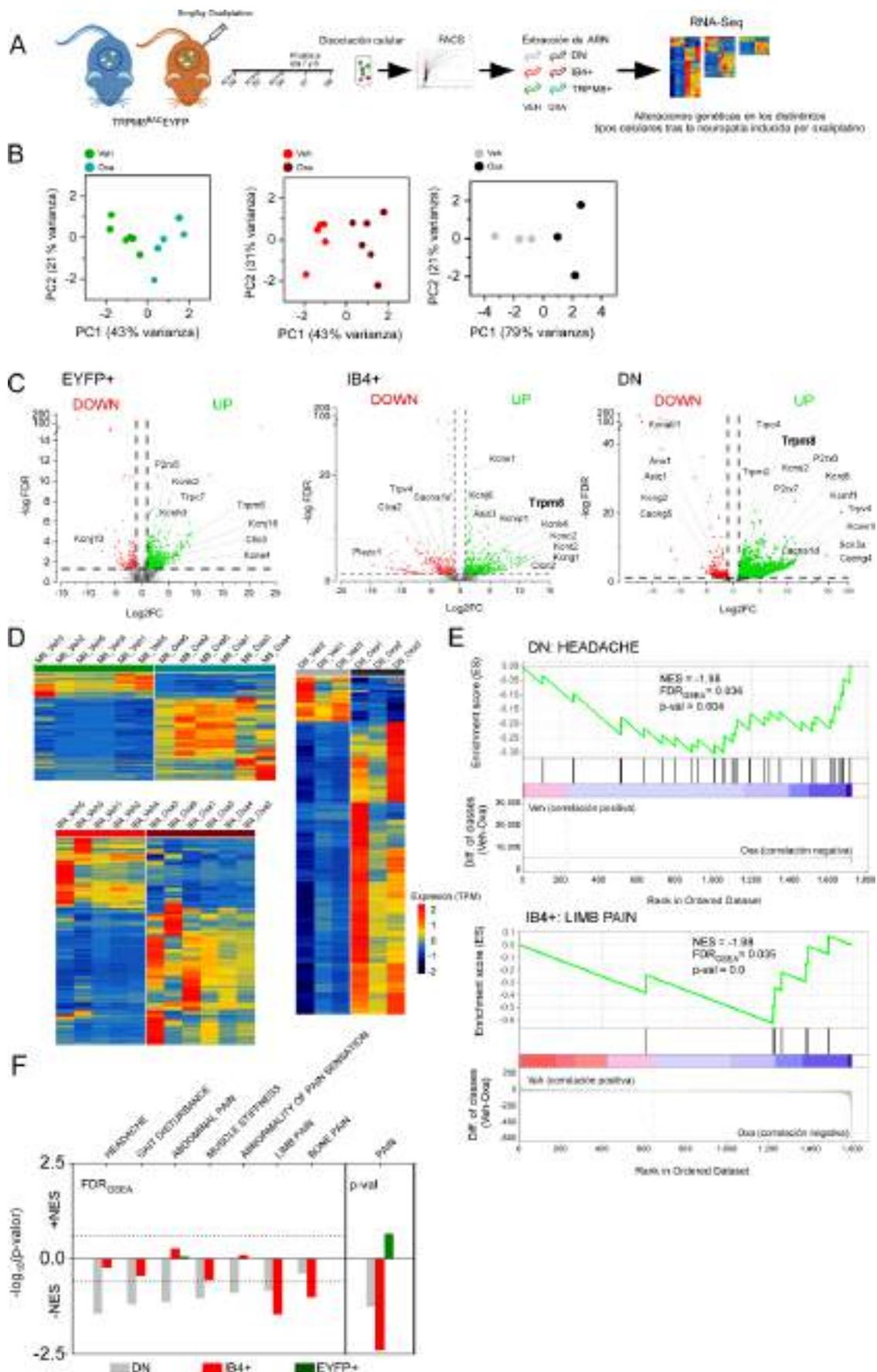


Figura 62. Análisis de la expresión diferencial de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN y su asociación con términos relacionados con patologías humanas. A) Esquema del protocolo seguido para el aislamiento y secuenciación de neuronas EYFP+, IB4+ y DN tras la inducción de la neuropatía por oxaliplatino. A diferencia del análisis realizado en las **secciones 4.2.2-3**, el análisis comparativo se efectuó entre las mismas subpoblaciones neuronales en diferentes condiciones experimentales. B) El análisis del componente principal (PCA, unidad de expresión $\log_2\text{CPM}$) muestra una segregación diferente del transcriptoma para las tres poblaciones purificadas de neuronas tratadas y sus controles (EYFP+ verde, IB4+ rojo, y DN gris). C) Gráficos tipo volcán representando los genes diferencialmente expresados (*DE*) en cada una de las subpoblaciones neuronales. Los puntos verdes representan genes diferencialmente sobreexpresados en la condición tratada con oxaliplatino, “UP”, con un umbral $\text{Log}_2\text{FC}>1$ y $\text{FDR}<0.05$ y los puntos rojos infraexpresados, “DOWN”, $\text{Log}_2\text{FC}<-1$ y $\text{FDR}<0.05$ (línea punteada). Se indican además los nombres de los canales iónicos diferencialmente expresados. D) Mapas de calor con la expresión de los transcritos (TPM) de genes *DE* ($|\text{Log}_2\text{FC}|>1$ y $\text{FDR}<0.05$) en la condición control y tratada en las tres poblaciones estudiadas. E y F) Análisis GSEA (“*Gene set enrichment analysis*”) de los genes *DE* para las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN tras la inducción de la neuropatía. En E) se muestra el análisis resultante para dos términos asociados con patologías humanas y que muestran mejor asociación para las alteraciones genéticas observadas tras la neuropatía; “*Headache*” y “*Limb pain*”, que se relacionaron con la población DN e IB4+ respectivamente. Se indican los valores *NES* y el *p*-valor para estos términos. En F) se resumen los mejores términos ($\text{FDR}_{\text{GSEA}} < 0.05$) del análisis para cada población. El término “*PAIN*”, se encuentra representado aparte y en este caso expresa en *p*-valor.

El patrón de expresión para todas las patologías analizadas se resume en la **figura 62F**; en ella puede observarse que las poblaciones más enriquecidas en términos patológicos relacionados con el dolor son las poblaciones IB4+ y DN. Además, la mayoría presenta un valor *NES* negativo por lo que los términos se relacionan con genes sobreexpresados en las muestras tratadas con oxaliplatino.

Adicionalmente, también analizamos el enriquecimiento de los genes *DE* tras el oxaliplatino con el término generalizado del dolor, sin especificar una patología concreta (denominado como “*PAIN*” en la **figura 62E**). En este caso, los genes *DE* de la población IB4+ es la que presenta una relación más estrecha, seguida por la población DN. La población EYFP+ está inversamente relacionada con un valor *ES*. Esto indica que los genes expresados negativamente tras el tratamiento con el oxaliplatino son los que presentan gran relevancia en procesos de generación del dolor para esta población. En cambio, para la población IB4+ y DN los genes sobreexpresados en la condición tratada tienen más relevancia en las patologías del dolor. Nótese que para el término generalizado del dolor el *p*-valor no se encuentra ajustado, dado que sólo hemos analizado una base de datos (**figura 62E**).

Las **figuras 62E y F**, sugieren que las poblaciones DN e IB4+ pueden tener un papel relevante en la generación de dolor en la neuropatía inducida por oxaliplatino, sin embargo, desconocemos qué procesos biológicos pueden estar implicados. Para ello, aparte del análisis por GSEA, también investigamos los términos enriquecidos de la base de datos *Gene Ontology* (*GO*). De entre

los términos en la categoría proceso biológico (*BP*), en la **figura 63A**, se recogen aquellos más probables según su nivel de significación (*p*-valor) para los genes *DE* tanto sobreexpresados como infraexpresados en la condición de oxaliplatino según la población estudiada. Cabe destacar que algunos de los términos encontrados se relacionan con células no neuronales como es el caso de procesos de gliogénesis, vascularización, alteración en la diferenciación de los eritrocitos o procesos propios del sistema inmunitario, indicando que los efectos producidos por el compuesto no se limitan sólo a las neuronas sensoriales, sino que otras células son partícipes de los cambios observados.

Puesto que las poblaciones DN y IB4+ presentan cierto grado de heterogeneidad (verse de nuevo **figura 45C**), clasificamos los genes *DE* en nuestras poblaciones según su origen neuronal y no neuronal, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó en **la sección 4.2.3**. En este caso también distinguimos si las células no neuronales pertenecen al sistema inmune dado su importancia en el desarrollo del dolor y ciertas neuropatías, especialmente en la hipersensibilidad mecánica (Cobos *et al.*, 2018). Es más, existen pruebas directas de la alteración de células inmunes tras el tratamiento con oxaliplatino (Stojanovska *et al.*, 2019).

Un dato inesperado teniendo en cuenta que el número de genes *DE* es distinto dependiendo de la población, es que su proporción para los marcadores de cada clase (neuronal, inmune, neuronal/inmune, células satélites o inespecífico) no varía entre las muestras DN, IB4+ y EYFP+ (**figura 63B**). Dentro de los genes de origen neuronal, la mayoría de los cambios se generan en genes marcadores para nociceptores Nav1.8+/IB4- (**figura 63C**). En el caso de los genes con origen no neuronal cabe destacar que la desregulación de células satélites presenta el mayor porcentaje. Respecto del sistema inmune, la mayoría de los genes alterados son marcadores de las células auxiliares CD4+/Th1, participando también los macrófagos, aunque en menor medida (**figura 63C**). Las células Th1 son los mediadores principales de los procesos inflamatorios de los que dependen los macrófagos y otras células T citotóxicas, además de que regulan positivamente la liberación de IFN- γ (Rosas *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2015).

En la **figura 63D**, se muestra además cómo se distribuyen los términos ontológicos obtenidos en la **figura 63A** tras clasificarlos en función de su origen neuronal o no neuronal. Nótese que los procesos biológicos no se repiten ni entre las categorías ni entre las poblaciones DN, IB4+ y EYFP+, a excepción de la organización de la matriz extracelular que aparece alterado para genes de origen no neuronal en la población IB4+ y DN y resaltado en azul en la figura. Esto sugiere que el oxaliplatino afecta de forma distinta a las subpoblaciones estudiadas y dentro de éstas entre los distintos tipos celulares, pudiendo quizás explicar la variada sintomatología que provoca la neuropatía.

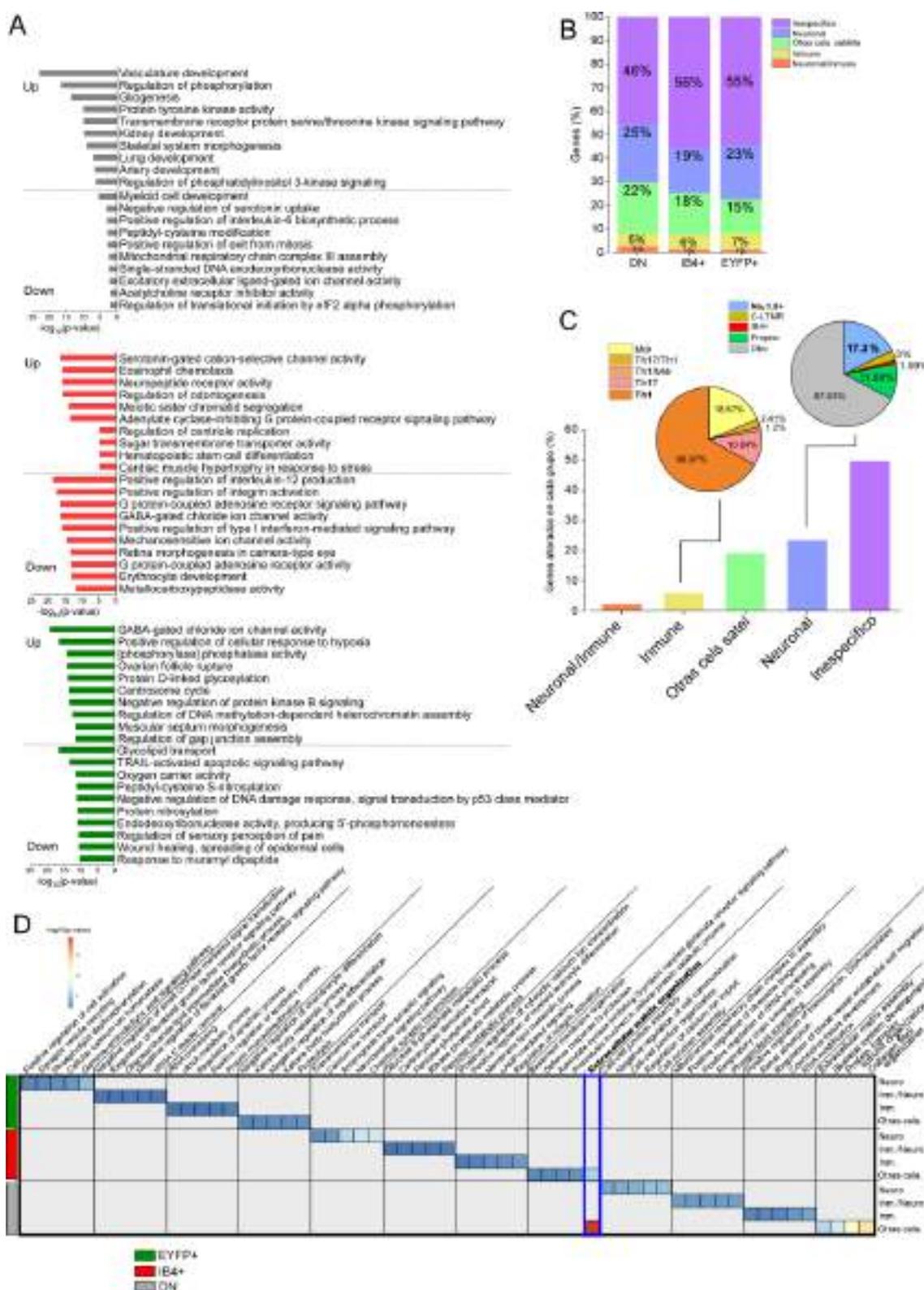


Figura 63. El oxaliplatino provoca una alteración molecular diferente en células neuronales y de origen no neuronal. A) Análisis de ontología genes *DE* para las poblaciones DN (gris), IB4+ (rojo) y EYFP+ (verde) con los 10 mejores grupos de términos en la categoría de proceso biológico (BP) de la base de datos GO. Los términos se han separado según agrupen genes sobreexpresados o infraexpresados. B) Porcentaje de genes de origen neuronal, satélite, sistema inmune, neuronal-inmune o indeterminado para los genes

diferencialmente expresados de las subpoblaciones DN, IB4+ y EYFP+. C) Misma representación que en B) sin separar entre las poblaciones DN, IB4+ y EYFP. Los sectores circulares detallan si los genes de origen neuronal definen las poblaciones Nav1.8+/IB4-, Nav1.8+/IB4-, propioceptores (“Proprio”) y C-LTMRs, referente a la **figura 46** o a macrófagos (M ϕ), células Th1 o células Th17 en el caso de genes relacionados con el sistema inmunitario. D) Mismo análisis que en A) para los grupos de genes alterados en función de su origen celular y la población donde se expresan (se representan los 5 mejores términos para cada categoría). La barra de escala indica el *p*-valor estadístico expresado como $-\log_{10}(p\text{-valor})$, siendo en rojo en máximo y azul mínimo.

Seguidamente, al explorar el solapamiento de los genes *DE*, se observa que prácticamente los genes alterados no se repiten entre las subpoblaciones (ver los diagramas de Venn de la **figura 64A**), ya sean desregulados positiva o negativamente. Sólo se identificaron 31 genes comunes para las tres poblaciones que se indican en la **tabla 64B**. De éstos, *Hba-a1*, *H2-Ab1*, *H2-Aa*, *Hbb-b1*, *S100a8* y *Cd74* están relacionados con deficiencias inmunitarias (**figura 64C**).

Igualmente, analizamos los procesos biológicos implicados según aquellos genes alterados de manera específica en una subpoblación celular determinada. En este caso, quisimos identificar aquellos procesos alterados según la base de datos de vías celulares KEGG (del inglés “*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*”), ya que nos permite definir mejor las interacciones moleculares dentro de las células que definen una vía metabólica o de señalización. Las **figuras 64D** muestran la red de interacción según su asociación génica para los términos enriquecidos de genes *DE* alterados en una población específica. Téngase en cuenta que, aunque los genes analizados sólo se expresan en una u otra población es posible que participen en procesos comunes con otros genes inespecíficos en las poblaciones restantes. En la **tabla 8** del anexo 2 pueden consultarse los genes *DE* con mayor nivel de expresión para cada grupo.

Consecuente con los genes *DE* obtenidos, la población DN es la que presenta un número más elevado de vías de señalización alteradas ya que presenta una red de interacción mayor que las otras dos poblaciones (**figura 64D**). De los términos más enriquecidos se incluyen la matriz extracelular (“*ECM receptor-interaction*”) y rutas de señalización celular PI3K/AKT/mTOR o Hippo, ambos relacionados con la supervivencia celular, siendo potenciales dianas para mecanismos afectados tras el oxaliplatino. Al examinar los resultados obtenidos en las demás poblaciones, encontramos que en la población IB4+ los genes alterados están principalmente relacionados con la infección por el virus Herpes 1 con la familia de proteínas *Zinc finger proteins* (ZFP), que pueden estar alterados en procesos inmunitarios para la secreción del interferón. Además, también encontramos genes relacionados con la activación neuronal por ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (**figura 64D**, panel central). Los principales términos relacionados con genes *DE* específicos de la población EYFP+, incluyen alteraciones en el metabolismo del nitrógeno o la N-glicosilación de proteínas (**figura 64D**, panel de la derecha).

Figura 64. Las vías de señalización y los mecanismos celulares alterados por el tratamiento con oxaliplatino son específicos de cada subpoblación. A) Diagramas de Venn mostrando genes alterados positivamente (izquierda, $\text{Log}_2\text{FC} > 1$, $\text{FDR} < 0.05$) y negativamente (derecha, $\text{Log}_2\text{FC} < -1$, $\text{FDR} < 0.05$) para las subpoblaciones EYFP+, IB4+ y DN. B) Tabla con los 31 genes alterados comunes entre las tres poblaciones. Se indica la dirección de la regulación (“UP” sobreexpresados, “DOWN”, infraexpresados) para las tres poblaciones estudiadas. C) Análisis de interacciones, según el análisis del programa ClueGo para los genes comunes indicados en B (términos BP de la base de datos GO) y D) términos KEGG, específicos de cada población DN (izquierda), IB4+ (centro) y EYFP+ (derecha). Las redes están representadas usando la modalidad “Cerebral layout”. E) Adaptación gráfica de la vía mmu04080: “Neuroactive ligand-receptor interaction” identificada en el análisis de enriquecimiento para la población IB4+ en D) en la base de datos de KEGG. Los colores en los receptores indican el valor de expresión diferencial (Log_2FC) al comparar entre las muestras IB4+ (gráfico superior) y EYFP+ (gráfico inferior) tratadas y sus controles. Verde indica sobreexpresión y rojo infraexpresión en la condición oxaliplatino.

En referencia a la activación de GCPRs por ligandos, este término puede tener un papel relevante para explicar la sensibilización de neuronas IB4+, por lo que se ha representado en más detalle en el panel superior de la **figura 64E**. En ella se aprecia de forma esquematizada los receptores o ligandos alterados por el tratamiento, la escala de color indica la unidad de expresión (Log_2FC) al comparar las muestras control y oxaliplatino de la población IB4+. Se indica además los resultados de esta misma vía para la población EYFP+ (panel inferior). Aunque se encuentran genes alterados para el mismo proceso biológico en ambas en ambas poblaciones, nótese que la población IB4+ presenta más receptores y ligandos alterados.

4.4.5. El tratamiento con el oxaliplatino produce un aumento en la expresión del canal TRPM8 y de otros marcadores propios de la población TRPM8 de baja intensidad

En la sección anterior hemos descrito de manera generalizada las alteraciones génicas producidas por el oxaliplatino. Sin embargo, el dato más relevante para nuestro trabajo es que el canal termosensible TRPM8 se encuentra sobreexpresado en las poblaciones DN y IB4+ y que originalmente no lo expresaban (véase de nuevo la **figura 62C** y la **figura 65A** donde se indica la unidad de expresión en Log_2FC para *Trpm8*). Para validar este cambio, realizamos experimentos inmunohistológicos en rodajas de DRG de animales TRPM8^{BAC}EYFP tratados con el oxaliplatino y sus controles (vehículo) y confirmar así el patrón de expresión en neuronas TRPM8+.

Se utilizó un triple marcaje para GFP, IB4 y beta-tubulina III, un marcaje neuronal que permite identificar la población total de neuronas sensoriales (**figura 65B**). Los datos obtenidos muestran una mayor fluorescencia verde en rodajas de ratones tratados con oxaliplatino, tal como se muestra en las **figuras 65B-C**. El análisis realizado en la **figura 65C** muestra que la distribución acumulativa de la fluorescencia de ambos grupos para imágenes (control y tratado) son distintas

($p < 0.001$, prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov). El aumento de la fluorescencia en neuronas TRPM8^{BAC}EYFP puede ir acompañado de un aumento de la expresión de *Trpm8*.

En las muestras de animales tratados con oxaliplatino, se observa un incremento en el número de neuronas EYFP+ respecto al número total de células analizadas. Ambas poblaciones, IF-EYFP+ y WF-EYFP+, aumentan en los ratones tratados, observándose el mayor cambio en la subpoblación de baja expresión WF-EYFP+, aumentando el número de un 13 % (213/1639) a un 29.4 % (362/1235) ($p < 0.001$, prueba exacta de Fisher) (**figura 65D**). Este aumento no viene acompañado de cambios en el número total de células IB4+, aunque se aprecia un aumento notable en la co-expresión de ambos marcadores (**figuras 65D y E**). En conjunto, estos datos sugieren un cambio en el patrón de expresión de TRPM8, aumentando su expresión en neuronas IB4+.

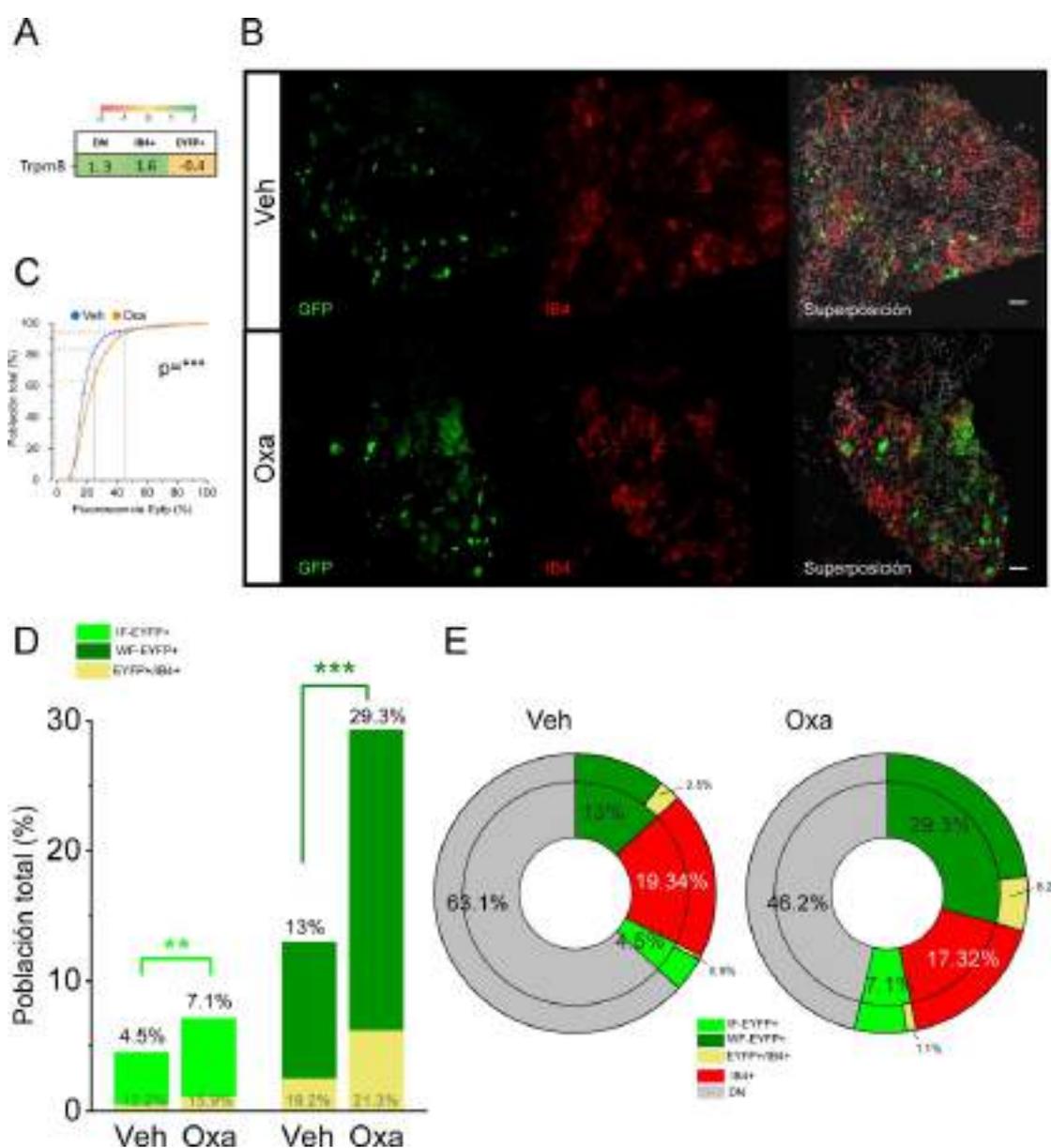


Figura 65. El oxaliplatino produce un incremento en la fluorescencia de neuronas TRPM8+ de DRG. A) Expresión diferencial expresado en Log_2FC del gen *Trpm8* obtenido tras la secuenciación de neuronas EYFP+, IB4+ y DN tratadas y sus controles (referente a la **sección 4.4.4**). El gen está diferencialmente sobreexpresado ($Log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$) en las poblaciones IB4+ y DN. B) Imágenes representativas en microscopía confocal del marcaje de GFP e IB4 realizado por inmunohistoquímica en rodajas fijadas de DRG de ratones TRPM8^{BAC}EYFP inyectados con el oxaliplatino (oxa) o vehículo (veh). Las imágenes de los paneles derechos muestran la fluorescencia superpuesta con el marcaje β -tubulina III. Barra de escala: 50 μ m. C) Distribución acumulativa de la fluorescencia EYFP detectada en las imágenes para la condición control (azul) y tratado (naranja). Se indican los puntos de corte establecidos para determinar las neuronas EYFP+ y dentro de ellas aquellas de alta intensidad (IF-EYFP+) ($***p < 0.001$, prueba de Kolmogorov-Smirnov). D) y E) Cuantificación de las neuronas IF-EYFP+ (verde claro) y WF-EYFP+ (verde oscuro) sobre el total de neuronas analizadas. En D, se detalla además el porcentaje de las neuronas EYFP+/IB4+ sobre el número de neuronas EYFP+ ($**p < 0.01$ y $***p < 0.001$, prueba exacta de Fisher), mientras que, en E, se detalla además el número de neuronas IB4+ sobre el total de neuronas analizadas. Número de neuronas analizadas $n=287$ EYFP+, $n=317$ IB4+ ($n_{total}=1639$) para la condición control y $n=450$ EYFP+, $n=214$ IB4+ ($n_{total}=1235$); $n=3$ animales por condición.

A la vista de estos resultados, quisimos determinar si la aparición de las nuevas neuronas EYFP+ viene acompañado en un cambio en la naturaleza de su perfil molecular o el cambio es sólo debido a una mayor expresión de TRPM8. Con este fin, repetimos las mismas pautas del análisis bioinformático utilizado en la **sección 4.2.3** para determinar si los marcadores moleculares de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN (genes *DE* al comparar una población con las otras dos restantes) siguen estando presentes en las muestras tratadas con oxaliplatino.

Al comparar los genes *DE* específicos para cada población tratada EYFP+, IB4+ y DN con marcadores específicos de subpoblaciones neuronales identificados por secuenciación por célula única (referente a la **figura 47C** de la **sección 4.2.4**), se observa un mayor porcentaje de marcadores específicos de las neuronas peptidérgicas (PEP1.1-4 y PEP2) en la población DN tratadas que en la condición control. También observamos que aumenta la proporción de marcadores peptidérgicos en las neuronas IB4+ tratadas y disminuye aquellos propios de esta población correspondiente al subgrupo NP1 (nociceptores MRGPRD+). Por el contrario, el porcentaje de genes peptidérgicos no cambió en las muestras EYFP+ tratadas (**figura 66A**). Tampoco se han encontrado diferencias notables en la distribución de genes que identifican a los subgrupos TRPM8+, identificados en la **sección 4.3.1**, en muestras EYFP+ tratadas (**figura 66B**).

Asimismo, la **figura 66C** muestra un gráfico PCA para el análisis conjunto de todas las muestras secuenciadas, tanto control como tratadas. Se observa que aquellas que pertenecen a la misma población se agrupan entre sí. No obstante, se aprecian diferencias internas dentro de los grupos poblacionales según sean controles o tratadas con oxaliplatino (nótese como las muestras tratadas para DN y en menor medida IB4+ se dispersan de más de sus controles en la segunda dimensión, PC2).

Por último, observamos qué genes *DE* de la población EYFP+ cambian en las muestras tratadas con oxaliplatino. La **figura 66D** muestra la expresión diferencial (Log_2FC) de los genes *DE* EYFP+ obtenidos en la **sección 4.2.2** al compararla con las poblaciones IB4+ (gráfico superior) y DN (inferior). En azul se indican los valores obtenidos en dicha sección (condición control) y en naranja el mismo análisis en muestras tratadas con oxaliplatino. Se observa que muchos de estos genes no llegaron a superar el corte $Log_2FC > 1$ para considerarlos como genes *DE* en la condición patológica. Se indica además qué genes presentaron un poder estadístico $FDR < 0.05$ para la condición tratada con un asterisco tras el análisis de expresión diferencial. Téngase en cuenta que en la condición control todos estos genes obtuvieron un poder significativo $FDR < 0.05$ (**figura 66D**). Este resultado sugiere que el aumento de la expresión de *Trpm8* va acompañado con un cambio en la naturaleza de las neuronas sensoriales en las poblaciones IB4+ y DN hacia genes con propiedades peptidérgicas.

Asimismo, cuando representamos la expresión diferencial de dichos marcadores respecto a sus controles, observamos que muchos se encuentran diferencialmente sobreexpresados, principalmente en la población IB4+. Tal como hemos mencionado anteriormente, se detecta una sobreexpresión de *Trpm8* en la población IB4+ y también en la DN (**figura 66E**). Esta remodelación genética podría ser clave para entender las causas moleculares de la aparición de nuevas neuronas sensibles al frío silentes en la neuropatía.

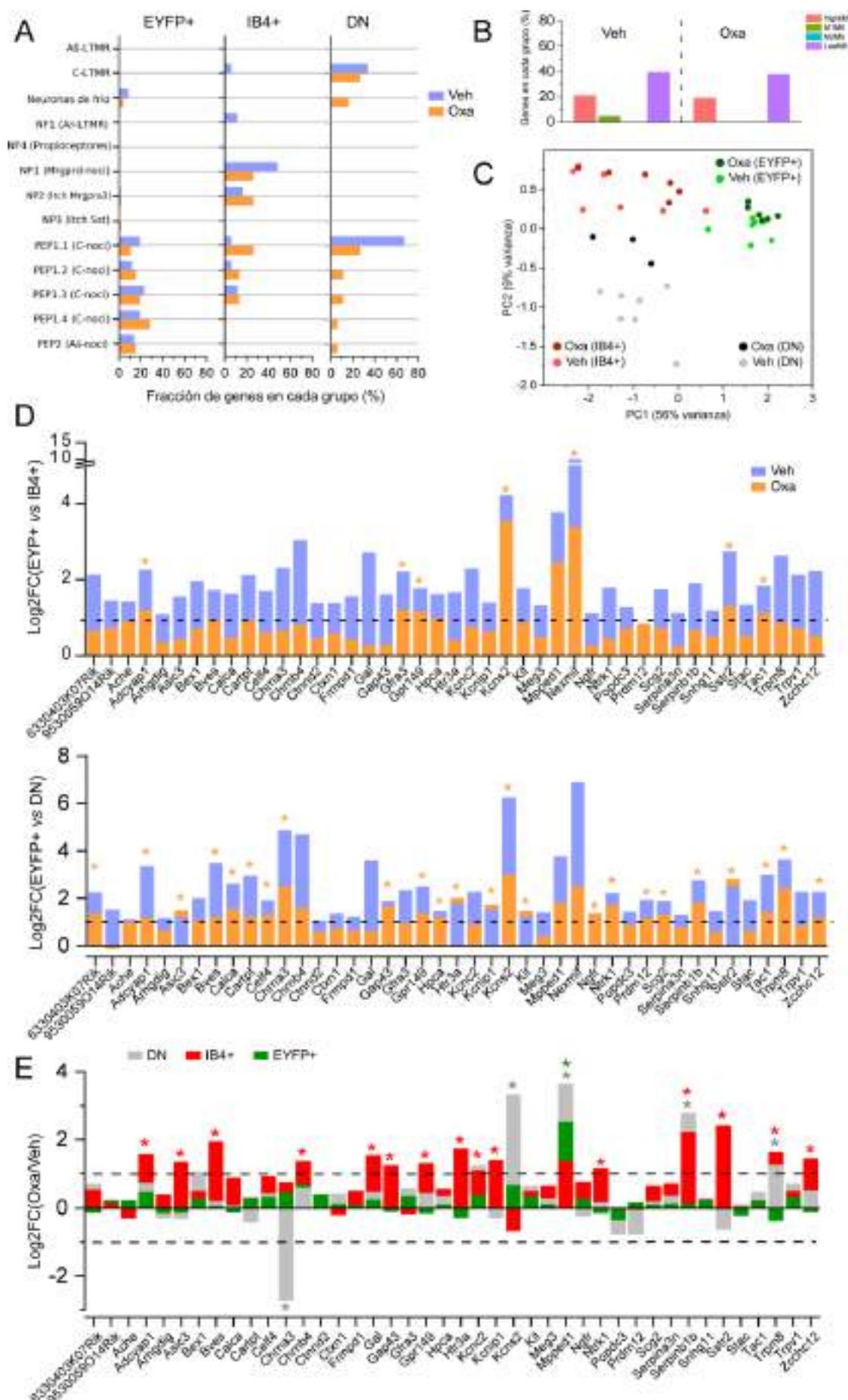


Figura 66. El oxaliplatino aumenta la expresión de marcadores peptidérgicos en neuronas IB4+ y DN. A) Porcentaje de genes *DE* para la población EYFP+, IB4+ y DN ($Log_2FC > 1$, $FDR < 0.05$ al comparar con las otras dos poblaciones restantes en condición control), que identifican a los 100 primeros marcadores específicos de cada tipo celular según su Log_2FC . El análisis se realizó en muestras control (azul) y tratadas (naranja). B) Mismo análisis realizado en la población EYFP+ (control y tratada), para los marcadores que identifican los subgrupos de TRPM8+ (referente a la **sección 4.3.1**) (para considerarse marcador, la expresión debe superar el $log_2FC > 0.25$ al comparar con los subgrupos restantes, véase de nuevo la **figura 48E**). El porcentaje está expresado sobre el total de genes *DE* de la población EYFP+ (n=43 control y n=21 tratado). C) Análisis del componente principal (PCA, unidad de expresión log_2CPM) para todas las muestras secuenciadas, EYFP+ control y oxa (verde claro y oscuro respectivamente), IB4+ control y oxa (rojo claro y oscuro) y DN control y oxa (gris y negro). D) y E) Expresión diferencial expresado en Log_2FC de los marcadores típicos obtenidos en la **sección 4.2.2-3** para la población EYFP+. En C, al comparar con la población IB4+ (panel superior) y DN (panel inferior) en condiciones control (vehículo, azul) y tratadas (oxa, naranja) y D, comparando las muestras tratadas en función de sus controles (EYFP+ verde, IB4+ rojo y DN gris). Se indica el punto de corte para el $Log_2FC > 1$ y los genes que se consideraron *DE* cuando comparamos las muestras tratadas ($Log_2FC > 1$ y $FDR < 0.05$).

5. DISCUSIÓN

5.1. Las neuronas TRPM8+ presentan una dualidad funcional y molecular

En este trabajo, nos hemos propuesto realizar la caracterización molecular y funcional de las neuronas TRPM8+ del ganglio raquídeo de ratón adulto, las cuales carecen de las propiedades típicas de nociceptores: no expresan canales Na_v resistentes a TTX, no expresan CGRP o SP y responden a temperaturas en el rango inocuo (McKemy, Neuhausser and Julius, 2002; Peier, Moqrich, *et al.*, 2002; Dhaka *et al.*, 2008; Griffith, Docter and Lumpkin, 2019). No obstante, dado que comparten expresión con algunos de los marcadores específicos de la población peptidérgica, tales como TRKA, GAL o TRPV1 (Babes, Zorzon and Reid, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2017), muchos autores las consideran nociceptores de frío, además de ser termorreceptores para el frío inocuo. Por tanto, es frecuente que se les atribuya un papel en la sensación nociva, el cual no ha sido totalmente esclarecido.

En la literatura, las neuronas TRPM8+ presentan incoherencias en algunos aspectos de su caracterización. Por ejemplo, el porcentaje de neuronas sensoriales TRPM8+ estimado a partir de técnicas inmunohistológicas o de hibridación *in situ* es variable, encontrándose entre un 5 % y un 10 % en DRG (Peier, Moqrich, *et al.*, 2002; Takashima *et al.*, 2007; Dhaka *et al.*, 2008). Asimismo, la identificación de neuronas TRPM8+ usando la técnica scRNA-Seq es mucho menor, en algunos casos siendo menos del 1 %, sobre el total de neuronas secuenciadas (Usoskin *et al.*, 2015; Zeisel *et al.*, 2018). En contraposición, los datos obtenidos mediante experimentos funcionales indican que existe un porcentaje mayor de neuronas que responden al frío, alrededor del 15-20 % del total de neuronas sensoriales, y sugiere además la existencia de otra población sensible al frío TRPM8- (Nealen *et al.*, 2003; Dhaka *et al.*, 2007; Karashima *et al.*, 2009).

No obstante, aún no se ha esclarecido qué canal es el responsable de las respuestas al frío en ausencia de TRPM8. Los principales candidatos propuestos, los canales iónicos TRPA1 o TRPC5, los cuales ejercen un papel ya demostrado en la termosensibilidad del ganglio nodoso (NG) o en los dientes, presentan discrepancias, según algunos trabajos en DRG (Jordt *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2011). Además, estudios más recientes realizados mediante experimentos de imagen de calcio *in vivo* apuntan a que es, de hecho, TRPM8 el que media la termosensibilidad en el rango nocivo hasta temperaturas de 1 °C, o tras una patología (Yarmolinsky *et al.*, 2016; Luiz *et al.*, 2019).

Resulta particularmente sorprendente que un número tan bajo de neuronas con expresión de un único canal termosensible intervengan en una actividad tan compleja como es la detección

térmica del frío ambiental, capaz de evocar sensaciones muy diferentes según el nivel de temperatura alcanzado durante el estímulo. Por ejemplo, el frío puede generar una sensación analgésica al aliviar la inflamación, o producir dolor por daños por congelación cuando el descenso de temperatura es muy grande. Además, estas neuronas sensoriales son capaces de detectar cambios de temperatura muy distintos, que abarcan desde variaciones tan precisas de 0.5 °C, hasta bajadas de temperatura bruscas de más de 10 °C. Por el contrario, en la termotransducción del calor, parece que participan múltiples canales iónicos (p.e. TRPV1, TRPV2, TRPM3 y TRPA1). Estos canales parecen tener una función parcialmente redundante, ya que es necesaria la eliminación de más de uno para detectar déficits en la sensibilidad a las altas temperaturas (Vandewauw *et al.*, 2018)

Aparte de la modulación que pueda sufrir la señal térmica en áreas del sistema nervioso central, una explicación plausible es que la heterogeneidad molecular de la población TRPM8+ defina su función para detectar diferentes temperaturas. Algunos de los posibles mecanismos moleculares presentes en estas neuronas para aumentar su rango dinámico ya han sido propuestos: por ejemplo, la expresión variable de los canales de potasio determina el umbral de activación por frío de estas neuronas y por ende, el rango de temperaturas al que se encuentran “sintonizadas” (Viana, De la Peña and Belmonte, 2002; Madrid *et al.*, 2009; Morenilla-Palao *et al.*, 2014).

Sin embargo, los estudios de *scRNA-Seq* en neuronas sensoriales no han identificado la expresión diferencial de estos canales en los subgrupos TRPM8+. En realidad, aunque los subgrupos TRPM8+ identificados en DRG y en TG en los estudios de Nguyen y Zeisel presentan diferencias moleculares, no se ha podido establecer una relación entre su perfil transcriptómico con el obtenido funcionalmente, que las clasifica en LT o HT-CS.

Teniendo en cuenta el número tan bajo de neuronas TRPM8+ que se identificaron tras la obtención del transcriptoma, resulta plausible considerar que la población TRPM8+ aún no ha sido caracterizada en su totalidad, tal como defiende las conclusiones obtenidas de este trabajo. Esto puede deberse a que la cobertura de la secuenciación era insuficiente para detectarlas, ya que tal como hemos indicado en nuestros resultados, las neuronas expresan bajos niveles para *Trpm8*. A continuación, centraremos la discusión en los marcadores obtenidos en su perfil molecular y su posible interpretación.

5.1.1. La población TRPM8+ de baja expresión pasa inadvertida en la mayoría de las líneas reporteras para TRPM8

Dado a que en muchas ocasiones el uso de anticuerpos ha mostrado una baja eficiencia para identificar al canal, la mayoría de los trabajos han optado por el uso de líneas reporteras TRPM8+, o la aplicación de agonistas específicos para la caracterización de estas neuronas. Entre los distintos modelos reporteros disponibles en la literatura, nuestro análisis morfológico, funcional y molecular de esta población neuronal se ha realizado usando la línea TRPM8^{BAC}EYFP. Esta línea ha sido extensamente caracterizada en nuestro grupo de investigación derivando, en la publicación de varios trabajos funcionales y de expresión (Morenilla-Palao *et al.*, 2014; Alcalde *et al.*, 2018; Arcas *et al.*, 2019; Ordás *et al.*, 2021), entre los que se incluye un estudio limitado del perfil genético en neuronas EYFP+ realizado por Morenilla-Palao y colaboradores.

La línea TRPM8^{BAC}EYFP presenta la particularidad de detectar un mayor número de neuronas TRPM8+ que otros modelos reporteros; en un trabajo previo llevado a cabo en nuestro grupo, se identificaron alrededor de un 20 % de neuronas fluorescentes en DRG, un porcentaje similar a los datos presentados en esta memoria (Ordás Fernández, 2019). En el trabajo mencionado también se examinaron otras líneas reporteras para TRPM8, y en todas se obtuvieron un número más bajo de neuronas TRPM8+ con un porcentaje en torno al 10 %. Otro rasgo característico de la línea TRPM8^{BAC}EYFP es que exhibe una señal fluorescente muy alta al compararla con las otras líneas, lo que permite detectar neuronas de baja expresión, siendo posible clasificarlas en las poblaciones IF-EYFP+ y WF-EYFP+, con fluorescencia variable (Alcalde *et al.*, 2018; Ordás Fernández, 2019; Gers-barlag, 2020; este trabajo). La población IF-EYFP es menos abundante, con un porcentaje estimado del 20-30 % mientras que las WF-EYFP+ suponen el 80-70 % de la población total de neuronas EYFP+ en DRG y TG, respectivamente.

Si analizamos las características morfológicas y funcionales de las dos poblaciones celulares, las neuronas WF-EYFP+ presentan un diámetro mayor, (aprox. 20 μm) y responden rara vez a los estímulos habituales del canal TRPM8. Las neuronas IF-EYFP+, en cambio, son particularmente pequeñas (aprox. 15 μm de diámetro) y presentan porcentajes muy altos de respuesta ante agonistas de TRPM8, en especial aquellas con un tamaño celular muy pequeño. En base a estas observaciones, podemos concluir que las neuronas con alta intensidad de fluorescencia pertenecen efectivamente la población TRPM8+ comúnmente descrita y muy bien caracterizada en la literatura. En contraste, hay muy pocos estudios sobre las neuronas WF-EYFP+, debido posiblemente a su baja fluorescencia en otros modelos reporteros. En la **sección 4.2.1.** de los resultados, determinamos si la variación de la fluorescencia encontrada en las neuronas EYFP+ se

debe a una expresión variable de TRPM8 o si, por el contrario, las neuronas WF-EYFP+ presentan un marcaje espurio:

Mediante experimentos de hibridación in situ (RNAscope), demostramos que la fluorescencia reportera es específica en el ratón TRPM8^{BAC}EYFP, y que presenta una correlación directa entre la expresión de los genes *Trpm8* y *Eyfp*. Este dato implica también una relación entre la fluorescencia endógena y la expresión del canal y, por consiguiente, la fluorescencia de nuestro ratón reportero puede utilizarse como una medida indirecta de la expresión de *Trpm8*. Los datos obtenidos por imagen funcional de calcio también demuestran que el uso de la aplicación conjunta de los estímulos de mentol y frío aumenta el número de respuestas ante estos agonistas que su aplicación individual, sugiriendo que las neuronas WF-EYFP+ expresan menos canales TRPM8 funcionales y es necesario aplicar un estímulo más potente para observar la entrada del calcio intracelular secundario a su apertura. Un resultado similar se obtuvo en el trabajo de Alcalde *et al.*, en 2018, en donde observaron que la aplicación conjunta de los estímulos de mentol y frío generan pequeñas despolarizaciones en neuronas de baja fluorescencia mediante registros electrofisiológicos en el ganglio trigémino. Esta activación no se observó al aplicar los estímulos individualmente.

El hecho de que sean menos sensibles a los agonistas de TRPM8 dificulta su identificación funcional cuando se usan animales silvestres. En todo caso, es posible encontrar en la literatura varios trabajos en los que se describe una segunda población sensible al frío cuyo perfil se podría corresponder con las neuronas WF-EYFP+ y con temperaturas de activación más bajas. Además, esta población presenta niveles de calcio más altos en respuesta a la capsaicina pero menores para mentol que las IF-EYFP+, sensibilidad a AITC y expresión de canales Na_v TTX resistentes (Viana, De la Peña and Belmonte, 2002; Thut, Wrigley and Gold, 2003; Babes, Zorzon and Reid, 2004; Xing *et al.*, 2006; Sarria *et al.*, 2012; Teichert *et al.*, 2012).

Pero, ¿cómo es posible que la línea reportera TRPM8^{BAC}EYFP sea la única que identifique a la población TRPM8+ de baja expresión? Una explicación plausible es que la capacidad de la línea TRPM8^{BAC}EYFP para detectar niveles bajos de expresión de TRPM8 se deba a una mayor inserción de las copias del constructo. El modelo se generó a través de la inserción de un BAC artificial, expresando la proteína EYFP bajo el promotor de TRPM8. Resulta particularmente interesante que otra línea reportera para TRPM8 también generada por la integración de un BAC presenta unas características similares a nuestro ratón transgénico. En la caracterización esta línea, TRPM8^{BAC}GFP, Takashima y colaboradores observaron que el porcentaje de respuesta para el mentol fue del 80 %, aclarándose que utilizaron una concentración dos veces más alta (200 μ M), que la usada en este trabajo. Este porcentaje podría ser considerado bajo para la reactividad tan

alta que presenta la IF-EYFP+ a los compuestos mentolados (más del 70 % de la población IF-EYFP+ de pequeño tamaño, $< 20 \mu\text{m}$, responde al mentol a $100 \mu\text{M}$), y sugiere que parte de la población GFP+ caracterizada en dicho estudio incluye a la población de baja expresión denominada WF-EYFP+. Además, las neuronas GFP+ presentaron un tamaño celular medio de $18.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$ en DRG, muy similar al obtenido en este trabajo para la línea TRPM8^{BAC}EYFP ($20.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$). No obstante, el dato más interesante para nuestro estudio es que los autores observaron una co-localización parcial con el neuropéptido CGRP (20 % para DRG, y 30% para TG). Asimismo, aunque en el trabajo original no lo mencionan, es posible apreciar una diferencia de intensidad entre las neuronas GFP+.

En otra de las líneas reporteras para TRPM8 caracterizadas por la Dra. Ordás Fernández, denominada TRPM8-Cre y generada en el laboratorio del Dr. Mark Hoon, se identificaron neuronas fluorescentes con un tamaño celular grande, de alrededor de $20 \mu\text{m}$, y consecuente con los resultados obtenidos para la de Takashima y nuestro propio trabajo. Asimismo, el modelo transgénico se creó también por recombinación aleatoria utilizando el mismo BAC, aunque en este caso se incorporó el constructo Cre bajo el promotor de TRPM8. En consecuencia, esta línea puede cruzarse con diferentes proteínas recombinantes gracias al sistema Cre/loxP y se utilizó para caracterizar funcionalmente las neuronas TRPM8+ al expresar la sonda GCaMP5 (Yarmolinsky *et al.*, 2016). Un dato muy interesante obtenido de este estudio es que una pequeña fracción de neuronas TRPM8+/CGRP+ respondían con menor frecuencia a los estímulos de frío.

Por último, de los modelos reporteros disponibles, la línea TRPM8^{GFPf} se ha utilizado en homocigosis para estudiar el efecto de la ablación del canal TRPM8. Este ratón fue el primero en desarrollarse por Dhaka y colaboradores y, acorde a sus resultados, es el menos idóneo para identificar la población TRPM8+ de baja fluorescencia (Dhaka *et al.*, 2008; Ordás Fernández, 2019). A diferencia de las líneas descritas en los párrafos anteriores, su generación se basa en estrategias de “*gene knockin*” (verse de nuevo materiales y métodos) y la población fluorescente presentan el perfil característico de las neuronas descritas como IF-EYFP+ en esta memoria. Así, el número de neuronas fluorescentes es reducido, de alrededor del 10 % sobre el total. También presentan un tamaño celular menor (diámetro medio de $15.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$) y una especificidad de respuesta mucho mayor ante los estímulos propios del canal en hemocigosis; aproximadamente el 80 % de las neuronas fluorescentes respondieron al estímulo de frío en comparación con el 40 % en nuestra línea cuando agrupamos la población de alta y baja fluorescencia (Ordás Fernández, 2020; resultados de esta Tesis). Además, presenta una señal de fluorescencia baja para GFP en comparación con otras líneas, pese a que su señal se ha potenciado mediante el cruce con otra

línea reportera (Dhaka *et al.*, 2008). Por último, debemos señalar que los estudios de expresión en los que usaron el ratón TRPM8^{GFPf}, presentaron una co-localización nula o muy baja con algunos de los genes *DE* obtenidos tras nuestro estudio transcriptómico y que están potencialmente expresadas en neuronas WF-EYFP+, tales como SP, CGRP o TRPV1 (Dhaka *et al.*, 2008).

En conclusión, estos datos sugieren de forma convincente que los animales transgénicos generados por recombinación por BAC son preferibles para el estudio de la población TRPM8+, ya que permite detectar más neuronas de baja expresión y siendo máxima en el caso del ratón TRPM8^{BAC}EYFP. Las regiones genómicas de los BACs presentan una longitud más extensa que los transgenes utilizados en estrategias de “*gene targeting*”, por lo pueden incluir elementos regulatorios que ayuden a una expresión génica más fiable (Heintz, 2001).

5.1.2. Comparación del perfil molecular obtenido de la línea TRPM8^{BAC}EYFP mediante diferentes técnicas de expresión

En la **sección 4.2.** de los resultados, obtuvimos el perfil molecular de la población TRPM8+ identificada por fluorescencia a través del marcaje del ratón TRPM8^{BAC}EYFP, y se procedió a su análisis de expresión diferencial al compararlo con las poblaciones neuronales no solapantes IB4+ (EYFP-/IB4+) y DN (EYFP-/IB4-). De acuerdo con la literatura, las neuronas IB4+ constituyen mayoritariamente las neuronas MRGPRD+, un subgrupo de nociceptores no peptidérgicos Nav1.8+ y TRPA1+ (Zylka, Rice and Anderson, 2005; Barabas, Kossyrev and Stucky, 2012). La población no específica DN, en cambio, estaría supuestamente enriquecida por nociceptores Nav1.8+/IB4-, neuronas mielínicas NF+ y otras células satélites de origen no neuronal presentes también en DRG. Sin embargo, al aislar las neuronas de una manera tan agresiva, esperaríamos un enriquecimiento en células de menor tamaño, más resistentes al efecto de fricción que puede producirse por la separación en el citómetro y constituidos principalmente por nociceptores Nav1.8+ y otras células satélites de origen no neuronal.

No obstante, el análisis reveló que la población EYFP+ era la que presentaba el patrón genético propio de nociceptores Nav1.8+/IB4-, con expresión diferencial de *Calca* (CGRP), *Trpv1*, *Gfra3*, *Adcyap1* (PACAP), *Gal*, *Tac1*, *Ntrk1* (TRKA) entre otros genes (véase de nuevo las **figuras 46A-B** de la **sección 4.2.4**). Para el propio gen *Scn10a*, que codifica el canal Nav1.8, se obtuvieron niveles más elevados que para la población DN ($\text{Log}_2\text{FC} = 0.9$ y $\text{FDR} = 0.02$), pero sin diferencias significativas respecto a la población IB4+. En este último caso, el resultado es coherente con estudios previos ya que el canal de sodio se expresa también en neuronas IB4+ (Fang *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2014).

Asimismo, debemos mencionar que tanto la población DN como la IB4+, expresaron marcadores propios de células con origen no neuronal. Este resultado se debe tener en consideración ya que puede enmascarar los niveles de expresión obtenidos al comparar la población IB4+ y la DN con la EYFP+, que representa una población neuronal más pura (verse de nuevo los resultados de la **sección 4.2.3, figura 45**). En consecuencia, la unidad de expresión expresada en “*fold change*” puede estar sobrerrepresentada para algunos de los genes enriquecidos en la población EYFP+, y explicaría los niveles tan altos en el caso de los genes *Calca*, *Ntrk1*, *Trpv1* o *Trpa1*, los cuales se expresan también en otros nociceptores IB4+ y/o DN. La presencia de genes de origen no neuronal en estas poblaciones es también importante para interpretar los resultados obtenidos tras el análisis del transcriptoma en la NPIO. Recuérdese que en la **sección 4.4.4**, observamos que la población DN y seguida de la población IB4+ eran las que presentaban más alteraciones (mayor número de genes *DE*) tras la neuropatía, posiblemente porque constituyen poblaciones celulares más heterogéneas.

Posteriormente, para verificar si la población EYFP+ estaba constituida por un subgrupo de neuronas Nav1.8+ o la representaba en su totalidad, comparamos el perfil genético obtenido en la **sección 4.2.2-3**, con los datos obtenidos de la población Nav1.8+/ IB4- procedente del trabajo de Chiu y colaboradores en 2014, y de la población TRPV1+, obtenidos de Goswami *et al.*, 2014, realizados también mediante la técnica de *FACS-Seq*. Los resultados muestran una buena correlación al comparar con la población TRPV1+ (**figura 46C**).

Dado que alrededor del 90 % de las neuronas TRPV1+ peptidérgicas expresan Nav1.8 (Patil, Hovhannisyan and Akopian, 2018), los resultados son además coherentes al comparar con datos obtenidos de neuronas secuenciadas a nivel individual en DRG (referente a la **sección 4.2.4, figura 47B**). En este análisis, los marcadores específicos identificados de las neuronas EYFP+ (*Sstr2*, *Trpv1*, *Gfra3*, *Gal*, *Adcyap1*, *Tac1*, *Calca* entre otros) coincidieron con aquellos que también definen las subpoblaciones PEP1.1, PEP1.2, PEP1.3, PEP1.4 y PEP2, y que designan a las poblaciones peptidérgicas identificadas por secuenciación de célula única (Usoskin *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Zeisel *et al.*, 2018). Aun así, podemos observar que un pequeño porcentaje de los genes *DE* identificados para la población EYFP+ son marcadores específicos de los subgrupos típicos para TRPM8+, acorde con otros trabajos de *scRNA-Seq*, y representados conjuntamente como neuronas de frío en la **figura 47C** de los resultados de esta memoria. En dichos genes se incluyen *Pnoc*, *Prdm12*, o *Isl1* (Nguyen *et al.*, 2017; Zeisel *et al.*, 2018), que presentaron niveles de expresión más altos al compararlos con las poblaciones IB4+ o DN.

Asimismo, el estudio previo de expresión de las neuronas TRPM8+ realizado también por nuestro grupo de investigación mediante la caracterización de la línea TRPM8^{BAC}EYFP, en este caso a través de la tecnología de microarray, permite la comparación directa de la población EYFP+ con nuestros datos (Morenilla-Palao *et al.*, 2014). Al comparar los marcadores identificados en ambos trabajos se puede apreciar que existe una mayor representación de la población TRPM8+ clásica en el estudio de Morenilla-Palao *et al.* (**figura 67A**). No obstante, es importante añadir que, aunque se utiliza la misma línea reportera para ambos trabajos, existen diferencias que deben tenerse en consideración y que puedan explicar los resultados encontrados:

1) Los animales utilizados en el anterior estudio eran neonatos con una edad aproximada entre P9 y P12 mientras que en nuestro caso utilizamos animales adultos. La edad puede ser un factor determinante en el perfil molecular de las neuronas TRPM8+; en el estudio de Takashima y colaboradores encontraron que las neuronas TRPM8+ de los animales neonatos presentan porcentajes de co-expresión menores para TRKA, periferyna, TRPV1 y CGRP, estabilizándose su expresión adulta a partir de P14 (Takashima, Ma and McKemy, 2010).

2) Ambos trabajos presentan estrategias de separación por fluorescencia diferentes que puede limitar una lectura homogénea al comparar ambos datos; en el caso del array, se estudió en neuronas TRPM8+ y TRPM8-, separadas sólo por el marcaje de fluorescencia de la proteína EYFP. En cambio, en este trabajo, las neuronas TRPM8- se segregaron en neuronas IB4+ y DN, por lo que los niveles de expresión al realizar el análisis diferencial no son representativos.

3) La técnica utilizada en el array permite el estudio de un número limitado de genes (se seleccionaron sólo 94 genes), por lo que parte del trasfondo genético permanece oculto. Ambas técnicas, además, presentan procesos de amplificación clonal diferentes, con diferentes unidades de magnitud. Aun así, a grandes rasgos, se ha podido establecer una correlación positiva entre los niveles de expresión de los genes comunes detectados en ambos trabajos (véase **figura 67B**).

De los marcadores identificados en ese estudio, el gen *Knck9*, que codifica el canal de potasio TASK3, también se demostró que el canal juega un papel importante en la excitabilidad de las neuronas termosensibles (Morenilla-Palao *et al.*, 2014). En línea con estos resultados, nuestros datos de *FACS-Seq* muestran también niveles más altos de *Kcnk9* en las neuronas EYFP+ ($Log_2FC = 9.61$ y 4.91 para la población DN e IB4+, respectivamente), aunque si analizamos su expresión absoluta, los valores de TPM fueron mínimos (el valor medio en TPM fue sólo de 2.96 en la población EYFP+ y prácticamente cercano a cero en las poblaciones DN e IB4+), lo que indica detección muy pobre del gen. No obstante, creemos que la baja expresión de TASK3 es principalmente debido a limitaciones de la técnica, ya que su detección sólo fue posible cuando ali-

Zeisel et al., pero fue imposible ya que sólo detectaron 17 células (~1 % del total). Así pues, decidimos recopilar los datos de neuronas procedentes de varios trabajos y aumentar el tamaño muestral. En trigémino, sin embargo, las neuronas secuenciadas por Nguyen y su equipo fueron suficientes para detectar las neuronas TRPM8+ de baja expresión.

Usando las bases de datos procedentes de ambos tejidos, se identificaron hasta cuatro subgrupos de neuronas TRPM8+ con expresión variable para este gen, siendo aquellas con mínima expresión (denominada como subgrupo LowM8 en este trabajo) las que expresan los marcadores peptidérgicos, incluyendo CGRP, *Gfra3*, *Adcyap1*, y los canales de sodio TTX resistentes Na_v1.8 (*Scn10a*) y Na_v1.9 (*Scn11a*). Dado que nuestro principal objetivo era poder identificar las neuronas TRPM8+ nociceptivas que podrían estar incluidas dentro de la población peptidérgica, el análisis de “clustering” sólo se realizó en neuronas con expresión para *Trpm8*. Así, nos aseguramos de que en la selección de subgrupos no intervengan variables procedentes de neuronas TRPM8- (**figura 48, sección 4.3.1**).

Además, los genes marcadores de las neuronas LowM8 correspondían con los genes *DE* obtenidos para la población EYFP+ en la sección **4.2.2-3**. Estos datos apuntan a que las neuronas EYFP+ purificadas tras el FACS están enriquecidas en la población de baja expresión para TRPM8 o WF-EYFP+; posiblemente debido a que representan a un porcentaje mayor dentro de la población fluorescente (recuérdese que el 80 % de la población total de EYFP+ son neuronas de baja expresión WF-EYFP+). Las neuronas TRPM8+ de alta expresión, al ser una minoría, da lugar a que su perfil genético sea menos perceptible en los datos obtenidos tras el FACS. Posteriormente, los experimentos de RNAscope en cortes de DRG y TG del ratón TRPM8^{BAC}EYFP, permitió verificar que efectivamente que las neuronas WF-EYFP+ con baja expresión de TRPM8 expresan los marcadores nociceptivos Na_v1.8 y CGRP (referente a la **figura 55** de la **sección 4.3.3**). Nuestro grupo de investigación también ha demostrado la expresión de CGRP en neuronas WF-EYFP+ a través de técnicas de inmunohistoquímica en DRG y TG usando la línea TRPM8^{BAC}EYFP (Alcalde *et al.*, 2018; Ordás Fernández, 2019). Análogamente, los resultados relativos a la expresión con Na_v1.8 se verificaron también en TG y en DRG mediante IHQ (datos no publicados), y en neuronas del nervio vago (Gers-Barlag, 2020).

La presencia de neuronas TRPM8+ nociceptivas parece ser más evidente en otras especies, como en primates no humanos (Kupari *et al.*, 2021) o en humanos (Nguyen *et al.*, 2021; Tavares-Ferreira *et al.*, 2021). En el estudio llevado a cabo en la especie de macaco Rhesus, los autores describen una población TRPM8+ con alta expresión con propiedades moleculares similares a los tres grupos identificados en ratón por Zeisel (Kupari *et al.*, 2021). Lo que es más interesante es que también describen otro grupo peptidérgico, denominado en el trabajo como PEP3, con

expresión de $Na_v1.8$, *Kit*, CGRP o *Piezo2*, marcadores específicos de nuestro grupo LowM8 en ratón. Además, las neuronas PEP3 tienen una expresión más baja para TRPM8+. Este grupo, PEP3, es molecularmente similar a los nociceptores tipo A δ , denominado PEP2 según la clasificación de Ernfors y Linnarsson. En nuestro caso, no podemos corroborar si las neuronas WF-EYFP+ identificadas en este trabajo constituyen el grupo A δ peptidérgico en ratón; los genes *DE* en los datos de FACS para la población EYFP+ son coincidentes con marcadores específicos de más de una de las poblaciones peptidérgicas. Además, la población EYFP+ es heterogénea, lo que dificulta los resultados obtenidos tras la secuenciación en bloque. Sería necesario replicar los experimentos de secuenciación a nivel individual y así poder situar con mayor precisión las neuronas WF-EYFP+ entre los grupos moleculares PEP descritos en la literatura.

En humanos, existen dos estudios independientes mencionados previamente, que han logrado identificar neuronas TRPM8+ que expresan CGRP y $Na_v1.8$, usando estrategias de secuenciación distintas (Nguyen *et al.*, 2021; Tavares-Ferreira *et al.*, 2021). En ambos casos la expresión de PIEZO2 también era visible en estas neuronas. Similarmente, en el estudio de Nickolls *et al.*, publicado en 2020, los autores fueron capaces de realizar la diferenciación de termorreceptores a partir de células pluripotentes humanas, observando una co-expresión de PIEZO2 y TRPM8, aunque no de $Na_v1.8$. En ese estudio, las neuronas TRPM8+/PIEZO2+ presentaban además canales totalmente funcionales y se pudo demostrar su sensibilidad mecánica y al frío en registros *in vitro*. En línea con estos resultados, nuestros experimentos de RNAscope indican una co-expresión baja para PIEZO2 y TRPM8, coherente con lo publicado en la literatura en referencia al modelo de ratón. Sí bien es cierto que las pocas neuronas doblemente positivas para ambos genes presentan, principalmente, niveles bajos de TRPM8. Dentro de la población peptidérgica, PIEZO2 se expresa de forma uniforme en las subpoblaciones PEP por lo que la presencia del canal en neuronas de baja expresión TRPM8+ peptidérgicas podría ser plausible.

No obstante, en el supuesto caso de que las neuronas WF-EYFP+ expresen PIEZO2, no se ha podido demostrar la mecano-sensibilidad en el soma de los termorreceptores de frío (Fernández-Trillo *et al.*, 2020; von Buchholtz *et al.*, 2021). Una posible explicación es que las neuronas LowM8 sean nociceptores mecanosensibles silentes (CMiHi). Este grupo está formado por neuronas sensibles a estímulos mecánicos sólo en situaciones de lesión o inflamación (Schmidt *et al.*, 1995), y delimita principalmente a la subpoblación molecular PEP1.3 según la clasificación de Zeisel *et al.* Apoyando esta hipótesis, hemos observado que los niveles de *Chrna3*, la subunidad alfa-3 del receptor de acetilcolina y que define molecularmente al grupo PEP1.3 (Prato *et al.*, 2017; Zeisel *et al.*, 2018), está sobreexpresada diferencialmente en las neuronas EYFP+ (véase de nuevo la **figura 44E**). Además, las neuronas PEP1.3 expresan CGRP y

PIEZO2, aunque en este último caso no responden mecánicamente en condiciones basales, sino que es necesaria la incorporación al cultivo de NGF para generar las corrientes a estímulos mecánicos (Prato *et al.*, 2017). En el futuro, sería oportuno explorar si la adición de mediadores inflamatorios, como NGF sensibiliza las neuronas WF-EYFP+ ante estímulos mecánicos. Contrariamente, también hemos observado marcadores peptidérgicos que definen otros grupos de subpoblaciones peptidérgicas como *Adcyap1*, o *Htr3a*, siendo este último marcador para el grupo PEP2 (nociceptores tipo A δ). En consecuencia, nuestros datos son insuficientes para identificar con claridad el grupo peptidérgico al que pertenece las neuronas WF-EYFP+ o si en cambio, las neuronas WF-EYFP+ identifican a más de una población peptidérgica.

Por último, es interesante mencionar que, en ambos ganglios, obtuvimos prácticamente el mismo perfil genético para las neuronas TRPM8+ de baja expresión. La presencia de estas neuronas en diversas localizaciones anatómicas sugiere una función específica. En línea con estos resultados, existen muy pocos estudios que describan una co-expresión de TRPM8+/CGRP+ en aferentes primarios, pero predominan principalmente en la inervación visceral, especialmente en la mucosa intestinal, en la pulpa dental, vejiga, o los vasos sanguíneos (Harrington *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2013; De Jong *et al.*, 2015; Michot, Lee and Gibbs, 2018; Reimúndez *et al.*, 2018). Un dato interesante es que, en la mayoría de los tejidos nombrados, la detección temperatura ambiental pasa a un papel secundario ya que las fibras no están en contacto directo con el ambiente, como es el caso de la piel. En el caso de los dientes, en donde la detección al frío es muy relevante, TRPM8 no parece contribuir a la termosensibilidad (Michot, Lee and Gibbs, 2018; Bernal *et al.*, 2021). La inervación de las vísceras predomina principalmente en los ganglios lumbares y sacros para los DRGs, y aunque los experimentos de RNAscope que realizamos en la **sección 4.3.2** dividimos en función del nivel anatómico en cervical, torácico o lumbar, no encontramos diferencias en la expresión de *Trpm8*. No obstante, no descartamos la posibilidad de diferencias en su expresión y sería necesario realizar estudios más exhaustivos a nivel individual del ganglio, analizando la co-expresión con marcadores específicos de las neuronas WF-EYFP+ como CGRP.

En función de los estudios en los que se tiene constancia de la co-expresión de TRPM8+/CGRP+ teorizamos que las neuronas WF-EYFP+ pueden tener una función en la regulación de la temperatura corporal y/o la inflamación neurogénica. A continuación, discutiremos con más detalle su posible función.

a) Relación entre CGRP y TRPM8: Posible función vasomotora de las neuronas TRPM8+ de baja expresión

El neuropéptido CGRP es el más potente y duradero vasodilatador endógeno conocido (revisado por Heather and Chain, 2016). En cambio, la vasoconstricción está relacionada con un decaimiento de los niveles de CGRP. La temperatura también puede generar dicho efecto; el enfriamiento local de los tejidos genera vasoconstricción mientras que el recalentamiento de éstos genera el efecto contrario (Takenaga and Kawasaki, 1999). Se ha observado igualmente que la aplicación tópica de mentol estimula la producción de CGRP, tal como demostraron en el trabajo de Kichko *et al.*, en 2018, al estudiar la mucosa bucal de roedores. Los autores observaron que la sobreproducción de CGRP se intensifica al exponer el tejido a temperaturas de 14 °C. Otros estudios también han descrito que la activación por agonistas de TRPM8 produce un efecto predominantemente vasodilatador, además de que su expresión se ha demostrado en los vasos sanguíneos (Yang *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2009; Cheang *et al.*, 2013; X. R. Liu *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014; Melanaphy *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2017).

El papel vasodilatador de TRPM8 parece depender del tono muscular en la que se encuentra la musculatura. Por ejemplo, en el estudio de Johnson *et al.*, 2009, observaron que la activación de TRPM8 por mentol generaba la contracción de las arterias en ratas cuando el vaso se encontraba relajado (sin contracción). No obstante, la aplicación de mentol o icilina producía una fuerte relajación tras la vasoconstricción generada por la aplicación de KCl (Johnson *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). Posteriormente, en los trabajos de Huang *et al.*, 2017 y Xiong *et al.*, 2017, demuestran que la activación crónica de TRPM8 por mentol antagoniza el efecto de la angiotensina II, un potente vasoconstrictor, relajando el tono muscular del músculo liso. Los efectos no se observaron en animales TRPM8^{KO}. Asimismo, se ha descrito que la activación de termorreceptores de frío en la esclera produce un descenso en el flujo sanguíneo, es decir una vasoconstricción, acompañándose de una bajada de la temperatura local en la córnea (Gallar, Acosta and Belmonte, 2003).

Pero, ¿qué relevancia biológica tiene la función vasomotora de TRPM8? Es bien conocido que el tono muscular es fundamental para mantener la temperatura corporal en los organismos homeotermos; un descenso del flujo sanguíneo evita pérdida del calor a nivel local por exposiciones prolongadas al frío pero también produce la falta de riego sanguíneo (revisado por Señarís *et al.*, 2018). En su trabajo, Johnson *et al.*, hipotetizan que la liberación de CGRP inducida por TRPM8 actúa como un mecanismo de respuesta para aumentar la irrigación de los tejidos y recuperarse rápidamente tras los procesos de vasoconstricción generada por la exposición al frío.

En ratones, la cola es el principal órgano termorregulador ya que permite la disipación rápida del calor por su gran superficie. Estudios previos de nuestro grupo demostraron la presencia de fibras sensoriales TRPM8+ en este órgano y algunas de ellas eran también CGRP+, lo que refuerza la hipótesis de que las neuronas WF-EYFP+ juegan un papel importante en el sistema sensorial perivasculoso. Es más, se conoce que tanto la ablación de neuronas CGRP+ como las TRPM8+ produce en ambos casos déficits en la termorregulación (McCoy *et al.*, 2013; Reimúndez *et al.*, 2018).

En el estudio realizado por McCoy y colaboradores usaron animales CGRP^{DTR}, carentes de las neuronas CGRP+ tras el tratamiento con la toxina diftérica, y observaron que tardaban más en recuperar su temperatura corporal tras sumergirlos en agua tibia que los controles. Por tanto, los animales presentaban dificultades para mantener la homeotermia en respuesta a un estímulo térmico. A largo plazo, también sufren una pérdida de peso, fenotipo que se atribuyó a una exacerbada sensibilidad al frío ambiental (McCoy *et al.*, 2013; McCoy and Zylka, 2014); la denervación de las neuronas CGRP+ desencadena que estos animales sientan más frío al encontrarse en un estado de vasoconstricción constante y no pueden mantener la temperatura corporal. Esto a su vez origina una movilización de las grasas con el fin de aumentar la tasa metabólica y generar la termogénesis necesaria. Los resultados del estudio fueron posteriormente validados por Makwana y colaboradores, demostrando que los animales CGRP^{DTR} son más resistentes a la obesidad cuando se les suministra una dieta hipercalórica. También consumen mayores volúmenes de oxígeno (VO₂), indicativo de un gasto energético superior. Se observó también que la temperatura local en la cola de estos animales era más baja cuando se los exponen a un ambiente frío a 22-21 °C, indicando que estos animales también presentan una vasoconstricción más intensa a medida que descienden las temperaturas, por lo que la regulación de la temperatura depende únicamente de la movilización de grasas para iniciar la termogénesis (Makwana *et al.*, 2021).

Resulta interesante que cuando se elimina el canal TRPM8 el efecto es ligeramente distinto, pero altera también el correcto funcionamiento del metabolismo energético y del tono vascular. En el estudio de Reimúndez *et al.*, 2018, demostraron que los animales deficientes para TRPM8, al igual que los ratones TRPM8^{DTR}, presentaban hipotermia. Si bien, ésta se agudizaba a temperaturas más bajas o en condiciones de ayuno. Por otro lado, a diferencia de los animales CGRP^{DTR} en los que no se observó un aumento en la ingesta de alimentos al comparar con el grupo silvestre, los animales TRPM8^{KO} presentaron hiperfagia y obesidad a largo plazo, alcanzando valores máximos al estabularlos a 21 °C. En cambio, los animales silvestres presentaron una pérdida de peso. También observaron diferencias en la temperatura corporal de la cola entre animales

silvestres y deficientes, siendo más altas en estos últimos. El estudio plantea que, al eliminar el canal TRPM8, se desregula el mecanismo vasomotor ya que estos animales son incapaces de detectar cambios térmicos y no pueden iniciar una respuesta vasoconstrictora inducida por el frío. Al perder más calor que en los silvestres, el mantenimiento de la temperatura corporal depende únicamente de la ingesta de alimentos (Reimúndez *et al.*, 2018; Señarís *et al.*, 2018). La presencia de TRPM8 en las neuronas CGRP+ explicaría cómo el canal regula la liberación del neuropéptido en base a la temperatura. También explicaría el efecto observado en animales CGRP^{DTR} ya que al eliminar las neuronas CGRP+/ TRPM8+ no pueden reactivar el flujo sanguíneo y se encuentran en un proceso de vasoconstricción permanente. Sin embargo, seguirían sintiendo frío dado que las neuronas TRPM8^{high} siguen activas (el grupo de alta expresión para TRPM8 no co-localiza con CGRP). Al igual que en los ratones TRPM8^{KO}, su única posibilidad de restaurar la temperatura es aumentando las tasas metabólicas. Es posible que el consumo energético sea mayor tras la ablación de neuronas CGRP+ que sólo con la eliminación de TRPM8 ya que la ablación es más drástica (recuérdese de que no todas las neuronas CGRP+ expresan TRPM8+), y les imposibilita una ganancia de peso.

Asimismo, los animales CGRP^{DTR} presentan una mayor hipersensibilidad al frío con un aumento de las respuestas aversivas en los estudios de la placa fría o la acetona, relacionando de nuevo el péptido con la temperatura (McCoy *et al.*, 2013; Cowie *et al.*, 2018). Los autores atribuyen que la hipersensibilidad al frío tras eliminar las neuronas CGRP+, se debe a un efecto inhibitorio a nivel medular que ejercen sobre la población TRPM8+, más que la presencia de CGRP en neuronas TRPM8+ a nivel periférico. No obstante, un estudio reciente ha demostrado que la ablación de neuronas CGRP+ de la asta dorsal no produce cambios en las respuestas al frío evaporativo en la prueba de acetona (Löken *et al.*, 2021). Asimismo, las neuronas CGRP+ procedentes del ganglio son capaces de responder a estímulos de mentol o icilina (McCoy, Taylor-Blake and Zylka, 2012). Dadas las evidencias, es más plausible considerar la co-expresión de TRPM8 y CGRP a nivel de neuronas sensoriales primarias. La hipersensibilidad observada en ratones CGRP^{DTR} puede deberse a una ganancia en la función de las neuronas TRPM8^{high} por mecanismos compensatorios.

b) TRPM8 y su relación con el dolor inflamatorio

Junto con su rol vasomotor, las neuronas peptidérgicas CGRP+ tienen un papel muy importante en la iniciación del proceso inflamatorio a través de la liberación de diversos neuropéptidos, como la SP y CGRP (inflamación neurogénica). Ambos producen vasodilatación, extravasación capilar, activación de macrófagos y neutrófilos que promueven la producción y liberación de

otros mediadores inflamatorios. Por su parte, la presencia de factores liberados en el proceso conlleva a la sensibilización de nociceptores, por lo que estos neuropéptidos magnifican la señal dolorosa y promueven un estado de hiperalgesia.

Aunque se conoce bien las propiedades analgésicas de TRPM8, el canal ha sido relacionado con frecuencia con procesos pronociceptivos (Colburn *et al.*, 2007; Caspani *et al.*, 2009; Knowlton and McKemy, 2010; Knowlton *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011). En estos casos, el efecto va acompañado por una hipersensibilidad al frío y el bloqueo selectivo o la eliminación del canal atenúa estas respuestas. El canal TRPM8 también se le ha relacionado con el dolor generado por la inflamación visceral del colón y vejiga (Mukerji *et al.*, 2006; Harrington *et al.*, 2011; Ramachandran *et al.*, 2013; Hosoya *et al.*, 2014; De Jong *et al.*, 2015; Mueller-Tribbensee *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2020). Es particularmente interesante que en estos dos tejidos se ha advertido, además, una co-expresión inusual de fibras TRPM8+ y CGRP+, y ambos trastornos no van acompañados de una ganancia en la sensibilidad térmica, lo que sugiere una función desconocida del canal. Generalmente, el bloqueo alivia el dolor generado por la inflamación, como por ejemplo en el modelo de cistitis en ratas (Lashinger *et al.*, 2008), y su activación por agonistas induce respuestas nociceptivas (Hosoya *et al.*, 2014). En la mayoría de los casos se observa además un aumento de la expresión del canal TRPM8 (Ramachandran *et al.*, 2013; Hosoya *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020).

Un dato interesante que también relaciona las neuronas TRPM8+ con el dolor visceral es que las neuronas TRPM8+/CGRP+ que inervan al colon expresan el receptor de la serotonina 5-HT₃ (codificado con el gen *Htr3a*), según el estudio de transcriptoma a nivel de célula única del trabajo de Hockley *et al.*, 2018. *Htr3a* también es un marcador identificado en nuestra población EYFP+ que se expresa predominantemente en neuronas de baja expresión. Similar a lo descrito para TRPM8, el bloqueo selectivo del 5-HT₃ tiene un efecto antiinflamatorio en el tracto digestivo en modelos de colitis en ratas y otros roedores (Kato, 2013).

Asimismo, el papel de TRPM8 en la inflamación parece ser mucho más complejo dado que algunos autores afirman en cambio que TRPM8 presenta propiedades anti-nociceptivas en modelos de dolor visceral. Estos estudios se han centrado especialmente en el tracto digestivo (Adam *et al.*, 2006; Cappello *et al.*, 2007; Ramachandran *et al.*, 2013; Khalil *et al.*, 2016). En el estudio desarrollado por Harrington *et al.*, la aplicación de mentol genera una desensibilización ante irritantes exógenos, a los compuestos AITC y capsaicina, y a la estimulación mecánica. El proceso parece ser dependiente de TRPM8 ya que el efecto analgésico no se observó con animales TRPA1^{KO}, y los autores sugieren que TRPM8 reduce la inflamación mediada por TRPA1 y TRPV1

(Harrington *et al.*, 2011). Hay que destacar que tanto la activación de TRPV1 como TRPA1 pueden iniciar el proceso de inflamación neurogénica con la liberación de neuropéptidos, entre ellos CGRP (Meng *et al.*, 2009; Gebhardt *et al.*, 2020). Estos resultados son coherentes con el hecho de que la aplicación de icilina reducía los niveles de CGRP *in vitro* en presencia de capsaicina (Ramachandran *et al.*, 2013), o tras estimular el colón mecánicamente por distensión (90 mm Hg) (Khalil *et al.*, 2016), por lo que se propuso que TRPM8 inhibe la inflamación neurogénica mediada por la activación de TRPV1 y/o TRPA1.

Una explicación plausible a la controvertida implicación de TRPM8 en el dolor visceral fue teorizada por Dussor and Cao, en 2016: se ha propuesto que el comportamiento pro- o anti-nociceptivo de TRPM8 depende de si la activación de TRPM8 se realiza en presencia de otros mediadores pro-inflamatorios. Cuando se activa individualmente, generaría una sensación de dolor. En cambio, si ya se ha iniciado el proceso de inflamación, TRPM8 reduciría la transmisión dolorosa (Dussor and Cao, 2016). Debido a que la mayoría de las fibras entéricas observadas eran TRPM8+/CGRP+, se puede teorizar que las neuronas WF- TRPM8+ son reguladores clave en el papel de TRPM8 para iniciar el proceso de dolor inflamatorio o, por el contrario, resolverlo. Asimismo, la ausencia del canal agrava la patología, ya que los animales TRPM8^{KO} son extremadamente sensibles a las ulceraciones y heridas producidas por los modelos de colitis y daño intestinal (Ramachandran *et al.*, 2013; De Jong *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2016).

Por último, debemos mencionar la implicación que tienen CGRP y TRPM8 en la fisiopatología de la migraña, que consiste en un desorden vascular ocasionado por una inflamación de origen no infeccioso en el trigémino. Por un lado, es ampliamente conocida la importancia del péptido ya que el bloqueo de su receptor por antagonistas selectivos alivia los episodios de cefaleas de la neuralgia (Edvinsson, 2019). El canal TRPM8 también se le ha relacionado con el trastorno; el 50 % de los pacientes que sufren migraña presentan alodinia al frío (Burstein, Cutrer and Yarnitsky, 2000). Además, los pacientes que expresan el polimorfismo rs10166942 del gen *Trpm8* tienen un riesgo mayor a desarrollar la patología (Chasman *et al.*, 2011).

Sin embargo, la activación del canal en las meninges puede provocar inflamación o analgesia en un escenario similar al escenario observado en el tracto digestivo: la aplicación de agonistas de TRPM8 en la duramadre produce alodinia mecánica en el área facial, además de que las temperaturas frías son un desencadenante para sufrir un episodio (Prince *et al.*, 2004). En cambio, Ren *et al.*, demostraron que cuando se aplica mentol en presencia de mediadores inflamatorios se reducen los comportamientos nocifensivos derivados de la irritación de la duramadre en ratones (Ren, Dhaka and Cao, 2015). Aunque la co-expresión de TRPM8 y CGRP no ha sido demostrada en las meninges, es probable que las neuronas WF-EYFP+ puedan tener un papel en la patología

dado su relación con CGRP. Cabe señalar que, en el trabajo previamente mencionado, utilizaron la línea reportera TRPM8^{GFP} que marca principalmente aquellas neuronas de alta expresión para TRPM8, pero no las de baja expresión.

En resumen, los datos aquí expuestos y contrastados con otros trabajos nos llevan a considerar que las neuronas WF- TRPM8+ tengan un papel en la nocicepción, actuando como guardianes que regulan la señal dolorosa en neuronas nociceptivas. Esta hipótesis va en línea con un trabajo reciente donde la sobreexpresión de TRPV1 en neuronas TRPM8+ desencadena un aumento de la sensibilidad al frío nocivo en la córnea (Li *et al.*, 2019). Al inducir la patología del ojo seco observaron, además, que aumenta el número de neuronas TRPV1+/TRPM8+ y que posiblemente pertenezcan a la población WF-EYFP+. Ese trabajo también demostró que la estimulación por frío de las neuronas sensoriales TRPM8+/TRPV1+ cultivadas *in vitro* genera la liberación de la SP (no estudiaron el efecto para CGRP), y que el efecto es dependiente de la activación de TRPV1 en estas neuronas. Por tanto, existe una evidencia directa que vincula las neuronas TRPM8+ nociceptivas con la transmisión de la señal dolorosa.

5.1.4. Las neuronas TRPM8+ con expresión intermedia: posibles mecanorreceptores tipo A δ .

Las neuronas IF-EYFP+ presentan las temperaturas de activación por frío más altas, constituyendo prácticamente una población LT-CS pura (el 87 % de las neuronas sensibles a frío eran LT-CS en la población IF-EYFP+). Estos resultados sugieren que la población participa principalmente en la detección de pequeños cambios de temperatura, por lo que su contribución en la detección del frío nocivo parece poco probable. Sus propiedades fisiológicas podrían además explicar por qué no se ha observado co-expresión de TRPM8 y CGRP en las capas más superficiales de la piel siendo las neuronas IF-EYFP+ las que se encargan de detectar variaciones de temperatura en contacto directo con el ambiente. Con todo, no podemos descartar que las fibras TRPM8+/CGRP+ se expresen también en la piel, ya que en ningún estudio se ha utilizado la línea TRPM8^{BAC}EYFP, que detecta un número mayor de neuronas TRPM8+ de baja expresión.

Asimismo, varios autores mencionan una estrecha interconexión pero no co-expresión de las fibras epidérmicas TRPM8+ y CGRP+, aunque se desconoce la relevancia biológica (Takashima *et al.*, 2007; Dhaka *et al.*, 2008). En la piel, las neuronas TRPM8+ no presentan la típica topología que las clasifica en fibras peptidérgicas y no peptidérgicas sino que se distribuyen homogéneamente en distintas capas pero en bajo número, y que coincide con el escaso número de neuro-

nas IF-EYFP+ cuantificadas en los ganglios sensoriales (Ordás Fernández, 2019). Los datos funcionales extraídos de estudios de microneurografía en nervios cutáneos demuestran que estas fibras pueden ser de conducción rápida o lenta (Campero et al., 2009). En línea con estos resultados, varios estudios histológicos por inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* demuestran que entre un 20-50 % de la población TRPM8+ es NF+, tanto en neuronas de alta como de baja expresión (Kobayashi et al., 2005; Takashima et al., 2007; Alcalde et al., 2018). Estos datos concuerdan con nuestros resultados obtenidos por RNAscope donde se aprecia expresión de *Nefh* en distintas neuronas TRPM8+ de expresión variable en un 20 %.

Los datos también van en línea con los resultados obtenidos en el análisis del transcriptoma de las neuronas TRPM8+ en DRG, donde encontramos marcadores típicos de neuronas tipo C como TRKA, *Tac1*, *Gal* o periférica (*Prph*) pero también niveles más altos de *Nefh* en grupos no solapantes (Nguyen et al., 2017; Zeisel et al., 2018). En especial, la población denominada como PSPEP8 (TRPM8.3) en el trabajo del grupo de Linnarson, expresa los niveles más altos de *Nefh*. Teniendo en cuenta que en dicho estudio no se pudo identificar al grupo TRPM8+ nociceptivo, las neuronas tipo C y mielínicas que se describen constituirían parte de la población IF-EYFP+. La clasificación utilizada en este trabajo apunta que el grupo PSPEP8 forma parte del grupo de neuronas de expresión intermedia para TRPM8, denominado como M1M8 en este trabajo. Estas neuronas también expresan otros marcadores como *Cpxl1*, *Asic1*, *Kcnk2* y *Gal*, pero no *Calca*, y es relativamente abundante dentro de la población neuronal TRPM8+ secuenciada en los ganglios DRGs (véase de nuevo la **figura 50B** de la **sección 4.3.2**).

El canal TREK1 (codificado por el gen *Kcnk2*), junto con otro miembro de la familia de canales de potasio K2P, TRAAK (codificado por el gen *Kcnk4*), han sido relacionados con la sensibilidad térmica, tanto al frío como al calor (Noël et al., 2009). Asimismo, la expresión de *Kcnk2* en neuronas TRPM8 también ha sido demostrada en varios estudios, incluido este trabajo y el anterior estudio por técnicas de array usando la línea TRPM8^{BAC}EYFP (Yamamoto, Hatakeyama and Taniguchi, 2009; Morenilla-Palao et al., 2014). Según nuestros datos, obtenidos por la técnica RNAscope, TREK1 co-expresa en neuronas TRPV1+/TRPM8+ en un porcentaje considerable, tanto en neuronas de alta/media como de baja expresión para TRPM8. Los resultados complementan otros estudios donde se ha visto que aproximadamente el 50 % de las neuronas que expresan TREK1 expresan TRPV1, cuantificado sobre la población total de neuronas DRG (Alloui et al., 2006; Yamamoto, Hatakeyama and Taniguchi, 2009). Además, como ya hemos mencionado previamente, los animales deficientes para TREK1 presentan alteraciones para la detección de altas temperaturas; estos animales son hipersensibles al calor en el rango de temperatura de activa-

ción de TRPV1, demostrando una relación directa de ambos canales (Alloui *et al.*, 2006). Su expresión en neuronas TRPM8+/TRPV1+ sugiere que estas neuronas podrían participar en mecanismos de regulación de la sensibilidad térmica, tanto para estímulos de frío como de calor. Apoyando estos resultados, la caracterización funcional de las neuronas EYFP+ muestra que además del grupo de baja expresión, existe una población IF-EYFP+ sensible a capsaicina, en torno al 20 %. Tal como hemos mencionado anteriormente, estas neuronas también presentarían niveles altos de *Nefh* en el caso de que pertenezcan al grupo M1M8. Este resultado es bastante singular ya que es raro que las neuronas mielínicas expresen canales TRPs. Sin embargo, se han observado respuestas al calor y al frío en un número reducido de neuronas, especialmente fibras tipo A δ con una velocidad de conducción intermedia (Ji *et al.*, 2007).

La complexina 1 (*Cplx1*) es otro de los marcadores validados por RNAscope y demostramos que se expresa en neuronas TRPM8+ de expresión intermedia. Según los grupos TRPM8+ identificados en las bases de datos de célula única, se trata de neuronas M1M8. Aunque su función se desconoce en estas neuronas, en neuronas corticales interviene en la modulación de la transmisión sináptica, regulando la exocitosis a través del complejo Complexina/Sinaptotagmina 1. El déficit de esta proteína produce potenciales sinápticos anómalos y asincrónicos, además de una reducción en la generación de la actividad sináptica espontánea. Es posible que *Cplx1* contribuya también a regular la transmisión eléctrica en los termorreceptores de frío, los cuales se caracterizan por una actividad espontánea y disparo en forma de ráfaga (Tang *et al.*, 2006).

Asimismo, los experimentos realizados con la técnica de RNAscope han identificado además neuronas TRPM8+ con expresión de TrkB (*Ntrk2*), generalmente en neuronas de alta/media expresión y, acorde con los resultados obtenidos del re-análisis identifican al grupo M2M8. El perfil molecular de estas neuronas demuestra que también expresan niveles de *Nefh* y *Th*. No obstante, en referencia a este último marcador, la expresión se identificó en algunas neuronas y fueron muy pocas en la validación por hibridación *in situ*, coincidiendo con otros trabajos donde también han mostrado una pobre co-expresión de ambos (Reimúndez *et al.*, 2018).

TrkB es un marcador específico de mecanorreceptores de bajo umbral tipo δ (A δ -LTMRs, Li *et al.*, 2011). Este resultado es ciertamente sorprendente ya que en la literatura no se describe su expresión en neuronas TRPM8. No obstante, al examinar detalladamente los resultados obtenidos en los principales trabajos de secuenciación, podemos apreciar que estos dos genes co-expresan en neuronas TRPM8+ de alta expresión para primates y humanos (Kupari *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2021). Las pocas neuronas TRKB+/TRPM8+ encontradas en la especie murina provienen principalmente de la base de datos de Li *et al.*, que las identificaron como C9-1 en su trabajo original (Li *et al.*, 2016). Cabe recordar que este estudio presenta una profundidad de

lectura superior a los trabajos de Linnarson o Usoskin, aunque secuenciaron un número más bajo de neuronas. El grupo C9, donde se incluye las neuronas TRKB+/TRPM8+ tienen un diámetro medio de 20 μm , lo que podría explicar que no se identificaran por su bajo número; el porcentaje de neuronas IF-EYFP+ mayores de 20 μm es bajo (17.9 % (7/39) dentro de la población IF, así como el grupo M2M8 identificado *in silico* es el menos abundante en DRG, verse de nuevo la **figura 48D, sección 4.3.1** de los resultados). Además, hemos observado una expresión considerable de *P2ry1* en neuronas TRPM8+ de alta y media expresión en los experimentos de RNAscope en DRG. Aunque este hallazgo es igualmente anómalo, (similar a lo que ocurre con *Ntrk2*, no se ha descrito co-expresión de *P2ry1* y *Trpm8*), los resultados van en línea con la existencia de una población TRPM8+ de velocidad de conducción intermedia, ya que el gen *P2ry1* es otro marcador que define a las neuronas A δ -LTMRs. Es interesante añadir que la eliminación de P2RY1 produce déficits térmicos, tanto al frío como al calor y no se expresa en neuronas CGRP+, vinculándolo directamente con neuronas termosensibles, posiblemente TRPM8+ de alta expresión (Molliver *et al.*, 2011). P2RY1 es un receptor purinérgico y existen agonistas selectivos que podrían usarse para validar funcionalmente la expresión en neuronas IF-EYFP+ a través de experimentos de imagen de calcio.

Adicionalmente, se ha demostrado que los aferentes de las neuronas A δ -LTMRs pueden responder rápidamente a estímulos de frío inocuo y sus potenciales de acción son estrechos, similares a los observados en neuronas TRPM8+ (Li *et al.*, 2011). Basándonos en su nivel de expresión para el neurofilamento, ambos grupos intermedios (M1M8 y M2M8) podrían identificar las fibras A δ sensibles al frío (Pierau and Wurster, 1981; Simone and Kajander, 1997). Es interesante añadir que las fibras A δ termosensibles son más abundantes en primates que en la especie murina, donde la co-expresión de *Ntrk2* con TRPM8 parece ser mayor (Darian-Smith, Johnson and Dykes, 1973; Dubner, Sumino and Wood, 1975; Georgopoulos, 1976).

En conclusión, el perfil molecular de algunas neuronas TRPM8+ comparten características que definen a los mecanorreceptores A δ -LTMRs. Nuestros datos apuntan a que este grupo delimita a un grupo raro de neuronas IF-EYFP+ de gran tamaño en DRG con expresión intermedia para TRPM8, definido molecularmente como M2M8. El otro grupo intermedio, M1M8, presenta niveles más altos para *Trpv1*, *Kcnk2*, *Gal* y *Nefh* y basándonos en la caracterización funcional de las neuronas EYFP+, son neuronas de pequeño tamaño (sólo una neurona IF-EYFP+ con un diámetro > 20 μm respondió al agonista capsaicina). La población reactiva a este agonista presentó un tamaño medio menor que la población insensible $13.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$ y $16.7 \pm 1.7 \mu\text{m}$, respectivamente.

5.1.5. Las neuronas TRPM8+ de alta expresión y su posible vinculación con procesos de analgesia

El subgrupo denominado HighM8 expresa niveles más altos de *Tac1* y *Prph* que los grupos intermedios, pero no se detecta ni *Calca* ni *Gal* en DRG, sugiriendo que puedan tratarse de las fibras tipo C sensibles al frío con actividad espontánea descritas en la literatura. Estas fibras son termorreceptores de frío puros, sin sensibilidad mecánica que presentan una frecuencia de disparo muy alta ante la bajada de temperatura (Campero and Bostock, 2010; Teliban *et al.*, 2011; Paricio-Montesinos *et al.*, 2020).

Las neuronas HighM8 expresan diferencialmente niveles más altos de *Pnoc* y *Penk*, por lo que se incluyen dentro del grupo PSPEP.7 (TRPM8.2), acorde con el estudio de Linnarsson y colaboradores. *Pnoc* codifica la prenociceptina, precursor de los neuropeptidos nociceptina, orfanina FQ2 y nocistatina. La nociceptina y nocistatina intervienen en procesos de algia o analgesia respectivamente. Además, pueden regular la temperatura corporal, la memoria o el hambre en el sistema nervioso central (Mallimo and Kusnecov, 2013; Andero, 2015; Hardaway *et al.*, 2019).

Pnoc y su receptor están estrechamente relacionados con los receptores opiáceos μ (MOR): aunque los receptores de la nociceptina (NOP) no son sensibles a la morfina, la administración crónica de morfina lleva a un aumento de los receptores NOP y en cambio, ratones deficientes para los receptores NOP exhiben una tolerancia reducida a la morfina (Ueda *et al.*, 1997, 2000). El canal TRPM8 también ha sido relacionado con los receptores MOR, particularmente con el tipo μ -1 (*Oprm1*), y existe una relación funcional entre ambos; la morfina suprime la actividad del canal TRPM8 por medio de los receptores MOR-1, llevando a cabo una internalización del canal. En cambio, cuando se administra morfina de forma crónica tiene efectos opuestos, promoviendo la hiperexcitabilidad de las neuronas TRPM8+ e inhibiendo la desensibilización del canal por medio de la vía PKC β (Shapovalov *et al.*, 2013; Iftinca *et al.*, 2020). Asimismo, nuestros experimentos de hibridación RNAscope, aunque no están respaldados por los datos obtenidos del transcriptoma de neuronas TRPM8+, muestran una co-expresión de MOR-1 y TRPM8 (véase de nuevo la **figura 52B**) y reafirman la asociación funcional observada en otros estudios.

Estos datos sugieren que las neuronas TRPM8+, especialmente aquellas HighM8 podrían estar relacionados con procesos de analgesia (Proudfoot *et al.*, 2006; Knowlton *et al.*, 2013). Asimismo, se ha descrito que la analgesia producida por la aplicación de varios compuestos mentolados ante diferentes estímulos dolorosos está ausente en animales deficientes para TRPM8 (Proudfoot *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011; B. Liu *et al.*, 2013). El efecto desaparece

además cuando se administraba mentol con naloxona, sugiriendo que la activación de TRPM8 involucra una vía de señalización dependiente de los opioides (B. Liu *et al.*, 2013).

En resumen, en este apartado hemos discutido la posible relevancia biológica de las distintas subpoblaciones de las neuronas TRPM8+ en función de su perfil molecular. En el caso de las neuronas WF-EYFP+ e IF-EYFP+ presentarían propiedades pro-nociceptivas y antinociceptivas respectivamente. Las neuronas con expresión intermedia podrían constituir grupos NF+ y potencialmente mecanosensibles (**figura 68**). No podemos olvidar que los ejemplos propuestos para las distintas funciones de las neuronas TRPM8 se basa principalmente en el perfil transcripcional obtenido y en los resultados de estudios previos, ya que, a excepción del estudio de la reactividad ante agonistas para los canales TRPM8, TRPA1 y TRPV1, no hemos profundizado más en la caracterización funcional de las poblaciones IF y WF-EYFP+.

También debemos advertir que algunos de los marcadores descritos se basan en los resultados positivos obtenidos de la co-expresión con neuronas TRPM8+ obtenidos por RNAscope, y que en algunos casos, como en *Ntrk2*, *P2ry1*, *Kcnn2* y *Oprm1* no se respaldaban en los datos de secuenciación de célula única obtenidos de distintas bases de datos. No debemos olvidar, que la validación por RNAscope se fundamenta en una metodología diferente y, basándonos en los resultados obtenidos para detectar neuronas TRPM8+ de baja expresión, más sensible. Por tanto, es muy posible que algunos de los transcritos no detectados en los estudios del transcrito sólo sean visibles por hibridación *in situ* (RNAscope). Otros resultados anómalos, obtenidos en los experimentos por RNAscope es la baja co-expresión de *Gal* o *Tac1* en neuronas TRPM8+ en comparación con otros estudios. Es posible que parte de estas discrepancias se deban a los distintos criterios empleados para considerar una neurona como positiva para un determinado marcador. En el caso de los resultados referentes a las figuras de la **sección 4.3.2**, se decidió un punto de corte común (> 60 %, de su máxima expresión) para todos los marcadores testados, por lo que podría ser demasiado exigente para algunos de los marcadores.

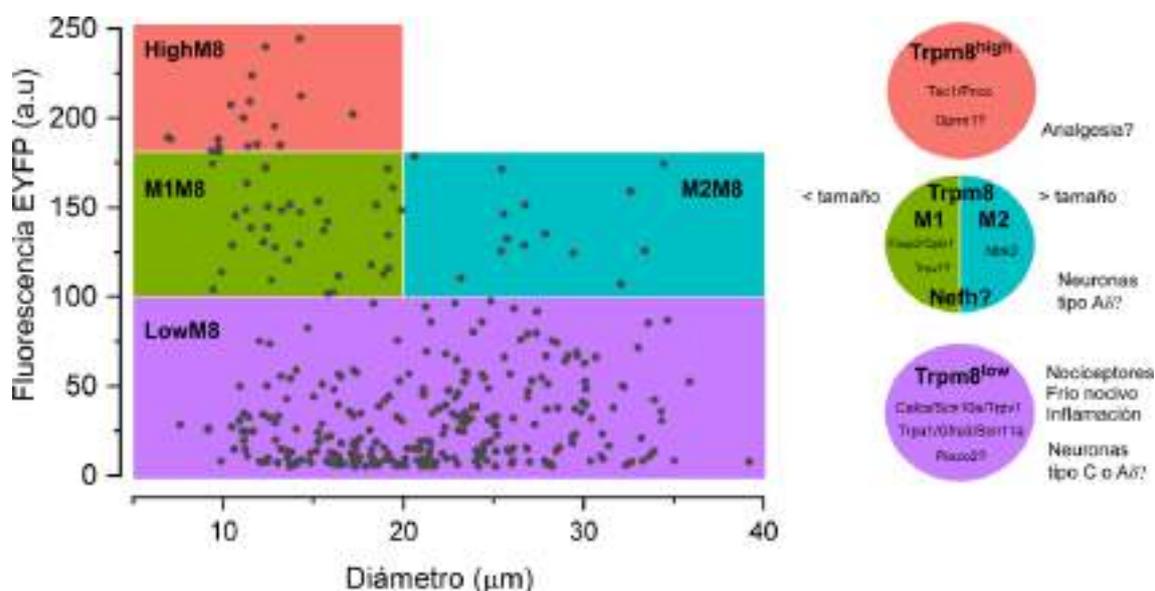


Figura 68. Distribución hipotética de los grupos TRPM8+ identificados en los estudios de expresión de célula única en el ratón TRPM8^{BAC}EYFP. Se representa el diagrama de dispersión en función del tamaño e intensidad de fluorescencia de las neuronas EYFP+ (referente a la **figura 37**), y su clasificación en los posibles grupos TRPM8+ identificados en la **sección 3.3.1**. Acorde a su nivel de expresión para TRPM8, el grupo denominado como LowM8 identificaría a las neuronas WF-EYFP+ en el ratón TRPM8^{BAC}EYFP. Estas neuronas participan en la detección del frío nocivo y posiblemente tengan un papel en la inflamación. Los grupos M1M8 y M2M8 son neuronas con expresión intermedia y posible expresión de NF. Además, podrían diferenciarse entre ellas por su tamaño celular: el grupo más reducido correspondería a las neuronas M2M8, con un tamaño mayor y expresión de marcadores típicos para LTMRs como *Ntrk2* (*TrkB*). El grupo M1M8 tiene un tamaño celular menor y al igual que el grupo LowM8, pueden expresar *Trpv1*, además de *Kcnk2* o *Foxp2*. Por último, las neuronas de alta expresión expresarían *Pnoc* y es posible que tengan un papel en procesos de analgesia

Por último, debemos recalcar que la posible relevancia biológica para las neuronas TRPM8+ que discutimos en este apartado hacen referencia a las neuronas TRPM8+ en DRG, ya que el estudio se focalizó en estos ganglios: tanto el perfil de las neuronas EYFP+ como la validación de la heterogeneidad molecular de los experimentos de RNAscope se realizó solamente en DRG. Esta situación podría ser distinta para los ganglios trigéminos ya que, a excepción del grupo LowM8, los patrones moleculares son distintos (verse de nuevo resultados de la **figura 49, sección 4.3.1**). Por ejemplo, a diferencia de DRG, el grupo HighM8 y M1M8 de neuronas de TG presentan un perfil molecular muy similar, con niveles comparables de *Nefh* y de otros neurofilamentos como *Nefm* y *Nefhl*. Asimismo, en trigémino, el grupo HighM8 es el que presenta mayor expresión de *Ntrk2*, mientras que el grupo M1M8 expresa niveles de *Pvalb*, *Scn4b* o *Scn1a*, que son marcadores específicos de propioceptores y/o A β -LTMRs (Chiu *et al.*, 2014). Estos cambios podrían tener relación con que en TG encontramos un número mayor número de neuronas IF-EYFP+, muchas de ellas con un tamaño celular grande, acorde con las características de neuronas tipo A de gran

tamaño (datos no publicados de nuestro grupo de investigación). Las diferencias en el perfil molecular de ambos ganglios es otro de los interrogantes que deja abierto los resultados obtenidos en este estudio, que podrían abordarse mediante estudios de expresión comparativos en ambos tejidos.

5.2. El perfil molecular de las neuronas IB4+

En nuestro estudio de expresión, las neuronas TRPM8+ (identificadas por la fluorescencia EYFP) se compararon con la población IB4+, que expresa el canal TRPA1, conclusión validada por el alto porcentaje de respuesta a su agonista específico AITC (Barabas, Kossyrev and Stucky, 2012). Aunque no hemos profundizado demasiado en los marcadores encontrados en la población IB4+, en este trabajo hemos aportado información adicional sobre su perfil molecular:

En concordancia con otros estudios de *FACS-Seq*, observamos que los genes *Mrgprd*, *Trpc3*, *Lpar3* o *Grik1* son marcadores selectivos de la población IB4+ (Zylka, Rice and Anderson, 2005; Chiu *et al.*, 2014; Reynders *et al.*, 2015). Además, cuando comparamos los marcadores de nuestra población IB4+ con aquellos de las principales subpoblaciones neuronales identificadas por *scRNA-Seq* vemos que identifican en un alto porcentaje a las MRGPRD+, que constituyen aproximadamente el 75% de las neuronas IB4+ (Wang and Zylka, 2009). De entre estos marcadores, podemos destacar como atractivo a *Grik1*, el canal ionotrópico de glutamato GluR5, el cual se le ha relacionado con distintos procesos de dolor (revisado por Pereira and Goudet, 2019). Asimismo, encontramos también marcadores que identifican a otros grupos de neuronas como las MRGPRA3+ que también se unen a la isolectina B4 (Han *et al.*, 2013) (referente a la **figura 47 sección 4.2.4.**).

Al comparar la población IB4+ con la DN, identificamos otros marcadores *DE* conocidos de esta población, como *Chrna6*, *Scn11a*, *Trpa1*, *Scn10a* o *Kcnmb1*, algunos de ellos también sobreexpresados en la población EYFP+ (Chiu *et al.*, 2014; Usoskin *et al.*, 2015; Zeisel *et al.*, 2018). Además de los canales de sodio y *Trpa1*, destacamos la sobreexpresión en la población IB4+, de la subunidad reguladora $\beta 1$ del canal de potasio activado por calcio KCa1.1 (codificado por el gen *Kcnmb1*), que regula la hiperpolarización en neuronas sensoriales no peptidérgicas (X. L. Zhang *et al.*, 2010). Por otro lado, el canal colinérgico *Chrna6* se le ha relacionado con la generación del dolor crónico y se expresa en varios tipos de poblaciones sensoriales neuronales incluidas las neuronas IB4+ (Wieskopf *et al.*, 2015).

5.3. Diferente sensibilidad térmica en neuronas de los DRG y su relación con su perfil molecular

La mayoría de los estudios sobre termotransducción coinciden en varias premisas: **1)** a diferencia del estímulo del calor, la detección del frío es relativa, no absoluta, por lo que depende de la magnitud del cambio de temperatura y no de la temperatura basal, **2)** a mayor diferencia de temperatura, se produce un mayor reclutamiento de neuronas sensibles al frío con umbrales de activación más altos y **3)** el efecto no es gradual, es decir, la mayoría de los termorreceptores al frío están “sintonizados” a responder a una temperatura específica; tras alcanzar esa temperatura, la respuesta tiende a disminuir gradualmente (Ran, Hoon and Chen, 2016; Wang *et al.*, 2018). No obstante, los estudios de Yarmolinsky *et al.*, y Luiz *et al.*, realizados usando la técnica de calcio *in vivo* demuestran que existe un número considerable de neuronas sensibles al frío que presentan un perfil gradual y mantienen la respuesta con la bajada de la temperatura (Yarmolinsky *et al.*, 2016; Luiz *et al.*, 2019).

Las respuestas graduales o adaptativas implican la posible existencia de dos modelos distintos en la detección del frío en la periferia; uno donde la bajada de temperatura causa un incremento en la intensidad y en el número de las respuestas, y otro en donde cada receptor codifica una temperatura específica. Muchos autores se decantan por el primer modelo, dado que las neuronas sensibles al frío presentan una temperatura de activación variable, separándose en neuronas LT-CS y HT-CS. Sin embargo, se conoce también que las neuronas TRPM8+ típicas o LT-CS se desensibilizan cuando el estímulo se prolonga, mostrando un perfil adaptativo a la respuesta, mientras que aquellas que responden a umbrales más altos mantienen los niveles de calcio a lo largo del estímulo (perfil no adaptativo) (Babes, Zorzon and Reid, 2004; Yarmolinsky *et al.*, 2016; Luiz *et al.*, 2019).

En nuestra caracterización funcional también hemos observado que, tras aplicar un pulso de frío, algunas neuronas que generalmente son EYFP-, tardan más en alcanzar el punto máximo en los niveles de calcio, indicativo de una respuesta gradual no adaptativa. Este rasgo también se observa en la población EYFP+, predominante en neuronas WF-EYFP+. Los datos coinciden con los resultados de Yarmolinsky, donde observan dos tipos de respuesta en las neuronas TRPM8+, una adaptativa y otra mantenida a lo largo del estímulo (Yarmolinsky *et al.*, 2016). En general, hemos apreciado que las neuronas que responden a AITC presentan los valores de tiempo al pico en respuesta al frío más altos independientemente de la población estudiada, encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre las neuronas AITC+ y AITC- (re-

ferente a la **figura 38J** de la **sección 4.1.2** de los resultados). El canal TRPA1, en especial la isoforma de ratón, presenta una inactivación muy lenta al frío, lo que podría explicar por qué los niveles de calcio se mantienen a lo largo del estímulo (Sinica *et al.*, 2019).

Además de la presencia de TRPA1, la expresión diferencial de otros canales iónicos entre las poblaciones IF y WF podrían explicar su perfil de respuesta al frío. Por ejemplo, en el transcrito de los subgrupos TRPM8+, el gen *Scn1a* (codifica al canal $Na_v1.1$ que es un canal de sodio dependiente de voltaje y sensible a TTX) se expresa principalmente en los grupos TRPM8+ de expresión intermedia y alta. Ya en el trabajo de Griffith, en 2019, observaron que este canal se expresa en neuronas TRPM8+ y se demostró funcionalmente por su bloqueo selectivo en neuronas que responden a mentol. Por otro lado, basándonos en los resultados de esta tesis, las neuronas sensibles al frío WF-EYFP+ junto con otros nociceptores TRPM8- como las neuronas IB4+, son $Na_v1.8+$, el cual presenta una cinética de inactivación muy lenta (Vijayaragavan, O'Leary and Chahine, 2001). En 2012, Sarria y colaboradores caracterizaron funcionalmente las propiedades fisicoquímicas de las neuronas de TG sensibles al frío y mentol en ratas. Su estudio se basó en la clasificación de neuronas sensibles al frío y sensibles a TTX (TTX-s) o resistentes (TTX-r) y los resultados concuerdan con el perfil descrito de las neuronas IF y WF-EYFP+: umbral de temperatura, APs más estrechos en las TTX-s y amplios en las TTX-r, entre otras características. También demostraron que a 10 °C las corrientes de las neuronas TTX-s se inactivan pero no aquellas TTX-r, posiblemente debido a que $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$ son resistentes a la inactivación por frío (Zimmermann *et al.*, 2007; revisado por Liu and Wood, 2011). Los resultados implican que las neuronas IF-EYFP+ no intervienen en el frío nocivo, ya que la transmisión eléctrica cesa y por consiguiente recae en neuronas WF-EYFP+ y otras neuronas no dependientes de TRPM8+.

Por último, hay que puntualizar que el número de respuestas al frío obtenidas en este trabajo que no son dependientes de TRPM8 (y potencialmente $Na_v1.8+$), es mayor que en experimentos realizados en imagen de calcio *in vivo*. En este último caso se encuentran muy pocas neuronas TRPM8- sensibles al frío, aun cuando la temperatura decae en extremo hasta alcanzar 1° C (Emery *et al.*, 2016; Luiz *et al.*, 2019; MacDonald *et al.*, 2021). Más que a un estímulo agudo, en estas condiciones las neuronas responden tras exponerlas al frío durante un periodo prolongado. En cambio, nuestros datos junto con otros estudios realizados en cultivo demuestran que las respuestas al frío que no dependen de TRPM8 son más abundantes. Las diferencias entre los estudios pueden deberse a la sensibilización que sufren las neuronas sensoriales tras cultivarlas *in vitro*, donde sufren un proceso de axotomización.

5.3.1. La expresión de TRPM8 y TRPA1 define a las neuronas de bajo y alto umbral respectivamente.

Nuestros datos de la **sección 4.1.4** muestran que el porcentaje de neuronas sensibles al frío que son AITC- es mayor que el porcentaje de las AITC+, y que esta última población tienen umbrales de temperatura más altos y respuestas más lentas. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Karashima y colaboradores en su estudio de 2009, aunque encuentran una proporción mayor de neuronas AITC+ que responden al frío. Las diferencias entre ambos abordajes pueden deberse a la duración de la rampa de temperatura para el estímulo de frío (3 minutos en su caso); lo que aumenta la probabilidad de ver más respuestas de neuronas AITC+ con una cinética lenta.

Otro de los puntos clave para estudiar la termosensibilidad al frío y que se ha enfatizado en este trabajo es que la temperatura mínima que alcanza la rampa; esto es clave para ver neuronas sensibles a frío TRPM8-. Nuestros resultados indican que a partir de los 19 °C podemos empezar a detectar las respuestas al frío en la población TRPM8- y que principalmente dependen de TRPA1 (referente a la **sección 4.1.4** de los resultados). La caracterización de esta población está ausente en muchos trabajos previos, como en Madrid *et al.*, 2006, posiblemente debido a que en dicho estudio la temperatura mínima alcanzada era de solo hasta 19 °C. También explicaría por qué en el estudio de Karashima y colaboradores observan más respuestas dependientes de TRPA1, ya que su rampa de frío alcanza temperaturas más bajas, alrededor de 10 °C (Karashima *et al.*, 2009). La temperatura media mínima alcanzada en nuestro estudio es de 12.4 ± 0.08 °C.

En conclusión, hemos podido clasificar las respuestas de frío en dependientes de TRPM8 o TRPA1, según su umbral de activación. Los resultados son claros: las poblaciones TRPM8+ (es decir, fluorescentes para la proteína EYFP en la línea TRPM8^{BAC}EYFP), presentan umbrales de activación bajos (responden a temperaturas más altas) mientras que las neuronas TRPM8-, principalmente neuronas TRPA1+, responden a temperaturas más bajas. Las poblaciones IF-EYFP+, IB4+ y DN son prácticamente puras e identifican las poblaciones de bajo (IF-EYFP+) y muy alto umbral (IB4+ y DN). En cambio, la población WF-EYFP+ presenta un perfil mixto. De nuevo, aquellas neuronas WF-EYFP+ que respondieron a AITC presentaron los umbrales de activación más altos. Dado que la expresión de TRPM8 es más baja que en las neuronas IF-EYFP+, es posible que en las respuestas a frío de estas neuronas participen ambos canales. En cualquier caso, nuestra clasificación de las respuestas “tipo TRPM8”, “TRPM8/TRPA1” o “TRPA1” utilizadas en las **secciones 4.4.2. y 4.4.3** coincide bastante bien con las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN, siendo estas dos últimas dependientes de TRPA1.

En el umbral de temperatura intervienen otros elementos que no hemos tenido en consideración; debemos recordar que los canales de potasio, principalmente los miembros de las familias K_v y $K2P$, regulan la excitabilidad en los termorreceptores de frío. Particularmente, los canales K_v1 y la generación de la corriente *IKD* ha sido ampliamente estudiada y se considera un componente fundamental para definir el umbral de temperatura de los termorreceptores, incluidos aquellas dependientes de *TRPA1* (Madrid *et al.*, 2006; Memon *et al.*, 2017). La mayoría de estos estudios coinciden en afirmar que las neuronas HT-CS expresan niveles más altos de los canales K_v1 . En línea con estos datos, en el trabajo de Luiz *et al.* (2019), demuestran su expresión diferencial al comparar el transcriptoma de las neuronas sensibles al frío $Na_v1.8^-$ y aquellas $Na_v1.8^+$ (sensibles o no al estímulo) tras aislarlas por citometría de flujo. Las neuronas que respondieron al estímulo de frío que son $Na_v1.8^-$, expresaron niveles más altos de *Trpm8* y *Kcnk9*. A su vez, las neuronas $Na_v1.8^+$ aisladas expresaban diferencialmente *Kcna1* ($K_v1.1$), *Kcna2*, ($K_v1.2$) y $Na_v1.9$. Basándonos en estos datos, esperaríamos que los niveles de $K_v1.1/2$ fueran mayores en la población WF-EYFP+. No obstante, no hemos observado cambios en la expresión en la población LowM8 al compararla con los grupos altos e intermedios de expresión para TRPM8. Es más, la expresión de $K_v1.1$ y $K_v1.2$ es más alta en los grupos intermedios M2M8 y M1M8 respectivamente. Es interesante añadir que algunos estudios de expresión determinan que los $K_v1.1/2$ se expresan predominantemente en neuronas mielínicas y no en nociceptores. De hecho, a excepción de los nociceptores tipo $A\delta$ que codifican el grupo PEP2, $K_v1.1$, no se expresa en las neuronas peptidérgicas (Zeisel *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2019). Hay que puntualizar que, en la mayoría de los estudios funcionales, la caracterización de la corriente *IKD* está determinada por la aplicación de antagonistas, que en algunos casos no son totalmente selectivos para un solo canal. Uno de los antagonistas utilizados, α -DTX, puede bloquear también a la subfamilia de canales $K_v1.6$, que se expresa diferencialmente en neuronas TRPM8 peptidérgicas LowM8 y nociceptores MRGPRD+ (Zheng *et al.*, 2019 ; este trabajo). Sería conveniente verificar si la corriente de freno se ha atribuido erróneamente a otros miembros de la familia K_v1 .

5.3.2. La sensibilidad térmica en neuronas TRPA1+ no es específica de las neuronas IB4+

Los experimentos de imagen de calcio con animales *TRPA1*^{KO} han demostrado que este canal es el principal mediador de las respuestas a frío en neuronas AITC+, tanto en la población IB4+ como en la IB4-, tal como han descrito trabajos previos (Bandell *et al.*, 2004; Macpherson *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 2007; Fajardo *et al.*, 2008; Karashima *et al.*, 2009; Camino *et al.*, 2010).

Estos datos son coherentes con estudios *in vivo* donde la ablación simultánea de las subpoblaciones de neuronas MRGPRD+ y TRPM8+ agrava más los déficits térmicos en la prueba de la placa fría que cuando sólo eliminamos las neuronas TRPM8+, lo que indica la existencia de otra población sensible TRPA1+ (Pogorzala, Mishra and Hoon, 2013).

La población IB4+, presentaba además una amplitud de respuesta a AITC mayor que otras neuronas, sugiriendo que tiene una mayor expresión de TRPA1. Según los estudios de Memon *et al.*, los niveles de expresión para TRPA1 determinan la sensibilidad al frío en las neuronas TRPA1+ (Memon *et al.*, 2017). Sin embargo, no hemos observado cambios en la amplitud para los estímulos de frío y mentol al comparar las neuronas AITC+/IB4+ y AITC+/IB4-. Hay que aclarar que en este caso sólo hemos comparado las células que respondieron a umbrales de activación por frío muy altos (temperaturas menores de 19 °C) para evitar la reactividad cruzada con algunas células WF-EYFP+ que expresen TRPM8 y TRPA1. Sí hemos observado que la amplitud de respuesta al compuesto AITC es mayor en las neuronas sensibles a frío, siendo estadísticamente significativa (0.34 ± 0.03 vs 0.26 ± 0.01 , $p = 0.04$ prueba t-Student), y sugiriendo que es posible que debamos aumentar el tamaño muestral para ver las diferencias entre las neuronas IB4+ e IB4-. Por lo tanto, los estímulos de frío y mentol, el cual también evoca respuestas en las poblaciones TRPM8-, IB4- y DN, pueden considerarse como agonistas débiles del canal. La utilización de WS-12, más específico para TRPM8, produce un menor número de respuestas a en la población TRPM8-, tanto para aquellas neuronas IB4+ como DN (referente a la **figura 40, sección 4.1.4**).

Aunque la expresión del canal TRPA1 parece ser determinante en la sensibilidad al frío es también posible que otros mecanismos ajenos al canal intervengan. Por ejemplo, la ya mencionada corriente IKD. En nuestros datos no hemos encontrado diferencias en los niveles de expresión de los canales K_v o K2P en las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN. Sí que encontramos, en cambio, una sobreexpresión de las subunidades accesorias para los canales K_v, comúnmente conocidas como KChIPs ("*Kv channel interaction protein*", siendo *Kcnp4* en las IB4+ y *Kcnp1* en las EYFP+). Estas subunidades aumentan la excitabilidad a través de la inhibición de los canales de potasio tipo A en respuesta a pequeños cambios en el calcio intracelular. Los canales tipo-A están especialmente constituidos por K_v1.4/K_v4.3 entre otros canales, y se expresan predominantemente en las neuronas no peptidérgicas IB4+ y C-LTMRs. Su función es regular las corrientes de potasio ya que puede inhibir los canales K_v, aumentando así la excitabilidad de las neuronas IB4+, por lo que es posible que intervengan en su sensibilidad al frío (Xia *et al.*, 2010; Kuo *et al.*, 2017).

5.4. Efecto de la NPIO en células de DRG según su alteración transcripcional

En el estudio de la sensibilidad térmica, nos decidimos por inducir la neuropatía a través del agente quimioterapéutico oxaliplatino. Este fármaco ha sido ampliamente usado en modelos experimentales de neuropatía periférica y aunque existen numerosas variantes del protocolo, todos convergen en una mayor sensibilidad al frío. Las diferencias se basan en dosis administrada, vía de administración, cantidad acumulada del compuesto y periodo de la evaluación conductual (Ta, Low and Windebank, 2009; Descoeur *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Deuis *et al.*, 2013; Gris *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2021). La eficacia del protocolo usado en esta Tesis ya ha sido probada en otros estudios de nuestro laboratorio con resultados reproducibles para la hipersensibilidad mecánica y al frío (Gers-Barlag, 2020; Marcotti, 2020). Es importante reiterar las diferencias entre los modelos utilizados; normalmente, se considera un modelo agudo cuando los síntomas son evaluados a las pocas horas o días de la inyección, aunque la cronicidad es dependiente de la acumulación del compuesto y por tanto de la dosis acumulada.

La aplicación directa del compuesto *in vitro* también produce alteraciones en las neuronas sensoriales, incluyendo una reducción del crecimiento de las neuritas (Anand, Otto and Anand, 2010; López-González *et al.*, 2018) y un aumento en la expresión de los canales iónicos, incluidos TRPM8, TRPA1 y TRPV1 (Ta *et al.*, 2010). También causa una despolarización en las neuronas IB4-, presuntamente a través de la activación de TRPM8 (Wu *et al.*, 2021). En referencia a este último estudio, recientemente se ha descrito que el compuesto produce un aumento en la amplitud de la respuesta a mentol en células HEKs transfectadas con el canal TRPM8 (Rimola *et al.*, 2021). Esta activación ocurre a las pocas horas de la administración y puede explicar el desarrollo agudo de hipersensibilidad al frío a las pocas horas de la infusión en clínica. En el estudio también demuestran que a las 24h de la administración del fármaco la actividad de TRPM8 decae con unos niveles más bajos en la amplitud de la respuesta. La actividad puede ser restaurada de nuevo con la inhibición de la vía de señalización PLC/PKC y los autores sugieren que sería la acumulación del calcio intracelular que a su vez activa la depleción de PIP2 a través de la fosfolipasa PLC, lo que reduciría la actividad del canal.

Aunque estos trabajos señalan directamente al canal TRPM8 en el desarrollo de la alodinia al frío, desconocemos si los cambios transcripcionales observados en este estudio se deban a los mismos mecanismos celulares; en nuestro modelo, la dosis acumulada del compuesto y la evaluación a los pocos días de la administración lo sitúan como un estudio subagudo o crónico. En la fase crónica es característico observar una pérdida de la sensibilidad o hipostesia a estímulos

mecánicos y térmicos, acompañada de muerte celular en los ganglios sensoriales (revisado por (Vichaya *et al.*, 2015).

Los genes *DE* identificados tras el tratamiento sugieren la participación de células no neuronales, como la glía y el sistema inmune, por lo que es posible que sea un indicativo de la cronicidad del modelo. Cada vez son más las evidencias que atribuyen la hipersensibilidad mecánica desarrollada tras las neuropatías a células satélite residentes en los ganglios sensoriales. En general, la glía y el sistema inmune son responsables de la cronicidad de la patología (Cobos *et al.*, 2018; Xiaojuan Liu *et al.*, 2019; Ding, Luo and Qi, 2020; Yu *et al.*, 2020; Silva, Guimarães and Cunha, 2021). A diferencia de otros modelos neuropáticos, se conoce muy poco de la contribución de estas células al desarrollo de la neuropatía inducida por oxaliplatino. Los limitados estudios del transcriptoma de los que disponemos tampoco han aportado nuevos datos en este tema (Bangash *et al.*, 2018; Housley *et al.*, 2020; Starobova *et al.*, 2020; Gould *et al.*, 2021); cuando comparamos los datos obtenidos de los estudios realizados en ratón vemos que muy pocos genes *DE* coinciden entre las bases de datos (sólo 93 de un total de 616 genes analizados coincidieron con nuestra base de datos y sólo 6 fueron comunes a los estudios de Bangash y Starobova: *Alas2*, *Hba-a1*, *Hba-a2*, *Hbb-bt*, *Neto* y *Ptgds*). De los 6 genes comunes, *Alas2*, *Hba-a1*, *Hba-a2*, se identificaron como los únicos genes alterados al inducir la neuropatía en animales *Sarm1^{KO}*, que presentan una resistencia adicional a la degeneración axonal con una eficacia probada en otros modelos neuropáticos (Gould *et al.*, 2021). Además, estos tres genes se encontraron desregulados negativamente en nuestro estudio (*Hba-a1* y *Hba-a2* se encontraron desregulados en las tres poblaciones estudiadas y *Alas2* en las poblaciones IB4+ y DN), lo que indica que su participación en la NPIO es generalizada en varias poblaciones celulares del DRG.

A continuación, describiremos los posibles mecanismos comunes o inespecíficos afectados tras el tratamiento con el oxaliplatino en base a los resultados obtenidos a partir del análisis del transcriptoma (es decir, puede afectar a la población no neuronal o neuronal). La mayoría de los procesos involucran a la población heterogénea DN y a los procesos identificados en las **figuras 65 y 66** de los resultados, aunque también pueden estar *DE* en las otras dos poblaciones. Posteriormente, en la **sección 5.4.4** nos centraremos específicamente en el posible efecto que el oxaliplatino puede producir en las neuronas sensoriales.

5.4.1. Activación del sistema inmunitario

H2-Ab1, *H2-Aa* y *Cd74* son otros 3 genes regulados negativamente en las tres poblaciones celulares estudiadas. Estos genes participan en procesos de inmunidad adaptativa (referente a los

resultados obtenidos en la **sección 4.4.4**). Concretamente, estos genes forman parte del complejo de histocompatibilidad o MHC-II y su función es permitir la diferenciación de las células T CD4+. El complejo MHC-II se encuentra en la membrana de células dendríticas, microglía y macrófagos y permite la diferenciación de las células citolíticas Th(*helper*) CD4+ inactivas a través de la presentación de antígenos (Jones *et al.*, 2006). Las consecuencias funcionales de estos resultados no están claras; ciertos déficits del MHC-II conducen a trastornos de inmunodeficiencia por lo que la regulación negativa del complejo podría indicar una activación menor de las células T CD4+ (Reith and Mach, 2003; Jones *et al.*, 2006). Además, la eliminación de MHC-II a través de ratones KO ayuda en la resolución de la algesia en diferentes modelos neuropáticos (Sweitzer *et al.*, 2002).

Sin embargo, a diferencia de otros tratamientos contra el cáncer, el oxaliplatino no tiene un efecto inmunosupresor sino que más bien promueve la activación de células TCD8+ y TCD4+ (Makker *et al.*, 2017; Stojanovska *et al.*, 2019). Asimismo, nuestros resultados sugieren una diferenciación de las células Th (T helper) hacia un fenotipo proinflamatorio a través de la sobreexpresión de genes como TNF α (*Tnfaip8l3*, *Tnfaip6*) y sus receptores, la activación de IFN (*Ifit3*, *Ifitm3*, *Ifitm2*, *Ifi204*, *Ifi203*) y los genes *Icam1*, *Itgal* e IL-18 asociados con la producción de IFN γ . Los niveles de TGF β (*Tgbi*, *Tgfb3*, *Tgfb2*), TGF α (*Tgfa*) también se encontraron sobreexpresados. Por último, vemos una sobreexpresión de la interleucina IL-17 y *Rorc*, marcadores de las células Th17 que presentan un perfil inflamatorio. De los distintos grupos de células Th que promueven la inflamación, Th1 se encarga del proceso agudo y Th17 de la inflamación crónica. En especial, la infiltración de las células Th17 en los ganglios periféricos está descrita en distintos modelos de inflamación y su presencia se ha vinculado con un aumento de la sensibilidad dolorosa (revisado por Laumet *et al.*, 2019). Es más, la infiltración ganglionar de células Th17 ocurre tras un modelo de constricción del nervio ciático o CCI (Kleinschnitz *et al.*, 2006), y la interleucina IL-17, que es canónica de las células Th17, coordina la inflamación local a través de la liberación de otras citocinas inflamatorias y quimiocinas, la activación de macrófagos y la sensibilización de nociceptores (Kawaguchi *et al.*, 2004; Kolls and Lindén, 2004; Huo *et al.*, 2019). Más recientemente, se ha demostrado que la activación de los nociceptores TRPV1+ promueve la activación de estas células a través de la liberación de CGRP (Cohen *et al.*, 2019). Estos datos ponen de manifiesto la activa comunicación entre el sistema inmunitario y neuronal y abren, además, una nueva vía de estudio de las células Th17 en neuropatías inducidas por agentes quimioterapéuticos.

En base a estos resultados, hipotetizamos que el oxaliplatino promueve la activación del sistema inmunitario. Entonces, la desregulación de los genes que forman el complejo MHC-II puede que

sea indicativo de la pérdida de otras células no inmunitarias; en la periferia, diferentes tipos celulares como células endoteliales, células satélites o de Schwann pueden sobreexpresar MHC-II bajo ciertas condiciones de inflamación (Cifuentes-Diaz *et al.*, 1992; Wiendl *et al.*, 2003; Rothermel *et al.*, 2004; Hartlehnert *et al.*, 2017). De entre éstas, las células de Schwann son muy vulnerables a la toxicidad del compuesto oxaliplatino a concentraciones incluso menores que las que dañan las neuronas sensoriales (Imai *et al.*, 2017).

También observamos una sobreexpresión de la proteína *MyD88*, que interviene en la diferenciación mieloide y un aumento de los niveles de IL-11, IL-16 y IL-33 que estimulan el desarrollo de linfocitos T y B, IL-34 que promueve la diferenciación de macrófagos y monocitos, e IL-18 e IL-15, específicas en la activación de células T citolíticas. Las quimiocinas que inducen la infiltración de macrófagos (CXCL12, CCL8), neutrófilos y eosinófilos (CXCL2, CCL11), y la familia de receptores atípicos ACKR2 y ACKR3 también se encuentran sobreexpresadas en las poblaciones IB4+ y DN. A excepción de CXCL12 que también puede expresarse en neuronas sensoriales, las demás las secretan los macrófagos y están asociadas con la aparición del dolor crónico ya que su inyección dificulta la resolución de muchas neuropatías (Guyon, 2014). La sobreexpresión de CXCL12 en la NPIO también ha sido documentada y tiene una implicación directa en el modelo ya que la neutralización de la quimiocina por anticuerpos alivia la hiperalgesia mecánica y térmica (Li *et al.*, 2017). Otro de los genes relacionados con la activación de macrófagos y sobreexpresado en nuestra base de datos es el factor estimulante de la colonia M-CSF (codificado por *Csf1*). Su presencia también es imprescindible para la supervivencia de la microglía (Schweizerhof *et al.*, 2009). En macrófagos, causa su polarización hacia el fenotipo denominado M2 o “*alternatively activated macrophage*”, el cual presenta propiedades antiinflamatorias y, recientemente, se ha descrito que su activación parece ser fundamental para la reparación del tejido celular y la homeostasis (Iwai *et al.*, 2021). Esto sugiere que en el tejido del ganglio se activan distintos procesos de regeneración con el fin de resolver la neuropatía. Junto con *Csf1*, hemos encontrado otros marcadores sobreexpresados para los macrófagos tras el tratamiento con oxaliplatino, como CD68 y CD163 (en IB4+). Este último es también marcador del tipo M2 (Jayasingam *et al.*, 2020) (figura 69A).

5.4.2. Efecto intracelular del oxaliplatino: metabolismo y desequilibrio energético e inducción de los procesos de muerte celular

El oxaliplatino se acumula en las células de forma pasiva o mediante los transportadores MTP (del inglés “*multidrug transporters*”). Los datos de secuenciación muestran una mayor expresión de genes relacionados con la entrada y eliminación del compuesto. De entre ellos, podemos

destacar el gen *Slc22a2* (también conocido como OCT2; sólo *DE* en la población EYFP+) y *Slc31a2* (CTR2) relacionados con su transporte activo (Sprowl *et al.*, 2013; Fujita *et al.*, 2019a). También, observamos un aumento en la expresión de diferentes miembros dentro de la familia de enzimas glutatión S-transferasas (GST) μ , α y θ (*Gstm1/2/7*, *Gsta4* y *Gstt2/3* respectivamente), encargadas de detoxificar compuestos xenobióticos a través de la conjugación de una molécula de glutatión. Los miembros de la familia GSTM1 o GSTP1 son considerados como marcadores predictivos para la terapia por oxaliplatino y su sobreexpresión tras el tratamiento sugiere un papel en la clarificación y eliminación del compuesto (Allocati *et al.*, 2018).

El platino que no es eliminado puede intercalarse en el ADN nuclear y mitocondrial, produciendo fallos en la replicación del ADN que inducen la muerte celular si no son procesadas adecuadamente (**figura 69B**). Este fenómeno puede relacionarse con un aumento de la expresión para la ADN polimerasa θ y γ (*Polq* y *Polg*, respectivamente) junto con *Ercc4*, *Ercc8*, *Mlh1* y *Brca1*. Los genes mencionados se encuentran alterados tras la inducción de la neuropatía en nuestros datos y pertenecen a distintos mecanismos de reparación del ADN genómico; han sido muy estudiados en la resistencia que adquieren ciertos tumores tras el tratamiento con los agentes de platino (Slyskova *et al.*, 2018). No obstante, destaca especialmente la sobreexpresión de los miembros de familia de enzimas PARP poli ADP ribosa polimerasas (*Parp3/9/14/16*) en la población DN, ya que previamente se ha descrito su participación directa en la NPIO (Zhu, Chang and Lippard, 2010; McQuade *et al.*, 2018). Las enzimas PARPs reconocen roturas de hebras de ADN monocatenario e inician también un proceso de reparación. Su acción requiere del cofactor NAD⁺ como sustrato y una actividad prolongada de estas enzimas puede reducir las reservas de éste. NAD⁺ es también necesario para el balance energético a partir de la síntesis de ATP en la glucólisis y el ciclo TCA. La síntesis del cofactor se encuentra también comprometida en nuestros datos de *RNA-Seq*, con unos niveles bajos de la enzima *Nmnat1* y un aumento de *Qprt1* y *Naprt* (esta última solo en la población EYFP+); *Nmnat1* (“Nicotinamide Nucleotide Adenylyltransferase 1”) se encarga del reciclaje de NAD⁺ tras un proceso de oxido-reducción mientras que las otras dos enzimas lo sintetizan *di novo* a partir de aminoácidos, sugiriendo la necesidad de recurrir a otras vías de síntesis alternativas para cubrir la demanda energética (Xie *et al.*, 2020). Asimismo, la enzima *Nnmt* (“Nicotinamide N-Methyltransferase”), que reduce las reservas de NAD⁺ al realizar procesos de metilación está altamente sobreexpresada en la condición de oxaliplatino ($\text{Log2FC} = 11.2$ y $\text{FDR} < 0.05$ en la población DN). Un aumento de la actividad de *Nnmt* produce un descenso de la actividad del complejo 1 y por tanto una disfunción mitocondrial. La bajada de las reservas de NAD⁺ se ha descrito en otros trastornos como la neuropatía diabética (revisado por Fricker *et al.*, 2018; Chandrasekaran *et al.*, 2019).

Otros indicativos que sugieren un aumento del estrés oxidativo tras el tratamiento con oxaliplatino es que hemos encontrado una sobreexpresión de los niveles del citocromo b5 reductasa, el citocromo P450, las enzimas superóxido dismutasa *Sod3* y *Nox4*. Destacamos también la sobreexpresión de la enzima deshidrogenasa sarcosina (*Sardh*) en las tres poblaciones estudiadas. SARDH es una enzima mitocondrial que permite la formación de FAD(H2) a partir de sarcosina desde una vía no canónica, usado posteriormente en la cadena respiratoria como cofactor con una función similar a NAD(H). Además, su metabolismo está estrechamente relacionado con la síntesis del también antioxidante creatina, ya que sirve de precursor a partir de la actividad catalítica de la enzima *Gatm* (también conocida como AGAT), y la cual también se encuentra expresada diferencialmente en la población DN según nuestros resultados. La creatina se sintetiza en ciertas neuronas y juega un rol esencial en el metabolismo energético, ya que su forma fosforilada, el fosfato de creatina, permite almacenar energía para producir ATP de forma anaerobia (Béard and Braissant, 2010). Asimismo, la administración de creatina se ha visto que reduce la hiperalgesia mecánica en un modelo inflamatorio producido por CFA (Werdehausen *et al.*, 2015).

El desbalance energético y oxidativo genera alteraciones en el mantenimiento del potencial de membrana en las mitocondrias ($\Delta\Psi_m$) que a su vez genera una mayor permeabilización al calcio y la activación de la apoptosis por el citocromo c y las caspasas (Polyak *et al.*, 1997) (**figura 69C**). Nuestros datos indican una posible alteración de estas vías a través de la sobreexpresión de *Bbc3* (más conocido como PUMA), una proteína que regula positivamente los factores proapoptóticos pertenecientes a la familia reguladora de apoptosis BCL2 (Han *et al.*, 2001). También hemos observado una sobreexpresión de las caspasas (6, 7 en la población DN, y 12 en IB4+), junto con el gen *Casp8ap2* o FASH, asociado a la activación de la caspasa 8. Las caspasas 6, 7 y 8 intervienen en la activación apoptótica a través de la liberación del citocromo c mientras que la 12 actúa en un proceso independiente de la mitocondria y orquestado por el retículo endoplasmático (RE). En vinculación con esto último hemos observado la sobreexpresión en la condición tratada de la proteína IRE1 (codificado por el gen *Ern*), además de otros genes asociados a esta vía, como *Traf2*, *Mapk13* (una quinasa relacionada con la vía de señalización JNK), y las enzimas calpaínas, (*Capn6*, *Capn3* y *Capn9* en DN, EYFP+ e IB4+ respectivamente), encargadas de la escisión de la caspasa 12 (revisado por Lin, Walter and Yen, 2008).

Resulta interesante destacar que la actividad catalítica de las calpaínas es dependiente del Ca^{2+} intracelular (Khorchid and Ikura, 2002), ya que el oxaliplatino también puede alterar la homeostasis del calcio debido al efecto quelante del compuesto oxalato. No obstante, algunos estudios han indicado que el compuesto aumenta también los niveles de calcio a través de la vía

del inositol trifosfato (InsP3) (Schulze *et al.*, 2011). La expresión de los receptores 1, 2 y 3 de InsP3 (codificado por los genes *Itpr1*, *Itpr2* e *Itpr3*) es mayor tras el tratamiento con el oxaliplatino en las tres poblaciones estudiadas, y puede ser un indicativo de un aumento del Ca^{2+} intracelular, ya que la activación de este receptor libera el calcio de los depósitos intracelulares (Yousuf *et al.*, 2020).

La reducción del calcio intracelular por inhibidores del receptor de InsP3 o de las calpaínas alivian la alodinia mecánica y la hiperalgesia producida por de paclitaxel en ratas (Boehmerle *et al.*, 2007). El bloqueo del receptor también alivia la alodinia al frío en un modelo de neuropatía asociada a la infección vírica (Sanna *et al.*, 2015).

5.4.3. Reorganización de la matriz extracelular y reparación del daño axonal

Por último, la mayoría de los genes alterados en la población DN en la NPIO involucran a la matriz extracelular o ECM y moléculas que actúan en la reorganización de ésta, tales como las familias de metaloproteinasas MMP, ADAM y ADAMST. La ECM está compuesta por proteoglicanos, colágeno, elastina, fibronectina y lamininas que se encuentran especialmente enriquecidos tras una lesión, generando el proceso de fibrosis (Melrose, Hayes and Bix, 2021). Nuestros resultados indican que prácticamente todos los componentes de la ECM se encuentran sobreexpresados en la población DN: la laminina α , β y γ (codificado por los genes *Lama2*, *Lama4*, *Lamb2* y *Lamc3*), la fibronectina (*Flrt2*, *y *Fndc1*) y casi todos los tipos de colágeno (I, III, IV, V, VI, VIII, IX, XI, XIII, XIV XVI, XVIII, XXIV y XXVI). La función de la ECM no es meramente estructural sino que permite la supervivencia de las neuronas a través de la interacción con las integrinas o receptores de superficie que inician procesos de señalización celular, entre ellos regeneración axonal y crecimiento de neuritas. Muchos de los miembros de la familia de integrinas se encuentran sobreexpresados en las tres poblaciones tras el oxaliplatino (las subunidades $\alpha 11$ codificada por el gen *Itga11* en la población EYFP+ e IB4+, $\alpha 5$, *Itga5*, $\alpha 6$ *Itga6*, $\beta 4$ *Itgb4*, $\beta 5$ *Itgb5* en la DN y $\beta 6$ *Itgb6* en EYFP+). Asimismo, los niveles de TGF β , junto con otros factores de crecimiento como TGF α , IGF-1 (factor de insulina), EGF (factor epidérmico) y aquellos derivados de fibroblastos y plaquetas (FGF11 y PDGR respectivamente) se encuentran también sobreexpresados. Todos ellos son habituales en estados de lesión cuya función es inducir un microambiente que facilite la regeneración y remodelación axonal (revisado por Melrose, Hayes and Bix, 2021).*

El mantenimiento de la ECM depende en gran medida de las células no neuronales residentes en los ganglios sensoriales como las células accesorias gliales (SGC, del inglés “*satellite glial cells*”), las células de Schwann y la microglía. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el oxaliplatino produce alteraciones profundas en la mayoría de las células. Por ejemplo,

podemos mencionar un aumento de los niveles de expresión para marcadores específicos de las células de Schwann como *Sox10*, *Pou3f1* (conocido también como SCIP), *Mbp*, *Plp1* y *Tmem119*, *Sparc*, *Fcrls*, *Gpr34* como marcadores típicos de la microglía. También hemos visto una sobreexpresión del marcador de astrocitos *Gfap*, el cual no obstante, puede expresarse asimismo en la microglía en condiciones de estrés (Woodham *et al.*, 1989) (figura 69D).

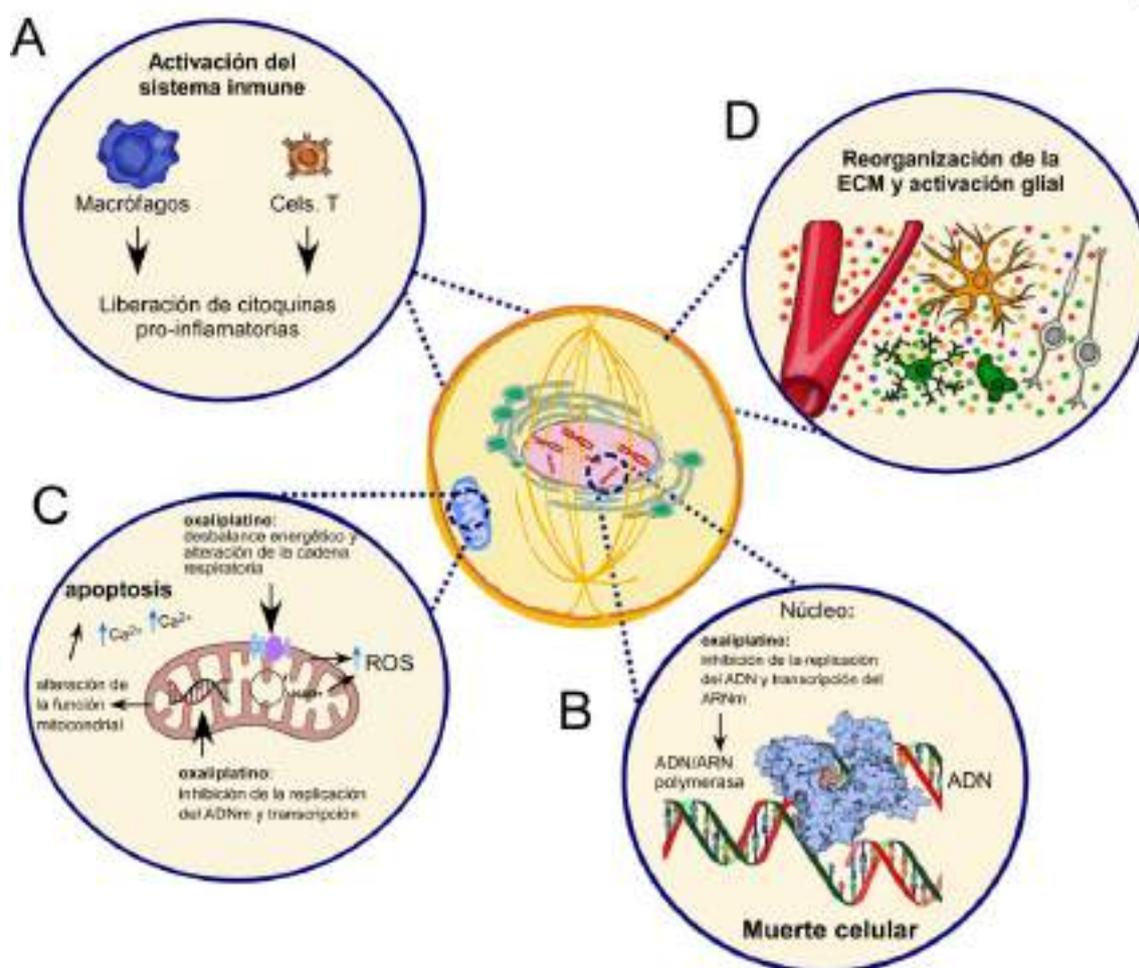


Figura 69. Procesos celulares afectados por el oxaliplatino en células de DRG. El mecanismo de acción anti-tumoral del oxaliplatino conduce a alteraciones en células periféricas que, en última instancia produce la muerte celular. Dado la evidencia y los datos obtenidos del transcriptoma de la **sección 4.4.4.** se proponen los diferentes mecanismos afectados. A) el oxaliplatino produce una activación del sistema inmunitario, en especial las células Th y los macrófagos que promueven un ambiente pro-inflamatorio. B) El oxaliplatino se une al ADN nuclear y causa errores en la replicación y transcripción que a su vez activa vías apoptóticas. C) Disfunción mitocondrial: aumenta la producción de ROS, la concentración del calcio intracelular y apoptosis. Además, el oxaliplatino puede dañar la mitocondria al intercalarse con el ADNm alterando la replicación y transcripción. D) El entorno extracelular también se ve afectado por activación/daño de la glía y otras células satélite que alteran los componentes la ECM, generando una respuesta tisular. Modificado de Roll and Faissner, 2014; Starobova and Vetter, 2017.

5.4.4. Efecto del oxaliplatino en las neuronas sensoriales

Los procesos biológicos que hemos discutido en la sección anterior destacan alteraciones que ocurren principalmente en la población DN, y muchos de ellos involucran a poblaciones celulares no neuronales. No obstante, un porcentaje considerable de los genes *DE* tras la neuropatía corresponden a aquellos que se expresan en la población neuronal. Este dato lo describen en el estudio de Starobova *et al.*, 2020, donde se observó un enriquecimiento mayor de genes específicos de tipos neuronales tras la inducción de la NPIO al comparar con otros modelos de neuropatía derivados del platino como vincristina y cisplatino (Starobova *et al.*, 2020). Al analizar las distintas subpoblaciones neuronales, observamos los genes *DE* en la neuropatía para las poblaciones IB4+ y DN son marcadores de los nociceptores Na_v1.8+/ IB4- y particularmente la población peptidérgica. Los marcadores para las poblaciones de nociceptores no peptidérgicos y C-LTMRs no se vieron alterados. Dado que estos genes no se expresaban en condiciones control en las poblaciones IB4+ y DN, los datos sugieren que, tras la inducción de la neuropatía, existe un cambio en el perfil molecular de estas neuronas. No obstante, tanto el trabajo de Starobova como el nuestro no ha permitido identificar con exactitud los cambios poblacionales ya que estos trabajos no se realizaron a resolución de célula única.

a) El oxaliplatino produce un reclutamiento de neuronas TRPM8+: ¿Posibles neuronas sensibles al frío silentes?

Uno de los resultados más llamativos y relevantes de nuestro estudio es el aumento de la expresión del gen *Trpm8* en las poblaciones IB4+ y DN tras la neuropatía. Este dato fue posteriormente validado a través de experimentos de IHQ en ratones TRPM8^{BAC}EYFP, donde observamos un aumento de los niveles de la fluorescencia EYFP sobre el total de neuronas de DRG analizadas. Dada la buena correlación que existe entre la expresión de la proteína EYFP y el canal TRPM8 en esta línea transgénica, podemos asumir que el porcentaje de neuronas *Trpm8* también se incrementa en DRG tras el tratamiento. Asimismo, otros resultados de nuestro laboratorio muestran unos resultados similares en rodajas de TG de animales TRPM8^{BAC}EYFP tratados por oxaliplatino (Gers-Barlag, 2020). Ambos resultados son coherentes con los datos de *FACS-Seq* donde los niveles de expresión para *Trpm8* para la condición tratada sólo aumentaron en las poblaciones que originariamente no lo expresaban (IB4+ y DN). Dado que también observamos cambios en otros marcadores de la población EYFP+, la sobreexpresión de *Trpm8* parece ser una consecuencia del cambio del perfil transcripcional que sufren cierto porcentaje de la población IB4+ y DN (figura 70).

Un interrogante que nos plantea estos resultados es que, si los niveles de EYFP y TRPM8 son correlativas, ¿por qué hemos podido apreciar el aumento de la expresión de *Trpm8* en el transcrito de las neuronas IB4+ y DN, sin fluorescencia para EYFP? El hecho puede justificarse por diferentes razones: **1)** es posible que el FACS no haya purificado completamente las tres poblaciones y cierta fracción de neuronas EYFP+ ha podido caer dentro de la ventana de selección de la población IB4+ y DN, tanto en la condición control y tratada. **2)** Otra explicación es que el aumento de la expresión de *Trpm8* ocurra en neuronas con una fluorescencia muy débil y que sólo son visibles en los experimentos de inmunohistoquímica, ya que la fluorescencia endógena de la proteína EYFP se encuentra amplificada por unión del anticuerpo. Esto explicaría también por qué no apreciamos este aumento de la fluorescencia en los números de eventos tras el FACS o en las imágenes de epifluorescencia tomadas previo a los experimentos de calcio. En cualquier modo, la forma de seleccionar las neuronas que se estudiaron también ha podido sesgar la proporción de neuronas positivas encontradas ya que se buscaron zonas del cristal con la presencia de las tres poblaciones a estudiar para los experimentos funcionales.

Otro de los interrogantes es por qué no hemos observado un incremento de los niveles de *Trpm8* en la población EYFP+ en la neuropatía. Sin embargo, sí que observamos un aumento en el número de neuronas IF-EYFP+ de rodajas de DRG tratadas en los experimentos de IHQ. Al haber también un reclutamiento mayor de las células de baja expresión es posible que no pueda apreciarse en la población total EYFP+, tal como hemos observado en los resultados de *FACS-Seq*. Estas neuronas podrían ser originalmente WF-EYFP+ que aumentan su fluorescencia basal (**figura 70**).

De cara a experimentos futuros sería necesario validar los resultados obtenidos por IHQ por ISH usando la sonda *Trpm8* y por qPCR para demostrar que efectivamente el incremento del número de las neuronas EYFP+ está ligada a unos niveles más altos de *Trpm8*. La sobreexpresión del gen TRPM8 tras el tratamiento ya se había demostrado por la técnica qPCR en trabajos previos (Kawashiri *et al.*, 2012; Kato *et al.*, 2014; Mizuno *et al.*, 2014). No obstante, otros estudios no han sido capaces de observar cambios en la expresión del gen (Descoeur *et al.*, 2011; K. Yamamoto *et al.*, 2015). Es posible que las discrepancias entre los trabajos se deban principalmente a que el reclutamiento de nuevas neuronas TRPM8+ son de baja expresión, aunque también hemos observado un aumento más bajo en las neuronas IF-EYFP+. Dado que las neuronas WF-EYFP+ expresan en menor medida el canal TRPM8, quizás el aumento de la expresión no sea suficiente para verlo globalmente en muestras de todo el tejido de DRG. Otra forma de validación sería realizar experimentos electrofisiológicos en neuronas EYFP+ y estudiar las corrientes del canal TRPM8 en ambas condiciones.

En los estudios de Descoeur *et al.*, y más recientemente en MacDonald *et al.*, se observó que la NPIO provoca un aumento de las respuestas al frío y, según el último trabajo, estas neuronas silentes expresan CGRP y Na_v1.8, coincidiendo con el perfil molecular de las neuronas WF-EYFP+ (MacDonald *et al.*, 2021). En ese estudio, se hipotetiza que el oxaliplatino junto con otros compuestos quimioterapéuticos, produce un efecto similar a cuando se elimina la corriente de freno de los canales K_v1, aumentando así la sensibilidad al frío en los termorreceptores. No obstante, en nuestros datos no observamos cambios en la expresión de estos canales ni de K2P tras la neuropatía. Más bien hemos encontrado el efecto opuesto con la sobreexpresión de *Kcnk2* (TREK-1) y *Kcnk4* (TRAAK) en las poblaciones IB4+ y EYFP+ de la condición tratada, *Kcnc2* (K_v3.2), *Kcnv1* (K_v2.3) en la población IB4+ y *Kcns2* (K_v9.2) en la población DN. Estos resultados contradicen los datos obtenidos por el estudio de Pereira *et al.*, 2021, donde se observa una regulación negativa de muchos miembros de los canales de potasio K2P y K_v, en especial TREK-1 y TRAAK. Algunos de nuestros resultados pueden explicarse si parte de las neuronas IB4+ y DN adoptan el perfil molecular de las neuronas WF-EYFP+ tal como hemos observado en la **sección 4.4.1** de los resultados, ya que *Kcnc2* y *Kcns2* son marcadores específicos de la población EYFP+ en condición control. Es posible que los niveles de algunos canales difieran debido a la separación celular realizada en nuestro estudio en vez de la extracción del ARN del tejido completo de DRG.

b) El aumento de la expresión de *Trpm8* tras la NPIO puede deberse a la liberación de mediadores inflamatorios y estar modulada por *GFRa3*.

Nuestro estudio apunta a que el aumento del número de neuronas TRPM8+ observado en los experimentos de IHQ podría ser la causa del reclutamiento de neuronas sensibles al frío y de la hipersensibilidad observada *in vivo*. Pero ¿qué genera el aumento de la expresión del gen en otras neuronas sensoriales?, ¿puede un aumento tan bajo de la expresión del canal ser relevante para la neuropatía? En respuesta a la primera pregunta, el estudio de Kayama *et al.*, 2017, demostró que la activación de TrkA por NGF aumenta la expresión de TRPM8 a través de la vía de señalización MAPK38, JNK y PI3K. NGF, se encuentra expresado en la población DN además de ciertos genes involucrados en las vías mencionadas en la población EYFP+ (*Mapk13*, *Map3k14*, *Traf1*, *Traf2*, *Tnfrsf19*, *Meak7* entre otros). Esto sugiere que el oxaliplatino propicia un ambiente único que puede activar la transcripción de TRPM8 a través la liberación de distintos mediadores proinflamatorios (**figura 70**). Un dato interesante es que la adición de NGF a los cultivos neuronales aumenta el número de respuestas al frío (Babes, Zorzon and Reid, 2004), y produce alodinia al frío en animales que es dependiente de TRPM8 (Lippoldt *et al.*, 2013). Asimismo, en el trabajo de Gasperini *et al.*, 2011, dónde estudiaron el papel de TRPM8 y Na_v1.8 en los conos de

crecimientos de neuronas sensoriales, se encontraron un número muy elevado de neuronas TRPM8+ (> 50 %). En la discusión lo atribuyen a una selección positiva de neuronas TrkA+ ya que las células se cultivaron en presencia de NGF.

También hay un estudio donde se ha demostrado que, tras un modelo neuropático, se produce un aumento del transporte celular de TRPM8 hacia la membrana plasmática, por lo que en condiciones patológicas no sólo aumenta la expresión de *Trpm8* sino el número de canales funcionales (Su *et al.*, 2017). Los autores del estudio también advirtieron que tras lesionar a los ratones por constricción del nervio ciático (CCI) existe un aumento de la co-expresión de TRPM8 con GFR α 3, CGRP y periferina (*Prph*), coherente con el aumento del número de neuronas WF-EYFP+ tras la neuropatía según nuestros resultados. Otro dato interesante de este estudio es que la inhibición de GFR α 3 por siRNA no solo disminuye la expresión de TRPM8 sino la co-expresión de TRPM8 con GFR α 3 (Su *et al.*, 2017).

La administración de la artemina, el ligando del receptor GFR α 3, produce además una hipersensibilidad al frío que es dependiente de TRPM8 (Lippoldt *et al.*, 2013). Unos años más tarde, el Dr. Mckemy y su equipo demostraron también que la alodinia al frío generada por NGF está ausente en los ratones deficientes para GFR α 3 (Lippoldt *et al.*, 2016). En este mismo trabajo también demostraron que la neutralización de artemina o la ablación del receptor GFR α 3 evita que los animales desarrollen la NPIO, similar al efecto observado cuando se bloquea TRPM8. Aunque el mecanismo se desconoce aún, los autores hipotetizan que la activación de GFR α 3 sensibiliza de algún modo al canal ya que recientemente demuestran que la activación indirecta de TRPA1 o TRPV1 promueve una sensibilización al frío en las neuronas TRPM8+/GFR α 3+ (Yamaki *et al.*, 2021). El mecanismo depende de la liberación de mediadores inflamatorios como CGRP y TLR4, que a su vez aumenta los niveles de artemina y activa GFR α 3 (Yamaki *et al.*, 2021). Sus hallazgos pueden tener relevancia para explicar por qué unos niveles de expresión tan bajos de TRPM8 puedan sensibilizar a estas neuronas, actuando como un amplificador de la respuesta. Asimismo, podría ser importante para justificar el incremento en el número de respuestas a frío reclutadas con el agonista mentol en neuronas WF-EYFP+ tratadas (**figura 70**). En futuros estudios debería abordarse el estudio del mecanismo de actuación de GFR α 3 sobre TRPM8 en diversos modelos patológicos y si la administración de artemina al cultivo aumenta el número de respuestas a frío y a mentol en estas neuronas.

Aunque el mecanismo que produce la sensibilización de las neuronas TRPM8+ no se conoce, la contribución del canal en la neuropatía ha quedado más que demostrada ya que el bloqueo farmacológico o la ablación genética del canal evita el desarrollo de la hipersensibilidad al frío (Gauchan *et al.*, 2009; Descoeur *et al.*, 2011; Bertamino *et al.*, 2018; Journigan *et al.*, 2020). El

efecto se observa también cuando se bloquea la transmisión eléctrica de las neuronas TRPM8+ (Ongun, Sarkisian and McKemy, 2018). Los hallazgos obtenidos en nuestro estudio aportan evidencias adicionales sobre el papel que tiene TRPM8 en los procesos patológicos y la función que las neuronas TRPM8+ peptidérgicas puedan tener en la nocicepción al frío.

c) Reprogramación molecular de las neuronas IB4+ y DN tras la inducción de la neuropatía

Los resultados obtenidos en la **sección 4.4.5** sugieren que el oxaliplatino altera la identidad molecular de las neuronas sensoriales IB4+ y DN hacia un fenotipo similar a las neuronas EYFP+. Al analizar los marcadores específicos de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN tratadas con el oxaliplatino observamos, por ejemplo, que los genes *Gal* y *Trpv1*, identificados como genes enriquecidos en la población EYFP+ control, ya no están diferencialmente expresados tras el tratamiento (no superan el criterio de $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ y $\text{FDR} < 0.05$ al compararlos con la población IB4+ y la DN, referente a la **figura 66D, sección 4.4.5** de los resultados). Asimismo, hemos encontrado que otros genes dejan de ser marcadores específicos de la población EYFP+ cuando comparamos con la población IB4+ (p.ej. *Asic3*, *Calca*, *Chrna3*, *Htr3a*, *Ntrk1* o *Zcch12*) y la DN como *Gfra3*, *Chrnb4* o *Kcnc2*. La “reprogramación” molecular parece más acentuada en la población IB4+ que en la DN, aunque es posible que esto se explique si las alteraciones sólo ocurren en una fracción neuronas DN, ya que esta población es más heterogénea.

Cabe destacar que, además, estos genes son también marcadores de la población peptidérgica, sugiriendo que los cambios involucran principalmente a la población TRPM8+ de baja expresión. Por tanto, las neuronas IB4+ e DN empiezan a presentar un perfil similar a la población WF-EYFP+. En el estudio de Chukyo *et al.*, 2018, mediante experimentos de inmunohistoquímica, observaron que el número de neuronas TRPA1+, TRPV1+ y TRPM8+ aumentan tras el oxaliplatino. Estos cambios podrían producirse por el aumento de las neuronas WF-EYFP+ que sugiere nuestros resultados (recuérdese que las neuronas WF-EYFP+ pueden expresar los tres canales TRPs mencionados). Por un lado, la expresión de TRPA1 y TRPV1 es más alta en la población DN al compararla con las neuronas EYFP+ en condiciones patológicas: en condiciones control, ya hemos observado que tanto TRPA1 como TRPV1 son marcadores de la población EYFP+ (**sección 4.2.3**). Sin embargo, al hacer esta comparación para las poblaciones tratadas, los canales dejan de estar *DE* en la población EYFP+ cuando comparamos con la DN (EYFP+ vs DN; $\text{Log}_2\text{FC} = -0.32$ (OXA) vs $\text{Log}_2\text{FC} = 1.71$ (Veh) para TRPA1, y $\text{Log}_2\text{FC} = 0.84$ (OXA) vs $\text{Log}_2\text{FC} = 2.24$ (Veh) para TRPV1, siendo el valor positivo del Log_2FC cuando se sobreexpresa en la población EYFP+). Para la población IB4+ vemos un cambio similar para TRPV1 (EYFP+ vs IB4+; $\text{Log}_2\text{FC} = 0.69$ (OXA) y $\text{Log}_2\text{FC} = 2.11$ (Veh)), pero no para TRPA1. No obstante, dado que la expresión de TRPA1 es de

por sí alta en las neuronas IB4+ es posible que no observemos los cambios tras la secuenciación en bloque y sí podríamos verlo a nivel individual. Chukyo y colaboradores, junto con Yamamoto (2015), observaron que el aumento de los niveles de proteína de los tres canales afecta, en parte, a la población IB4+ ya que aumentaba la co-expresión de TRPA1 y TRPV1 (K. Yamamoto *et al.*, 2015; Chukyo *et al.*, 2018).

Referente a la sobreexpresión de TRPA1 tras el tratamiento con oxaliplatino, no hemos observado un aumento en los niveles del calcio intracelular o en el número de respuestas ante el agonista AITC, aunque sí de las respuestas a frío y mentol en neuronas TRPA1, que posiblemente puedan estar mediadas por este canal. Otros estudios sí que han mostrado un aumento en el número de respuestas para AITC (Zhao *et al.*, 2012), o en su amplitud (Marcotti, 2020) en DRG. Las discrepancias con nuestros resultados pueden deberse a los distintos protocolos de estimulación utilizados en los experimentos de imagen calcio. Mientras que en estos trabajos utilizan AITC como primer estímulo, en nuestro estudio se aplica tras la activación por frío y mentol. Tal como hemos demostrado en la **sección 4.1.4.**, TRPA1 puede activarse también por estos agonistas, por lo que una activación repetida del canal puede influir en los resultados obtenidos con AITC.

La posible “reprogramación” celular de las neuronas IB4+ y DN observada en nuestros datos está respaldada por los últimos trabajos de *scRNA-Seq* en modelos de dolor. Los estudios coinciden en que, tras un daño axonal, las neuronas empiezan a cambiar su perfil molecular y a expresar genes relacionados con un daño celular como *Atf3*, *Sox11*, *Jun* o *Gal* (Hu *et al.*, 2016; Nguyen, Le Pichon and Ryba, 2019; Renthall *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Aunque ninguno de los trabajos mencionados se realizó con el modelo de oxaliplatino, hemos observado ciertas coincidencias con el perfil de expresión identificado en nuestro protocolo de neuropatía. De entre los genes mencionados *Gal* o galanina, es particularmente interesante ya que es un conocido marcador de las neuronas peptidérgicas y de la población EYFP+. En condiciones patológicas, su número aumenta en distintos modelos inflamatorios (Calzà *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2016) o neuropáticos (Hököfelt *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 2018). En nuestro estudio, *Gal*, se expresa en las poblaciones DN e IB4+ en la condición tratada. Además, *Gal* se encuentra *DE* en la población IB4+ al comparar la población tratada con su control ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ y $\text{FDR} < 0.05$, véase de nuevo la **figura 66E** de la **sección 4.4.5**). También hemos observado un aumento de los niveles *Atf3* en la población DN tratada. Sin embargo, la expresión de *Atf3* en neuronas en la NPIO no ha sido completamente demostrada ya que, aunque algunos autores sí describen su activación, otros no observan un aumento de la expresión en comparación con resultados obtenidos en otros modelos neuropáticos, donde su expresión está bien descrita (Makker *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2018,

2019). Asimismo, también hemos observado la sobreexpresión de otros genes relacionados con el daño celular como *Sox11* en la población EYFP+ y *Fosl2* (un miembro de la familia de factores de transcripción Fos) en la población IB4+.

Los estudios de *scRNA-Seq* mencionados en el párrafo anterior también coinciden en que, tras inducir la lesión, las neuronas afectadas dejan de expresar los marcadores específicos que las identifica molecularmente, lo que dificulta determinar su origen neuronal. En el trabajo de Wang *et al.*, identificaron tres subgrupos molecularmente distintos de neuronas lesionadas tras un modelo de lesión del nervio ciático, y denominadas en el trabajo como SNIIC1, SNIIC2 y SNIIC3 (Wang *et al.*, 2021). Los autores fueron capaces de seguir la trayectoria transcripcional de estas neuronas y descubrieron que la población SNIIC1 definía originariamente un grupo de la población C1-1, que, según la clasificación establecida por Li y colaboradores en 2016, pertenece a un subgrupo de la población peptidérgica. SNIIC2, en cambio, estaba formada por neuronas lesionadas MRGPRD+ y SNIIC3 neuronas mielínicas de gran tamaño que expresan el marcador *S100b* y *Trappc3l*. Es interesante destacar que en el caso de la población MRGPRD+ (SNIIC2) su reprogramación se producía en dos pasos; el primero ocurre a los dos días de la inducción del modelo con una mayor expresión de *Gal* y después dejan de expresar los niveles de *Mrgprd* como marcador, transformándose en neuronas SNIIC1 con mayor expresión de otros marcadores de neuronas peptidérgicas, entre los que se incluye *Gfra3*. En consonancia con estos datos, hemos observado que el gen *Mrgprd* deja de expresarse diferencialmente en la población IB4+ tratada con el oxaliplatino (no supera el criterio de $\text{Log}_2\text{FC} > 1$ y $\text{FDR} < 0.05$ al comparar con las otras dos poblaciones), y sugiere que las neuronas MRGPRD+ expresan niveles más bajos del gen (**figura 70**).

Aunque nuestros datos de *FACS-Seq* apuntan a que el oxaliplatino podría causar un cambio en el perfil molecular de las neuronas sensoriales, por limitaciones de la técnica, tenemos una visión incompleta del proceso ya que nos hemos centrado en el estudio de las neuronas TRPM8+ e IB4+. Desconocemos, por ejemplo, si las neuronas mielínicas, las cuales también presentan alteraciones tras la neuropatía, pudieran estar también alteradas (Forstenpointner *et al.*, 2018). Asimismo, los datos de "*Bulk-Seq*" no nos permiten determinar unos niveles de expresión absolutos para confirmar efectivamente la sobreexpresión de estos marcadores moleculares. Para ello sería necesario realizar la secuenciación a nivel individual y estudiar en detalle qué cambios poblacionales se producen tras la NPIO, tal como se ha descrito en otros modelos neuropáticos.

d) **Sensibilización de nociceptores no dependiente de TRPM8: Activación de GPCRs**

En el estudio de Wang *et al.*, también observan que los procesos biológicos en los que intervienen los genes alterados de las neuronas lesionadas están involucrados en la señalización por neuropéptidos y respuesta a factores de crecimiento. En consonancia con estos hallazgos, hemos observado que muchos de los procesos alterados en la población IB4+ también involucran la activación de receptores GPCRs (“*G protein-coupled receptors*”) por neuropéptidos, en especial la vía de señalización “*Neuroactive ligand-receptor interaction*”, “*mmu04080*” de la base de datos KEGG referente a la **figura 64E de la sección 4.4.4** de los resultados. Por ejemplo, los receptores de la histamina, endotelina, prostaglandina, prolactina, péptido Y, somatostatina, acetilcolina, neuromedina U y los receptores metabotrópicos de glutamato MGLuR4 y MGLuR8 se sobreexpresan diferencialmente en la población IB4+. La mayoría de estos receptores señalizan a través de las subunidades G α y G β , para activar las vías de cAMP, DAG y fosfolipasas, produciendo una hiperexcitabilidad en los nociceptores (revisado por Salzer *et al.*, 2019). Muchas de las enzimas que intervienen en estas vías están alteradas tras la neuropatía, como la fosfolipasa C ϵ , δ y η (*Plcd1*, *Plcd3*, *Plce2*, *Plch2*), PKC (*Pacs1*, *Prkch*), adenil ciclasa (*Adcy7*, *Adcy4* y *Adcy8*), además de la activación de calcio por la vía de inositol trifosfato, así como miembros de las subunidades β de las proteínas G (*Gnb3*). Por último, hemos observado que los receptores opioides MOR-1 (*Oprm1*) y DOR-1 (*Oprd1*) se encuentran regulados negativamente en las poblaciones IB4+ y DN respectivamente.

Los GPCRs pueden sensibilizar a los canales TRPs, especialmente TRPV1 y TRPA1, por un aumento del calcio intracelular y la fosforilación de la PKC y PKA. TRPA1, se expresa preferencialmente en las neuronas IB4+ y su sensibilización indirecta por estos mecanismos puede explicar el aumento de las respuestas al frío, en especial aquellas “tipo TRPA1” (neuronas vH-CS y AITC+), que no parecen depender de TRPM8. También podría explicar el aumento en el número de respuestas a mentol observadas en esta población (**figura 70**). La implicación de las neuronas IB4+ en la NPIO se ha propuesto en un estudio anterior realizado por Joseph y colaboradores en el año 2008, donde la eliminación de esta población por la administración de una neurotoxina selectiva evita el desarrollo de la sensibilidad mecánica (Joseph *et al.*, 2008). Asimismo, se ha observado que las neuronas TRPA1+ empiezan a expresar la proteína quinasa p38 tras la neuropatía (MAPK) (K. Yamamoto *et al.*, 2015). MAPK interviene en diversas vías pro-inflamatorias entre las que se encuentran la activación de GPCRs por diferentes moduladores o la activación de la vía TrkA por NGF que hemos comentado previamente.

Aunque TRPA1 se expresa de manera especial en la población IB4+, no se restringe a esta población, por lo que el aumento a los agonistas frío y mentol en la población DN podrían explicarse

también por una sensibilización de las neuronas TRPA1. No obstante, no hemos observado un aumento o tendencia en el número de respuestas típicas de TRPA1 en esta población tras la NPIO. El aumento proviene principalmente de respuestas a frío reclutadas tras el estímulo de mentol similar al perfil observado para la población WF-EYFP+. Asimismo, observamos que la temperatura umbral de estas neuronas para el primer estímulo de frío aumenta significativamente incluyendo aparición de respuestas con temperaturas >19 °C (LT-CS y HT-CS). Es posible que estas neuronas sean efectivamente WF-EYFP+, con niveles muy bajos del canal y de fluorescencia que se hayan clasificado erróneamente como EYFP-. En vista a futuros experimentos sería conveniente estudiar si el bloqueo selectivo del canal TRPM8 reduce efectivamente esta sensibilización observada.

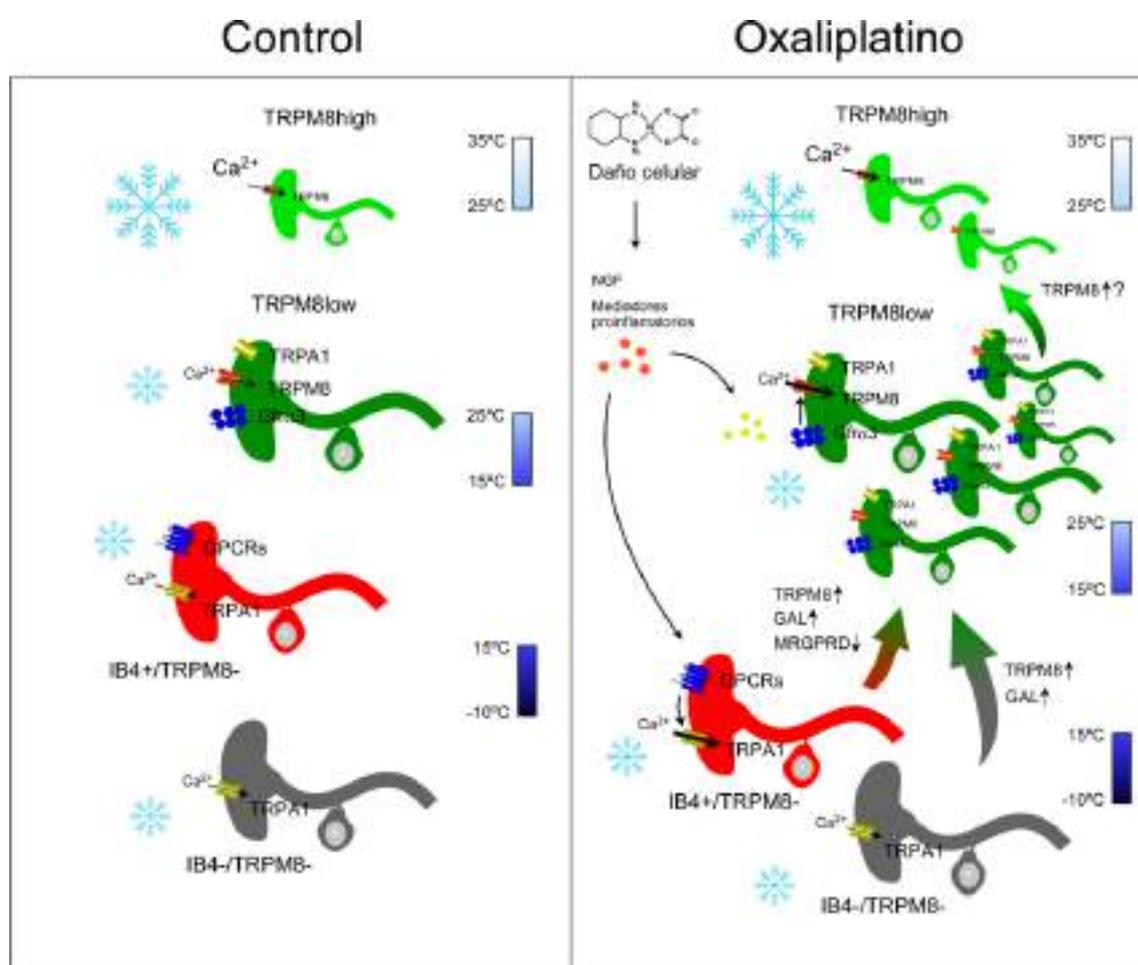


Figura 70. Propuesta esquematizada de los cambios inducidos por el oxaliplatino en neuronas sensibles al frío TRPM8+, IB4+ y DN. En condiciones control, las respuestas al frío están principalmente mediadas por TRPM8+ y proceden de neuronas TRPM8high (alta expresión de *Trpm8*; IF-EYFP+). En cambio, neuronas TRPM8low (baja expresión de *Trpm8*; WF-EYFP+), IB4+/TRPM8- y DN responden menos al estímulo. La población TRPM8high constituye principalmente la población sensible al frío de bajo umbral (LT-CS) mientras que el resto de las poblaciones tienen umbrales de activación más altos (responden a

temperaturas más bajas). De éstas, las neuronas IB4+ y DN son consideradas de muy alto umbral (vHT-CS) y están mediadas por TRPA1. El tratamiento con el oxaliplatino incrementa el número de respuestas al frío en las poblaciones TRPM8+ e IB4+/TRPA1+. El aumento de las respuestas en neuronas IB4+ puede deberse a la sensibilización de TRPA1 por la liberación de sustancias nocivas, liberadas tras el daño celular causado por la neuropatía, a través activación de receptores asociados a GPCRs. Asimismo, TRPM8 podría estar sensibilizado indirectamente por GFR α 3, tal como reflejan el mayor número de neuronas sensibles al frío reclutadas por mentol. El ambiente pro-inflamatorio también podría inducir la reprogramación genética de las poblaciones IB4+ y DN en neuronas TRPM8low con un aumento de la expresión de *Trpm8* y marcadores específicos de esta población, a su vez que pierden la naturaleza molecular de la población original (p.e. reducción de los niveles de *Mrgprd* en neuronas IB4+). El número de neuronas *Trpm8*high también se incrementaría tras la neuropatía debido a un hipotético aumento de los niveles de *Trpm8* en neuronas *Trpm8*low.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La línea transgénica TRPM8^{BAC}EYFP constituye una herramienta útil para identificar la población TRPM8 positiva. El marcaje fluorescente EYFP es específico y muestra una buena correlación con los niveles del ARNm de *Trpm8*. La caracterización del modelo reportero reveló dos poblaciones neuronales con una intensidad variable para el marcaje de YFP y diferente tamaño celular.
2. Las neuronas con alta y baja expresión para TRPM8 son funcionalmente distintas. Muestran un perfil de respuesta diferente a los agonistas de TRPM8, TRPV1 y TRPA1, y diferentes umbrales de activación para la respuesta al frío.
3. La mayoría de las respuestas al frío en DRG están mediadas a través el canal TRPM8 por neuronas de alta expresión para este gen. Existe, además, un pequeño porcentaje de neuronas sensibles al frío dependientes de TRPA1 en la que se incluye la población no peptidérgica con unión a la isolectina B4.
4. Las respuestas al frío mediadas por TRPA1 tienen umbrales de temperatura más altos y amplitudes de respuesta más bajas que las respuestas mediadas por TRPM8.
5. El transcriptoma de las neuronas TRPM8 positivas revela la expresión de marcadores específicos de las neuronas peptidérgicas en esta población. Su patrón molecular define a un subgrupo de nociceptores con expresión baja para TRPM8 presente en los ganglios DRG y TG.
6. La población TRPM8 positiva de alta expresión es también molecularmente diferente entre DRG y TG acorde con los niveles de expresión variables del ARNm de TRPM8.
7. El tratamiento sistémico con oxaliplatino induce la activación de neuronas de DRG sensibles al frío silentes a través de la sensibilización al estímulo del frío en neuronas TRPM8 y TRPA1 positivas.
8. Los resultados obtenidos por la técnica de *RNA-seq* revelaron que el compuesto oxaliplatino produce alteraciones genéticas en las poblaciones celulares de origen neuronal y no neuronal en DRG.
9. Dichos cambios en el patrón genético sugieren la aparición de una nueva subpoblación TRPM8 positiva responsable de la hipersensibilidad al frío en condiciones patológicas

CONCLUSIONS

1. TRPM8^{BAC}EYFP transgenic mice are a useful tool to characterize TRPM8 positive neurons. The expression of EYFP shows a good correlated specificity with TRPM8 mRNA expression. The characterization of this line revealed two YFP-labeled populations with different fluorescence intensities and sizes.
2. High and low expressing TRPM8 neurons are functionally distinct. They show different response profile to TRPM8, TRPV1, and TRPA1 agonists and have different activation threshold temperatures.
3. Cold responses in DRG neurons are mainly mediated via TRPM8 channels by high expressing TRPM8 population, whereas a small fraction of cold responses is mediated by TRPA1. These TRPM8-independent cold-sensitive neurons include a subset of non-peptidergic neurons labeled with IB4.
4. TRPA1-mediated cold responses have higher temperature thresholds and lower response amplitudes than TRPM8 mediated responses.
5. The transcriptome of TRPM8-positive neurons revealed molecular markers characteristic of peptidergic neurons. Their pattern of expressed genes defines a subpopulation of nociceptive low-expressing TRPM8 neurons in DRG and TG ganglia.
6. The high-expressing TRPM8 population is molecularly different between DRG and TG according to variable TRPM8 mRNA expression levels.
7. Systemic oxaliplatin treatment activates silent cold-sensitive neurons in DRG by increasing the sensitivity of TRPM8+ and IB4+/TRPA1+ neurons to cold temperatures.
8. RNA-seq revealed changes in the expression profile of genes in neuronal and non-neuronal DRG cells in neuropathic conditions caused by oxaliplatin.
9. These transcriptional changes suggest the emergence of a new TRPM8+ subpopulation responsible for cold hypersensitivity

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdo, H. et al. (2019) 'Specialized cutaneous schwann cells initiate pain sensation', *Science*, 365(6454), pp. 695–699. doi: 10.1126/science.aax6452.
- Abe, J. et al. (2005) 'TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae', *Molecular Brain Research*, 136(1–2), pp. 91–98. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.01.013.
- Abrahamsen, B. et al. (2008) 'The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain', *Science*, 321(5889), pp. 702–705. doi: 10.1126/science.1156916.
- Abraira, V. E. and Ginty, D. D. (2013) 'The sensory neurons of touch', *Neuron*. NIH Public Access, pp. 618–639. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.051.
- Adam, B. et al. (2006) 'A combination of peppermint oil and caraway oil attenuates the post-inflammatory visceral hyperalgesia in a rat model', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(2), pp. 155–160. doi: 10.1080/00365520500206442.
- Adelman, P. C. et al. (2019) 'Single-cell q-PCR derived expression profiles of identified sensory neurons', *Molecular Pain*, 15. doi: 10.1177/1744806919884496.
- Adelsberger, H. et al. (2000) 'The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na⁺ channel kinetics on rat sensory neurons', *European Journal of Pharmacology*, 406(1), pp. 25–32. doi: 10.1016/S0014-2999(00)00667-1.
- Airaksinen, M. S. et al. (1996) 'Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation', *Neuron*, 16(2), pp. 287–295. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80047-1.
- Alcalde, I. et al. (2018) 'Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice', *Journal of Comparative Neurology*, 526(11), pp. 1859–1874. doi: 10.1002/cne.24454.
- Alejandro, L. M. et al. (2013) 'Predicting acute and persistent neuropathy associated with oxaliplatin', in *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. Am J Clin Oncol, pp. 331–337. doi: 10.1097/COC.0b013e318246b50d.
- Allocati, N. et al. (2018) 'Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases', *Oncogenesis*. Nature Publishing Group, pp. 1–15. doi: 10.1038/s41389-017-0025-3.
- Alloui, A. et al. (2006) 'TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception', *EMBO Journal*, 25(11), pp. 2368–2376. doi: 10.1038/sj.emboj.7601116.
- Anand, U., Otto, W. R. and Anand, P. (2010) 'Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons', *Molecular Pain*, 6(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/1744-8069-6-82.
- Andero, R. (2015) 'Nociceptin and the nociceptin receptor in learning and memory', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. NIH Public Access, pp. 45–50. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.02.007.
- Andersson, D. A. et al. (2009) 'Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), pp. 8374–8379. doi: 10.1073/pnas.0812675106.
- Andersson, D. A., Gentry, C. and Bevan, S. (2012) 'TRPA1 Has a Key Role in the Somatic Pro-Nociceptive Actions of Hydrogen Sulfide', *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046917.
- Arber, S. et al. (2000) 'ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons', *Cell*, 101(5), pp. 485–498. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80859-4.
- Arcas, J. M. et al. (2019) 'The immunosuppressant macrolide tacrolimus activates cold-sensing TRPM8 channels', *Journal of Neuroscience*, 39(6), pp. 949–969. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1726-18.2018.

- Arcourt, A. et al. (2017) 'Touch Receptor-Derived Sensory Information Alleviates Acute Pain Signaling and Fine-Tunes Nociceptive Reflex Coordination', *Neuron*, 93(1), pp. 179–193. doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.027.
- Argyriou, A. A., Cavaletti, G., Briani, C., et al. (2013) 'Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: A prospective study in 170 patients with colorectal cancer', *Cancer*, 119(2), pp. 438–444. doi: 10.1002/cncr.27732.
- Argyriou, A. A., Cavaletti, G., Antonacopoulou, A., 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(19), pp. 3570–3577. doi: 10.1002/cncr.28234.
- Askwith, C. C. et al. (2001) 'DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), pp. 6459–6463. doi: 10.1073/pnas.111155398.
- Asuthkar, S. et al. (2015) 'The TRPM8 protein is a testosterone receptor: II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8', *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), pp. 2670–2688. doi: 10.1074/jbc.M114.610873.
- Attal, N. et al. (2010) 'EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision', *European Journal of Neurology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1113–e88. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02999.x.
- Averill, S. et al. (1995) 'Immunocytochemical Localization of trkA Receptors in Chemically Identified Subgroups of Adult Rat Sensory Neurons', *European Journal of Neuroscience*, 7(7), pp. 1484–1494. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb01143.x.
- Babes, A., Zorzon, D. and Reid, G. (2004) 'Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor', *European Journal of Neuroscience*, 20(9), pp. 2276–2282. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03695.x.
- Bai, L. et al. (2015) 'Genetic Identification of an Expansive Mechanoreceptor Sensitive to Skin Stroking', *Cell*, 163(7), pp. 1783–1795. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.060.
- Bandell, M. et al. (2004) 'Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin', *Neuron*, 41(6), pp. 849–857. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00150-3.
- Bandell, M. et al. (2006) 'High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol', *Nature Neuroscience*, 9(4), pp. 493–500. doi: 10.1038/nn1665.
- Bangash, M. A. et al. (2018) 'Distinct transcriptional responses of mouse sensory neurons in models of human chronic pain conditions [version 1; referees: 2 approved]', *Wellcome Open Research*, 3, p. 78. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14641.1.
- Bano, N., Najam, R. and Mateen, A. (2013) 'Neurological Adverse Effects in Patients of Advanced Colorectal Carcinoma Treated with Different Schedules of FOLFOX', *Chemotherapy Research and Practice*, 2013, pp. 1–7. doi: 10.1155/2013/379870.
- Barabas, M. E., Kossyryeva, E. A. and Stucky, C. L. (2012) 'TRPA1 Is Functionally Expressed Primarily by IB4-Binding, Non-Peptidergic Mouse and Rat Sensory Neurons', *PLoS ONE*, 7(10), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0047988.
- Barba, M., Czosnek, H. and Hadidi, A. (2013) 'Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology', *Viruses*, 6(1), pp. 106–136. doi: 10.3390/v6010106.
- Baron, R. (2009) 'Neuropathic pain: A clinical perspective', *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3–30. doi: 10.1007/978-3-540-79090-7_1.
- Barrire, D. A. et al. (2012) 'Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization', *Pain*, 153(3), pp. 553–561. doi: 10.1016/j.pain.2011.11.019.

- Bautista, D. M. et al. (2005) 'Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), pp. 12248–12252. doi: 10.1073/pnas.0505356102.
- Bautista, D. M. et al. (2006) 'TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents', *Cell*, 124(6), pp. 1269–1282. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023.
- Bautista, D. M. et al. (2007) 'The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold', *Nature*, 448(7150), pp. 204–208. doi: 10.1038/nature05910.
- Bautista, D. M., Pellegrino, M. and Tsunozaki, M. (2013) 'TRPA1: A gatekeeper for inflammation', *Annual Review of Physiology*. NIH Public Access, pp. 181–200. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183811.
- Béard, E. and Braissant, O. (2010) 'Synthesis and transport of creatine in the CNS: Importance for cerebral functions', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 297–313. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06935.x.
- Belmonte, C. (2012) 'Signal transduction in nociceptors: general principles', in *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford University Press, pp. 243–257. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198523345.003.0010.
- Belmonte, C. et al. (2017) 'TFOS DEWS II pain and sensation report', *Ocular Surface*. Elsevier Inc., pp. 404–437. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.002.
- Belmonte, C. and Cervero, F. (2012) *Neurobiology of Nociceptors*, *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford: Oxford University Press. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198523345.001.0001.
- Belmonte, C. and Giraldez, F. (1981) 'Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation.', *The Journal of Physiology*, 321(1), pp. 355–368. doi: 10.1113/jphysiol.1981.sp013989.
- Belmonte, C. and Viana, F. (2008) *Molecular and cellular limits to somatosensory specificity*, *Molecular Pain*. SAGE Publications. doi: 10.1186/1744-8069-4-14.
- Bennett, D. L. H. et al. (1998) 'A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury', *Journal of Neuroscience*, 18(8), pp. 3059–3072. doi: 10.1523/jneurosci.18-08-03059.1998.
- Bennett, D. L. H. et al. (2006) 'Artemin has potent neurotrophic actions on injured C-fibres', *Journal of the Peripheral Nervous System*, 11(4), pp. 330–345. doi: 10.1111/j.1529-8027.2006.00106.x.
- Bernal, L. et al. (2021) 'Odontoblast TRPC5 channels signal cold pain in teeth', *Science Advances*, 7(13), p. eabf5567. doi: 10.1126/sciadv.abf5567.
- Bertamino, A. et al. (2018) 'Identification of a Potent Tryptophan-Based TRPM8 Antagonist with in Vivo Analgesic Activity', *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(14), pp. 6140–6152. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00545.
- Bertin, S. et al. (2017) 'The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ t cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1', *Gut*, 66(9), pp. 1584–1596. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310710.
- Bessou, P. and Perl, E. R. (1969) 'Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli.', *Journal of neurophysiology*, 32(6), pp. 1025–1043. doi: 10.1152/jn.1969.32.6.1025.
- Bindea, G. et al. (2009) 'ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks', *Bioinformatics*, 25(8), pp. 1091–1093. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101.
- Bödding, M., Wissenbach, U. and Flockerzi, V. (2007) 'Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor', *Cell Calcium*, 42(6), pp. 618–628. doi: 10.1016/j.ceca.2007.03.005.
- Boehmerle, W. et al. (2007) 'Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation', *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America, 104(26), pp. 11103–11108. doi: 10.1073/pnas.0701546104.
- Boonen, B. et al. (2018) 'TRP channels as sensors of bacterial endotoxins', *Toxins*. MDPI AG. doi: 10.3390/toxins10080326.
 - Bourinet, E. et al. (2014) 'Calcium-permeable ion channels in pain signaling', *Physiological Reviews*, 94(1), pp. 81–140. doi: 10.1152/physrev.00023.2013.
 - Boyette-Davis, J. and Dougherty, P. M. (2011) 'Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline', *Experimental Neurology*, 229(2), pp. 353–357. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.02.019.
 - Brain, S. D. and Williams, T. J. (1989) 'Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin', *British Journal of Pharmacology*, 97(1), pp. 77–82. doi: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb11926.x.
 - Brauchi, S. et al. (2007) 'Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), pp. 10246–10251. doi: 10.1073/pnas.0703420104.
 - Brauchi, S., Orío, P. and Latorre, R. (2004) 'Clues to understanding cold sensation: Thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), pp. 15494–15499. doi: 10.1073/pnas.0406773101.
 - Braun, H. A., Bade, H. and Hensel, H. (1980) 'Static and dynamic discharge patterns of bursting cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 386(1), pp. 1–9. doi: 10.1007/BF00584180.
 - Breese, N. M. et al. (2005) 'Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse', *Pain*, 115(1–2), pp. 37–49. doi: 10.1016/j.pain.2005.02.010.
 - Brenner, D. S. et al. (2014) 'A dynamic set point for thermal adaptation requires phospholipase C-mediated regulation of TRPM8 in vivo', *Pain*, 155(10), pp. 2124–2133. doi: 10.1016/j.pain.2014.08.001.
 - Brierley, S. M. et al. (2011) 'TRPA1 contributes to specific mechanically activated currents and sensory neuron mechanical hypersensitivity', *Journal of Physiology*, 589(14), pp. 3575–3593. doi: 10.1113/jphysiol.2011.206789.
 - Brown, A. F. et al. (2015) 'Memory Th1 Cells Are Protective in Invasive Staphylococcus aureus Infection', *PLoS Pathogens*, 11(11). doi: 10.1371/journal.ppat.1005226.
 - von Buchholtz, L. J. et al. (2021) 'Decoding Cellular Mechanisms for Mechanosensory Discrimination', *Neuron*, 109(2), pp. 285–298.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2020.10.028.
 - Buijs, T. J. (2018) Identification of a Novel Cold Transduction Mechanism in Peripheral Neurons. King's College London.
 - Bulua, A. C. et al. (2011) 'Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS)', *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), pp. 519–533. doi: 10.1084/jem.20102049.
 - Burstein, R., Cutrer, M. F. and Yarnitsky, D. (2000) 'The development of cutaneous allodynia during a migraine attack. Clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine', *Brain*, 123(8), pp. 1703–1709. doi: 10.1093/brain/123.8.1703.
 - Cain, D. M., Khasabov, S. G. and Simone, D. A. (2001) 'Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: An in vivo study', *Journal of Neurophysiology*, 85(4), pp. 1561–1574. doi: 10.1152/jn.2001.85.4.1561.
 - Calzà, L. et al. (1997) 'Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: An immunocytochemical and in situ hybridization study', *Neuroscience*, 82(2), pp. 575–589. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00272-8.

- Cameron, A. A., Leah, J. D. and Snow, P. J. (1986) 'The electrophysiological and morphological characteristics of feline dorsal root ganglion cells', *Brain Research*, 362(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/0006-8993(86)91391-0.
- Camila Almeida, M. et al. (2012) 'Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature', *Journal of Neuroscience*, 32(6), pp. 2086–2099. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5606-11.2012.
- Camino, D. Del et al. (2010) 'TRPA1 contributes to cold hypersensitivity', *Journal of Neuroscience*, 30(45), pp. 15165–15174. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2580-10.2010.
- Campero, M. et al. (2009) 'Human cutaneous C fibres activated by cooling, heating and menthol', *Journal of Physiology*, 587(23), pp. 5633–5652. doi: 10.1113/jphysiol.2009.176040.
- Campero, M. and Bostock, H. (2010) 'Unmyelinated afferents in human skin and their responsiveness to low temperature', *Neuroscience Letters*. Elsevier, pp. 188–192. doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.089.
- Canta, A., Pozzi, E. and Carozzi, V. A. (2015) 'Mitochondrial dysfunction in chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN)', *Toxics*. MDPI AG, pp. 198–223. doi: 10.3390/toxics3020198.
- Cao, E., Cordero-Morales, J. F., et al. (2013) 'TRPV1 Channels Are Intrinsically Heat Sensitive and Negatively Regulated by Phosphoinositide Lipids', *Neuron*, 77(4), pp. 667–679. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.016.
- Cao, E., Liao, M., et al. (2013) 'TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms', *Nature*, 504(7478), pp. 113–118. doi: 10.1038/nature12823.
- Cappello, G. et al. (2007) 'Peppermint oil (Mintoil®) in the treatment of irritable bowel syndrome: A prospective double blind placebo-controlled randomized trial', *Digestive and Liver Disease*, 39(6), pp. 530–536. doi: 10.1016/j.dld.2007.02.006.
- Carvalho, L. F., Silva, A. M. F. and Carvalho, A. A. (2017) 'The use of antioxidant agents for chemotherapy-induced peripheral neuropathy treatment in animal models', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Blackwell Publishing, pp. 971–979. doi: 10.1111/1440-1681.12803.
- Caspani, O. et al. (2009) 'The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain', *PLoS ONE*. Edited by M. Louis, 4(10), p. e7383. doi: 10.1371/journal.pone.0007383.
- Castellanos, A. et al. (2020) 'TRESK background K⁺ channel deletion selectively uncovers enhanced mechanical and cold sensitivity', *Journal of Physiology*, 598(5), pp. 1017–1038. doi: 10.1113/JP279203.
- Cata, J. P. et al. (2006) 'Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy', *Minerva Anestesiologica*, 72(3), pp. 151–169.
- Caterina, M. J. et al. (1997) 'The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway', *Nature*, 389(6653), pp. 816–824. doi: 10.1038/39807.
- Cavanaugh, D. J. et al. (2009) 'Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), pp. 9075–9080. doi: 10.1073/pnas.0901507106.
- Ceresa, C. and Cavaletti, G. (2012) 'Drug Transporters in Chemotherapy Induced Peripheral Neurotoxicity: Current Knowledge and Clinical Implications', *Current Medicinal Chemistry*, 18(3), pp. 329–341. doi: 10.2174/092986711794839160.
- Cersosimo, R. J. (2005) 'Oxaliplatin-associated neuropathy: A review', *Annals of Pharmacotherapy*. Ann Pharmacother, pp. 128–135. doi: 10.1345/aph.1E319.
- Di Cesare Mannelli, L. et al. (2013) 'Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: Could it correlate with in vivo neuropathy?', *Free Radical Biology and Medicine*, 61, pp. 143–150. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.019.

- Chandrasekaran, K. et al. (2019) Role of mitochondria in diabetic peripheral neuropathy: Influencing the NAD⁺-dependent SIRT1–PGC-1 α –TFAM pathway, *International Review of Neurobiology*. doi: 10.1016/bs.irn.2019.04.002.
- Chaplan, S. R. et al. (1994) 'Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw', *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), pp. 55–63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- Chasman, D. I. et al. (2011) 'Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population', in *Nature Genetics*. NIH Public Access, pp. 695–698. doi: 10.1038/ng.856.
- Chávez, A. E., Chiu, C. Q. and Castillo, P. E. (2010) 'TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus', *Nature Neuroscience*, 13(12), pp. 1511–1519. doi: 10.1038/nn.2684.
- Cheang, W. S. et al. (2013) 'Menthol relaxes rat aortae, mesenteric and coronary arteries by inhibiting calcium influx', *European Journal of Pharmacology*, 702(1–3), pp. 79–84. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.028.
- Chen, J. et al. (2011) 'Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation', *Pain*, 152(5), pp. 1165–1172. doi: 10.1016/j.pain.2011.01.049.
- Chen, J. et al. (2013) 'Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity', *Nature Communications*, 4, p. 2501. doi: 10.1038/ncomms3501.
- Chen, S. H. et al. (2018) 'Elevated galanin receptor type 2 primarily contributes to mechanical hypersensitivity after median nerve injury', *PLoS ONE*, 13(6), p. e0199512. doi: 10.1371/journal.pone.0199512.
- Cheng, W., Sun, C. and Zheng, J. (2010) 'Heteromerization of TRP channel subunits: Extending functional diversity', *Protein and Cell*. Springer, pp. 802–810. doi: 10.1007/s13238-010-0108-9.
- Cheng, Y. R., Jiang, B. Y. and Chen, C. C. (2018) 'Acid-sensing ion channels: Dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing', *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central. doi: 10.1186/s12929-018-0448-y.
- Chisholm, K. I. et al. (2018) 'Large scale in vivo recording of sensory neuron activity with GCaMP6', *eNeuro*, 5(1). doi: 10.1523/ENEURO.0417-17.2018.
- Chiu, I. M. et al. (2014) 'Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity', *eLife*, 3, pp. 1–32. doi: 10.7554/eLife.04660.
- Chuang, H. H., Neuhausser, W. M. and Julius, D. (2004) 'The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel', *Neuron*, 43(6), pp. 859–869. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.038.
- Chukyo, A. et al. (2018) 'Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity', *Neuropeptides*, 67, pp. 95–101. doi: 10.1016/j.npep.2017.12.002.
- Cifuentes-Diaz, C. et al. (1992) 'Class II MHC antigens in normal human skeletal muscle', *Muscle & Nerve*, 15(3), pp. 295–302. doi: 10.1002/mus.880150307.
- Clapham, D. E. (2003) 'TRP channels as cellular sensors', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 517–524. doi: 10.1038/nature02196.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W. and Strübing, C. (2001) 'The TRP ion channel family', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 387–396. doi: 10.1038/35077544.
- Cobo, R. et al. (2020) 'Peripheral mechanobiology of touch—studies on vertebrate cutaneous sensory corpuscles', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, pp. 1–17. doi: 10.3390/ijms21176221.
- Cobos, E. J. et al. (2018) 'Mechanistic Differences in Neuropathic Pain Modalities Revealed by Correlating Behavior with Global Expression Profiling', *Cell Reports*, 22(5), pp. 1301–1312. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.006.

- Cohen, J. A. et al. (2019) 'Cutaneous TRPV1+ Neurons Trigger Protective Innate Type 17 Anticipatory Immunity', *Cell*, 178(4), pp. 919–932.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.022.
- Colak, S. et al. (2014) 'Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells', *Cell Death and Differentiation*, 21(7), pp. 1170–1177. doi: 10.1038/cdd.2014.37.
- Colburn, R. W. et al. (2007) 'Attenuated Cold Sensitivity in TRPM8 Null Mice', *Neuron*, 54(3), pp. 379–386. doi: 10.1016/j.neuron.2007.04.017.
- Colloca, L. et al. (2017) 'Neuropathic pain', *Nature Reviews Disease Primers*, 3, p. 17002. doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
- Correll, C. C. et al. (2004) 'Cloning and pharmacological characterization of mouse TRPV1', *Neuroscience Letters*, 370(1), pp. 55–60. doi: 10.1016/j.neulet.2004.07.058.
- Cosens, D. J. and Manning, A. (1969) 'Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant [30]', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 285–287. doi: 10.1038/224285a0.
- da Costa, D. S. M. et al. (2010) 'The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation', *Pain*, 148(3), pp. 431–437. doi: 10.1016/j.pain.2009.12.002.
- Cowie, A. M. et al. (2018) 'Optogenetic inhibition of CGRP α sensory neurons reveals their distinct roles in neuropathic and incisional pain', *Journal of Neuroscience*, 38(25), pp. 5807–5825. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3565-17.2018.
- Cristino, L. et al. (2006) 'Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain', *Neuroscience*, 139(4), pp. 1405–1415. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.074.
- Crow, M. et al. (2018) 'Characterizing the replicability of cell types defined by single cell RNA-sequencing data using MetaNeighbor', *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-018-03282-0.
- Cruz-Orengo, L. et al. (2008) 'Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1', *Molecular Pain*, 4. doi: 10.1186/1744-8069-4-30.
- Daniels, R. L., Takashima, Y. and McKemy, D. D. (2009) 'Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate', *Journal of Biological Chemistry*, 284(3), pp. 1570–1582. doi: 10.1074/jbc.M807270200.
- Darian-Smith, I., Johnson, K. O. and Dykes, R. (1973) '"Cold" fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to cooling pulses.', <https://doi.org/10.1152/jn.1973.36.2.325>, 36(2), pp. 325–346. doi: 10.1152/JN.1973.36.2.325.
- Decosterd, I. and Woolf, C. J. (2000) 'Spared nerve injury: An animal model of persistent peripheral neuropathic pain', *Pain*, 87(2), pp. 149–158. doi: 10.1016/S0304-3959(00)00276-1.
- Descoeur, J. et al. (2011) 'Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors', *EMBO Molecular Medicine*, 3(5), pp. 266–278. doi: 10.1002/emmm.201100134.
- Deuis, J. R. et al. (2013) 'An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways', *Pain*, 154(9), pp. 1749–1757. doi: 10.1016/j.pain.2013.05.032.
- Devesa, I. et al. (2011) 'Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis', *Journal of Inflammation Research*, pp. 67–81. doi: 10.2147/JIR.S12978.
- Dhaka, A. et al. (2007) 'TRPM8 is Required for Cold Sensation in Mice', *Neuron*, 54(3), pp. 371–378. doi: 10.1016/J.NEURON.2007.02.024.
- Dhaka, A. et al. (2008) 'Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections', *Journal of Neuroscience*, 28(3), pp. 566–575. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3976-07.2008.

- Dhaka, A., Viswanath, V. and Patapoutian, A. (2006) 'TRP ion channels and temperature sensation', *Annual Review of Neuroscience*, 29, pp. 135–161. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958.
- Dib-Hajj, S. D., Geha, P. and Waxman, S. G. (2017) 'Sodium channels in pain disorders: Pathophysiology and prospects for treatment', *Pain*, 158(4), pp. S97–S107. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000854.
- Ding, Y. Q., Luo, H. and Qi, J. G. (2020) MHCII-restricted T helper cells: An emerging trigger for chronic tactile allodynia after nerve injuries, *Journal of Neuroinflammation*. doi: 10.1186/s12974-019-1684-0.
- Dini, L. et al. (2018) 'Selective blockade of HCN1/HCN2 channels as a potential pharmacological strategy against pain', *Frontiers in Pharmacology*, 9(NOV). doi: 10.3389/fphar.2018.01252.
- Dirajlal, S., Pauers, L. E. and Stucky, C. L. (2003) 'Differential response properties of ib4-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin', *Journal of Neurophysiology*, 89(1), pp. 513–524. doi: 10.1152/jn.00371.2002.
- Diver, M. M., Cheng, Y. and Julius, D. (2019) 'Structural insights into TRPM8 inhibition and desensitization', *Science*, 365(6460), pp. 1434–1440. doi: 10.1126/science.aax6672.
- Dixon, W. J. (1965) 'The Up-and-Down Method for Small Samples', *Journal of the American Statistical Association*, 60(312), pp. 967–978. doi: 10.1080/01621459.1965.10480843.
- Dixon, W. J. (1980) 'Efficient analysis of experimental observations.', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 20, pp. 441–462. doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301.
- Djouhri, L. and Lawson, S. N. (2004) 'A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: A review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals', in *Brain Research Reviews*. Elsevier, pp. 131–145. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.015.
- Doerner, J. F. et al. (2007) 'Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions', *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), pp. 13180–13189. doi: 10.1074/jbc.M607849200.
- Doihara, H. et al. (2009) 'Molecular cloning and characterization of dog TRPA1 and AITC stimulate the gastrointestinal motility through TRPA1 in conscious dogs', *European Journal of Pharmacology*, 617(1–3), pp. 124–129. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.038.
- Doly, S. et al. (2004) 'The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes', *Neuroscience Letters*, 357(2), pp. 123–126. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.051.
- Dougherty, P. M. et al. (2004) 'Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients', *Pain*, 109(1–2), pp. 132–142. doi: 10.1016/j.pain.2004.01.021.
- Dragoni, I., Guida, E. and McIntyre, P. (2006) 'The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functionally important double cysteine motif', *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), pp. 37353–37360. doi: 10.1074/jbc.M607227200.
- Dubner, R., Sumino, R. and Wood, W. I. (1975) 'A peripheral "cold" fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey's face', *Journal of Neurophysiology*, 38(6), pp. 1373–1389. doi: 10.1152/jn.1975.38.6.1373.
- Dussor, G. et al. (2008) 'Cutaneous sensory neurons expressing the Mrgprd receptor sense extracellular ATP and are putative nociceptors', *Journal of Neurophysiology*, 99(4), pp. 1581–1589. doi: 10.1152/jn.01396.2007.
- Dussor, G. and Cao, Y. Q. (2016) 'TRPM8 and Migraine', *Headache*. Blackwell Publishing Inc., pp. 1406–1417. doi: 10.1111/head.12948.
- Dvoryanchikov, G. et al. (2017) 'Transcriptomes and neurotransmitter profiles of classes of gustatory and somatosensory neurons in the geniculate ganglion', *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01095-1.

- Eberhardt, M. et al. (2014) 'H2S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway', *Nature Communications*, 5(1), pp. 1–17. doi: 10.1038/ncomms5381.
- Edvinsson, L. et al. (1987) 'Calcitonin gene-related peptide and cerebral blood vessels: Distribution and vasomotor effects', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 7(6), pp. 720–728. doi: 10.1038/jcbfm.1987.126.
- Edvinsson, L. (2019) 'Role of CGRP in Migraine', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 255, pp. 121–130. doi: 10.1007/164_2018_201.
- Egashira, N. et al. (2010) 'Mexiletine reverses Oxaliplatin-Induced neuropathic pain in rats', *Journal of Pharmacological Sciences*, 112(4), pp. 473–476. doi: 10.1254/jphs.10012SC.
- Emery, E. C. et al. (2016) 'In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP', *Science Advances*, 2(11). doi: 10.1126/sciadv.1600990.
- Emery, E. C. and Ernfors, P. (2018) 'Dorsal root ganglion neuron types and their functional specialization', in *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*. Oxford University Press, pp. 129–155. doi: 10.1093/oxfordhb/9780190860509.013.4.
- Erlanger, J. and Gasser, H. S. (1924) 'the Compound Nature of the Action Current of Nerve As Disclosed By the Cathode Ray Oscillograph', *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 70(3), pp. 624–666. doi: 10.1152/ajplegacy.1924.70.3.624.
- Erlanger, J. and Gasser, H. S. (1937) *Electrical Signs of Nervous Activity*, Electrical Signs of Nervous Activity. University of Pennsylvania Press. doi: 10.9783/9781512819441.
- Fajardo, O. et al. (2008) '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(31), pp. 7863–75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1696-08.2008.
- Fang, X. et al. (2006) 'Intense Isolectin-B4 Binding in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons Distinguishes C-Fiber Nociceptors with Broad Action Potentials and High Nav1.9 Expression', *Journal of Neuroscience*, 26(27), pp. 7281–7292. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1072-06.2006.
- Farquhar-Smith, P. and Brown, M. R. D. (2016) 'Persistent pain in cancer survivors: pathogenesis and treatment options', *Pain Clinical Updates*, 24(4), pp. 1–8.
- Feketa, V. V. et al. (2020) 'Cnga3 acts as a cold sensor in hypothalamic neurons', *eLife*, 9. doi: 10.7554/eLife.55370.
- Fernández-Trillo, J. et al. (2020) 'Piezo2 mediates low-threshold mechanically evoked pain in the cornea', *Journal of Neuroscience*, 40(47), pp. 8976–8993. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0247-20.2020.
- Finnerup, N. B., Kuner, R. and Jensen, T. S. (2021) 'Neuropathic pain: From mechanisms to treatment', *Physiological Reviews*, 101(1), pp. 259–301. doi: 10.1152/physrev.00045.2019.
- Finno, C. J. et al. (2019) 'Single-Cell RNA-seq Reveals Profound Alterations in Mechanosensitive Dorsal Root Ganglion Neurons with Vitamin E Deficiency', *iScience*, 21, pp. 720–735. doi: 10.1016/j.isci.2019.10.064.
- Flegel, C. et al. (2015) 'RNA-Seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors', *PLoS ONE*, 10(6). doi: 10.1371/journal.pone.0128951.
- Fleig, A. and Penner, R. (2004) 'The TRPM ion channel subfamily: Molecular, biophysical and functional features', *Trends in Pharmacological Sciences. Trends Pharmacol Sci*, pp. 633–639. doi: 10.1016/j.tips.2004.10.004.
- Florez-Paz, D. et al. (2016) 'A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons', *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep25923.
- Forstenpointner, J. et al. (2018) 'A-Fibers Mediate Cold Hyperalgesia in Patients with Oxaliplatin-Induced Neuropathy', *Pain Practice*, 18(6), pp. 758–767. doi: 10.1111/papr.12670.

- Freeman, F. N. and Sherrington, S. (1907) *The Integrative Action of the Nervous System.*, The Journal of Philosophy, Psychology and Scientific Methods. doi: 10.2307/2010953.
- Fricker, R. A. et al. (2018) 'The Influence of Nicotinamide on Health and Disease in the Central Nervous System', *International Journal of Tryptophan Research*. SAGE PublicationsSage UK: London, England. doi: 10.1177/1178646918776658.
- Fuertes, M. et al. (2012) 'Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways', *Current Medicinal Chemistry*, 10(3), pp. 257–266. doi: 10.2174/0929867033368484.
- Fujita, S. et al. (2019a) 'Identification of drug transporters contributing to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy', *Journal of Neurochemistry*, 148(3), pp. 373–385. doi: 10.1111/jnc.14607.
- Fujita, S. et al. (2019b) 'Identification of drug transporters contributing to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy', *Journal of Neurochemistry*, 148(3), pp. 373–385. doi: 10.1111/jnc.14607.
- Gallar, J., Acosta, M. C. and Belmonte, C. (2003) 'Activation of Scleral Cold Thermoreceptors by Temperature and Blood Flow Changes', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(2), pp. 697–705. doi: 10.1167/IOVS.02-0226.
- Gandevia, S. (2008) 'Proprioception', in *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 3297–3300. doi: 10.1007/978-3-540-29678-2_4820.
- Gasperini, R. J. et al. (2011) 'TRPM8 and Nav1.8 sodium channels are required for transthyretin-induced calcium influx in growth cones of small-diameter TrkA-positive sensory neurons', *Molecular Neurodegeneration* 2011 6:1, 6(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/1750-1326-6-19.
- Gatto, G. et al. (2019) 'Neuronal diversity in the somatosensory system: bridging the gap between cell type and function', *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd, pp. 167–174. doi: 10.1016/j.conb.2019.03.002.
- Gauchan, P. et al. (2009) 'Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice', *Neuroscience Letters*, 458(2), pp. 93–95. doi: 10.1016/j.neulet.2009.04.029.
- Gaudet, R. (2008) 'A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond', *Molecular BioSystems*, 4(5), pp. 372–379. doi: 10.1039/b801481g.
- Gavva, N. R. (2008) 'Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1', *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(11), pp. 550–557. doi: 10.1016/j.tips.2008.08.003.
- Gebhardt, L. A. et al. (2020) 'TRPA1-dependent calcium transients and CGRP release in DRG neurons require extracellular calcium', *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press. doi: 10.1083/JCB.201702151.
- Gees, M. et al. (2012) 'TRP channels', *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, pp. 563–608. doi: 10.1002/cphy.c110026.
- Geisler, S. et al. (2016) 'Prevention of vincristine-induced peripheral neuropathy by genetic deletion of SARM1 in mice', *Brain*, 139(12), pp. 3092–3108. doi: 10.1093/brain/aww251.
- Geisler, S. et al. (2019) 'Gene therapy targeting SARM1 blocks pathological axon degeneration in mice', *Journal of Experimental Medicine*, 216(2), pp. 294–303. doi: 10.1084/jem.20181040.
- Gentry, C. et al. (2010) 'The Roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in Chemically Induced Cold Hypersensitivity', *Molecular Pain*, 6, pp. 1744–8069-6–4. doi: 10.1186/1744-8069-6-4.
- Georgopoulos, A. P. (1976) 'Functional properties of primary afferent units probably related to pain mechanisms in primate glabrous skin.', *Journal of neurophysiology*, 39(1), pp. 71–83. doi: 10.1152/jn.1976.39.1.71.
- Gerdtts, J. et al. (2016) 'Axon Self-Destruction: New Links among SARM1, MAPKs, and NAD⁺ Metabolism', *Neuron*. Cell Press, pp. 449–460. doi: 10.1016/j.neuron.2015.12.023.

- Gers-Barlag, K. (2020) Mechanisms of cold sensitivity in mouse vagal and trigeminal ganglion neurons: functional and molecular characterization in healthy and neuropathic conditions. Universidad Miguel Hernández.
- Gers-Barlag, K. et al. (2021) 'Differential mechanisms of cold sensitivity in mouse trigeminal and vagal ganglion neurons', *bioRxiv*, p. 2021.08.05.455314. doi: 10.1101/2021.08.05.455314.
- Ghelardini, C. et al. (2010) 'Effects of a new potent analog of tocainide on hNav1.7 sodium channels and in vivo neuropathic pain models', *Neuroscience*, 169(2), pp. 863–873. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.019.
- Ghitani, N. et al. (2017) 'Specialized Mechanosensory Nociceptors Mediating Rapid Responses to Hair Pull', *Neuron*, 95(4), pp. 944–954.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.024.
- Glimelius, B. et al. (2018) 'Persistent prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy using calmagofopir (PledOx®): a placebo-controlled randomised phase II study (PLIANT)', *Acta Oncologica*, 57(3), pp. 393–402. doi: 10.1080/0284186X.2017.1398836.
- Goldstein, M. E., House, S. B. and Gainer, H. (1991) 'NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells', *Journal of Neuroscience Research*, 30(1), pp. 92–104. doi: 10.1002/jnr.490300111.
- Gong, J. et al. (2019) 'A Cold-Sensing Receptor Encoded by a Glutamate Receptor Gene', *Cell*, 178(6), pp. 1375–1386.e11. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.034.
- González-Muñiz, R. et al. (2019) 'Recent progress in TRPM8 modulation: an update', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), p. 2618. doi: 10.3390/ijms20112618.
- González, A. et al. (2017) 'Role of the excitability brake potassium current I_{KD} in cold allodynia induced by chronic peripheral nerve injury', *The Journal of Neuroscience*, 37(12), pp. 3553–16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3553-16.2017.
- Goswami, S. C. et al. (2014) 'Molecular signatures of mouse TRPV1-lineage neurons revealed by RNA-seq transcriptome analysis', *Journal of Pain*, 15(12), pp. 1338–1359. doi: 10.1016/j.jpain.2014.09.010.
- Gould, S. A. et al. (2021) 'Protection against oxaliplatin-induced mechanical and thermal hypersensitivity in Sarm1^{-/-} mice', *Experimental Neurology*, 338, p. 113607. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113607.
- Green, E. D., Watson, J. D. and Collins, F. S. (2015) 'Human Genome Project: Twenty-five years of big biology', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 29–31. doi: 10.1038/526029a.
- Griffith, T. N., Docter, T. A. and Lumpkin, E. A. (2019) 'Tetrodotoxin-sensitive sodium channels mediate action potential firing and excitability in menthol-sensitive Vglut3-lineage sensory neurons', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(36), pp. 7086–7101. doi: 10.1523/jneurosci.2817-18.2019.
- Grimm, C. et al. (2003) 'Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3', *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), pp. 21493–21501. doi: 10.1074/jbc.M300945200.
- Gris, G. et al. (2016) 'The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep24591.
- Grolleau, F. et al. (2001) 'A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels', *Journal of Neurophysiology*, 85(5), pp. 2293–2297. doi: 10.1152/jn.2001.85.5.2293.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) 'A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties', *Journal of Biological Chemistry*, pp. 3440–3450. doi: 10.1016/s0021-9258(19)83641-4.
- Guillaumot, M. A. et al. (2019) 'Oxaliplatin-induced neuropathy: The preventive effect of a new super-oxide dismutase modulator', *Oncotarget*, 10(60), pp. 6418–6431. doi: 10.18632/oncotarget.27248.

- Guyon, A. (2014) 'CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(MAR). doi: 10.3389/FNCEL.2014.00065.
- Haghverdi, L. et al. (2018) 'Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors', *Nature Biotechnology* 2018 36:5, 36(5), pp. 421–427. doi: 10.1038/nbt.4091.
- Han, J. W. et al. (2001) 'Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), pp. 11318–11323. doi: 10.1073/PNAS.201208798.
- Han, L. et al. (2013) 'A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch', *Nature Neuroscience*, 16(2), pp. 174–182. doi: 10.1038/nn.3289.
- Han, Y. and Smith, M. T. (2013) 'Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN)', *Frontiers in Pharmacology*. doi: 10.3389/fphar.2013.00156.
- Hardaway, J. A. et al. (2019) 'Central Amygdala Prepronociceptin-Expressing Neurons Mediate Palatable Food Consumption and Reward', *Neuron*, 102(5), pp. 1037-1052.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.037.
- Harper, A. A. and Lawson, S. N. (1985) 'Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities.', *The Journal of Physiology*, 359(1), pp. 47–63. doi: 10.1113/jphysiol.1985.sp015574.
- Harrington, A. M. et al. (2011) 'A novel role for TRPM8 in visceral afferent function', *Pain*, 152(7), pp. 1459–1468. doi: 10.1016/j.pain.2011.01.027.
- Hartlehnert, M. et al. (2017) 'Schwann cells promote post-traumatic nerve inflammation and neuropathic pain through MHC class II', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-017-12744-2.
- Heather, J. M. and Chain, B. (2016) 'The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA', *Genomics*. Elsevier, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
- Heintz, N. (2001) 'Bac to the future: The use of bac transgenic mice for neuroscience research', *Nature Reviews Neuroscience*, 2(12), pp. 861–870. doi: 10.1038/35104049.
- Hellmich, U. A. and Gaudet, R. (2014) 'Structural biology of TRP channels', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 223, pp. 963–990. doi: 10.1007/978-3-319-05161-1_10.
- Hensel, H. and Iggo, A. (1971) 'Analysis of cutaneous warm and cold fibres in primates', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 329(1), pp. 1–8. doi: 10.1007/BF00586896.
- Hensel, H. and Zotterman, Y. (1951) 'The Effect of Menthol on the Thermoreceptors', *Acta Physiologica Scandinavica*, 24(1), pp. 27–34. doi: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00824.x.
- Hernández, M. et al. (2020) 'Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis', *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), pp. 150–161. doi: 10.1016/j.ram.2019.06.003.
- Hinman, A. et al. (2006) 'TRP channel activation by reversible covalent modification', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), pp. 19564–19568. doi: 10.1073/pnas.0609598103.
- Hippenmeyer, S. et al. (2005) 'A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling', *PLoS Biology*, 3(5), pp. 0878–0890. doi: 10.1371/journal.pbio.0030159.
- Hiyama, H. et al. (2018) 'TRPA1 sensitization during diabetic vascular impairment contributes to cold hypersensitivity in a mouse model of painful diabetic peripheral neuropathy', *Molecular Pain*, 14. doi: 10.1177/1744806918789812.
- Hjerling-Leffler, J. et al. (2007) 'Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), pp. 2435–43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5614-06.2007.

- Hockley, J. R. F. et al. (2019) 'Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron', *Gut*, 68(4), pp. 633–644. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315631.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F. (1952) 'The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*', *The Journal of Physiology*, 116(4), pp. 497–506. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004719.
- Hoffstaetter, L. J., Bagriantsev, S. N. and Gracheva, E. O. (2018) 'TRPs et al.: a molecular toolkit for thermosensory adaptations', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. Springer Verlag, pp. 745–759. doi: 10.1007/s00424-018-2120-5.
- Hökfelt, T. et al. (1987) 'Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy', *Neuroscience Letters*, 83(3), pp. 217–220. doi: 10.1016/0304-3940(87)90088-7.
- Honda, C. N. (1995) 'Differential distribution of calbindin-D28k and parvalbumin in somatic and visceral sensory neurons', *Neuroscience*, 68(3), pp. 883–892. doi: 10.1016/0306-4522(95)00180-Q.
- Horch, K. W., Tuckett, R. P. and Burgess, P. R. (1977) 'A key to the classification of cutaneous mechanoreceptors', *Journal of Investigative Dermatology*, 69(1), pp. 75–82. doi: 10.1111/1523-1747.ep12497887.
- Hosoya, T. et al. (2014) 'TRPM8 has a key role in experimental colitis-induced visceral hyperalgesia in mice', *Neurogastroenterology & Motility*, 26(8), pp. 1112–1121. doi: 10.1111/NMO.12368.
- Housley, S. N. et al. (2020) 'Cancer Exacerbates Chemotherapy-Induced Sensory Neuropathy', *Cancer Research*, 80(13), pp. 2940–2955. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2331.
- Hu, G. et al. (2016) 'Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons', *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep31851.
- Huang, F. et al. (2017) 'TRPM8 downregulation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells is involved in hypertension', *Molecular Medicine Reports*, 15(4), pp. 1900–1908. doi: 10.3892/mmr.2017.6158.
- Huang, J. et al. (2018) 'Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain.', *Nature neuroscience*, 21(5), pp. 707–716. doi: 10.1038/s41593-018-0119-z.
- Huo, W. et al. (2019) 'Imbalanced spinal infiltration of Th17/Treg cells contributes to bone cancer pain via promoting microglial activation', *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, pp. 139–151. doi: 10.1016/j.bbi.2019.01.024.
- Ichikawa, H. et al. (1994) 'Parvalbumin, calretinin and carbonic anhydrase in the trigeminal and spinal primary neurons of the rat', *Brain Research*, 655(1–2), pp. 241–245. doi: 10.1016/0006-8993(94)91620-9.
- Iftinca, M. et al. (2020) 'Chronic morphine regulates TRPM8 channels via MOR-PKC β signaling', *Molecular Brain* 2020 13:1, 13(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/S13041-020-00599-0.
- Iggo, A. (1969) 'Cutaneous thermoreceptors in primates and sub-primates', *The Journal of Physiology*, 200(2), pp. 403–430. doi: 10.1113/jphysiol.1969.sp008701.
- Illias, A. M. et al. (2018) 'Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the dorsal root ganglion contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity', *Pain*, 159(7), pp. 1308–1316. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001212.
- Imai, S. et al. (2017) 'Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-017-05784-1.
- Iwai, H. et al. (2021) 'Tissue-resident M2 macrophages directly contact primary sensory neurons in the sensory ganglia after nerve injury', *Journal of Neuroinflammation* 2021 18:1, 18(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/S12974-021-02283-Z.
- Jamieson, S. M. F. et al. (2005) 'Oxaliplatin causes selective atrophy of a subpopulation of dorsal root ganglion neurons without inducing cell loss', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 56(4), pp. 391–399. doi: 10.1007/s00280-004-0953-4.

- Jankowski, M. P. and Koerber, H. R. (2009) 'Neurotrophic factors and nociceptor sensitization', in *Translational Pain Research: From Mouse to Man*. CRC Press, pp. 31–50. doi: 10.1201/9781439812105-7.
- Janssens, A. and Voets, T. (2011) 'Ligand stoichiometry of the cold- and menthol-activated channel TRPM8', *Journal of Physiology*, 589(20), pp. 4827–4835. doi: 10.1113/jphysiol.2011.216523.
- Jaquemar, D., Schenker, T. and Trueb, B. (1999) 'An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts', *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), pp. 7325–7333. doi: 10.1074/jbc.274.11.7325.
- Jara-Oseguera, A., Simon, S. and Rosenbaum, T. (2010) 'TRPV1: On the Road to Pain Relief', *Current Molecular Pharmacology*, 1(3), pp. 255–269. doi: 10.2174/1874467210801030255.
- Jayasingam, S. D. et al. (2020) 'Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice', *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A., p. 1512. doi: 10.3389/fonc.2019.01512.
- Ji, G. et al. (2007) 'Plasticity in intact A δ - and C-fibers contributes to cold hypersensitivity in neuropathic rats', *Neuroscience*, 150(1), pp. 182–193. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.002.
- Johnson, C. D. et al. (2009) 'Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 296(6), p. H1868. doi: 10.1152/AJPHEART.01112.2008.
- Jones, E. Y. et al. (2006) 'MHC class II proteins and disease: a structural perspective', *Nature Reviews Immunology* 2006 6:4, 6(4), pp. 271–282. doi: 10.1038/nri1805.
- De Jong, P. R. et al. (2015) 'TRPM8 on mucosal sensory nerves regulates colitogenic responses by innate immune cells via CGRP', *Mucosal Immunology*, 8(3), pp. 491–504. doi: 10.1038/mi.2014.82.
- Jordt, S.-E. et al. (2004) 'Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1.', *Nature*, 427(6971), pp. 260–5. doi: 10.1038/nature02282.
- Joseph, E. K. et al. (2008) 'Oxaliplatin Acts on IB4-Positive Nociceptors to Induce an Oxidative Stress-Dependent Acute Painful Peripheral Neuropathy', *Journal of Pain*, 9(5), pp. 463–472. doi: 10.1016/j.jpain.2008.01.335.
- Journigan, V. B. et al. (2020) 'Structure-Based Design of Novel Biphenyl Amide Antagonists of Human Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8 Channels with Potential Implications in the Treatment of Sensory Neuropathies', *ACS Chemical Neuroscience*, 11(3), pp. 268–290. doi: 10.1021/acschemneuro.9b00404.
- Kaas, J. H. (2012) 'Chapter 30 – Somatosensory System', *The Human Nervous System*, pp. 1074–1109. doi: 10.1016/B978-0-12-374236-0.10030-6.
- Kagiava, A. et al. (2008) 'The effects of oxaliplatin, an anticancer drug, on potassium channels of the peripheral myelinated nerve fibres of the adult rat', *NeuroToxicology*, 29(6), pp. 1100–1106. doi: 10.1016/j.neuro.2008.09.005.
- Kamm, G. B. and Siemens, J. (2017) 'The TRPM2 channel in temperature detection and thermoregulation', *Temperature*, 4(1), pp. 21–23. doi: 10.1080/23328940.2016.1258445.
- Kang, D., Choe, C. and Kim, D. (2005) 'Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK', *Journal of Physiology*, 564(1), pp. 103–116. doi: 10.1113/jphysiol.2004.081059.
- Kang, K. et al. (2012) 'Modulation of TRPA1 thermal sensitivity enables sensory discrimination in *Drosophila*', *Nature*, 481(7379), pp. 76–81. doi: 10.1038/nature10715.
- Karashima, Y. et al. (2007) 'Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(37), pp. 9874–9884. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2221-07.2007.

- Karashima, Y. 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(4), pp. 1273–8. doi: 10.1073/pnas.0808487106.
- El Karim, I. et al. (2015) 'TNF- α -induced p38MAPK activation regulates TRPA1 and TRPV4 activity in odontoblast-like cells', *American Journal of Pathology*, 185(11), pp. 2994–3002. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.020.
- Kato, S. (2013) 'Role of serotonin 5-HT₃ receptors in intestinal inflammation', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(9), pp. 1406–1409. doi: 10.1248/bpb.b13-00363.
- Kato, Y. et al. (2014) 'Gosha-jinki-gan reduced oxaliplatin-induced hypersensitivity to cold sensation and its effect would be related to suppression of the expression of TRPM8 and TRPA1 in rats', *Anti-Cancer Drugs*, 25(1), pp. 39–43. doi: 10.1097/CAD.0000000000000022.
- Katsura, H. et al. (2006) 'Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats', *Experimental Neurology*, 200(1), pp. 112–123. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.01.031.
- Kawaguchi, M. et al. (2004) 'IL-17 cytokine family', *Journal of Allergy and Clinical Immunology. J Allergy Clin Immunol*, pp. 1265–1273. doi: 10.1016/j.jaci.2004.10.019.
- Kawashiri, T. et al. (2012) 'L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats', *Molecular Pain*, 8, p. 7. doi: 10.1186/1744-8069-8-7.
- Kayama, Y. et al. (2017) 'Signaling Pathways Relevant to Nerve Growth Factor-induced Upregulation of Transient Receptor Potential M8 Expression', *Neuroscience*, 367, pp. 178–188. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.10.037.
- Kelley, M. R. et al. (2014) 'Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy', *PLoS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0106485.
- Kelley, M. R. et al. (2016) 'Identification and characterization of new chemical entities targeting apurinic/aprimidinic endonuclease 1 for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 359(2), pp. 300–309. doi: 10.1124/jpet.116.235283.
- Kerstein, P. C. et al. (2009) 'Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors', *Molecular Pain*, 5, p. 19. doi: 10.1186/1744-8069-5-19.
- Khalil, M. et al. (2016) 'Transient receptor potential melastatin 8 ion channel in macrophages modulates colitis through a balance-shift in TNF-alpha and interleukin-10 production', *Mucosal Immunology*, 9(6), pp. 1500–1513. doi: 10.1038/mi.2016.16.
- Khalil, M. et al. (2018) 'Functional role of transient receptor potential channels in immune cells and epithelia', *Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.*, p. 174. doi: 10.3389/fimmu.2018.00174.
- Kheradpezhoh, E. et al. (2017) 'TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex', *Open Biology*, 7(4). doi: 10.1098/rsob.160314.
- Khorchid, A. and Ikura, M. (2002) 'How calpain is activated by calcium', *Nature Structural Biology* 2002 9:4, 9(4), pp. 239–241. doi: 10.1038/nsb0402-239.
- Kichko, T. I. et al. (2018) 'The roles of TRPV1, TRPA1 and TRPM8 channels in chemical and thermal sensitivity of the mouse oral mucosa', *European Journal of Neuroscience*, 47(3), pp. 201–210. doi: 10.1111/EJN.13799.
- Kidd, G. J., Ohno, N. and Trapp, B. D. (2013) 'Biology of Schwann cells', in *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., pp. 55–79. doi: 10.1016/B978-0-444-52902-2.00005-9.
- Kim, A. Y. et al. (2008) 'Pirt, a Phosphoinositide-Binding Protein, Functions as a Regulatory Subunit of TRPV1', *Cell*, 133(3), pp. 475–485. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.053.

- Kim, Y. H. et al. (2012) 'TRPV1 in GABAergic Interneurons Mediates Neuropathic Mechanical Allodynia and Disinhibition of the Nociceptive Circuitry in the Spinal Cord', *Neuron*, 74(4), pp. 640–647. doi: 10.1016/J.NEURON.2012.02.039.
- Kim, Y. S. et al. (2016) 'Effects of ginger and its pungent constituents on transient receptor potential channels', *International Journal of Molecular Medicine*, 38(6), pp. 1905–1914. doi: 10.3892/ijmm.2016.2791.
- Klein, A. H. et al. (2010) 'Topical application of l-menthol induces heat analgesia, mechanical allodynia, and a biphasic effect on cold sensitivity in rats', *Behavioural Brain Research*, 212(2). doi: 10.1016/j.bbr.2010.04.015.
- Kleinschnitz, C. et al. (2006) 'T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression', *Experimental Neurology*, 200(2), pp. 480–485. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.03.014.
- Knowlton, W. M. et al. (2010) 'TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo', *Pain*, 150(2), pp. 340–350. doi: 10.1016/j.pain.2010.05.021.
- Knowlton, W. M. et al. (2011) 'Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice', *PLoS ONE*, 6(9). doi: 10.1371/journal.pone.0025894.
- Knowlton, W. M. 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', *Journal of Neuroscience*, 33(7), pp. 2837–2848. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1943-12.2013.
- Knowlton, W. and McKemy, D. (2010) 'TRPM8: From Cold to Cancer, Peppermint to Pain', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(1), pp. 68–77. doi: 10.2174/138920111793937961.
- Kobayashi, K. et al. (2005) 'Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ /C-fibers and colocalization with Trk receptors', *Journal of Comparative Neurology*, 493(4), pp. 596–606. doi: 10.1002/cne.20794.
- Kolls, J. K. and Lindén, A. (2004) 'Interleukin-17 family members and inflammation', *Immunity*. *Immunity*, pp. 467–476. doi: 10.1016/j.immuni.2004.08.018.
- Koltzenburg, M., Stucky, C. L. and Lewin, G. R. (1997) 'Receptive Properties of Mouse Sensory Neurons Innervating Hairy Skin', *Journal of Neurophysiology*, 78(4), pp. 1841–1850. doi: 10.1152/jn.1997.78.4.1841.
- Krames, E. S. (2014) 'The Role of the Dorsal Root Ganglion in the Development of Neuropathic Pain', *Pain Medicine*, 15(10), pp. 1669–1685. doi: 10.1111/pme.12413.
- Kress, M. et al. (1992) 'Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro', *Journal of Neurophysiology*, 68(2), pp. 581–595. doi: 10.1152/jn.1992.68.2.581.
- Kuo, Y.-L. et al. (2017) 'K⁺ Channel Modulatory Subunits KChIP and DPP Participate in Kv4-Mediated Mechanical Pain Control', *The Journal of Neuroscience*, 37(16), p. 4391. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1619-16.2017.
- Kupari, J. et al. (2019) 'An Atlas of Vagal Sensory Neurons and Their Molecular Specialization', *Cell Reports*. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.096.
- Kupari, J. et al. (2021) 'Single cell transcriptomics of primate sensory neurons identifies cell types associated with chronic pain', *Nature Communications*, 12(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41467-021-21725-z.
- Kupari, J. and Airaksinen, M. S. (2014) 'Different Requirements for GFRa2-Signaling in Three Populations of Cutaneous Sensory Neurons', *PLoS ONE*, 9(8), p. 104764. doi: 10.1371/journal.pone.0104764.
- Kwak, J. et al. (2000) 'Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains', *Journal of Neuroscience*, 20(22), pp. 8298–8304. doi: 10.1523/jneurosci.20-22-08298.2000.

- Kwan, K. Y. et al. (2006) 'TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction.', *Neuron*, 50(2), pp. 277–89. doi: 10.1016/j.neuron.2006.03.042.
- Kwan, K. Y. et al. (2009) 'TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons', *Journal of Neuroscience*, 29(15), pp. 4808–4819. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5380-08.2009.
- Kweekel, D. M., Gelderblom, H. and Guchelaar, H. J. (2005) 'Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy', *Cancer Treatment Reviews*, 31(2), pp. 90–105. doi: 10.1016/j.ctrv.2004.12.006.
- de la Peña, E. et al. (2005) 'The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones', *Journal of Physiology*, 567(2), pp. 415–426. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086546.
- Lam, T. and Pearson, K. G. (2002) 'The Role of Proprioceptive Feedback in the Regulation and Adaptation of Locomotor Activity', in Gandevia, S. C., Proske, U., and Stuart, D. G. (eds) *Sensorimotor Control of Movement and Posture*. Boston, MA: Springer US, pp. 343–355. doi: 10.1007/978-1-4615-0713-0_40.
- Lamas, J. A., Rueda-Ruzafa, L. and Herrera-Pérez, S. (2019) 'Ion Channels and Thermosensitivity: TRP, TREK, or Both?', *International journal of molecular sciences*, 20(10). doi: 10.3390/ijms20102371.
- Lamballe, F., Klein, R. and Barbacid, M. (1991) 'trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3', *Cell*, 66(5), pp. 967–979. doi: 10.1016/0092-8674(91)90442-2.
- LaPaglia, D. M. et al. (2018) 'RNA-Seq investigations of human post-mortem trigeminal ganglia', *Cephalalgia*, 38(5), pp. 912–932. doi: 10.1177/0333102417720216.
- Lashinger, E. S. R. et al. (2008) 'AMTB, a TRPM8 channel blocker: Evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 295(3). doi: 10.1152/ajprenal.90269.2008.
- Lau, S. Y., Procko, E. and Gaudet, R. (2012) 'Distinct properties of Ca²⁺-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel', *Journal of General Physiology*, 140(5), pp. 541–555. doi: 10.1085/jgp.201210810.
- Laumet, G. et al. (2019) T Cells as an Emerging Target for Chronic Pain Therapy, *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fnmol.2019.00216.
- Lawson, J. J. et al. (2008) 'TRPV1 Unlike TRPV2 Is Restricted to a Subset of Mechanically Insensitive Cutaneous Nociceptors Responding to Heat', *Journal of Pain*, 9(4), pp. 298–308. doi: 10.1016/j.jpain.2007.12.001.
- Lawson, S. N., Crepps, B. A. and Perl, E. R. (1997) 'Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig', *Journal of Physiology*, 505(1), pp. 177–191. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.00177.x.
- Lee, M. et al. (2017) 'Glutathione alleviated peripheral neuropathy in oxaliplatin-treated mice by removing aluminum from dorsal root ganglia', *American Journal of Translational Research*, 9(3), pp. 926–939. Available at: www.ajtr.org (Accessed: 13 April 2021).
- Leffler, A. et al. (2007) 'A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles TRPV2 and is blocked by gadolinium', *European Journal of Neuroscience*, 26(1), pp. 12–22. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05643.x.
- Leijon, S. C. M. et al. (2019) 'Oral thermosensing by murine trigeminal neurons: modulation by capsaicin, menthol and mustard oil', *The Journal of Physiology*, 597(7), pp. 2045–2061. doi: 10.1113/JP277385.
- Leong, I., Skinner, J. and Love, D. (2014) 'Application of Massively Parallel Sequencing in the Clinical Diagnostic Testing of Inherited Cardiac Conditions', *Medical Sciences*, 2(2), pp. 98–126. doi: 10.3390/medsci2020098.

- Lesage, F. et al. (2000) 'Human TREK2, a 2P Domain Mechano-sensitive K⁺ Channel with Multiple Regulations by Polyunsaturated Fatty Acids, Lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq Protein-coupled Receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 275(37), pp. 28398–28405. doi: 10.1074/jbc.M002822200.
- Li, C. L. et al. (2016) 'Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity', *Cell Research*, 26(1), pp. 83–102. doi: 10.1038/cr.2015.149.
- Li, F. et al. (2019) 'TRPV1 activity and substance P release are required for corneal cold nociception', *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41467-019-13536-0.
- Li, J. et al. (2012) 'Normalization, testing, and false discovery rate estimation for RNA-sequencing data', *Biostatistics*, 13(3), pp. 523–538. doi: 10.1093/BIOSTATISTICS/KXR031.
- Li, L. et al. (2011) 'The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons', *Cell*, 147(7), pp. 1615–1627. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.027.
- Li, Y. Y. et al. (2017) 'Activation of STAT3-mediated CXCL12 up-regulation in the dorsal root ganglion contributes to oxaliplatin-induced chronic pain', *Molecular Pain*, 13. doi: 10.1177/1744806917747425.
- Liao, M. et al. (2013) 'Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy', *Nature*, 504(7478), pp. 107–112. doi: 10.1038/nature12822.
- Liao, P. et al. (2019) 'Selective Activation of TASK-3-containing K⁺ Channels Reveals Their Therapeutic Potentials in Analgesia', *bioRxiv*, p. 657387. doi: 10.1101/657387.
- Liberzon, A. et al. (2015) 'The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection', *Cell Systems*, 1(6), pp. 417–425. doi: 10.1016/j.cels.2015.12.004.
- Lin, J. H., Walter, P. and Yen, T. S. B. (2008) 'Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. NIH Public Access, pp. 399–425. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434.
- Ling, B. et al. (2007) 'Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat.', *Pain*, 128(3). doi: 10.1016/j.pain.2006.09.016.
- Ling, J. et al. (2017) 'Orofacial neuropathic pain induced by oxaliplatin: Downregulation of KCNQ2 channels in V2 trigeminal ganglion neurons and treatment by the KCNQ2 channel potentiator retigabine', *Molecular Pain*, 13. doi: 10.1177/1744806917724715.
- Linte, R. M. et al. (2007) 'Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurones by inflammatory mediators', *Experimental Brain Research*, 178(1), pp. 89–98. doi: 10.1007/s00221-006-0712-3.
- Lippoldt, E. K. et al. (2013) 'Artemin, a glial cell line-derived neurotrophic factor family member, induces TRPM8-dependent cold pain', *Journal of Neuroscience*, 33(30), pp. 12543–12552. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5765-12.2013.
- Lippoldt, E. K. et al. (2016) 'Inflammatory and neuropathic cold allodynia are selectively mediated by the neurotrophic factor receptor GFR α 3', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(16), pp. 4506–4511. doi: 10.1073/pnas.1603294113.
- Lishko, P. V et al. (2007) 'The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity.', *Neuron*, 54(6), pp. 905–918. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.027.
- Liu, B. et al. (2013) 'TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain', *Pain*, 154(10), pp. 2169–2177. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.043.
- Liu, B. et al. (2016) 'Oxidized phospholipid OxPAPC activates TRPA1 and contributes to chronic inflammatory pain in mice', *PLoS ONE*, 11(11). doi: 10.1371/journal.pone.0165200.
- Liu, M. and Wood, J. N. (2011) 'The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of neuropathic pain', *Pain Medicine*, 12(SUPPL. 3), pp. S93-9. doi: 10.1111/j.1526-4637.2011.01158.x.

- Liu, Q. et al. (2009) 'Sensory Neuron-Specific GPCR Mrgprs Are Itch Receptors Mediating Chloroquine-Induced Pruritus', *Cell*, 139(7), pp. 1353–1365. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.034.
- Liu, Q. et al. (2012) 'Mechanisms of itch evoked by β -alanine', *Journal of Neuroscience*, 32(42), pp. 14532–14537. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3509-12.2012.
- Liu, X. et al. (2018) 'HCN2 contributes to oxaliplatin-induced neuropathic pain through activation of the CaMKII/CREB cascade in spinal neurons', *Molecular Pain*, 14, p. 1744806918778490. doi: 10.1177/1744806918778490.
- Liu, Xiaojuan et al. (2019) 'Paclitaxel-activated astrocytes produce mechanical allodynia in mice by releasing tumor necrosis factor- α and stromal-derived cell factor 1', *Journal of Neuroinflammation*, 16(1). doi: 10.1186/s12974-019-1619-9.
- Liu, Xiaoling et al. (2019) 'STIM1 thermosensitivity defines the optimal preference temperature for warm sensation in mice', *Cell Research*, 29(2), pp. 95–109. doi: 10.1038/s41422-018-0129-0.
- Liu, X. R. et al. (2013) 'Down-regulation of TRPM8 in pulmonary arteries of pulmonary hypertensive rats', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(6), pp. 892–904. doi: 10.1159/000350107.
- Livni, L. et al. (2019) 'Dorsal root ganglion explants derived from chemotherapy-treated mice have reduced neurite outgrowth in culture', *Neuroscience Letters*, 694, pp. 14–19. doi: 10.1016/j.neulet.2018.11.016.
- Llorián-Salvador, M. et al. (2016) 'Involvement of CC Chemokine Receptor 1 and CCL3 in Acute and Chronic Inflammatory Pain in Mice', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(1), pp. 32–40. doi: 10.1111/bcpt.12543.
- Loeser, J. D. and Treede, R.-D. D. (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology, *Pain*. No longer published by Elsevier. doi: 10.1016/j.pain.2008.04.025.
- Löken, L. S. et al. (2021) 'Contribution of dorsal horn cgrp-expressing interneurons to mechanical sensitivity', *eLife*, 10. doi: 10.7554/ELIFE.59751.
- Lollignier, S. et al. (2015) 'The Nav1.9 Channel Is a Key Determinant of Cold Pain Sensation and Cold Allodynia', *Cell Reports*, 11(7), pp. 1067–1078. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.027.
- Lopes, D. M., Denk, F. and McMahon, S. B. (2017) 'The molecular fingerprint of dorsal root and trigeminal ganglion neurons', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, p. 304. doi: 10.3389/fnmol.2017.00304.
- López-González, M. J. et al. (2018) 'Oxaliplatin treatment impairs extension of sensory neuron neurites in vitro through miR-204 overexpression', *NeuroToxicology*, 68, pp. 91–100. doi: 10.1016/j.neuro.2018.07.009.
- Luiz, A. P. et al. (2019) 'Cold sensing by Na V 1.8-positive and Na V 1.8-negative sensory neurons', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), pp. 3811–3816. doi: 10.1073/pnas.1814545116.
- Ma, H. et al. (2020) 'The neuropeptide Y Y2 receptor is coexpressed with NPPB in primary afferent neurons and Y2 activation reduces histaminergic and IL-31-induced itch', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 372(1), pp. 73–82. doi: 10.1124/jpet.119.262584.
- Ma, L. et al. (2009) 'Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: An initiator of nerve injury-induced neuropathic pain', *Molecular Pain*, 5. doi: 10.1186/1744-8069-5-64.
- Mabuchi, T. et al. (2004) 'Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain', *Journal of Neuroscience*, 24(33), pp. 7283–7291. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0983-04.2004.
- MacDonald, D. I. et al. (2021) 'Silent cold-sensing neurons contribute to cold allodynia in neuropathic pain', *Brain*. doi: 10.1093/brain/awab086.
- MacDonald, D. I., Wood, J. N. and Emery, E. C. (2020) 'Molecular mechanisms of cold pain', *Neurobiology of Pain*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jnypai.2020.100044.

- MacDonald, J. S. (2002) 'Oxaliplatin: New opportunities for the treatment of gastrointestinal cancer', *Cancer Investigation*. *Cancer Invest*, pp. 287–289. doi: 10.1081/CNV-120001155.
- Macosko, E. Z. et al. (2015) 'Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets', *Cell*, 161(5), pp. 1202–1214. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.002.
- Macpherson, L. J. et al. (2006) 'More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 32(4), pp. 335–343. doi: 10.1016/j.mcn.2006.05.005.
- Macpherson, L. J. et al. (2007) 'Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines.', *Nature*, 445(7127), pp. 541–5. doi: 10.1038/nature05544.
- Madrid, R. et al. (2006) 'Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals', *Journal of Neuroscience*, 26(48), pp. 12512–12525. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3752-06.2006.
- Madrid, R. et al. (2009) 'Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels', *Journal of Neuroscience*, 29(10), pp. 3120–3131. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4778-08.2009.
- Maingret, F. et al. (2000) 'TREK-1 is a heat-activated background K⁺ channel', *EMBO Journal*, 19(11), pp. 2483–2491. doi: 10.1093/emboj/19.11.2483.
- Makker, P. G. S. et al. (2017) 'Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy', *PLoS ONE*, 12(1), p. e0170814. doi: 10.1371/journal.pone.0170814.
- Makker, P. G. S. et al. (2020) 'Acute changes in nerve excitability following oxaliplatin treatment in mice', *Journal of Neurophysiology*, 124(1), pp. 232–244. doi: 10.1152/jn.00260.2020.
- Makwana, K. et al. (2021) 'Sensory neurons expressing calcitonin gene-related peptide α regulate adaptive thermogenesis and diet-induced obesity', *Molecular Metabolism*, 45. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101161.
- Mälkiä, A. et al. (2007) 'Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors', *Journal of Physiology*, 581(1), pp. 155–174. doi: 10.1113/jphysiol.2006.123059.
- Mallimo, E. M. and Kusnecov, A. W. (2013) 'The role of orphanin FQ/nociceptin in neuroplasticity: Relationship to stress, anxiety and neuroinflammation', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. *Front Cell Neurosci*. doi: 10.3389/fncel.2013.00173.
- La Manno, G. et al. (2021) 'Molecular architecture of the developing mouse brain', *Nature* 2021, pp. 1–5. doi: 10.1038/s41586-021-03775-x.
- Marcotti, A. (2020) *Modulación del canal iónico trpa1 por la chaperona sigma 1: papel en la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino*. Universidad Miguel Hernández.
- Mathie, A. and Veale, E. L. (2015) 'Two-pore domain potassium channels: Potential therapeutic targets for the treatment of pain', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. Springer Verlag, pp. 931–943. doi: 10.1007/s00424-014-1655-3.
- Matos-Cruz, V. et al. (2017) 'Molecular Prerequisites for Diminished Cold Sensitivity in Ground Squirrels and Hamsters', *Cell Reports*, 21(12), pp. 3329–3337. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.083.
- Mazzone, S. B. et al. (2019) 'Transcriptional Profiling of Individual Airway Projecting Vagal Sensory Neurons', *Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s12035-019-01782-8.
- McCoy, E. S. et al. (2013) 'Peptidergic CGRP α Primary Sensory Neurons Encode Heat and Itch and Tonicly Suppress Sensitivity to Cold', *Neuron*, 78(1), pp. 138–151. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.030.
- McCoy, E. S., Taylor-Blake, B. and Zylka, M. J. (2012) 'CGRP α -expressing sensory neurons respond to stimuli that evoke sensations of pain and itch', *PLoS ONE*, 7(5), p. e36355. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036355> (Accessed: 24 May 2020).

- McCoy, E. S. and Zylka, M. J. (2014) 'Enhanced behavioral responses to cold stimuli following CGRP α sensory neuron ablation are dependent on TRPM8.', *Molecular pain*, 10, p. 69. doi: 10.1186/1744-8069-10-69.
- McIlwrath, S. L. et al. (2007) 'Overexpression of neurotrophin-3 enhances the mechanical response properties of slowly adapting type 1 afferents and myelinated nociceptors', *European Journal of Neuroscience*, 26(7), pp. 1801–1812. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05821.x.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M. and Julius, D. (2002) 'Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation', *Nature*, 416(6876), pp. 52–58. doi: 10.1038/nature719.
- McQuade, R. M. et al. (2018) 'PARP inhibition in platinum-based chemotherapy: Chemopotentiation and neuroprotection', *Pharmacological Research. Pharmacol Res*, pp. 104–113. doi: 10.1016/j.phrs.2018.09.031.
- Megat, S. et al. (2019) 'Nociceptor translational profiling reveals the regulator-rag gtpase complex as a critical generator of neuropathic pain', *Journal of Neuroscience*, 39(3), pp. 393–411. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2661-18.2018.
- Melanaphy, D. et al. (2016) 'Ion channel mechanisms of rat tail artery contraction-relaxation by menthol involving, respectively, TRPM8 activation and I-type ca²⁺ channel inhibition', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 311(6), pp. H1416–H1430. doi: 10.1152/ajpheart.00222.2015.
- Melrose, J., Hayes, A. J. and Bix, G. (2021) 'The CNS/PNS extracellular matrix provides instructive guidance cues to neural cells and neuroregulatory proteins in neural development and repair', *International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, p. 5583. doi: 10.3390/ijms22115583.
- Memon, T. et al. (2017) 'TRPA1 expression levels and excitability brake by KV channels influence cold sensitivity of TRPA1-expressing neurons', *Neuroscience*, 353, pp. 76–86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.001.
- Méndez-Reséndiz, K. A. et al. (2020) 'Steroids and TRP channels: A close relationship', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), p. 3819. doi: 10.3390/ijms21113819.
- Menendez, L. et al. (2002) 'Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice', *Journal of Neuroscience Methods*, 113(1), pp. 91–97. doi: 10.1016/S0165-0270(01)00483-6.
- Meng, J. et al. (2009) 'Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential', *Journal of Neuroscience*, 29(15), pp. 4981–4992. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5490-08.2009.
- Merskey, H. and Bogduk, N. (1994) *Classification of Chronic Pain, IASP Pain Terminology*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1834-7819.1996.tb05933.x/full> (Accessed: 27 June 2021).
- Meseguer, V. et al. (2014) 'TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins', *Nature Communications*, 5(1), p. 3125. doi: 10.1038/ncomms4125.
- Metzker, M. L. (2010) 'Sequencing technologies the next generation', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 31–46. doi: 10.1038/nrg2626.
- Michot, B., Lee, C. S. and Gibbs, J. L. (2018) 'TRPM8 and TRPA1 do not contribute to dental pulp sensitivity to cold', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-018-31487-2.
- Minett, M. S. et al. (2014) 'Pain without nociceptors? Nav1.7-independent pain mechanisms', *Cell Reports*, 6(2), pp. 301–312. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.033.
- Miyamoto, T. et al. (2009) 'TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice', *PLoS ONE*, 4(10), p. 7596. doi: 10.1371/journal.pone.0007596.

- Mizuno, K. et al. (2014) 'Goshajinkigan, a traditional Japanese medicine, prevents oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy by suppressing functional alteration of TRP channels in rat', *Journal of Pharmacological Sciences*, 125(1), pp. 91–98. doi: 10.1254/jphs.13244FP.
- Molliver, D. C. et al. (2011) 'The ADP receptor P2Y₁ is necessary for normal thermal sensitivity in cutaneous polymodal nociceptors', *Molecular Pain*, 7, p. 13. doi: 10.1186/1744-8069-7-13.
- Montell, C. and Rubin, G. M. (1989) 'Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction', *Neuron*, 2(4), pp. 1313–1323. doi: 10.1016/0896-6273(89)90069-X.
- Mootha, V. K. et al. (2003) 'PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes', *Nature Genetics* 2003 34:3, 34(3), pp. 267–273. doi: 10.1038/ng1180.
- Moparthy, L. 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(47), pp. 16901–6. doi: 10.1073/pnas.1412689111.
- Moparthy, L. et al. (2016) 'Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep28763.
- Morenilla-Palao, C. et al. (2014) 'Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation', *Cell Reports*, 8(5), pp. 1571–1582. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.003.
- Moriyama, T. et al. (2005) 'Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins', *Molecular Pain*, 1, p. 3. doi: 10.1186/1744-8069-1-3.
- Mueller-Tribbensee, S. M. et al. (2015) 'Differential Contribution of TRPA1, TRPV4 and TRPM8 to Colonic Nociception in Mice.', *PloS one*, 10(7), p. e0128242. doi: 10.1371/journal.pone.0128242.
- Mueller, O. and Schroeder, A. (2004) 'RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application', *Nano*, pp. 1–8.
- Mukerji, G. et al. (2006) 'Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations', *BMC Urology*, 6, p. 6. doi: 10.1186/1471-2490-6-6.
- Munns, C., AlQatari, M. and Koltzenburg, M. (2007) 'Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1', *Cell Calcium*, 41(4), pp. 331–342. doi: 10.1016/j.ceca.2006.07.008.
- Muraki, K. et al. (2003) 'TRPV2 Is a Component of Osmotically Sensitive Cation Channels in Murine Aortic Myocytes', *Circulation Research*, 93(9), pp. 829–838. doi: 10.1161/01.RES.0000097263.10220.0C.
- Myers, B. R., Sigal, Y. M. and Julius, D. (2009) 'Evolution of thermal response properties in a cold-activated TRP channel', *PLoS ONE*, 4(5). doi: 10.1371/journal.pone.0005741.
- Nakagawa, T. and Kaneko, S. (2017) 'Roles of transient receptor potential ankyrin 1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, pp. 947–953. doi: 10.1248/bpb.b17-00243.
- Nassenstein, C. et al. (2008) 'Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs', *Journal of Physiology*, 586(6), pp. 1595–1604. doi: 10.1113/jphysiol.2007.148379.
- Nassini, R. et al. (2011) 'Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation', *Pain*, 152(7), pp. 1621–1631. doi: 10.1016/j.pain.2011.02.051.
- Nativi, C. et al. (2013) 'A TRPA1 antagonist reverts oxaliplatin-induced neuropathic pain.', *Scientific reports*, 3, p. 2005. doi: 10.1038/srep02005.
- Nealen, M. L. et al. (2003) 'TRPM8 mRNA Is Expressed in a Subset of Cold-Responsive Trigeminal Neurons From Rat', <https://doi.org/10.1152/jn.00843.2002>, 90(1), pp. 515–520. doi: 10.1152/JN.00843.2002.

- Nguyen, M. Q. et al. (2017) 'Diversity amongst trigeminal neurons revealed by high throughput single cell sequencing', PLOS ONE. Edited by A. G. Obukhov, 12(9), p. e0185543. doi: 10.1371/journal.pone.0185543.
- Nguyen, M. Q. et al. (2021) 'Single nucleus transcriptomic analysis of human dorsal root ganglion neurons', bioRxiv, p. 2021.07.02.450845. doi: 10.1101/2021.07.02.450845.
- Nguyen, M. Q., Le Pichon, C. E. and Ryba, N. (2019) 'Stereotyped transcriptomic transformation of somatosensory neurons in response to injury', eLife, 8. doi: 10.7554/eLife.49679.
- Nickolls, A. R. et al. (2020) 'Transcriptional Programming of Human Mechanosensory Neuron Subtypes from Pluripotent Stem Cells', Cell Reports, 30(3), pp. 932-946.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.062.
- Noël, J. et al. (2009) 'The mechano-activated K[±] channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception', EMBO Journal, 28(9), pp. 1308–1318. doi: 10.1038/emboj.2009.57.
- Numazaki, M. et al. (2003) 'Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(13), pp. 8002–8006. doi: 10.1073/pnas.1337252100.
- Obata, K. et al. (2005) 'TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury', Journal of Clinical Investigation, 115(9), pp. 2393–2401. doi: 10.1172/JCI25437.
- Olson, W. et al. (2016) 'The specification and wiring of mammalian cutaneous low-threshold mechanoreceptors', Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 5(3), pp. 389–404. doi: 10.1002/wdev.229.
- Ongun, S., Sarkisian, A. and McKemy, D. D. (2018) 'Selective cold pain inhibition by targeted block of TRPM8-expressing neurons with quaternary lidocaine derivative QX-314', Communications Biology 2018 1:1, 1(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s42003-018-0062-2.
- Ordás Fernández, P. (2019) Caracterización de líneas transgénicas murinas para el canal iónico termosensible trpm8: valoración funcional, expresión extraganglionar e identificación de nuevas dianas de inervación. Universidad Miguel Hernández.
- Ordás, P. et al. (2021) 'Expression of the cold thermoreceptor TRPM8 in rodent brain thermoregulatory circuits', Journal of Comparative Neurology, 529(1), pp. 234–256. doi: 10.1002/cne.24694.
- Ordovas-Montanes, J. et al. (2015) 'The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease', Trends in Immunology. Elsevier Ltd, pp. 578–604. doi: 10.1016/j.it.2015.08.007.
- Orio, P. et al. (2009) 'Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors', Journal of Physiology, 587(9), pp. 1961–1976. doi: 10.1113/jphysiol.2008.165738.
- Orio, P. et al. (2012) 'Role of Ih in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings', Journal of Neurophysiology, 108(11), pp. 3009–3023. doi: 10.1152/jn.01033.2011.
- Orozco, O. E. et al. (2001) 'GFRalpha3 is expressed predominantly in nociceptive sensory neurons', European Journal of Neuroscience, 13(11), pp. 2177–2182. doi: 10.1046/j.0953-816X.2001.01596.x.
- Osterloh, J. M. et al. (2012) 'dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway', Science, 337(6093), pp. 481–484. doi: 10.1126/science.1223899.
- Ovchinnikov, Y. A. (1981) 'Ion Channels of Excitable Membranes', in Science and Scientists. 3rd edn. UNIVERSITY OF WASHINGTON: Sinauer, Sunderland, MA, 2001, pp. 235–241. doi: 10.1007/978-94-009-7755-6_30.
- Pan, H. et al. (2019) 'Identification of a Spinal Circuit for Mechanical and Persistent Spontaneous Itch Graphical Abstract Highlights d Spinal Ucn3 + neurons transmit both mechanical itch and persistent spontaneous itch d Spinal Ucn3 + neurons receive inputs from TLR5 + LTMRs d Spinal

- NPY + inhibitory interneurons gate Ucn3 + neurons d Sensitization of mechanical itch pathway contributes to chronic itch', *Neuron*, 103. doi: 10.1016/j.neuron.2019.06.016.
- Paricio-Montesinos, R. et al. (2020) 'The Sensory Coding of Warm Perception', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2020.02.035.
 - Parra, A. et al. (2010) 'Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea', *Nature Medicine*, 16(12), pp. 1396–1399. doi: 10.1038/nm.2264.
 - Parysek, L. M. and Goldman, R. D. (1988) 'Distribution of a novel 57 kDa intermediate filament (IF) protein in the nervous system', *Journal of Neuroscience*, 8(2), pp. 555–563. doi: 10.1523/jneurosci.08-02-00555.1988.
 - Patil, M. J., Hovhannisyan, A. H. and Akopian, A. N. (2018) 'Characteristics of sensory neuronal groups in CGRP-cre-ER reporter mice: Comparison to Nav1.8-cre, TRPV1-cre and TRPV1-GFP mouse lines', *PLOS ONE*. Edited by D. D. McKemy, 13(6), p. e0198601. doi: 10.1371/journal.pone.0198601.
 - Paulsen, C. E. et al. (2015) 'Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms.', *Nature*, 520(7548), pp. 511–7. doi: 10.1038/nature14367.
 - Paus, R. et al. (2006) 'Frontiers in pruritus research: Scratching the brain for more effective itch therapy', *Journal of Clinical Investigation*, pp. 1174–1185. doi: 10.1172/JCI28553.
 - Peier, A. M., Reeve, A. J., et al. (2002) 'A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes', *Science*, 296(5575), pp. 2046–2049. doi: 10.1126/science.1073140.
 - Peier, A. M., Moqrich, A., et al. (2002) 'A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol', *Cell*, 108(5), pp. 705–715. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00652-9.
 - Pereira, A. F. et al. (2018) 'Neurotoxic effect of oxaliplatin: Comparison with its oxalate-free analogue cis-[PtII(1R,2R-DACH)(3-acetoxy-1,1-cyclobutanedicarboxylato)] (LLC-1402) in mice', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 340, pp. 77–84. doi: 10.1016/j.taap.2018.01.001.
 - Pereira, A. F. et al. (2019) 'Metformin reduces c-Fos and ATF3 expression in the dorsal root ganglia and protects against oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice', *Neuroscience Letters*, 709, p. 134378. doi: 10.1016/J.NEULET.2019.134378.
 - Pereira, V. et al. (2014) 'Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception', *Pain*, 155(12), pp. 2534–2544. doi: 10.1016/j.pain.2014.09.013.
 - Pereira, V. et al. (2021) 'Epigenetics Involvement in Oxaliplatin-Induced Potassium Channel Transcriptional Downregulation and Hypersensitivity', *Molecular Neurobiology*, 58(7), pp. 3575–3587. doi: 10.1007/s12035-021-02361-6.
 - Pereira, V. and Goudet, C. (2019) 'Emerging trends in pain modulation by metabotropic glutamate receptors', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media SA. doi: 10.3389/fnmol.2018.00464.
 - Pertusa, M. et al. (2018) 'Critical role of the pore domain in the cold response of TRPM8 channels identified by ortholog functional comparison', *Journal of Biological Chemistry*, 293(32), pp. 12454–12471. Available at: /pmc/articles/PMC6093233/ (Accessed: 30 July 2021).
 - Pertusa, M. and Madrid, R. (2017) 'The IKD current in cold detection and pathological cold pain', *Temperature*. Informa UK Limited, pp. 346–349. doi: 10.1080/23328940.2017.1341968.
 - Petersen, M. and Wengel, J. (2003) 'LNA: A versatile tool for therapeutics and genomics', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, pp. 74–81. doi: 10.1016/S0167-7799(02)00038-0.
 - Petitpré, C. et al. (2018) 'Neuronal heterogeneity and stereotyped connectivity in the auditory afferent system', *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41467-018-06033-3.
 - Phelps, C. B. and Gaudet, R. (2007) 'The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization.', *The Journal of biological chemistry*, 282(50), pp. 36474–80. doi: 10.1074/jbc.M707205200.
 - Picelli, S. et al. (2013) 'Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells.', *Nature methods*, 10, pp. 1096–8. doi: 10.1038/nmeth.2639.

- Pierau, F. K. and Wurster, R. D. (1981) 'Primary afferent input from cutaneous thermoreceptors', *Federation Proceedings*, 40(14), pp. 2819–2824. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7308494/> (Accessed: 1 November 2021).
- Piña, R. et al. (2019) 'Role of TRPM8 Channels in Altered Cold Sensitivity of Corneal Primary Sensory Neurons Induced by Axonal Damage', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(41), pp. 8177–8192. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0654-19.2019.
- Pogorzala, L. A., Mishra, S. K. and Hoon, M. A. (2013) 'The cellular code for mammalian thermosensation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(13), pp. 5533–41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5788-12.2013.
- Polyak, K. et al. (1997) 'A model for p53-induced apoptosis', *Nature*, 389(6648), pp. 300–305. doi: 10.1038/38525.
- Pozsgai, G., Bártai, I. Z. and Pintér, E. (2019) 'Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels', *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc., pp. 628–645. doi: 10.1111/bph.14514.
- Prason, P. et al. (2015) 'Role of somatostatin and somatostatin receptor type 2 in postincisional nociception in rats', *Neuropeptides*, 49, pp. 47–54. doi: 10.1016/j.npep.2014.12.002.
- Prato, V. et al. (2017) 'Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive "Silent" Nociceptors', *Cell Reports*, 21(11). doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.066.
- Premkumar, L. S. et al. (2005) 'Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(49), pp. 11322–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3006-05.2005.
- Priestley, J. V. (2009) 'Trophic factors and their receptors in pain pathways', in *Synaptic Plasticity in Pain*. Springer New York, pp. 21–45. doi: 10.1007/978-1-4419-0226-9_2.
- Prince, P. B. et al. (2004) 'The effect of weather on headache', *Headache*, 44(6), pp. 596–602. doi: 10.1111/j.1526-4610.2004.446008.x.
- Proudfoot, C. J. et al. (2006) 'Analgesia Mediated by the TRPM8 Cold Receptor in Chronic Neuropathic Pain', *Current Biology*, 16(16), pp. 1591–1605. doi: 10.1016/j.cub.2006.07.061.
- Purves, D. et al. (2018) *Neuroscience*. Oxford University Press. Available at: https://books.google.es/books?id=R__8uwEACAAJ.
- Quallo, T. et al. (2015) 'TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice', *Nature Communications*, 6(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/ncomms8150.
- Quasthoff, S. and Hartung, H. P. (2002) 'Chemotherapy-induced peripheral neuropathy', *Journal of Neurology*. D. Steinkopff-Verlag, pp. 9–17. doi: 10.1007/PL00007853.
- Quick, K. et al. (2012) 'TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells', *Open Biology*, 2(MAY). doi: 10.1098/rsob.120068.
- Raghavendra, V., Tanga, F. and Deleo, J. A. (2003) 'Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), pp. 624–630. doi: 10.1124/jpet.103.052407.
- Ramachandran, R. et al. (2013) 'TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), pp. 7476–81. doi: 10.1073/pnas.1217431110.
- Ran, C., Hoon, M. A. and Chen, X. (2016) 'The coding of cutaneous temperature in the spinal cord', *Nature Neuroscience*, 19(9), pp. 1201–1209. doi: 10.1038/nn.4350.
- Ranade, S. S. et al. (2014) 'Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice', *Nature*, 516(729), pp. 121–125. doi: 10.1038/nature13980.
- Rau, K. K. et al. (2009) 'Mrgprd enhances excitability in specific populations of cutaneous murine polymodal nociceptors', *Journal of Neuroscience*, 29(26), pp. 8612–8619. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1057-09.2009.

- Ray, P. et al. (2018) 'Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research.', *Pain*, 159(7), pp. 1325–1345. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001217.
- Reid, G. (2005) 'ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to?', *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 451(1), pp. 250–63. doi: 10.1007/s00424-005-1437-z.
- Reid, G. and Flonta, M. L. (2001) 'Cold transduction by inhibition of a background potassium conductance in rat primary sensory neurones', *Neuroscience Letters*, 297(3), pp. 171–174. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01694-3.
- Reimúndez, A. et al. (2018) 'Deletion of the cold thermoreceptor TRPM8 increases heat loss and food intake leading to reduced body temperature and obesity in mice', *Journal of Neuroscience*, 38(15), pp. 3643–3656. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3002-17.2018.
- Reith, W. and Mach, B. (2003) 'The Bare Lymphocyte Syndrome and the Regulation of MHC Expression', <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.331>, 19, pp. 331–373. doi: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.19.1.331.
- Ren, L., Dhaka, A. and Cao, Y. Q. (2015) 'Function and postnatal changes of dural afferent fibers expressing TRPM8 channels', *Molecular Pain*, 11(1). doi: 10.1186/s12990-015-0043-0.
- Renthal, W. et al. (2020) 'Transcriptional Reprogramming of Distinct Peripheral Sensory Neuron Subtypes after Axonal Injury', *Neuron*, 108(1), pp. 128-144.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2020.07.026.
- Reynders, A. et al. (2015) 'Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs', *Cell Reports*, 10(6), pp. 1007–1019. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.022.
- Riddoch, G. (1938) 'THE CLINICAL FEATURES OF CENTRAL PAIN', *The Lancet*, 231(5985), pp. 1093–1098. doi: 10.1016/S0140-6736(00)94468-4.
- Rimola, V. et al. (2021) 'Oxaliplatin causes transient changes in trpm8 channel activity', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p. 4962. doi: 10.3390/ijms22094962.
- Rinwa, P. et al. (2021) 'Demise of nociceptive Schwann cells causes nerve retraction and pain hyperalgesia', *Pain*, 162(6), pp. 1816–1827. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002169.
- Risso, D. et al. (2014) 'Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples', *Nature Biotechnology*, 32(9), pp. 896–902. doi: 10.1038/nbt.2931.
- Ritter, K. E. and Southard-Smith, E. M. (2016) 'Dynamic Expression of Serotonin Receptor 5-HT3A in Developing Sensory Innervation of the Lower Urinary Tract', *Frontiers in Neuroscience*, 10(JAN), p. 592. doi: 10.3389/FNINS.2016.00592.
- Robinson, D. R. and Gebhart, G. F. (2008) 'Inside information: The unique features of visceral sensation', *Molecular Interventions*. NIH Public Access, pp. 242–253. doi: 10.1124/mi.8.5.9.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K. (2009) 'edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data', *Bioinformatics*, 26(1), pp. 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Rohács, T. et al. (2005) 'PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain.', *Nature neuroscience*, 8(5), pp. 626–34. doi: 10.1038/nn1451.
- Roll, L. and Faissner, A. (2014) 'Influence of the extracellular matrix on endogenous and transplanted stem cells after brain damage', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(AUG), p. 219. doi: 10.3389/FNCEL.2014.00219/BIBTEX.
- Rosas, M. et al. (2014) 'The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal', *Science*, 344(6184), pp. 645–648. doi: 10.1126/science.1251414.
- Rosenbaum, T. et al. (2004) 'Ca²⁺/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin', *Journal of General Physiology*, 123(1), pp. 53–62. doi: 10.1085/jgp.200308906.
- Rothermel, A. L. et al. (2004) 'Endothelial cells present antigens in vivo', *BMC Immunology* 2004 5:1, 5(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1471-2172-5-5.

- Roudaut, Y. et al. (2012) 'Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors.', *Channels* (Austin, Tex.), 6(4), pp. 234–245. doi: 10.4161/chan.22213.
- Rutlin, M. et al. (2014) 'The cellular and molecular basis of direction selectivity of A δ -LTMRs', *Cell*, 159(7), pp. 1640–1651. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.038.
- Saif, M. W. and Reardon, J. (2005) 'Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy.', *Therapeutics and clinical risk management*, 1(4), pp. 249–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360567> (Accessed: 11 February 2020).
- Saito, S. et al. (2012) 'Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates.', *The Journal of biological chemistry*, 287(36), pp. 30743–54. doi: 10.1074/jbc.M112.362194.
- Saito, S. et al. (2014) 'Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison.', *Molecular biology and evolution*, 31(3), pp. 708–22. doi: 10.1093/molbev/msu001.
- Sařat, K. (2020) 'Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1—current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy', *Pharmacological Reports*. Springer, pp. 486–507. doi: 10.1007/s43440-020-00109-y.
- Salzer, I. et al. (2019) 'Nociceptor signalling through ion channel regulation via GPCRs', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms20102488.
- Sand, C. A., Grant, A. D. and Nandi, M. (2015) 'Vascular Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Histochemical Society Inc., pp. 449–453. doi: 10.1369/0022155415581014.
- Sanna, M. D. et al. (2015) 'Spinal RyR2 pathway regulated by the RNA-binding protein HuD induces pain hypersensitivity in antiretroviral neuropathy', *Experimental Neurology*, 267, pp. 53–63. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.02.036.
- Sapio, M. R. et al. (2020) 'Comparative Analysis of Dorsal Root, Nodose and Sympathetic Ganglia for the Development of New Analgesics', *Frontiers in Neuroscience*, 14. doi: 10.3389/fnins.2020.615362.
- Saria, A. (1984) 'Substance P in sensory nerve fibres contributes to the development of oedema in the rat hind paw after thermal injury', *British Journal of Pharmacology*, 82(1), pp. 217–222. doi: 10.1111/j.1476-5381.1984.tb16461.x.
- Sarria, I. et al. (2011) 'TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP2: distinction from tachyphylaxis', *Journal of Neurophysiology*, 106(6), p. 3056. doi: 10.1152/JN.00544.2011.
- Sarria, I. et al. (2012) 'Sensory Discrimination between Innocuous and Noxious Cold by TRPM8-Expressing DRG Neurons of Rats', *Molecular Pain*, 8, pp. 1744-8069-8–79. doi: 10.1186/1744-8069-8-79.
- Sawada, Y. et al. (2007) 'Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels.', *Brain research*, 1160(1), pp. 39–46. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.047.
- Saxena, A. et al. (2012) 'Trehalose-enhanced isolation of neuronal sub-types from adult mouse brain', *BioTechniques*, 52(6), pp. 381–385. doi: 10.2144/0000113878.
- Schadt, E. E., Turner, S. and Kasarskis, A. (2010) 'A window into third-generation sequencing', *Human Molecular Genetics*, 19(R2). doi: 10.1093/hmg/ddq416.
- Schaible, H. G. and Schmidt, R. F. (1985) 'Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units', *Journal of Neurophysiology*, 54(5), pp. 1109–1122. doi: 10.1152/jn.1985.54.5.1109.
- Schepers, R. J. and Ringkamp, M. (2010) 'Thermoreceptors and thermosensitive afferents', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, pp. 177–184. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.10.003.

- Schmidt, M. et al. (2009) 'Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane', *Neuron*, 64(4), pp. 498–509. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.030.
- Schmidt, R. et al. (1995) 'Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin', *Journal of Neuroscience*, 15(11), pp. 333–341. doi: 10.1523/jneurosci.15-01-00333.1995.
- Schmidt, R. F. (2006) 'Silent Nociceptor', in Schmidt, R. F. and Willis, W. D. (eds) *Encyclopedia of Pain*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 2171–2173. doi: 10.1007/978-3-540-29805-2_4001.
- Schulze, C. et al. (2011) 'Prolonged oxaliplatin exposure alters intracellular calcium signaling: A new mechanism to explain oxaliplatin-associated peripheral neuropathy', *Clinical Colorectal Cancer*, 10(2), pp. 126–133. doi: 10.1016/j.clcc.2011.03.010.
- Schweizerhof, M. et al. (2009) 'Hematopoietic colony-stimulating factors mediate tumor-nerve interactions and bone cancer pain', *Nature Medicine* 2009 15:7, 15(7), pp. 802–807. doi: 10.1038/nm.1976.
- Señaris, R. et al. (2018) 'Mammalian cold TRP channels: impact on thermoregulation and energy homeostasis', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. Pflugers Arch, pp. 761–777. doi: 10.1007/s00424-018-2145-9.
- Sereno, M. et al. (2017) 'Genetic polymorphisms of SCN9A are associated with oxaliplatin-induced neuropathy', *BMC Cancer*, 17(1). doi: 10.1186/s12885-016-3031-5.
- Shannon, P. et al. (2003) 'Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks', *Genome Research*, 13(11), pp. 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303.
- Shapovalov, G. et al. (2013) 'Opiates modulate thermosensation by internalizing cold receptor TRPM8', *Cell Reports*, 4(3), pp. 504–515. doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.002.
- Sharma, N. et al. (2020) 'The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons', *Nature*, 577(7790), pp. 392–398. doi: 10.1038/s41586-019-1900-1.
- Sherrington, C. S. (1903) 'Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus', *The Journal of Physiology*, 30(1), pp. 39–46. doi: 10.1113/jphysiol.1903.sp000980.
- Shibasaki, K., Tominaga, M. and Ishizaki, Y. (2015) 'Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4.', *Biochemical and biophysical research communications*, 458(1), pp. 168–73. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.087.
- Shields, S. D. et al. (2012) 'Na v1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system', *Pain*, 153(10), pp. 2017–2030. doi: 10.1016/j.pain.2012.04.022.
- Shim, W. S. et al. (2007) 'TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase', *Journal of Neuroscience*, 27(9), pp. 2331–2337. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4643-06.2007.
- Shin, J. et al. (2002) 'Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), pp. 10150–10155. doi: 10.1073/pnas.152002699.
- Silva, C. E. A., Guimarães, R. M. and Cunha, T. M. (2021) 'Sensory neuron-associated macrophages as novel modulators of neuropathic pain', *Pain Reports*, 6(1), p. e873. doi: 10.1097/PR9.0000000000000873.
- Simone, D. A. and Kajander, K. C. (1997) 'Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold', *Journal of Neurophysiology*, 77(4), pp. 2049–2060. doi: 10.1152/jn.1997.77.4.2049.
- Sinica, V. et al. (2019) 'Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage', *Cells*, 9(1). doi: 10.3390/cells9010057.
- Sittl, R. et al. (2010) 'Enhancement of axonal potassium conductance reduces nerve hyperexcitability in an in vitro model of oxaliplatin-induced acute neuropathy', *NeuroToxicology*, 31(6), pp. 694–700. doi: 10.1016/j.neuro.2010.07.006.

- Sittl, R. et al. (2012) 'Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na V1.6-resurgent and persistent current', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), pp. 6704–6709. doi: 10.1073/pnas.1118058109.
- Skofitsch, G. and Jacobowitz, D. M. (1985a) 'Calcitonin gene-related peptide coexists with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat', *Peptides*, 6(4), pp. 747–754. doi: 10.1016/0196-9781(85)90179-2.
- Skofitsch, G. and Jacobowitz, D. M. (1985b) 'Galanin-like immunoreactivity in capsaicin sensitive sensory neurons and ganglia', *Brain Research Bulletin*, 15(2), pp. 191–195. doi: 10.1016/0361-9230(85)90135-2.
- Slyskova, J. et al. (2018) 'Base and nucleotide excision repair facilitate resolution of platinum drugs-induced transcription blockage', *Nucleic Acids Research*, 46(18), pp. 9537–9549. doi: 10.1093/nar/gky764.
- Smart.servier.com (2021) Flask - Servier Medical Art. Available at: https://smart.servier.com/smart_image/flask-2/ (Accessed: 30 June 2021).
- Smith, P. A. (2020) 'K⁺ Channels in Primary Afferents and Their Role in Nerve Injury-Induced Pain', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0, p. 294. doi: 10.3389/FNCEL.2020.566418.
- Sneddon, L. U. (2002) 'Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*', *Neuroscience Letters*, 319(3), pp. 167–171. doi: 10.1016/S0304-3940(01)02584-8.
- Solinski, H. J. et al. (2019) 'Nppb Neurons Are Sensors of Mast Cell-Induced Itch', *Cell Reports*, 26(13), pp. 3561–3573.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.089.
- Soppet, D. et al. (1991) 'The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor', *Cell*, 65(5), pp. 895–903. doi: 10.1016/0092-8674(91)90396-G.
- Sprowl, J. A. 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(27), pp. 11199–11204. doi: 10.1073/pnas.1305321110.
- Stankiewicz, A. M. et al. (2014) 'Social stress increases expression of hemoglobin genes in mouse prefrontal cortex', *BMC Neuroscience*, 15(1). doi: 10.1186/s12868-014-0130-6.
- Stankiewicz, A. M. et al. (2015) 'The effect of acute and chronic social stress on the hippocampal transcriptome in Mice', *PLoS ONE*, 10(11), p. e0142195. doi: 10.1371/journal.pone.0142195.
- Stantcheva, K. K. et al. (2016) 'A subpopulation of itch-sensing neurons marked by Ret and somatostatin expression.', *EMBO reports*, 17(4), pp. 585–600. doi: 10.15252/embr.201540983.
- Starobova, H. et al. (2018) 'Transcriptomics in pain research: insights from new and old technologies', *Molecular Omics*, 14(6), pp. 389–404. doi: 10.1039/c8mo00181b.
- Starobova, H. et al. (2020) 'Inflammatory and Neuropathic Gene Expression Signatures of Chemotherapy-Induced Neuropathy Induced by Vincristine, Cisplatin, and Oxaliplatin in C57BL/6J Mice', *Journal of Pain*, 21(1–2), pp. 182–194. doi: 10.1016/j.jpain.2019.06.008.
- Starobova, H. and Vetter, I. (2017) 'Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fnmol.2017.00174.
- Stewart, A. P. et al. (2010) 'AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPM8 channel', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(2), pp. 383–386. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.027.
- Stojanovska, V. et al. (2019) 'Oxaliplatin Treatment Alters Systemic Immune Responses', *BioMed Research International*, 2019. doi: 10.1155/2019/4650695.
- Story, G. M. et al. (2003) 'ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures.', *Cell*, 112(6), pp. 819–29. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00158-2.

- Stuart, T. et al. (2019) 'Comprehensive Integration of Single-Cell Data', *Cell*, 177(7), pp. 1888-1902.e21. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.031.
- Stucky, C. L. (2006) 'IB4-Positive Neurons, Role in Inflammatory Pain', in *Encyclopedia of Pain*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 952–955. doi: 10.1007/978-3-540-29805-2_1855.
- Su, L. et al. (2011) 'Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain', *BMC Neuroscience*, 12, p. 120. doi: 10.1186/1471-2202-12-120.
- Su, L. et al. (2017) 'Downregulations of TRPM8 expression and membrane trafficking in dorsal root ganglion mediate the attenuation of cold hyperalgesia in CCI rats induced by GFR α 3 knock-down', *Brain Research Bulletin*, 135, pp. 8–24. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.08.002.
- Subramanian, A. et al. (2005) 'Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), pp. 15545–15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- Sun, J. et al. (2014) 'Activation of Cold-Sensing Transient Receptor Potential Melastatin Subtype 8 Antagonizes Vasoconstriction and Hypertension Through Attenuating RhoA/Rho Kinase Pathway', *Hypertension*, 63(6), pp. 1354–1363. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02573.
- Sun, J. et al. (2019) ' μ -Opioid receptors in primary sensory neurons are essential for opioid analgesic effect on acute and inflammatory pain and opioid-induced hyperalgesia', *The Journal of Physiology*, 597(6), p. 1661. doi: 10.1113/JP277428.
- Sun, S. et al. (2017) 'The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: A meta-analysis of literatures and datasets', *Oncotarget. Impact Journals LLC*, pp. 16036–16051. doi: 10.18632/oncotarget.13917.
- Sweitzer, S. M. et al. (2002) 'The differential role of spinal MHC class II and cellular adhesion molecules in peripheral inflammatory versus neuropathic pain in rodents', *Journal of Neuroimmunology*, 125(1–2), pp. 82–93. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00036-X.
- Ta, L. E. et al. (2006) 'Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding', *NeuroToxicology*, 27(6), pp. 992–1002. doi: 10.1016/j.neuro.2006.04.010.
- Ta, L. E. et al. (2010) 'Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice', *Molecular Pain*, 6, pp. 1744-8069-6–15. doi: 10.1186/1744-8069-6-15.
- Ta, L. E., Low, P. A. and Windebank, A. J. (2009) 'Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli', *Molecular Pain*, 5, p. 9. doi: 10.1186/1744-8069-5-9.
- Takahashi, N. et al. (2011) 'TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂.', *Nature chemical biology*, 7(10), pp. 701–11. doi: 10.1038/nchembio.640.
- Takashima, Y. et al. (2007) 'Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons', *Journal of Neuroscience*, 27(51), pp. 14147–14157. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4578-07.2007.
- Takashima, Y., Ma, L. and McKemy, D. D. (2010) 'The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression', *Neuroscience*, 169(2), pp. 828–842. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2010.05.039.
- Takenaga, M. and Kawasaki, H. (1999) 'Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses vasoconstriction mediated by adrenergic nerves in rat mesenteric resistance blood vessels', *European Journal of Pharmacology*, 367(2–3), pp. 239–245. doi: 10.1016/S0014-2999(98)00949-2.
- Talavera, K. et al. (2020) 'Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease', *Physiological reviews*, 100(2), pp. 725–803. doi: 10.1152/physrev.00005.2019.
- Tang, J. et al. (2006) 'A Complexin/Synaptotagmin 1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis', *Cell*, 126(6), pp. 1175–1187. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.030.

- Tang, Z. et al. (2013) 'Pirt functions as an endogenous regulator of TRPM8', *Nature Communications*, 4(1), p. 2179. doi: 10.1038/ncomms3179.
- Tavares-Ferreira, D. et al. (2021) 'Title: Spatial transcriptomics reveals unique molecular fingerprints of human nociceptors', *bioRxiv*, p. 2021.02.06.430065. doi: 10.1101/2021.02.06.430065.
- Taylor-Clark, T. E. et al. (2008) 'Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1)', *Molecular Pharmacology*, 73(2), pp. 274–281. doi: 10.1124/mol.107.040832.
- Teichert, R. W. et al. (2012) 'Characterization of two neuronal subclasses through constellation pharmacology', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), pp. 12758–12763. doi: 10.1073/pnas.1209759109.
- Teliban, A. et al. (2011) 'Axonal thermosensitivity and mechanosensitivity of cutaneous afferent neurons', *European Journal of Neuroscience*, 33(1), pp. 110–118. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07471.x.
- Tesniere, A. et al. (2010) 'Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin', *Oncogene*, 29(4), pp. 482–491. doi: 10.1038/onc.2009.356.
- Thakur, M. et al. (2014) 'Defining the nociceptor transcriptome', *Front Mol Neurosci*, 7(November), p. 87. doi: 10.3389/fnmol.2014.00087.
- Thut, P. D., Wrigley, D. and Gold, M. S. (2003) 'Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro', *Neuroscience*, 119(4), pp. 1071–1083. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00225-2.
- Togashi, K. et al. (2006) 'TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion', *EMBO Journal*, 25(9), pp. 1804–1815. doi: 10.1038/sj.emboj.7601083.
- Tominaga, M. et al. (1998) 'The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli', *Neuron*, 21(3), pp. 531–543. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80564-4.
- Tóth, A. et al. (2005) 'Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain', *Molecular Brain Research*, 135(1–2), pp. 162–168. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.12.003.
- Touska, F. et al. (2016) 'Comprehensive thermal preference phenotyping in mice using a novel automated circular gradient assay', *Temperature*, 3(1), pp. 77–91. doi: 10.1080/23328940.2015.1135689.
- Treede, R. D., Meyer, R. A. and Campbell, J. N. (1998) 'Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: Heat-response properties', *Journal of Neurophysiology*, 80(3), pp. 1082–1093. doi: 10.1152/jn.1998.80.3.1082.
- Trevisani, M. 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(33), pp. 13519–13524. doi: 10.1073/pnas.0705923104.
- Tsagareli, M. G. et al. (2010) 'Behavioral evidence of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia induced by intradermal cinnamaldehyde in rats', *Neuroscience Letters*, 473(3), pp. 233–236. doi: 10.1016/j.neulet.2010.02.056.
- Tsantoulas, C. and McMahon, S. B. (2014) 'Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain.', *Trends in neurosciences*, 37(3), pp. 146–58. doi: 10.1016/j.tins.2013.12.002.
- Tsvaler, L. et al. (2001) 'Trp-p8, a Novel Prostate-specific Gene, Is Up-Regulated in Prostate Cancer and Other Malignancies and Shares High Homology with Transient Receptor Potential Calcium Channel Proteins', *Cancer Res.*, 43(4), pp. 1809–1818. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/9/3760.long> (Accessed: 28 July 2019).
- Turkiew, E. et al. (2017) 'Deletion of Sarm1 gene is neuroprotective in two models of peripheral neuropathy', *Journal of the Peripheral Nervous System*, 22(3), pp. 162–171. doi: 10.1111/jns.12219.

- Ueda, H. et al. (1997) 'Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene', *Neuroscience Letters*, 237(2–3), pp. 136–138. doi: 10.1016/S0304-3940(97)00832-X.
- Ueda, H. et al. (2000) 'Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence', *Journal of Neuroscience*, 20(20), pp. 7640–7647. doi: 10.1523/jneurosci.20-20-07640.2000.
- Urru, M. et al. (2020) 'Dexpramipexole blocks Nav1.8 sodium channels and provides analgesia in multiple nociceptive and neuropathic pain models', *Pain*, 161(4), pp. 831–841. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001774.
- Usoskin, D. et al. (2015) 'Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing', *Nature Neuroscience*, 18(1), pp. 145–153. doi: 10.1038/nn.3881.
- Vandewauw, I. et al. (2018) 'A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing', *Nature*, 555(7698), pp. 662–666. doi: 10.1038/nature26137.
- Vay, L., Gu, C. and McNaughton, P. A. (2012) 'The thermo-TRP ion channel family: Properties and therapeutic implications', *British Journal of Pharmacology*, pp. 787–801. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x.
- Velasco, R. et al. (2021) 'Predictive Biomarkers of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neurotoxicity', *Journal of Personalized Medicine*, 11(7). doi: 10.3390/JPM11070669.
- Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007) 'TRP Channels TRP: Transient Receptor Potential', *Annu Rev Biochem.*, 76, pp. 387–417. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- Viana, F. (2016) 'TRPA1 channels: molecular sentinels of cellular stress and tissue damage', *Journal of Physiology*, 594(15), pp. 4151–4169. doi: 10.1113/JP270935.
- Viana, F., De la Peña, E. and Belmonte, C. (2002) 'Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression', *Nature Neuroscience*, 5(3), pp. 254–260. doi: 10.1038/nn809.
- Vichaya, E. G. et al. (2015) 'Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities', *Frontiers in Neuroscience*, pp. 1–17. doi: 10.3389/fnins.2015.00131.
- Vijayaragavan, K., O'Leary, M. E. and Chahine, M. (2001) 'Gating properties of Na(v)1.7 and Na(v)1.8 peripheral nerve sodium channels', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(20), pp. 7909–7918. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-20-07909.2001.
- Vilceanu, D. and Stucky, C. L. (2010) 'TRPA1 Mediates Mechanical currents in the plasma membrane of Mouse Sensory Neurons', *PLoS ONE*, 5(8). doi: 10.1371/journal.pone.0012177.
- Voets, T. et al. (2007) 'TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli', *Nature Chemical Biology*, 3(3), pp. 174–182. doi: 10.1038/nchembio862.
- Voets, T. (2012) 'Quantifying and modeling the temperature-dependent gating of TRP channels', *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 162, pp. 91–119. doi: 10.1007/112_2011_5.
- Vriens, J. et al. (2004) 'Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), pp. 396–401. doi: 10.1073/pnas.0303329101.
- Vriens, J. et al. (2011) 'TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat', *Neuron*, 70(3), pp. 482–494. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.051.
- Vulchanova, L. et al. (1998) 'P2X 3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II', *European Journal of Neuroscience*, 10(11), pp. 3470–3478. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00355.x.
- Wang, D. et al. (2020) 'Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of monosialotetrahexosylganglioside for the prevention of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity in stage II/III colorectal cancer', *Cancer Medicine*, 9(1), pp. 151–159. doi: 10.1002/cam4.2693.

- Wang, F. et al. (2012) 'RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues', *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), pp. 22–29. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
- Wang, F. et al. (2018) 'Sensory Afferents Use Different Coding Strategies for Heat and Cold', *Cell Reports*, 23(7), pp. 2001–2013. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.065.
- Wang, H. and Zylka, M. J. (2009) 'Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(42), pp. 13202–13209. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3248-09.2009.
- Wang, K. et al. (2021) 'Single-cell transcriptomic analysis of somatosensory neurons uncovers temporal development of neuropathic pain', *Cell Research*, 31(8), pp. 904–918. doi: 10.1038/s41422-021-00479-9.
- Wang, Y. Y., Chang, R. B. and Liman, E. R. (2010) 'TRPA1 is a component of the nociceptive response to CO₂', *Journal of Neuroscience*, 30(39), pp. 12958–12963. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2715-10.2010.
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) 'RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 57–63. doi: 10.1038/nrg2484.
- Wangzhou, A. et al. (2020) 'Pharmacological target-focused transcriptomic analysis of native vs cultured human and mouse dorsal root ganglia', *Pain*, 161(7), pp. 1497–1517. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001866.
- Watanabe, H. et al. (2002) 'Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells', *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), pp. 47044–47051. doi: 10.1074/jbc.M208277200.
- Wei, G. et al. (2021) 'Platinum accumulation in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy', *Journal of the Peripheral Nervous System*, p. jns.12432. doi: 10.1111/jns.12432.
- Wei, J. J. et al. (2015) 'A TRPA1 channel that senses thermal stimulus and irritating chemicals in *Helicoverpa armigera*', *Insect Molecular Biology*, 24(4), pp. 412–421. doi: 10.1111/imb.12168.
- Wende, H., Lechner, S. G. and Birchmeier, C. (2012) 'The transcription factor c-Maf in sensory neuron development', *Transcription*, 3(6), pp. 285–289. doi: 10.4161/trns.21809.
- Werdehausen, R. et al. (2015) 'The lidocaine metabolite N-ethylglycine has antinociceptive effects in experimental inflammatory and neuropathic pain', *Pain*, 156(9), p. 1647. doi: 10.1097/J.PAIN.0000000000000206.
- Wiendl, H. et al. (2003) 'Antigen processing and presentation in human muscle: Cathepsin S is critical for MHC class II expression and upregulated in inflammatory myopathies', *Journal of Neuroimmunology*, 138(1–2), pp. 132–143. doi: 10.1016/S0165-5728(03)00093-6.
- Wieskopf, J. S. et al. (2015) 'The nicotinic $\alpha 6$ subunit gene determines variability in chronic pain sensitivity via cross-inhibition of P2X_{2/3} receptors', *Science Translational Medicine*, 7(287). doi: 10.1126/scitranslmed.3009986.
- Wilkes, G. (2007) 'Peripheral Neuropathy Related to Chemotherapy', *Seminars in Oncology Nursing*, 23(3), pp. 162–173. doi: 10.1016/j.soncn.2007.05.001.
- Windebank, A. J. and Grisold, W. (2008) 'Chemotherapy-induced neuropathy', *Journal of the Peripheral Nervous System*, pp. 27–46. doi: 10.1111/j.1529-8027.2008.00156.x.
- Wolf, S. et al. (2008) 'Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Prevention and treatment strategies', *European Journal of Cancer*, 44(11), pp. 1507–1515. doi: 10.1016/j.ejca.2008.04.018.
- Woo, S. H. et al. (2015) 'Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception', *Nature Neuroscience*, 18(12), pp. 1756–1762. doi: 10.1038/nn.4162.
- Woodbury, C. J. and Koerber, H. R. (2003) 'Widespread projections from myelinated nociceptors throughout the substantia gelatinosa provide novel insights into neonatal hypersensitivity', *Journal of Neuroscience*, 23(2), pp. 601–610. doi: 10.1523/jneurosci.23-02-00601.2003.

- Woodbury, C. J. and Koerber, H. R. (2007) 'Central and peripheral anatomy of slowly adapting type I low-threshold mechanoreceptors innervating trunk skin of neonatal mice', *Journal of Comparative Neurology*, 505(5), pp. 547–561. doi: 10.1002/cne.21517.
- Woodbury, C. J., Ritter, A. M. and Koerber, H. R. (2000) 'On the problem of lamination in the superficial dorsal horn of mammals: A reappraisal of the substantia gelatinosa in postnatal life', *Journal of Comparative Neurology*, 417(1), pp. 88–102. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000131)417:1<88::AID-CNE7>3.0.CO;2-U.
- Woodham, P. et al. (1989) 'Satellite cells surrounding axotomised rat dorsal root ganglion cells increase expression of a GFAP-like protein', *Neuroscience Letters*, 98(1), pp. 8–12. doi: 10.1016/0304-3940(89)90364-9.
- Wu, B. et al. (2021) 'Oxaliplatin Depolarizes the IB4– Dorsal Root Ganglion Neurons to Drive the Development of Neuropathic Pain Through TRPM8 in Mice', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, p. 108. doi: 10.3389/fnmol.2021.690858.
- Wu, L. et al. (2020) 'Increased Transient Receptor Potential Melastatin 8 Expression in the Development of Bladder Pain in Patients With Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome', *Urology*, 146, pp. 301.e1-301.e6. doi: 10.1016/j.urology.2020.09.037.
- Xia, K. et al. (2010) 'Roles of KChIP1 in the regulation of GABA-mediated transmission and behavioral anxiety', *Molecular Brain* 2010 3:1, 3(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1756-6606-3-23.
- Xiao, B. et al. (2008) 'Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels', *Journal of Neuroscience*, 28(39), pp. 9640–9651. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2772-08.2008.
- Xiao, B. et al. (2011) 'Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca²⁺ influx and modulates gene expression', *Nature Chemical Biology*, 7(6), pp. 351–358. doi: 10.1038/nchembio.558.
- Xiao, W. H., Zheng, H. and Bennett, G. J. (2012) 'Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel', *Neuroscience*, 203, pp. 194–206. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.023.
- Xie, N. et al. (2020) 'NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential', *Signal Transduction and Targeted Therapy*. doi: 10.1038/s41392-020-00311-7.
- Xing, H. et al. (2006) 'Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons', *Journal of Neurophysiology*, 95(2), pp. 1221–1230. doi: 10.1152/jn.01035.2005.
- Xing, H. et al. (2007) 'TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(50), pp. 13680–13690. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2203-07.2007.
- Xing, Y. et al. (2019) 'Molecular signature of pruriceptive MrgprA3 + neurons', *bioRxiv*, pp. 1–35. doi: 10.1101/727396.
- Xiong, S. et al. (2017) 'Activation of transient receptor potential melastatin subtype 8 attenuates cold-induced hypertension through ameliorating vascular mitochondrial dysfunction', *Journal of the American Heart Association*, 6(8). doi: 10.1161/JAHA.117.005495.
- Yamaki, S. et al. (2021) 'Nociceptive afferent phenotyping reveals that transient receptor potential ankyrin 1 promotes cold pain through neurogenic inflammation upstream of the neurotrophic factor receptor GFR α 3 and the menthol receptor transient receptor potential melastatin 8', *Pain*, 162(2), pp. 609–618. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002043.
- Yamamoto, K. et al. (2015) 'Transient Receptor Potential Ankyrin 1 that is Induced in Dorsal Root Ganglion Neurons Contributes to Acute Cold Hypersensitivity after Oxaliplatin Administration', *Molecular Pain*, 11, p. 69. doi: 10.1186/s12990-015-0072-8.
- Yamamoto, Y. et al. (2015) 'Downregulation of growth hormone 1 gene in the cerebellum and prefrontal cortex of rats with depressive-like behavior', *Physiological Genomics*, 47(5), pp. 170–176. doi: 10.1152/physiolgenomics.00119.2014.

- Yamamoto, Y., Hatakeyama, T. and Taniguchi, K. (2009) 'Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells.', *Neuroscience letters*, 454(2), pp. 129–33. doi: 10.1016/j.neulet.2009.02.069.
- Yang, S. et al. (2020) 'A paradigm of thermal adaptation in penguins and elephants by tuning cold activation in TRPM8', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(15), pp. 8633–8638. doi: 10.1073/pnas.1922714117.
- Yang, X. R. et al. (2006) 'Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290(6). doi: 10.1152/ajplung.00515.2005.
- Yarmolinsky, D. A. et al. (2016) 'Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System.', *Neuron*, 92(5), pp. 1079–1092. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.021.
- Yin, K. et al. (2016) 'Transcriptomic and behavioural characterisation of a mouse model of burn pain identify the cholecystinin 2 receptor as an analgesic target', *Molecular Pain*, 12, pp. 1–13. doi: 10.1177/1744806916665366.
- Yin, Y. et al. (2018) 'Structure of the cold- And menthol-sensing ion channel TRPM8', *Science*, 359(6372), pp. 237–241. doi: 10.1126/science.aan4325.
- Yin, Y. et al. (2019) 'Structural basis of cooling agent and lipid sensing by the cold-activated TRPM8 channel', *Science*, 363(6430). doi: 10.1126/science.aav9334.
- Yoshida, S. and Matsuda, Y. (1979) 'Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular-recording and horseradish peroxidase-injection techniques', *Journal of Neurophysiology*, 42(4), pp. 1134–1145. doi: 10.1152/jn.1979.42.4.1134.
- Yousuf, M. S. et al. (2020) 'Endoplasmic reticulum–mitochondria interplay in chronic pain: The calcium connection', *Molecular Pain*. SAGE Publications. doi: 10.1177/1744806920946889.
- Yu, J. et al. (2015) 'Oxaliplatin-based doublets versus cisplatin or carboplatin-based doublets in the first-line treatment of advanced nonsmall cell lung cancer', *Medicine (United States)*, 94(27), p. e1072. doi: 10.1097/MD.0000000000001072.
- Yu, X. et al. (2020) 'Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain', *Nature Communications*, 11(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13839-2> (Accessed: 31 March 2021).
- Zakharian, E., Cao, C. and Rohacs, T. (2010) 'Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers', *Journal of Neuroscience*, 30(37), pp. 12526–12534. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3189-10.2010.
- Zeisel, A. et al. (2018) 'Molecular Architecture of the Mouse Nervous System', *Cell*, 174(4), pp. 999-1014.e22. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.021.
- Zhang, F. X. et al. (2010) 'Inhibition of inflammatory pain by activating B-type natriuretic peptide signal pathway in nociceptive sensory neurons', *Journal of Neuroscience*, 30(32), pp. 10927–10938. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0657-10.2010.
- Zhang, J. et al. (2019) 'Sour Sensing from the Tongue to the Brain', *Cell*, 179(2), pp. 392-402.e15. doi: 10.1016/j.cell.2019.08.031.
- Zhang, M. D. et al. (2016) 'Orthopedic surgery modulates neuropeptides and BDNF expression at the spinal and hippocampal levels', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), pp. E6686–E6695. doi: 10.1073/pnas.1614017113.
- Zhang, X. L. et al. (2010) 'BKCa currents are enriched in a subpopulation of adult rat cutaneous nociceptive dorsal root ganglion neurons', *European Journal of Neuroscience*, 31(3), pp. 450–462. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.07060.x.
- Zhao, M. et al. (2012) 'Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice', *Molecular Pain*, 8(1), p. 55. doi: 10.1186/1744-8069-8-55.

- Zheng, H., Xiao, W. H. and Bennett, G. J. (2011) 'Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy', *Experimental Neurology*, 232(2), pp. 154–161. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.08.016.
- Zheng, Y. et al. (2019) 'Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2019.05.039.
- Zhou, H.-Y. et al. (2009) 'The Glutamatergic Nature of TRPV1-Expressing Neurons in the Spinal Dorsal Horn', *Journal of neurochemistry*, 108(1), p. 305. doi: 10.1111/J.1471-4159.2008.05772.X.
- Zhu, G., Chang, P. and Lippard, S. J. (2010) 'Recognition of platinum-DNA damage by Poly(ADP-ribose) polymerase-1', *Biochemistry*, 49(29), pp. 6177–6183. doi: 10.1021/bi100775t.
- Zimmermann, K. et al. (2007) 'Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures', *Nature*, 447(7146), pp. 855–858. doi: 10.1038/nature05880.
- Zimmermann, K. et al. (2011) 'Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), pp. 18114–9. doi: 10.1073/pnas.1115387108.
- Zurborg, S. et al. (2007) 'Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺', *Nature Neuroscience*, 10(3), pp. 277–279. doi: 10.1038/nn1843.
- Zylka, M. J. et al. (2008) 'Prostatic Acid Phosphatase Is an Ectonucleotidase and Suppresses Pain by Generating Adenosine', *Neuron*, 60(1), pp. 111–122. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.024.
- Zylka, M. J., Rice, F. L. and Anderson, D. J. (2005) 'Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd', *Neuron*, 45(1), pp. 17–25. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.015.
-

8. ANEXO 1: PUBLICACIÓN

Piezo2 Mediates Low-Threshold Mechanically Evoked Pain in the Cornea

Jorge Fernández-Trillo, Danny Florez-Paz, Almudena Íñigo-Portugués, Omar González-González, Ana Gómez del Campo, Alejandro González, Félix Viana, Carlos Belmonte and Ana Gomis

Journal of Neuroscience 18 November 2020, 40 (47) 8976-8993;

DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0247-20.2020>

Abstract

Mammalian Piezo2 channels are essential for transduction of innocuous mechanical forces by proprioceptors and cutaneous touch receptors. In contrast, mechanical responses of somatosensory nociceptor neurons evoking pain, remain intact or are only partially reduced in Piezo2-deficient mice. In the eye cornea, comparatively low mechanical forces are detected by polymodal and pure mechanosensory trigeminal ganglion neurons. Their activation always evokes ocular discomfort or pain and protective reflexes, thus being a unique model to study mechanotransduction mechanisms in this particular class of nociceptive neurons. Cultured male and female mouse mechano- and polymodal nociceptor corneal neurons display rapidly, intermediately and slowly adapting mechanically activated currents. Immunostaining of the somas and peripheral axons of corneal neurons responding only to mechanical force (pure mechano-nociceptor) or also exhibiting TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) immunoreactivity (polymodal nociceptor) revealed that they express Piezo2. In sensory-specific Piezo2-deficient mice, the distribution of corneal neurons displaying the three types of mechanically evoked currents is similar to the wild type; however, the proportions of rapidly adapting neurons, and of intermediately and slowly adapting neurons were significantly reduced. Recordings of mechano- and polymodal-nociceptor nerve terminals in the corneal surface of Piezo2 conditional knock-out mice revealed a reduced number of mechano-sensitive terminals and lower frequency of nerve terminal impulse discharges under mechanical stimulation. Eye blinks evoked by von Frey filaments applied on the cornea were lower in Piezo2-deficient mice compared with wild type. Together, our results provide direct evidence that Piezo2 channels support mechanically activated currents of different kinetics in corneal trigeminal neurons and contributes to transduction of mechanical forces by corneal nociceptors.

SIGNIFICANCE STATEMENT The cornea is a richly innervated and highly sensitive tissue. Low-threshold mechanical forces activate corneal receptors evoking discomfort or pain. To examine the contribution of Piezo2, a low-threshold mechanically activated channel, to acute ocular pain, we characterized the mechanosensitivity of corneal sensory neurons. By using Piezo2 conditional knock-out mice, we show that Piezo2 channels, present in the cell body and terminals of corneal neurons, are directly involved in acute corneal mechano-nociception. Inhibition of Piezo2 for systemic pain treatment is hindered because of its essential role for mechano-transduction processes in multiple body organs. Still, topical modulation of Piezo2 in the cornea may be useful to selectively relieve unpleasant sensations and pain associated with mechanical irritation accompanying many ocular surface disorders.

Introduction

Precise and rapid detection of mechanical forces is crucial for living organisms. The mammalian skin, mucosae, muscles, and joints are equipped with peripheral endings of multiple classes of somatosensory ganglion neurons activated by mechanical stimuli. Cultured cell bodies of these mechanosensory neurons display distinct types of mechanically activated (MA) inward currents, classified according to their inactivation kinetics as rapidly adapting (RA), intermediately adapting (IA), and slowly adapting (SA). RA currents are more common in low-threshold mechanoreceptor neurons (LTMR), while IA and SA are mainly found in high-threshold mechanoreceptor neurons, although this segregation is by no means exclusive (Drew et al., 2002; Hu and Lewin, 2006; Hao and Delmas, 2010).

Piezo2 was identified as an ion channel expressed in dorsal root ganglion (DRG; Coste et al., 2010; Woo et al., 2014) and trigeminal ganglion (TG) neurons (Bron et al., 2014; Schneider et al., 2014, 2017; Nguyen et al., 2017) and selectively activated by innocuous mechanical forces (Ranade et al., 2014; Woo et al., 2014; Florez-Paz et al., 2016). However, Piezo2 was also identified in neurons expressing nociceptive markers, suggesting a potential role in noxious mechanosensation (Coste et al., 2010; Nguyen et al., 2017; Szczot et al., 2017; Murthy et al., 2018b; Zhang et al., 2019).

Genetic ablation of Piezo2 in mice produced deficits in somatic low-threshold mechanosensitivity (Woo et al., 2015; Florez-Paz et al., 2016), while responses to noxious mechanical forces in cutaneous nociceptor neurons were diminished partially (Murthy et al., 2018b) or remained largely unaffected (Ranade et al., 2014; Szczot et al., 2018), even after nerve

injury or chronic inflammation (Szcot et al., 2018). Moreover, humans carrying Piezo2-inactivating variants showed selective loss of discriminative touch and decreased proprioception, while responses to cutaneous pinprick and pressure pain were unaltered (Chesler et al., 2016; Szcot et al., 2018). Nonetheless, other experimental evidence points toward an involvement of Piezo2 in NGF-induced mechanosensitivity of “silent” nociceptors (Prato et al., 2017) and in mechanical allodynia (Murthy et al., 2018b), thus challenging the existence of an univocal association between a specific mechanotransducing molecule such as Piezo2, and the qualitatively distinct innocuous and painful conscious percepts evoked respectively by low- and high-intensity mechanical forces.

The cornea is the most densely innervated surface epithelium in the human body, a vital characteristic in protecting this exposed tissue from injury. Unmyelinated free nerve endings of corneal sensory axons originated in TG cell bodies ramify close to the surface of the corneal epithelium (Weddell and Zander, 1950; Marfurt et al., 2010). Functionally, three distinct populations of corneal nerve terminals have been identified (Belmonte et al., 1997; González-González et al., 2017); pure mechano-nociceptors, which respond exclusively to low-intensity mechanical forces, and polymodal nociceptors, which are activated by analogous mechanical stimuli, heat and chemical irritants, and cold thermoreceptors, responding to temperature decreases (Belmonte and Giraldez, 1981; Gallar et al., 1993; Belmonte et al., 2017). In humans, all conscious sensations resulting from the stimulation of the cornea contain a defined unpleasant or painful perceptual component (Beuerman and Tanelian, 1979; Belmonte et al., 1999), except for the ambiguous feeling of cooling evoked by small corneal surface temperature reductions (Acosta et al., 2001). These characteristics are coherent with the protective role of corneal sensory innervation against tissue damage.

The involvement of Piezo2 channels in nociception is still unclear, thus requiring a deeper study in different nociceptive neuronal classes. Interestingly, a fraction of corneal TG neurons expresses Piezo2 (Bron et al., 2014). Here, we sought to explore the role of Piezo2 in acute nociception, using corneal neurons, where low-intensity mechanical forces evoke sensations of discomfort or pain. Our results show that Piezo2 contributes to mechanosensitivity of corneal nociceptive neurons. This result has therapeutic significance for the treatment of ocular pain and is conceptually relevant in defining the complex correspondence between the expression of specific transduction molecules by the different cohorts of peripheral sensory neurons and the distinct perceptual characteristics of the sensations evoked by their excitation.

Materials and Methods

All experimental procedures were performed in accordance with the Spanish Royal Decree 1201/2005 and the European Community Council Directive 2010/63/EU. Adult mice of either sex were used. Mice were housed in a temperature-controlled room (21°C) on a 12 h light/dark cycle, with access to food and water *ad libitum*.

Mouse lines

Adult C57BL/6J wild-type (WT) mice (<https://www.jax.org/strain/000664>) and five different transgenic mouse lines were used in this study. We generated conditional Piezo2 knock-out mice (*Piezo2^{CKO}*) on a C57BL/6J background by crossing an Advillin-Cre line (Zurborg et al., 2011) with floxed Piezo2 mice (<https://www.jax.org/strain/027720>; Woo et al., 2014). The Advillin-Cre is a bacterial artificial chromosome (BAC) transgenic Cre-driver mouse line that expresses Cre-recombinase under the regulatory elements of the Advillin gene (Zurborg et al., 2011). Expression analysis showed that Advillin is mainly restricted to peripheral sensory ganglia in adult mice (Zurborg et al., 2011). Floxed Piezo2 mice (*Piezo2^{fl/fl}*) present two loxP sites flanking exons 43 through 45 (Woo et al., 2014). In *Piezo2^{CKO}* mouse, Piezo2 is ablated in neurons from peripheral sensory ganglia. Littermates of this line were also used as wild-type controls. Different genotypes were used for this purpose: mice that did not carry the Advillin-Cre allele and were homozygous, heterozygous, or null for the floxed Piezo2 allele or mice with the positive Cre allele and null alleles for Piezo2^{fl/fl}. Piezo2GFP-Cre mice (Woo et al., 2014) is a knock-in line, expressing GFP fused to Piezo2 (<https://www.jax.org/strain/027719>). Trpv1-GFP mice, a strain from the GENSAT collection, were obtained from the MMRRC Repository (033029-UCD) at University of California, Davis (<http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:4847511>; MMRRC Services, The Rockefeller University, New York, NY) and backcrossed to a C57BL/6J background. An EGFP (enhanced green fluorescent protein) reporter gene was inserted into a BAC clone at the initiating ATG codon of the first coding exon of the Trpv1 gene so that EGFP expression is driven by the regulatory sequences of the Trpv1 gene. In Trpm8BAC-EYFP mice, generated in our laboratory, yellow fluorescent protein (YFP) is expressed under the Trpm8 promoter (Morenilla-Palao et al., 2014). The genotype of the different transgenic mice used was established by PCR. The primers and genotyping protocols are available on request.

Retrograde labeling of corneal TG neurons

Trigeminal sensory neurons innervating the mouse cornea were identified with the retrograde tracers FM 1-43FX (Thermo Fisher Scientific) and Fast Blue (Polyscience Europe). In most animals, the labeling of corneal neurons was done using FM 1-43FX (100 μ m). Adult mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of a solution containing ketamine (90 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg; injection, 5 μ l/g). Also, a dose of buprenorphine was injected subcutaneously (0.1 mg/kg). Additionally, we applied local anesthesia, 1 drop of a mixture of tetracaine (4 mg/ml) and oxibuprocain (4 mg/ml), to the right eye (only one eye was labeled in each mouse). To remove the corneal epithelium, an absorbable hemostatic gelatin sponge disk (diameter, 3 mm) soaked with ethanol 70% was placed on the corneal surface for 30 s. Thereafter, the corneal epithelium was slightly scraped using a surgical blade exposing the nerve terminals, and a Gelfoam sponge soaked with 100 μ m FM 1-43 FX or with Fast Blue (5% in distilled water) was placed on the de-epithelized corneal surface for 40 min. During incubation with the retrograde label, the animals were maintained in the dark in a veterinary recovery chamber at 35°C (MediHeat V1200, Peco Services); after 20 min of incubation, the Gelfoam sponge was remoistened (2–3 μ l) with the labeling solution and left for 20 additional minutes. Then, the sponge was removed by moistening with saline and the eye was washed out with saline. A drop of tobramycin (3 mg/ml) was applied to the eye to prevent corneal infections; the eye was rinsed with saline after each described step. A drop of artificial tear was applied to the untreated eye during the labeling procedure. Mice were kept 3–4 d after labeling to allow the transport of the tracer from the corneal terminals to the soma in the TG and then were killed for cell culture. Fluorescence of intact TG was visualized with a MZ16FA Stereomicroscope (Leica Microsystems) and a QiClick-FM-12 camera (Q-Imaging).

Neuronal cell culture

Mice were killed by cervical dislocation followed by decapitation. Trigeminal corneal neurons were cultured as described previously (Viana et al., 2001). Briefly, the ocular branch of the TG of the labeled eye was dissected out and incubated in a mix of collagenase type XI (900 u/ml; Sigma-Aldrich) and dispase (3 mg/ml; Thermo Fisher Scientific) in INCMix medium (in mm: 155 NaCl, 1.5 K₂PO₄, 10 HEPES, and 5 glucose buffered to pH 7.4) containing 1% penicillin and streptomycin for 40 min at 37°C in 5% CO₂. Ophthalmic branches of labeled TG ganglia from two mice were then dissociated mechanically via trituration with flame-polished Pasteur pipettes to break down the tissue. Enzymes were stopped by adding HBSS medium containing 1% MEM

Vitamin Solution, 10% FBS, and 1% penicillin and streptomycin, followed by centrifugation at 850 rpm for 5 min. The pellets were resuspended in Eagle's minimal essential medium, 1% MEM Vitamin Solution, 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin (all from Thermo Fisher Scientific). Cell suspensions were plated on poly-L-lysine-coated glass coverslips and maintained at 37°C in 5% CO₂ and used 24 h after plating. At the start of the experiment, images of neurons were obtained using the recording microscope with transmitted light and under 488 nm excitation wavelength (FM 1-43FX) or 365 nm (Fast Blue) to identify retrogradely labeled fluorescent cells.

Whole-cell recordings and mechanical stimulation

Patch-clamp recordings were performed in the current-clamp and voltage-clamp whole-cell configuration using a Multiclamp 700B amplifier, connected to a Digidata 1322A Data Acquisition System and controlled by pCLAMP 10 software (Molecular Devices). Experiments were performed at a temperature of 32–34°C. Temperature was controlled by a homemade water-cooled Peltier system controlled by a feedback device. Cells were held at –60 mV, and data were sampled at a frequency of 20 kHz and low-passed filtered at 10 kHz. Recordings were not adjusted for the pipette liquid junction potential of +12 mV, which was calculated as previously described (Neher, 1992). This was very similar to the estimated value using the junction potential calculator included in the pClamp software (about +13 mV). The control external solution contained the following (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 glucose, and 10 HEPES, at pH 7.2 (300 mOsm/kg). Borosilicate glass capillary patch-pipettes of 4–7 MΩ resistance were filled with intracellular solution containing (in mM): 115 K-gluconate, 25 KCl, 9 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 1 MgCl₂, 3 K₂-ATP, and 1 Na-GTP adjusted to pH 7.2 with KOH (280–290 mOsm/kg). Injection of current pulses varying from –20 pA to 900 nA over 300 ms was used to evoke action potentials.

The recording chamber was placed on the stage of a Leica DMI 3000B inverted microscope. Labeled TG neurons were identified under fluorescence excitation with a Lambda 10-2 Filter Wheel (Sutter Instruments), and the emitted fluorescence, of FM 1-43 or Fast Blue, was long-pass filtered at 510 and 420 nm, respectively, to the dye used. The images were acquired using an Orca ER CCD camera (Hamamatsu Photonics).

Mechanical stimulation of corneal TG neuron cell bodies was performed using a heat-closed glass pipette driven by a MM3A-LS piezoelectric micromanipulator (Kleindiek Nanotechnik). The pipette was positioned on a cell body at a 45–60° angle to the horizontal plane and opposite to the recording pipette, and it was moved at 540 μm/s. A series of mechanical steps in 1 μm increments were applied for 250 ms every 10 s.

Mechanically activated currents were classified by their inactivation time course, which were adjusted to a monoexponential or double-exponential function using the Clampfit 10 software (Molecular Devices). In the case of fits to a double-exponential, the reported time constant (τ) corresponds to the component with the largest weight. Cells were classified in RA ($\tau \leq 10$ ms), IA ($10 < \tau \leq 30$ ms), or SA ($\tau \geq 30$ ms) current, as described previously (Drew et al., 2002; Hu and Lewin, 2006; Coste et al., 2010; Hao and Delmas, 2010).

Fluorometric calcium imaging

DRG neurons were incubated with 5 μ m Fura2-AM and 0.2% Pluronic F-127 (Thermo Fisher Scientific) in control external solution for 45 min at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Coverslips with cultured neurons were placed in a low-volume chamber continuously perfused at ~ 1 ml/min on an inverted microscope (model DMI 3000B, Leica). Fluorescence signals were obtained by exciting Fura2 at 340 and 380 nm with a Lambda 10-2 filter wheel and a LAMBDA LS xenon arc lamp (Sutter Instruments) and filtering the emitted fluorescence with a 510 nm long-pass filter. Images were acquired using an Orca ER CCD camera (Hamamatsu Photonics) and analyzed with Metaflour software (Molecular Devices). Increases in cytosolic Ca²⁺ are presented as the ratio of the emission intensities at 340 and 380 nm (F₃₄₀/F₃₈₀; fluorescence arbitrary units). A positive calcium response was considered when the fluorescence signal (F₃₄₀/F₃₈₀) deviated by at least four times the SD of the baseline. Experiments were performed at a temperature of 33–34°C. Temperature was controlled by a homemade water-cooled Peltier system controlled by a feedback device.

Heat sensitivity was investigated with ramp-like temperature increments to $49 \pm 0.3^\circ\text{C}$ from a basal temperature of 34°C, applied in control solution. Thereafter, 100 nm capsaicin (CAP) was applied extracellularly to determine the chemical sensitivity to this specific TRPV1 agonist.

Immunocytochemistry

CELLS

Cultured cells on coverslips (diameter, 6 mm) were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 m PBS, washed three times with PBS for 10 min and twice with TBST (0.5 m Tris Base, 9% w/v NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.6) for 10 min. Nonspecific binding sites were blocked by incubating the cells for 30 min in freshly made blocking solution containing TBST 1 \times , 1% BSA, and 0.25% Triton X-100. Cells were then incubated for 2 h at room temperature (RT) with primary antibodies. Then, cells were rinsed three times with TBST for 15 min and incubated for

2 h at RT with secondary antibodies. All the antibodies used are listed in Table 1. The primary antibodies used were rabbit anti-Piezo2 (1:200), mouse anti-class-III- β -tubulin (1:1000), and chicken anti-GFP (1:1000). The secondary antibodies used were donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555 (1:1000), goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:1000), and goat anti-chicken IgG Alexa Fluor 647 (1:1000). Both primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution. Coverslips were mounted on a microscope slide using VECTASHIELD antifade mounting medium (H-1000, Vector Laboratories), sealed with clear nail polish and stored at 4°C until used. Images were acquired with an UPlanSApo 20 \times objective using an inverted confocal microscope (model FV1200, Olympus) driven by FV10-ASW 4.2 software (Olympus Life Sciences).

Table 1. Primary and secondary antibodies and RNAscope probe used

Antibodies and RNAscope probe	Vendor	Catalog #
Primary antibodies		
Rabbit anti Piezo2	Novus Biologicals, Centennial, CO	NBPI-78624
Mouse anti-neuronal class III β -tubulin	BioLegend, San Diego, CA	801201
Chicken anti-GFP	Abcam, Cambridge, MA	ab13970
Goat anti-TRPV1	Neuromics, Edina, MN	GT15129
Secondary antibodies		
Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555	Abcam, Cambridge, MA	ab150078
Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A31573
Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A11029
Goat anti-chicken IgG Alexa Fluor 647	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A21449
Goat anti-chicken IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A11039

Goat anti-chicken IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A21437
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A32733
Donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 647	Abcam, Cambridge, MA	ab105131
Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A32727
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR	A11008
RNAscope probe Mm-Piezo2	ACDBio	400191

CELL IDENTIFICATION

To identify the molecular phenotype of the electrophysiologically recorded neurons, immunocytochemistry was directly performed from cells on coverslips, immediately after recording. A line pattern was engraved on the coverslip surface before cell seeding, using a tungsten carbide pencil, to be used later as a guide in the identification of the recorded neurons. Recorded cells were identified by comparing the images obtained under transmitted light (differential interference contrast) immediately after electrophysiological recording and after Piezo2 immunostaining. In some cases, the precise location of the neuron on the coverslip was indicated by the broken tip of the recording pipette, left very close to the cell, and viewed in bright field.

Immunohistochemistry

Mice were killed by cervical dislocation and were decapitated. The cranium was opened, the TG were removed and immediately fixed in 4% PFA for 2 h at 4°C, washed twice with 0.1 m PBS, and cryoprotected in 30% sucrose overnight at 4°C. The next day, tissues were cryopreserved in optimal cutting temperature compound (O.C.T.; Tissue-Tek), frozen in dry ice, and cryosectioned at 20 µm in an axial plane (see Fig. 5D) using a cryostat (MNT, Slee Medical) and picked up in Superfrost microscope slides (Thermo Fisher Scientific).

The slides containing the sections were dried in an oven at 37°C for 30 min and washed twice with 0.1 m phosphate buffer with Tween 20 (PBT), pH 7.4 (0.0774 m Na₂HPO₄,

0.0226 m NaH₂PO₄, 0.05% Tween 20) at room temperature. Slides were then boiled for 20 min in citrate buffer (citric acid 1 m, sodium citrate 1 m, pH 6) using a water bath and cooled down for 10 min by stopping the bath heater. Following two additional washes with 0.1 m PBT, tissues were incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution containing 5% BSA and 1% Triton X-100 in PBT. Tissues were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Next, tissue sections were washed in PBT four times for 15 min at room temperature and incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature. Then, samples were washed four times in PBT for 15 min, once in PBS for 10 min, and once in distilled H₂O for 5 min. Then, slides were dried in darkness and mounted in coverslips using Fluoromount mounting medium (Sigma-Aldrich). The primary antibodies used were rabbit anti-Piezo2 (1:200), mouse anti-class-III- β -tubulin (1:1000), and chicken anti-GFP (1:1000). The secondary antibodies used were donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 555 (1:1000), donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647 (1:1000), goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:1000), and goat anti-chicken IgG Alexa Fluor 647 (1:1000). Primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution and are listed in Table 1. The anti-Piezo2 antibody has been used in previous studies (Florez-Paz et al., 2016; Nencini and Ivanusik, 2017; Prato et al., 2017). However, we further validated its specificity by performing immunohistochemistry in DRG and TG slices from *Piezo2GFP-Cre* mice following the same procedure and antibodies described above. We performed triple immunohistochemistry with anti-Piezo2, anti-GFP, and anti-class-III- β -tubulin antibodies in mouse DRG and TG slices. The analysis showed that $91.4 \pm 3.1\%$ of the Piezo2⁺ DRG neurons were also GFP⁺ and that $90.6 \pm 3.3\%$ of the GFP⁺ neurons were Piezo2⁺ (617 DRG neurons from three slices, 1 mouse). The average Pearson correlation coefficient was 0.87 ± 0.03 . Likewise, Piezo2 expression was observed in $90.6 \pm 8.8\%$ of TG neurons that were GFP⁺, while $89.2 \pm 1.5\%$ of the GFP⁺ neurons were Piezo2⁺ (1587 neurons from $n = 4$ slices, 2 mice). In this case, the average Pearson correlation coefficient was 0.81 ± 0.01 (data not shown).

***In situ* hybridization**

RNAscope *in situ* hybridizations for freshly frozen tissue were performed according to the manufacturer instructions (ACDBio; Table 1). The Piezo2 probe was tested in TG slices of adult wild-type littermates and *Piezo2^{ckO}* mice. Slices of 20 μ m were cryosectioned in O.C.T. and stored at -80°C . Sections were thawed just before staining and fixed with 4% PFA for 15 min followed by rinsing in PBS. All sections were mounted with Fluoromount Mounting Medium (Sigma-Aldrich).

Image analysis

Confocal image acquisition and mosaic stitching of cultured cells and TG slices was done with a UPlanSApo 20× objective using an inverted confocal microscope (model FV1200, Olympus) driven by FV10-ASW 4.2 software (Olympus Life Sciences). Images were analyzed with FIJI software (ImageJ 1.4, NIH). Adjustments in brightness and contrast were done for image presentation, but all analyses and quantifications were performed on raw unprocessed data.

IMMUNOCHEMISTRY

For Piezo2+ cell identification, regions of interest (ROIs) were manually drawn for each neuron using the β -III-tubulin-labeled image as a reference, and the mean intensity of each ROI was measured. Neurons with an intensity value $\geq 30\%$ of the maximum measured ROI intensity were considered positive for each individual experiment. Comparison of the number of Piezo2+ neurons in WT and *Piezo2^{ckO}* mice was done using samples processed in parallel, and the fluorescence of the most intense ROI in the WT was used as the maximum. For GFP immunostaining, neurons with an intensity $\geq 10\%$ of the maximum were considered positive.

IN SITU HYBRIDIZATION

Several ROIs containing neurons were defined per slice using DAPI fluorescence and transmitted light images as a reference. A ROI, not including neurons per slice, was used to correct for a nonspecific signal. The averaged Piezo2 transcript fluorescence intensity for wild-type and *Piezo2^{ckO}* mice was calculated as the summation of the integrated intensity from each ROI divided by the total area analyzed.

Cornea immunohistochemistry

IMMUNOHISTOCHEMISTRY ON WHOLE-MOUNTED CORNEAS

Whole-mounted corneas immunohistochemistry was performed as described previously (Alcalde et al., 2018). Briefly, adult mice were killed by cervical dislocation followed by decapitation. Eyes were enucleated and fixed for 2 h at RT in methanol and DMSO (4:1), rehydrated, and washed three times in PBS (3 × 15 min). The corneas were isolated and cut into quadrants, then were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing 1% bovine serum albumin and 10% normal goat serum (both from Vector Laboratories) in PBS with 1% Triton X-100 (PBS-TX). Next, corneas were incubated during 4 d at 4°C with the primary antibodies, 2 d in the case of the anti-TRPV1 antibody, and after washing three times in PBS-TX

(15 min), the secondary antibodies were applied for 2 h at room temperature and then washed with PBS for 15 min. Nuclei were counterstained using Hoechst 33342 stain (10 $\mu\text{m}/\text{ml}$; Thermo Fisher Scientific). Immediately afterward, corneas were washed in PBS and mounted on a coverslip with fluorescence mounting medium (DAKO).

Primary antibodies used included chicken anti-GFP (1:500), rabbit anti-Piezo2 (1:50), goat anti-TRPV1 (1:100) and mouse anti-neuronal class III- β -tubulin (1:500; Table 1). The secondary antibodies were goat anti-chicken IgG Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647, donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 647, goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 555, and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Table 1). All secondary antibodies were used at a 1:500 concentration.

CORNEAL SLICES

As described above, mice were killed by cervical dislocation followed by decapitation. Eyeballs were enucleated and fixed for 2 h at RT in methanol and DMSO (4:1), rehydrated, and washed three times in PBS (3 \times 15 min). Eyes were then cryoprotected overnight at 4°C in 30% sucrose in PBS, embedded in O.C.T. medium (Sakura Finetek) and rapidly frozen in isopentane. Blocks were cut on a cryostat microtome in serial 20- μm -thick sections and mounted on Superfrost Plus Slides. Tissue sections were washed in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 10 min and blocked for 30 min in PBS containing 10% goat serum at RT and incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBS. Afterward, sections were washed five times for 5 min (5 \times 5 min) with PBS and incubated for 2 h at RT with secondary antibodies. Thereafter, sections were washed (5 \times 5 min) in PBS and incubated with Hoechst 33342 stain for 10 min at RT and rinsed (5 \times 5 min). Slides were then mounted with fluorescence mounting medium (DAKO). We used the same primary and secondary antibodies that were used for corneal whole-mount immunostaining.

CORNEAL IMAGE ACQUISITION

Fluorescence image stacks were collected using a laser-scanning confocal microscope (model LSM 880, Zeiss) with an objective LD LCI Plan-Apochromat 25 \times /0.8 Imm differential interference contrast (DIC) or Plan-Apochromat 63 \times /1.4 Oil DIC (Carl Zeiss). Confocal images were analyzed using FIJI image analysis software (ImageJ 1.4, NIH). Whole-mounted corneas were divided into four quadrants, and the penetration points of subepithelial bundles through the basal lamina were counted throughout the total area of the cornea of each quadrant and were expressed as penetrations points per square millimeter.

Extracellular recordings from corneal nerve terminals

Recordings of single corneal nerve terminals *in vitro* were done as previously described in detail (González-González et al., 2017). Briefly, mice were killed by cervical dislocation followed by decapitation, and the excised eyes were placed in a recording chamber continuously perfused with a saline solution containing the following (in mM): 128 NaCl, 5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, and 10 glucose. The solution was bubbled with 5% CO₂ and 95% O₂ and maintained at 34°C. By using a manual micromanipulator MM33 (BioLogic), a glass micropipette electrode filled with saline solution was placed in contact with the corneal surface. Thereafter, light suction was applied on the pipette to obtain a high-resistance seal with the corneal surface, thus allowing the recording of extracellular nerve terminal impulses (NTIs) generated from single nerve corneal endings. NTIs were amplified with an AC amplifier (Neurolog NL104, Digitimer) filtered at 10 kHz and stored in a computer, using a CED Micro1401 interface and Spike 2 software (both from Cambridge Electronic Design).

To explore the nerve activity of the entire cornea, the recording pipette was placed at sequential points on the corneal surface in a specific pattern (González-González et al., 2017). If no NTIs were detected 2 min after positioning the pipette on the corneal surface, mechanical stimulation was applied by forward displacement of the pipette of 200 µm for 5 s. If no spontaneous activity or responses to mechanical stimulation were recorded, the electrode was moved to the next recording spot. If the terminal displayed spontaneous activity or the stimulus-evoked NTIs, cold and mechanical stimuli were sequentially applied. Cold stimulation was performed first, by decreasing the baseline temperature (~34°C to ~12°C), generating a cooling ramp lasting ~35 s at a cooling rate of ~0.6°C/s, returning thereafter to the baseline temperature. Mechanical stimulation was applied again by forward displacements of 100 and 200 µm of the pipette for 5 s each one, with a resting period of 10–30 s between them. After a resting period of 2 min, the heating stimulus was applied by increasing the temperature of the perfusion solution from 34°C to ~50°C at 0.5°C/s and returned to 34°C. The heating ramp was applied for ~30 s. Following a resting period of 5 min, another mechanical stimulation was performed to verify whether or not the absence of responses to heat were because of desensitization or loss of the recording. The parameters analyzed were as follows: the background activity, defined as the mean basal ongoing frequency in impulses per second at the basal temperature (~34°C), was measured during the 30 s period that preceded the onset of the first stimulus; the general activity, assessed by the number of times that the pipette was placed on the corneal surface and some activity was detected compared with the total number of times that the pipette was placed, and the number of NTIs during the mechanical stimulation and during the cooling and heating ramp.

Mechanical response was assessed as the increment in NTIs during mechanical stimulation (5 s) with respect to the total number of NTIs fired during the 5 s period immediately before mechanical stimulation. A positive response to mechanical stimulation was considered when the increment in the NTIs during mechanical stimulation is, at least, 50% of the terminal background activity for the same period of time.

Behavior

COTTON SWAB ASSAY

To assess deficits in light touch, the paw withdrawal evoked by a cotton swab was used (Garrison et al., 2012). In brief, mice were placed in an elevated mesh-like platform of square holes in an $\sim 5 \times 5$ mm grid (Hugo Basile). Mice were acclimated for 1 h before testing. A frayed cotton swab was swept five times to each plantar surface of the hindpaw for 1 s, with 10 s between each hindpaw sweep. The number of withdrawals was recorded and analyzed as a proportion of positive responses with respect to the total number of trials. The experimenter was blinded to mouse genotype throughout the data collection and analysis.

ASSESSMENT OF BLINKING

Adult male and female mice, *Piezo2^{CKO}* and their littermates, were carefully held by the scruff to apply gentle touch to the cornea with von Frey filaments. Filaments of 0.008 and 0.02 g were tested in each eye 5–10 times every 5 s in the morning (0.008 g) and afternoon (0.02 g) sessions, alternating the left and right eyes, on 3 consecutive days. The procedure was recorded using a Grasshopper3 GS3-U3-32S4M camera (Point Gray) at 15 frames/s. One hundred twenty-six videos were visualized in slow motion by two observers, and the number of blinks associated with the monofilament touch were counted. Data are presented as the mean proportion of evoked responses with regard to the total number of trials. Thicker filaments were also tested (0.04 and 0.4 g) but after the first touch most of the animals moved vigorously as the filament approached, preventing the analysis of their blinking. Three of the tested *Piezo2^{CKO}* mice closed their eye after the first touch; these animals were not included in the analysis.

Reagents

Capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-*trans*-6-nonenamide; Sigma-Aldrich) was prepared in ethanol as a stock (100 mM) and stored at -20°C .

Statistical and data analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Differences were considered significant at $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$. Exact p values, statistical test, and sample size are indicated in the text or in figure legends. Student's t test, Mann–Whitney rank-sum test, and Z-test were performed using the SigmaStat 4.0 software (Systat Software). The OriginPro 2019 software (OriginLab) was used for graphing.

Results

A large fraction of TG corneal neurons exhibit mechanosensitivity

We identified, using epifluorescence illumination, the cell bodies of intact (Fig. 1A, left) and cultured TG corneal neurons (Fig. 1A, right), retrogradely labeled with FM 1-43FX applied to the eye surface in adult wild-type mice, and performed patch-clamp recordings on their somas. As expected, retrogradely labeled cells were found in the ophthalmic branch of the TG.

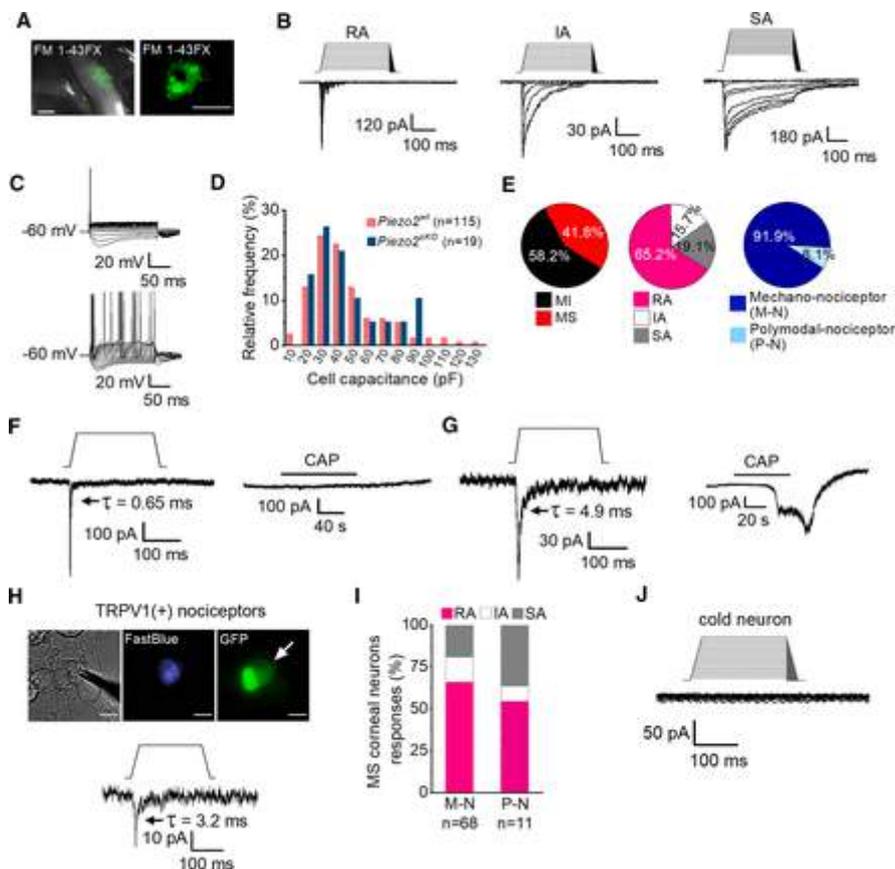


Figure1.

Mechanically activated currents in trigeminal corneal neurons. *A*, FM 1-43 FX fluorescent labeling of TG ganglia in fresh tissue (left) and of TG cultured cells (right) after its application to the corneal surface. Scale bars: left, 500 μm ; right, 25 μm . *B*, Representative whole-cell recordings in the voltage-clamp configuration ($V_{\text{hold}} = -60$ mV) of the three general subtypes of mechanically activated currents, RA, IA, and SA, recorded from cultured corneal TG neurons identified by FM 1-43 FX labeling. Mechanical stimuli in 1 μm increments are indicated on top of each recording. Time constants of current relaxation are indicated in each panel. *C*, Representative whole-cell recordings in current-clamp configuration showing the phasic ($n = 62$, top) and tonic ($n = 9$, bottom) firing pattern of corneal TG neurons. *D*, Frequency histogram of cell capacitance shows that TG mechanically activated neurons are mainly of small and medium size and that the size distribution was similar for wild-type (pink) and *Piezo2*^{CKO} mice (blue). *E*, Pie plots showing the distribution of mechano-sensitive (MS) (115 of 275) and mechano-insensitive (MI) corneal TG neurons (160 of 275; left); the proportion of the different types of mechanically activated currents is displayed with respect to the total number of MA recorded neurons ($n = 115$; central pie plot) and the distribution of the pure mechano-nociceptor (M-N; 68/74) and polymodal nociceptor (P-N; 6/74; right) neurons. *F, G*, Representative recordings of RA mechanically activated whole-cell currents ($V_{\text{hold}} = -60$ mV) of corneal neurons in response to mechanical indentation (left panels) and to 100 nm capsaicin (right panels). Mechanical stimuli of 250 ms duration are indicated on top of the recordings (11 μm and 7 μm respectively). *H*, Phase-contrast image (left) of a Fast Blue-labeled corneal neuron (middle) expressing TRPV1 (right, arrow), identified by the expression of GFP. Note that GFP labels two adjacent neurons. Scale bars, 25 μm . The bottom panel shows the whole-cell current response of the labeled neuron in the top panels to mechanically indentation (15 μm). The patch electrode in the phase-contrast image indicates the recorded neuron. *I*, Comparison of the proportions of MS corneal neurons responding with RA, IA, and SA currents in M-N ($n = 68$) versus P-N ($n = 11$); $p = 0.682$ (RA), $p = 0.0.977$ (IA), and $p = 0.370$ (Z-test). *J*, Representative traces of a whole-cell recording in the voltage-clamp configuration ($V_{\text{hold}} = -60$ mV) of a TRPM8-expressing cold-sensitive cultured corneal TG neuron identified by the expression of EYFP, showing the absence of a response to mechanical indentation. The mechanical stimulus in 1 μm increments is indicated on top of the recording. Time constants (τ) of MA current inactivation are indicated for each panel.

In a fraction of these neurons, sustained cell membrane indentation, conducted with an electrically driven glass probe, evoked MA currents showing graded increases in amplitude in response to progressively larger indentation values (Fig. 1*B*). MA currents were evoked in 115 of the 275 wild-type corneal TG neurons explored (Fig. 1*E*, left pie plot). MA currents were further classified as RA, IA, and SA, based on their inactivation time course (Hu and Lewin, 2006; Coste et al., 2010; Fig. 1*B,E*, central pie plot). Almost two-thirds were RA. Injection of current pulses on corneal MA neurons generally evoked phasic action potential firing (62 of 71; Fig. 1*C*, top), with only a few neurons showing a tonic firing pattern (9 of 71; Fig. 1*C*, bottom). Passive membrane properties (membrane potential, rheobase, input resistance, and cell capacitance) of MA corneal TG neurons were similar to those reported in the general population of TG neurons (Cabanes et al., 2002). Parameters were analyzed for each class of mechanosensitive (MS) neuron (i.e., RA, IA, and SA); membrane potential, rheobase, input resistance, and cell capacitance were not different for the three classes. However, we did find that the peak current density was significantly

higher in SA MS neurons (15.9 ± 3.8 pA/pF) compared with RA MS neurons (7.4 ± 1.4 pA/pF; Table 2). In agreement with their capacitance values, corneal neurons are predominantly distributed within the small- to medium-sized population of TG neurons (Fig. 1D).

Table 2. Passive membrane properties of retrogradely labeled corneal neurons

		Membrane potential (mV)	Rheo-base (pA)	Input resistance (MΩ)	Mechanical threshold (μm)	Current amplitude (pA/pF)	Cell capacitance (pF)
WT	RA	-61.5 ± 1.4 (n = 75)	407 ± 36 (n = 45)	89.1 ± 9.8 (n = 71)	6 ± 0.3 (n = 75)	7.4 ± 1.4 (n = 75)	40 ± 2.6 (n = 75)
	IA	-65.7 ± 1.5 (n = 18)	486 ± 86 (n = 10)	88.5 ± 18.6 (n = 18)	6.6 ± 0.8 (n = 18)	6.7 ± 1.9 (n = 18)	43.7 ± 6.4 (n = 18)
	SA	-62.9 ± 1.7 (n = 22)	401 ± 59 (n = 15)	104 ± 23.5 (n = 22)	5.6 ± 0.6 (n = 22)	$15.9 \pm 3.8^*$ (n = 22)	39.2 ± 5.8 (n = 22)
<i>Pi- eoz2^{ckO}</i>	RA	-58.4 ± 2.9 (n = 14)	401 ± 85 (n = 8)	56.1 ± 5.9 (n = 14)	$3.9 \pm 0.9^\#$ (n = 14)	5.8 ± 1.6 (n = 14)	39.9 ± 6 (n = 14)
	IA	-81.1 (n = 1)	322 (n = 1)	40 (n = 1)	11 (n = 1)	2.3 (n = 1)	21.3 (n = 1)
	SA	-60.8 ± 5.4 (n = 4)	355 (n = 1)	55.3 ± 12.6 (n = 4)	5.5 ± 1.5 (n = 4)	6.7 ± 3.8 (n = 4)	47.4 ± 12.5 (n = 4)

Electrical properties of mechanosensitive corneal neurons from wild-type and *Piezo2^{ckO}* mice. Mean \pm SE values are given for each parameter. Membrane potential values were adjusted for the calculated liquid junction potential of +12 mV. To compare the means of different parameters among the three types of MA cells, the Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks test and the Dunn's method one-way ANOVA test were used.

*Density of current in SA cells is significantly higher than in RA cells in wild-type mice ($p = 0.037$). To compare the means of different parameters for each type of cell between wild-type and *Piezo2^{ckO}* mice, the Student's *t* test and Mann–Whitney rank-sum test were used.

#The mechanical threshold in RA cells from *Piezo2^{ckO}* mice is lower than in RA cells from wild-type mice ($p = 0.013$). The absence of symbols indicates the lack of significant differences.

Distinct subpopulations of corneal neurons display mechanically activated currents

During voltage-clamp recordings performed on MA cultured corneal neurons, we observed that the majority (68 of 74) were insensitive to the application of 100 nm CAP, the selective agonist of TRPV1 channels typically expressed by polymodal nociceptor neurons (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Fig. 1E, right pie chart, F). Thus, capsaicin insensitivity was used to define the group of pure mechano-nociceptor corneal neurons (Belmonte et al., 1991). The remaining six MA neurons, where CAP evoked an inward current, were unambiguously considered as corneal polymodal nociceptor neurons (Fig. 1G; Belmonte et al., 1991). The proportion of polymodal corneal neurons recorded, using this criterion, was lower than expected from previous studies in peripheral corneal nerve terminals (Chen et al., 1997; González-González et al., 2017). Thus, to rule out any possible bias in the selection of recorded neurons or a damaging effect of the mechanical stimulation, applied before the CAP application, we further characterized the polymodal nociceptor subpopulation using a transgenic mouse line expressing EGFP under the promoter of TRPV1 (*TRPV1-GFP*). First, using intracellular Ca²⁺ imaging, we examined whether GFP expression in this line is a reliable marker for the polymodal phenotype. We measured calcium responses to CAP (100 nm) and heat (49 ± 0.3°C) in Fura2-loaded cultured TG neurons. We found that 31% of them (27 of 87 cells) expressed the EGFP protein (Fig. 2A) and, as expected, the great majority responded to TRPV1 agonists (Fig. 2B). As shown in the representative traces of Figure 2B, heat and capsaicin evoked calcium increases in the three GFP-labeled TG neurons in this imaging field. In contrast, very few GFP– cells were activated by capsaicin. A summary of their calcium responses to heat or capsaicin is shown in Figure 2, C and D, for GFP+ and GFP– TG neurons, respectively. The functional data show that virtually all of the GFP+ neurons were activated by CAP (96%; Fig. 2C) while only 8% of the GFP– neurons responded to this agonist (Fig. 2D); these proportions were significantly different ($p < 0.001$; Z-test). Moreover, the majority of GFP+ neurons were activated by heat (93%; Fig. 2C), a responsiveness that was also found in a smaller fraction of GFP– neurons (30%; Fig. 2D), consistent with the notion that noxious heat sensitivity in primary sensory neurons is determined by other channels in addition to TRPV1 (Vandewauw et al., 2018). Venn diagrams of these results show that almost all GFP+ responded to CAP and heat (Fig. 2C) and only 4 of 60 of the GFP– were CAP and heat sensitive (Fig. 2D). The same results were obtained using a higher concentration of CAP (200 nm; data not shown). Therefore, we conclude that GFP expression is a good proxy of TRPV1 expression in TG neurons of this transgenic mouse line, indicating that it can be used to identify TRPV1+ nociceptive neurons.

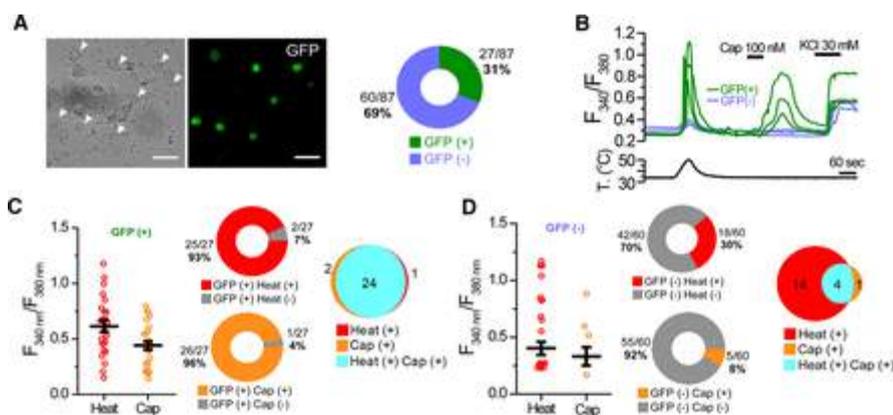


Figure 2.

Functional characterization of the *TRPV1-GFP* transgenic mouse line. *A*, Representative transillumination (left) and GFP fluorescence (right) images of TG cultured neurons from a *TRPV1-GFP* mouse. Arrowheads in the left panel indicate the GFP+ neurons in the right panel. Scale bar, 20 μ m. Diagram indicates the proportion of GFP+ and GFP- TG neurons from *TRPV1-GFP* mice. *B*, Time course of the averaged Fura2 ratio changes in cultured TG neurons during application of heat (50°C) and capsaicin (Cap, 100 nM); high K+ was also applied to test the viability of neurons. Bottom trace represents the simultaneous recording of the bath temperature during the experiment. Green traces represent GFP+, and blue traces represent GFP- cells. *C*, *D*, Dot plot of calcium increase exhibited by individual cells in response to heat and CAP of GFP+ and GFP- neurons; error bars indicate the SEM. Central diagrams show the proportion of the responses to CAP (26 of 27) and heat (25 of 27) in GFP+ neurons, and to CAP (5 of 60) and heat (18 of 60) in GFP- neurons during the protocol shown in *B*. Venn diagrams summarize the responses to heat and capsaicin, and their overlap. Results in this figure were obtained from eight independent experiments from two mice.

Next, we tested the mechanosensitivity of retrogradely labeled corneal neurons in *TRPV1-GFP* mice (Fig. 1H). MA currents were recorded in 5 of 51 of the GFP+ corneal neurons (9.8%), 4 of them belonging to the RA type (Fig. 1H) and 1 to the SA type. This shows that only a small fraction of the somas of corneal TRPV1-expressing nociceptors in mouse responded to mechanical indentation. For further analysis, we pooled together the results of capsaicin-activated corneal polymodal neurons recorded in the C57BL/6J and in GFP+ neurons of *TRPV1-GFP* mice. Pure mechano- and polymodal nociceptors displayed the three types of MA currents in different proportions, but were not significantly different (Fig. 1I). The peak current density was not different between pure mechano-nociceptors (8.6 ± 1.4 pA/pF; $n = 68$) and polymodal nociceptors (4.2 ± 1.4 pA/pF; $n = 11$; $p = 0.248$; Student's *t* test, Mann-Whitney rank-sum test). We also tested the effect of mechanical indentation on TG cold thermoreceptor neurons in a transgenic mouse expressing YFP under the control of the transient receptor potential melastatin 8 (*TRPM8*) channel promoter (Morenilla-Palao et al., 2014). None of these cold thermoreceptor neurons ($n = 12$) responded to mechanical indentation (Fig. 1J).

Piezo2 is expressed in corneal mechanosensitive neurons of different submodality

Next, we asked whether Piezo2 is expressed by the two subclasses (i.e., pure mechano-nociceptors and polymodal nociceptors) of mechanosensitive TG corneal neurons and whether the expression correlates with kinetic features of the currents. To this end, we combined recordings of MA currents, their kinetic analysis, and responses to CAP, with subsequent immunofluorescence staining for tracking Piezo2+ corneal neurons in culture using a reliable antibody against Piezo2 (Florez-Paz et al., 2016). Immunoreactivity for Piezo2 was tested in 36 of the MA neurons previously recorded. Twenty-five were unequivocally identified as purely mechano-nociceptive neurons, 8 were CAP sensitive or TRPV1-GFP+ (i.e., polymodal nociceptor neurons), and 3 of them could not be classified because CAP sensitivity was not tested. Identification of the recorded neurons in the coverslip after immunohistochemistry was possible in 23 of the 36 tested neurons. Piezo2 expression was confirmed in 18 neurons (78.2%), 14 pure mechano-nociceptive neurons, and 1 polymodal nociceptor; 3 of them could not be subclassified further. The remaining five MA neurons (21.8%) were Piezo2-, of which four were identified as pure mechano-nociceptors and 1 as a polymodal nociceptor. These results suggest that Piezo2 is the major, but not the unique, transducer of mechanical forces in MS corneal neurons. Piezo2 expression was more frequent in RA (85.7%) than in IA (66.6%) and SA (66.6%) neurons, but differences between these proportions did not reach statistical significance ($p = 0.963$ and $p = 0.713$, respectively; Z-test; Fig. 3H). These results evidence the lack of a strict correlation between Piezo2 expression and the kinetic features of the MA currents.

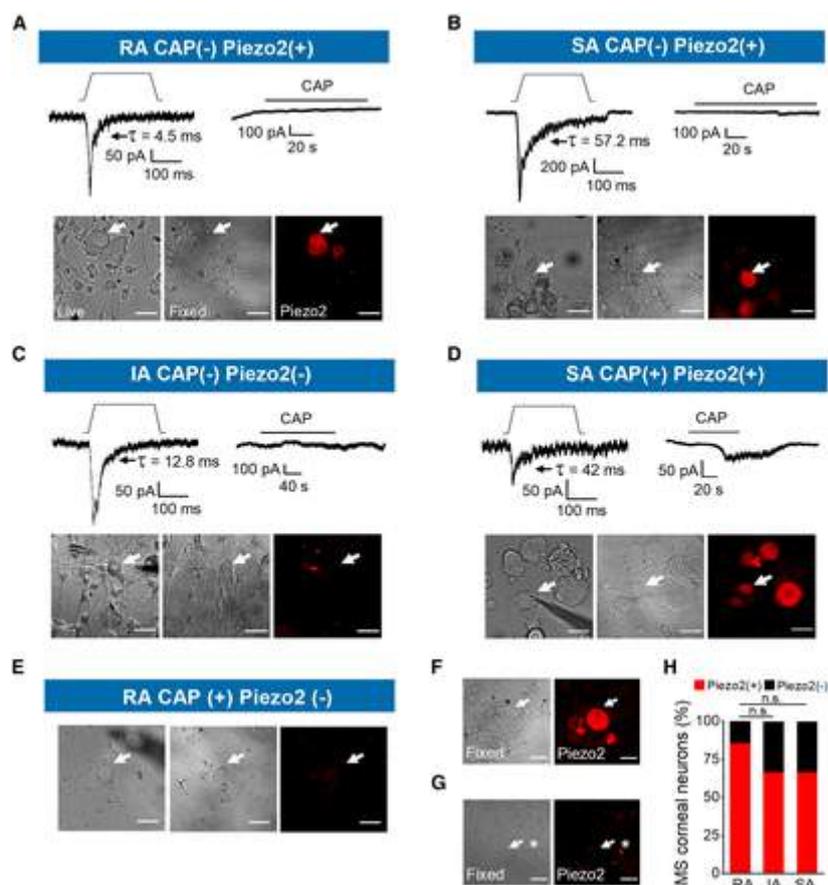


Figure 3.

Piezo2 is expressed in mechanosensitive trigeminal corneal nociceptors. A–D, Representative whole-cell currents ($V_{\text{hold}} = -60$ mV) in response to static indentation, depicted on top of each recording (15, 15, 12, and 7 μ m, respectively). Mechanical stimuli activate inward currents with different inactivation kinetics (top left panels); the type of MA current is indicated in the top label of each panel (RA, IA, SA). Top right panels show the current responses of the same neurons to 100 nM CAP. Bottom panels show phase-contrast images of the recorded neurons, indicated by the arrows, in live (left), fixed conditions (center) and after immunostaining for Piezo2 (right panels). Scale bars, 25 μ m. E, Phase-contrast images of the recorded neuron in Figure 1G, indicated by the arrow, in live (left) and fixed conditions (center), and after immunostaining for Piezo2 (right). F, Piezo2 immunofluorescence was visible in neighboring neurons in another field from the same coverslip. Scale bars, 25 μ m. G, Uncropped image of the same field shown in Figure 3C. Left, Phase-contrast image of the recorded neuron, indicated by the arrow in fixed conditions (left) and after immunostaining for Piezo2 (right). The asterisk points to a neighboring positive neuron for Piezo2. Scale bars, 50 μ m. H, Bar graph representing the proportion of Piezo2+ and Piezo2- corneal neurons responding with rapidly ($n = 14$), intermediately ($n = 3$), and slowly ($n = 6$) adapting mechanically activated currents. n.s., not significant.

Figure 3A–C shows examples of the indentation-induced RA, SA, and IA currents evoked in three CAP-insensitive corneal neurons. Two of them (Fig. 3A,B, top panels) are immunoreactive for Piezo2 and one lacks Piezo2 (Fig. 3C). Images of the only two identified mechanosensitive polymodal nociceptive neurons, one displaying SA current that expresses Piezo2 and one RA

neuron negative for Piezo2 are shown in Figure 3, *D* and *E*, respectively. The images in Figure 3*E* correspond to the RA neuron shown in Figure 1*G*. The lack of Piezo2 staining was not because of failure of Piezo2 labeling because Piezo2 was always visible in other neighboring neurons (Fig. 3*F*, arrow, *G*, asterisk).

Importantly, this analysis revealed that Piezo2 is expressed in most MS corneal neurons, basically in the pure mechano-nociceptor class (93.3%, 14 of 15; $p < 0.001$, Student's *t* test) and mediates RA, IA, and SA current adaptation types. Our analysis also evidenced that a small population of TRPV1-GFP+ corneal neurons (i.e., polymodal nociceptors responded to mechanical stimulation; 9.8%; Fig. 1*H*).

Combined, these two findings suggest that most polymodal nociceptors (TRPV1+ neurons) are Piezo2-GFP– and that the majority of Piezo2+ neurons do not express TRPV1. To confirm this observation, we examined the immunocolocalization of Piezo2 and GFP in *TRPV1-GFP* mice in cultured TG ganglion neurons. Neurons were counted from a mosaic image of an entire coverslip (Fig. 4*A*, top left). Of 671 TRPV1+ neurons, only 152 are labeled for Piezo2 (23%). This proportion is somewhat higher but is in line with the proportion of corneal polymodal neurons responding to mechanical indentation (9.8%; Fig. 1*H*). Likewise, a low proportion of the labeled Piezo2 TG neurons were also positive for TRPV1 (18%; 152 of 826), suggesting that Piezo2+ neurons are mainly pure mechano-nociceptors. A similar low overlap for both markers was observed in DRG neurons (Coste et al., 2010). This proportion is somewhat higher than the one obtained from our functional analysis in which only 1 of the 15 (6.7%) Piezo2+ MS corneal neurons was a polymodal nociceptive neuron. A possible explanation for these differences is that corneal polymodal neurons represent a smaller fraction within the entire population of TG neurons of such modality or that the expression of Piezo2 in some corneal neurons is not sufficient to evoke a recordable mechanical response.

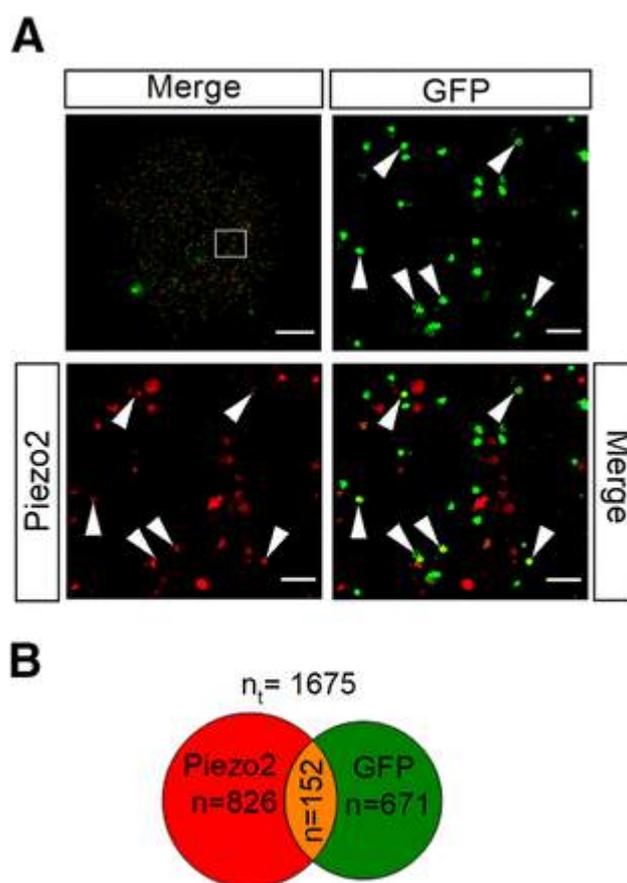


Figure 4

Piezo2 and TRPV1 are coexpressed in a small fraction of TG neurons. *A*, Immunostaining of TG cultured neurons from *TRPV1-EGFP* mice with anti-GFP (green) and anti-Piezo2 (red). Top left, A composite image assembled from multiple high-resolution images of an entire coverslip. The boxed region is magnified in the right and bottom images. Arrowheads indicate examples of GFP+/Piezo2+ neurons. Scale bars: entire coverslip image, 1 mm; magnified views, 100 μ m. *B*, Venn diagram showing the quantification of TG neurons that express Piezo2, TRPV1, and overlap between both populations [total number (n_t) of neurons analyzed = 1675].

Sensory-specific genetic ablation of Piezo2

To determine the contribution of Piezo2 to the generation of MA currents in corneal neurons, we generated a sensory-specific conditional *Piezo2* knock-out (*Piezo2^{ckO}*) mouse. This allowed the selective ablation of Piezo2 channels in adult sensory neurons. To this end, we crossed floxed *Piezo2* mice (*Piezo2^{fl/fl}*; Woo et al., 2014) with an *Advil-Cre* mouse, a line expressing Cre recombinase under the sensory neuron-specific *Advillin* promoter (Zurborg et al., 2011). Immunocytochemical analysis in cultured TG neurons, identified by β -III-tubulin labeling (Fig. 5A), revealed that 58% of TG neurons of wild-type littermate mice are immunoreactive for Piezo2 (Fig. 5A,B). Compared with wild type, Piezo2 expression was significantly reduced ($p < 0.001$) but still expressed in a significant fraction (31.7%) of TG neurons from *Piezo2^{ckO}* mice (Fig.

5A,B). Thus, Piezo2 was reduced by 45% compared with wild-type littermates. These results evidenced that the efficiency of *Piezo2* ablation in this recombination system was incomplete, as had been shown previously (Zhang et al., 2019). Nevertheless, Piezo2 reduction was sufficient to generate an altered sensory–motor phenotype as has been described for the ablation of *Piezo2* in proprioceptive sensory neurons (Ranade et al., 2014; Woo et al., 2015; Florez-Paz et al., 2016). Thus, when suspended from their tails, the position of the hindlegs in *Piezo2*^{CKO} mice was abnormal (Fig. 5C), which is indicative of proprioceptive deficits. Compared with wild-type littermates, *Piezo2*^{CKO} mice also presented a reduced sensitivity to light-touch stimuli when tested with a cotton swab stroke over their paws (Ranade et al., 2014; Fig. 5C, bottom).

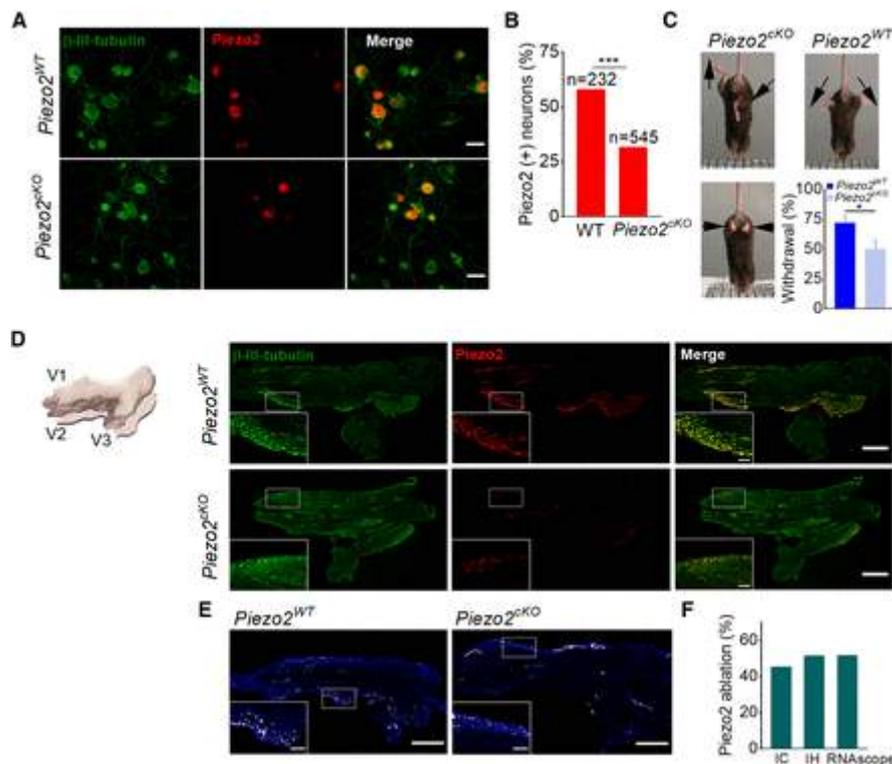


Figure 5.

Histologic and functional characterization of *Piezo2*^{CKO} mice. A, Images of cultured TG neurons immunostained for β -III-tubulin (green) and Piezo2 (red), and merged image from wild-type littermate and *Piezo2*^{CKO} mice. Scale bars, 50 μ m. B, Comparison of the percentage of Piezo2+ neurons in wild-type littermate (n = 2) and *Piezo2*^{CKO} mice (n = 3; ***p < 0.001; Z-test). Five to seven coverslips were analyzed from each mouse. C, Representative images of leg posture in *Piezo2*^{CKO} mice (left) when lifted by their tails, showing hindlimb retraction or opposite positioning. None of these postures was observed in their wild-type littermates (right); arrows indicate the orientation of the limbs. The bottom histogram shows the proportion of withdrawal responses to gentle sweep (repeated five times) with a cotton swab over the glabrous surface of the hindpaw in wild-type littermate (n = 9) and *Piezo2*^{CKO} (n = 9) mice. Error bars

represent the SEM. * $p = 0.025$, Student's t test analysis. D, Schematic representation of the TG, illustrating the plane of section used for immunohistochemistry (left). The three peripheral nerves coming together, V1 (ophthalmic branch), V2 (maxillary branch), and V3 (mandibular branch), are indicated. Representative confocal images of sections of TG immunolabeled for β -III-tubulin (green) and Piezo2 (red), and the merged image in the right panels for wild-type littermates and for *Piezo2^{ckO}*. Piezo2 neurons only represent a fraction of β -III-tubulin+ TG neurons. Scale bars, 500 μ m. Insets show magnified views of the regions marked with the dotted squares. Scale bars, 100 μ m. E, Representative confocal images of Piezo2 staining with the RNAscope probe in TG sections from wild-type littermate and *Piezo2^{ckO}* mice. White, Piezo2 transcripts; blue, DAPI. Scale bar, 500 μ m. Insets show magnified views of the regions marked with the dotted squares. Scale bars, 100 μ m. F, Histogram shows the percentage of the ablation of Piezo2 in *Piezo2^{ckO}* mice using immunocytochemistry (IC), immunohistochemistry (IH), and RNAscope in situ hybridization techniques.

We also examined the expression of Piezo2 in TG slices from wild-type littermates and *Piezo2^{ckO}* mice. Slices were cut in the axial (i.e., horizontal) plane to visualize the entire TG (Fig. 5D). This is an important consideration because the TG cell bodies are somatotopically distributed in particular areas within the ganglion that may harbor different proportions of mechanosensitive neurons. Piezo2 expression was detected in 41.7% of TG neurons from wild-type littermates (Fig. 5D, top panels; $n = 3979$ cells, 6 slices, 3 mice) and in 20.3% of the *Piezo2^{ckO}* mice (Fig. 5D, bottom panels; $n = 5884$, 8 slices, 4 mice), representing a reduction of 51.3%. Two immunohistochemistry experiments were performed in parallel in wild-type and *Piezo2^{ckO}* mice that were analyzed independently. Differences in the proportions of neurons expressing Piezo2 were statistically significant for each of the two experiments ($p < 0.001$, Z-test analysis).

We additionally tested the ablation of *Piezo2* in *Piezo2^{ckO}* mouse by performing *in situ* hybridization of *Piezo2* mRNA with RNAscope technology (ACDBio). TG slices were cut in the axial plane. We compared *Piezo2* transcript fluorescence from wild-type littermates ($n = 32$ regions, 4 slices, 2 mice) and *Piezo2^{ckO}* ($n = 33$ regions, 6 slices, 3 mice) and observed a 51.6% deletion of *Piezo2* transcripts in *Piezo2^{ckO}* mice (Fig. 5E). In conclusion, *Piezo2* ablation efficiency was ~50% and was consistent when evaluated with the following three different approaches: immunocytochemistry technique in cultured cells and TG slices, and RNAscope *in situ* hybridization (Fig. 5F).

Ablation of Piezo2 reduces the proportion of corneal neurons responding to mechanical indentation

Next, we examined the mechanosensitivity of TG cultured corneal neurons after genetic *Piezo2* ablation. Notably, the ablation of *Piezo2* caused an incomplete but significant reduction in the percentage of corneal neurons responding to mechanical indentation,

decreasing from 41.8% (115 of 275; Fig. 1E) in wild-type mice to 18.8% (19 of 101 neurons) in the *Piezo2^{ckO}* mice (Fig. 6A).

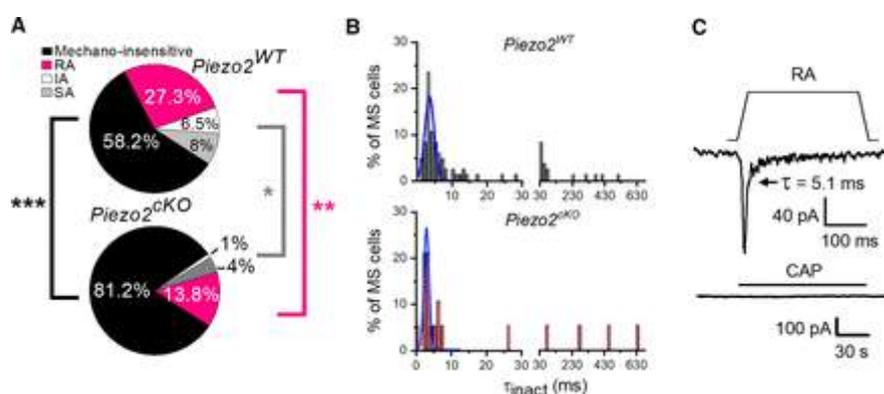


Figure 6.

TG corneal mechanosensitive neurons are reduced in *Piezo2^{ckO}* mice. **A**, Pie plots show the proportion of mechano-insensitive and mechano-sensitive corneal trigeminal neurons and the distribution of the different types of mechanically activated currents, RA, IA, and SA, in wild-type (top, $n = 275$) and *Piezo2^{ckO}* (bottom, $n = 101$) mice. Black asterisks indicate differences in the proportion of mechano-insensitive neurons. Pink and gray asterisks indicate differences between proportions of RA and IA/SA currents, respectively, for wild-type versus *Piezo2^{ckO}* mice ($***p < 0.001$, $**p = 0.01$, $*p = 0.018$; Z-test analysis). **B**, Frequency distribution of inactivation time constants (τ_{inact}). Data collected from 85 TG neurons in wild-type and 19 in *Piezo2^{ckO}* mice, voltage clamped at -60 mV and mechanically activated. Gaussian fits (blue traces) identified only one peak of inactivation time (τ ; 3.75 ± 0.26 ms for *Piezo2^{WT}* mice and 3.05 ± 0.13 ms for *Piezo2^{ckO}* mice). The bin width was 1 ms up to 30 ms, and 20 ms from 30 ms onward. **C**, Example of a corneal neuron of *Piezo2^{ckO}* mice that displayed RA MA currents and did not respond to 100 nm capsaicin (bottom; $V_{hold} = -60$ mV). Mechanical stimulus (11 μ m) is indicated on top of the recording (top). Time constant of current inactivation is indicated in the panel.

The distribution of inactivation time constants (τ_{inact}) was similar in wild-type and *Piezo2^{ckO}* neurons (Fig. 6B). The majority of MS corneal neurons recorded in *Piezo2^{ckO}* mice responded with RA currents (73.7%, $n = 14/19$), while indentation evoked SA currents in 21% ($n = 4$ of 19) and IA currents in 5.3% ($n = 1$ of 19) of all corneal MS neurons. There were not significant differences in these proportions compared with wild-type mice (73.7% vs 65.2% RA currents, $p = 0.642$; 5.26% vs 15.6% IA currents, $p = 0.397$; 21% vs 19.1%, SA currents, $p = 0.905$; Z-test). Likewise, the average values of membrane potential, rheobase, input resistance, peak current density, and cell capacitance of each type of MS neurons from *Piezo2^{ckO}* mice were not different compared with wild-type mice. In contrast, the mechanical threshold decreased significantly in RA corneal neurons of *Piezo2^{ckO}* mice (Table 2). Such modest differences in threshold may be explained by the variability within the few number of cells that responded to mechanical stimulation in the KO mice.

The proportion of RA MS neurons was reduced significantly in *Piezo2^{ckO}* mice compared with wild-type mice (Fig. 6A; 13.9% vs 27.3% RA currents; ** $p = 0.01$, Z-test). The proportions of IA and SA currents were also reduced (IA currents, 0.99% vs 6.55%; SA currents, 3.96% vs 8%), but differences did not reach statistical significance ($p = 0.056$ and $p = 0.255$, respectively). A very low number of IA and SA MS neurons were recorded in *Piezo2^{ckO}* mice. When grouped together, the proportion of IA/SA MS neurons was significantly reduced in *Piezo2^{ckO}* mice (IA/SA currents, 14.6% vs 4.95%, $p = 0.018$; Z-test). However, average values of peak current density of RA and IA/SA MS neurons were similar when comparing *Piezo2^{ckO}* (5.8 ± 1.6 pA/pF; $n = 14$) to wild-type (7.4 ± 1.4 pA/pF; $n = 75$) RA currents ($p = 0.906$), and IA/SA currents [5.9 ± 3.1 pA/pF ($n = 5$) vs 11.8 ± 2.3 pA/pF ($n = 40$); $p = 0.213$; Student's *t* test, Mann–Whitney rank-sum test; Fig. 6C], suggesting that Piezo2 accounts for the different types of MA currents.

Notably, none of the MA corneal neurons of *Piezo2^{ckO}* mice in which CAP could be tested (8 of 19) responded positively to this compound (Fig. 6C). This is not entirely surprising if we recall that the large majority (91.9%) of MS neurons are capsaicin insensitive in wild-type mice.

Piezo2 is expressed in peripheral polymodal and pure mechanosensory axons of the mouse cornea

To further define the contribution of Piezo2 channels to the mechanical sensitivity of the different functional subclasses of corneal sensory neurons, we analyzed Piezo2 expression in their peripheral axons. A schematic diagram of corneal innervation is represented in Figure 7A, showing how the thick nerve trunks of the subepithelial plexus in the stroma give rise to ascending branches that penetrate through the basal lamina and split into thin, parallel nerve bundles of 7–20 fibers (“leashes”) in the sub-basal plexus (Alcalde et al., 2018). These thin nerve bundles, which run just below the corneal basal epithelium cell layer, give rise to ascending nerve terminal branches along their long trajectory that end at variable heights between the stratified corneal epithelium cells (Müller et al., 2003; Marfurt et al., 2010). To visualize the trajectories of nerves traveling from the corneal stroma to the epithelium, we performed triple immunolabeling in whole mounts of the cornea from C57BL/6J mice stained with antibodies for β -III-tubulin (red), TRPV1 (green), and Piezo2 (white) (Fig. 7B). In some experiments from *TRPV1-GFP* mice, we used an anti-GFP antibody to identify putative TRPV1+ endings. Analysis of confocal image stacks in flattened corneal whole-mounts allowed us to follow the full trajectories of subepithelial bundles, individual sub-basal nerve axons, and intraepithelial terminals. Figure 7B shows a representative example of a subepithelial nerve bundle in the stroma (Fig. 7B, arrowhead), the penetration points through the basal lamina of the ascending

subepithelial nerve bundles (Fig. 7B, circles), and their branching into sub-basal axons. Subepithelial bundles and sub-basal axons labeled for TRPV1 were frequent, but none of them stained for Piezo2. Nonetheless, we observed coimmunostaining of Piezo2 and TRPV1 in the majority of penetration points (Fig. 7B, yellow circles). Only a few of these penetration points were labeled only for Piezo2 or TRPV1 (Fig. 7B, cyan circle, labeled for TRPV1 and negative for Piezo2).

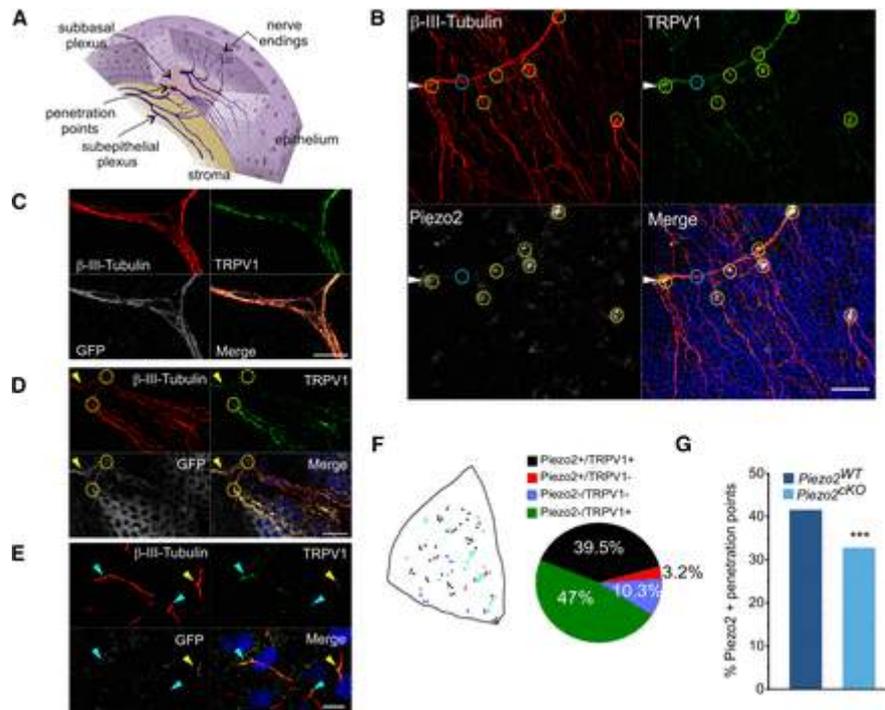


Figure 7.

Piezo2 is detected in mouse corneal nerve terminals. *A*, Sketch of the neuroanatomical structure of the cornea. The subepithelial nerves in the stroma traverse the basal lamina through penetration points and branch into sub-basal plexuses that give rise to ascending intraepithelial terminals. *B*, Z-stacked confocal images of a whole-mount cornea from a C57BL/6J mouse, showing a subepithelial bundle (arrowhead), points where subepithelial nerves penetrate the basal lamina (circles) and thinner sub-basal nerves after penetrating through the basal lamina. Nerves were immunolabeled with anti- β -III-tubulin (red), nerve fibers immunopositive for TRPV1 display green fluorescence, and those immunopositive to the Piezo2 antibody appear stained in white. Yellow circles indicate the penetration points with nerve bundles positive for TRPV1 and Piezo2, and a cyan circle points to a penetration point positive only for TRPV1. Nuclei of the epithelial cells are stained with Hoechst 33342 stain (blue). Scale bar, 50 μ m. *C–E*, Confocal images of whole-mount corneas from *Piezo2-GFP-IRES-Cre* mice immunolabeled with anti- β -III-tubulin (red), anti-TRPV1 (green), and anti-GFP (white) antibodies. *C*, Subepithelial nerve bundle containing many individual axons in the stromal layer. Nerve bundles were positive for TRPV1 and Piezo2. Scale bar, 10 μ m. *D*, Circles indicate points where a subepithelial nerve (arrowhead) penetrates the basal lamina and divides into sub-basal nerves. Scale bar, 25 μ m. *E*, Simple nerve ending in the corneal epithelium layer that coexpresses Piezo2 and TRPV1 (yellow arrowhead). Cyan arrowheads point to terminals positive for TRPV1, and negative for Piezo2. Nuclei of the epithelial cells are stained with Hoechst 33342 stain (blue). Scale bar, 10 μ m. *F*, Schematic representation of the penetration points of nerve bundles in a corneal quadrant; color

code indicates the expression of Piezo2 and/or TRPV1. Proportion of penetration points expressing Piezo2+/TRPV1+, Piezo2+/TRPV1-, Piezo2-/TRPV1-, or Piezo2-/TRPV1+ ($n = 1347$ from four corneas, divided into four quadrants) is represented in the pie chart. *G*, Proportion of penetration points positive for Piezo2 in wild-type and *Piezo2^{CKO}* mice. *** $p < 0.001$, Z-test analysis.

In an attempt to improve visualization of Piezo2 in corneal nerve fibers, we used an alternative strategy, carrying out triple immunostaining in corneas from *Piezo2-GFP-IRES-Cre* (*Piezo2GFP*) mice, which was previously shown to label Piezo2 in sensory neurons (Woo et al., 2014), colocalizing the GFP label (white) with immunostaining for β -III-tubulin (red) and TRPV1 (green) (Fig. 7C,D,E). We found subepithelial nerve bundles (Fig. 7C) and sub-basal nerve fibers (Fig. 7D) positive for GFP and TRPV1 ($n = 5$ corneas from 5 mice). We additionally identified a few epithelial terminals characterized as “simple” nerve terminals (Alamri et al., 2015) expressing Piezo2 and TRPV1 with anti-GFP and anti-TRPV1 antibodies in whole-mount corneas of *Piezo2GFP* mice (Fig. 7E, yellow arrowhead). Other intraepithelial nerve terminals were positive only for TRPV1 (Fig. 7E, cyan arrowheads). Despite our efforts, the detection of Piezo2 in corneal nerves was irregular among samples, making it difficult to quantify the coexpression of Piezo2 and TRPV1. Thus, using *TRPV1-GFP* mice, we made a general estimation of the spatial distribution and the density of presumed Piezo2+/TRPV1+, Piezo2+/TRPV1-, Piezo2-/TRPV1- and Piezo2-/TRPV1+ nerve bundles by counting the number of basal lamina penetration points of branches running into the different corneal epithelium layers that exhibited positive immunostaining to three markers: β -III-tubulin, GFP, and Piezo2 (Fig. 7F; four corneas from three mice). We found that 86.5% of the basal lamina nerve bundle penetration points showed TRPV1 immunofluorescence; ~40% of them also expressed Piezo2. Penetration points marked only for Piezo2 were very rare (Fig. 7F, pie plot). Quantification of penetration points positive for Piezo2 in the *Piezo2^{CKO}* mice evidence a modest but significantly reduced proportion, from 41.5% to 32.7% (three corneas from three mice; Fig. 7G).

Altogether, the results with immunocytochemical staining confirm the presence of Piezo2 in many of the peripheral axons of TG neurons innervating the cornea, although very few ascending intraepithelial nerve terminal branches expressing Piezo2 were identified, and the significant reduction of Piezo2 expression in corneal nerves of the *Piezo2^{CKO}* mice.

Piezo2 contributes to mechanical sensitivity in corneal pure mechanoreceptor and polymodal nociceptor sensory nerve terminals

To test directly the hypothesis that Piezo2 participates in the peripheral transduction of mechanical forces by the different functional classes of corneal sensory endings, we recorded

NTI activity in functionally characterized single sensory endings of the cornea in *Piezo2^{CKO}* mice and their wild-type littermates. Active terminals were identified by placing the recording electrode sequentially onto neighboring points of the corneal surface (González-González et al., 2017), searching for the presence of spontaneous activity and/or responsiveness to 100 μ m and/or 200 μ m mechanical indentations. The sensitivity of corneal terminals to heat (i.e., polymodal nociceptor) and cold (i.e., cold thermoreceptor) was subsequently explored. In wild-type littermates of *Piezo2^{CKO}* mice, mechanical sensitivity to 100 μ m and/or 200 μ m was observed in approximately one-fourth of the total recording attempts (36 nerve terminals in 157 corneal surface points tested; Fig. 8A,B). Terminals responding to a mechanical stimulus and to heating over 40°C were classified as polymodal nociceptors and were recorded with a probability of 7.6% (Fig. 8C). In a few cases (4 of 36) in which mechanically sensitive/cold-insensitive corneal terminals were obtained, the recording was lost before heat application; thus, their functional subcategory within the group of mechanosensitive terminals could not be further identified. The probability of recording at a site that responded only to the mechanical stimulus, thus classified as pure mechano-nociceptor terminals, was low (3.2%; Fig. 8C). Finally, the probability to record mechano-cold receptors (i.e., terminals responding to indentation plus cooling ramps down to 12°C was 9.6%; González-González et al., 2017; Fig. 8C). In addition, a small proportion of nerve terminals were insensitive to mechanical indentation and responded only to cold (2.5%) or to heat (1.3%; Fig. 8A).

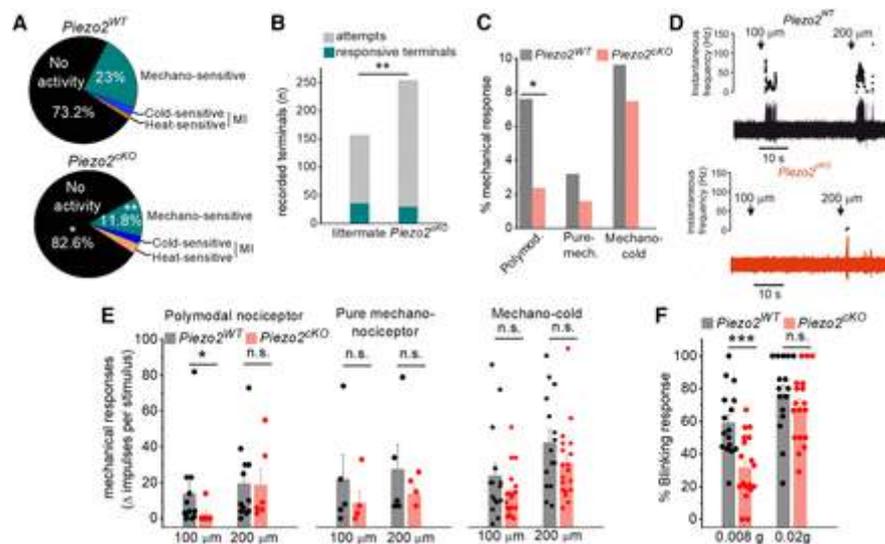


Figure 8.

Piezo2 is involved in corneal nerve terminal mechanosensitivity. **A**, Distribution of the different functional classes of corneal terminals recorded in wild-type littermates (15 eyes from 9 animals) and *Piezo2^{CKO}* mice (20 eyes from 15 animals; $**p = 0.004$; Z-test). **B**, Stacked bar plot shows significant differences in the

successful attempts of recording a terminal from wild-type (157 corneal points) compared with *Piezo2^{ckO}* (254 corneal points) mice. *C*, Proportion of corneal mechanosensitive terminals, identified as polymodal nociceptors, pure mechanoreceptors, and mechano-cold receptors from wild-type littermates (gray) and *Piezo2^{ckO}* mice (light red; 5 pure-mechanoreceptors, 12 polymodal nociceptors, and 15 cold thermoreceptors in littermate mice; 4 pure mechanoreceptors, 6 polymodal nociceptors, and 19 cold thermoreceptors in *Piezo2^{ckO}* mice; * $p < 0.023$; Z-test). *D*, Example of NTI activity in polymodal terminals from a wild-type littermate (top) and a *Piezo2^{ckO}* mice (bottom) evoked by a 5 s forward displacement (100 and 200 μm) of the recording electrode. Arrows indicate the onset of the stimulus. The instantaneous frequency is represented at the top, and the original nerve impulse recording at the bottom. *E*, Histograms showing the increment of NTI activity of the different functional classes of corneal receptors in response to 100 and 200 μm displacement of the recording electrode in wild-type littermate and *Piezo2^{ckO}* mice. Statistically significant differences were observed only in polymodal nociceptors in response to 100 μm (* $p = 0.033$; Student's *t* test, Mann–Whitney rank-sum test; n.s., not significant). *F*, Proportion of blink responses to the application of von Frey filaments (0.008 and 0.02 g) to the cornea in wild-type littermate ($n = 16$) and *Piezo2^{ckO}* ($n = 18$) mice. *** $p < 0.001$ (Student's *t* test). n.s., not significant. *E, F*, Bars represent the averaged response, and the scattered symbols show the individual values of terminal recordings (*E*) or for each mice (*F*).

Compared with wild-type mice, in *Piezo2^{ckO}* mice the probability of recording mechanically activated terminals decreased significantly (30 terminals in 254 tested points, 11.8%; Figs. 8A,B; ** $p = 0.004$, Z-test). In other words, to record the same number of mechanically sensitive terminals, a significantly higher number of attempts was required (Fig. 8B). This was due essentially to the lower presence of mechanosensory polymodal nociceptor (2.4%; * $p = 0.023$) and of pure mechano-nociceptor terminals (1.6%), while mechano-cold thermoreceptor terminals were less affected (7.9%; Fig. 8C); only one terminal initially activated by indentation but not by cold was identified by the recording and lost before heat application. Mechano-insensitive nerve terminals responding only to cold (12°C; 2.4%) or heat (over 40°C; 3.2%) were also found in *Piezo2^{ckO}* mice (Fig. 8A). These results evidence that *Piezo2* ablation reduced, in a variable degree, the impulse activity evoked by moderate indentation in the different modalities of corneal sensory nerve terminals. As shown in Figure 8C, this reduction affected mainly the mechano-sensitive and heat-sensitive polymodal nociceptor terminals and pure mechanosensory-nociceptors terminals. The mechanical responsiveness of cold thermoreceptors in *Piezo2^{ckO}* mice remained essentially unaltered (Fig. 8C).

We further noticed that the response to force of the mechanosensitive terminals of *Piezo2^{ckO}* mice maintaining mechanical responsiveness appeared subtly altered. The sensitivity to low-intensity mechanical stimulation, expressed as the increment of NTIs evoked by sequential 100 and 200 μm indentation pulses compared with basal activity, tended to be lower in *Piezo2^{ckO}* mice compared with wild-type littermates (Fig. 8D,E) and affected differently the functional subpopulations of corneal terminals (Fig. 8E). In *Piezo2^{ckO}* mice ($n = 6$), only one of the six polymodal terminals responded to 100 μm indentation (Fig. 8E); altogether, the

number of NTIs fired by polymodal nociceptor terminals in response to 100 μm indentations was significantly reduced compared with wild-type mice ($n = 12$; mean, 13.8 ± 6.6 vs 2.3 ± 2.3 ; $*p = 0.033$; Fig. 8D, example); no significant differences were observed in the number of NTI discharge evoked by 200 μm indentation (mean, 19.3 ± 6.2 vs 18.8 ± 8.7 ; Fig. 8E). Pure mechano-nociceptors firing responses to 100 and 200 μm in *Piezo2^{ckO}* mice ($n = 4$) were substantially reduced (21.8 ± 13.6 vs 10.8 ± 7.6 and 27.4 ± 13.9 vs 17.25 ± 4.1 NTIs, respectively), but not significantly different when compared with littermates ($n = 5$).

In cold thermoreceptors, the responses to 100 and 200 μm indentations were not significantly different in wild-type mice ($n = 15$) and *Piezo2^{ckO}* mice ($n = 19$; 23.9 ± 6.8 vs 13.9 ± 3.1 and 42.6 ± 6.8 vs 30.6 ± 4.5 NTIs, respectively; Fig. 8E).

Mechanically activated corneal terminals generated a short burst of NTIs at the onset of the 5 s indentation. The duration of the NTI discharges was <5 s in all types of corneal terminals. This pattern corresponds to a fast adaptation that inactivates before the termination of mechanical stimulation. No significant differences were observed in the duration of the NTIs to 100 and 200 μm indentation in wild-type mice compared with *Piezo2^{ckO}* mice in the three types of corneal terminals (Table 3).

Table 3. Duration of the nerve terminal impulses discharge

Terminal type	Indentation	WT	<i>Piezo2^{ckO}</i>
Polymodal nociceptor	100 μm	1.89 ± 0.5 ($n = 9$)	0.8 ($n = 1$)
	200 μm	1.9 ± 0.36 ($n = 11$)	1.55 ± 0.25 ($n = 6$)
Pure mechano-nociceptor	100 μm	1.9 ± 1.04 ($n = 4$)	1.3 ± 0.32 ($n = 3$)
	200 μm	1.2 ± 0.38 ($n = 5$)	1.7 ± 0.66 ($n = 4$)
Cold thermoreceptors	100 μm	2.5 ± 0.55 ($n = 12$)	3.6 ± 0.41 ($n = 12$)
	200 μm	3.7 ± 0.4 ($n = 15$)	3 ± 0.28 ($n = 19$)

Average time (in seconds) of NTIs during the 5 s indentation in the cornea. Data are presented as the mean \pm SE. Statistical comparison of NTIs between wild-type and *Piezo2^{ckO}* mice was performed using the Student's t test and Mann–Whitney rank-sum test.

In summary, the number of responsive terminals and activity, measured as terminal impulse firing, was reduced in *Piezo2^{ckO}* mice at the lowest mechanical force used. These results

suggest that Piezo2 contributes variably to nerve impulse responses to mechanical forces in corneal nerve endings of different nociceptive submodalities.

Piezo2^{CKO} mice show impaired reflex blinking to low-threshold mechanical stimuli

Mechanosensitivity plays an essential role in triggering the protective eye-blinking response (VanderWerf et al., 2003). We quantified the contribution of Piezo2 channels to eye blinking evoked by light mechanical stimulation in unanesthetized animals, counting the number of blinks after unilateral application of von Frey hairs of 0.008 and 0.02 g to the corneas of *Piezo2^{CKO}* mice and their wild-type littermates. The average proportion of blinks evoked with the finest von Frey hair (0.008 g) was significantly reduced in *Piezo2^{CKO}* mice (wild-type mice, 59 ± 5.2 ; vs *Piezo2^{CKO}* mice, 31.6 ± 4.6 ; $p < 0.001$; Fig. 8F). In contrast, no significant differences with wild-type littermate mice were observed when higher forces (0.02 g hairs; wild-type mice, 77 ± 5.7 ; vs *Piezo2^{CKO}* mice, 68.4 ± 5.0 ; $p = 0.273$; Fig. 8F) were applied.

Discussion

Mechanical pain is a vital protective response to minimize corneal injury. Here, we characterized, for the first time, the mechanically activated currents present in a well identified functional population of TG corneal sensory neurons in mammals. We show that a large fraction of these neurons, belonging to pure mechanosensory and polymodal nociceptor corneal neuron classes, exhibit MA currents and express Piezo2 channels. Experiments in *Piezo2^{CKO}* mice strongly suggest an involvement of Piezo2 channels in the transduction of noxious mechanical forces by both types of mechanosensitive neurons. Indeed, a significant reduction in the number of nociceptor neurons exhibiting MA currents was observed in *Piezo2^{CKO}* mice. Unfortunately, the efficiency of genetic deletion of Piezo2 in the conditional mouse line that we used is not complete, as previously demonstrated by others (Zhang et al., 2019) and confirmed by our results. Still, we were able to successfully eliminate Piezo2 in ~50% of TG neurons, and this reduction was accompanied by an equivalent reduction (~55%) of the TG corneal neurons exhibiting MA currents, indirectly supporting the conclusion that the majority of MA currents in corneal TG neurons are linked to the expression of Piezo2.

The presence of Piezo2-dependent mechanosensitivity in RA IA and SA neurons indicates that Piezo2 channels contribute to all these current types in nociceptive corneal neurons. This is in full agreement with recent observations in cell bodies of mechanosensitive DRG neurons, including nociceptors, where all classes of currents are variably affected (Szcot et al.,

2018; Murthy et al., 2018b). Differences in the kinetics of Piezo2-mediated currents in individual MS neurons may be partially explained by several factors, such as interaction of the channel with other proteins or membrane lipids or by the existence of several splice isoforms of Piezo2 in mouse sensory ganglion neurons that tunes the inactivation of Piezo2 (Hong et al., 2016; Szczot et al., 2017; Anderson et al., 2018). Future studies on structure–function relationships may help reveal Piezo2 kinetic mechanisms at the single-cell level.

In our view, the observed reduction in the proportion of IA/SA neurons in the *Piezo2^{ckO}* mice suggests a direct involvement of Piezo2 in these currents, but we cannot exclude that Piezo2 deletion might have effects on gene expression, leading to an upregulation/downregulation of other proteins in sensory neurons, as occurs with other channels (Minett et al., 2015). The fraction of MA currents still recorded in corneal neurons of *Piezo2^{ckO}* mice are most likely attributable to the residual expression of the channel in some neurons of these mice. Nevertheless, MA currents were recorded in a few corneal neurons lacking Piezo2, suggesting that another, still unidentified, MA channel contributes to their mechanosensitivity (Zappia et al., 2017; Murthy et al., 2018a).

About two-thirds of the corneal terminals of cold thermoreceptor neurons, another main functional sensory receptor neuron type innervating the cornea, also responded to mechanical stimulation, thus defining them as mechano-cold terminals. Nonetheless, our results in identified corneal cold thermoreceptor neurons suggest that their mechanical responsiveness is not mediated by Piezo2 channels because no MA currents were evoked in cultured cold thermoreceptor neurons expressing TRPM8, the defining molecular marker for this subpopulation of corneal sensory neurons. This functional result agrees with the lack of Piezo2 immunostaining in TRPM8-expressing corneal afferent neurons reported by Bron et al. (2014). Therefore, the mechanism mediating mechanosensitivity in cold corneal endings remains an open question, as occurs with our limited understanding of mechanosensory transduction in cutaneous cold receptors (Winter et al., 2017). It is worth noting that corneal endings respond to hyperosmotic stimuli, a different type of mechanical perturbation, and that this response is mediated by TRPM8 (Quallo et al., 2015).

Altogether, our work shows that genetic ablation of Piezo2 reduced nerve terminal impulse activity of pure mechanosensory and polymodal nociceptor neurons and decreased mechanically evoked protective blink reflexes, thus suggesting that Piezo2 participates in the detection of low-intensity but already harmful mechanical stimuli to the eye.

The conclusion that Piezo2 is expressed by corneal neurons, which have been functionally defined as nociceptive neurons evoking pain (Belmonte et al., 1991), is additionally confirmed

by the immunocytochemical demonstration of Piezo2 staining in peripheral corneal axons. Of note, Piezo2 immunoreactivity was mainly accumulated at the penetration points of ascending stromal nerve bundles into the basal lamina, likely reflecting the presence of axons that contain Piezo2. Very few ascending nerve branches expressing only Piezo2 were found. This may be because of a low proportion of pure mechano-nociceptors (~10% in mouse cornea; González-González et al., 2017) or that nerve terminals expressing Piezo2 only (i.e., pure mechano-nociceptors) terminate at deeper epithelium levels, near the basal lamina (Alamri et al., 2018), where we located most Piezo2-immunoreactive fibers. Nerve endings expressing TRPV1 were more frequently identified, suggesting their polymodal character but a precise estimation of the number of polymodal nociceptor neurons innervating the cornea coexpressing Piezo2 appears challenging because of the very few nerve endings that express Piezo2.

In line with our findings in the soma, genetic *Piezo2* deletion produced a marked reduction in the mechanosensitivity of peripheral corneal nerve terminals. It is noteworthy, in *Piezo2^{CKO}* mice corneas, that nerve terminals showing mechanical sensitivity, in particular polymodal nociceptors, fired a lower number of NTIs when subjected to a stimulus of 100 μm indentation when compared with those of wild-type mice. A possible explanation for this observation is that Piezo2 is responsible for the initial response of the cornea to a low-intensity mechanical stimulation. It is tempting to speculate that the expression of Piezo2 confers to corneal mechanosensory nociceptor terminals the transduction sensitivity required to reach firing threshold under moderate but potentially injurious mechanical forces. With stronger, overtly noxious indentations (200 μm), the differences in response between wild-type and *Piezo2^{CKO}* mice disappeared. This difference may suggest the expression of additional mechanosensitive channels at these terminals (Murthy et al., 2018a) or of other membrane-associated molecules involved in mechanotransduction (Janmey and Kinnunen, 2006; Nezu et al., 2010).

The direct relationship between mechanical stimulation of the cornea and protective reflex lid closure is firmly established (VanderWerf et al., 2003; Henriquez and Evinger, 2007). *Piezo2^{CKO}* mice show reduced blinking responses to light corneal mechanical stimulation, similar to what happens in the skin of *Piezo2^{CKO}* mice (Murthy et al., 2018b), further supporting the functional relevance of this ion channel as a critical first line in the building of protective/defensive behaviors.

Peripheral sensory neurons are canonically defined by their preferential transducing capacities for a given form of energy and by the perceptual quality of the sensations evoked by their sensory input to the brain, which determines the final cognitive and affective characteristics of the perceptual experience. For corneal stimulation in humans and experimental animals,

perception appears to be always unpleasant or overtly painful depending on the recruitment level of peripheral receptor terminals (Acosta et al., 2001; Moulton et al., 2012). Indeed, mechano-nociceptor and polymodal nociceptor corneal neurons project centrally into the trigeminal subnucleus caudalis–cervical cord (Vc/C1) junction region of the lower brainstem, the second-order neural station of the eye surface pain pathways (Saito et al., 2017).

Our demonstration that Piezo2, a detector of mild forces, is also expressed by neurons belonging to a well defined population of pain-signaling peripheral corneal nociceptor neurons speaks against a direct correspondence between this mechanotransducer molecule and the sensory percept evoked by its activation. The innocuous forces required to stimulate LTMR tactile terminals in the keratinized skin are already injurious when applied to the unprotected corneal epithelium cells. Touch sensations are felt with air streams directed toward the eye, but they are attributable to immediate stimulation of the more sensitive, myelinated low-threshold mechanoreceptors of the eyelids, eyelashes, and exposed conjunctiva (Munger and Halata, 1984).

The cornea is highly vulnerable to injury by a variety of external mechanical forces with serious consequences on vision and health. Hence, the expression of Piezo2, a highly sensitive mechanotransducing molecule in corneal endings of TG neurons, can be considered an advantageous evolutionary adaptation in the innervation of this organ for early detection of potentially injurious mechanical forces. Nonetheless, it is worth noting that in transgenic mouse lines where lanceolate A δ -LTMRs and A β -RA-LTMR nerve terminals of the skin are fluorescent (*TrkB:TauGFP* mice; *Split:cre* mice; *Npy2r:tdTomato* mice), corneal nerves do not appear to be labeled (Bouheraoua et al., 2019), suggesting that Piezo2+ neurons giving rise to cutaneous low-threshold mechanoreceptors and those directed to the cornea mediating pain have different genetic signatures.

In summary, our findings reveal the key contribution of Piezo2 channels to the early activation of corneal nociceptor neurons, which has significant relevance for several ocular disorders. In the eye, rapid detection of low-intensity mechanical stimuli plays a particularly important protective role for the early prevention of corneal epithelium damage by foreign bodies or other external mechanical trauma. Moreover, it has been recently suggested that in dry eye disease, sliding of the eyelid over a corneal surface with reduced moistness causes mechanical stress, which damages epithelial cells, exciting corneal surface nociceptors, thereby aggravating pain and altered vision symptoms typical of this pathology (van Setten, 2020). Topical pharmacological modulation of Piezo2 channels in corneal mechano-nociceptive nerve terminals appears as a potential therapeutic strategy to selectively attenuate the enhanced

activity of sensitized corneal mechano-nociceptor neurons underlying discomfort and pain in dry eye and other ocular surface pathologies.

Footnotes

- This research was supported by the following Spanish Government projects: SAF2016-77233R and PID2019-108194RB-I00 (A. Gomis and F.V.) and the “Severo Ochoa” Program for Centers of Excellence in R&D (SEV-2017-0723). A.Í.-P. and O.G.-G. were supported by the project SAF2017-83674-C2-1-R and C2-2R. We thank Ardem Patapoutian and Paul Heppenstall for providing the *Piezo2^{fl/fl}* and *Advillin-Cre* mice respectively; and Salvador Sala for helping with current kinetic analysis and to Manuela Schmidt for advice with immunohistochemistry in *Piezo2^{GFP}* mice. We also thank Mireille Tora and Eva Quintero for excellent technical assistance, and Carlos Ramos and Sergio Javaloy for illustrations. In addition, we thank all members of the Sensory Transduction and Nociception Group for useful comments and suggestions.
- The authors declare no competing financial interests.
- Correspondence should be addressed to Ana Gomis at agomis@umh.es

References

- Acosta MC, Belmonte C, Gallar J (2001) Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J Physiol* 534:511–525.
- Alamri A, Bron R, Brock JA, Ivanusic JJ (2015) Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Front Neuroanat* 9:71.
- Alamri AS, Wood RJ, Ivanusic JJ, Brock JA (2018) The neurochemistry and morphology of functionally identified corneal polymodal nociceptors and cold thermoreceptors. *PLoS One* 13:e0195108.
- Alcalde I, Iñigo-Portugues A, Gonzalez-Gonzalez O, Almaraz L, Artime E, Morenilla-Palao C, Gallar J, Viana F, Merayo-Llodes J, Belmonte C (2018) Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice. *J Comp Neurol* 526:1859–1874.
- Anderson EO, Schneider ER, Matson JD, Gracheva EO, Bagriantsev SN (2018) TMEM150C/Ten-tonin3 is a regulator of mechano-gated ion channels. *Cell Rep* 23:701–708. Belmonte C, Giraldez F (1981) Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol* 321:355–368.
- Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I (1991) Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat’s cornea. *J Physiol* 437:709–725.
- Belmonte C, Garcia-Hirschfeld J, Gallar J (1997) Neurobiology of ocular pain. *Progr Retin Eye Res* 16:117–156. Belmonte C, Acosta MC, Schmelz M, Gallar J (1999) Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO2 esthesiometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:513–519.

- Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, Dartt DA, Galor A, Hamrah P, Ivanusic JJ, Jacobs DS, McNamara NA, Rosenblatt MI, Stapleton F, Wolffsohn JS (2017) TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf* 15:404–437.
- Beuerman RW, Tanelian DL (1979) Corneal pain evoked by thermal stimulation. *Pain* 7:1–14.
- Bouheraoua N, Fouquet S, Marcos-Almaraz MT, Karagogeos D, Laroche L, Chédotal A (2019) Genetic analysis of the organization, development, and plasticity of corneal innervation in mice. *J Neurosci* 39:1150–1168.0
- Bron R, Wood RJ, Brock JA, Ivanusic JJ (2014) Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *J Comp Neurol* 522:2967–2979.
- Cabanes C, López de Armentia M, Viana F, Belmonte C (2002) Postnatal changes in membrane properties of mice trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol* 87:2398–2407.
- 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* 389:816–824.
- Chen X, Belmonte C, Rang HP (1997) Capsaicin and carbon dioxide act by distinct mechanisms on sensory nerve terminals in the cat cornea. *Pain* 70:23–29.
- Chesler AT, Szczot M, Bharucha-Goebel D, Čeko M, Donkervoort S, Laubacher C, Hayes LH, Alter K, Zampieri C, Stanley C, Innes AM, Mah JK, Grosmann CM, Bradley N, Nguyen D, Foley AR, Le Pichon CE, Bönnemann CG (2016) The role of PIEZO2 in human mechanosensation. *N Engl J Med* 375:1355–1364.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330:55–60.
- Drew LJ, Wood JN, Cesare P (2002) Distinct mechanosensitive properties of capsaicin-sensitive and -insensitive sensory neurons. *J Neurosci* 22: RC228.
- Florez-Paz D, Bali KK, Kuner R, Gomis A (2016) A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons. *Sci Rep* 6:25923.
- Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP, Belmonte C (1993) Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol* 468:609–622.
- Garrison SR, Dietrich A, Stucky CL (2012) TRPC1 contributes to light-touch sensation and mechanical responses in low-threshold cutaneous sensory neurons. *J Neurophysiol* 107:913–922.
- González-González O, Bech F, Gallar J, Merayo-Llodes J, Belmonte C (2017) Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58:404–415.
- Hao J, Delmas P (2010) Multiple desensitization mechanisms of mechanotransducer channels shape firing of mechanosensory neurons. *J Neurosci* 30:13384–13395.
- Henriquez VM, Evinger C (2007) The three-neuron corneal reflex circuit and modulation of second-order corneal responsive neurons. *Exp Brain Res* 179:691–702.
- Hong GS, Lee B, Wee J, Chun H, Kim H, Jung J, Cha JY, Riew TR, Kim GH, Kim IB, Oh U (2016) Tentonin 3/TMEM150c confers distinct mechanosensitive currents in dorsal-root ganglion neurons with proprioceptive function. *Neuron* 91:107–118.
- Hu J, Lewin GR (2006) Mechanosensitive currents in the neurites of cultured mouse sensory neurons. *J Physiol* 577:815–828.
- Janmey PA, Kinnunen PK (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol* 16:538–546.
- Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L (2010) Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res* 90:478–492.
- Minett MS, Pereira V, Sikandar S, Matsuyama A, Lolignier S, Kanellopoulos AH, Mancini F, Iannetti GD, Bogdanov YD, Santana-Varela S, Millet Q, Baskozos G, MacAllister R, Cox JJ, Zhao J, Wood JN

- (2015) Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7. *Nat Commun* 6:8967
- Morenilla-Palao C, Luis E, Fernández-Peña C, Quintero E, Weaver JL, Bayliss DA, Viana F (2014) Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Rep* 8:1571–1582.
 - Moulton EA, Becerra L, Rosenthal P, Borsook D (2012) An approach to localizing corneal pain representation in human primary somatosensory cortex. *PLoS One* 7:e44643.
 - Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM (2003) Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res* 76:521–542.
 - Munger BL, Halata Z (1984) The sensorineural apparatus of the human eyelid. *Am J Anat* 170:181–204.
 - Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, Ward AB, Patapoutian A (2018a) OSCA/TMEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *Elife* 7: e41844.
 - Murthy SE, Loud MC, Daou I, Marshall KL, Schwaller F, Kühnemund J, Francisco AG, Keenan WT, Dubin AE, Lewin GR, Patapoutian A (2018b) The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Sci Transl Med* 10:eaat9897.
 - Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:31.
 - Nencini S, Ivanusik J (2017) Mechanically sensitive Ad nociceptors that innervate bone marrow respond to changes in intra-osseous pressure. *J Physiol* 595:4399–4415.
 - Nezu A, Tanimura A, Morita T, Tojyo Y (2010) Visualization of Ins(1,4,5)P3 dynamics in living cells: two distinct pathways for Ins(1,4,5)P3 generation following mechanical stimulation of HSY-EA1 cells. *J Cell Sci* 123:2292–2298.
 - Nguyen MQ, Wu Y, Bonilla LS, von Buchholtz LJ, Ryba NJP (2017) Diversity amongst trigeminal neurons revealed by high throughput single cell sequencing. *PLoS One* 12:e0185543.
 - Prato V, Taberner FJ, Hockley JRF, Callejo G, Arcourt A, Tazir B, Hammer L, Schad P, Heppenstall PA, Smith ES, Lechner SG (2017) Functional and molecular characterization of mechanoinensitive “silent” nociceptors. *Cell Rep* 21:3102–3115.
 - Quallo T, Vastani N, Horridge E, Gentry C, Parra A, Moss S, Viana F, Belmonte C, Andersson DA, Bevan S (2015) TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature Commun* 6:7150.
 - Ranade SS, Woo SH, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M, Mathur J, Bégay V, Coste B, Mainquist J, Wilson AJ, Francisco AG, Reddy K, Qiu Z, Wood JN, Lewin GR, Patapoutian A (2014) Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature* 516:121–125.
 - Saito H, Katagiri A, Okada S, Mikuzuki L, Kubo A, Suzuki T, Ohara K, Lee J, Gionhaku N, Iinuma T, Bereiter DA, Iwata K (2017) Ascending projections of nociceptive neurons from trigeminal subnucleus caudalis: a population approach. *Exp Neurol* 293:124–136.
 - Schneider ER, Mastrotto M, Laursen WJ, Schulz VP, Goodman JB, Funk OH, Gallagher PG, Gracheva EO, Bagriantsev SN (2014) Neuronal mechanism for acute mechanosensitivity in tactile-foraging waterfowl. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14941–14946.
 - Schneider ER, Anderson EO, Mastrotto M, Matson JD, Schulz VP, Gallagher PG, LaMotte RH, Gracheva EO, Bagriantsev SN (2017) Molecular basis of tactile specialization in the duck bill. *Proc Natl Acad Sci* 114:13036–13041.
 - Szczyt M, Pogorzala LA, Solinski HJ, Young L, Yee P, Le Pichon CE, Chesler AT, Hoon MA (2017) Cell-type-specific splicing of Piezo2 regulates mechanotransduction. *Cell Rep* 21:2760–2771.
 - Szczyt M, Liljencrantz J, Ghitani N, Barik A, Lam R, Thompson JH, Bharucha-Goebel D, Saade D, Necaie A, Donkervoort S, Foley AR, Gordon T, Case L, Bushnell MC, Bonnemann CG, Chesler AT

- (2018) PIEZO2 mediates injury-induced tactile pain in mice and humans. *Sci Transl Med* 10:eaat9892.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543.
 - VanderWerf F, Brassinga P, Reits D, Aramideh M, Ongerboer de Visser B (2003) Eyelid movements: behavioral studies of blinking in humans under different stimulus conditions. *J Neurophysiol* 89:2784–2796.
 - Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, Segal A, Voet T, Vennekens R, Zimmermann K, Vriens J, Voets T (2018) A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 555:662–666.
 - van Setten G-B (2020) Impact of attrition, intercellular shear in dry eye disease: when cells are challenged and neurons are triggered. *Int J Mol Sci* 21:4333.
 - Viana F, de la Peña E, Pecson B, Schmidt RF, Belmonte C (2001) Swelling-activated calcium signaling in cultured mouse primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 13:722–734.
 - Weddell G, Zander E (1950) A critical evaluation of methods used to demonstrate tissue neural elements, illustrated by reference to the cornea. *J Anat* 84:168–195.
 - Winter Z, Gruschwitz P, Eger S, Touska F, Zimmermann K (2017) Cold temperature encoding by cutaneous TRPA1 and TRPM8-carrying fibers in the mouse. *Front Mol Neurosci* 10:209.
 - Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A (2014) Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature* 509:622–626. Woo SH, Lukacs V, de Nooij JC, Zaytseva D, Criddle CR, Francisco A, Jessell TM, Wilkinson KA, Patapoutian A (2015) Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nat Neurosci* 18:1756–1762.
 - Zappia KJ, O’Hara CL, Moehring F, Kwan KY, Stucky CL (2017) Sensory neuron-specific deletion of TRPA1 results in mechanical cutaneous sensory deficits. *eNeuro* 4:ENEURO.0069-16.2017.
 - Zhang M, Wang Y, Geng J, Zhou S, Xiao B (2019) Mechanically activated piezo channels mediate touch and suppress acute mechanical pain response in mice. *Cell Rep* 26:1419–1431.e4.
 - Zurborg S, Piszczek A, Martínez C, Hublitz P, Al Banchaabouchi M, Moreira P, Perlas E, Heppinstall PA (2011) Generation and characterization of an Advillin-Cre driver mouse line. *Molecular pain* 7:66.

9. ANEXO 2: TABLAS Y DATOS SUPLEMENTARIOS

A continuación, se detalla las tablas con los datos suplementarios para diversos apartados, incluyendo información sobre la secuenciación y las muestras utilizadas, los resultados del análisis de expresión diferencial entre poblaciones en la condición control (EYFP+ vs IB4+, EYFP+ vs DN y IB4+ vs DN) y para el modelo neuropático con oxaliplatino (vehículo vs tratado) en cada una de las poblaciones EYFP+, IB4+ y DN.

ID de la muestra	Estudio	Tipo celular	Condición	ID del animal	RIN	Alineamiento	
						Número de lecturas mapeadas al genoma	Lecturas únicas mapeadas
DN_1	Poblacional	EYFP-/IB4-	Ctrol	M_1-1	8.3	26080686	28955429
DN_2	Poblacional	EYFP-/IB4-	Ctrol	M_1-2	9.2	26602575	29638346
DN_3	Poblacional	EYFP-/IB4-	Ctrol	M_1-3	9.2	28788557	32857465
DN_4	Poblacional	EYFP-/IB4-	Ctrol	M_1-4	7.3	28377632	33149633
DN_5 / DN_Veh1	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4-	Veh	M_3-11	6.6	45566740	50372506
DN_6 / DN_Veh2	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4-	Veh	F_3-13	9.1	43286888	48084413
DN_7 / DN_Veh3	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4-	Veh	M_3-12	*	45262131	50017653
DN_Oxa1	Tratamiento	EYFP-/IB4-	Oxa	F_3-15	9	47013815	52327712
DN_Oxa2	Tratamiento	EYFP-/IB4-	Oxa	M_3-17	8.7	47868869	53327039
DN_Oxa3	Tratamiento	EYFP-/IB4-	Oxa	M_3-18	9	48976389	53593595
IB4_1 / IB4_Veh1	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4+	Veh	F_3-13	7.9	41614751	46758954
IB4_2 / IB4_Veh2	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4+	Veh	M_3-11	9	49101481	54459949
IB4_3 / IB4_Veh3	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4+	Veh	F_3-14	8.5	54312600	59739578
IB4_4	Poblacional	EYFP-/IB4+	Ctrol	M_1-1	7.1	32836849	39210208
IB4_5	Poblacional	EYFP-/IB4+	Ctrol	M_1-2	8.6	32467818	39725647
IB4_6 / IB4_Veh4	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4+	Veh	F_2-6	7.2	40224043	45381603
IB4_7 / IB4_Veh5	Poblacional / Tratamiento	EYFP-/IB4+	Veh	F_2-7	7.8	25967637	29094334
IB4_Oxa1	Tratamiento	EYFP-/IB4+	Oxa	M_2-10	7.2	35999166	39579874
IB4_Oxa2	Tratamiento	EYFP-/IB4+	Oxa	M_2-9	6.6	25088683	27492093
IB4_Oxa3	Tratamiento	EYFP-/IB4+	Oxa	F_3-15	6.3	49980022	55985594
IB4_Oxa4	Tratamiento	EYFP-/IB4+	Oxa	F_3-16	*	34524176	38602826
IB4_Oxa5	Tratamiento	EYFP-/IB4+	Oxa	M_3-17	8.7	45317156	50397849
IB4_Oxa6	Tratamiento	EYFP-/IB4+	Oxa	M_3-18	8.5	55447812	60957162
M8_1	Poblacional	EYFP+/IB4-	Ctrol	M_1-2	5.7	36792819	43903438
M8_2	Poblacional	EYFP+/IB4-	Ctrol	M_1-4	7.9	31120408	36336586
M8_3 / M8_Veh1	Poblacional / Tratamiento	EYFP+/IB4-	Veh	F_3-14	6.5	55856838	61274509
M8_4 / M8_Veh2	Poblacional / Tratamiento	EYFP+/IB4-	Veh	M_3-11	8.5	54037552	60707690
M8_5 / M8_Veh3	Poblacional / Tratamiento	EYFP+/IB4-	Veh	F_3-13	7.4	43336965	47638577
M8_6 / M8_Veh4	Poblacional / Tratamiento	EYFP+/IB4-	Veh	M_3-12	9.1	41308995	45430504
M8_7 / M8_Veh5	Poblacional / Tratamiento	EYFP+/IB4-	Veh	M_2-5	8.7	27449722	29888473
M8_8 / M8_Veh6	Poblacional / Tratamiento	EYFP+/IB4-	Veh	F_2-8	8.6	27296988	29552169
M8_Oxa1	Tratamiento	EYFP+/IB4-	Oxa	M_3-17	7.9	45465255	50425474
M8_Oxa2	Tratamiento	EYFP+/IB4-	Oxa	F_3-15	8.4	52907611	58284237
M8_Oxa3	Tratamiento	EYFP+/IB4-	Oxa	F_3-16	9.6	49504372	54695727
M8_Oxa4	Tratamiento	EYFP+/IB4-	Oxa	M_3-18	8.6	48944706	54104027
M8_Oxa5	Tratamiento	EYFP+/IB4-	Oxa	M_2-9	7.5	40628479	44076526
M8_Oxa6	Tratamiento	EYFP+/IB4-	Oxa	M_2-10	7.2	30792907	33853795

Tabla 6. Descripción de los experimentos realizados para la secuenciación masiva de ARN. Información y detalles de los replicados biológicos para la secuenciación de ARN. Tipo de estudio; “control” sin pruebas conductuales realizados, “vehículo” y “oxaliplatino”, población neuronal, género, identificación del ratón (se indica el género “M” masculino, “F” femenino, la tanda y la ID del ratón), valores para el RIN y parámetros de calidad para el alineamiento (número de “reads” mapeadas al gen, al genoma y % de alineamiento para cada replicado). * indica que el valor del RIN no se pudo determinar sin embargo los picos ribosómicos fueron visibles en la electroforesis.

EYFP+ (TRPM8+)	M8/DN		M8/IB4		Descripción
	Log2FC	FDR	Log2FC	FDR	
Gen					
Nexmif	6.9	0.01	9.8	0.00	neurite extension and migration factor
Kcns2	6.2	0.00	4.2	0.02	K+ voltage-gated channel, subfamily S, 2
Chrn4	4.7	0.00	3.0	0.00	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 4
Mpped1	3.7	0.02	3.8	0.01	metallophosphoesterase domain containing 1
Chrna3	4.8	0.00	2.3	0.00	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3
Gal	3.6	0.00	2.7	0.00	galanin and GMAP prepropeptide
Trpm8	3.6	0.00	2.6	0.00	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8
Adcyap1	3.3	0.00	2.2	0.00	adenylate cyclase activating polypeptide 1
Sstr2	2.5	0.01	2.7	0.00	somatostatin receptor 2
Bves	3.5	0.00	1.7	0.03	blood vessel epicardial substance
Cartpt	2.9	0.00	2.1	0.00	CART prepropeptide
Tac1	3.0	0.00	1.8	0.00	tachykinin 1
Serpinb1b	2.7	0.00	1.9	0.02	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1b
Kcnc2	2.2	0.01	2.3	0.00	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2
Gfra3	2.3	0.00	2.2	0.00	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3
Zcchc12	2.2	0.00	2.2	0.00	zinc finger, CCHC domain containing 12
Trpv1	2.2	0.00	2.1	0.00	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
6330403K07Rik	2.2	0.00	2.1	0.00	RIKEN cDNA 6330403K07 gene
Gpr149	2.5	0.00	1.8	0.01	G protein-coupled receptor 149
Calca	2.6	0.00	1.6	0.00	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Ntrk1	2.2	0.00	1.8	0.00	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
Bex1	2.0	0.04	1.9	0.01	brain expressed X-linked 1
Celf4	1.9	0.00	1.7	0.00	CUGBP, Elav-like family member 4
Scg2	1.8	0.00	1.7	0.00	secretogranin II
Htr3a	1.8	0.00	1.7	0.00	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A
Gap43	1.8	0.00	1.6	0.00	growth associated protein 43
Stac	1.9	0.00	1.3	0.01	src homology three (SH3) and cysteine rich domain

Hpca	1.4	0.01	1.6	0.01	hippocalcin
Kit	1.3	0.01	1.8	0.00	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
Kcnip1	1.6	0.00	1.4	0.02	Kv channel-interacting protein 1
Prdm12	1.9	0.00	1.0	0.04	PR domain containing 12
9530059O14Rik	1.5	0.03	1.4	0.04	RIKEN cDNA 9530059O14 gene
Asic3	1.3	0.00	1.5	0.00	acid-sensing (proton-gated) ion channel 3
Frmpd1	1.2	0.02	1.5	0.00	FERM and PDZ domain containing 1
Ctxn1	1.3	0.00	1.4	0.01	cortexin 1
Meg3	1.4	0.00	1.3	0.00	maternally expressed 3
Popdc3	1.4	0.02	1.3	0.05	popeye domain containing 3
Snhg11	1.4	0.00	1.2	0.01	small nucleolar RNA host gene 11
Ache	1.1	0.01	1.4	0.00	acetylcholinesterase
Ngfr	1.3	0.00	1.1	0.04	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
Ctnnd2	1.0	0.02	1.4	0.02	catenin (cadherin associated protein), delta 2
Serpina3n	1.3	0.00	1.1	0.02	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N
Arhgdig	1.1	0.01	1.1	0.05	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma

IB4+

(neuronal)

IB4/DN

IB4/M8

Gen	Log2FC	FDR	Log2FC	FDR	Descripción
S100a8	5.3	0.00	6.7	0.00	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
S100a9	4.2	0.00	6.7	0.00	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
Hdc	3.7	0.00	3.7	0.00	histidine decarboxylase
Slco1a4	1.6	0.00	4.9	0.00	solute carrier organic anion transporter family, member 1a4
Rgs5	1.9	0.00	4.4	0.00	regulator of G-protein signaling 5
Srgn	1.3	0.01	4.6	0.00	serglycin
Adgrf5	2.0	0.00	3.7	0.00	adhesion G protein-coupled receptor F5
Flt1	1.4	0.01	4.0	0.00	FMS-like tyrosine kinase 1
Plaur	2.6	0.00	2.1	0.01	plasminogen activator, urokinase receptor
Emcn	1.4	0.01	3.1	0.00	endomucin
Zfp40	1.4	0.04	2.7	0.00	zinc finger protein 40
Zfp760	1.9	0.03	2.1	0.00	zinc finger protein 760
Il13ra1	1.4	0.03	2.5	0.00	interleukin 13 receptor, alpha 1
Trpc3	1.7	0.00	1.9	0.00	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3
Mal2	1.8	0.00	1.8	0.00	mal, T cell differentiation protein 2
Lpar3	1.9	0.00	1.6	0.00	lysophosphatidic acid receptor 3

Zfp938	1.3	0.02	2.2	0.00	zinc finger protein 938
Gm765	1.6	0.00	1.8	0.00	predicted gene 765
Hs6st2	2.1	0.00	1.3	0.01	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2
Mrgprd	1.8	0.00	1.4	0.00	MAS-related GPR, member D
Rab27b	1.6	0.00	1.5	0.00	RAB27B, member RAS oncogene family
Ctxn3	1.2	0.01	1.9	0.00	cortixin 3
Lcp1	1.7	0.00	1.4	0.01	lymphocyte cytosolic protein 1
Kcnip4	1.4	0.00	1.6	0.00	Kv channel interacting protein 4
Samd12	1.7	0.01	1.2	0.03	sterile alpha motif domain containing 12
Ly86	1.5	0.00	1.4	0.00	lymphocyte antigen 86
Grik1	1.3	0.00	1.0	0.04	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1
Dusp1	1.1	0.04	1.1	0.02	dual specificity phosphatase 1

**IB4+
(inespecif.)**

Gen	IB4/DN		IB4/M8		Descripción
	Log2FC	FDR	Log2FC	FDR	
Clec4e	9.7	0.00	13.7	0.00	C-type lectin domain family 4, member e
Ccr1	8.1	0.00	13.5	0.00	chemokine (C-C motif) receptor 1
Cd300lb	8.8	0.00	12.3	0.00	CD300 molecule like family member B
Cd86	7.0	0.00	13.2	0.00	CD86 antigen
4930438A08Rik	9.8	0.00	10.2	0.00	RIKEN cDNA 4930438A08 gene
Gm34589	10.4	0.00	9.5	0.00	predicted gene, 34589
Fut7	9.7	0.00	9.2	0.00	fucosyltransferase 7
Fabp4	7.1	0.00	11.7	0.00	fatty acid binding protein 4, adipocyte
Tmem236	9.3	0.00	9.3	0.00	transmembrane protein 236
Lilra6	6.5	0.00	11.6	0.00	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 6
Ncr1	6.4	0.02	11.0	0.00	natural cytotoxicity triggering receptor 1
Cxcr2	4.9	0.00	12.4	0.00	chemokine (C-X-C motif) receptor 2
Hk3	4.9	0.01	12.2	0.00	hexokinase 3
Ptpnc	1.7	0.00	15.4	0.00	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Retnlg	4.4	0.00	12.6	0.00	resistin like gamma
Tfec	8.5	0.02	8.6	0.00	transcription factor EC
Tmem182	10.0	0.00	6.8	0.00	transmembrane protein 182
Spic	7.7	0.03	9.1	0.00	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
Ms4a6b	2.2	0.00	14.3	0.00	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
Slamf7	4.6	0.02	11.6	0.00	SLAM family member 7

Ms4a2	5.6	0.02	10.5	0.00	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2
Hp	1.8	0.00	14.2	0.00	haptoglobin
Cd84	2.0	0.01	14.0	0.00	CD84 antigen
Ifi209	1.5	0.03	14.2	0.00	interferon activated gene 209
Sirpb1b	5.6	0.01	10.2	0.00	signal-regulatory protein beta 1B
Gpr65	3.7	0.03	11.9	0.00	G-protein coupled receptor 65
Csf3r	2.9	0.03	12.6	0.00	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
Tlr2	2.8	0.05	12.5	0.00	toll-like receptor 2
Gm5086	6.9	0.04	8.2	0.02	predicted gene 5086
Igsf6	3.8	0.00	11.2	0.00	immunoglobulin superfamily, member 6
Osm	3.9	0.02	11.1	0.00	oncostatin M
Oas2	7.3	0.05	7.7	0.01	2'-5' oligoadenylate synthetase 2
Ptpn22	6.8	0.02	8.0	0.00	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)
Alox5	3.1	0.03	11.2	0.00	arachidonate 5-lipoxygenase
Naip6	8.4	0.02	5.8	0.03	NLR family, apoptosis inhibitory protein 6
Slf1	6.0	0.00	7.9	0.00	schlafen 1
Inpp4b	2.9	0.01	10.8	0.00	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II
Aoah	7.1	0.02	6.0	0.00	acyloxyacyl hydrolase
Sox7	6.2	0.04	6.8	0.02	SRY (sex determining region Y)-box 7
Nostrin	6.4	0.01	6.5	0.00	nitric oxide synthase trafficker
Itgb2	2.5	0.00	10.0	0.00	integrin beta 2
Dpp4	5.5	0.00	6.9	0.00	dipeptidylpeptidase 4
Ifi207	3.6	0.00	8.6	0.00	interferon activated gene 207
Ms4a4a	5.1	0.02	7.1	0.00	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
Lilr4b	4.2	0.00	7.7	0.00	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4B
Plac8	2.8	0.00	9.1	0.00	placenta-specific 8
Il1b	3.0	0.00	8.4	0.00	interleukin 1 beta
Was	7.2	0.02	4.2	0.05	Wiskott-Aldrich syndrome
Ifi203	1.8	0.00	9.3	0.00	interferon activated gene 203
Selplg	1.6	0.02	9.3	0.00	selectin, platelet (p-selectin) ligand
Lcn2	3.9	0.00	6.6	0.00	lipocalin 2
5430427O19Rik	4.1	0.02	6.1	0.00	RIKEN cDNA 5430427O19 gene
Dok2	4.1	0.02	6.1	0.00	docking protein 2
Pglyrp1	3.4	0.00	6.6	0.00	peptidoglycan recognition protein 1
Cd53	1.4	0.00	8.4	0.00	CD53 antigen
Mmp9	3.7	0.00	6.0	0.00	matrix metalloproteinase 9

Atp13a5	5.9	0.00	3.7	0.00	ATPase type 13A5
Filip1l	2.7	0.00	6.7	0.00	filamin A interacting protein 1-like
Klhl6	2.4	0.04	6.6	0.00	kelch-like 6
Slpi	3.6	0.00	5.2	0.00	secretory leukocyte peptidase inhibitor
Ly6a2	3.7	0.00	4.8	0.00	lymphocyte antigen 6 complex, locus A2
Myo1f	3.6	0.00	4.7	0.00	myosin IF
Itgam	3.5	0.02	4.7	0.00	integrin alpha M
Rac2	1.5	0.01	6.4	0.00	Rac family small GTPase 2
Ccl6	2.1	0.00	5.4	0.00	chemokine (C-C motif) ligand 6
Laptm5	1.5	0.00	6.1	0.00	lysosomal-associated protein transmembrane 5
Arhgdib	1.9	0.00	5.5	0.00	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
Ly6c2	2.4	0.00	5.0	0.00	lymphocyte antigen 6 complex, locus C2
Stab1	2.4	0.01	4.8	0.00	stabilin 1
Gucy1b1	2.6	0.01	4.7	0.00	guanylate cyclase 1, soluble, beta 1
Prtn3	3.7	0.02	3.4	0.01	proteinase 3
Slfn2	2.2	0.01	4.8	0.00	schlafen 2
Cyrr1	2.5	0.02	4.3	0.00	cysteine and tyrosine-rich protein 1
Adgrl4	2.1	0.00	4.4	0.00	adhesion G protein-coupled receptor L4
Lrg1	2.8	0.00	3.6	0.00	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
Vsir	1.5	0.04	4.9	0.00	V-set immunoregulatory receptor
Gucy1a1	2.0	0.00	4.3	0.00	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 1
Pirb	3.0	0.02	2.9	0.00	paired Ig-like receptor B
Fes	2.5	0.02	3.1	0.00	feline sarcoma oncogene
Anxa1	1.1	0.03	4.5	0.00	annexin A1
Plek	2.4	0.00	3.1	0.00	pleckstrin
Uvssa	2.3	0.04	3.0	0.00	UV stimulated scaffold protein A
Plvap	1.6	0.03	2.9	0.00	plasmalemma vesicle associated protein
Unc93b1	1.2	0.04	3.3	0.00	unc-93 homolog B1, TLR signaling regulator
Eng	1.4	0.02	3.0	0.00	endoglin
Desi2	2.2	0.05	1.8	0.03	desumoylating isopeptidase 2
Jcad	1.6	0.01	2.2	0.00	junctional cadherin 5 associated
Cnn2	1.3	0.04	2.2	0.00	calponin 2

Tabla 7. Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial para las poblaciones EYFP+ e IB4+ (referente a la sección 4.2.3 de los resultados). Genes enriquecidos en la población EYFP+ y IB4+. Se indica el *Log2FC* y *FDR* (False Discovery rate) obtenidos tras la comparación en parejas con las otras dos poblaciones restantes. El criterio para considerar un gen sobre expresados es de *Log2FC*>1 y *FDR*<0.05.

Los resultados para IB4+ están divididas según si los genes obtenidos tienen un origen neuronal o inespecífico (no neuronal ni glial).

Genes alterados (común)

Log2FC

Gen	DN	IB4+	EYFP+		Descripción
Cdt1	-1.7	3.5	3.5	Inespecif.	chromatin licensing and DNA replication factor 1
Mfsd7a	10.6	3.3	2.5	Inespecif.	major facilitator superfamily domain containing 7A
Zfat	8.4	3.0	3.9	Inespecif.	zinc finger and AT hook domain containing
D16Ertd472e	6.0	2.4	8.1	Inespecif.	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 472, expressed
Tmc4	4.0	2.3	2.8	Inespecif.	transmembrane channel-like gene family 4
Sardh	2.7	2.1	3.0	Inespecif.	sarcosine dehydrogenase
Tonsl	-1.6	-1.8	1.7	Inespecif.	tonsoku-like, DNA repair protein
Cnksr2	2.3	-2.0	1.5	Inespecif.	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2
Zfp119a	7.4	-2.0	2.3	Inespecif.	zinc finger protein 119a
2200002D01Rik	3.9	-2.8	3.9	Inespecif.	RIKEN cDNA 2200002D01 gene
Bicra	1.7	-3.0	2.7	Inespecif.	BRD4 interacting chromatin remodeling complex associated protein
Sncaip	3.1	-3.8	3.9	Inespecif.	synuclein, alpha interacting protein (synphilin)
Hbb-b1	-16.9	-12.7	-11.9	Inespecif.	hemoglobin, beta adult major chain
Grik2	7.1	2.2	1.8	Neuronal	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (beta 2)
Slc16a12	-2.2	-1.1	1.3	Neuronal	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 12
Zrsr1	-1.3	-1.3	-1.7	Neuronal	zinc finger (CCCH type), RNA binding motif and serine/arginine rich 1
Mobp	2.1	-3.1	22.3	Neuronal	myelin-associated oligodendrocytic basic protein
Dcaf15	3.3	-3.2	-2.5	Neuronal	DDB1 and CUL4 associated factor 15
S100a8	-3.6	-3.6	-3.2	Neuronal	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
Hba-a2	-10.9	-3.8	-3.4	Neuronal	hemoglobin alpha, adult chain 2
Hba-a1	-12.4	-7.4	-5.9	Neuronal	hemoglobin alpha, adult chain 1
H2-Ab1	-2.7	-1.5	-3.5	Mφ	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1
Cd74	-2.2	-1.7	-5.8	Mφ	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)
H2-Aa	-1.9	-1.8	-6.7	Mφ	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha
Fam180a	5.7	12.4	4.2	Glía	family with sequence similarity 180, member A
Mettl24	2.0	5.7	-1.0	Glía	methyltransferase like 24
Ltbp2	7.6	4.5	3.2	Glía	latent transforming growth factor beta binding protein 2
Col12a1	2.3	4.0	-2.1	Glía	collagen, type XII, alpha 1
Ajuba	5.0	3.7	-3.7	Glía	ajuba LIM protein
Aspn	2.2	1.5	-1.1	Glía	asporin

Pcdh18	2.4	-1.1	2.1	Glía	protocadherin 18
--------	-----	------	-----	------	------------------

Genes alterados (especif.)

Log2FC

Gen	DN	IB4+	EYFP+		Descripción
Ddx3y	86.8			Neuronal	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked
Eif2s3y	82.6			Neuronal	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked
Uty	45.7			Inespecif.	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome
Dpp4	11.8			Inespecif.	dipeptidylpeptidase 4
Nostrin	11.7			Inespecif.	nitric oxide synthase trafficker
Gm973	11.5			Glía	predicted gene 973
Gdf10	11.4			Glía	growth differentiation factor 10
Thbs4	11.4			Glía	thrombospondin 4
Capn6	11.3			Glía	calpain 6
St6galnac2	11.2			Inespecif.	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2
Nnmt	11.2			Inespecif.	nicotinamide N-methyltransferase
Trabd2b	11.0			Inespecif.	TraB domain containing 2B
Ttc22	10.9			Neuronal	tetratricopeptide repeat domain 22
Slc2a9	10.9			Inespecif.	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9
Aldh1a2	10.8			Glía	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2
Myzap	10.8			Inespecif.	myocardial zonula adherens protein
Cyp2e1	10.8			Inespecif.	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1
Npr3	10.7			Glía	natriuretic peptide receptor 3
Vnn1	10.7			Glía	vanin 1
Alox12b	10.6			Inespecif.	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type
Gypa	-13.4			Neuronal	glycophorin A
Trim10	-13.2			Neuronal	tripartite motif-containing 10
Apol11b	-12.5			Neuronal	apolipoprotein L 11b
Slc38a5	-11.5			Inespecif.	solute carrier family 38, member 5
Klf1	-11.4			Inespecif.	Kruppel-like factor 1 (erythroid)
Il1b	-10.5			Inespecif.	interleukin 1 beta
Slc4a1	-7.1			Neuronal	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1
Zfp558	-5.7			Inespecif.	zinc finger protein 558
Tent5c	-5.7			Inespecif.	terminal nucleotidyltransferase 5C

Anexo 2: Tablas y datos suplementarios

Grap2	-5.0			Inespecif.	GRB2-related adaptor protein 2
Nfe2	-4.4			Inespecif.	nuclear factor, erythroid derived 2
Ube2c	-4.4			Neuronal	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
Ltf	-4.4			Glía	lactotransferrin
Ngp	-4.2			Glía	neutrophilic granule protein
Fv1	-4.2			Neuronal	Friend virus susceptibility 1
Tbxas1	-4.2			Inespecif.	thromboxane A synthase 1, platelet
Mrgprb4	-4.2			Neuronal	MAS-related GPR, member B4
Ncf1	-4.1			Glía	neutrophil cytosolic factor 1
Gm28729	-4.0			Inespecif.	predicted gene 28729
Rho	-4.0			Neuronal	ras homolog family member D
Txlnb		11.4		Inespecif.	taxilin beta
Tnfrsf13c		10.8		Inespecif.	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c
Srms		10.1		Inespecif.	src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites
6430550D23Rik		10.1		Inespecif.	RIKEN cDNA 6430550D23 gene
Nmnat3		9.9		Inespecif.	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3
Heph		9.9		Glía	hephaestin
Casq2		9.7		Glía	calsequestrin 2
Fgf14		9.7		Inespecif.	fibroblast growth factor 14
Cdh7		9.5		Neuronal	cadherin 20
Cubn		8.7		Glía	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)
Cd163		8.6		Glía	CD163 antigen
Cngb1		8.6		Neuronal	cyclic nucleotide gated channel beta 1
Dmp1		8.5		Glía	dentin matrix protein 1
Pilrb1		8.4		Inespecif.	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1
Col4a5		8.0		Glía	collagen, type IV, alpha 5
AW146154		7.6		Inespecif.	expressed sequence AW146154
Nat8f4		7.6		Inespecif.	N-acetyltransferase 8 (GCN5-related) family member 4
Armcx4		7.4		Neuronal	armadillo repeat containing, X-linked 4
Dppa2		7.4		Inespecif.	developmental pluripotency associated 2
Xkr4		7.4		Inespecif.	X-linked Kx blood group related 4
Wdr86		-21.6		Glía	WD repeat domain 86
Myh8		-14.7		Glía	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal
Ltb		-12.5		Inespecif.	lymphotoxin B
Bhlhe22		-11.5		Glía	basic helix-loop-helix family, member e22
Gcnt7		-11.5		Inespecif.	glucosaminyl (N-acetyl) transferase family member 7

Anexo 2: Tablas y datos suplementarios

Sdcbp2		-11.4		Inespecif.	trafficking protein particle complex 4
Npas2		-10.7		Neuronal	neuronal PAS domain protein 2
Arntl		-10.4		Inespecif.	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
Piezo1		-10.0		Th1	piezo-type mechanosensitive ion channel component 1
Acap1		-9.7		Inespecif.	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 1
Itgae		-9.5		Th17	integrin alpha E, epithelial-associated
Zfp607a		-9.5		Inespecif.	zinc finger protein 607A
Fancd2		-9.3		Inespecif.	Fanconi anemia, complementation group D2
Styx1		-9.2		Glía	serine/threonine/tyrosine interacting-like 1
Trim6		-9.0		Neuronal	tripartite motif-containing 6
Plppr5		-8.9		Inespecif.	phospholipid phosphatase related 5
Blnk		-8.9		Inespecif.	B cell linker
9630028I04Rik		-8.9		Inespecif.	RIKEN cDNA 9630028I04 gene
Piwil2		-8.8		Inespecif.	piwi-like RNA-mediated gene silencing 2
Ager		-8.5		Inespecif.	advanced glycosylation end product-specific receptor
Gbp5			9.4	Inespecif.	guanylate binding protein 5
Slc16a10			9.3	Inespecif.	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 10
Ramp3			8.9	Glía	receptor (calcitonin) activity modifying protein 3
Lsp1			8.8	Inespecif.	lymphocyte specific 1
Actrt3			8.8	Inespecif.	actin related protein T3
Tas1r1			8.6	Neuronal	taste receptor, type 1, member 1
Nek2			8.5	Inespecif.	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2
2410004P03Rik			8.1	Inespecif.	RIKEN cDNA 2410004P03 gene
BC034090			8.0	Glía	cDNA sequence BC034090
Spag5			7.7	Inespecif.	sperm associated antigen 5
Lhx6			7.7	Inespecif.	LIM homeobox protein 6
Stap2			7.6	Inespecif.	signal transducing adaptor family member 2
Ccbe1			7.5	Glía	collagen and calcium binding EGF domains 1
5930430L01Rik			7.5	Inespecif.	RIKEN cDNA 5930430L01 gene
Trpm6			7.3	Neuronal/ Inmune	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6
Bdh2			7.3	Glía	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2
Shcbp1			7.0	Inespecif.	Shc SH2-domain binding protein 1
Sec1			6.7	Inespecif.	secretory blood group 1
Mfsd13b			6.7	Inespecif.	major facilitator superfamily domain containing 13B
Serp1b1c			6.7	Glía	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1c
Hepacam2			-7.4	Glía	HEPACAM family member 2

Ifit1bl2			-5.2	Inespecif.	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1B like 2
Rdh12			-4.9	Inespecif.	retinol dehydrogenase 12
Fcer1g			-4.3	Glía	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide
Gm9920			-4.1	Inespecif.	predicted gene 9920
Shroom4			-4.0	Inespecif.	shroom family member 4
Csf1r			-3.9	Glía	colony stimulating factor 1 receptor
Myl2			-3.8	Inespecif.	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow
Gm11762			-3.7	Inespecif.	predicted gene 11762
Ldoc1			-3.7	Glía	regulator of NFKB signaling
Zfp850			-3.6	Inespecif.	zinc finger protein 850
Gm5868			-3.5	Inespecif.	predicted gene 5868
2810408A11Rik			-3.4	Inespecif.	RIKEN cDNA 2810408A11 gene
BC049762			-3.1	Inespecif.	cDNA sequence BC049762
Flacc1			-2.9	Inespecif.	flagellum associated containing coiled-coil domains 1
Bbof1			-2.8	Inespecif.	basal body orientation factor 1
Fbxo40			-2.6	Neuronal	F-box protein 40
Slc5a1			-2.5	Neuronal	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1
Upk1a			-2.5	Inespecif.	uroplakin 1A
Cdh3			-2.4	Glía	cadherin 3

Tabla 8. Resultados obtenidos tras el análisis de expresión diferencial en modelo neuropático por inducción con oxaliplatino (referente a la sección 4.4.4). Genes alterados en la condición de oxaliplatino para las poblaciones TRPM8+, IB4+ y DN. Se indica el *Log2FC* obtenidos tras la comparación con su respectivo control en los genes diferencialmente expresados con un $|Log2FC| > 1$ y $FDR < 0.05$. El color indica si está infraexpresado (rojo) o sobreexpresado (verde) en la condición de oxaliplatino. Se indica además si los genes obtenidos tienen un origen neuronal, inespecífico, glial o inmune (“Th1” o “Th17” para linfocitos T o derivados de macrófago, “Mφ”). Las tablas están divididas según si los genes obtenidos están diferencialmente expresados en todas las poblaciones (comunes), sólo en una de las tres estudiadas (específicos, sólo se incluyen los 40 mejores genes en cada tabla según su unidad de expresión).

AGRADECIMIENTOS

Se dice que cuando se cierra una etapa, se borran los malos momentos y magnifica los buenos, porque al final esos son los momentos que te quieres llevar contigo en el camino. En mi caso después de casi siete largos años (siete, que se dice pronto) no puedo estar más de acuerdo. Aún me sorprende cuando pienso en todo lo que he aprendido desde que llegué en Alicante; no solo en lo profesional, que ha sido mucho, pero también y más importante, en lo personal. Todo gracias a la gente maravillosa que me he encontrado por la terreta.

Quisiera agradecer a mis directores, Ana y Félix, de darme la oportunidad de entrar y trabajar en este proyecto y zambullirme de lleno en el mundo científico, de compartir su conocimiento y su experiencia. No voy a negar que ha habido momentos en los que no veía luz a final del túnel, pero valoro su confianza en mí y agradezco de corazón su ayuda. Muchas gracias.

También agradezco a todos aquellos que me han ayudado y asesorado durante estos años, que han sido muchos, y que aprecio enormemente su aporte científico: Laura, Peter, Paco, a Salva, que me ha ayudado mucho en la parte de la programación, y a Elvira, cuya ayuda además ha sido crucial en esta recta final para toda la burocracia de la tesis. Al oráculo de Mireille, por asistirme en todas las dudas que me han ido surgiendo (¡que han sido muchas!) siempre con una sonrisa. A Eva, que siempre está dispuesta a ayudarte, da igual si está en el labo, en el SEA o en casa. No he visto mujer tan resolutiva, y si he conseguido terminar la tesis ha sido gracias a ella y a su ayuda en los cultivos. A Antonio Caler, *aka* señor FACSMAN, que es tan entusiasta en su trabajo, siempre con una solución cuando los experimentos no salían y lo único que querías era darte cabezazos contra el citómetro. A Rosa, que te amenizaba hasta el peor día con sus historias en cultivos. También a Jussi y a Dinko que han sido unos grandes anfitriones en tierras lejanas y me han ayudado en todo lo que he necesitado.

No obstante, quisiera agradecer muy especialmente a todos mis compañeros de fatigas del imperio del dolor que han sido mi familia durante estos años y de los que me llevo una verdadera amistad. A Aída, compi de labo, de piso y de aventuras, que has aguantado estoicamente mis quebraderos de cabeza científicos y no tan científicos, gracias por tu apoyo incondicional y por argentinizarme Alicante. A mi vecina Kat, de la que admiro su determinación y seguridad pero que a la vez es tan cálida y cercana, por esos picnics en la playa y sus paellas que no tienen nada que envidiar a los alicanticos. A Aitana, por incluirme en tus planes alicantinos cuando era una recién llegada y por amenizar el piso con buena música. A Pablo y su capacidad de sacar adelante cualquier experimento, técnica o ejercicio de crossfit, además de entretenernos con los cotilleos

más recientes del INA. A Josemi y esa alegría que le sigue allá adonde vaya, si quieres una barbacoa bien hecha, es tu hombre. A Jorge y sus charlas sobre la vida mientras calientas agua para el mate/té, Khalid, I will miss our tea talks, ¡mucho ánimo!, a Alex que entre disparo y disparo de fibras te alegraba el día siempre que pasabas por ahí, a Puri, Agnese, María, Raquel, Enoch...

A la nueva generación: Manu, Espe, Clara y Chiara, que, aunque hemos compartido poquito ha sido genial compartir rutas *IN* pandilla con vosotros. Doble mención para Chiara por ser tan simpática desde el día cero y por esas deliciosas comidas italianas que me has preparado. Al grupo ukelelista Lucía, Mike, Álvaro, por descubrir la gastronomía y la cultura de Alicante juntos, y a Salma, además, to make the company in the research room more enjoyable, and for all the beauty advises.

También a todos aquellos con los que he compartido momentos inolvidables durante estos años: Annia, Danny, Antón, Khalil, Amr, Sempere, Fede, Sergio, Fran, Aroa, Mercedes... (seguramente me olvide de alguien), y mención aparte a mi círculo de amistad no perteneciente al INA, Lyvia, Dani, Juanlu, Sandra, Teo, Albay y Jeyli, que tantos planes hemos hecho juntos.

Por último, quisiera agradecer a mi familia; a mi hermano, a mi prima, a mis tíos, a mis abuelas... que se han preocupado por mí desde la distancia y porque me apoyan en cada paso que doy.

A mis padres, porque todo lo que soy se lo debo a ellos y sin su sacrificio no hubiera llegado tan lejos.

