



Caracterización de líneas transgénicas murinas para el canal iónico termosensible TRPM8: valoración funcional, expresión extraganglionar e identificación de nuevas dianas de inervación.

Tesis doctoral presentada por:
Purificación Ordás Fernández

Director de tesis:

Dr. Félix Viana de la Iglesia.

Co-directora de tesis:

Dra. Rosa M^a Señarís Rodríguez.

- 2019 -

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





Sant Joan d'Alacant, 27th August 2019

To whom it may concern,

The doctoral thesis entitled "Caracterización de líneas transgénicas murinas para el canal iónico termosensible TRPM8: valoración funcional, expresión extraganglionar e identificación de nuevas dianas de innervación" has been developed by myself, Purificación Ordás Fernández. This thesis is presented in a publication format. It is based on experimental studies undertaken at the Neuroscience Institute of Alicante during the PhD program in neuroscience of the Miguel Hernández University.

Yours sincerely

Purificación Ordás Fernández



Sant Joan d'Alacant, 27th August 2019

To whom it may concern,

The doctoral thesis entitled “Caracterización de líneas transgénicas murinas para el canal iónico termosensible TRPM8: valoración funcional, expresión extraganglionar e identificación de nuevas dianas de innervación” has been developed by myself, Purificación Ordás Fernández. This thesis includes the following publication, of which I am the first author. I declare that the publication has not been used and will not be used in any other thesis in agreement with my thesis director Dr Félix Viana de la Iglesia.

“Expression of the cold thermoreceptor TRPM8 in rodent brain thermoregulatory circuits”. Purificación Ordás, Pablo Hernández-Ortego, Hugo Vara, Carlos Fernández-Peña, Alfonso Reimúndez, Cruz Morenilla-Palao, Ana Guadaño-Ferraz, Ana Gomis, Mark Hoon, Félix Viana and Rosa Señarís. **The Journal of Comparative Neurology** (2019). <https://doi.org/10.1002/cne.24694>

Yours sincerely,

Purificación Ordás

Dr. Félix Viana



Sant Joan d'Alacant, 27 de agosto 2019.

El Dr. Félix Viana de la Iglesia, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y la Dra. Rosa M^a Señarís Rodríguez, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela.

AUTORIZAMOS la presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización de líneas transgénicas murinas para el canal iónico termosensible TRPM8: valoración funcional, expresión extraganglionar e identificación de nuevas dianas de inervación" realizada por D^a Purificación Ordás Fernández bajo nuestra inmediata dirección y supervisión como directores de su Tesis Doctoral en el Instituto de Neurociencias (UMH-CSIC) y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

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

Dr Felix Viana de la Iglesia

Dra. Rosa M^a Señarís Rodríguez



Sant Joan d'Alacant, 27 de Agosto 2019

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

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización de líneas transgénicas murinas para el canal iónico termosensible TRPM8: valoración funcional, expresión extraganglionar e identificación de nuevas dianas de inervación” has sido realizada por D/D^a. Purificación Ordás Fernández, bajo la dirección del Dr. Félix Viana de la Iglesia y la Dra. Rosa M^a Señarís Rodríguez; y doy mi conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

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

Dr. Miguel Valdeolmillos López

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

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

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

A mis padres,
por darme todo lo que tengo.

A Ramón,
por compartir conmigo todo lo que tiene.



Índice.

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN / ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Percepción sensorial e integración de la información térmica.	13
1.1.1 El sistema somatosensorial y los receptores sensoriales.	13
1.1.2 Fibras nerviosas sensoriales.	16
1.1.3 Canales iónicos y transducción sensorial.	17
1.1.4 Procesamiento de la información térmica.	18
1.2 La familia de los canales iónicos TRP.	21
1.2.1 Estructura y funcionalidad.	21
1.2.2 Nomenclatura y distribución filogenética.	23
1.2.3 Implicaciones fisiológicas.	24
1.2.4 Canales TRP termosensibles.	25
1.3 TRPM8.	28
1.3.1 Expresión.	29
1.3.2 Estructura y funcionalidad.	30
1.3.3 TRPM8 en termosensación y nocicepción.	34
1.3.4 TRPM8 y termorregulación.	38
1.4 Bases celulares de la osmorregulación. Relación con canales TRP.	39
1.5 Ratones reporteros.	43
1.5.1 Metodologías de transgénesis.....	43
1.5.2 Tipos de ratones reporteros y su aplicación al estudio del canal iónico TRPM8.....	45
2. OBJETIVOS.....	51
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	55
3.1 Animales.	57
3.1.1 Líneas transgénicas TRPM8-EYFP.	57
3.1.2 Línea transgénica TRPM8-EGFPf.....	58
3.1.3 Línea transgénica TRPM8-Cre.....	59
3.1.4 Línea transgénica TRPM8-DTR-GFP.	60
3.2 Cultivo primario de neuronas procedentes de ganglios raquídeos.	62
3.2.1 Soluciones.....	62
3.2.2 Establecimiento del cultivo.	63
3.3 Registro fluorométrico de imagen del calcio intracelular.	64
3.4 Análisis de expresión génica y genotipado mediante técnicas de biología molecular.	67

3.4.1	Análisis de la expresión génica.	67
3.4.2	Genotipado.	70
3.5	Técnicas empleadas para análisis histológicos.	72
3.5.1	Anticuerpos utilizados.	72
3.5.2	Fijación y técnicas inmunohistoquímicas.	74
3.5.3	Hibridación "in situ" optimizada para la detección de bajos niveles de expresión.	79
3.5.4	Hibridación "in situ" fluorescente en combinación con inmunohistoquímica. ..	82
3.6	Inyección hiperosmótica y detección de Fos.	83
3.7	Inyección intraocular de toxina colérica (subunidad B).	84
3.8	Adquisición, procesamiento y cuantificación de imágenes.	85
3.9	Estrategias de muestreo para cuantificación.	86
3.10	Gráficos, tablas y análisis estadístico.	86
3.11	Figuras.	87
4.	RESULTADOS.	89
4.1	Evaluación de líneas transgénicas reporteras de ratón para el estudio de las neuronas sensoriales que expresan el canal iónico TRPM8.	91
4.1.1	Detección del marcador fluorescente en cortes fijados de ganglio raquídeo. ...	91
4.1.2	Caracterización morfológica de las neuronas sensoriales marcadas en cultivo. ...	93
4.1.3	Caracterización funcional de las neuronas sensoriales marcadas en cultivo.	97
4.1.4	Línea TRPM8-EYFP1.	102
4.1.5	Línea TRPM8-EGFPf.	106
4.1.6	Línea TRPM8-DTR-GFP.	109
4.2	Caracterización histológica extraganglionar en el ratón TRPM8-EYFP1.	113
4.2.1	Tejidos inervados por fibras con inmunorreactividad a GFP.	114
4.2.2	Detección de expresión de GFP en células de tejidos extraganglionares.	118
4.3	Estudio del canal iónico TRPM8 en el cerebro.	121
4.3.1	Expresión de TRPM8 en cerebro	121
4.3.2	Distribución anatómica del canal TRPM8 en el cerebro de ratón.	122
4.3.3	Distribución anatómica del canal TRPM8 en el cerebro de rata	134
4.4	Estudio del canal iónico TRPM8 en la retina.	138
4.4.1	Detección de ARNm de TRPM8 en retina.	138
4.4.2	Utilización de líneas transgénicas reporteras de TRPM8 para caracterizar su expresión en la retina de ratón.	139
4.4.3	Caracterización celular del marcaje retiniano para TRPM8.	142
4.4.4	Proyecciones retinianas de neuronas GFP+ al cerebro.	158
4.5	Papel de TRPM8 en la osmorregulación.	168
4.5.1	Expresión de TRPM8 en núcleos osmorreguladores del hipotálamo.	168
4.5.2	Efecto de la hipernatremia aguda en la activación de <i>cfos</i> en el hipotálamo anterior.	170

5. DISCUSIÓN.	179
5.1 Evaluación de líneas transgénicas de ratón que expresan el canal iónico TRPM8 en combinación con reporteros fluorescentes.	181
5.1.1 Análisis del marcaje fluorescente: intensidad y detección inmunohistoquímica.	182
5.1.2 Análisis morfológico y funcional de neuronas sensoriales marcadas con reporteros fluorescentes en cultivo celular de ganglios raquídeos.	184
5.1.3 Análisis funcional de neuronas sensoriales en la línea TRPM8-DTR-GFP.	188
5.1.4 Relación entre la expresión de TRPM8 y CGRP.	191
5.1.5 Valoración general de los modelos transgénicos evaluados.	194
5.2 Uso del ratón TRPM8-EYFP1 como herramienta para el estudio de la expresión e inervación extraganglionar de TRPM8.	196
5.2.1 Piel y vasculatura.	196
5.2.2 Médula espinal.	199
5.2.3 Meninges.	201
5.2.4 Globo ocular.	202
5.2.5 Sistema olfatorio y respiratorio.	203
5.2.6 Sistema digestivo.	205
5.2.7 Vejiga.	207
5.2.8 Aparato reproductor.	209
5.3 Expresión del canal iónico TRPM8 en cerebro.	210
5.3.1 Hibridación “in situ” optimizada para la detección de transcritos a bajos niveles de expresión.	212
5.3.2 Patrón de expresión de TRPM8 en cerebro.	212
5.4 Estudio del canal iónico TRPM8 en células neuronales de la retina y sus proyecciones al cerebro.	217
5.4.1 Caracterización molecular de células fluorescentes de la retina.	218
5.4.2 Proyecciones retinianas al cerebro en las líneas transgénicas TRPM8-EGFPf y TRPM8-EYFP1.	226
5.4.3 Posibles implicaciones funcionales	228
5.5 Influencia del canal TRPM8 en la osmorregulación.	230
6. CONCLUSIONES.	235
7. BIBLIOGRAFÍA.	241
8. ANEXO: PUBLICACIÓN.	277

Abreviaturas.

3V: 3er ventrículo.

ac: comisura anterior.

Acb: núcleo accumbens.

AD: núcleo anterodorsal del tálamo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

AHi: área amigdalohipocampal.

AITC: alil-isocianato.

AM: núcleo anteromedial del tálamo.

AngII: angiotensina II.

AOD: núcleo olfatorio anterior, parte dorsal.

AOL: núcleo olfatorio anterior, parte lateral.

AOM: núcleo olfatorio anterior, parte medial.

AOP: núcleo olfatorio anterior, parte posterior.

AOV: núcleo olfatorio anterior, parte ventral.

AP: fosfatasa alcalina.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

AV: núcleo anteroventral del tálamo.

BAC: cromosoma bacteriano artificial.

BCTC: N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)piperazine-1-carboxamide.

BLA: núcleo basolateral de la amígdala.

BSA: albúmina de suero bovino.

BST: núcleo del lecho de la estría terminal.

CA1: división CA1 del hipocampo.

Calb: calbindin-D28k.

CEA: núcleo central de la amígdala.

CFA: coadyuvante de Freud.

CG: capa células ganglionares de la retina.

Cg: corteza cingulada.

cig: cíngulo.

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

ChAT: acetiltransferasa de colina.

CL: núcleo centrolateral del tálamo.

CM: núcleo centromedial del tálamo.

COa: núcleo amigdalino cortical, posteromedial.

CPu: caudoputamen.

CTB: toxina colérica, subunidad B.

DEn: núcleo endopiriforme.

DEPC: dietilpirocarbonato.

DIG: digoxigenina.

DMH: núcleo dorsomedial hipotalámico.

dNTP: desoxirribonucleótido.

DTR: receptor de la toxina diftérica.

DTR+: animal portador del receptor DTR.

DTR-: animal no portador del receptor DTR.

DTR-NT: animal DTR+ no sometido a tratamiento con la toxina diftérica.

DTR-T: animal DTR+ sometido a tratamiento con la toxina diftérica.

DTT: tenia tecta dorsal.

EGFP: proteína fluorescente verde "mejorada".

EGFPf: proteína EGFP farnesilada.

ENTL: corteza entorrinal lateral.

EYFP: proteína fluorescente amarilla "mejorada".

f: fórnix.

FBS: suero fetal bovino.

Fura-2AM: fura-2-acetoximetil éster.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GNDF: factor neurotrófico derivado de la glía.

GFP: proteína verde fluorescente.

GLd: núcleo geniculado dorsal.
GLv: núcleo geniculado ventral.
HbL: núcleo habénular lateral.
HbM: núcleo habénular medial.
HB-EGF: factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina.
HPRT: hipoxantina-fosforiltransferasa.
IAD: núcleo interanterodorsal del tálamo.
ic: cápsula interna.
ICj: islas de Calleja.
iGL: núcleo intergeniculado.
ipRGCs: células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina.
Kb: kilopares de bases.
KO: animal con el gen de referencia interrumpido.
LA: núcleo lateral de la amígdala.
LD: núcleo laterodorsal del tálamo.
LPAG: periacueducto gris, parte lateral.
LPB: núcleo parabraquial.
LPBd: núcleo parabraquial, parte dorsal.
LPBel: núcleo parabraquial, parte lateral externa.
LPO: núcleo preóptico lateral.
LS: núcleo lateral del septum.
LSc: núcleo lateral del septum, parte caudal.
LSr: núcleo lateral del septum, parte rostral.
LSv: núcleo lateral del septum, parte ventral.
LT: lámina terminal.
LV: ventrículo lateral.
M1: corteza motora primaria.
M2: corteza motora secundaria.
MCPO: núcleo preóptico magnocelular.
MD: núcleo mediodorsal del tálamo.
Mel: melanopsina.
MnPO: núcleo preóptico mediano.
MPN: núcleo preóptico medial.
MPO: área preóptica medial.
MS: núcleo medial del septum.
NDB: núcleo de la banda diagonal.
NGF: factor de crecimiento nervioso.
NI: capa nuclear interna de la retina.
Op: quiasma óptico.
OPT: oliva pretectal.
pb: pares de bases.
PB: tampón fosfato.
PBS: tampón fosfato salino.
PC: núcleo paracentral del tálamo.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
PFA: paraformaldehído.
Pir: corteza piriforme.
PLE: capa plexiforme externa.
PLI: capa plexiforme interna.
PO: grupo nuclear talámico posterior.
POA: área preóptica hipotalámica.
POD: peroxidasa de rábano.
PRh: corteza perirrinal.
PrL: corteza prelímbica.
PT: núcleo paratenial del tálamo.
PV: parvalbúmina.
PVH: núcleo paraventricular del hipotálamo.
PVT: núcleo paraventricular del tálamo.
RAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona.
rRPa: núcleo del rafe "pallidus", parte rostral.
RSP: corteza retroesplénica.
RT: núcleo reticular del tálamo.
RT-PCR: retrotranscripción basada en PCR.
SC: colículo superior.
SCh: núcleo supraquiasmático.
SFO: órgano subfornical.
SI: "Substantia innominata".
SL: núcleo semilunar.
sm: estría medular.
SNC: sistema nervioso central.
SO: núcleo supraóptico.
Sp50: Núcleo trigeminal espinal, parte oral.

Spt5: tracto espinal del nervio trigémino.
SSC: solución citrato sódico salina.
ST: estría terminal.
SuML: núcleo supramamilar, parte lateral.
TMR: tetrametil rodamina.
TR: área de transición amigdalopiriforme.
TTBS: tampón trizma salino con tween.
Tu: núcleo tuberal.
UTP: Uracilo tri-fosfato.
UV: ultravioleta.
VA: núcleo ventral anterior del tálamo.

VL: núcleo ventrolateral del tálamo.
VLPO: núcleo preóptico ventrolateral.
vLPO: núcleo preóptico lateral, parte ventral.
VM: núcleo ventromedial del tálamo.
VMPO: núcleo preóptico ventromedial.
VOLT: órgano vascular de la lámina terminal.
VP: “pallidum” ventral.
VPT: núcleo ventral posteromedial del tálamo.
VTT: tenia tecta ventral.
WT: animal silvestre o “wildtype”.



Resumen.

El canal iónico TRPM8 (“Transient Receptor Potential Melastatin 8”) se activa por descensos moderados de la temperatura y por compuestos químicos como el mentol, que evocan sensaciones de frescor. Estudios previos han demostrado su papel crucial en la detección somatosensorial del frío inocuo, aunque también se relaciona con la detección del frío nocivo y la nocicepción. Asimismo, en estudios recientes se ha asociado con la termorregulación y con la regulación del metabolismo energético. Su principal lugar de expresión se circunscribe a un subgrupo de neuronas sensoriales de pequeño tamaño, mayormente ubicadas en los ganglios raquídeos y del trigémino. Aunque se ha descrito su presencia en otros tejidos del organismo, no existe ningún estudio sistemático de su expresión, lo que ayudaría a entender su papel fisiológico.

Uno de los principales impedimentos para el estudio de TRPM8 reside en la falta de buenos anticuerpos que localicen su presencia de manera clara y veraz. En este contexto, en los últimos años se han generado varios modelos transgénicos murinos que permiten la detección de su expresión mediante proteínas reporteras, y que han demostrado ser de gran utilidad para el estudio de su función. En este trabajo de tesis doctoral, hemos evaluado la fiabilidad de siete líneas transgénicas de ratón que expresan reporteros fluorescentes para ubicar la expresión del canal iónico TRPM8. Algunas de estas líneas se han utilizado en trabajos de investigación previos (TRPM8-EYFP1, TRPM8-EGFPf, TRPM8-Cre, TRPM8-DTR-GFP), mientras que otras (TRPM8-EYFP2, TRPM8-EYFP3 y TRPM8-EYFP4), generadas en nuestro laboratorio, son totalmente novedosas. Hemos realizado un estudio comparativo de la expresión del reportero y de la respuesta del canal TRPM8 a fármacos moduladores de su actividad en neuronas sensoriales en las distintas líneas estudiadas. Así hemos concluido que casi todos los modelos muestran una buena correlación entre el marcaje del reportero y la expresión funcional del termorreceptor, lo que indica que constituyen unas buenas herramientas para el estudio de la anatomía y fisiología del canal. La única excepción fue la línea TRPM8-Cre, en la que demostramos una baja correlación entre expresión y función, lo que limita su utilidad. Además, la línea TRPM8-EYFP1 mostró una alta intensidad de marcaje fluorescente, que se detectó variable entre sus células. El estudio sistemático de estas diferencias nos llevó a establecer que el reportero de esta línea transgénica identifica dos

subpoblaciones de neuronas termosensibles pero con características morfológicas, funcionales y niveles de expresión de TRPM8 distintos. En consecuencia, este modelo fue seleccionado para desarrollar un estudio tisular generalizado, para localizar ubicaciones de expresión e inervación de TRPM8 en emplazamientos extraganglionares. De este modo, verificamos algunas de las dianas ya indicadas en la bibliografía e identificamos algunas novedosas que estudiamos en más profundidad.

Hemos estudiado en detalle la expresión del canal TRPM8 al nivel del sistema nervioso central de ratón, identificando neuronas positivas en unas pocas localizaciones, principalmente núcleos del hipotálamo preóptico, el septum y el núcleo reticular del tálamo. Estas áreas se relacionan principalmente con la termorregulación y otros procesos homeostáticos relacionados con la temperatura. Igualmente, se observó una amplia distribución de sus dianas de inervación, lo que sugiere la implicación de TRPM8 en múltiples procesos regulatorios a nivel central aún no descritos. Hemos estudiado la osmorregulación como uno de estos procesos, y hemos determinado que TRPM8 influye indirectamente en el nivel de activación del órgano vascular de la lámina terminal y del órgano subfornical, principales núcleos osmorreguladores cerebrales.

Finalmente, caracterizamos la presencia del canal TRPM8 en retina. Los patrones de marcaje observados en las distintas líneas transgénicas evidenciaron su expresión en células amacrinas colinérgicas y en células ganglionares, algunas de ellas positivas para el ftopigmento melanopsina. Asimismo, se observó que las proyecciones ganglionares retinianas con marcaje llegaban a todos los núcleos cerebrales implicados en la vía visual, tanto la formadora como la no formadora de imágenes. Sin embargo, no logramos detectar su ARNm en la retina, lo que nos lleva a concluir que sus niveles de expresión en esta ubicación serían extremadamente bajos.

En conclusión, en este trabajo se caracterizan nuevas herramientas moleculares para estudiar la expresión del canal TRPM8, evaluándose en profundidad algunas de las nuevas dianas detectadas. Además, los resultados permiten ofrecer una visión global de las implicaciones fisiológicas de este termorreceptor. Futuros análisis de la función de TRPM8 en estos y otros tejidos que lo expresan ayudarán a completar el rompecabezas de sus implicaciones homeostáticas.

Abstract.

The Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) ion channel is activated by moderate drops in temperature and by chemical compounds such as menthol, which evoke coolness sensations. Previous studies have demonstrated its crucial role in the somatosensory detection of innocuous cold, although it is also related to the detection of noxious cold and nociception. Likewise, in recent studies, TRPM8 has been associated with thermoregulation and the regulation of energy metabolism. The main site of TRPM8 expression is in a subset of small-size sensory neurons, principally located in the spinal and trigeminal ganglia. Although its presence has been described in other tissues of the organism, a systematic study of its location in the body is lacking, which would help our understanding of its physiological role.

One of the main impediments for the full characterization of TRPM8 distribution is the lack of reliable antibodies for its localization. In this context, in recent years, several murine transgenic models have been generated to detect its expression using reporter proteins. These tools have been very useful for the study of TRPM8 localization and function. In this doctoral thesis work, we evaluated the reliability of seven transgenic mouse lines that express fluorescent reporters to locate the expression of the TRPM8 ion channel. Some of these lines have been used in previous research articles (TRPM8-EYFP1, TRPM8-EGFPf, TRPM8-Cre and TRPM8-DTR-GFP), while others (TRPM8-EYFP2, TRPM8-EYFP3 and TRPM8-EYFP4), generated in our laboratory, are totally novel in the literature. We made a comparative study between the reporter expression in sensory ganglia neurons and the response of the TRPM8 activity to drugs that modulate its activity. We demonstrated that nearly all these models show a good correlation between the reporter signal and the functional expression of TRPM8 channel, suggesting that they are good tools for its study. The only exception was the TRPM8-Cre line, in which we demonstrate a low correlation between expression and function, which limits its usefulness. Furthermore, the TRPM8-EYFP1 line showed a high fluorescent signal intensity, which is variable among the labelled cells. The systematic study of these differences led us to establish that the reporter protein identifies two subpopulations of thermosensitive neurons with distinctive morphological and functional characteristics and different levels of TRPM8 expression. Therefore, this model was selected for a more systematic characterization, to identify extraganglionic sites of TRPM8 expression and innervation. This way, we verified some

of the targets already indicated in the bibliography and identified novel expression sites that we studied in more depth.

We characterized in detail the expression of the TRPM8 channel in the central nervous system of the mouse, locating positive neurons in a few locations, principally nuclei of the preoptic area of the hypothalamus, the septum and the reticular nucleus of the thalamus. These areas are mainly linked to thermoregulation and other homeostatic processes related to temperature. In addition, a wide distribution of labeled axons was observed, suggesting the implication of these neurons expressing TRPM8 in multiple regulatory processes at the central level not described previously. We have studied osmoregulation as one of these processes, and we established that TRPM8 indirectly influences the activation of the vascular organ of the lamina terminalis and the subfornical organ, the main osmoregulatory nuclei in the brain.

Finally, we characterized the presence of the TRPM8 channel in the retina. The marking patterns observed in the different transgenic lines located its expression in cholinergic amacrine cells and ganglion cells, some of them expressing the melanopsin photopigment. Furthermore, positive retinal ganglion cells projections to the brain reached all the nuclei involved in vision, both image forming and the non-image forming pathways. However, we couldn't detect TRPM8 mRNA in the retina, suggesting that levels of TRPM8 expression in this location must be extremely low.

In conclusion, in this work new molecular tools to study the expression of the TRPM8 channel have been characterized, evaluating in depth some of the new targets detected. In addition, the results allow us to offer an overview of different physiological functions of this thermoreceptor. Future, in depth analyses of the function of TRPM8 expression in these and other tissues will help to complete the puzzle of its homeostatic implications.

1. Introducción.



1.1 Percepción sensorial e integración de la información térmica.

1.1.1 El sistema somatosensorial y los receptores sensoriales.

Nuestra supervivencia depende del conocimiento del medio externo, así como de la detección de los cambios ocurridos en nuestro organismo. El sistema somatosensorial es la parte del sistema nervioso que nos proporciona información sobre las señales mecánicas, térmicas y químicas que alcanzan nuestra superficie corporal, músculos y otros tejidos internos. Estas señales son captadas mediante receptores sensoriales, estructuras altamente especializadas localizadas en las terminaciones nerviosas de las neuronas sensoriales primarias, que generan señales eléctricas específicas a la naturaleza, intensidad y duración del estímulo. Este proceso se denomina transducción sensorial, y además de permitir la detección de estímulos de distinta tipología, nos lleva a diferenciar entre aquellos que resultan inocuos de los que pueden tener consecuencias nocivas (Purves, 2004).

Morfológicamente, estas terminales, pueden aparecer encapsuladas, conformando estructuras sensoriales complejas, o como terminaciones libres (**figura 1.1 A**). La información sensorial captada en ellas se envía al sistema nervioso central (SNC) en forma de trenes de potenciales de acción para su procesamiento. Esta transmisión se produce a través las vías de sensibilidad de la cabeza, las vías ascendentes medulares y la vía mediada por el nervio vago. La mayoría de las neuronas sensoriales primarias que las conforman, ubican sus somas agrupados en un conjunto de ganglios sensoriales periféricos (Quiroz, 1993; Kandel, 2013).

En la cabeza, el principal ganglio de recepción somatosensorial es el ganglio trigémino, que recibe información sensitiva de la cara y del resto de estructuras craneales expuestas al medio externo (**figura 1.1 B**). Otros ganglios sensoriales cefálicos son: el geniculado, que recibe información sensorial gustativa de los tercios anteriores de la lengua; los ganglios superior e inferior del glosofaríngeo, que reciben información sensorial general de la mucosa de la faringe, amígdala palatina y tercio posterior de la lengua, y los ganglios nodoso y yugular, desde donde se originan las fibras sensoriales del nervio vago que llegan a diversas áreas cefálicas como la faringe, laringe o el tracto auricular (Quiroz, 1993; Purves, 2004; Moore et al., 2007).

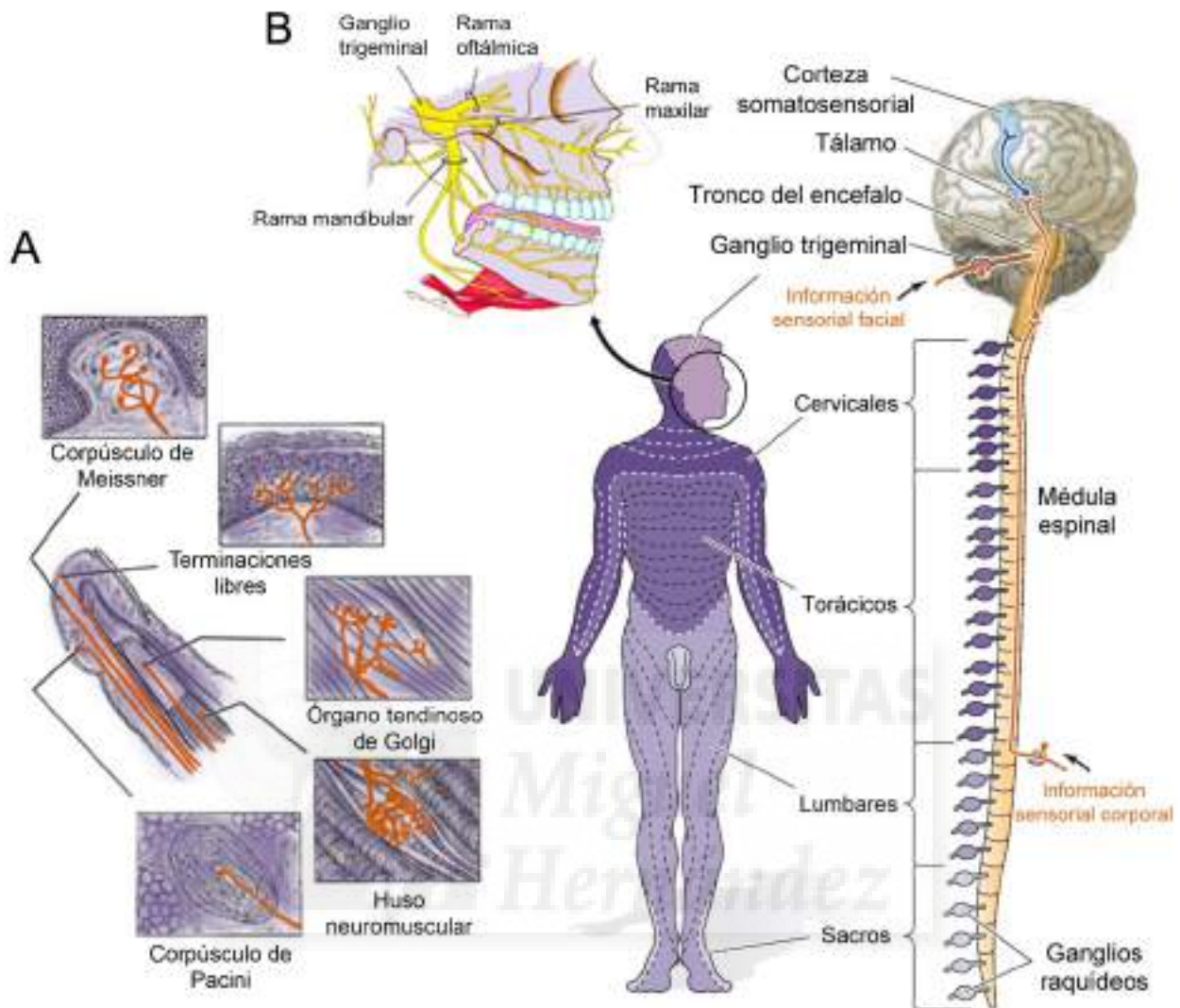


Figura 1.1 Organización anatómica y funcional del sistema somatosensorial. A. Las terminaciones nerviosas, que conforman los distintos tipos de receptores sensoriales detectan la información sensorial externa e interna. B. Las neuronas sensoriales primarias alojadas en los ganglios raquídeos y trigéminos, que inervan el cuerpo y el rostro, respectivamente, envían la información sensorial recogida al sistema nervioso central para su integración. Modificado de Edith J. Applegate (2000), y Purves (2004).

La información sensorial recabada en el tronco y las extremidades se procesa en neuronas alojadas en una cadena de ganglios paravertebrales conocidos como ganglios raquídeos. Sus proyecciones axonales periféricas llegan hasta estructuras superficiales como la piel captando información somatosensorial (figura 1.1 B), pero también hasta las articulaciones, músculos y algunos órganos viscerales (p.e. pulmones, corazón, páncreas, hígado, ect.)(figura 1.2). Estas neuronas conectan con neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la medula espinal desde donde se envía la información captada al SNC. Asimismo,

inervación sensorial interoceptiva adicional es captada a través de las fibras sensoriales que viajan por el nervio vago y cuyos somas neuronales residen en los ganglios nodoso y yugular, proyectando sus axones posteriormente al núcleo del tracto solitario en el bulbo raquídeo (figura 1.2)(Kandel, 2013; Purves, 2004; Moore et al., 2007).

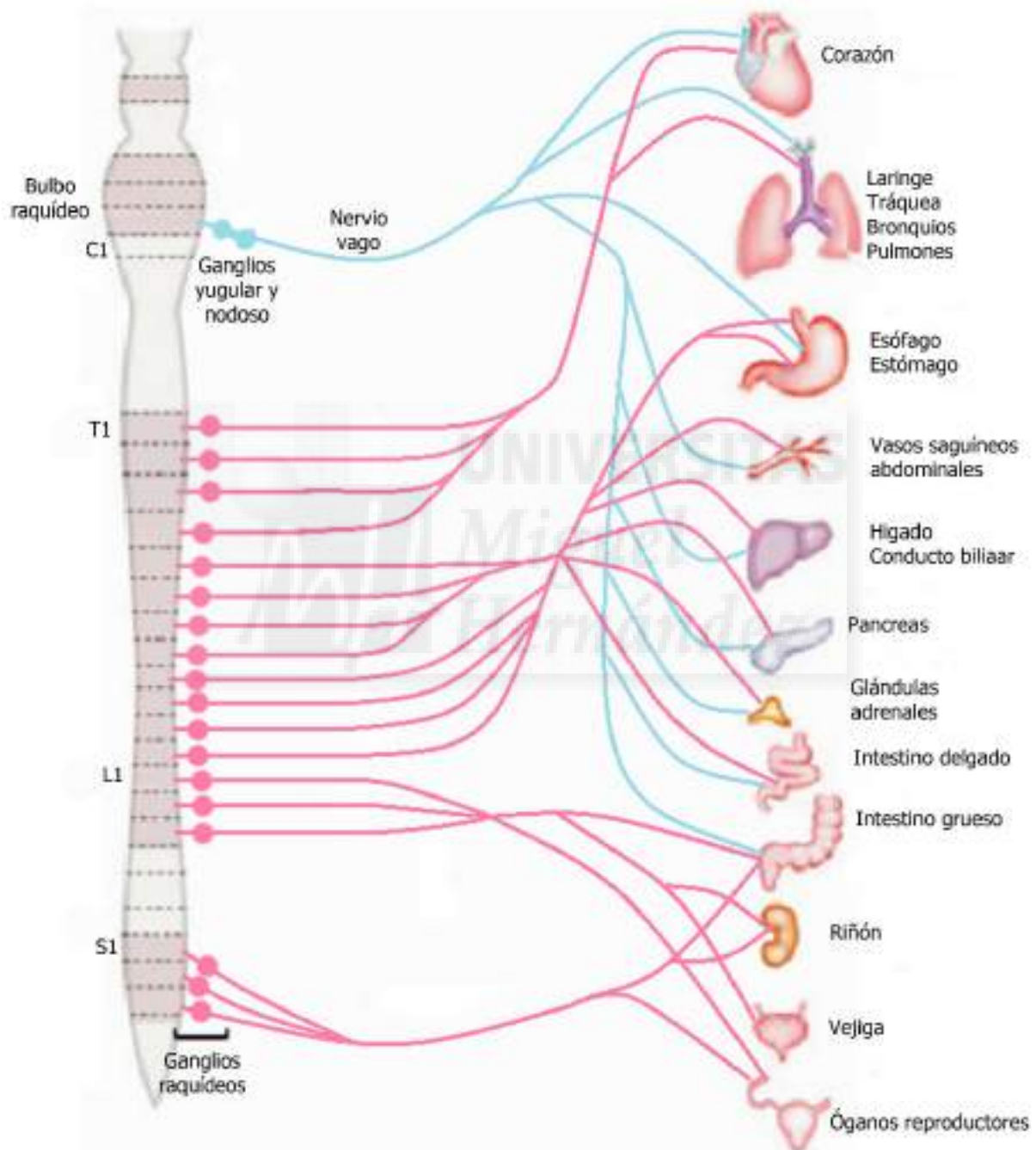


Figura 1.2 Distribución de las fibras sensoriales aferentes que inervan las vísceras. Estas aferencias proceden de neuronas sensoriales ubicadas en los ganglios raquídeos o en los ganglios nodoso y yugular donde se origina el nervio vago. Modificado de Abdullah y Firmansyah (2012).



1.1.2 Fibras nerviosas sensoriales.

Las fibras nerviosas sensoriales que inervan los tejidos periféricos son funcional y morfológicamente diversas. La manera clásica de clasificación de estas fibras es la propuesta por Erlanger y Gasser (1937), realizada en función de su velocidad de conducción, la cual depende del diámetro de la fibra, y de su grado de mielinización. Así, se distinguen las fibras A, mielínicas, de conducción rápida, y las fibras C, amielínicas y de conducción lenta. Las fibras A son las más abundantes y abarcan un amplio rango de velocidades de conducción, por lo que, a su vez se subdividen en tres subtipos:

- Fibras A α : Presentan un grado de mielinización medio, y un diámetro de 12-20 μm . Conducen el impulso nervioso a una velocidad de 72-120 m/s. Inervan principalmente fibras musculares y se asocian funcionalmente con la propiocepción.
- Fibras A β : Son fibras mielinizadas, de 6-12 μm de diámetro que conducen el impulso nervioso a una velocidad de 36-72 m/s. Inervan principalmente la piel y se asocian con la mecanocepción.
- Fibras A δ : Son fibras moderadamente mielinizadas, con un diámetro de 1-6 μm de grosor que conducen el impulso nervioso a una velocidad de 4-36 m/s. Inervan una gran variedad de tejidos y se aprecian en gran medida en los folículos pilosos. Se asocian con la termocepción y la nocicepción.
- Fibras C: Son fibras amielínicas de pequeño grosor (0,2-1,5 μm) que conducen los impulsos eléctricos a 0,4-2 m/s. Aparecen en forma de terminaciones libres, principalmente en la piel. Se asocian con la termocepción, mecanocepción y la nocicepción.

Las fibras amielínicas C son muy heterogéneas desde el punto de vista bioquímico y funcional. En función de sus características bioquímicas, más concretamente, en base a su expresión de neuropéptidos se han clasificado en distintas subpoblaciones. La población denominada peptidérgica produce sustancia P y el péptido asociado al gen de la calcitonina (CGRP), ambas moléculas de gran relevancia en el proceso de inflamación, y también expresan el receptor TrkA del factor de crecimiento nervioso (NGF). La población no peptidérgica, por el contrario, expresa el receptor c-Ret para el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y varios subtipos de receptores purinérgicos, el más notable, el P2X₃, y además muestran

capacidad de unión a la isolectina IB4 (revisado por Basbaum et al., 2010; Kandel, 2013).

Otra forma de clasificar a los receptores sensoriales hace referencia a su umbral de activación y a su tasa de adaptación. El primer término, se refiere a la intensidad mínima del estímulo que activa al receptor, y el segundo, a la disminución de la respuesta eléctrica ante la presencia persistente del estímulo.

1.1.3 Canales iónicos y transducción sensorial.

La membrana plasmática que delimita la célula es una barrera selectivamente permeable que permite el paso al medio intracelular del agua, iones y distintos metabolitos. A causa de esta regulación, las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana son diferentes, lo que hace que, en situaciones estables, haya más cargas negativas en el interior, detectándose un voltaje negativo constante denominado potencial de membrana en reposo.

En el caso de las neuronas sensoriales, se han identificado distintos tipos de proteínas transmembrana especializadas que conforman canales iónicos, cuya apertura y cierre se produce en respuesta a estímulos sensoriales concretos, permitiendo el paso regulado de iones a través de su poro (Purves, 2004). El cambio de conformación proteica que da lugar a la apertura de los distintos canales iónicos puede ocurrir como consecuencia de varios mecanismos, como son la unión a un ligando específico (intra o extracelular), alteraciones del voltaje transmembrana, o estímulos físicos (mecánicos o térmicos). Una característica biofísica que define a los distintos canales iónicos es su selectividad iónica y su permeabilidad, que permite discriminar el flujo de iones según su carga (definiendo canales catiónicos o aniónicos), y el tamaño del ion (canales de sodio, de calcio, de potasio, etc.)(Hille, 2001).

Cuando la neurona receptora recibe el estímulo sensorial específico que provoca la apertura de los canales iónicos que posee, se produce un potencial receptor, es decir, una alteración transitoria del potencial de membrana en reposo debido al paso de cargas. La cantidad de iones translocados, y la amplitud de la despolarización, es proporcional a la intensidad del estímulo aplicado. Si el potencial receptor producido es lo suficientemente despolarizante, se alcanza el umbral para la generación de potenciales de acción, produciéndose un cambio momentáneo en la polaridad del potencial de membrana que pasa a ser positivo y se transmite a lo largo de la fibra axonal hacia el SNC. La amplitud del potencial



de acción es constante, independiente de la magnitud de la despolarización generada durante el potencial receptor desencadenante; sin embargo, a mayores corrientes, mayor número de potenciales de acción generados. Por tanto, la intensidad del estímulo se codifica en forma de frecuencia de potenciales de acción, que se propagan neurona a neurona mediante procesos de sinápsis.

Como resultado final de este proceso, se consigue el procesamiento de la información procedente de nuestro medio interno y del que nos rodea, así como la generación de sensaciones y adaptaciones fisiológicas y comportamentales diversas, de manera general o puntual (Purves, 2004).

1.1.4 Procesamiento de la información térmica.

Los receptores sensoriales que detectan cambios de temperatura se denominan termorreceptores. Son los encargados de monitorizar permanentemente los cambios térmicos que afectan al organismo, tanto los externos (adversidades ambientales), como los internos, (respuestas inflamatorias, fiebre, etc.), enviando esta información a distintas estructuras del cerebro para su procesamiento. A nivel central, la información térmica recabada se integra tanto a través de la ruta sensorial, que permite la detección, localización y discriminación de los estímulos térmicos, como a través de la ruta homeostática, que llevará a la puesta en marcha de los mecanismos termorreguladores que permiten mantener la temperatura corporal estable. Estos mecanismos regulatorios provocarán la pérdida de calor corporal o la generación de calor interno en función de las necesidades, resultando esenciales en los organismos homeotermos para garantizar su correcto funcionamiento vital. En condiciones ambientales termoneutras, pequeños ajustes en el grado de vasoconstricción permiten mantener la temperatura interna constante. Sin embargo, cuando el individuo se expone a temperaturas fuera del rango de la termoneutralidad, entran en juego otros mecanismos termorreguladores que incluyen procesos disipadores de calor como la sudoración y procesos termogénicos como los escalofríos y la termogénesis en la grasa parda, así como determinados comportamientos locomotores y de hiperfagia. Todos estos procesos, evidencian una íntima interrelación entre el sistema sensorial, la termorregulación y la homeostasis energética (revisado por Señarís et al., 2018).

Las estaciones centrales primarias de recopilación de información sensorial térmica se sitúan en el núcleo parabraquial lateral (LPB) y en el núcleo ventromedial del tálamo (VM). Se ha comprobado que esta última ubicación, no está involucrada en la ruta homeostática, pues su lesión no afecta a la termorregulación. No obstante, la primera, es precisa para ambas (Yahiro et al., 2017).

El LPB está situado en el tronco del encéfalo y recibe aferencias de la medula espinal. Como vemos en la [figura 1.3](#), en esta ubicación hay centros diferenciados para la recepción de señales de temperaturas altas (subnúcleo dorsal, LPBd) y bajas (subnúcleo lateral en su parte externa, LPBel) de modo que se activan vías de transducción diferentes. Las neuronas termoprocadoras del LPB proyectan al área preóptica (POA) del hipotálamo, la parte del cerebro considerada como el gran centro termorregulador del organismo. En esta localización, no solamente se monitoriza la información termosensitiva periférica, sino también la temperatura local del cerebro, mediante neuronas hipotalámicas sensibles al calor y al frío. Así, se ha comprobado que cuando el hipotálamo se enfría o se calienta se disparan mecanismos de conservación o disipación del calor respectivamente, constatándose en ella la existencia de neuronas termosensibles. Las neuronas del LPB proyectan principalmente a dos zonas del hipotálamo: el área preóptica medial (MPO) y el núcleo preóptico mediano (MnPO), desde donde se va modular la actividad de otros núcleos implicados que acabarán desencadenando las respuestas termorreguladoras (Morrison, 2016).

En el caso del calor, la vía nerviosa de detección actúa tanto a través del MPO como del MnPO, inhibiendo la ruta del frío y generando vasodilatación; en este proceso está involucrada la zona ventral del núcleo lateral preóptico (vLPO). Para detectar el frío, la vía actúa a través del MnPO, inhibiendo la ruta del calor y desencadenando, por un lado, los procesos de termogénesis en la grasa parda y la activación muscular (tiritera) por mediación del núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH), y por otro lado, mecanismos de vasoconstricción. Las respuestas efectoras se generan a través de la activación de neuronas premotoras del núcleo del rafe “pallidus”, situadas en su parte rostral (rRPa), que conectan con la médula espinal ([figura 1.3](#)).

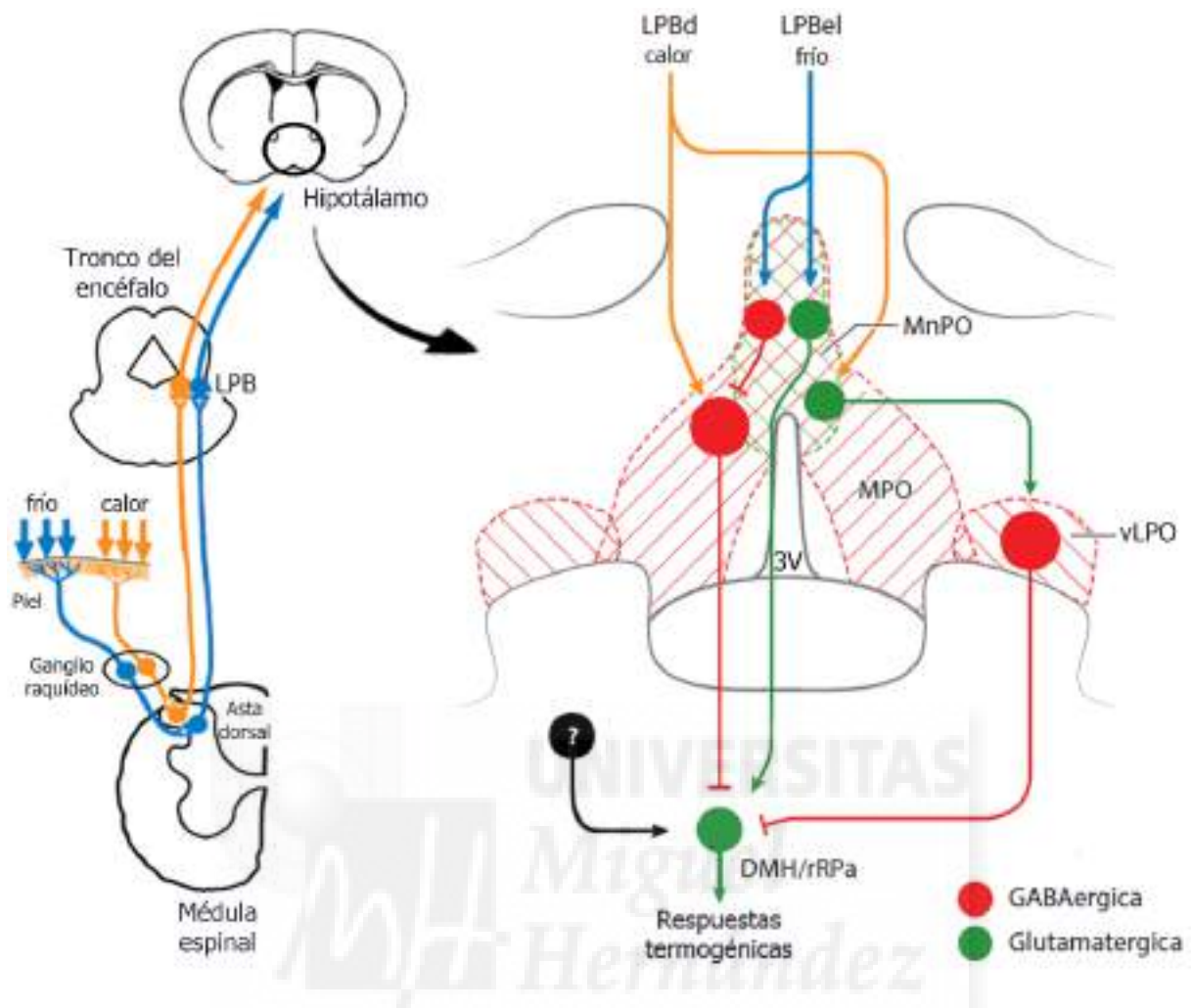


Figura 1.3 A la izquierda, modelo neuroanatómico funcional que muestra las rutas fundamentales para el desencadenamiento de los procesos termorregulatorios centrales modulados por la temperatura ambiental. A la derecha, esquema de los circuitos locales en la POA que controlan las respuestas termorregulatorias. 3V: tercer ventrículo; DMH: núcleo dorsomedial hipotalámico; LPB: núcleo parabraquial, parte dorsal (LPBd) y parte lateral externa (LPBel); MnPO: núcleo preóptico medio; MPO: área preóptica medial; rRPa: núcleo del rafe “pallidus”, parte rostral; vLPO: núcleo preóptico lateral, parte ventral. Modificado de Morrison (2016), y Morrison y Nakamura (2019).

Por la vía sensorial, el núcleo VM del tálamo conecta con la corteza somatosensorial y la amígdala dónde se generan las sensaciones, lo que desencadenará los mecanismos comportamentales de confort térmico. Como ya comentamos en unos párrafos anteriores, el LPB parece estar involucrado en esta vía sensorial, pero la conexión efectora no se conoce con precisión, pues aunque proyecta a la amígdala transduciendo señales de dolor, no parece que sea desde las mismas neuronas que procesan la temperatura en el rango inocuo, y aún no se ha conseguido determinar si la POA también media en termosensación de alguna manera (revisado por Morrison y Nakamura, 2019).

1.2 La familia de los canales iónicos TRP.

Dentro de la enorme diversidad de canales iónicos conocidos, se encuentra la llamada familia de canales TRP. Su nombre proviene del fenotipo mostrado por un mutante de *Drosophila melanogaster*, en la que se descubrió la primera proteína integrante de esta familia. Esta mosca mutante exhibía un potencial receptor transitorio (TRP, “transient receptor potential”, por sus siglas en inglés) en retina ante su exposición a pulsos lumínicos (Cosens y Manning, 1969; Montell y Rubin, 1989) y de ahí el nombre que se dio a la proteína responsable. Desde entonces, han sido muchos los canales identificados pertenecientes a esta gran familia, localizándose exclusivamente en organismos eucariotas, desde los más sencillos, como las levaduras, hasta los grandes vertebrados (revisado por Li, 2017).

1.2.1 Estructura y funcionalidad.

Estructuralmente, los canales TRP tienen una conformación tetramérica, es decir, están integrados por cuatro subunidades proteicas ensambladas. Aunque se piensa que la mayoría de los canales TRP conforman homotetrámeros, también se ha comprobado su capacidad para formar heterómeros entre miembros de la misma subfamilia o de subfamilias diferentes (Cheng et al., 2010).

Cada unidad proteica presenta 6 dominios transmembrana α -hélice (S1-S6), y entre los dominios S5 y S6 se sitúa un tramo anfipático que conforma el poro del canal y donde se encuentra el dominio “p-loop” responsable de la selectividad iónica; además los extremos carboxilo terminal y amino terminal se localizan siempre en el medio intracelular.

La mayoría de estos canales contienen una secuencia altamente conservada en el extremo carboxilo terminal denominada dominio TRP y unas repeticiones de anquirina en el extremo amino terminal. La longitud de estos extremos terminales es muy variable de unos canales a otros y algunos miembros presentan características estructurales específicas y diferenciadas del resto (revisado por Pedersen et al., 2005; Montell, 2005; Venkatachalam y Montell, 2007; Wu et al., 2010; Madej y Ziegler, 2018; Muller et al., 2019) (figura 1.4).

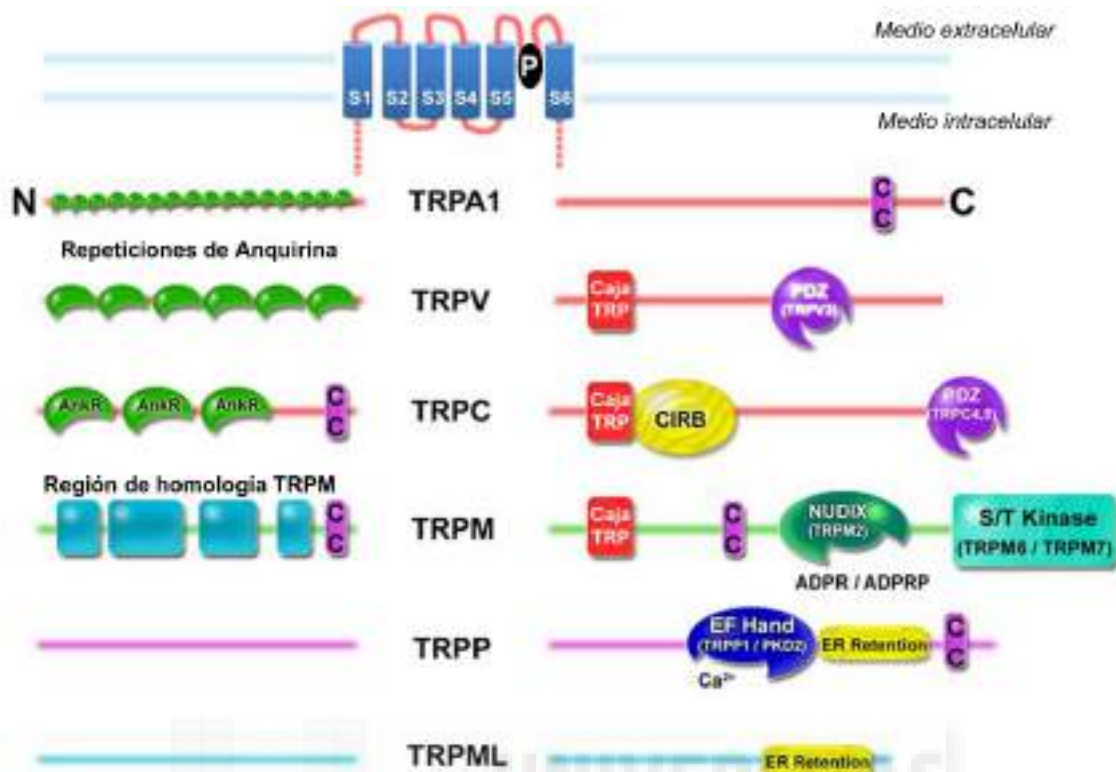


Figura 1.4 Representación esquemática de la estructura general de una unidad proteica que conforma los canales TRP. En la parte superior, se muestran los seis dominios transmembrana (S1-S6), el poro iónico (P) y la ubicación intracelular de los extremos amino (NH₂) y carboxilo (COOH) terminal. Debajo, se muestran las diferentes características estructurales que muestran los extremos amino (izquierda) y carboxilo terminal (derecha) en cada una de las subfamilias de canales TRP. Modificado de Doerner y Clapham (2018).

Funcionalmente, son canales catiónicos y, salvo excepciones, no selectivos, aunque de permeabilidad variable. Median, principalmente, el flujo de Ca²⁺ y Na⁺ a través de la membrana plasmática, facilitando la generación de impulsos nerviosos y contribuyendo en la regulación de distintas funciones celulares.

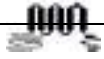
Los mecanismos de apertura y cierre de su compuerta son muy variados, respondiendo ante estímulos tanto físicos, como mecánicos o químicos, siendo la mayoría polimodales. Se han identificado moléculas exógenas que actúan como agonistas, así como algunas endógenas. Muchas de éstas últimas se corresponden con pequeños lípidos que parecen interaccionar funcional y estructuralmente con los canales TRPs, modulando su actividad en los procesos celulares desde diferentes rutas metabólicas lipídicas; no obstante sus formas de actuación aún no son del todo comprendidas (revisado por Wu et al., 2010; Ciardo y Ferrer-Montiel, 2017).

1.2.2 Nomenclatura y distribución filogenética.

Debido a la diversidad estructural y funcional que presenta la familia de los canales TRP, no es posible hacer una clasificación de los mismos en base a estas características, criterios que normalmente se han utilizado para clasificar otros tipos de canales iónicos. Por ello, se ha llegado al consenso de hacerlo en base a su homología en la secuencia de aminoácidos.

En mamíferos, son 28 los canales identificados, y se subdividen en 6 subfamilias; TRPC, TRPA, TRPV, TRPM, TRPML y TRPP, siendo estas dos últimas las más alejadas filogenéticamente (**figura 1.5**) (revisado por Clapham, 2003; Montell, 2005; Pedersen et al., 2005; Venkatachalam y Montell, 2007; Wu et al., 2010; Kaneko y Szallasi, 2014; Nilius y Szallasi, 2014; Li, 2017).

- Subfamilia TRPC: Son los que mayor homología presentan con la proteína primigenia hallada en el mutante de *Drosophila*, por ello su denominación con la letra “C” que hace referencia a “canónico”. Cuenta con siete miembros (C1-C7).
- Subfamilia TRPA: este grupo está formado por un único miembro, TRPA1, y se denomina “A” por la característica estructural que posee en su extremo N-terminal, en el que aparecen un número mucho mayor de repeticiones de anquirina. Se ha hipotetizado que estas anquirinas le permiten anclarse a la membrana plasmática, haciéndolo más sensible a sus cambios de conformación, desempeñando así algún papel en mecanotransducción (Story et al., 2003).
- Subfamilia TRPV: La “V” hace referencia a la identificación del primero de sus miembros, TRPV1, receptor activado por el compuesto vanilloide capsaicina (Caterina et al., 1997). Esta subfamilia la componen 6 miembros (V1-V6) y está ampliamente distribuida por el organismo, por lo que se le atribuye relación con diversas funcionalidades sensoriales y regulatorias.
- Subfamilia TRPM: Al igual que la subfamilia anterior su nombre “M” hace referencia a la denominación de su primer integrante descrito, TRPM1, pues se identificó como el gen de la melastatina (Duncan et al., 1998). Está compuesta por 8 miembros (M1-M8), e igualmente están ampliamente distribuidos.



- Subfamilia TRPML: Consta de 3 miembros (ML1-ML3) que se expresan intracelularmente, en la membrana de los lisosomas. Guardan gran relación con la proteína MCOLN necesaria para el correcto funcionamiento de los mismos (Sun et al., 2000), por ello, su denominación “ML” que se refiere a mucolipina, el tipo de esta proteína.
- Subfamilia TRPP: La “P” hace referencia a policistina, el nombre dado a su primer miembro descrito, y cuya mutación se demostró responsable de causar el riñón poliquistico (Mochizuki et al., 1996). Está conformada por 3 miembros (TRPP1-TRPP3).

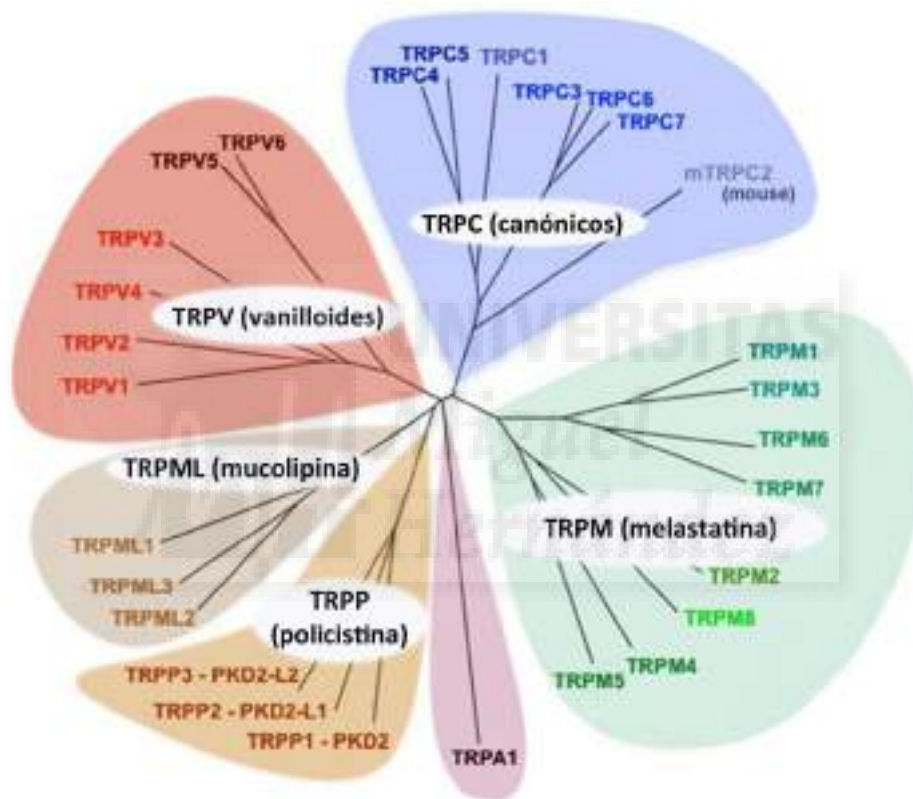


Figura 1.5 Árbol filogenético de la familia de canales iónicos TRP encontrados en humanos. Se muestran separados por subfamilias en función de su homología. La longitud de las ramas muestra su distancia evolutiva. Modificado de Doerner y Clapham (2018).

1.2.3 Implicaciones fisiológicas.

Debido a la distribución tisular generalizada que presentan estos canales y a la multitud de tipos de estímulos que los activan, se les atribuye un papel crítico en múltiples procesos fisiológicos. Así, se ha determinado la implicación de estos canales en el sentido del gusto, olfato, visión, termosensación, mecanotransducción, en la señalización por feromonas, procesos de desarrollo, vasorregulación, inflamación, y regulación del ciclo celular, entre otros

(revisado por Clapham, 2003; Venkatachalam y Montell, 2007; Damann et al., 2008; Wu et al., 2010; Nilius y Owsianik, 2011; Yu et al., 2011; Julius, 2013; Blackshaw, 2014; Wang y Siemens, 2015; Yu et al., 2016; Li, 2017; Bishnoi et al., 2018). Igualmente, la disfuncionalidad de los distintos canales TRP se asocia a diversas patologías, que, como canales iónicos que son, se denominan canalopatías. La causa puede ser adquirida, derivada de cambios regulatorios intrínsecos del propio individuo, o genética, resultantes de alguna mutación en la secuencia que lo codifica y que por tanto son heredables. Entre las distintas patologías asociadas a canales TRP se incluyen la mucopolidosis IV (TRPML1), el riñón poliquístico autosómico dominante (TRPP1/P2), el síndrome de Olmstedts (TRPV3) y la displasia metatrófica (TRPV4)(revisado por Nilius y Szallasi, 2014).

1.2.4 Canales TRP termosensibles.

En función de la dinámica térmica a la que responden los termorreceptores, éstos se consideran de frío o de calor; los primeros responden ante una bajada de temperatura, y los segundos ante un aumento. De este modo, es posible monitorizar de manera precisa los distintos cambios térmicos que afectan al organismo (Hensel, 1981).

Entre los miembros de la familia de canales TRP, se han descrito varios que muestran una marcada termosensibilidad, y que por tanto se abren o cierran en función de los cambios de temperatura a que están expuestos. Sus temperaturas de activación cubren todo el rango térmico sensorial, desde el calor nocivo hasta el frío lesivo, por lo que se proponen como receptores específicos en lo que a termosensibilidad y nocicepción se refiere (Belmonte y Viana, 2008). Por otro lado, algunos también han demostrado ser claves en procesos termorregulatorios que llevan al ajuste hormonal, metabólico y comportamental adecuado para el mantenimiento de la homeotermia (Ahern, 2013). Los descritos como especialmente termosensibles, hasta ahora, son: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1 y TRPC5 (figura 1.6).

El primer TRP termosensible identificado fue el canal TRPV1, también conocido como receptor de capsaicina. Se activa por aumentos de temperaturas que alcanzan el rango nocivo (>43°C), y que generan sensaciones dolorosas “in vivo” (Caterina et al., 1997). Posteriormente, se identificaron otros 3 miembros de la subfamilia TRPV también termosensibles, e



identificados como receptores de calor: TRPV2, activado por temperaturas nocivas aún más altas ($>52^{\circ}\text{C}$) (Caterina et al., 1999) y TRPV3 y TRPV4, ambos activados por valores térmicos moderados ($>35^{\circ}\text{C}$ y $\approx 30^{\circ}\text{C}$ respectivamente) (Peier et al., 2002a; Watanabe et al., 2002; Güler et al., 2002).

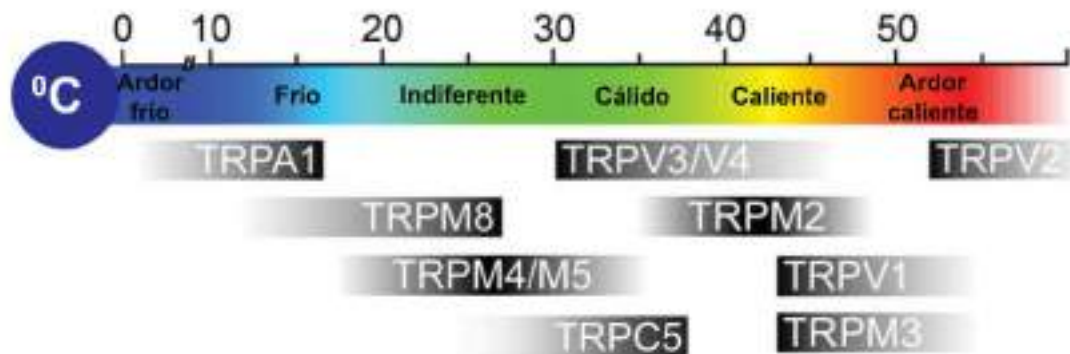


Figura 1.6 Canales TRP termosensibles, rango de temperatura en que se produce su activación e hipotética sensación evocada por los mismos. Modificado de Kashio y Tominaga (2017).

Dentro de la subfamilia TRPM se han identificado otros cuatro canales activados por calor, el TRPM2 y TRPM3, que responden a incrementos de temperatura, incluidos o cercanos al rango de valores nocivos ($>35^{\circ}\text{C}$ y $>40^{\circ}\text{C}$ respectivamente) (Togashi et al., 2006; Vriens et al., 2011), y TRPM4 y TRPM5, activados por temperaturas bajas-intermedias no nocivas (entre $15\text{-}35^{\circ}\text{C}$) (Talavera et al., 2005).

En el rango térmico frío, se han identificado dos canales TRP activados por descensos de la temperatura: el canal TRPM8, que responde a temperaturas moderadas inferiores a las corporales ($<28^{\circ}\text{C}$) (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b) y TRPA1, que responde a valores más bajos dentro del rango nocivo ($<17^{\circ}\text{C}$) (Story et al., 2003).

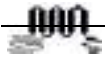
Finalmente, TRPC5 es el canal TRP termosensible descrito más recientemente, se activa por bajadas de temperatura pero en el rango de las temperaturas percibidas como cálidas ($37\text{-}25^{\circ}\text{C}$) (Zimmermann et al., 2011).

Se ha intentado determinar el papel térmico sensorial y regulatorio de estos canales “in vivo” gracias a la caracterización de ratones transgénicos en los que se ha eliminado la expresión del canal de interés (animales denominados “knockout” (KO)), y al uso de

activadores (agonistas) y bloqueantes (antagonistas) específicos de cada canal. De este modo, se han evaluado las alteraciones termorregulatorias y del comportamiento animal ante la exposición a distintos estímulos térmicos tanto inocuos como nocivos, así como el efecto de la aplicación sistémica o localizada de las sustancias mencionadas. Dichos estudios han sido complementados con análisis hormonales, moleculares y electrofisiológicos. Sin embargo, las anomalías detectadas, también podrían deberse a alteraciones directas de las propias neuronas sensoriales primarias o bien al procesamiento de la información a nivel central.

Poniendo el punto de mira en los canales activados por altas temperaturas, observamos que los modelos de ratón KO de TRPV1 y TRPM3 muestran un déficit severo en la detección de estímulos termales en el rango del calor nocivo (Caterina et al., 2000; Vriens et al., 2011), y el de TRPM2 en la detección de temperaturas altas que aún no llegan a ser nocivas (Tan y McNaughton, 2016). También hay estudios que relacionan al canal TRPV1 y TRPM2 con la regulación de la temperatura corporal actuando como freno a la excesiva elevación térmica (Gavva et al., 2007; 2008; Song et al., 2016), ubicando la influencia del canal TRPM2 a nivel central, pues parece expresarse en regiones del área preóptica hipotalámica (Song et al., 2016). En contraposición, el truncado del gen TRPV2 no parece tener ningún efecto sensorial en ratones (Park et al., 2011), aunque sí en procesos de termogénesis (Sun et al., 2016).

Dentro de los canales activados por temperaturas intermedias, vemos que los ratones carentes de TRPV3 muestran deficiencias en la percepción del calor inocuo y nocivo y en los mecanismos de vasodilatación (Moqrich et al., 2005; Fromy et al., 2018). El canal TRPV4 se ha asociado recientemente con procesos termorregulatorios tanto a nivel central como periférico (Vizin et al., 2015; Yadav et al., 2017) y además se ha comprobado que los ratones que no lo expresan parecen estar más cómodos en temperaturas más cálidas lo que también revela un déficit termosensorial (Lee et al., 2005). Los canales TRPM4 y TRPM5, se relacionan funcionalmente con el sentido del gusto, por lo que el hecho de que sean termosensibles pone de relevancia la influencia de la temperatura en la percepción de los sabores (Talavera et al., 2005; Dutta Banik et al., 2018). Sin embargo, a pesar de la existencia de modelos transgénicos de ratón KO para ambos canales, no hemos encontrado estudios que los relacionen con la termosensibilidad, aunque en los últimos años sí que se ha relacionado a TRPM4 con procesos de adipogénesis (Tran et al., 2014). La baja expresión de TRPM5 en ganglios sensoriales



primarios hace suponer que, al menos este canal, no tenga demasiada influencia en termotransducción sensorial (Vandewauw et al., 2013).

Por otro lado, observando las implicaciones de los canales TRP activados por frío, el canal TRPM8 es considerado el principal receptor de frío inocuo, pues se ha demostrado que los ratones que no lo expresan muestran déficits sensoriales en este rango térmico (Bautista et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Colburn et al., 2007). También se ha involucrado a este canal en procesos de termorregulación, con función en la vasoconstricción periférica y en el mantenimiento de la temperatura corporal (Knowlton et al., 2011; Almeida et al., 2012; Reimúndez et al., 2018). En el caso de TRPA1, existe cierta controversia, pues, aunque hay estudios “in vivo” que lo proponen como el receptor de frío nocivo y con influencia en termorregulación, también hay otros que no encuentran evidencia de ello (revisado por Señarís et al., 2018).

Por último, la eliminación del canal TRPC5 no muestra ninguna influencia en termosensación, aunque sí que se ha descrito su influencia en el metabolismo de los ácidos grasos (Zimmermann et al., 2011; Sukumar et al., 2012).

1.3 TRPM8.

En el año 2001, Tsavaler y sus colaboradores identificaron y clonaron un nuevo gen a partir de una librería genómica de ácido desoxirribonucleico (ADN) procedente de muestras cancerígenas de próstata humana. Del estudio de esta nueva proteína concluyeron que poseía una gran homología con los integrantes de la familia de canales TRP, concretamente la relacionada con la proteína melastatina (Tsavaler et al., 2001). Inicialmente, la denominaron como TRP-p8 y posteriormente, tras la unificación de la nomenclatura de canales de la familia TRP pasó a llamarse TRPM8 (Montell et al., 2002). En este primer estudio, el canal fue señalado como un marcador cancerígeno, pues su expresión se observó notablemente incrementada en tumores recogidos de distintos tejidos humanos; hoy en día su papel en este ámbito aún no está suficientemente esclarecido (revisado por Noyer et al., 2018).

Poco después, dos grupos de investigación independientes, mediante estrategias diferentes de experimentación, identificaron y clonaron un canal iónico que se activaba ante la exposición a frío y a mentol a partir de muestras de ganglios trigéminos y raquídeos de

roedor. Este canal fue propuesto como un termorreceptor de frío que participaba en somatosensación a través del sistema nervioso periférico (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b) y resultó ser ortólogo del canal TRPM8 descrito en humanos.

Desde entonces, son numerosos los estudios que han sido realizados “in vivo” e “in vitro” acerca del canal y sus posibles implicaciones fisiológicas, principalmente en termosensación y nocicepción (Abe et al., 2005; de la Peña et al., 2005; Proudfoot et al., 2006; Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Xing et al., 2008; Johnson et al., 2009; Cho et al., 2010; Knowlton et al., 2011; Tajino et al., 2011; Almeida et al., 2012; Gavva et al., 2012; Liu et al., 2013a; Milenkovic et al., 2014; Ran et al., 2016; Moraes et al., 2017; Huang et al., 2017; Reimúndez et al., 2018).

1.3.1 Expresión.

El principal emplazamiento de expresión de TRPM8 es en el sistema nervioso periférico, circunscrito a un pequeño subgrupo (\approx 10-15%) de neuronas sensoriales primarias. En su mayoría son neuronas no peptidérgicas, de pequeño tamaño y que se ubican, mayoritariamente, en ganglios raquídeos y trigéminos (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b). Desde esta ubicación se han descrito fibras que expresan TRPM8 invadiendo tejidos expuestos al exterior, como la piel (Dhaka et al., 2008; Milenkovic et al., 2014), la córnea (Parra et al., 2010), la lengua (Abe et al., 2005) o las mucosas oral (Sato et al., 2013) y nasal (Plevkova et al., 2013). También se ha descrito que inervan algunos tejidos internos y órganos viscerales como las meninges (Dhaka et al., 2008), la vejiga (Mukerji et al., 2006), el tracto digestivo (Yu et al., 2016) y el respiratorio (Xing et al., 2008).

La expresión de TRPM8 fuera de los ganglios sensoriales primarios y en tejidos no neurales, está mucho menos caracterizada, aunque se ha descrito su presencia en distintos sistemas, con niveles de expresión mucho más bajos que en ganglios periféricos. En este sentido, existen varios estudios que sugieren una amplia distribución tisular de este canal, encontrándose en células espermatozógenas (de Blas et al., 2009), pulpa dental (Tokuda et al., 2015), epitelio pulmonar (Sabnis et al., 2008a), macrófagos (Khalil et al., 2016), próstata (Bidaux, 2005), queratinocitos (Denda et al., 2010), grasa (Rossato et al., 2014), y miocitos vasculares (Johnson et al., 2009) entre otros tejidos. En el SNC, únicamente hemos encontrado



algunos trabajos que describen su expresión de forma general en el cerebro o de forma específica en el hipotálamo, aunque sin aportar más detalles sobre el tipo celular que la albergaría y su distribución anatómica (Mittag et al., 2013; Wang et al., 2017; Bräunig et al., 2018).

1.3.2 Estructura y funcionalidad.

La conformación estructural de TRPM8 se corresponde con el modelo homotetramérico general ya explicado para los canales de la familia TRP, con 6 dominios transmembrana y los extremos amino y carboxilo terminal citoplasmáticos.

Al igual que el resto de los componentes de la subfamilia TRPM, cada subunidad consta de un largo extremo amino terminal, que a diferencia de las otras subfamilias, no posee repeticiones de anquirina. En el extremo carboxilo terminal, contiene la secuencia altamente conservada conocida como dominio TRP, cuya parte inicial se denomina “caja TRP”, y que en este caso, se relaciona con la unión inicial a su agonista el mentol y la apertura del canal (Bandell et al., 2006). También hay algunos estudios que sugieren que la parte más distal de este extremo tiene influencia en el correcto proceso de ensamblaje del canal permitiendo su tetramerización (Erler et al., 2006; Tsuruda et al., 2006). Por ello, parece ser determinante para su correcto funcionamiento, así como la región del extremo amino terminal que comprende los aminoácidos 40-86 (Phelps y Gaudet, 2007) (**figura 1.7**).

TRPM8 conforma un canal catiónico, no selectivo y polimodal, cuya actividad es dependiente de la presencia de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), y por tanto de la actividad de la fosfolipasa C (Rohács et al., 2005; Daniels et al., 2009). Otras moléculas endógenas como la proteína quinasa C (PKC), algunos mediadores de la inflamación y lípidos han mostrado también tener cierta influencia sobre el canal para modular su funcionalidad (Premkumar et al., 2005; Andersson et al., 2007; Linte et al., 2007).

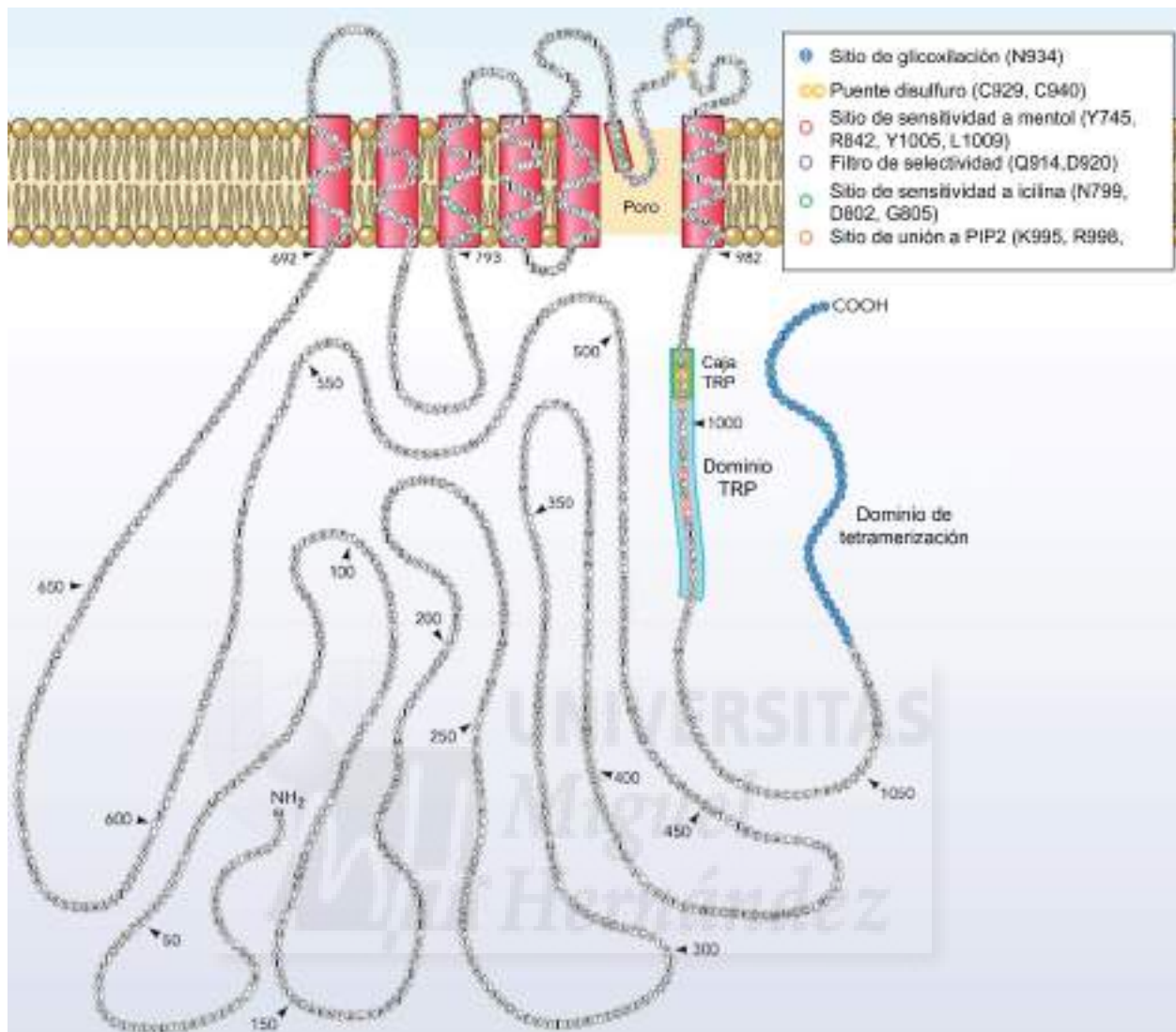


Figura 1.7 Secuencia de aminoácidos de una subunidad del canal iónico TRPM8 de ratón. Se muestra su correspondencia estructural con los seis dominios transmembrana, la región del poro, y los extremos intracelulares amino y carboxilo terminal. Aparecen representados los sitios regulatorios indicados en el cuadro situado en la esquina superior derecha. Modificado de Latorre et al. (2011).

El canal es altamente permeable al Ca^{2+} y se activa débilmente por cambios de voltaje. Las bajadas de temperatura en el rango frío moderado también provocan su apertura, así como varios compuestos químicos de origen natural y sintético. En este sentido, se describen una gran variedad de moléculas identificadas como moduladoras de la actividad iónica de TRPM8. Sus agonistas se caracterizan por evocar sensaciones de frescor, siendo los más representativos el mentol y la icilina. Igualmente, se han identificado diversos antagonistas. Los primeros descritos, como el BCTC o la capsazepina, no resultaron específicos, afectando también a la funcionalidad de otros canales; sin embargo, en los últimos años, diversas



compañías farmacéuticas han sintetizado e identificado diversos antagonistas que se describen como altamente selectivos (revisado por Almaraz et al., 2014; Weyer y Lehto, 2017; González-Muñiz et al., 2019).

Recientemente, Yin y su equipo (2018, 2019) han determinado la estructura del canal mediante microscopía crioelectrónica. Describen una ordenación espacial en tres capas, una transmembrana y otras dos citosólicas (una submembranal y otra más interior). También indican que el dominio amino terminal posee un pliegue característico, y que junto con el carboxilo terminal, conforma un anillo citosólico que interactúa con los segmentos transmembrana S1-S4 formando una cavidad en la capa submembranal. Los autores proponen que en este hueco está el dominio sensor de voltaje y que los segmentos S5 y S6 conformarían el poro (figura 1.8).

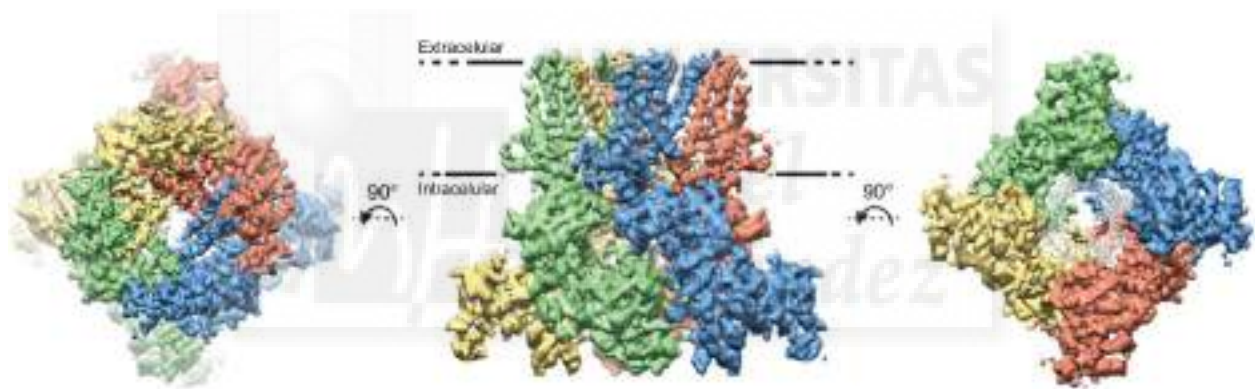


Figura 1.8 Reconstrucción tridimensional de la estructura del canal iónico TRPM8 basada en imágenes de microscopía crioelectrónica. Se observa una ordenación estructural en tres capas, una transmembrana y dos citosólicas (una submembranal y otra más interior). Cada color representa una de las cuatro subunidades proteicas que conforman el canal iónico TRPM8. Modificado de Yin et al. (2018).

Los mecanismos de acción por los que agonistas y antagonistas actúan sobre el canal empiezan a ser vislumbrados. Gracias a experimentos de mutagénesis y a la estructura recientemente descrita, ya se conocen algunos residuos clave para su funcionamiento, ciertos aspectos de su forma de interacción y sus consecuencias alostéricas.

Distintos estudios han identificado algunos residuos responsables de la activación por mentol, como el Y745 localizado en el segmento S1, y los residuos Y1005 y L1009 pertenecientes al dominio TRP. Igualmente, otras mutaciones en el segmento S4 modifican su afinidad (Bandell et al., 2006; Voets et al., 2007;). Algunas de estas posiciones, también

afectan a la activación por icilina, así como algunos residuos del segmento S2-S3 (N799, D802 y G805) que determinan su sensibilidad (Chuang et al., 2004; Bandell et al., 2006). El mismo residuo Y745 también ha mostrado ser diana del bloqueo generado por algunos de sus antagonistas, lo que hace suponer que es un residuo central en el mecanismo de apertura por ligando (Malkia et al., 2009). En el modelo tridimensional de Yin, todos estos residuos están localizados en el interior de la cavidad del dominio sensor del voltaje, por lo que proponen que también es el sitio de unión a mentol, icilina y otros compuestos relacionados (Yin et al., 2018, 2019).

El análisis por criomicroscopía sugiere que la molécula PIP2 se uniría al canal en la región interfaz entre el dominio transmembrana y la parte más cercana del complejo citoplasmático. Esta interacción provocaría un reordenamiento de la cavidad submembranal que posibilitaría la unión de compuestos ligando en su interior. Este espacio sería capaz de adoptar diferentes conformaciones, permitiendo encajar distintas moléculas como el mentol o la icilina, que al interactuar con los residuos específicos, se determinarían sus dinámicas de respuesta. Finalmente, la unión al agonista provocaría un nuevo cambio alostérico, que llevaría a la apertura del canal, en la que participaría la caja TRP (Yin et al., 2019).

En la región del poro también se describen ciertos residuos específicos que afectan al funcionamiento del canal, como las posiciones D920 y Y981 cuyas alteraciones lo inutilizan, el residuo Q914 que modifica su permeabilidad a Ca^{2+} (revisado por Latorre et al., 2011; Taberner et al., 2014), o un punto de N-glicosilación (N934) que en caso de ser eliminado afecta a la sensibilidad del canal a sus ligandos (Pertusa et al., 2012). Esta última ubicación está flanqueada por dos cisteínas que conforman un puente disulfuro también necesario para que el canal sea viable (Dragoni et al., 2006).

El mecanismo de apertura del canal ante la exposición al frío aún no se ha descrito. Sin embargo, recientemente se han localizado unos residuos no conservados en la región del poro que, junto a las posiciones 526-556 del extremo amino terminal influyen en su sensibilidad (Pertusa et al., 2018).

También se han descrito formas cortas del canal, aunque no en neuronas sensoriales primarias, y, hasta ahora, se mantienen pobremente caracterizadas (Bidaux et al., 2012, 2015, 2016).



1.3.3 TRPM8 en termosensación y nocicepción.

El estudio de la transducción sensorial del frío comenzó hace casi 70 años, gracias a los estudios pioneros de Hensel y Zotterman. Estos científicos demostraron que el frío aplicado sobre la piel del gato promovía la generación de impulsos eléctricos en determinadas fibras sensoriales; y también relacionaron la activación de estas fibras de frío con el efecto del mentol, el principio activo de la menta que evoca sensaciones de frescor (Hensel y Zotterman, 1951a, 1951b, 1951c). Estos trabajos sentaron las bases para la caracterización de los distintos tipos de fibras termosensitivas en mamíferos.

Sin embargo, no fue hasta finales de los años 90, cuando surgieron los primeros estudios que demostraban la existencia de respuestas a bajadas de temperatura y a agentes mentolados en algunas neuronas sensoriales primarias; las cuales se debían a la activación de canales catiónicos no selectivos (Suto y Gotoh, 1999; Reid et al., 2002). Otros estudios demostraron el papel de los canales de potasio en la modulación de las respuestas al frío de estas neuronas (Viana et al., 2002).

La identificación del canal TRPM8 en 2002 permitió establecer el primer sensor molecular del estímulo de frío, pues se comprobó que era capaz de ser modulado por un amplio rango de temperaturas, desde los 30 a los $\approx 15^{\circ}\text{C}$ (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b; Madrid et al., 2006). Poco tiempo después se generaron varios modelos transgénicos animales con el gen *trpm8* inactivado, comprobándose que mostraban deficiencias claras en la termodetección de bajas temperaturas (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). El conjunto de estas observaciones llevaron a confirmar su papel esencial en termosensación como transductor de bajas temperaturas, así como en otros procesos adaptativos relacionados. Sin embargo, así como su papel en la detección en estímulos fríos inocuos es indiscutible, existe un gran debate sobre su implicación en la detección del frío nocivo, que a día de hoy aún no se ha dado por concluido.

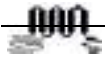
La temperatura a la cual un estímulo frío empieza a ser detectado como doloroso puede resultar muy variable. De hecho, se ha descrito en humanos, que puede percibirse como tal desde los 0 a los 28 $^{\circ}\text{C}$ (Morin y Bushnell, 1998); rango en el que TRPM8 es activado. Esto podría sugerir la conexión funcional del canal con rutas nociceptivas, y por tanto influir en la generación de la sensación de dolor. El canal TRPA1, igualmente expresado en neuronas

sensoriales primarias, y que se activa por temperaturas inferiores a las de TRPM8, también ha sido propuesto como sensor de frío nocivo (Story et al., 2003). No obstante, los resultados obtenidos en neuronas sensoriales que expresan TRPA1 han resultado bastante controvertidos en cuanto a su posible papel en nocicepción (Jordt et al., 2004; Nagata, 2005; Zurborg et al., 2007; Karashima et al., 2009; del Camino et al., 2010), situación que no ha mejorado con el estudio de los animales transgénicos sin expresión del canal (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006; Karashima et al., 2009; del Camino et al., 2010).

El análisis de los ratones KO para TRPM8, no han resultado tampoco concluyente, pues dependiendo del modelo utilizado o el test aplicado se observan comportamientos de aversión a temperaturas nocivas o no (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Sin embargo, en el estudio de Bautista et al., (2007) se detecta una reducción considerable del número de fibras sensitivas periféricas de alto umbral activadas por frío, tanto de conducción rápida (A δ) como lenta (C). La mayoría de las terminaciones nerviosas que actúan como nociceptores se describen como de estos tipos (Scholz y Woolf, 2002; Basbaum et al., 2009; Belmonte et al., 2009), lo que sugeriría cierta implicación, al menos en parte, del canal en la detección del frío nocivo.

El ratón doble KO, que no expresa ambos canales (TRPM8 y TRPA1), fue estudiado por Knowlton y su equipo (2010), quienes describieron que su fenotipo comportamental era similar al de los ratones KO de TRPM8. En ellos, apenas se observaron respuestas evasivas al frío nocivo, a diferencia del ratón KO para TRPA1, en que sí estaban presentes. Estos resultados hicieron sugerir que TRPM8 es necesario para detectar las respuestas nocivas del frío, y TRPA1 no.

Sin embargo, estudios recientes implementan un nuevo método para la evaluación conductual térmica en roedores; se basa en la exposición a una superficie que muestra un gradiente térmico en forma circular, y parece evaluar la preferencia térmica de una forma más sensible que en los trabajos anteriores. Con esta nueva metodología, se ha observado que los doble KO muestran una mayor reducción de la conducta evasiva a las temperaturas frías que los KO simples de ambas líneas. Esta observación sugiere que ambos receptores son necesarios para la correcta detección del frío ambiental, y que trabajan conjuntamente para detectar el frío tanto moderado como nocivo. No obstante, el peso de TRPM8 en esta



funcionalidad sería mayor, pues el estudio electrofisiológico de las terminaciones nerviosas periféricas que expresan TRPA1 reveló que son menos activas, producen respuestas más pequeñas y son más propensas a adaptarse ante el estímulo frío (Touska et al., 2016; Winter et al., 2017).

También se han descrito un par de modelos transgénicos de ratón que expresan el receptor de la toxina diftérica (DTR) en neuronas que expresan TRPM8, de manera que al ser tratados con dicha toxina se consigue la ablación selectiva de estas células (Knowlton et al., 2013; Pogorzala et al., 2013). Curiosamente, tras el tratamiento, estos animales mostraron déficits en la detección de estímulos fríos aún superiores que en los animales KO de TRPM8, lo que sugiere la presencia de al menos otro sensor de frío en la misma población neuronal. Este efecto pudiera deberse a la presencia de TRPA1, pero las poblaciones neuronales de TRPM8 y TRPA1 en ganglios trigéminos y raquídeos apenas se solapan (Story et al., 2003; Pogorzala et al., 2013), lo que sería consistente con el papel de ciertos canales de potasio en las neuronas TRPM8-positivas en su modulación de la respuesta a frío (Viana et al., 2002; Reimúndez et al., 2018).

La alteración de los nociceptores en distintas condiciones patológicas puede provocar sensaciones de dolor aberrantes. Así, se presentan fenómenos de alodinia, en que un estímulo normalmente inocuo produce sensación de dolor, o hiperalgesia, en que un estímulo comúnmente doloroso genera una sensación de dolor exagerada. Estas alteraciones pueden dar lugar a estados de dolor espontáneo, en ausencia de un estímulo concreto. Los estímulos lesivos, del tipo que sean, provocan la liberación de factores de inflamación en la zona tisular, un conjunto de sustancias de distinta naturaleza que hacen a los nociceptores más sensibles. Así, se genera hipersensibilidad alrededor de la zona dañada, en un proceso denominado sensibilización periférica (revisado por Scholz y Woolf, 2002; Basbaum et al., 2009; y Viana, 2018).

Las pruebas realizadas por Colburn y su equipo (2007) trataron de evaluar el papel de TRPM8 en la hipersensibilidad al frío generada por la sensibilización de los nociceptores. Para ello, analizaron las respuestas dolorosas producidas como consecuencia de la aplicación de acetona (compuesto evocador de frío), en un modelo de inflamación crónica en ratón, desarrollado mediante la inyección de CFA. Así, comprobaron que los roedores KO de TRPM8

no muestran respuestas nociceptivas tan exacerbadas a la aplicación de la acetona como los ratones silvestres, lo que sugiere que TRPM8 media en los procesos de alodinia e hiperalgesia causados por el frío. Resultados relacionados y en la misma dirección han sido aportados por otros grupos de investigación (Wasner et al., 2004; Xing et al., 2007; Knowlton et al., 2011; Patel et al., 2014), y en base a ellos se relaciona la expresión de TRPM8 con estados patológicos dolorosos sensibles al frío, como los aparecidos en pacientes crónicos tratados con opiáceos (Gong y Jasmin, 2017) u oxaliplatino (Chukyo et al., 2018).

En la búsqueda del mecanismo a través del cual TRPM8 mediaría en estos procesos, aparecen varios estudios que muestran un cambio en su nivel de expresión en neuronas sensoriales primarias en estos estados patológicos; no obstante, estos datos no son consistentes y no permiten extraer ninguna conclusión al respecto. Esta incertidumbre permite teorizar a los investigadores con explicaciones alternativas, como cambios en la modulación del canal o en la expresión de otras moléculas asociadas (revisado por Fernández-Peña y Viana, 2013).

Curiosamente, tanto la exposición a frío como el tratamiento con mentol, principales activadores de TRPM8, muestran propiedades analgésicas al ser aplicados en estados de inflamación, dolor crónico o lesión nerviosa (Liu et al., 2013a). Resultados en la misma línea se han obtenido ante la aplicación de frío nocivo (Proudfoot et al., 2006; Dhaka et al., 2007; Knowlton et al., 2013). Que la activación de TRPM8 produzca hiperalgesia, alodinia y analgesia a la vez parece contradictorio, pero los autores sugieren que los efectos algésicos se deberían a la activación de los nociceptores sensibilizados, y que el efecto de la analgesia sería consecuencia de la activación de los receptores de frío periféricos intactos (Knowlton et al., 2013).

Para finalizar, sólo queda comentar, que también se detecta inervación sensorial en los órganos internos, y que se ha comprobado que algunas neuronas sensoriales primarias que expresan TRPM8, inervan algunas vísceras, como son el intestino o la vejiga (Harrington et al., 2011; Shibata et al., 2011). Esta evidencia, podría indicar un papel termosensor y/o nociceptor de TRPM8 interno, sin embargo los procesos termosensitivos ocurridos en estas ubicaciones permanecen ampliamente inexplorados.



1.3.4 TRPM8 y termorregulación.

En animales homeotermos, la información térmica procesada por el SNC, además de transformarse en sensaciones, se utiliza para regular la temperatura corporal, manteniéndola estable dentro de un estrecho rango. Como ya se ha comentado previamente, el principal centro termorregulador del organismo se localiza en la POA; desde este emplazamiento se monitorizan los cambios térmicos periféricos y los locales del cerebro, desencadenando los mecanismos termorreguladores necesarios.

La existencia de neuronas termosensibles en la POA se conoce desde hace más de medio siglo (Nakayama et al., 1961) pero su identidad genética y los mecanismos moleculares que subyacen a dicha termosensibilidad solo han comenzado a revelarse en los últimos años. De este modo, recientemente se ha descrito al canal TRPM2 como un canal responsable de las respuestas al aumento local de temperatura en el POA (Song et al., 2016). Sin embargo, los sensores de frío centrales no se conocen todavía, por lo que TRPM8 se postula como un buen candidato.

La implicación de TRPM8 en el mantenimiento de la temperatura corporal se ha empezado a describir en estudios recientes. Así, se ha comprobado que la aplicación tópica de mentol en ratones desencadena situaciones de hipertermia, vasoconstricción de la cola, aumento del consumo de oxígeno y búsqueda de calor (Tajino et al., 2007). Igualmente, la aplicación sistémica de bloqueantes de TRPM8 lleva a estados de hipotermia moderada (Knowlton et al., 2011; Almeida et al., 2012).

Recientemente nuestro grupo ha mostrado que tanto los ratones KO para TRPM8, como los que sufren la ablación selectiva de las neuronas con expresión de TRPM8, muestran un déficit en el mantenimiento de la temperatura corporal cuando son expuestos a bajas temperaturas; se observa en ellos una disminución de alrededor de 0,7 °C (Reimúndez et al., 2018). Sin embargo, los principales mecanismos termogénicos, como la funcionalidad de la grasa parda, la actividad motora, la hiperfagia o los escalofríos ocasionados por el frío no presentan alteraciones destacables. No obstante, la vasoconstricción de la cola, principal proceso de conservación de calor, se ve afectado. Todos estos resultados indicarían que en ausencia de TRPM8 existen otros sensores de frío que impiden una caída drástica de la temperatura corporal; aunque TRPM8 sería imprescindible para regular correctamente los

mecanismos de vasoconstricción y para los ajustes finos de los procesos termorreguladores (Feketa et al., 2013; Reimúndez et al., 2018). El defecto detectado en el mantenimiento de la temperatura corporal, se ve acentuado en situaciones de ayuno, en la que los ratones KO llegan a perder más de 2,5 °C en relación a los controles, llegando a estados de torpor (Reimúndez et al., 2018; Señarís et al., 2018).

Por otro lado, la expresión de TRPM8 también ha sido descrita en el tejido adiposo, tanto en la grasa blanca como en la parda. La primera tiene una función principalmente de almacenamiento, mientras que la segunda desencadena los mecanismos metabólicos termogénicos durante la exposición al frío (Ma et al., 2012; Rossato et al., 2014; Morrison, 2016). Hay estudios que indicarían que TRPM8 influye en esta activación cuando es medida por el frío (Tajino et al., 2007, 2011; Ma et al., 2012; Rossato et al., 2014); hecho que sugiere que la acción de este tejido, además de ser controlada centralmente, podría verse afectada por la actuación de TRPM8 “in situ”, contribuyendo al fenotipo observado en el ratón KO. No obstante, otros estudios recientes contradicen este punto o atribuyen a TRPM8 una participación indirecta, generando cierta controversia sobre su papel específico (Clemmensen et al., 2018; Reimúndez et al., 2018; Jall et al., 2019).

Igualmente, nuestro grupo observó que los ratones KO sometidos a temperaturas de frío moderado presentan una mayor hiperfagia que los animales controles expuestos a las mismas condiciones, lo que sugiere que la información térmica mediada por TRPM8 es necesaria para adecuar el consumo de comida al gasto termogénico. Se trata de un incremento pequeño, fundamentalmente en las horas diurnas y persistente en el tiempo, lo que a largo plazo da lugar al desarrollo de obesidad en estos animales (Reimúndez et al., 2018).

1.4 Bases celulares de la osmorregulación. Relación con canales TRP.

Las variaciones producidas en los fluidos extracelulares, bien a casusa de la deshidratación o del aumento de la concentración osmótica circulante, son constantemente monitorizadas mediante osmoceptores situados a nivel periférico y central. De este modo cualquier alteración puede ser detectada y restaurada a valores fisiológicos homeostáticos.

El primer mecanismo de osmorregulación activado ante una disminución volumétrica



del líquido circulante es la liberación de vasopresina desde la glándula pituitaria, la cual se produce en los núcleos supraóptico (SO) y paraventricular del hipotálamo (PVH). Esta hormona actúa principalmente a nivel renal provocando la reabsorción de agua y disminuyendo la cantidad de orina, tratando así de evitar pérdidas de agua. Cuando el efecto de la vasopresina no es suficiente para restaurar los parámetros fisiológicos se desencadena el mecanismo de la sed, el ansia instintiva de beber (Silverthorn et al., 2008).

Un conjunto de tres núcleos ubicados en el hipotálamo anterior, han demostrado ser claves en la detección de estos desequilibrios a nivel central, y en coordinar las respuestas homeostáticas necesarias para su corrección. Son el órgano subfornical (SFO), el órgano vascular (VOLT) y MnPO, y en su conjunto constituyen la lámina terminal (LT) (revisado por Fitzsimons, 1998; Bourque, 2008; Leib et al., 2016; Zimmerman et al., 2017). Estos tres núcleos están interconectados entre sí y sus neuronas proyectan al SO y PVH regulando su actividad junto con otras señales recibidas desde los osmoceptores periféricos (Honda et al., 1989; Iovino y Steardo, 1984; Larsen y Mikkelsen, 1995; Fitzsimons, 1998; Prager-Khoutorsky, 2017). Además se ha comprobado que la activación de las neuronas de la LT provoca la necesidad de beber (Oka et al., 2015; Gizowski et al., 2016; Abbott et al., 2016; Allen et al., 2017; Leib et al., 2017), así como que su lesión suprime este deseo (Buggy y Johnson, 1977; Thrasher et al., 1982; Mangiapane et al., 1983; McKinley et al., 1999). El SFO y el VOLT, están situados fuera de la barrera hematoencefálica por lo que tienen acceso a la circulación sanguínea. Como contienen neuronas osmosensitivas, por su emplazamiento, hay un consenso generalizado en considerarlos como los principales receptores e integradores de señales sobre osmolaridad, volumen y presión plasmática (revisado por Bourque, 2008; Leib et al., 2016). Por otro lado, el MnPO, aunque participa en el proceso, tendría una función básicamente integradora, siendo el nexo de unión entre el SFO y el VOLT (McKinley et al., 2015; Allen et al., 2017). En consecuencia, la LT regula la actividad global osmorregulatoria, promoviendo respuestas como la motivación por el consumo de agua o sal, la generación de mecanismos autónomos y neuroendocrinos para regular la presión arterial, o el nivel de reabsorción de agua en los riñones (revisado por Zimmerman et al., 2017).

Finalmente, la percepción consciente de la sed parece generarse, principalmente, en las cortezas cingulada e insular (Denton et al., 1999; Egan et al., 2003; McKinley et al., 2006; Hollis

et al., 2008; Farrell et al., 2011). Estas áreas han demostrado estar conectadas axonalmente con la LT (Hollis et al., 2008), sin embargo el enlace con otras áreas relacionadas con aspectos del comportamiento, como la motivación, aún no ha sido establecida (revisado por Leib et al., 2016).

Distintos canales TRPs se han descrito como osmosensibles, principalmente miembros de las subfamilias TRPM, TRPC y TRPV, (revisado por Pedersen y Nilius, 2007). Sin embargo, sólo TRPV1 y TRPV4, han sido estudiados como posibles implicados en la transducción de señales osmoceptivas a nivel central. La expresión de TRPV1 se localiza en células osmoceptivas de la LT, y en los núcleos SO y PVH, aunque se trata de un transcrito alternativo del gen *trpv1* (Naeini et al., 2006; Zaelzer et al., 2015); la expresión del canal TRPV4 únicamente se describe en la LT (Liedtke et al., 2000). La presencia de estos TRPs en estas células osmosensibles sugiere su participación en la detección de las alteraciones osmóticas plasmáticas, participando en la regulación de los distintos procesos osmorregulatorios, entre ellos la generación del impulso dipsogénico. Sin embargo, su papel funcional no está bien caracterizado, ya que los estudios realizados muestran resultados contradictorios (Liedtke y Friedman, 2003; Mizuno et al., 2003; Ciura y Bourque, 2006; Naeini et al., 2006; Taylor et al., 2008; Kinsman et al., 2014; Tucker y Stocker, 2016). En cualquier caso, su implicación no parece ser decisiva pues los animales que no expresan estos canales, aunque con alteraciones, presentan mecanismos osmorreguladores satisfactorios.

En los últimos años, también se apunta al canal TRPV2 como potencial participe de la regulación de los procesos osmorregulatorios a nivel central, aunque su función “in vivo” aún no ha sido estudiada. Este canal se expresa tanto en la LT como en los núcleos SO y PVH (Nedungadi et al., 2012), y ha demostrado ser capaz de formar heterotetrámeros con TRPV1 y TRPV4 en sistemas heterólogos y/o nativos (Rutter et al., 2005; Cheng et al., 2007; 2010). Si esta tetramerización también se diese a este nivel, diferentes composiciones tetraméricas podrían estar regulando los flujos iónicos inducidos osmóticamente.

Con el tiempo, la visión funcional de la sed ha ido cambiando en el proceso osmorregulatorio y ya no se identifica como un elemento de advertencia sobre la necesidad de ingesta hídrica ante una alteración homeostática. Así, se ha visto que las respuestas osmoceptivas a nivel central no se regulan acorde a la estabilización de los valores del balance



hídrico, si no como un mecanismo preventivo anticipatorio a los desafíos fisiológicos. De este modo, se ha comprobado que, en situación de estabilidad, en las horas previas al sueño se desencadena el deseo de ingestión de agua para evitar una deshidratación durante las horas de letargo (Gizowski et al., 2016); o que, la sensación de sed es rápidamente frenada durante la ingesta de agua, al contacto con la cavidad oral, antes del restablecimiento de las condiciones fisiológicas para así prevenir un consumo excesivo (Zimmerman et al., 2016).

En relación a este último apunte y a TRPM8, se ha comprobado que los receptores de frío a nivel orofaríngeo tienen influencia sobre la sensación de sed (Eccles, 2000). En humanos está descrita la preferencia de consumo de agua a fría (5 °C) a tibia (22 °C) para saciar la sensación de sed. Sin embargo, un volumen similar de ingestión, causa el mismo efecto en la osmolaridad plasmática independientemente de su temperatura (Brunstrom y Macrae, 1997). También se ha visto que las ratas beben menos cantidad de agua para saciar su sed cuando la que se les suministra está fría (Kapatos y Gold, 1972; Deaux, 1973). Estos datos sugieren la implicación de TRPM8 para generar un rápido saciado de la sensación de sed a nivel central desde la cavidad bucal por una vía de transducción aún no descrita (Zimmerman et al., 2017); lo que apoya su participación en procesos de osmorregulación a nivel periférico. En este sentido, se ha demostrado que las neuronas sensoriales que expresan TRPM8 en la córnea responden a estímulos hiperosmóticos (Quallo et al., 2015), desempeñando un papel clave en el mantenimiento del flujo de la lágrima basal y la regulación del parpadeo (Parra et al., 2010, 2014; Quallo et al., 2015).

Curiosamente, el núcleo MnPO, además de ser decisivo para una correcta osmorregulación, también lo es para la integración de señales de frío periférico en los procesos termorreguladores (revisado por Morrison y Nakamura, 2018). Por ello, la convergencia de ambas vías homeostáticas en este emplazamiento podría ser la clave que explicara esta influencia de la temperatura periférica en los procesos osmorregulatorios.

En experimentos previos, realizados en nuestro laboratorio, se ha comprobado el papel que TRPM8 juega en el impulso dipsogénico y en la preferencia de la temperatura del agua consumida a nivel comportamental. Se ha visto que los ratones que no expresan el canal, tras pasar por un estado de privación hídrica de 24 horas, consumen menor cantidad de agua que los ratones silvestres. Además, no muestran aversión al consumo de agua a bajas

temperaturas, como sí hacen animales silvestres con expresión de TRPM8, que prefieren temperaturas intermedias (Denlinger, 2014). El cambio en la preferencia térmica del agua claramente se explica por el déficit de percepción de los estímulos fríos a nivel bucal; pero la disminución en la cantidad de agua consumida no, ya que ésta se produjo en todo el rango térmico de agua suministrado (0-40 °C). Estos datos sugieren que la falta de TRPM8 genera alguna alteración en la integración de señales a nivel central que lleva a una disminución de la sensación de sed o a un saciado más temprano de la misma.

1.5 Ratones reporteros.

La manipulación de la secuencia genómica del ratón se ha convertido en una poderosa herramienta de estudio en el área de la fisiología. Su aplicación ha permitido desarrollar múltiples modelos de ganancia y pérdida de función, sobreexpresando, alterando o eliminando genes para examinar sus consecuencias fisiológicas, así como su papel en distintas patologías (Snouwaert et al., 1992; Müller, 1999; Lamprecht Tratar et al., 2018). En este contexto, la aparición de los llamados ratones reporteros ha abierto un nuevo abanico de aplicaciones para el estudio de la función biológica. Estos nuevos modelos transgénicos permiten expresar genes que codifican proteínas exógenas (no mamíferas) en determinadas células y tejidos para facilitar su identificación y estudio pormenorizado (Gong et al., 2003; Abe y Fujimori, 2013).

1.5.1 Metodologías de transgénesis.

Hay dos metodologías principales utilizadas para introducir genes exógenos en el genoma del ratón, independientemente de su naturaleza: transgénesis aleatoria, y transgénesis dirigida por recombinación homóloga.

La primera de ellas, se fundamenta en la inserción del material genético deseado en la secuencia genómica por recombinación al azar. Para ello se generan cromosomas bacterianos artificiales (BACs) de recombinación aleatoria que portan el transgén a insertar. Estas moléculas son capaces de recombinar con secuencias distribuidas a lo largo del genoma, y así integrarse en él. Con este objetivo, el BAC se introduce en cigotos por microinyección que posteriormente se implantan en hembras para su gestación. Los BACs utilizados actualmente



permiten la introducción de moléculas de gran tamaño y portan secuencias regulatorias concretas para modular la expresión del transgén. Entre ellas, es común el uso de promotores específicos que permiten su expresión en tejidos concretos (Benavides y Guénet, 2003).

Sin embargo, la inserción aleatoria del transgén puede dar lugar a efectos indeseables. Se puede producir la disrupción de algún gen de importancia funcional o regulatoria en el genoma receptor que dé lugar a individuos inviábiles o estériles; asimismo, puede provocar un efecto mutagénico que genere un fenotipo independiente del propio transgén insertado. Igualmente, la expresión del transgén se puede ver comprometida por un efecto posicional; su transcripción puede que sea más o menos activa en función de las secuencias regulatorias que lo rodeen, pudiendo llegar a no expresarse, o generando una expresión ectópica no deseada. Además, la falta de control sobre el número de copias integradas, puede generar una expresión excesiva del transgén con consecuencias inciertas (revisado por Matthaei, 2007; Abe y Fujimori, 2013).

Por consiguiente, debido a todos estos inconvenientes, se hace indispensable un cuidadoso análisis del modelo transgénico obtenido mediante esta metodología para verificar los resultados, siendo recomendable la generación de varias líneas independientes a partir del mismo transgén para comparar los resultados de la expresión y así detectar posibles errores (revisado por Gong et al., 2003; Matthaei, 2007).

La segunda metodología también se conoce como “gene targeting” y se basa en técnicas de recombinación homóloga que permiten alterar secuencias específicas, integrando, eliminando o intercambiando unos fragmentos determinados por otros concretos, de forma dirigida (Müller, 1999). La técnica se aplica a células embrionarias pluripotentes que una vez modificadas se cultivan para generar un embrión viable que será implantado en hembras para su gestación.

Esta técnica, en comparación con la anterior, ofrece múltiples ventajas, ya que todos los problemas antes mencionados desaparecen. Al modificar únicamente un punto concreto del genoma previamente seleccionado, se altera la función específica del gen deseado, con la única limitación de las secuencias regulatorias que afectan al emplazamiento seleccionado. En este sentido, las expresiones ectópicas son un fenómeno mucho menos frecuente; e igualmente, se controla el número de copias introducidas evitando la sobreexpresión no

deseada (revisado por Bronson et al., 1996, Matthaei, 2007; Wells, 2010).

Por lo tanto, esta metodología ofrece bastantes ventajas en cuanto a la obtención de una correcta expresión génica, por lo que en principio van a ser modelos mucho más fiables. Sin embargo, desde el punto de vista técnico, es un proceso que resulta mucho más laborioso y con muchas menos probabilidades de éxito. Esto supone una mayor inversión de medios, conocimientos técnicos y una demora en el tiempo para la obtención de resultados. Por ello, ambas técnicas continúan siendo de uso habitual (revisado por Dalloz et al., 2001; Matthaei, 2007).

1.5.2 Tipos de ratones reporteros y su aplicación al estudio del canal iónico TRPM8.

Los distintos ratones reporteros se pueden diferenciar de acuerdo a la proteína que expresan como marcador, pero también por su control genético, pues la combinación de ambos factores va a determinar su funcionalidad.

Algunas de las proteínas más empleadas como reporteros han sido la β -galactosidasa (*Escherichia coli*), la luciferasa (*Photinus pyralis*) y la GFP (“green fluorescence protein”, *Aequorea victoria*), sirviendo como marcadores de expresión. Sin embargo, en los últimos años, tanto la GFP como otras proteínas que emiten fluorescencia, han ido ganando relevancia. En gran parte, esto se debe a la mejora de las técnicas de imagen, que permiten su identificación y estudio “in vivo” o “in vitro” dentro del propio tejido u órgano que las expresa (revisado por H. Thompson y Björklund, 2009). Ciertas proteínas, como las pertenecientes a la familia GCamp, además permiten monitorizar simultáneamente la expresión y la actividad celular, al ser proteínas fluorescentes sensibles a la concentración de calcio (Chen et al., 2013).

El primer ratón transgénico con expresión de GFP fue el descrito por Okabe y su grupo (1997), el cual, bajo el control de un promotor constitutivo, mostraba fluorescencia en todas sus células. Desde entonces, se han desarrollado multitud de modelos que restringen la expresión a poblaciones específicas de forma espacial y temporal mediante el uso de secuencias reguladoras, e incluso bajo circunstancias concretas, como ocurre con los sistemas inducibles (Zhang et al., 1996). Igualmente, la proteína GFP ha sido modificada genéticamente para mejorar sus propiedades en cuanto a intensidad de fluorescencia y estabilidad (p.e. ante



cambios del pH o temperatura), surgiendo diversos derivados como la EGFP, YFP o la EYFP (Hadjantonakis y Nagy, 2001).

En el caso de TRPM8, se han publicado tres modelos de expresión de reporteros fluorescentes bajo el control de su promotor. El primero se ha creado por “gene targeting”, intercambiando los primeros residuos tras el codón de iniciación de la transcripción de la secuencia génica de TRPM8, por la de la proteína EGFP; de manera que el ratón heterocigoto expresa ambas proteínas (es hemicigoto para TRPM8 y EGFP), mientras que el homocigoto es un ratón KO para TRPM8, pero que expresa EGFP dónde originariamente se hubiera expresado TRPM8 (Dhaka et al., 2007). Los otros dos modelos se han creado mediante la integración aleatoria de BACs recombinantes; son los modelos de Takashima y colaboradores (2007), y el ratón TRPM8-EYFP implementado por nuestro grupo (Morenilla-Palao et al., 2014).

El poder identificar visualmente las células con la expresión del transcrito de interés, permite estudiar con más facilidad su distribución dentro del tejido que las alberga, o de forma aislada en cultivo celular. En el caso de TRPM8, su detección neuronal en los ganglios sensoriales primarios ha permitido la caracterización de estas neuronas, analizando tanto su morfología como sus características bioquímicas y propiedades biofísicas (Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008; Morenilla-Palao et al., 2014). Igualmente, algunas de sus dianas de innervación han sido fácilmente identificadas y estudiadas (Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008; Takashima et al., 2010; Parra et al., 2010; Huang et al., 2012; McCoy et al., 2013a; Kim et al., 2014; Quallo et al., 2015; Ren et al., 2015; Jankowski et al., 2017; Alcalde et al., 2018; Arcas et al., 2018). Sin embargo, la caracterización de estos modelos transgénicos está lejos de ser exhaustiva. Un estudio más detallado debería poder arrojar datos novedosos sobre su distribución, que ayuden a comprender el papel funcional de este termorreceptor en el organismo.

Por otro lado, también se han generado otros modelos que, en combinación con el reportero, expresan algún gen diferente de interés para su estudio dentro de la misma población celular identificada. Un caso particular es la expresión del receptor de la toxina diftérica (DTR), la proteína secretada por la bacteria patógena *Corynebacterium diphtheriae*, que una vez introducida a la célula causa su muerte al inhibir la síntesis proteica.

Las células murinas son inmunes al efecto de la toxina diftérica, pues carecen de

receptores de membrana con la homología necesaria para internalizar la toxina. Sin embargo, en los humanos se describe al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) como receptor DTR (Naglich et al., 1992); por lo que la expresión transgénica de este receptor humano en células de ratón las convierte en susceptibles (Saito et al., 2001). En el caso de TRPM8, se describen dos modelos que implementan esta metodología en combinación con la expresión de GFP bajo el control del promotor del canal. Se ha demostrado que el tratamiento de estos ratones con la toxina diftérica produce la ablación selectiva de las células que expresan TRPM8, que son las células con marcaje GFP. De este modo en lugar de estudiar las implicaciones funcionales del gen, TRPM8 en este caso, lo que se estudia es la participación de la población celular que expresa TRPM8 (Knowlton et al., 2013; Pogorzala et al., 2013).

Igualmente, se han creado otras estrategias genéticas basadas en la transgénesis, para crear ratones con la expresión selectiva de distintos reporteros. Es el caso del sistema de recombinación Cre/*loxP* identificado inicialmente en el bacteriófago P1 (Sternberg y Hamilton, 1981) y utilizado por primera vez para modificar secuencias genómicas por Gu y colaboradores (1994). La enzima recombinasa Cre reconoce unos sitios específicos de recombinación dentro de la secuencia génica denominados sitios *loxP*. Estos emplazamientos están conformados por una secuencia consenso de 34 pb que no forma parte del genoma de los mamíferos. Cuando las secuencias *loxP* se sitúan relativamente cercanas entre sí, la actuación de Cre puede provocar la escisión, inversión o translocación de las secuencias flanqueadas. El bacteriófago P1 utiliza este sistema como un mecanismo de sustento, pero su implementación en ingeniería genética constituye una potente herramienta de edición genética en mamíferos (revisado por Nagy, 2000; Cox et al., 2012; Kim et al., 2018).

Para generar un ratón reportero de este tipo, es necesario disponer de una cepa transgénica en que la recombinasa Cre se exprese bajo el promotor del gen de interés. Por otro lado también tiene que estar presente la secuencia del gen reportero, cuya expresión dependa de la escisión de una secuencia flanqueada por los fragmentos *loxP*. De este modo, Cre sólo se expresará en células deseadas donde se liberará la expresión del gen marcador (Cox et al., 2012) (figura 1.9).

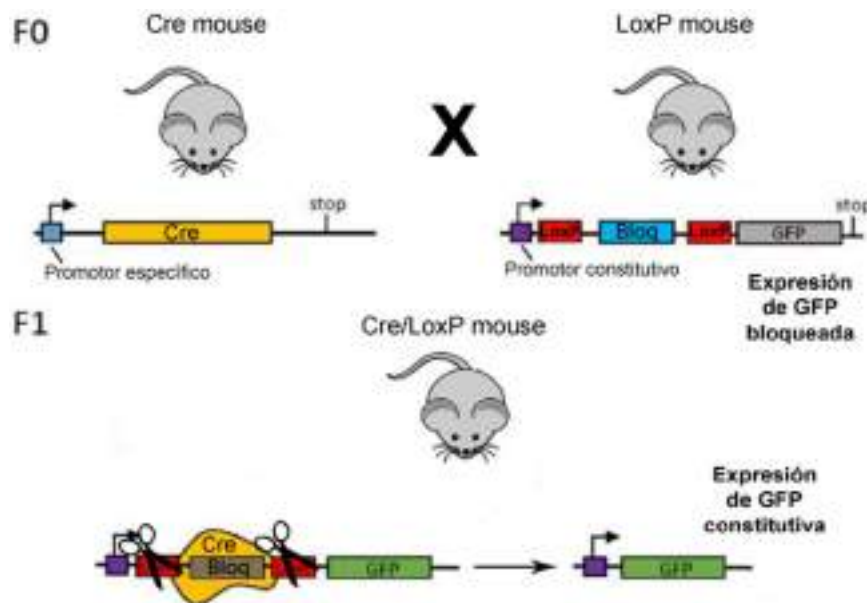


Figura 1.9 Ilustración esquemática del sistema Cre/LoxP. En la generación F0 el parental de la izquierda expresa Cre bajo un promotor celular específico; y el parental de la derecha, aunque tiene la expresión de GFP dirigida bajo un promotor constitutivo, está se encuentra bloqueada por un una secuencia flanqueada por secuencias *LoxP*. En la generación F1, en la descendencia que herede ambos alelos, la secuencia *LoxP* será escindida en aquellas células en que se exprese Cre permitiendo la expresión de GFP en ellas. Modificada de Cazemier et al. (2016).

La conveniencia de este sistema reside en su gran versatilidad. Se han generado diversas líneas *loxP* que permiten inducir la expresión de distintos reporteros (revisado por Swonger et al., 2016) que se pueden cruzar con la línea transgénica Cre⁺ deseada, para dirigir su expresión a un tipo celular determinado. De este modo, en muy poco tiempo y de una forma mucho más económica, es posible obtener ratones que permiten la expresión de reporteros de distintos colores, reporteros sensibles a los niveles de calcio, etc. Asimismo, esta metodología se puede aplicar para la obtención de otros modelos genéticos como sobrexpresiones, deleciones o ablaciones celulares (Cox et al., 2012; Enikolopov et al., 2015; Kim et al., 2018).

De igual modo, se ha conseguido modificar la proteína Cre para que únicamente sea eficiente ante la presencia de determinados agentes como el tamoxifeno o la tetraciclina; de esta manera se consigue un sistema inducible. Cuando el ratón es tratado con dicha sustancia, se estimula la expresión de Cre, y por consiguiente, la del reportero en las células de interés, marcando la ubicación de la expresión habida en ese momento; particularidad de gran utilidad para el estudio de células con expresiones transitorias (Kistnert et al., 1996; Metzger y

Chambon, 2001; Kim et al., 2018).

En el caso de TRPM8, únicamente se ha descrito un modelo de ratón Cre, no inducible, que expresa la recombinasa bajo el control de su promotor (Yarmolinsky et al., 2016).

Animales transgénicos con expresión del sistema Cre/*loxP* se pueden crear tanto por “gene targeting” como por recombinación aleatoria de BACs, y por tanto no están exentos de los inconvenientes de estas metodologías. Sin embargo, existen otros inconvenientes importantes propias del sistema Cre/*loxP*. El principal se deriva del hecho de que la actividad recombinasa de Cre no es reversible, de manera que al producirse la recombinación en una célula, esta modificación será permanente, y heredada por las células descendientes, independientemente de que el promotor que controla el gen de interés continúe activo en ese momento. Esta limitación es especialmente relevante si ocurre durante el desarrollo embrionario. Igualmente, el nivel de expresión de Cre debe ser lo suficientemente alto como para lograr una eficiente recombinación; en caso contrario no se observará marcaje o se generará un mosaico. Finalmente, también es frecuente la expresión ectópica inesperada del reportero, por lo que es conveniente examinar varios individuos dentro de la misma línea para su verificación (Nagy, 2000; Heffner et al., 2012; Swonger et al., 2016; Kim et al., 2018).

En resumen, podemos afirmar que la transgénesis ha supuesto una revolución en la manera de estudiar la función biológica de las distintas proteínas codificadas por los genes y, más concretamente, el uso de ratones reporteros, permite extraer conclusiones de gran relevancia. Sin embargo, los modelos animales utilizados son propensos a mostrar errores de expresión que a veces son difíciles de detectar. Por ello, es necesario desarrollar una cuidadosa caracterización del modelo a utilizar antes de extraer conclusiones definitivas que pueden resultar fatalmente equivocadas.

2. Objetivos.



El canal TRPM8 es principal sensor del frío inocuo. Los estudios previos han detallado su expresión en subpoblaciones de neuronas sensoriales primarias. Sin embargo, la información sobre su expresión extraganglionar es todavía fragmentaria.

Con estos antecedentes, y ante la disponibilidad de distintas líneas reporteras para el canal TRPM8, algunas no publicadas, nos planteamos una caracterización morfológica y funcional detallada de las mismas, intentando alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del patrón de expresión de TRPM8 en neuronas de los ganglios sensoriales primarios de distintos ratones reporteros, analizando y comparando sus características morfológicas y la co-expresión de marcadores moleculares.
2. Validación funcional de la actividad de TRPM8 en estas mismas líneas transgénicas, utilizando la técnica de imagen de calcio en combinación con la aplicación de agonistas y antagonistas del canal.
3. Análisis del patrón de expresión de TRPM8 en distintos tejidos, tanto a nivel del sistema nervioso central, retina, sistema nervioso periférico, como en células no nerviosas, mediante técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, con el fin de encontrar nuevas dianas de expresión.
4. Estudio de las posibles nuevas dianas de expresión identificadas para TRPM8.
5. Evaluación del papel de TRPM8 en la activación de las vías osmorreceptivas a nivel central.

3. Material y métodos.



3.1 Animales.

Todos los procedimientos experimentales que involucraron el uso de animales se llevaron a cabo de acuerdo al Real Decreto 53/2013 y a la directiva de la Comunidad Europea 2016/63/EU.

En este trabajo se han utilizado ratas Sprague Dawley y ratones C57BL/6J como modelo de estudio. Además, en el caso del ratón se han utilizado animales procedentes de 7 líneas transgénicas para el canal termorreceptor TRPM8, que se describirán en los siguientes apartados.

Los animales fueron criados en el animalario del Instituto de Neurociencias de Alicante (INA, UMH-CSIC) o en el animalario central de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). En Alicante se mantuvieron estabulados a una temperatura constante de 24 °C y en Santiago de Compostela a 21 °C, ambos con ciclos de luz de 12 horas y con acceso a agua y comida “ad libitum”.

La información sobre el genotipado de las líneas transgénicas empleadas se puede consultar en el apartado 3.4.2.

3.1.1 Líneas transgénicas TRPM8-EYFP.

Las cuatro líneas de ratón transgénicas TRPM8-EYFP (1-4) empleadas en este estudio fueron generadas en nuestro laboratorio por la Dra. Cruz Morenilla-Palao. Se partió de un BAC que contenía el locus completo del gen *trpm8* de ratón (BAC RP24-78N24, BACPAC Resources Center), el cual se modificó mediante recombinación homóloga. Así se consiguió insertar el gen que codifica la proteína fluorescente amarilla “mejorada” (EYFP) tras el promotor de TRPM8 en el BAC, concretamente en el primer codón de iniciación de la transcripción, seguido de una secuencia de cola poli-A y un codón de stop (**figura 3.1**).

El BAC fue inyectado en ovocitos fertilizados de ratón C57BL/6J y éstos implantados en hembras para la obtención de los ratones transgénicos primigenios por inserción al azar. Dicho procedimiento se realizó en la Unidad de Animales Transgénicos (<http://sct.uab.cat/uat/>) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y dio lugar a 8 potenciales ratones fundadores. Finalmente, tras comprobar que algunos de estos animales no generaban descendencia o que



la que generaban no presentaban atisbo de fluorescencia, nos quedamos con los 4 que dieron lugar a cada una de las líneas transgénicas aquí presentadas (Morenilla-Palao et al., 2014). La primera de ellas (TRPM8-EYFP1) ya ha sido caracterizada con cierto detalle y utilizada con éxito en algunos trabajos del grupo y colaboradores (Parra et al., 2010; Morenilla-Palao et al., 2014; Alcalde et al., 2018; Arcas et al., 2018). En el caso de las tres restantes (TRPM8-EYFP2, 3 y 4), es la primera vez que se caracterizan.

El resultado final de la transgénesis implementada en estos ratones, lleva a la expresión de la proteína EYFP en las células en que hay expresión endógena de la proteína TRPM8.

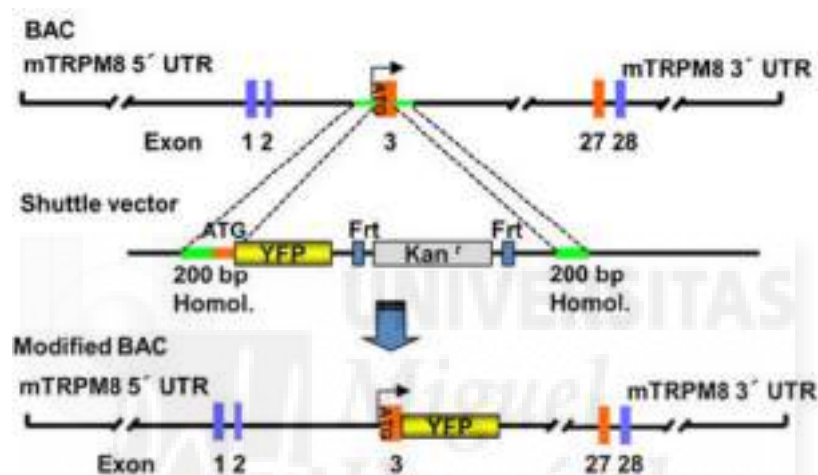


Figura 3.1 Estrategia genética utilizada para la modificación del BAC que dirige la expresión del gen *EYFP* detrás del promotor del gen *trpm8* en los ratones TRPM8-EYFP. Extraído de Morenilla-Palao et al. (2014).

3.1.2 Línea transgénica TRPM8-EGFPf.

El ratón transgénico TRPM8-EGFPf fue generado por Dhaka y sus colaboradores (2007) a partir de un BAC similar al utilizado en el apartado anterior (BAC RP23-180P9, BACPAC Resources Center). Mediante técnicas de ingeniería genética el BAC se modificó, consiguiendo intercalar el gen de la proteína verde fluorescente “mejorada” (EGFP) a partir del primer codón de transcripción del gen *trpm8*, y añadir una cola poliA en su extremo terminal.

A continuación, mediante técnicas de ingeniería genética basadas en recombinación homóloga en células embrionarias (“gene targeting”), se consiguió intercambiar la secuencia inicial de transcripción del gen de TRPM8, dentro del propio genoma del ratón, por el nuevo constructo. De esta forma, los animales portadores del transgén tienen interrumpido el gen *trpm8* por la inserción del gen de la EGFP, la cual se expresa bajo el promotor original de

TRPM8 (figura 3.2). Los animales que expresen el transgén en heterocigosis, mostrarán expresión de EGFP en aquellas células que expresen TRPM8 y serán fluorescentes, resultando hemocigotos para ambos genes; los que lo expresen en homocigosis, no tendrán expresión de TRPM8 (son animales KO), pero sí de EGFP en aquellas células en que debiera haber habido expresión del canal termosensible. Posteriormente, tal como describen Dhaka et al. (2008), un casete de neomicina flanqueado por secuencias *loxP* fue escindido del transgén a fin de mejorar la emisión de fluorescencia.

La EGFP que se expresa en este ratón es farnesilada (EGFPf), es decir, está fusionada con un grupo farnesil de unión a membrana. En consecuencia, la molécula de GFP se sitúa en esta ubicación y no queda libre en el citoplasma, como sí ocurre en las otras líneas que aquí nos ocupan. Esta característica hace que se marque con especial detalle cualquier tipo de proyección axonal de las células que lo expresan.

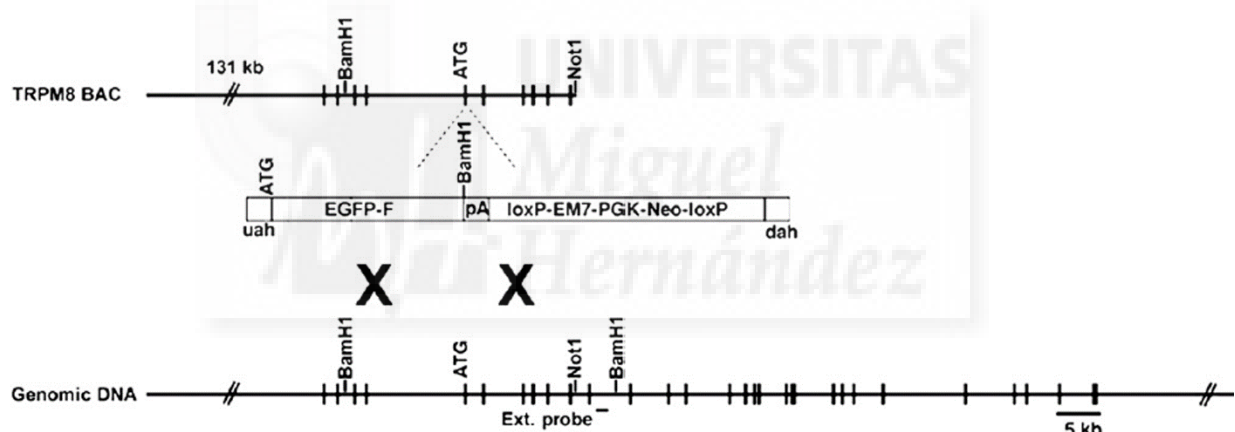


Figura 3.2 Estrategia genética empleada para la generación del constructo genético utilizado en la disrupción del gen *trpm8* y posterior recombinación homóloga embrionaria para conseguir la dirección de la expresión de la proteína EGFP bajo en promotor genómico natural de TRPM8. Extraído de Dhaka et al. (2007).

3.1.3 Línea transgénica TRPM8-Cre.

La línea transgénica TRPM8-Cre fue generada en el laboratorio del Dr. Mark Hoon (NIH, USA) usando el mismo BAC (RP24-78N24) que en las líneas TRPM8-EYFP. Este constructo fue modificado para introducir el gen de la proteína GFP y, fusionada por el péptido viral 2A, el de la recombinasa Cre, tras el promotor de *trpm8*, en el primer codón de iniciación de la transcripción. Posteriormente, el BAC se insertó aleatoriamente en el genoma del ratón. De



esta manera se consigue que aquellas células que expresan TRPM8, también expresen las proteínas GFP y Cre (Yarmolinsky et al., 2016).

Para mejorar la señal de fluorescencia, este ratón TRPM8-Cre se cruzó con la línea transgénica reportera de ratón RCE:*loxP*, que fue generado por Sousa y colaboradores (2009) mediante una metodología similar a la explicada para el ratón Cre. El constructo final dirige la expresión de EGFP de forma constitutiva, pero inhibida por un codón de stop flanqueado por secuencias *loxP*. La recombinasa Cre eliminará este codón, permitiendo la expresión del reportero de forma permanente solo en aquellas células que expresen TRPM8 (figura 3.3).

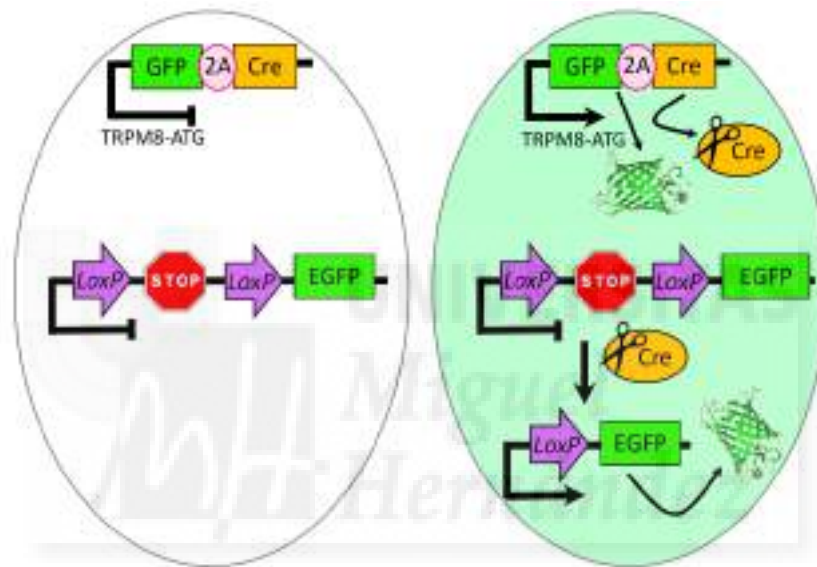


Figura 3.3 Representación esquemática del mecanismo genético que controla la expresión de GFP y EGFP en el ratón TRPM8-Cre. A la derecha se muestra el mecanismo desencadenado en una célula que expresa TRPM8, y a la izquierda, la situación en una en que no hay expresión.

3.1.4 Línea transgénica TRPM8-DTR-GFP.

Los ratones transgénicos TRPM8-DTR-GFP también fueron generados en el laboratorio del Dr. Mark Hoon, mediante la metodología ya descrita. Usando el mismo BAC (RP24-78N24), se insertó la secuencia codificante para GFP tras el promotor de *trpm8*, en el codón de iniciación de la transcripción y, a continuación, fusionada por el péptido viral 2A, se añadió la secuencia del receptor de la toxina diftérica (DTR). Posteriormente, el BAC se insertó aleatoriamente en el genoma del ratón (Pogorzala et al., 2013) (figura 3.4).

Los ratones portadores del alelo recombinante (DTR+) expresarán en las mismas células que se exprese TRPM8 la proteína GFP y el receptor DTR. El tratamiento con toxina diftérica

provocará la aniquilación de las células positivas para TRPM8. De este modo, si el tratamiento con toxina ha sido exitoso, dejarán de apreciarse en el tejido células que expresen GFP.

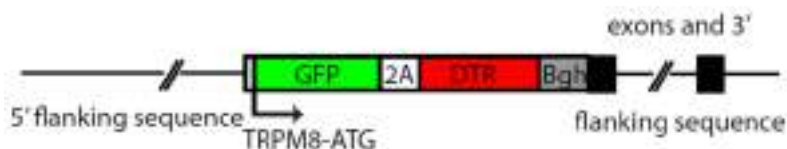


Figura 3.4 Esquema de la estructura del constructo generado para la consecución de la expresión de GFP y el receptor de la toxina diftérica bajo el promotor de TRPM8. Modificado de Pogorzala et al. (2013).

3.1.4.1 Tratamiento con toxina diftérica.

Se seleccionó un grupo de 6 ratones hembra de 8 meses de edad DTR+; 4 de ellos se inyectaron con 100 μ l (2 ng/ μ l) de toxina diftérica (List Biological Laboratories Inc, #150) disuelta en solución salina (NaCl 0,9%) por vía intraperitoneal, y los otros 2 únicamente con solución salina. El tratamiento se repitió, diariamente, durante 7 días. La elección del sexo se debió a la disponibilidad animal de aquel momento y la elección de la dosis se basó en un trabajo previo, recientemente publicado por nuestro grupo (Reimúndez et al., 2018), en que se valida la eficacia del tratamiento en animales portadores del receptor y la falta de efecto en los no portadores. En dicho estudio también se comprobó la efectividad de la dosis seleccionada en la ablación de las neuronas que expresan el termorreceptor TRPM8 por diferentes metodologías que también se han implementado en este trabajo:

- Análisis comportamental: los animales DTR+, tras ser sometidos a tratamiento con la toxina diftérica, presentan un déficit de sensibilidad al frío. (Consultar metodología en apartado 3.1.4.2).
- Análisis de expresión génica: mediante la técnica RT-PCR se comprueba que la expresión de TRPM8 en ganglio trigémino desaparece únicamente en los animales tratados DTR+. (Consultar metodología en apartado 3.4.1).
- Métodos inmunohistoquímicos: al visualizar cortes histológicos de los ganglios raquídeos, dejan de detectarse células fluorescentes en los animales DTR+ tratados en contraposición a los DTR+ que únicamente habían sido inyectados con solución salina. (Consultar metodología en apartado 3.5.2).

Los ratones sometidos a tratamiento pasaron por un periodo de recuperación de al



menos una semana, antes de ser utilizados en cualquier prueba o experimento.

3.1.4.2 Análisis de comportamiento: test del hielo seco.

Los ratones DTR+, fueron sometidos al test del hielo seco descrito por Brenner y colaboradores (2012), con ligeras modificaciones, antes y después del tratamiento con la toxina diftérica. De este modo se comprobó la eficacia del mismo, previamente a usar los animales en experimentación.

Para realizar la prueba, los ratones fueron colocados sobre una superficie elevada de cristal de borosilicato de 3,3 mm de grosor y separados individualmente por un cobertor cilíndrico de plástico transparente de 12 cm de diámetro. Se habituaron a estas condiciones durante una hora, o hasta que dejaron de observarse movimientos exploratorios.

A continuación, se rellenó una jeringa de 2 ml, a la que previamente se le había cortado la punta, con hielo seco pulverizado que se compactó con ayuda del émbolo. De este modo, se generó un pequeño cilindro de hielo seco de unos 7 mm de diámetro que se puede exponer apretando sobre el émbolo de la jeringa.

El cilindro con hielo seco se presionó contra la cara inferior del cristal coincidiendo con la posición de la pata posterior izquierda del ratón, hasta que se observó la retirada de la misma. El tiempo de latencia de la retirada de la extremidad en respuesta al estímulo frío fue medido con un cronómetro y comparado entre los distintos grupos de experimentación.

El experimentador realizó el test a ciegas, es decir, sin conocer el tratamiento de cada animal inyectado durante la toma del valor de la latencia.

3.2 Cultivo primario de neuronas procedentes de ganglios raquídeos.

3.2.1 Soluciones.

- Medio completo: Medio MEM con L-glutamina (Gibco™11095-080) suplementado al 1% con medio MEM-vit (Gibco™11120-037), al 10% con suero fetal bovino (FBS, Gibco™16000-044) y al 1% con penicilina/streptavidina (Gibco™PL15140122).
- Medio completo sin Ca²⁺: Medio HBSS (Gibco™14170-088) suplementado al 1% con medio MEM-vit, al 10% con FBS y al 1% con penicilina/streptavidina (Gibco™PL15140122).

- Medio INCmix: NaCl 155 mM, K₂HPO₄ 1.5 mM, HEPES 5.6 mM, NaHEPES 4.8 mM, glucosa 5 mM y penicilina/streptavidina 1µl/ml, en agua destilada autoclavada, pH: 7,4.
- Solución colagenasa-dispasa: 0,07% colagenasa tipo XI (Sigma-Aldrich®C7657), 0,3% de dispasa (Gibco™17105-041) en medio INCmix.

3.2.2 Establecimiento del cultivo.

Los ratones, con edades comprendidas entre los 2 y los 18 meses de edad, fueron sacrificados en cámara de CO₂ o por dislocación cervical. A continuación, se procedió a la extracción de la columna vertebral que, colocada bajo la lupa de disección para una correcta visualización, se seccionó con un bisturí en dos partes simétricas mediante un corte longitudinal dorso-ventral.

Acto seguido, tras retirar los restos de médula espinal, se procedió a la extracción cuidadosa de los ganglios raquídeos para no dañar su integridad. Estos se depositaron en una placa Petri de 60 mm de diámetro con abundante medio de cultivo HBSS, mantenida sobre un recipiente con hielo. Las aferencias ganglionares fueron seccionadas y eliminadas con el fin de reducir lo más posible los restos de mielina en el cultivo.

Seguidamente, los ganglios fueron sometidos a digestión enzimática en solución colagenasa-dispasa en incubador a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 45 min.

Tras la disociación enzimática se añadió a la mezcla 1 ml de medio completo sin Ca²⁺ para detener la reacción; y se realizó una suave digestión mecánica, primero con una micropipeta automática de 1 ml y a continuación con una de 100 µl, hasta deshacer todos los grumos. A continuación, la suspensión celular fue filtrada a través de una malla de 40 µm de poro (Falcon®352340), siendo recogida en un volumen final de 5 ml de medio completo sin Ca²⁺, que se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min.

El sedimento celular resultante fue resuspendido en medio completo, distribuido en cubrecristales redondos de 6 mm de diámetro (20 µl/cristal) y colocados en placas Petri de 35 mm. Previamente a su uso, los cubrecristales se habían tratado con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich®P4707) para favorecer la adhesión celular. Los cultivos se dejaron en el incubador a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 1 hora.



Finalmente, pasado este tiempo, se añadió a las placas 1-2 ml de medio completo y se devolvieron al incubador hasta su uso en experimentos de imagen de calcio, aproximadamente 12-24 horas después.

3.3 Registro fluorométrico de imagen del calcio intracelular.

La actividad neuronal se puede evaluar a través de la monitorización temporal de los niveles del calcio libre intracelular, bien de manera individual o en un conjunto tisular (Lock et al., 2015). La sonda fluorométrica fura-2-acetoximetil éster (fura-2AM) es capaz de atravesar la membrana plasmática, penetrando al interior de la célula. Esterasas citosólicas inespecíficas hidrolizan el éster AM, evitando que la molécula resultante, fura-2, salga de la misma y así se pueda unir al calcio libre citoplasmático. En estado libre (sin calcio unido), el pico máximo de excitación del fura-2 se produce alrededor de 362 nm pero, a medida que se va uniendo a los iones de Ca^{2+} este valor se va desplazando hacia longitudes de onda más cortas (figura 3.5). Esta característica de la molécula de fura-2 se puede utilizar para monitorizar la actividad neuronal, que se asocia a un aumento de los niveles intracelulares de calcio. Se ha determinado que el cociente de emisión de la intensidad de fluorescencia a 510 nm (máximo de emisión) tras la excitación a 340 y 380 nm (F340/F380) del fura-2 es directamente proporcional a la concentración intracelular de calcio. De esta manera, estudiando la variación de dicho cociente ante la exposición neuronal a distintos estímulos podemos evaluar si estos generan respuestas excitatorias así como su intensidad (Grynkiewicz et al., 1985; Moore et al., 1990).

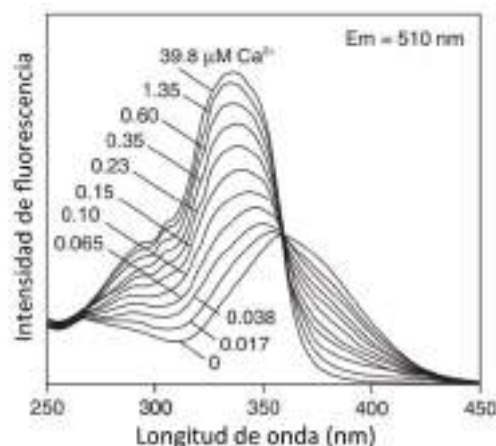


Figura 3.5 Espectro de excitación de la molécula fura-2 en soluciones con una concentración de calcio libre que van de 0 a 39,8 μM . Modificado de las especificaciones de producto del fura-2AM (Invitrogen™F1221).

Los cristales con las neuronas sensoriales adheridas para ser estudiadas mediante esta técnica se incubaron durante, aproximadamente, una hora en solución extracelular (tabla 3.1) que contenía fura-2AM (Invitrogen™F1221) a una concentración de 5 μ M (preparado a partir de un stock 1 mM en DMSO) y plurónico (Invitrogen™P6867) al 0,02%. La incubación se realizó en incubador a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5%, de manera individual.

Tabla 3.1 Composición de la solución extracelular usada en los experimentos de imagen de calcio.

Sustancia	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	3
CaCl ₂	2,4
MgCl ₂	1,3
HEPES	10
Glucosa	10
Ajustar pH:7.4 con NaOH	

A continuación, el cristal fue lavado en solución extracelular, y transferido a una microcámara perfundida continuamente (\approx 1ml/min) con solución extracelular, mantenida a una temperatura relativamente constante de 32-34 °C. Las células fueron excitadas durante 250-300 ms de manera alterna y consecutiva a 340 y 380 nm de longitud de onda mediante un monocromador Polychrome IV (Till Photonics) controlado por el programa "TillVision software package" (Till Photonics) cada 3 s. La fluorescencia emitida por la sonda en cada estimulación, previamente filtrada con un filtro de paso de longitud de onda larga de 510 nm, se captó a través de un microscopio Leica DM IRE2 (objetivo 20x) con una cámara CCD (Imago QE Sensicam, Till Photonics) acoplada que tomó la imagen. Finalmente, la señal fue integrada, registrada y almacenada por un ordenador utilizando el programa TillVision Imagen (Till Photonics), que además permitió monitorizar la señal en tiempo real.

Durante el protocolo de registro, los campos celulares bajo el objetivo se sometieron a estimulación térmica (bajada moderada de temperatura hasta \approx 17 °C, umbral de activación de TRPA1 (Story et al., 2003)) y química, de manera aislada o simultánea.

Los cambios de temperatura se lograron gracias a un sistema "Peltier" (ReidDan



Electronics) regulado por un controlador (RDTC-1, ReidDan Electronics) conectado a un ordenador a través de un digitalizador, y quedaron registrados simultáneamente a los registros de fluorimetría de calcio con el programa Clampex 10.2 (Molecular Devices) mediante un termómetro cuya sonda de medida se situó en el tubo de salida de la solución, la cual estaba situada inmediatamente encima del campo de registro.

La estimulación química se logró mediante un sistema de paso de vías, de manera que se pudo cambiar de una solución a otra sin interrumpir el flujo de perfusión ni alterar su temperatura de manera abrupta.

Las sustancias químicas ensayadas como moduladoras de la respuesta neuronal, fueron disueltas a alta concentración (soluciones “stock”) y almacenadas a 4 °C hasta su uso. El día del experimento, fueron diluidas en solución extracelular a la concentración final de trabajo. En la [tabla 3.2](#) se muestran con mayor detalle las distintas soluciones aplicadas.

Tabla 3.2 Descripción de la soluciones empleadas en experimentos de imagen de calcio

Sustancia	Solución “stock”		Concentración de trabajo	Observaciones
	Concentración	Solvente		
Mentol (Scharlau Me065)	300 mM	DMSO	100 μ M	Agonista de TRPM8 (Peier et al., 2002b; McKemy et al., 2002)
BCTC (Enzo®BML-CA231),	20 mM	DMSO	20 μ M	Bloqueante de TRPM8 (Behrendt et al., 2004; Madrid et al., 2006)
AITC (Sigma-Aldrich®377430)	100 mM	DMSO	100 μ M	Agonista de TRPA1 (Bautista et al., 2005)

El protocolo general de estimulación se inició con un descenso breve de temperatura que, una vez reestablecida a los niveles basales (32-34 °C), continuó con la aplicación del agonista de TRPM8 mentol (Peier et al., 2002b; McKemy et al., 2002). Esta sustancia se aplicó inicialmente de forma aislada y se combinó con una bajada transitoria de temperatura al final de su aplicación para potenciar la activación de TRPM8. Después, se administró el antagonista de TRPM8 BCTC (Madrid et al., 2006) y, en presencia del mismo, se procedió a realizar otra bajada breve de temperatura. A continuación se aplicó el agonista de TRPA1 alil-isocianato

(AITC) (Bautista et al., 2005). Para finalizar, se utilizó una solución extracelular de alta concentración de potasio (KCl 30 mM) con el fin de asegurar el adecuado estado funcional de las neuronas, y poder distinguirlas de otras células no excitables.

Entre cada paso de estimulación química se aplicó solución extracelular a fin de eliminar los restos de la sustancia previamente suministrada, y permitir el restablecimiento del calcio basal de las neuronas estimuladas.

A posteriori, se realizó el análisis de los datos recabados, utilizando los softwares MATLAB (MathWorks®), Origin 8 (OriginLab®) y Excel (Microsoft®) para estudiar y cuantificar el perfil de las respuestas individuales a cada estímulo dentro de cada población neuronal estudiada.

3.4 Análisis de expresión génica y genotipado mediante técnicas de biología molecular.

3.4.1 Análisis de la expresión génica.

3.4.1.1 Extracción de ARN.

Se procedió a realizar una extracción total de ARN de los tejidos de interés (hipotálamo, retina y ganglio trigémino) utilizando “TRIZol™ Reagent” (Ambion®15596026) acorde a las instrucciones del fabricante.

Brevemente, el tejido fue disociado en un 1 ml de TRIZol de forma mecánica y mezclado con 200 µl de cloroformo. Tras una centrifugación a 12.000 g durante 15 min a 4 °C, se recogió la fase acuosa en un tubo Eppendorf donde se extrajo el ARN con isopropanol y se purificó con etanol frío al 75%. Para terminar, el ARN extraído se disolvió en agua miliQ.

Finalmente, se procedió a realizar una cuantificación de la cantidad y pureza del ARN extraído mediante un espectrofotómetro Nanodrop™2000 y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

3.4.1.2 Síntesis de ADNc (RT-PCR).

El ARN aislado en el paso anterior, fue retrotranscrito en su ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) con el fin de ser manejado con mayor estabilidad y ser analizado por



productos de amplificado de PCR. Para ello se utilizó la enzima transcriptasa SuperScript™III (Invitrogen™18080-044) acorde a las instrucciones del fabricante.

Brevemente, 2 µg of ARN fueron incubados durante 5 min a 65 °C con 150 ng de cebadores aleatorios (Invitrogen™48190-011) y una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) a 10 mM. (Sigma-Aldrich®DNTP10). A continuación, se añadió una mezcla con el tampón comercial (1X), 10 mM DTT, 2 U/µl de RNase OUT (Invitrogen™10777-019), y 10 U/µl de Superscript™III. Finalmente se realizó una incubación en un termociclador (T100™Thermal Cycler, Bio-Rad), primero 10 min a 25 °C, seguidamente 1 hora a 50 °C y finalmente 15 min a 70 °C. El ADNc resultante se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se realizaron rutinariamente reacciones sin adición de la enzima transcriptasa como control negativo de expresión.

3.4.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADNc generado fue analizado mediante PCR semicuantitativa. Esta técnica permite replicar exponencialmente una determinada secuencia génica de interés si está presente en la muestra a analizar, de manera que el amplificado sea detectable en un gel de agarosa y en función de su intensidad se pueda valorar su nivel de expresión (Watson et al., 2006).

Para ello, se utilizó la polimerasa “KAPA2G Fast” (KapaBiosystems Inc.) de acuerdo a las instrucciones de uso del fabricante con los cebadores específicos detallados en la [tabla 3.3](#). Estos cebadores fueron diseñados usando el programa “on-line” primer-BLAST (NCBI), en exones ampliamente separados con el fin de evitar interferencias de amplificación genómica.

Tabla 3.3 Cebadores utilizados para la detección de expresión génica mediante PCR semicuantitativa.

Gen	Cebadores	Tm (°C)	Tamaño de banda
TRPM8 (pareja 1)	F: 5'-GGA ACTCCATGATGCATCTCTC-3' R: 5'-GGGGATGATGAATAGACACAGG-3'	60	466 pb
TRPM8 (pareja 2)	F: 5'-CAAGTTTGTCCGCCTCTTTC-3' R: 5'-AACTGTCTGGAGCTGGCAGT-3'	60	527 pb
β-Actina	5'-ACCCACACTGTGCCATCTA-3' 5'-GCCACAGGATTCCATACCCA-3'	60	342 pb
HPRT	5'-CAGTCCCAGCGTCGTGATTA-3' 5'-AGCAAGTCTTTCAGTCCTGTC-3'	60	139 pb

En los experimentos, se añadieron una serie de muestras control para verificar que el resultado obtenido es específico y que no se debe a contaminaciones externas.

- Control negativo o blanco: mezcla a la que no se le añade muestra a testar o, la que se añade, se sabe de antemano que no contiene expresión.
- Control positivo: mezcla a la que se le añade una muestra a testar que previamente ha demostrado tener expresión. Debería dar amplificación de banda del tamaño esperado.
- Control endógeno: Además del gen de interés, se testa otro gen que sea constitutivo del tejido a analizar y que, por tanto, siempre se expresa. Este tipo de control positivo nos indica la presencia de material genético, de manera que si no es posible detectar expresión del gen de interés, no se debe a que haya habido algún problema de síntesis o degradación de la muestra de ADN. Si previamente se comprueba que no se producen interferencias en los resultados, se pueden añadir los cebadores del gen constitutivo en combinación con los cebadores del gen de interés (metodología implementada en los genotipados); de este modo también se monitorizan los errores de pipeteo. Para este fin, hemos utilizado los genes de la miogenina o el de la hipoxantina-fosforiltransferasa (HPRT).

La amplificación se realizó en un termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad) con las condiciones generales presentadas en la **tabla 3.4**.

Tabla 3.4 Condiciones generales de amplificación en termociclador para la polimerasa “KAPA2G Fast”.

Desnaturalización inicial	95 °C, 3 min	1 ciclo
Desnaturalización	95 °C, 15 s	35 ciclos
Anillamiento	42-65 °C*, 15 s	
Extensión	72 °C, 30s	
Extensión final	72 °C, 3 min	1 ciclo
Mantenimiento	4 °C, ∞	1 ciclo

*Valor específico para cada conjunto de cebadores utilizado determinado por su Tm.

3.4.1.4 Electroforesis en gel de agarosa.

Para separar los productos de PCR generados, se utilizó un gel de agarosa (Sigma-Aldrich® A9539) al 1.5%, disuelto en tampón TAE 1X, mediante calentamiento por microondas.



A continuación, se añadieron 5 μ l/100 μ l de “SYBR®Safe stain” (Invitrogen™S33102) para permitir su posterior visualización, y se vertió en la cubeta molde. Una vez solidificado, las muestras se cargaron en el gel y se sometieron a campo eléctrico de 80 voltios durante 30 min en tampón TAE 1X. Finalmente, el resultado fue visualizado y fotografiado en un UV-transiluminador (Alphamager®2200). En todos los geles se añadió una muestra de marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen™15628-019) o 1 Kb (Invitrogen™10787-018).

3.4.2 Genotipado.

Todos los ratones empleados, procedentes de líneas transgénicas, fueron genotipados previamente a su uso. Igualmente, antes de comenzar cualquier experimento, se recolectó una pequeña muestra de tejido que se almacenó a -20 °C, para, tras la realización del experimento, volver a comprobar el genotipo si fuera necesario.

3.4.2.1 Extracción rápida de ADN genómico para genotipado.

El primer paso consiste en extraer el material genético a analizar. Normalmente la muestra de partida empleada fue un pedacito de no más de 2 mm de longitud de cola, o los pedacitos de oreja resultantes del marcaje identificativo del ratón. No obstante, en ocasiones se ha usado un mechón pequeño de pelo con iguales resultados.

Inicialmente, en un tubo Eppendorf con 50 μ l de NaOH 50 mM (JTBaker®0402) se sumerge la muestra y se calienta a 95 °C durante 25 min en un termobloque. A continuación, tras darle un pequeño pulso de centrifugación para recoger todas las gotitas que se habrán quedado pegadas a la pared por condensación, se le añaden otros 50 μ l de Tris-HCl 1M (Trizma®baseT1503, HCl Sigma-Aldrich®30721), se agita con el vórtex momentáneamente, y se centrifuga a 13000 rpm durante 5 min para que los restos no digeridos se vayan al fondo. En el sobrenadante encontraremos nuestro ADN listo para usar y que se puede mantener en la nevera por un corto periodo de tiempo (3-4 semanas).

3.4.2.2 Cebadores, condiciones y visualización.

A continuación, se realiza una PCR específica para cada transgén de interés (consultar cebadores en [tabla 3.5](#)) y se visualiza el resultado en un gel de agarosa como se ha explicado en los apartados 3.4.1.3 y 3.4.1.4 de los presentes métodos.

Según el diseño de cebadores realizado para el genotipado, la técnica permitirá recabar unos datos más o menos limitados sobre las características genéticas del ratón, y permitirnos detectar únicamente la presencia del transgén o también distinguir entre animales homocigotos, heterocigotos y silvestres por generación de bandas de distintos tamaños.

En el caso las líneas TRPM8-EYFP (1-4), TRPM8-DTR-GFP, y TRPM8-Cre (transgén Cre), únicamente podemos detectar su presencia (tabla 3.5) y por tanto distinguir entre portadores y no transgénicos. Para diferenciar entre homocigotos y heterocigotos habría que realizar un análisis de la descendencia.

En el caso de las líneas TRPM8-EGFPf y TRPM8-Cre (transgén reportero RCE), sí que es posible distinguir animales homocigotos, heterocigotos y silvestres por productos de PCR (tabla 3.5), lo que en el caso de la línea TRPM8-EGFPf resulta de vital importancia, ya que los homocigotos son animales KO.

Tabla 3.5 Cebadores y condiciones usadas en la PCR para genotipado.

Línea	Cebadores	Tm (°C)	Ciclos	Tamaño de banda
TRPM8-EYFP(1-4)	F: 5'-GCAGAAGAACGGCATCAAGG-3' R: 5'-AATGCTTGAGATAACAATACAGC-3'	62	35	+ : ≈750 pb
TRPM8-EGFPf	M8+: 5'-GGGATGTCATAGTGCTGAAAGGCAGA-3' M8-: 5'-CCGGGTGCTGCCCATAGTACCATTTTC-3' GFP: 5'-GGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCT-3'	55	30	WT: 295 pb KO: 360 pb
TRPM8-Cre	CreF: 5'-GCACTGATTTGACCAGGTT-3' CreR: 5'-GAGTCATCCTTAGCGCCGTA-3'	62	35	+ : 421pb
	RCE1: 5'-CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC-3' RCE2: 5'-GAAGGAGCGGGAGAAATGGATATG-3' RCE3: 5'-CCAGGCGGGCCATTTACCGTAAG-3'	57	30	WT: 580 pb HO: 320 pb
TRPM8-DTR-GFP	F: 5'-AGGCGCGCCGTCGGTGGTGCTGAAGCTC-3' R: 5'-GTGCGGCCGCTAGTGGGAATTAGTCATGCCAAC-3'	62	35	+ : ≈550 pb
Miogenina	F: 5'-CCAAGT TGGTGTCAAAAGCC-3' R: 5'-CTCTCTGCT TTAAGGAGTCAG-3'	-	-	+ : 173 pb



3.5 Técnicas empleadas para análisis histológicos.

3.5.1 Anticuerpos utilizados.

- Anti-cFos (SantaCruz®biotechnology sc-52, RRID: AB_2106783): anticuerpo policlonal generado en conejo y purificado por afinidad. Para su producción se utilizó un péptido mapeado en el extremo N-terminal de la proteína Fos humana. Actualmente se encuentra descatalogado. Se ha utilizado a una dilución 1:2000 como anticuerpo primario.
- Anti-CGRP (Merck-Millipore PC205L, RRID: AB_2068524): anticuerpo policlonal generado en conejo. Para su producción, se utilizó como inmunógeno el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) de rata, aunque demuestra tener reactividad cruzada también en ratón. La dilución de uso empleada como anticuerpo primario fue 1:2000.
- Anti-ChAT (Merck-Millipore AB144P, RRID: AB_2079751): anticuerpo policlonal generado en cabra y purificado por afinidad. Como inmunógeno para su producción se utilizó la enzima acetiltransferasa de colina (ChAT) procedente de placenta humana. Presenta actividad cruzada con varias especies, entre ellas el ratón. Se ha utilizado como anticuerpo primario a una dilución de 1:250.
- Anti-DIG-AP (Roche 11093274910, RRID: AB_514497): anticuerpo policlonal generado en oveja usando como inmunógeno digoxigenina (DIG) y purificado por cromatografía de intercambio iónico y aislamiento por inmunoadsorción. Se encuentra conjugado con fosfatasa alcalina (AP). Se utilizó como anticuerpo primario a la dilución 1:500.
- anti-DIG-POD (Roche 11207733910, RRID: AB_514500): anticuerpo policlonal generado en oveja usando DIG como molécula inmunógena y purificado por cromatografía de intercambio iónico y aislamiento por inmunoadsorción. Se encuentra conjugado con peroxidasa de rábano (POD). Se utilizó como anticuerpo primario a la dilución 1:500.
- Anti-GABA (Sigma-Aldrich®A2052, RRID: AB_477652): anticuerpo policlonal generado en conejo usando como inmunógeno ácido γ -aminobutírico (GABA) conjugado con albúmina de suero bovino (BSA). El anticuerpo fue aislado por métodos inmuno-específicos de purificación, y muestra unión a GABA pero no a BSA. La dilución de uso fue 1:200 para ser usado como anticuerpo primario.

- Anti-GFP (abcam 13970, RRID: AB_300798): anticuerpo policlonal generado en pollo usando como inmunógeno la proteína completa recombinante GFP procedente del alga *Aequorea victoria*. También se une a la proteína YFP. Se ha usado a una dilución 1:2000 como anticuerpo primario.
- Anti-Melanopsin (ATS Bio AB-N38, RRID: AB_1608077): Anticuerpo policlonal producido en conejo. Reconoce los últimos 15 aminoácidos del dominio extracelular del extremo N-terminal de la proteína melanopsina de ratón; carece de reactividad cruzada con otras especies. La dilución a la que se usó como anticuerpo primario fue 1:2500.
- Anti-Parvalbúmina (Swant PV27, RRID: AB_2631173): anticuerpo policlonal generado en conejo usando como inmunógeno la proteína recombinante parvalbúmina (PV) de rata, no obstante muestra reactividad cruzada con otras especies, como es el caso del ratón. Su dilución de uso como anticuerpo primario ha sido 1:1000.
- Anti-chicken Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch 703-545-155, RRID: AB_2340375): anticuerpo generado en burro purificado por cromatografía de inmunoafinidad. Está conjugado con el marcador fluorescente Alexa Fluor®488. Se une a la molécula completa IgY de pollo. Se utilizó como anticuerpo secundario a una dilución 1:800.
- Anti-goat CFL555: (Santa Cruz Biotechnology sc-362265, RRID: AB_10989474): anticuerpo producido en burro purificado por preadsorción en columna de afinidad. Está conjugado con el marcador fluorescente CruzFluor™555 y reconoce la molécula completa IgG de cabra. Actualmente descatalogado. Se ha utilizado a una dilución 1:400 como anticuerpo secundario.
- Anti-rabbit Alexa 596 (Invitrogen A11012, RRID: AB_141359): anticuerpo generado en cabra purificado por preadsorción en columna de afinidad. Está conjugado con el marcador fluorescente Alexa Fluor®596. Reconoce tanto la cadena pesada como las ligeras de las IgG de conejo. Se utilizó como anticuerpo secundario a una dilución 1:1000.



3.5.2 Fijación y técnicas inmunohistoquímicas.

3.5.2.1 Soluciones.

- Tampón fosfato salino (PBS) 1X: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM en agua destilada pH: 7,4. Autoclavar si se requiere estéril. Almacenar a 4 °C.
- Paraformaldehído (PFA) 4% en PBS 1X: En la campana de flujo laminar, en continua agitación, se calienta el PBS 1X sobre placa caliente, monitorizando la temperatura con un termómetro para asegurar que no sobrepasa los 65 °C. Cuando se alcance la temperatura apropiada, añadimos poco a poco el PFA. Para favorecer la solubilización, añadimos varias gotas de NaOH hasta que la solución se vea transparente. Una vez disuelto, ajustamos el pH a 7,4 con HCl midiéndolo con tiras reactivas pH 6.0-8.1 (Healthcare Life Sciences, Whatman™2629-990) y finalmente ajustamos el volumen. Si se va a usar en las siguientes horas, mantener a 4 °C; para un uso a medio-largo plazo almacenar alicuotado a -20 °C.
- Tampón trizma salino con tween (TTBS) 10X: Trizma Base 0,5M, NaCl 9%, pH 7,4 en agua destilada. Para usar, diluir 1:10 con agua destilada y añadir Tween 20 a una dilución final de 0,05%.
- Tampón fosfato (PB) 0,1 M: 190 ml solución A + 810 ml solución B. Ambas preparadas en agua destilada.
 - Solución A: Fosfato monosódico 0,1 M (Merck-Millipore 1.06346)
 - Solución B: Fosfato disódico 0,1 M (Sigma-Aldrich® S0876)
- Solución Hoechst 33342 (Invitrogen H1399): 0,5 µg/ml en PBS 1X. El stock 2000X se preparó en agua destilada, se alicuotó y se almacenó a -20 °C.

3.5.2.2 Perfusión, fijación y preparación de muestras.

Para llevar a cabo un correcto análisis histológico, se necesita conseguir una buena preservación del tejido con el fin de mantener su integridad morfológica y estructural en condiciones similares al estado “in vivo”. Con este fin, se realiza el proceso de fijación por medio de la perfusión a través del sistema cardiovascular, lo que permite que el agente fijador llegue más fácilmente a todos los tejidos (Gage et al. 2012).

Previamente a la aplicación del fijador, es necesario realizar un lavado del sistema circulatorio para eliminar la mayor cantidad de sangre posible, pues debido a su composición, interfiere en la correcta visualización de las muestras una vez procesadas. Para evitar que los procesos coagulatorios dificulten esta tarea de limpieza, es necesario iniciar el método de perfusión con el animal aún vivo, lo que hace imprescindible anestesiar profundamente al ratón para evitar el dolor.

Como anestésico utilizamos el fármaco pentobarbital sódico (Dolethal®) a una dosis indicada para eutanasia de 70 mg/Kg. Una vez dormido y tras comprobar la falta de reflejos, el ratón se sujeta por las extremidades al soporte donde se va a realizar el procedimiento.

Seguidamente, se abre el abdomen y la caja torácica con cuidado de no dañar el corazón y los grandes vasos. Después se introduce una cánula en el ventrículo izquierdo y se hace un pequeño corte en la aurícula derecha. Ayudados de una bomba peristáltica (Minuplus3, Gilson®) comenzamos a pasar solución a una velocidad de 5 ml/min, en primer lugar PBS 1X, como solución de lavado (≈ 10 min) y a continuación el agente fijador PFA al 4% (≈ 10 min). Ambas soluciones se aplicaron frías manteniéndose en todo momento en hielo.

En el caso de los animales juveniles empleados (edad P15-P23) el proceso fue similar a diferencia de la anestesia utilizada, pues fueron dormidos con isoflurano (Isoflo®) y mantenidos en este estado colocándoles un capuchón en el morro con un papel impregnado con el mismo anestésico durante el procedimiento.

A continuación, se procedió a la extracción de los tejidos de interés los cuales fueron postfijados en solución PFA 4% a 4 °C.

A las 4-6 horas de postfijación se procedió a la extracción de córneas y retinas de los globos oculares recolectados. Brevemente, sujetando el ojo por su parte posterior, bien por el nervio óptico o por los procesos ciliares remanentes, se realiza una perforación con una aguja de 30G (Microlance™) en el borde de la córnea. Con la ayuda de unas microtijeras, y valiéndonos del orificio generado, se separa esta estructura recortándola alrededor siguiendo la línea marcada por el epitelio pigmentario. A continuación, con ayuda de dos pinzas de punta fina, se extrajo el cristalino y se rasgó la esclera liberando la retina.

Córneas y retinas recién extraídas se depositaron en PBS 1X. Igualmente, al día siguiente, el resto de tejidos fueron lavados en este tampón fosfato y todas las muestras, se mantuvieron



en esta solución hasta su uso.

La única muestra fijada por un protocolo diferente fue la de espermatozoides, que se extrajo del epéndimo de machos recién sacrificados por dislocación cervical y fue extendida sobre portaobjetos (Superfrost™ Adhesion Slides, Thermo Scientific™) con una gota de PBS 1X. A continuación, las muestras se dejaron secar en una estufa a 37 °C durante 1 hora. Seguidamente, se fijaron en PFA 4% durante 10 min y se lavaron con PBS 1X, solución en la que permanecieron hasta que se aplicó la detección inmunohistoquímica sobre el portaobjeto.

3.5.2.3 Detección inmunohistoquímica en secciones de muestras flotantes.

Los cerebros y algunas muestras de los ganglios raquídeos fueron cortados en vibratomo (Leica VT1000S) a un grosor de 50-70 μm y recogidos en solución PBS 1X en placas de 96 pocillos. Los ganglios, al ser muestras muy pequeñas, previamente fueron incluidos en agarosa (Sigma-Aldrich® A9539) al 3% (disuelta en PBS 1X mediante calentamiento por microondas).

A continuación, se aplicó un protocolo de detección inmunofluorescente sobre los cortes flotantes en la misma placa de 96 pocillos en que fueron recogidos. Se comenzó realizando 2 lavados de 5 min con tampón TTBS 1X y, seguidamente, los cortes fueron incubados en la solución de bloqueo (TTBS 1X, BSA (Santa Cruz Boitechnology® CAS 9048-46-8) 5%, Tritón x-100 (Sigma-Aldrich® T8787) 1%) durante 1 hora. Después, la solución de bloqueo fue reemplazada por la misma solución pero con el anticuerpo, o anticuerpos primarios, a utilizar disueltos a la dilución de trabajo, y fueron incubados a 4 °C durante la noche.

Al día siguiente, los cortes fueron lavados 4 veces durante 15 min con solución TTBS 1X e incubados en solución de bloqueo que contenía el anticuerpo, o anticuerpos secundarios a utilizar a la dilución de trabajo, durante 2 horas. Finalmente, las secciones fueron lavadas 4 veces durante 15 min con solución TTBS 1X y teñidas con solución Hoechst 33342 durante 5 min.

Todo este proceso se llevó a cabo en agitación continua y se realizó a temperatura ambiente, salvo en los pasos indicados. A partir de la adición del anticuerpo secundario los cortes fueron protegidos de la exposición a la luz.

A continuación, las muestras fueron colocadas en portaobjetos (Normax) y tras 15 min de secado al aire en posición inclinada ($\approx 45^\circ$), montadas con medio Fluoromount™ (Sigma-Aldrich® F4680).

En todos los experimentos se testaron muestras a las que no les añadió el anticuerpo primario como control de especificidad de inmunodetección.

Notas:

- Sin ser cortadas, también se tiñeron mediante este protocolo, una porción de la pared de estómago, las meninges a nivel cerebral, y las córneas y retinas completas.
- En el caso de la detección en cortes cerebrales de las líneas TRPM8-EGFPf, TRPM8-DTR-GFP y de las retinas completas, la incubación con el anticuerpo primario se prolongó durante 72 horas a 4 °C, y la incubación con el anticuerpo secundario se alargó a 48 horas a 4 °C.
- En el caso de la detección en córnea, previo al bloqueo se realizó un paso de incubación en acetona (Sigma-Aldrich® 270725) durante 30 min a temperatura ambiente para favorecer la penetración posterior de los anticuerpos. Tanto el anticuerpo primario, como el secundario, se incubaron durante la noche a 4 °C y los lavados posteriores a ambas incubaciones que se realizaron fueron 6 de 30 min cada uno.
- Estómago, meninges, córneas y retinas completas se montaron en “whole mount”. Se colocaron lo más estiradamente posible sobre el portaobjetos, en el caso de las córneas y las retinas, se procedió previamente a darles 3-4 cortes laterales alrededor. A continuación, sin esperar a que se secaran, se añadió una gota de medio Fluoromount™ por encima, para, acto seguido, colocar un cubreobjetos sobre la muestra, presionando con suavidad para que el tejido quedase lo más extendido posible.

3.5.2.4 Detección inmunohistoquímica sobre cortes adheridos a portaobjetos.

Los tejidos no procesados mediante la inmunohistoquímica en flotante, fueron crioprotectados en sacarosa (Sigma-Aldrich® S9378) al 30% (disuelta en PBS 1X con azida sódica (Sigma-Aldrich® S2002) al 0,01%), y mantenidos en esta solución hasta su uso.

Posteriormente, fueron embebidos en medio de inmersión para cortes criogénicos



(CryoGlue, SLEE medical) en moldes del tamaño apropiado, y congelados rápidamente en hielo seco. Finalmente, las muestras fueron seccionadas en criostato (MNT, SLEE medical) a 20-24 μm de grosor y adheridas a portaobjetos (Superfrost™ Adhesion Slides, Thermo Scientific™). Las muestras se guardaron a 4 °C hasta su uso, que en ningún caso excedió las dos o tres semanas.

A continuación, se procedió a realizar una detección inmunofluorescente sobre los portaobjetos con las muestras adheridas a temperatura ambiente, salvo, en los pasos indicados.

La ubicación del tejido dentro del portamuestras fue delimitada por un rotulador hidrofóbico (PAP pen, Sigma-Aldrich® Z672548) con el fin de utilizar el menor volumen posible de reactivos durante las incubaciones. Para favorecer el secado de la tinta hidrófoba y la adhesión tisular a los portas, estos se mantuvieron en estufa a 37 °C durante los 30 min previos al inicio del procedimiento.

El protocolo se inició realizando 2 lavados de 5 min con solución PB 0,1 M, en agitación suave. Seguidamente, las muestras fueron trasladadas a una cámara húmeda donde, aplicando la solución de bloqueo (PB 0,1 M, BSA (Santa Cruz Biotechnology CAS 9048-46-8) 5%, Tritón x-100 (Sigma-Aldrich® T8787) 1%) sobre la superficie delimitada por el rotulador hidrófobo, fueron incubadas durante 1 hora. Después, la solución de bloqueo fue reemplazada por la misma solución pero con el anticuerpo, o anticuerpos primarios a utilizar disueltos a la dilución de trabajo, y fueron incubados a 4 °C durante la noche.

Al día siguiente, los cortes fueron lavados 4 veces durante 15 min con PB 0,1 M en agitación suave, e incubados, de nuevo, en cámara húmeda, en solución de bloqueo que contenía el anticuerpo, o anticuerpos secundarios a utilizar a la dilución de trabajo, durante 2 horas. Para finalizar, las secciones fueron lavadas 4 veces durante 15 min con PB 0,1M y teñidas con solución Hoechst 33342 durante 5 min, ambos pasos en agitación suave. A continuación, tras aproximadamente 15 min de secado al aire libre en posición inclinada ($\approx 45^\circ$), las muestras fueron montadas con medio Fluoromount (Sigma-Aldrich® F4680).

A partir de la adición del anticuerpo secundario los cortes fueron protegidos de la exposición a la luz en todo momento. En todos los experimentos se testaron muestras a las que no les añadió el anticuerpo primario como control de especificidad de inmunodetección.

Nota:

- En el caso de la detección en cortes de retina de las líneas TRPM8-EGFPf y TRPM8-DTR-GFP, la incubación con el anticuerpo primario se prolongó durante 72 horas a 4 °C, y la incubación con el anticuerpo secundario se alargó a 48 horas a 4 °C.

3.5.3 Hibridación “in situ” optimizada para la detección de bajos niveles de expresión.

Debido a los bajos niveles de expresión de TRPM8 detectados en el cerebro, hemos tenido que optimizar las condiciones de la técnica de hibridación “in situ”. El protocolo utilizado se adaptó del publicado por Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser (1993), en el que se realiza un marcaje de sonda con DIG, un pequeño péptido de origen vegetal que presenta una alta antigenicidad, lo que facilita su detección por técnicas inmunohistoquímicas.

3.5.3.1 Soluciones.

- Agua DEPC: Solución dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich® D5758) 0,01% en agua mili-Q®. Autoclavar.
- Solución citrato sódico salino (SSC) 20X: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M (Sigma-Aldrich® S4641), pH: 7.
- PB 0,4 M: 190 ml solución A + 810 ml solución B. Autoclavar.
 - Solución A: Fosfato monosódico 0,4 M (Merck 1.06346) disuelto en agua DEPC.
 - Solución B: Fosfato disódico 0,4 M (Sigma-Aldrich® S0876) disuelto en agua DEPC.
- PB 0,1 M: PB 0,4 M diluido 1:4 en agua DEPC en el momento de su uso.
- PBS 4X: PB 0,4 M, NaCl 0,55 M. Autoclavar.
- PBS 1X: PBS 4X diluido 1:4 en agua DEPC en el momento de su uso.
- Tampón de hibridación: Solución al 50% formamida y agua DEPC conteniendo SSC 5X, Denharpt's 1X (Sigma-Aldrich® D2532) y 0,1% dextran sulfato (Sigma-Aldrich® D8906). El tampón se completa en el momento de su uso con tRNA (Sigma-Aldrich® 83853) a 250 µg/ml y ADN de esperma de salmón (Sigma-Aldrich® D7656) a 500 µg/ml.
- Solución color sustrato: En 2 ml del tampón de detección (kit “DIG Nucleic Acid Kit” (Roche



11175041910)) añadir 9 μ l NBT 100mg/ml (Sigma-Aldrich® N6639) y 7 μ l BCIP 50 mg/ml (Sigma-Aldrich® B6149).

3.5.3.2 Obtención de muestras.

Los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂, o por dislocación cervical. Acto seguido, los tejidos de interés fueron extraídos (cerebro, ojos y ganglios trigéminos) y rápidamente congelados en hielo seco para prevenir la degradación del ARNm. Las muestras más pequeñas y difíciles de manejar fueron incluidas en bloques de Tissue-Tek (Sakura®) previamente a la congelación. Finalmente, todas las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Los tejidos fueron seccionados en criostato (CM1850UV, Leica) a -20 °C y a un grosor de 20 μ m. Los cortes se recogieron en portaobjetos de adhesión fuerte (Polysine™ Microscope Adhesion Slides, Thermo Scientific™), y rápidamente almacenados a -80 °C hasta su procesamiento.

3.5.3.3 Síntesis de ribosondas marcadas con digoxigenina (DIG).

Ante el desafío de ser capaces de detectar niveles muy bajos de expresión se utilizó una ribosonda de TRPM8 de ratón de gran tamaño (3,3 Kb), con el objetivo de aumentar la sensibilidad que pudieran mostrar otras sondas más cortas. Dicha secuencia, guarda una alta homología con la secuencia del ARNm de TRPM8 de rata.

La secuencia de ADNc utilizada en la síntesis, estaba contenida en un plásmido basado en el sistema pCR®II-TOPO (Invitrogen K466001) cedido amablemente por el Dr. Mark Hoon (NIH, USA). Dicha secuencia fue amplificada por PCR con los cebadores pUC/M13, indicados por el fabricante, y la “Dream Taq ADN Polymerase” (Thermo Scientific #EP0702), especialmente indicada para amplificar fragmentos de gran longitud. Debido a su tamaño, para la fase de elongación son necesarios 3 minutos de reacción.

El producto de la PCR fue separado en un gel de agarosa al 1%, comprobándose que efectivamente era del tamaño esperado y su integridad era la correcta, y purificado del mismo con el kit de extracción de banda “Wizard®SV Gel y PCR clean-up System” (A9282 Promega) para finalmente ser disuelto en agua DEPC. La cantidad de secuencia amplificada fue

cuantificada en un espectrofotómetro Nanodrop™2000, y utilizada como molde para la síntesis de la ribosonda por transcripción, añadiendo el ribonucleótido UTP marcado con DIG (digoxigenin-11-UTP, Roche 11209256910) usando el kit “Riboprobe Combination System SP6/T7 kit” (Promega P1460) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El sistema pCR®II-TOPO, permite sintetizar ribosondas en ambos sentidos, según la ribopolimerasa utilizada, la SP6 o la T7, generando sondas “antisense” complementarias al ARNm, y que por tanto darán señal al completar la técnica de “in situ”, y sondas “sense” que no. Ambas sondas fueron sintetizadas rutinariamente, y utilizadas en todos los experimentos mostrados, la primera para analizar la expresión de interés, y la segunda como control negativo.

Una alícuota de 5 µl de la síntesis se corrió en un gel de agarosa al 1,5% con el fin de asegurar que la síntesis había sido exitosa. A continuación, para evitar problemas de penetración celular de las ribosondas a causa de su gran longitud, una vez acabada la síntesis, se sometieron a un proceso de hidrólisis alcalina para obtener fragmentos más pequeños (100-250 pb), como describieron previamente Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser (1993).

3.5.3.4 Prehibridación, hibridación y lavados.

Las muestras fueron sacadas del congelador de -80 °C, descongeladas rápidamente con un secador de pelo, fijadas en PFA al 4% recién preparado en PB 0,1 M durante 10 min y lavadas en PBS 1X (3 x 5 min). A continuación, se acetilaron durante 10 min en trietanolamida 0,1 M (Sigma-Aldrich® 33729), 0.25% anhídrido acético, y de nuevo se lavaron en PBS 1X (3 x 5 min).

Para la prehibridación se añadió a cada muestra 300 µl del tampón de hibridación completo en cámara humidificada con SSC 5X y se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Para la hibridación, se reemplazó el tampón usado en la prehibridación por otra alícuota de tampón de hibridación completo que contenía en su composición la ribosonda marcada con DIG a la dilución de 1:100. Las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos para prevenir la evaporación e incubadas en la misma cámara húmeda a 72 °C durante la noche.

Al día siguiente, las muestras fueron lavadas a 72 °C, primero con SSC 5X durante 10



min, y seguidamente, 1 hora con SSC 0,2X. Finalmente, se realizó un último lavado con SSC 0,2X a temperatura ambiente durante 10 min. Todos los lavados se hicieron en agitación.

3.5.3.5 Detección inmunohistológica.

Para la detección de las moléculas híbridas generadas empleamos el kit “DIG Nucleic Acid Kit” (Roche 11175041910) siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando el anticuerpo Anti-DIG-AP y añadiendo como sustrato nuestra propia solución en lugar de la que proporcionan con el kit (solución color sustrato). Es un protocolo de inmunodetección histológica de DIG, en que el resultado se visualiza gracias al sustrato formado por la acción de la fosfatasa unida al anticuerpo primario en las células en que ha tenido lugar hibridación.

Para detectar la señal de DIG en ganglio, donde los niveles de expresión de TRPM8 son altos, es suficiente con realizar una incubación nocturna con el sustrato de la fosfatasa. Por el contrario, para visualizar la señal en tejidos de muy baja expresión, es necesario dejar las secciones de tejido en la solución de revelado durante 4-6 días.

Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en una batería de alcoholes creciente, seguida por xilol, y montadas con medio DPX (Scharlau DP0050).

3.5.4 Hibridación “in situ” fluorescente en combinación con inmunohistoquímica.

Se realizó el protocolo de hibridación “in situ” tal y como se ha descrito en el apartado anterior hasta el paso de la detección inmunohistológica. En ese paso, se utilizó el mismo kit pero con algunas modificaciones en el protocolo aportado por el fabricante.

Después del bloqueo, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-GFP diluido en solución de bloqueo a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, tras 4 lavados de 15 min con la solución de lavado, fueron incubadas con el anticuerpo anti-chicken Alexa 488 en combinación con el anticuerpo anti-DIG-POD, de nuevo, diluidos en solución de bloqueo, a temperatura ambiente durante 2 horas.

Tras 6 lavados de 20 min con la solución de lavado, se utilizó el kit “Tyramide Signal Amplification (TSA)” (PerkinElmer NEL760001KT) con el sistema de fluorescencia basado en tetrametilrodamina (TMR) siguiendo las instrucciones del fabricante. La peroxidasa “activa” a la tiramida oxidándola; así genera en su composición radicales libres que se unen a residuos

proteicos cercanos (de la propia peroxidasa o del anticuerpo que la porta), con los que forma enlaces covalentes. De este modo, múltiples moléculas de tiramida unidas al fluoróforo TMR se unen fuertemente al lugar de detección de la DIG permitiendo su visualización; la señal de fluorescencia obtenida será mucho mayor de la que se obtendría usando un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo. Las moléculas que no se unen forman dímeros entre ellas o dejan de ser activas rápidamente, por lo que apenas se generan uniones inespecíficas.

Finalmente el tejido fue teñido con la tinción nuclear fluorescente Hoechst 33342 (0,5 µg/ml (invitrogen H1399) en PBS, pH: 7,4) durante 5 min y montadas con el medio acuoso Fluoromount™ (Sigma-Aldrich® F4680).

3.6 Inyección hiperosmótica y detección de Fos.

Los ratones de la línea TRPM8-EGFPf de distintos genotipos, y de edades comprendidas entre P20-23, fueron sometidos a una inyección subcutánea en la región dorsal de 300 µl de solución hiperosmótica (NaCl 1M) o solución salina (NaCl 0,15 M). Acto seguido, se devolvieron a su jaula sin acceso a agua o comida durante 90 min, tiempo estimado para que se produzca el pico de máxima expresión de Fos ante un estímulo (Morgan et al., 1987). Pasado este tiempo, los animales fueron perfundidos (consultar apartado 3.5.2.2) y sus cerebros extraídos y post fijados durante 24 horas.

Posteriormente, los cerebros fueron sometidos a análisis inmunohistológico sobre muestras en flotante, como se ha explicado previamente en los apartados 3.5.2.2 y 3.5.2.3, con el objetivo de evaluar el incremento de la presencia de Fos en núcleos relacionados con los procesos de osmorregulación a nivel central. El *c-fos* es un gen de expresión neuronal temprana que inicia múltiples procesos de señalización en respuesta a ciertos estímulos fisiológicos, lo que permite asociar funcionalmente el emplazamiento de su expresión a la respuesta fisiológica obtenida a causa de un estímulo (revisado por Dragunow y Faull, 1989).

En este caso, los cortes realizados en vibratomo tuvieron un grosor de 55-65 µm sin excepciones, con la intención de evitar que diferencias en este sentido, pudieran influir en la cuantificación final de los datos.



3.7 Inyección intraocular de toxina colérica (subunidad B).

La subunidad B de la toxina colérica (CTB) no presenta ningún tipo de toxicidad, ya que solo contiene el fragmento de la toxina que le confiere la propiedad de unión a la membrana celular durante una infección. Esta propiedad se viene aprovechando desde hace más de 3 décadas para utilizar esta molécula como marcador axonal por marcaje anterógrado (Luppi et al. 1987; Angelucci et al. 1996; Conte, et al. 2009). Más recientemente, se ha conseguido conjugar la toxina con una nueva generación de marcadores fluorescentes extremadamente brillantes y fotoestables, permitiendo con una simple inyección, obtener resultados muy sensibles, reproducibles y duraderos (Conte et al., 2009).

Nosotros hemos utilizado este trazador en combinación con el marcador fluorescente Alexa-Fluor 594 (Invitrogen™C34777) en la retina, con el objetivo de seguir las proyecciones neuronales ganglionares hasta su destino en el SNC y de esta manera ver a dónde llegan las proyecciones neuronales de las células ganglionares fluorescentes en los ratones reporteros que hemos estudiado.

La casa comercial nos presenta el producto liofilizado y, de acuerdo a sus instrucciones de uso, se disolvió en PBS 1X estéril a la dilución de trabajo de un 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (solución CTB), a continuación se hicieron alícuotas de 5 μl y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Los ratones se anestesiaron con isoflurano (Isoflo®) en una caja de metacrilato, y acto seguido fueron colocados bajo la lupa, para poder visualizar bien el ojo. Aquí, los roedores se mantuvieron en estado inconsciente gracias al suministro anestésico que les llegaba a través de un adaptador especial que se le colocó alrededor del morro, dejando al aire los ojos.

Durante el procedimiento se utilizó una vaporización de isoflurano al 5% para la inducción, y posteriormente se bajó al 3% para el mantenimiento, siempre con O_2 a un flujo de 0,9 l/min.

Con una aguja estéril de 30G (Microlance™) se realizó un pinchazo en un lateral de la córnea, abriendo así un pequeño agujero. Como consecuencia de la lesión, algo de líquido puede exudar del ojo a través de la abertura producida; en ese caso es conveniente secar la superficie con un trozo de papel absorbente para visualizar mejor el orificio generado. A continuación, mediante una pipeta microcapilar ensamblada a un tubo aspirador bucal

(Sigma-Aldrich® A5177), se inyectó 1 µl de la solución CTB introduciendo la punta de la pipeta a través del agujero, en dirección a la retina. Seguidamente, repetimos el mismo proceso en el otro ojo.

Puesto que la operación, entre anestesia e inyección no debería llevar más de 2-3 min, no es necesario situar al ratón sobre una manta eléctrica para mantener su temperatura corporal durante el procedimiento. No obstante, una vez terminado, colocamos al ratón durante unos minutos en una placa térmica a 37 °C hasta que recuperase la consciencia para finalmente devolverlo a su jaula.

Después de 72 horas, los ratones fueron sometidos a perfusión y los cerebros y ojos fueron extraídos para ser analizados por las técnicas inmunohistológicas ya descritas anteriormente (consultar apartado 3.5.2). Como ya hemos comentado previamente, el Alexa Fluor 594 al que va unido la CTB, presenta una fluorescencia muy intensa, por lo que puede ser visualizado directamente bajo el microscopio si necesidad de realizar ningún marcaje secundario, no obstante se realizaron tinciones tanto en retina como en cerebro para visualizar el marcaje fluorescente transgénico de los ratones empleados.

3.8 Adquisición, procesamiento y cuantificación de imágenes.

Las imágenes tomadas en campo claro y epifluorescencia fueron realizadas con un microscopio Leica DM4000B con una cámara MBFCX9000 acoplada, mediante los objetivos de aumento secos 10X y 20X.

Las imágenes y mosaicos de microscopía confocal fueron adquiridos en un microscopio confocal Olympus FV1200 con platina motorizada XY, utilizando los ajustes apropiados para capturar fluorescencia en configuración de canal único, doble o triple en combinación con imagen pseudotransmitida. Se utilizaron los objetivos de aumento 10X (seco), 20X, 40X y 60X (inmersión en aceite). Todas las imágenes se tomaron en configuración z-Stack y, salvo que se especifique lo contrario, las fotografías mostradas son el resultado de sus proyecciones máximas.

Los niveles de brillo y contraste fueron ajustados mediante el programa de software libre ImageJ (Schneider et al., 2012). No se realizó ninguna otra manipulación en las imágenes mostradas. El mismo programa se utilizó para el procesado, análisis y cuantificación de las



imágenes.

3.9 Estrategias de muestreo para cuantificación.

1. Los campos de microscopía seleccionados para la caracterización morfológica y funcional de células fluorescentes en cultivo se escogieron al azar.

2. Los cortes de ganglios raquídeos fotografiados para la cuantificación de la co-expresión de fluorescencia y CGRP fueron seleccionados aleatoriamente.

3. Para el análisis de la colocalización en retina, se tomaron imágenes de cortes transversales retinianos completos que fueron seleccionados de forma estratificada. Durante su recolección, para cada retina se recogieron 6 portaobjetos con muestras. En cada portaobjeto se adhirieron 4-5 columnas de 3-5 cortes transversales de retina cada una; cada columna de muestras fue colocada de manera alterna porta tras porta, de modo que cada columna de cada portaobjetos se correspondiera con una zona diferente del tejido. Finalmente, se aplicó la técnica inmunohistológica en 3 de los portaobjetos seleccionados al azar, y para el análisis se seleccionó un corte de cada columna, normalmente, el que presentaba una mayor integridad del tejido. De esta forma todas las partes de la retina estuvieron representadas en el análisis.

4. En la cuantificación a nivel central de la inducción de Fos en respuesta al estímulo hiperosmótico, cada cerebro se seccionó en 2 o 3 series separadas de cortes alternos, de las cuales solamente una fue teñida. Se cuantificaron todos los cortes obtenidos del núcleo de interés en dicha serie.

3.10 Gráficos, tablas y análisis estadístico.

Todos los datos estadísticos mostrados se expresan en forma de media \pm sem. Para la realización de los gráficos y tablas se utilizaron los softwares GradPad Prism® (GradPad), Origin 8 (OriginLab®), y Excel (Microsoft®).

Para desarrollar los análisis estadísticos se utilizó el software GradPad Prism®. Los test estadísticos aplicados se especifican en los pies de cada figura o en el texto.

3.11 Figuras.

Para el montaje de los paneles mostrados se usó el software Phothoshop CS5 (Adobe Systems®) y Power point (Microsoft®).

Todos los esquemas realizados para la correcta ubicación a nivel cerebral de los núcleos a estudio, fueron adaptados del atlas de cerebro de ratón del Dr. Paxinos (Paxinos y Franklin, 2001) y del instituto Allen (Hong Wei Dong y The Allen Institute for Brain Science, 2008), y del atlas de cerebro de rata del Dr. Paxinos (Paxinos y Watson, 1998).



4. Resultados.



4.1 Evaluación de líneas transgénicas reporteras de ratón para el estudio de las neuronas sensoriales que expresan el canal iónico TRPM8.

La falta de anticuerpos específicos ha dificultado la detección celular del canal iónico TRPM8, tanto a nivel central como periférico. Como alternativa a dicha estrategia, nos proponemos evaluar la fiabilidad de siete líneas transgénicas reporteras que ubican su localización mediante la expresión de proteínas fluorescentes. Algunas de estas cepas ya aparecen en la literatura con una mayor o menor caracterización, mientras que el resto han sido generadas en nuestro laboratorio recientemente. En todas ellas, hemos estudiado el marcaje celular observado en relación a los diversos aspectos morfológicos, funcionales y de expresión conocidos para TRPM8.

Las líneas analizadas han sido: líneas TRPM8-EYFP(1-4)(Morenilla-Palao et al., 2014), TRPM8-EGFPf (Dhaka et al., 2007), TRPM8-Cre (Yarmolinsky et al., 2016) y TRPM8-DTR-GFP (Pogorzala et al., 2013).

En la literatura, la expresión de TRPM8 se encuentra bien caracterizada en ganglios sensoriales primarios, donde se circunscribe a un pequeño subgrupo de neuronas de pequeño tamaño. Se estima que representan un 10-15% del total (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b) y se conocen varios agonistas y antagonistas capaces de influir en su funcionalidad (revisado por Almaraz et al., 2014). Por ello, comenzamos este estudio de validación de las líneas reporteras caracterizando su expresión en las neuronas sensoriales primarias.

4.1.1 Detección del marcador fluorescente en cortes fijados de ganglio raquídeo.

Se comenzó por determinar los niveles de fluorescencia endógena del propio tejido fijado. Así, solo se logró una correcta visualización de neuronas con marcaje en los ejemplares de la línea TRPM8-EYFP1, restringiéndose la señal a los somas celulares. En las líneas TRPM8-EYFP2, 3, 4 y en la línea Cre se consiguió visualizar un tenue marcaje neuronal, aunque se hacía insuficiente para el estudio, pues la señal fluorescente era débil y no se distinguía claramente sobre el fondo. En las líneas TRPM8-EGFPf y TRPM8-DTR-GFP no se visualizó ninguna fluorescencia (datos no mostrados).

Es bien conocido que la fluorescencia de la GFP en material fijado puede verse



comprometida por distintos factores: variaciones en el pH, alteraciones en la conformación de la proteína, o por el efecto de ciertos disolventes orgánicos (Tsien, 1998). Por ello, se decidió amplificar la señal mediante la utilización de un anticuerpo anti-GFP. Con ello se consiguió una buena detección de neuronas con marcaje fluorescente en casi todas las líneas estudiadas. En las líneas TRPM8-EYFP (1-4) y en la línea TRPM8-EGFPf, el detalle de detección resultó mucho mejor que al estudiar la fluorescencia endógena pues fue posible observar con nitidez múltiples axones fluorescentes procedentes de las células marcadas (figura 4.1).

En el caso de la línea TRPM8-DTR-GFP, aunque con la inmunodetección sí que se consiguió visualizar células con fluorescencia, el marcaje obtenido fue muy débil, permitiendo distinguir tenuemente sólo algunos somas neuronales (figura 4.1).

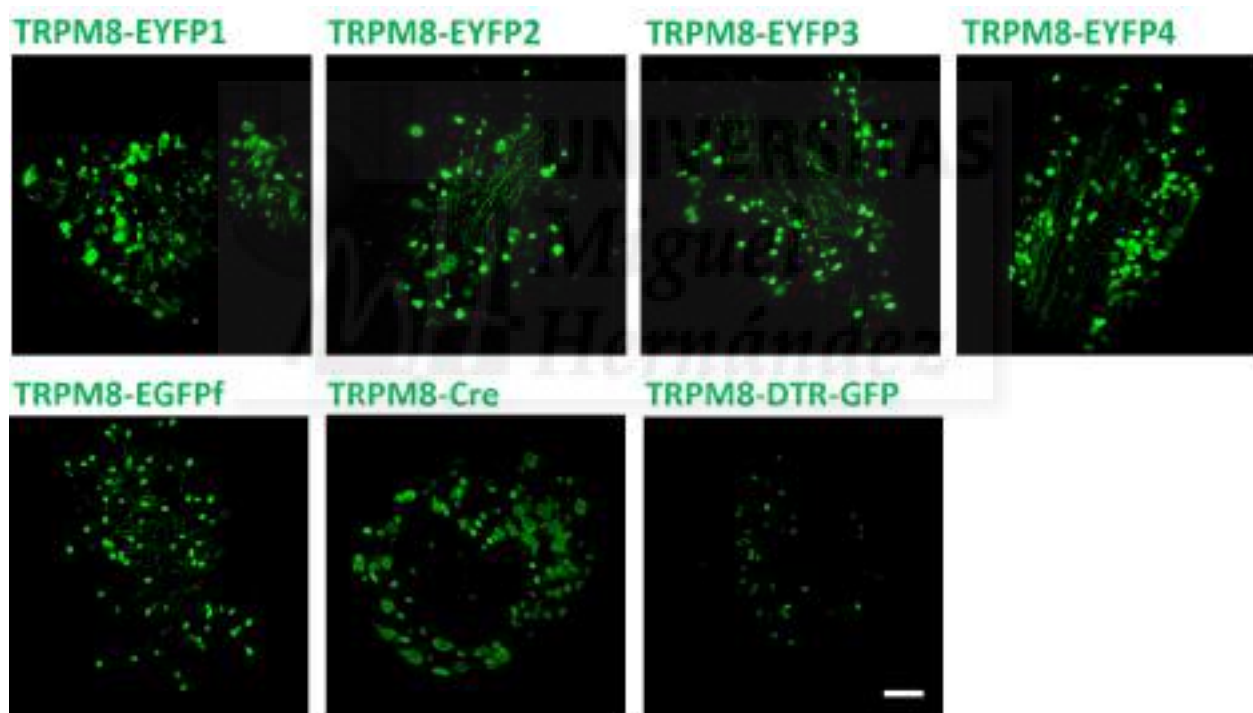


Figura 4.1 Detección inmunofluorescente de neuronas GFP+ en cortes de ganglio raquídeo (60-70 μ m), procedentes de distintas líneas transgénicas de ratón para TRPM8. Muestras tomadas en ratones de 2-5 meses de edad, excepto línea TRPM8-Cre que tenían 18 meses de edad. Nótese que en la línea TRPM8-DTR-GFP la detección es mucho más tenue. Barra de escala: 100 μ m.

En general, la intensidad de la fluorescencia detectada está relacionada con el nivel de expresión del gen reportero, lo que lleva a concluir que en la línea TRPM8-EYFP1 es muy alto, en contraposición a la línea TRPM8-DTR-GFP en que es mínimo.

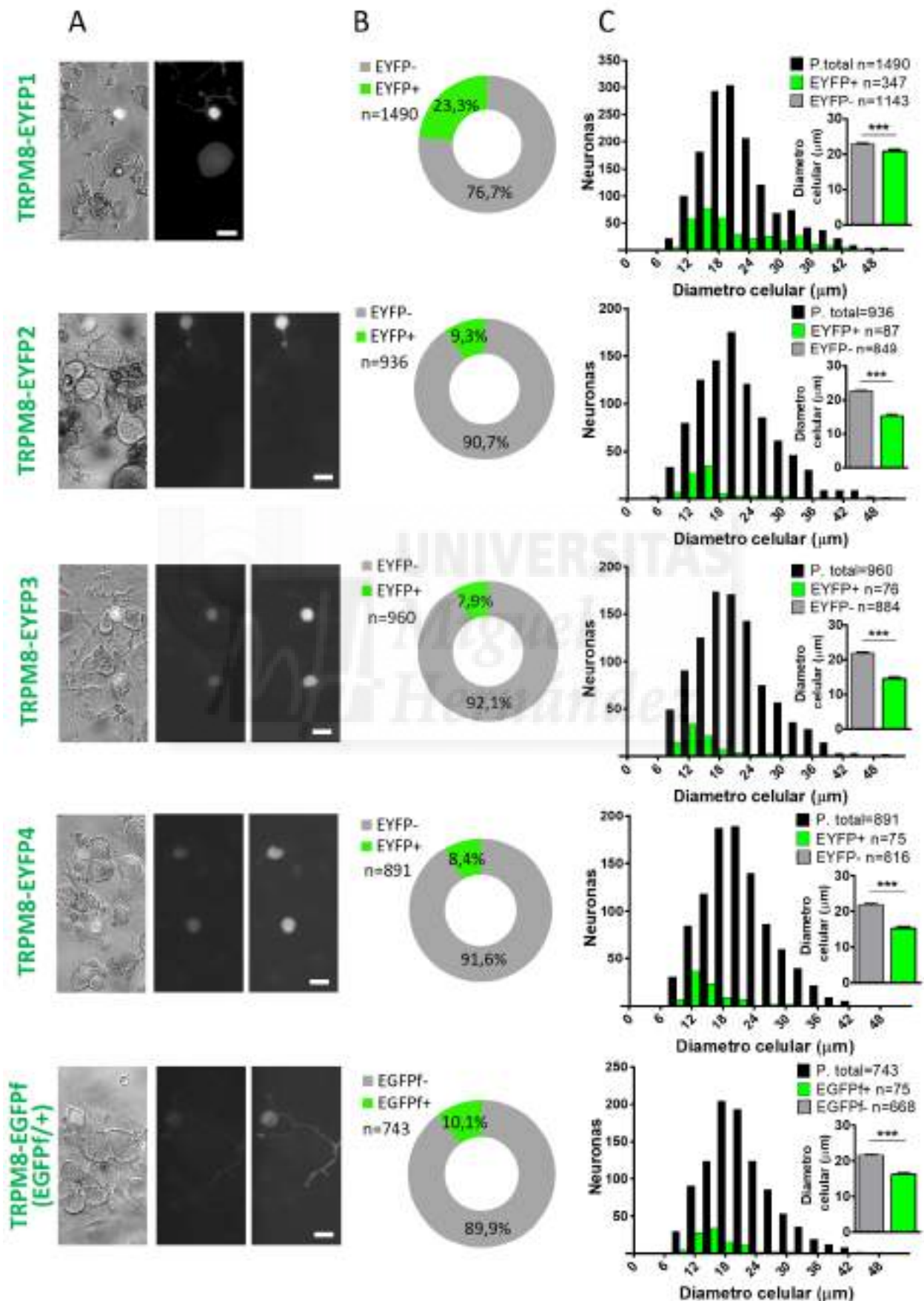
En animales control, sin el transgén, pertenecientes a la misma línea, no se ha observado señal fluorescente endógena, ni tras la adición de anticuerpo antiGFP. Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre sexos.

4.1.2 Caracterización morfológica de las neuronas sensoriales marcadas en cultivo.

A continuación, se realizaron cultivos celulares procedentes de ganglios raquídeos de ratones de sexo y de edad variable (3-8 meses) para cada línea transgénica sometida a estudio. Las células en cultivo mostraron un aspecto normal, sin presentar ninguna anomalía morfológica en relación a los cultivos procedentes de animales no transgénicos, a excepción del marcaje endógeno fluorescente en parte de sus neuronas.

La señal de fluorescencia endógena visualizada, se detectó mayormente en el soma de las neuronas marcadas, lo cual es esperable ya que la GFP es una proteína citosólica y muy hidrosoluble. La excepción a esta regla fue la línea TRPM8-EGFPf, donde la fluorescencia se localizó en la membrana celular. El hecho de que la proteína fluorescente expresada en esta línea sea farnesilada, hace que la fluorescencia se visualice principalmente en esta ubicación (Jiang y Hunter, 1998), permitiendo una fácil identificación de sus prolongaciones axonales en cultivo, en decremento de la visualización del soma. Sin embargo, el marcaje citoplasmático de los otros modelos facilita la detección celular y sólo algunas prolongaciones son distinguibles.

El análisis del marcaje fluorescente endógeno, reveló claras diferencias de intensidad de señal entre las distintas líneas transgénicas. TRPM8-EYFP1 se constató como la línea reportera más brillante, el resto mostraron una intensidad de fluorescencia media con respecto a ésta. La excepción la marcaron las líneas TRPM8-EGFPf en que la intensidad resultó considerablemente más baja, y la línea TRPM8-DTR-GFP en que fue imperceptible. Además, dentro de las neuronas marcadas en la línea TRPM8-EYFP1, observamos heterogeneidad en cuanto a la intensidad de fluorescencia exhibida por sus células. Por el contrario, la visualización en las otras líneas se constató homogénea ([figura 4.2 A](#)).



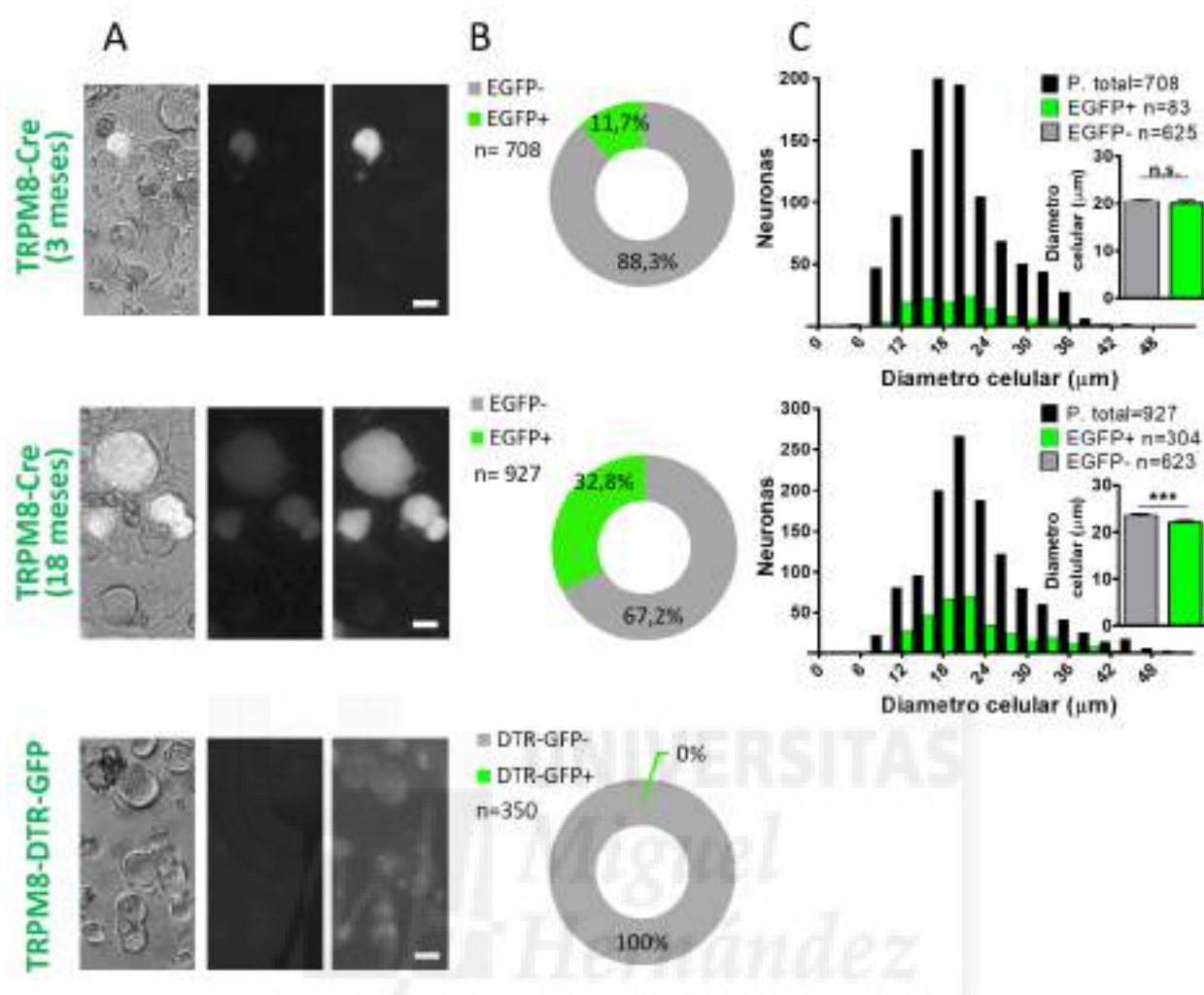


Figura 4.2 Caracterización morfológica de neuronas con marcaje fluorescente endógeno en cultivos neuronales de ganglios raquídeos pertenecientes a distintas líneas transgénicas para TRPM8. Para cada línea: (A) Imagen de epifluorescencia (excitación a 480 nm) a la derecha, superpuesta con imagen transmitida a la izquierda y, la misma imagen, usando los parámetros de exposición de la cámara para la línea más brillante, TRPM8-EYFP1, en el centro. Barra de escala: 15 μ m. (B) Porcentaje de neuronas fluorescentes observadas en cultivo. (C) Valor medio y distribución del tamaño celular de las neuronas observadas. Significancia estadística evaluada aplicando T-Student para muestras no pareadas ($p < 0.001$ para todos los casos con significancia). En la línea TRPM8-Cre se muestran datos obtenidos en ratones a 3 y 18 meses de edad; destacar que en los animales jóvenes, el número de neuronas fluorescentes es mucho menor, y su distribución celular de tamaño no se acota mayoritariamente a valores pequeños, en contraposición a lo que ocurre en los de edad más avanzada.

A continuación se hizo un recuento del número de células marcadas en relación al total de células obtenidas en el cultivo y se estudió su distribución por tamaños. Casi todas las líneas arrojaron un porcentaje de marcaje cercano al 10% de las neuronas totales, un valor aproximado al descrito en trabajos de investigación previos mediante experimentos de monitorización de calcio intracelular (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b). Las excepciones fueron la línea TRPM8-EYFP1 en que se obtuvo el doble y la línea TRPM8-DTR-



GFP en la que no se visualizó ninguna (figura 4.2 B).

En casi todas las líneas estudiadas, el tamaño medio celular de la población con expresión de fluorescencia endógena fue claramente inferior al del resto de la población, acotándose a valores pequeños. La diferencia la marcó la línea TRPM8-Cre, sin diferencias en el tamaño medio entre células con y sin fluorescencia para GFP. No obstante, en la línea TRPM8-EYFP1 el tamaño medio de las células positivas fue algo superior al observado en las otras líneas transgénicas; hecho que podemos asociar a la variación de su distribución, ya que el número de células de tamaño grande se vio incrementado (figura 4.2 C, tabla 4.1).

En observaciones puntuales, la línea TRPM8-Cre parecía mostrar un ligero aumento en el porcentaje de células fluorescentes con la edad de los animales examinados, por lo que se decidió estudiar esta expresión en animales de edad avanzada (18 meses). Las células reporteras de estos animales mostraron una intensidad de fluorescencia similar a la de los jóvenes; sin embargo, su presencia en cultivo se triplicó y su distribución de tamaño celular se vio modificada. La proporción de células pequeñas aumentó notablemente y, ahora sí, mostró diferencias en el tamaño medio respecto al de la población no fluorescente (figura 4.2 B y C).

Tabla 4.1 Diámetro celular (μm) de neuronas sensoriales raquídeas analizadas en cultivos procedentes de las distintas líneas de ratones transgénicos reporteros para TRPM8 analizadas. Se muestran datos separados por poblaciones en función de su marcaje fluorescente endógeno.

	Población fluorescente		Población no fluorescente	
	n	Media \pm SEM	n	Media \pm SEM
TRPM8-EYFP1	347	20,8 \pm 0,4	1143	22,8 \pm 0,2
TRPM8-EYFP2	87	15,3 \pm 0,5	849	22,5 \pm 0,3
TRPM8-EYFP3	76	13,1 \pm 0,4	884	21,8 \pm 0,2
TRPM8-EYFP4	75	13,9 \pm 0,3	816	21,8 \pm 0,2
TRPM8-EGFPf (+/-)	75	15,3 \pm 0,4	668	21,6 \pm 0,3
TRPM8-EGFPf (-/-)	62	14,9 \pm 0,3	516	22,1 \pm 0,3
TRPM8-Cre (Adulto 3 meses)	83	20,4 \pm 0,7	625	20,2 \pm 0,3
TRPM8-Cre (Adulto 18 meses)	304	22,4 \pm 0,4	623	24,4 \pm 0,3
TRPM8-DTR-GFP	-	-	354	21,1 \pm 0,3

Finalmente, en la línea TRPM8-EGFPf se caracterizaron tanto las células procedentes de animales hemicigotos (EGFPf/+) como homocigotos (EGFPf/EGFPf) sin encontrarse diferencias morfológicas entre ambos (tabla 4.1), sugiriendo que la falta de expresión de TRPM8 no

influye en el marcaje observado.

4.1.3 Caracterización funcional de las neuronas sensoriales marcadas en cultivo.

Para tratar de establecer una correlación entre la expresión del marcador fluorescente y la expresión del canal termosensible TRPM8 en cada una de las líneas transgénicas sometidas a estudio, se realizaron experimentos de imagen de calcio con la sonda fluorescente fura-2AM en cultivos celulares procedentes de ganglios raquídeos. La obtención secuencial de imágenes de fluorimetría nos permite monitorizar la concentración de calcio intracelular de varias neuronas simultáneamente. Así, es posible evaluar la respuesta de cada una ante una batería de estímulos, tanto físicos (p.e. temperatura) como químicos que revelarán la presencia de canales funcionales.

Para evaluar la presencia de TRPM8, los estímulos utilizados fueron de tipo térmico y químico, que se aplicaron de manera aislada o simultánea. La estimulación térmica consistió en una bajada moderada de temperatura nunca inferior a 17 °C, umbral de activación de TRPA1 (Story et al., 2003); de este modo se pretendía visualizar únicamente respuestas a frío derivadas de la presencia de TRPM8. La estimulación química consistió en la aplicación de mentol, agonista canónico de TRPM8 (Peier et al., 2002b; McKemy et al., 2002) y su antagonista BCTC (Behrendt et al., 2004; Madrid et al., 2006). Hemos considerado que una célula expresa TRPM8 cuando se produce un incremento en su calcio intracelular en respuesta a la aplicación de frío moderado, mentol o a la combinación de ambos estímulos, y que el efecto del frío se vea bloqueado en presencia de BCTC. Igualmente, hemos testado la presencia de TRPA1, registrando las respuestas a su agonista AITC (Bautista et al., 2005). Al final de cada experimento se aplicó una solución extracelular de alta concentración de potasio (KCl 30 mM) para validar la excitabilidad y el adecuado estado funcional de las neuronas presentes en el campo de estudio.

El protocolo general de estimulación utilizado en los experimentos se puede observar en la [figura 4.3](#), donde se muestra un ejemplo representativo de registro en un cultivo neuronal procedente de ganglios raquídeos. Como se puede observar, se identifica una célula fluorescente con expresión de TRPM8 (trazo verde), otra con expresión de TRPA1 (trazo rojo) y otra sin expresión de estos marcadores (trazo negro).

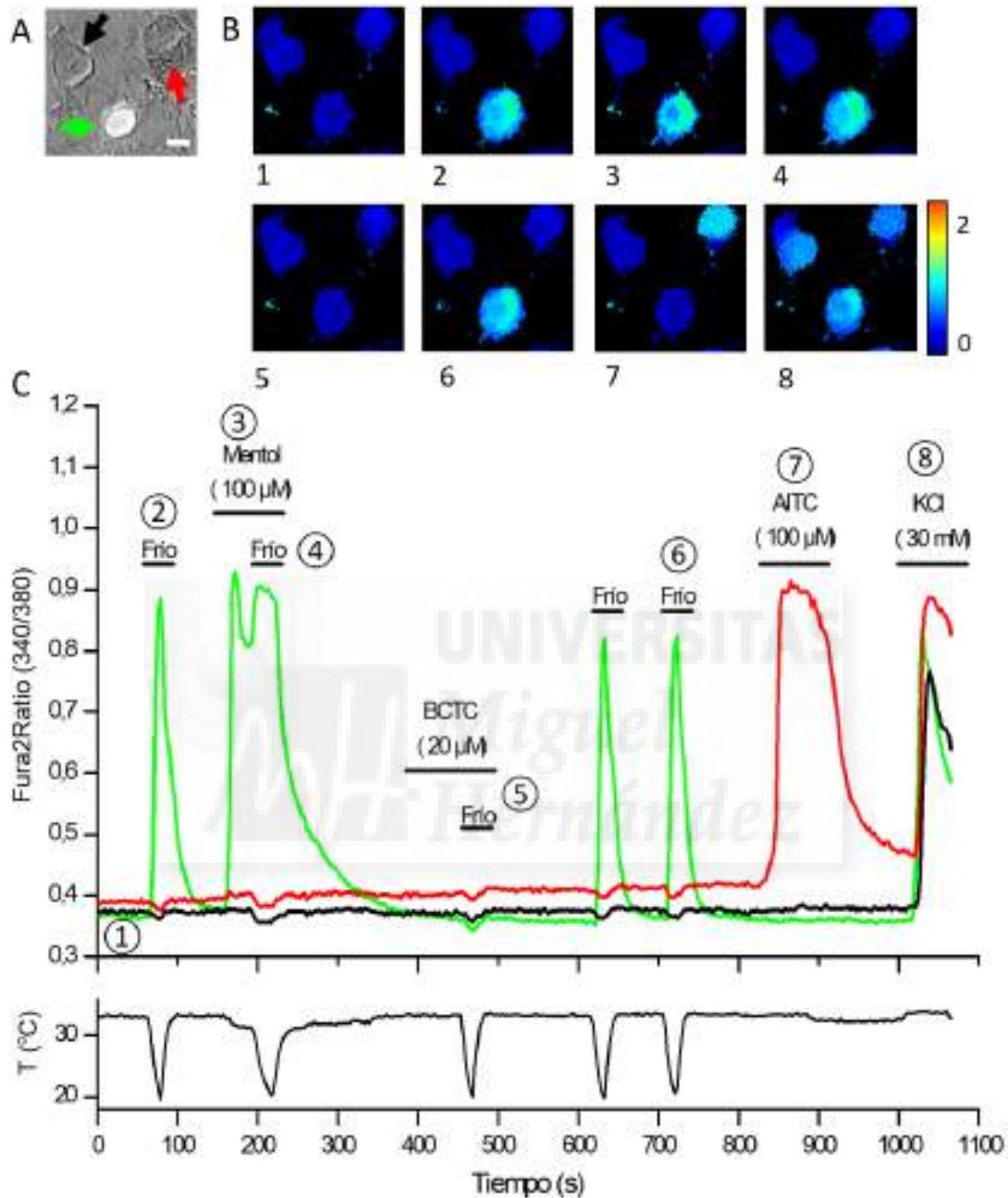


Figura 4.3 Ejemplo representativo de registro de imagen de calcio con la sonda fluorescente fura-2 para la caracterización funcional de neuronas fluorescentes que expresan TRPM8; obtenido en cultivo de neuronas raquídeas procedentes de la línea transgénica TRPM8-EYFP4. (A) Superposición de imagen transmitida y de epifluorescencia (480 nm) (barra de escala: 10 μ m). Se muestra una célula fluorescente que se visualiza en blanco. (B) Imágenes de fluorimetría de calcio en pseudocolor durante las diferentes etapas del experimento. (C) Curso temporal de las respuestas de calcio de las 3 neuronas mostradas en A, registradas simultáneamente durante la estimulación con frío y los agonistas/antagonistas químicos testados de forma aislada o en combinación. Cada trazo pertenece a la célula marcada con la flecha del mismo color. Los números representan los estadios mostrados en B.

En la línea TRPM8-EYFP1 solamente observamos respuestas neuronales a los agonistas de TRPM8 en $\approx 40\%$ de las neuronas con fluorescencia endógena. No obstante, cabe resaltar que la población funcional estuvo restringida a la población fluorescente prácticamente en su totalidad (figura 4.4 A). Sin embargo, las líneas TRPM8-EYFP2, 3 y 4, desarrolladas con la misma estrategia genética, mostraron una correlación entre fluorescencia y expresión funcional de TRPM8 mucho mejor. Sus neuronas reporteras respondieron a los agonistas de TRPM8, frío moderado y mentol, en más del 80% de los casos, superando incluso el 90% en la aplicación de ambos estímulos simultáneamente (figura 4.4 B-D).

De igual modo, los hemocigotos de línea TRPM8-EGFPf (EGFPf/+) arrojaron datos igual de satisfactorios en cuanto al grado de correlación. Además, en los animales homocigotos (EGFPf/EGFPf) se observó la supresión casi completa de estas respuesta, como era de esperar al ser animales KO para TRPM8 (figura 4.4 E).

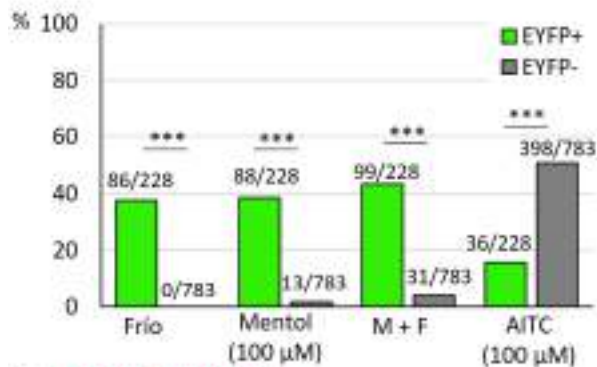
En la línea TRPM8-Cre, se obtuvieron datos diferentes en animales jóvenes y de edad avanzada. En ambos casos se obtuvo un porcentaje bajo de células con respuesta a agonistas de TRPM8 entre la población fluorescente; sin embargo, en los animales jóvenes, las respuestas se distribuyeron por igual entre neuronas marcadas y no marcadas, mientras que, en los animales de mayor edad, quedaron mayormente acotadas a la población fluorescente (figura 4.4 F).

En todas las líneas, las neuronas fluorescentes apenas mostraron respuestas a AITC, registrando valores inferiores al 10% en las líneas TRPM8-EYFP2, 3, 4 y TRPM8-EGFPf (líneas con los mejores datos de correlación entre marcaje y respuesta funcional) y algo superiores en TRPM8-EYFP1 ($\approx 15\%$). El porcentaje en la línea TRPM8-Cre fue mayor, $\approx 25\%$ (figura 4.4).

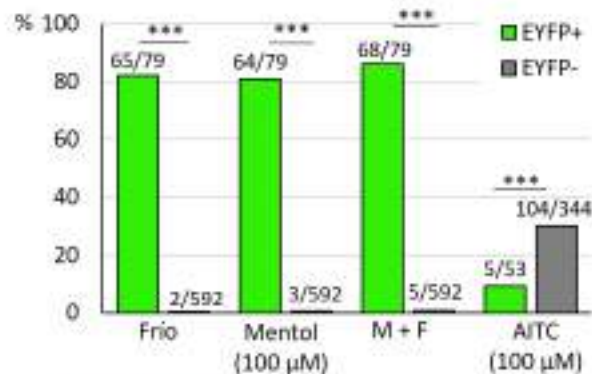
Para finalizar, queda resaltar que las respuestas a frío mostradas en células fluorescentes fueron bloqueadas por BCTC en un alto porcentaje (bien por completo o parcialmente), especialmente en aquellas líneas que mostraron una buena correlación de fluorescencia y expresión funcional. No obstante en todas las líneas se detectaron algunas neuronas insensibles a su efecto (figura 4.5, tabla 4.2).



A TRPM8-EYFP1



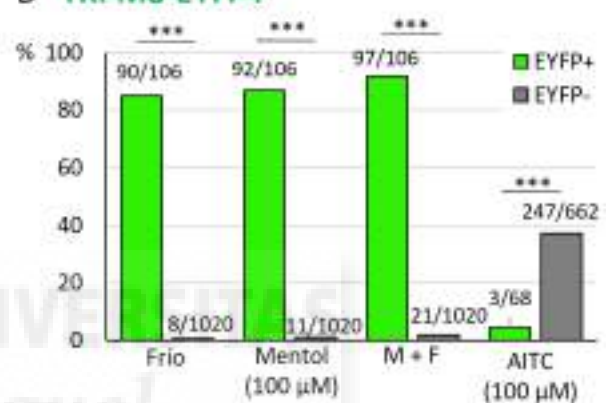
B TRPM8-EYFP2



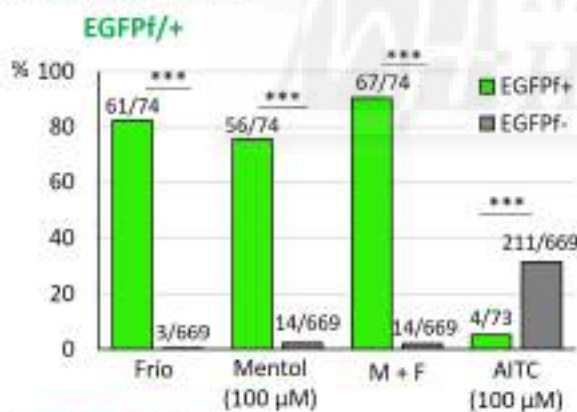
C TRPM8-EYFP3



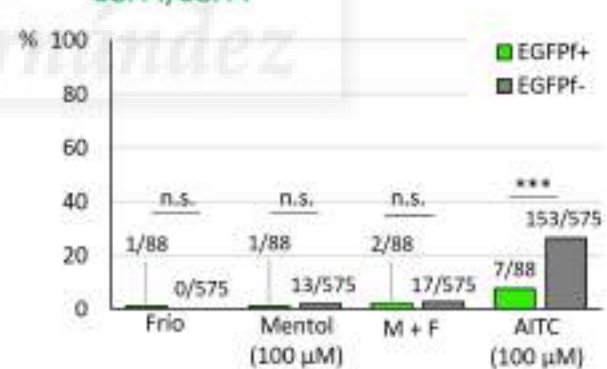
D TRPM8-EYFP4



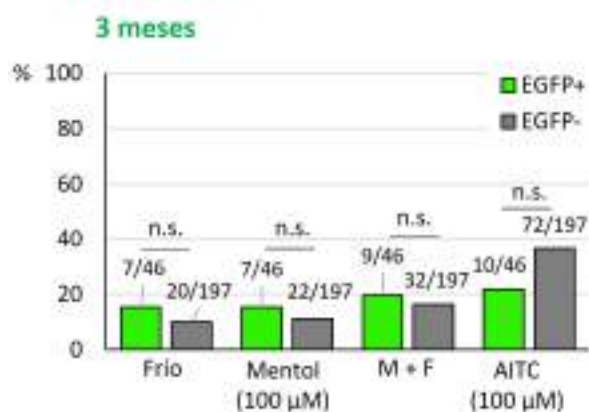
E TRPM8-EGFPf



EGFPf/EGFPf



F TRPM8-Cre



18 meses

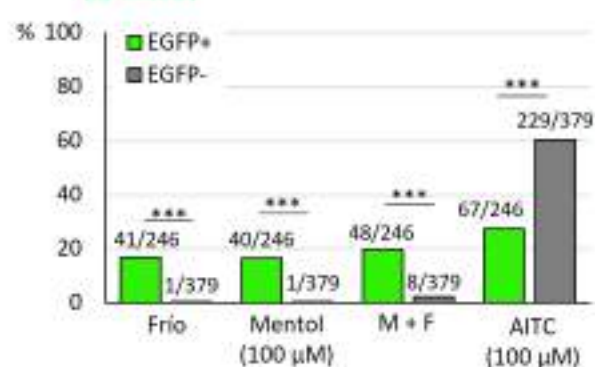


Figura 4.4 Caracterización funcional de neuronas con marcaje fluorescente endógeno mediante experimentos de imagen de calcio con fura-2 en las distintas líneas transgénicas reporteras de TRPM8 estudiadas. Respuestas obtenidas en neuronas sensoriales raquídeas fluorescentes (verde) y no fluorescentes (gris) ante la aplicación de los estímulos indicados, expresadas como porcentaje respecto del total. Diferencias estadísticas detectadas mediante el test de Fisher ($p < 0.001$ en todos los casos con significancia). Para la línea TRPM8-EGFPf (E) se muestran datos para el animal hemicigoto (EGFPf/+) y para el homocigoto (EGFPf/EGFPf). Para la línea TRPM8-Cre (F) se muestran datos obtenidos en animales a 3 meses y a 18 meses de edad.

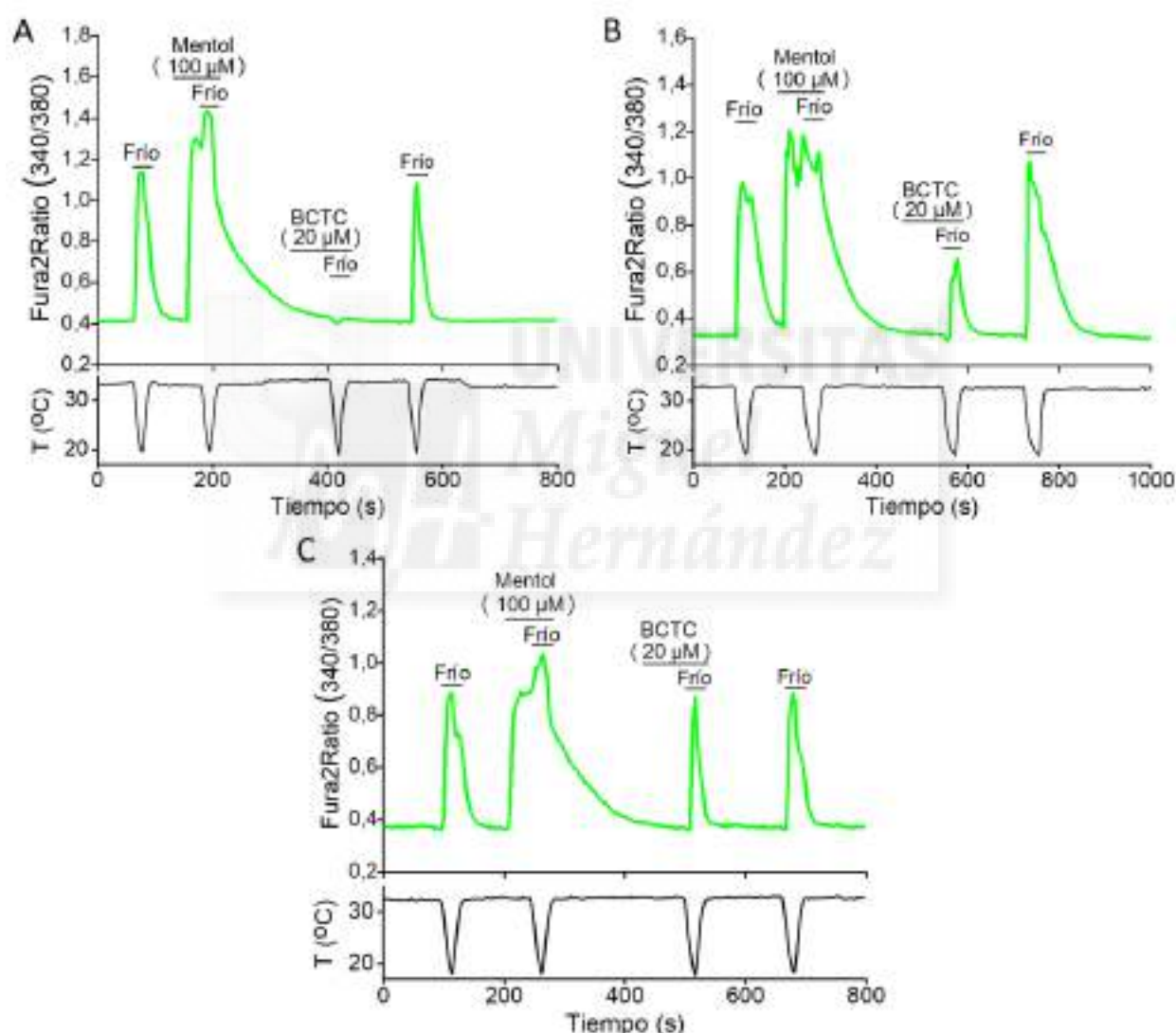


Figura 4.5 Ejemplos representativos del efecto de la aplicación del antagonista de TRPM8 BCTC (20 μM) sobre las respuestas a frío registradas mediante fluorimetría de imagen de calcio con la sonda fura-2 en neuronas raquídeas fluorescentes de la línea TRPM8-EYFP3. Se muestran los registros de tres neuronas que presentan respuestas positivas a la aplicación de los agonistas de TRPM8 frío, mentol y su combinación, cuyas respuestas a frío tienen comportamientos diferentes ante la presencia de BCTC: en (A) es completamente abolida, en (B) se bloquea parcialmente y en (C) se muestra insensible.



Tabla 4.2 Porcentaje de respuestas a frío bloqueadas por BCTC (20 μ M) en células con fluorescencia endógena.

	Bloqueadas	Parcialmente bloqueadas	Insensibles
TRPM8-EYFP1	78,5	12,7	8,8
TRPM8-EYFP2	72,7	25,0	2,3
TRPM8-EYFP3	71,8	21,8	6,8
TRPM8-EYFP4	84,4	7,8	7,8
TRPM8-EGFPf (+/-)	86,7	11,7	1,6
TRPM8-Cre (Adulto 18 meses)	57,9	21,1	21,0

4.1.4 Línea TRPM8-EYFP1.

Al realizar los experimentos funcionales de imagen de calcio en la línea TRPM8-EYFP1, se observó que la mayoría de las células fluorescentes que no respondían a estímulos propios de TRPM8 eran grandes y con baja fluorescencia endógena. Por ello, decidimos comprobar empíricamente si efectivamente había alguna relación entre la intensidad de fluorescencia mostrada, el tamaño celular y la respuesta obtenida.

Al representar gráficamente las neuronas con marcaje estudiadas en cultivo, en función del tamaño y fluorescencia exhibida, se observó una clara separación poblacional entre células con presencia y ausencia de respuestas funcionales para TRPM8 (**figura 4.6 A**). Constatamos que las células identificadas como TRPM8+ eran las de menor tamaño (<23 μ m) y las que presentaban una mayor intensidad de fluorescencia (>50 en el valor de la escala de grises) (población G1). Este grupo mostró una excelente correlación entre marcaje y expresión funcional; las respuestas a los agonistas de TRPM8, frío moderado y mentol, se observaron en el 90% de los casos, superando el 97% en la aplicación de ambos estímulos simultáneamente. En contraposición, las células excluidas de este grupo (población G2) únicamente mostraron respuestas en el 5% de los casos, el 10% cuando la aplicación fue simultánea (**figura 4.6 B**).

Además, se observó, que el número de respuestas a AITC en la población G1 descendía por debajo del 10%, valor similar al observado en las otras líneas analizadas y catalogadas como con buena correlación entre funcionalidad y marcaje. En la población G2 las respuestas a AITC se incrementaron por encima del 20%.

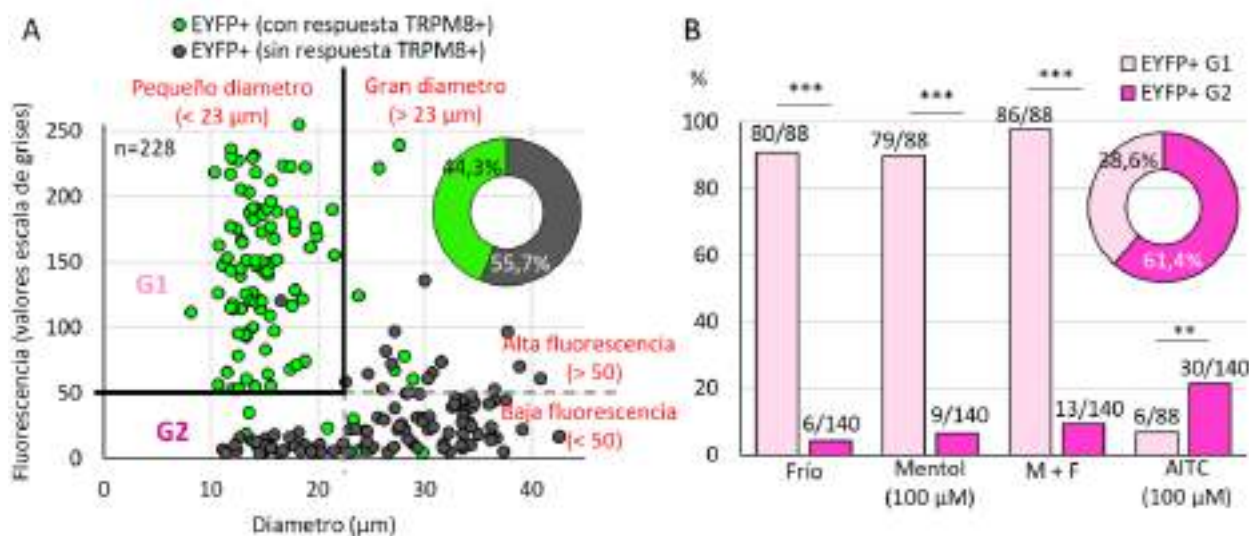


Figura 4.6 (A) Distribución en función del tamaño y fluorescencia de la población neuronal raquídea EYFP+ de la línea TRPM8-EYFP1 que se analizó en registros de imagen de fluorimetría de calcio con la sonda fura-2. Se representan en verde las neuronas que mostraron respuesta a los agonistas de TRPM8 (frío, mentol y/o la combinación de ambos) y en gris las que no. Se muestra su proporción en forma de porcentaje arriba a la derecha. (B) Cuantificación del número de neuronas EYFP+ representadas en A con respuesta a la aplicación de los estímulos indicados en forma de porcentaje. Se muestran por separado las neuronas clasificadas como de pequeño diámetro (< 23 μm) y alta fluorescencia (> 50) (G1) del resto (G2). El porcentaje que representa cada una de estas poblaciones se muestra en el gráfico situado arriba a la derecha. Se observa que las células identificadas funcionalmente como TRPM8+ pertenecen mayoritariamente a la población G1; así mismo, esta población muestra menos respuestas a AITC. Significancia estadística en el número de respuestas evaluadas por el test de Fisher.

En un estudio histológico reciente, realizado en el ganglio trigémino en esta misma línea transgénica, se describe que el $\approx 50\%$ de las neuronas de baja fluorescencia endógena co-expresan el marcador peptidérgico CGRP (Alcalde et al., 2018). Hemos ampliado este estudio a cortes tisulares de ganglios raquídeos a fin de mejorar la caracterización de estas neuronas. Los datos obtenidos han sido similares, detectándose co-expresión en el $48,3 \pm 4,9\%$ de las células marcadas; de ellas el $95,6 \pm 0,95\%$ fueron células de baja fluorescencia (<50 en el valor de la escala de grises). Dentro de la población G1, la colocación apenas llegó al 10%, mientras que en la G2 fue significativamente superior, aproximándose al 70% ($p < 0.001$, t-student para muestras no pareadas, $n=3$) (figura 4.7 A-D).

Es importante remarcar que, al igual que en el trabajo de Alcalde et al., la fluorescencia GFP evaluada fue la endógena de las neuronas en tejido, sin amplificar la señal por inmunofluorescencia. De este modo, la distribución de fluorescencia observada es muy similar



a la de las células en cultivo (figuras 4.6 A, 4.7 A y B, 4.8 C), lo que nos permite establecer un paralelismo entre poblaciones y afirmar que las neuronas de baja fluorescencia endógena que funcionalmente no responden a agonistas de TRPM8, son las que mayormente expresan CGRP.

Realizando una inmunodetección de GFP, el nivel de co-expresión aumenta un 10% tanto en la total ($59.8 \pm 5,6\%$) como en los grupos G1 y G2 (figuras 4.8 F-H); sin embargo, la distribución de fluorescencia detectada se ve alterada y difiere de la observada en cultivo (figura 4.7 C, 4.8 G), por lo que no podemos relacionar ambas poblaciones y es menos evidente la división poblacional de neuronas con y sin co-expresión de CGRP en función de su fluorescencia.

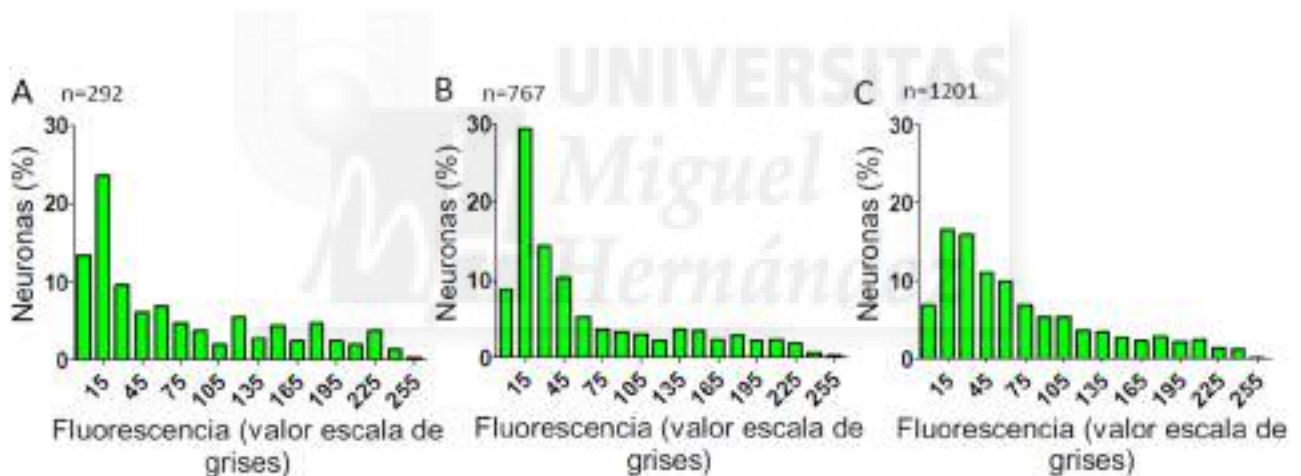


Figura 4.7 Distribución de neuronas raquídeas de la línea TRPM8-EYFP1 en función de su intensidad de fluorescencia expresado en forma de porcentaje. (A) Fluorescencia endógena exhibida en cultivo. (B) Fluorescencia endógena detectada en cortes histológicos. (C) Fluorescencia detectada en cortes histológicos tras realizar una amplificación inmunofluorescente de GFP.

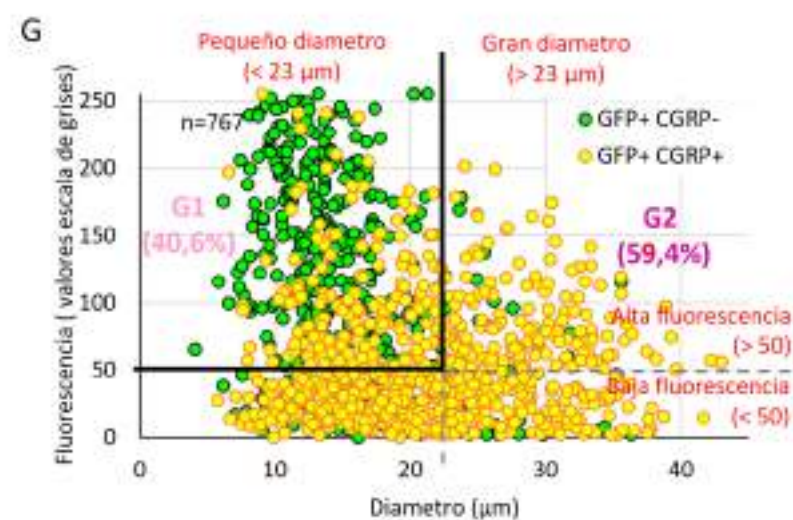
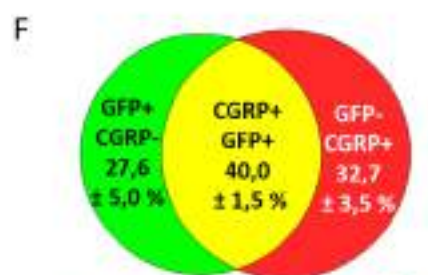
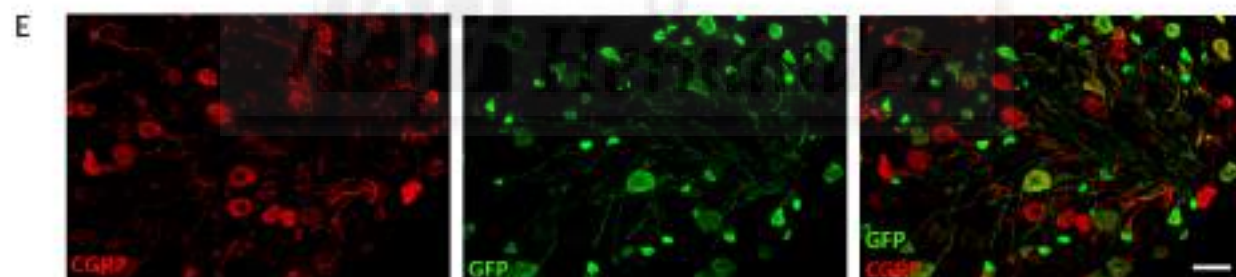
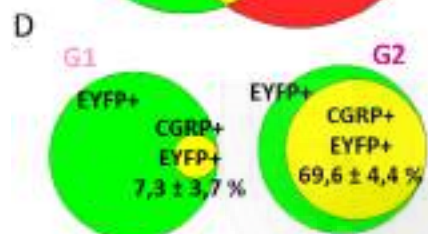
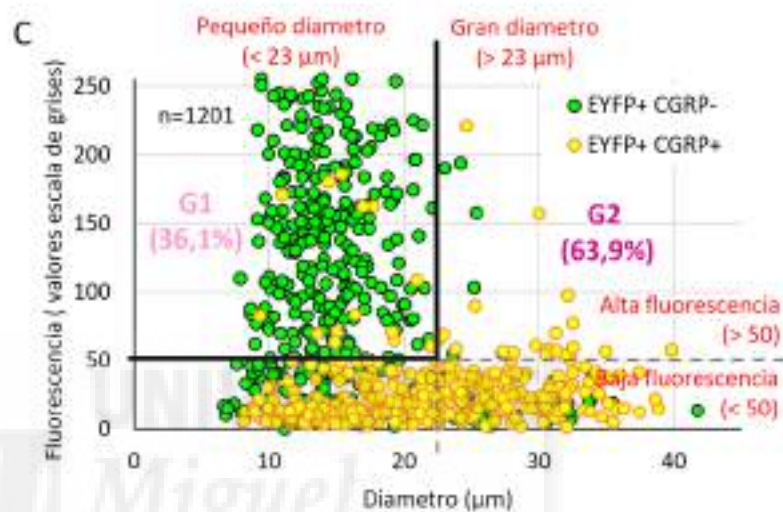
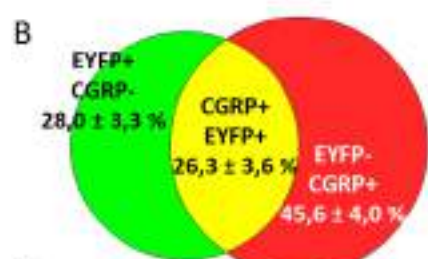
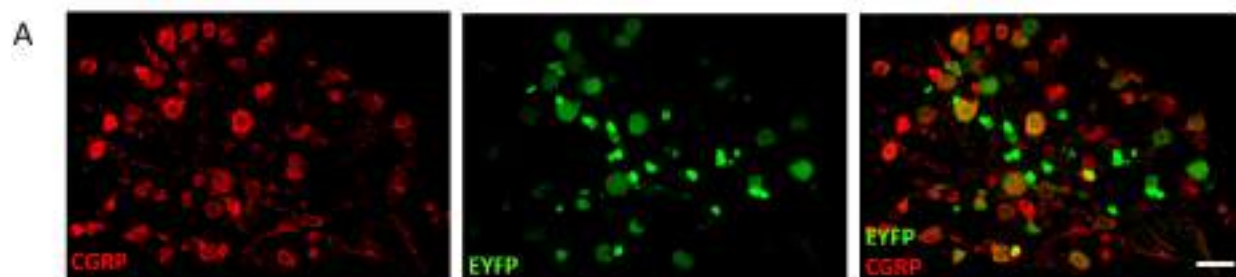




Figura 4.8 (A-D) Co-expresión de CGRP y EYFP en cortes de ganglios raquídeos (20 μm) en la línea TRPM8-EYFP1. (A) Imagen confocal representativa, en la que se observa la inmunodetección de CGRP (rojo) y la fluorescencia endógena de la proteína EYFP (verde). Barra de escala: 50 μm . (B) Cuantificación de la co-expresión en la población neuronal estudiada. (C) Distribución en función del tamaño y fluorescencia endógena de la población EYFP+ analizada. Se representan en amarillo las neuronas que también mostraron inmunorreactividad para CGRP. En rosa claro se muestra el porcentaje de neuronas clasificadas como de pequeño diámetro (< 23 μm) y alta fluorescencia (> 50) (G1) y en magenta el del resto (G2). (D) A la izquierda, porcentaje de neuronas que colocalizan con CGRP en la población G1, en el diagrama de la derecha se contabiliza el porcentaje de colocalización en G2. En B y D se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes. (E-H) Co-expresión de CGRP y EYFP, detectando esta última por inmunofluorescencia contra GFP, en iguales condiciones que A, B, C y D.

4.1.5 Línea TRPM8-EGFPf.

La línea TRPM8-EGFPf (Dhaka et al., 2007), al ser un modelo “knock in”, resulta muy interesante, pues de inicio se le presupone una mayor especificidad en la expresión génica. Además, nos permite trabajar con animales hemicigotos y homocigotos, éstos últimos sin expresión del canal, lo que resulta relevante de cara a la realización de experimentos comportamentales y/o fisiológicos.

El análisis funcional por imagen de calcio confirmó el correcto control genético al identificar por fluorescencia las neuronas raquídeas que expresan TRPM8, confirmando la ausencia de canal funcional en el ratón KO. Sin embargo, para una mayor caracterización del ratón, estudiamos la presencia del ARNm de TRPM8 mediante las técnicas de RT-PCR e hibridación “in situ” en estas neuronas. Así, se constató que en el animal homocigoto (EGFPf/EGFPf), KO de TRPM8, no se detectaba ARNm mientras que en sus hermanos silvestres y hemicigotos (EGFPf/+) su presencia se revelaba con facilidad (**figura 4.9 A y B**). Además, combinando las técnicas de hibridación “in situ” fluorescente e inmunofluorescencia de GFP, se consiguió colocalizar el ARNm de TRPM8 y la proteína GFP en los ratones TRPM8-EGFPf/+. La expresión detectada del mensajero en las células GFP+ fue muy alta, resultando positiva en el 97% de éstas. Por su parte el 73% de las neuronas que expresaban ARNm de TRPM8 presentaron inmunorreactividad a GFP (**figura 4.9C**).

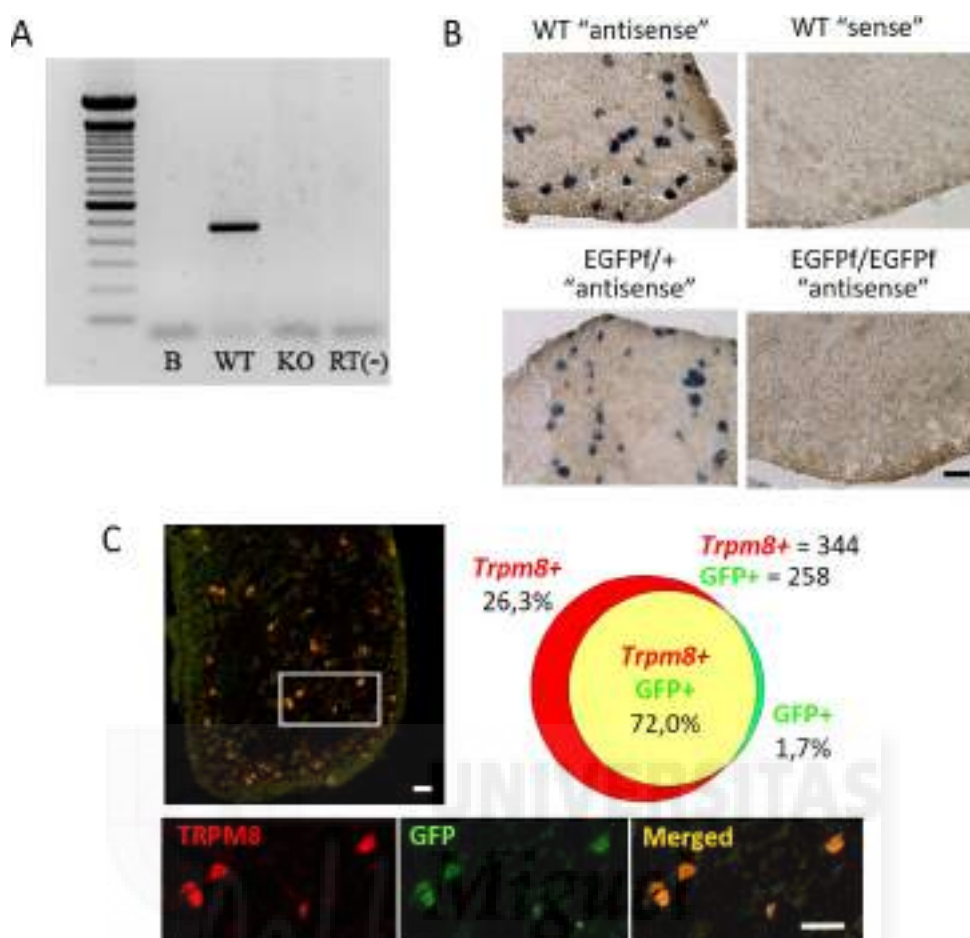


Figura 4.9 Detección de la expresión de *trpm8* en la línea TRPM8-EGFPf. (A) RT-PCR para el gen *trpm8* en ratones silvestres, también llamados "wildtype" (WT), y homocigotos (EGFPf/EGFPf). En animales EGFPf/EGFPf (KO) no se detecta expresión. B, control negativo de la PCR (sin muestra); RT(-), control negativo de la RT (muestra obtenida sin retrotranscriptasa). (B) Detección de ARNm de TRPM8 por hibridación "in situ" en cortes de ganglio trigémino de animales WT, hemicigotos (EGFPf/+) y (EGFPf/EGFPf). También se muestra un control negativo con la sonda "sense". En animales EGFPf/EGFPf no aparece marcaje. (C) A la izquierda, imagen confocal que muestra la detección de ARNm de TRPM8 por hibridación "in situ" revelada con fluorescencia (rojo), en combinación con inmunofluorescencia de GFP (verde). El detalle encuadrado aparece debajo, y muestra la buena colocalización celular de ambos marcajes. A la derecha, cuantificación de la colocalización. Grosor de cortes: 20 μ m. Barras de escala: 50 μ m.

Para finalizar, se aplicó un doble marcaje inmunohistoquímico para GFP y CGRP en cortes de ganglios raquídeos, con el fin de comparar el grado de co-expresión entre ambas proteínas, tal y como habíamos mostrado en la línea TRPM8-EYFP1.

A simple vista, el número de células detectadas con baja fluorescencia y gran tamaño fue muy baja en la línea TRPM8-EGFPf (figura 4.10 A), tal y como queda patente en la representación de la distribución en función del tamaño e intensidad de fluorescencia de las células con inmunorreactividad GFP (figura 4.10 C). Al cuantificar la co-expresión con el



marcador peptidérgico CGRP el porcentaje bajó hasta el $9,6 \pm 1,0$ % de la población total con marcaje GFP+, no obstante siguió siendo mayor en las células de baja fluorescencia ($91,6 \pm 0,8$ %) y prácticamente anecdótica en la población G1 ($2,7 \pm 0,8$ %) (figura 4.10 B y D). En contraposición, en la población G2 la colocalización fue significativamente superior, alcanzando un valor cercano al 60% ($p < 0,001$, t-student para muestras no pareadas, $n=3$) (figura 4.10 D).

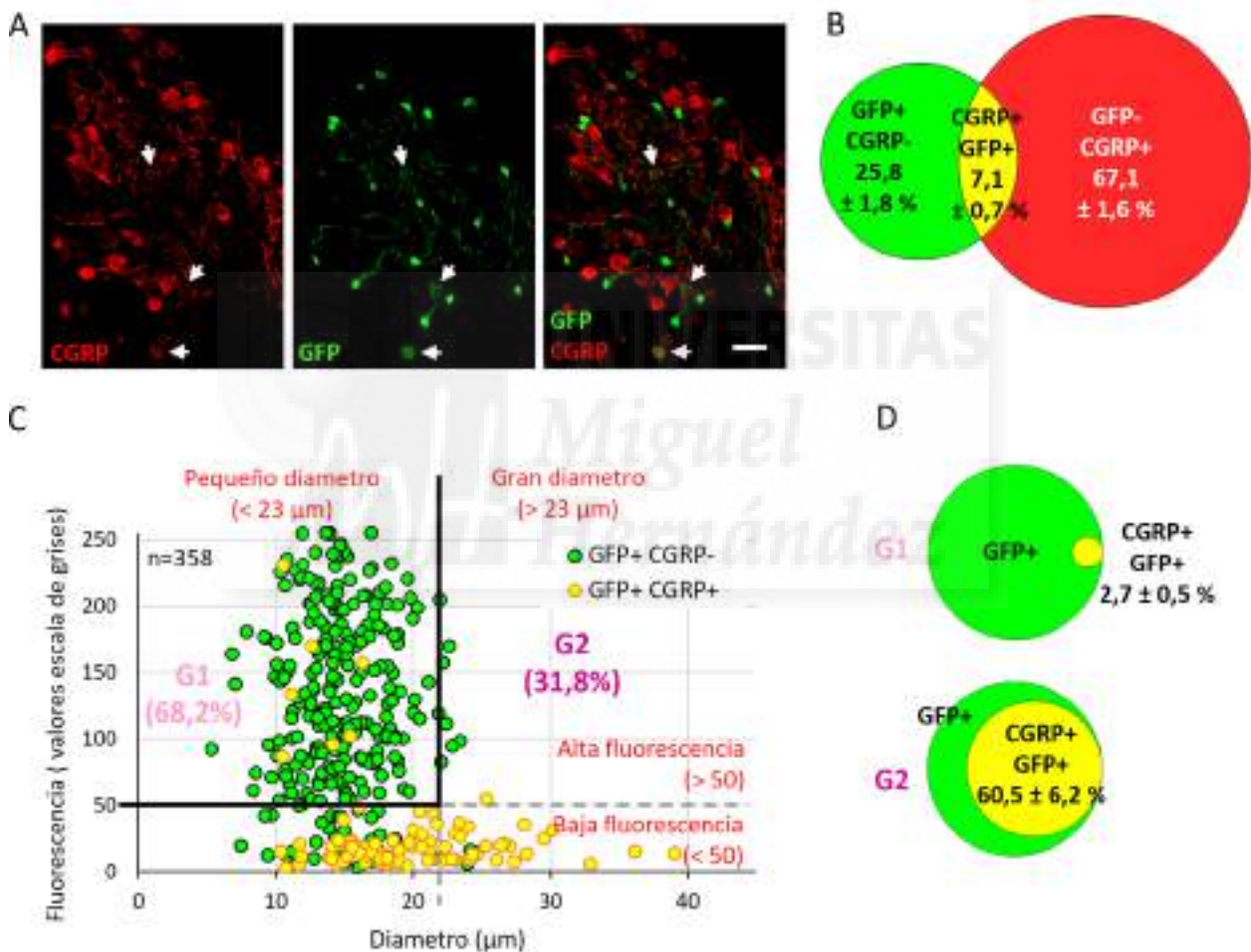


Figura 4.10 Detección de neuronas que expresan CGRP y GFP en el ratón homocigoto de línea TRPM8-EGFPf, en cortes de ganglios raquídeos ($20 \mu\text{m}$). (A) Imagen confocal representativa en la que se puede ver la doble inmunodetección de CGRP (rojo) y GFP (verde). Se indican con flechas algunas neuronas de baja fluorescencia detectadas. Barra de escala: $50 \mu\text{m}$. (B) Cuantificación de la co-expresión. (C) Distribución en función del tamaño y fluorescencia de la población GFP+ analizada. Se representan en amarillo las neuronas que también mostraron inmunorreactividad a CGRP. En rosa claro se muestra el porcentaje de neuronas clasificadas como de pequeño diámetro ($< 23 \mu\text{m}$) y alta fluorescencia (> 50) (G1) y en magenta el del resto (G2). (D) En el diagrama superior, porcentaje de neuronas que colocalizan con CGRP en la población G1, en el diagrama inferior se contabiliza el porcentaje de colocalización en G2. En B y D, se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.

Estos resultados, junto a los datos funcionales, parecen indicar que en el ratón TRPM8-EGFPf se logra marcar principalmente la población con altos niveles de fluorescencia detectada en la línea TRPM8-EYFP1 (población G1). Sin embargo, también se detecta parte de las neuronas pertenecientes a la población con bajos niveles de fluorescencia, las cuales co-expresan CGRP (población G2).

4.1.6 Línea TRPM8-DTR-GFP.

Como se ha mencionado, la fluorescencia exhibida por la línea TRPM8-DTR-GFP en cultivo es imperceptible y, en estas circunstancias, no hemos podido realizar un análisis funcional de las células DTR-GFP+ usando fluorometría de imagen de calcio. No obstante, sí es posible evaluar el efecto de la ablación de estas células de forma funcional, para constatar la desaparición de las neuronas que expresan TRPM8 y como afecta este hecho al resto de poblaciones neuronales.

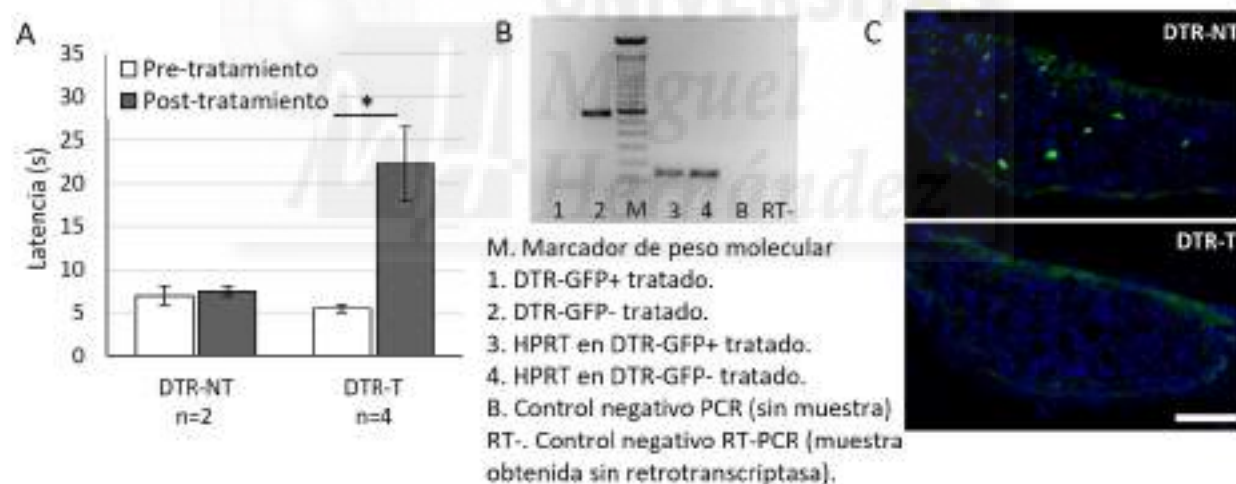


Figura 4.11 Métodos empleados para comprobar la efectividad del tratamiento con toxina diftérica en la ablación de las neuronas que expresan TRPM8 en la línea transgénica TRPM8-DTR-GFP. (A) Análisis de comportamiento en respuesta al test del hielo seco en animales DTR-GFP+ inyectados con toxina diftérica (DTR-T) o solución salina (DTR-NT). Diferencias evaluadas con el test de Student para muestras pareadas. (B) Análisis de expresión en ganglios raquídeos mediante RT-PCR. (C) Imágenes de microscopía confocal en que se muestra la detección inmunohistoquímica de células GFP+ en ganglio raquídeo de animales DTR-NT y DTR-T. Barra de escala: 100 μ m. Parte de estos resultados se han publicado en Reimúndez et al. (2018).

La eficacia del tratamiento con toxina diftérica en la eliminación de las células TRPM8+ también se comprobó utilizando otras metodologías: 1/ Test de comportamiento del hielo seco; se constató que los animales tratados presentaban un tiempo de latencia de la retirada

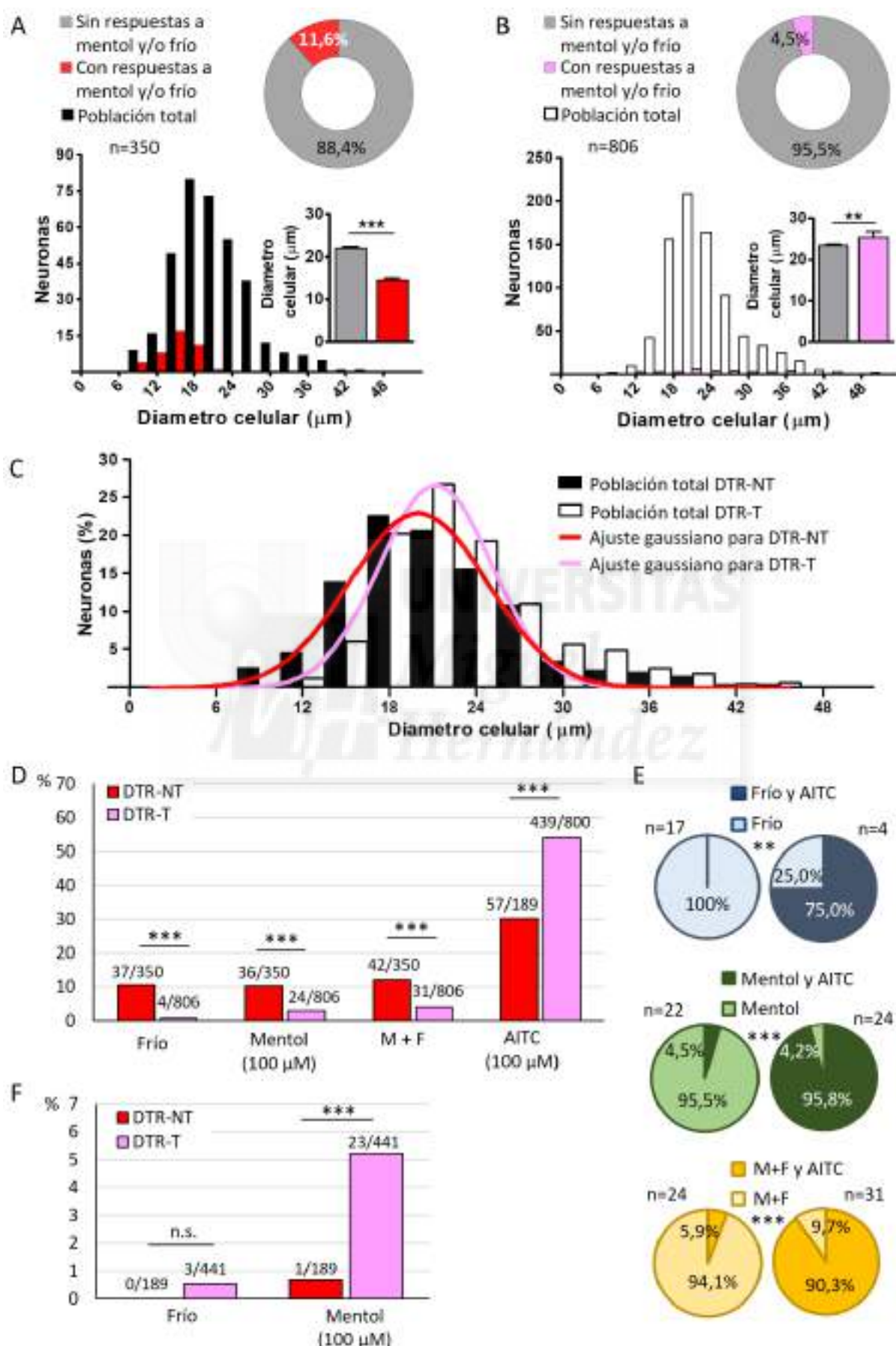


de la pata cuatro veces superior ante la aplicación de un estímulo frío, lo que revela un déficit sensorial en la percepción de bajas temperaturas (figura 4.11 A). 2/ Caracterización de la expresión de TRPM8; los ganglios sensoriales raquídeos de los animales tratados no contenían ARNm de TRPM8 (figura 4.11 B). 3/ Análisis inmunohistoquímico; estos animales tampoco mostraban neuronas reporteras fluorescentes en estos ganglios (8.7 ± 1.58 células GFP+/corte en ratones DTR-NT (n= 3); 0 ± 0 células/corte en ratones DTR-T (n= 4)) (figura 4.11 C).

El análisis funcional mediante experimentos de imagen de calcio con la sonda fura-2, se realizó en dos fases. Inicialmente, se utilizaron neuronas raquídeas en cultivo procedentes de ratones de 7-8 meses de edad que expresaban el receptor de toxina diftérica, pero sin haber sido tratados con la toxina (ratones DTR-NT). De este modo, se comprobó que sus neuronas sensoriales primarias exhibían la proporción de respuestas esperadas a los agonistas canónicos de TRPM8 (mentol, frío o ambos aplicados conjuntamente). Estas respuestas se circunscribieron mayoritariamente a neuronas de pequeño tamaño (figura 4.12 A). También se observó que las respuestas a frío, fueron bloqueadas total o parcialmente por la aplicación del antagonista BCTC en el 91,9 % de las neuronas estudiadas. Estas observaciones nos llevaron a concluir que estos ratones transgénicos poseen una población TRPM8+ que cumple con los estándares descritos en los ratones silvestres (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b).

Posteriormente, se trató un grupo de animales de las mismas características con toxina diftérica a fin de producir la ablación celular generalizada de las neuronas con expresión de TRPM8 (ratones DTR-T). El objetivo era realizar ensayos iguales a los anteriores una vez finalizado el tratamiento. Sin embargo, por problemas técnicos no se pudieron hacer los registros funcionales hasta 8 meses después del tratamiento, cuando los ratones alcanzaban los 16 meses de edad. Este es un factor a considerar a la hora de analizar y discutir los datos.

Tras estudiar las respuestas obtenidas en los animales DTR-T, observamos que el número de neuronas con respuesta a los agonistas testados para TRPM8 bajaron su proporción a más de la mitad, lo que indicaría que el tratamiento sólo fue parcialmente exitoso. Sin embargo, por un lado, el tamaño de las neuronas con respuesta se constató significativamente superior al de la población no funcional (figura 4.12 B), y por otro, en el perfil de la distribución por tamaño de la población estudiada mostró una menor proporción de neuronas de talla pequeña (figura 4.12 C).



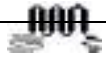


Figura 4.12 Caracterización funcional de neuronas raquídeas procedentes de animales TRPM8-GFP-DTR+ mediante imagen de fluorimetría de calcio con la sonda fura-2. (A y B) Recuento de neuronas con respuesta a agonistas de TRPM8 (frío, mentol o aplicación simultánea de ambos estímulos) en animales no tratados (DTR-NT) (A) y tratados (DTR-T) (B). Porcentaje en panel superior y valor medio y distribución de tamaño celular en panel inferior. Diferencias estadísticas evaluadas con el test de Student para muestras no pareadas. (C) Distribución del tamaño celular de la población total estudiada en animales DTR-NT y DTR-T expresada en forma de porcentaje. Se muestra el ajuste gaussiano de las mismas. (D) Cuantificación y comparación del número de respuestas obtenidas a los estímulos aplicados en neuronas procedentes de animales DTR-T y DTR-NT, expresado como porcentaje del total. (E) Porcentaje de neuronas que respondieron también a AITC en (D) (análisis realizado en un subgrupo de los experimentos de animales DTR-NT y en el total de los DTR-T). Diferencias estadísticas evaluadas con el test de Fisher. (F) Cuantificación de las neuronas que responden a frío o mentol en la población TRPA1+ (con respuestas a AITC) y TRPM8- (determinadas por la ausencia de respuestas a ambos agonistas de TRPM8, frío y mentol, en aplicación aislada), en ratones DTR-T y DTR-NT. Diferencias estadísticas evaluadas con el test de Fisher.

Además, comparando el perfil de las respuestas obtenidas, observamos que las respuestas a frío moderado tras el tratamiento prácticamente desaparecieron (<0,8%) mientras que las que persisten son las relacionadas con la aplicación de mentol ($\approx 4\%$) (figura 4.12 D, 4.13). Curiosamente, todas las neuronas que respondieron a mentol, excepto una, no respondieron a frío y viceversa, cuando normalmente la respuesta a ambos agonistas en las neuronas que expresan TRPM8 es la observación generalizada. De igual modo, analizando las respuestas a AITC, se vio que éstas estaban incrementadas en la población (figura 4.12 D), y que también eran mayoritarias en la población remanente con respuestas a frío y mentol (figura 4.12 E), lo que indicaría que están expresando TRPA1, en contraposición a lo que ocurría en animales no tratados. También se observó que entre las neuronas con expresión de TRPA1 (determinadas por responder a AITC) y sin expresión de TRPM8 (determinadas por no responder a ambos agonistas de TRPM8, frío y mentol, en aplicaciones aisladas), ahora había un incremento significativo de respuestas a mentol pero no a frío (figura 4.12 F).

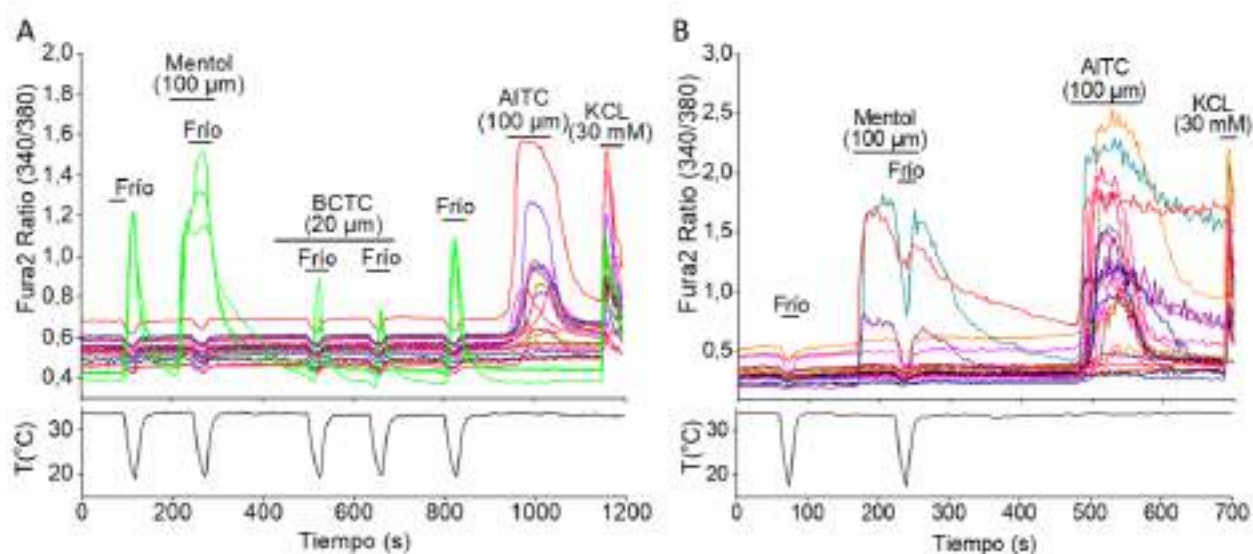


Figura 4.13 Curso temporal de las respuestas obtenidas en experimentos de imagen de calcio con la sonda fura-2 en cultivos de neuronas raquídeas procedentes de la línea TRPM8-DTR-GFP. Se muestran dos ejemplos representativos obtenidos en animales DTR-NT (izquierda) y DTR-T (derecha). Se han marcado en verde los trazos correspondientes a neuronas identificadas como TRPM8+; nótese su ausencia en los animales DTR-T.

4.2 Caracterización histológica extraganglionar en el ratón TRPM8-EYFP1.

En los ganglios sensoriales primarios es donde se detectan los mayores niveles de expresión de TRPM8, y ello ha propiciado su caracterización en esta ubicación con mayor detalle. Sin embargo, su expresión también se ha descrito en otros tejidos, aunque a un nivel bastante más modesto, lo que dificulta su análisis y explica la pobre caracterización existente en la literatura en relación a su expresión y función.

El análisis de un modelo transgénico que identifique el emplazamiento de la expresión extraganglionar de TRPM8 puede ser de gran ayuda para su estudio. Dado que la línea reportera TRPM8-EYFP1 presentaba los niveles de reportero más elevados, nos pareció el modelo más adecuado para realizar un estudio histológico generalizado e identificar células y fibras TRPM8+ en localizaciones periféricas. Para amplificar la señal de fluorescencia, hemos utilizado en todos los casos un anticuerpo anti-GFP. Este mapeo será útil para un posterior estudio pormenorizado de la función de TRPM8 en los distintos lugares en los que se expresa, y para definir su presencia en distintos circuitos neuronales.



4.2.1 Tejidos inervados por fibras con inmunorreactividad a GFP.

Tanto la superficie corporal como los órganos internos están inervados por terminaciones sensoriales. La función de TRPM8 en estas terminaciones está bien documentada a nivel cutáneo (Peier et al., 2002b; Schepers y Ringkamp, 2009; Milenkovic et al., 2014), demostrando ser fundamental dentro del circuito somatosensorial para la detección de las bajas temperaturas. De igual modo, TRPM8 también está presente en la inervación de otras estructuras expuestas al medio externo, y por tanto a variaciones térmicas, como la cavidad bucal y la córnea (Parra et al., 2010; Sato et al., 2013). Asimismo, se ha descrito su presencia en la inervación de algunos órganos internos, como por ejemplo la vejiga o ciertas vísceras (Harrington et al., 2011; Shibata et al., 2011). La señal amplificada del ratón TRPM8-EYFP1 nos permitió distinguir numerosas fibras con marcaje fluorescente en todos los tejidos mencionados, así como en otros que describiremos a continuación.

Las terminaciones sensoriales que inervan el tronco y las extremidades proceden mayormente de las neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos. En concordancia a la presencia de expresión de TRPM8 en ellos, hemos observado fibras con marcaje en la piel del ratón TRPM8-EYFP1. Estas fibras inervan tanto la dermis como la epidermis acercándose hacia la superficie cutánea donde acaban en forma de terminaciones libres; puntualmente, también se han podido observar algunas agrupaciones de fibras terminales en la dermis ([figura 4.14 A](#)). No se ha visualizado inervación con marcaje GFP+ en los folículos pilosos o en la microvasculatura.

Por otro lado, como indicaban los estudios previos que implican a TRPM8 en la inervación visceral, hemos encontrado un abundante marcaje axonal inmunofluorescente en la musculatura detrusora de la vejiga ([figura 4.14 B y C](#)), así como algunas fibras positivas en la musculatura del colón, el estómago ([figura 4.14 D](#)), y en la capa submucosa de la tráquea ([figura 4.16 D](#)).

Para finalizar con la inervación sensorial raquídea de neuronas con TRPM8, comentar que las aferencias sensoriales que llegan a la médula espinal procedentes de estas células, se han identificado claramente. La visualización en esta ubicación muestra un gran número de aferencias inmunofluorescentes que penetran en el asta dorsal, a través de las raíces sensitivas, en todos los segmentos medulares. Las terminaciones de dichas aferencias se

localizan en la parte más dorsal del asta, inervando principalmente la lámina I y parte de la lámina II, tal y como se ha descrito previamente (Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008; Knowlton et al., 2010). Exclusivamente, a la altura lumbar-sacra de la médula espinal hemos observado que algunas de estas fibras descienden hacia láminas más ventrales del asta dorsal, además de otras que discurren por la parte más dorsal del canal central, en la lámina X (figura 4.14 E).

La inervación sensorial de la cabeza es mayormente trigeminal y la participación de TRPM8 en ella se encuentra bien documentada (Peier et al., 2002b). De acuerdo a ello, hemos encontrado axones inmunofluorescentes en todos los tejidos estudiados a este nivel.

En primer lugar hemos analizado ubicaciones en contacto con el medio externo. Así, en la cavidad bucal hemos detectado inervación inmunofluorescente recorriendo el paladar; estas fibras discurren por la mucosa bucal, penetrando en el epitelio ocasionalmente (figura 4.14 F). En la cavidad nasal, la inervación positiva detectada se distribuye de manera similar, pues discurre por las capas submucosas, ingresando en la mucosa nasal de modo puntual (figura 4.14 G). Igualmente, algunas fibras se visualizaron atravesando la lengua; no obstante el marcaje más llamativo en este órgano se observó en las papilas gustativas fungiformes, donde las fibras terminales se ramifican rodeándolas sin llegar a penetrar en ellas (figura 4.14 I).

Por otra parte, en el ojo, hemos visualizado fibras positivas en la capa coroides, cuerpos ciliares y córnea. En esta última, la inervación fue más abundante; se distinguen unos troncos nerviosos con fibras inmunofluorescentes que entran en el tejido por la capa estromal de la córnea y que se dividen y ramifican desde la periferia hacia el centro. Las ramificaciones iniciales se producen de forma dicotómica hasta llegar a la zona subbasal del epitelio, donde los plexos nerviosos se ramifican de forma compleja y sus terminaciones libres penetran en el epitelio corneal para llegar hasta sus capas más superficiales (figura 4.14 J).

Igualmente, hemos estudiado la inervación de las meninges, tejido no expuesto al exterior. En ellas se observa un denso conjunto de aferencias positivas recorriendo los senos de la duramadre; siendo especialmente llamativas por su cantidad y fluorescencia las ubicadas en los senos transversales. Desde los senos se observan ramificaciones de las que salen fibras individuales que inervan el resto de la duramadre (figura 4.14 H).

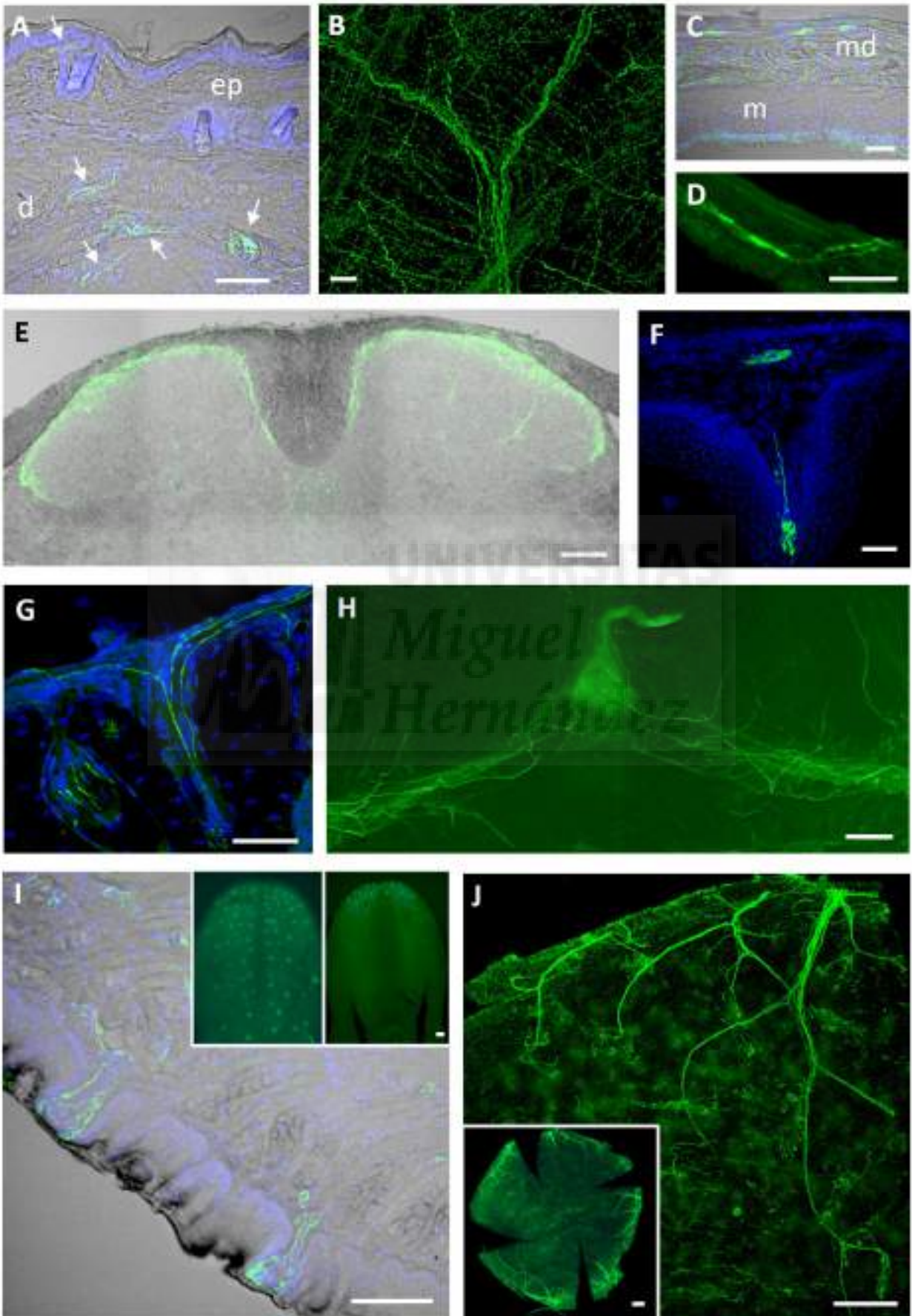


Figura 4.14 Detección de inervación inmunofluorescente en el ratón TRPM8-EYFP1 en diversos tejidos y órganos. (A) Terminaciones nerviosas en piel pilosa. Se indican con flechas fibras nerviosas marcadas a distintos niveles, tanto en la dermis (d) como en la epidermis (ep). (B y C) Inervación de la pared de la vejiga en una preparación en “whole mount” (B), y en un corte transversal en que se aprecia como el marcaje se restringe al músculo detrusor (md) que cubre la mucosa urinaria (m) (C). (D) Fibras nerviosas en la musculatura del colon. (E) Aferencias sensoriales en las astas dorsales de la médula espinal (zona lumbar-sacra). (F) Terminación nerviosa localizada en el paladar. (G) Fibras axonales inervando la cavidad nasal. (H) Inervación axonal de las meninges. (I) Terminaciones nerviosas cerca de la superficie de la lengua y alrededor de las papilas fungiformes. En miniatura se muestra la superficie de la lengua, vista ventral a la izquierda, dorsal a la derecha. (J) Terminaciones nerviosas en la córnea. En miniatura se muestra la córnea completa. Imágenes de microscopía confocal, excepto F y miniatura de la lengua, que es epifluorescencia. Barra de escala: 25 μm (D), 50 μm (A, B, C, E, F, I), 100 μm (G), 200 μm (J) y 500 μm (H).

La influencia de TRPM8 en el tono vascular periférico como mecanismo termorregulador se ha descrito previamente (revisado por Señarís et al., 2018). En este contexto, decidimos estudiar con más detalle la inervación sensorial de los principales vasos sanguíneos de la cola del ratón TRPM8-EYFP1. Así, hemos detectado fibras positivas en la periferia de los principales vasos sanguíneos que inervan la cola, contactando íntimamente con ellos ([figura 4.15 A](#)). Del mismo modo, hemos verificado la existencia de marcaje inmunofluorescente en fibras nerviosas que rodean la pared de los principales vasos sanguíneos que irrigan el organismo, como son la arteria aorta y las venas cava, pulmonar y porta ([figura 4.15 B-E](#)). En general, las fibras en estas ubicaciones muestran una buena colocalización con CGRP lo que podría indicar la participación de este neuropéptido en el tono vascular.

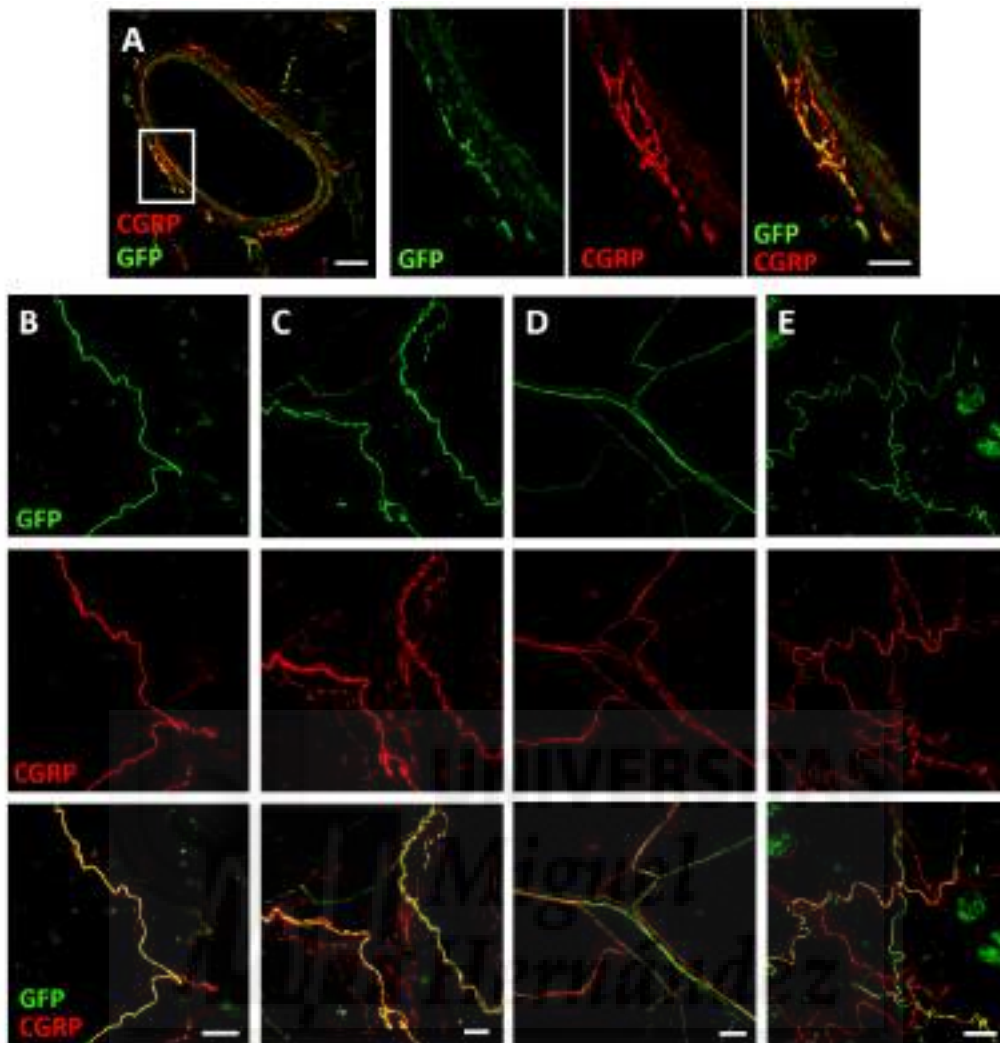


Figura 4.15 Colocalización de fibras GFP+ con CGRP en vasos sanguíneos. (A) Inervación de la vena lateral de la cola. El detalle encuadrado se muestra a la derecha. (B-E) Inervación de la pared vascular del (B) arco aórtico, (C) vena cava, (D) vena pulmonar, y (E) vena porta. Barras de escala: 25 μ m, excepto el detalle (A) que son 10 μ m. Parte de estos resultados se han publicado en Reimúndez et al. (2018) y Señarís et al. (2018).

4.2.2 Detección de expresión de GFP en células de tejidos extraganglionares.

Además de las neuronas sensoriales y la inervación TRPM8+ ya mencionada en los apartados anteriores, también hemos encontrado somas de neuronas extraganglionares, y células no nerviosas, con inmunorreactividad GFP. La expresión de TRPM8 en algunos de los órganos que las albergan ya ha sido descrita con anterioridad por otros autores, y por ello nos sirven de controles positivos en nuestro estudio; así ocurre, por ejemplo, en el testículo o las vías aéreas. Pero además, nosotros hemos encontrado células con expresión de TRPM8 en otras ubicaciones como en la retina, el sistema digestivo y el sistema nervioso central.

El marcaje encontrado en el testículo, se corresponde con el descrito previamente en la literatura, al igual que en los espermatozoides (De Blas et al., 2009; Borowiec et al., 2016). Así, en este órgano, en el ratón TRPM8-EYFP1, hemos observado un fuerte marcaje celular fluorescente en el interior de los tubos seminíferos, concretamente en su zona más central, en contacto con la luz seminal. Por su ubicación, el marcaje se correspondería con células en estado de espermatocito o espermatida (figura 4.16 A). Los espermatozoides también presentaron marcaje tanto en el flagelo como en la cabeza, aunque esta última parte se observa bastante más tenue (figura 4.16 B).

De igual modo, en la cavidad nasal y las vías aéreas también se visualizó expresión del reportero acorde a lo indicado por otros autores (Keh et al., 2011; Liu et al., 2013a). A nivel nasal, la histología realizada en el ratón TRPM8-EYFP1 reveló la presencia de marcaje fluorescente únicamente en el epitelio respiratorio (figura 4.16 C). A lo largo de la vía aérea detectamos inmunorreactividad en la mucosa traqueal (figura 4.16 D) y en el interior de los pulmones, concretamente en el epitelio de los bronquiolos (figura 4.16 E) y epitelio alveolar (figura 4.16 F). También hemos visualizado algunas células aisladas de gran tamaño en la médula espinal; aparecen exclusivamente a la altura lumbar-sacra y se sitúan en el asta ventral, cerca del borde con la sustancia blanca (figura 4.16 G). Un marcaje similar fue descrito por Mandadi et al. (2009) usando otro ratón reportero.

Atendiendo a los marcajes novedosos, hemos localizado algunas células aisladas inmunofluorescentes en la pared del colón y del estómago (figura 4.16 H) que podrían pertenecer al sistema nervioso entérico. Sorprendente ha sido el caso de la retina, donde hemos encontrado un abundante marcaje celular inmunofluorescente en la capa nuclear interna y en la capa de las células ganglionares, no descrito previamente; la organización de estas células es ordenada, pues sus proyecciones se agrupan claramente en tres plexos nerviosos en la capa plexiforme interna, lo que indicaría que tienen características comunes, y que forman parte de una o varias subpoblaciones concretas (figura 4.16 I). El cerebro también ha sido estudiado en detalle, identificando ciertas poblaciones en las que parece restringirse la expresión de TRPM8, principalmente ubicadas en hipotálamo anterior, septum y tálamo. Tanto de la retina como del cerebro hablaremos con más detalle en los siguientes apartados.

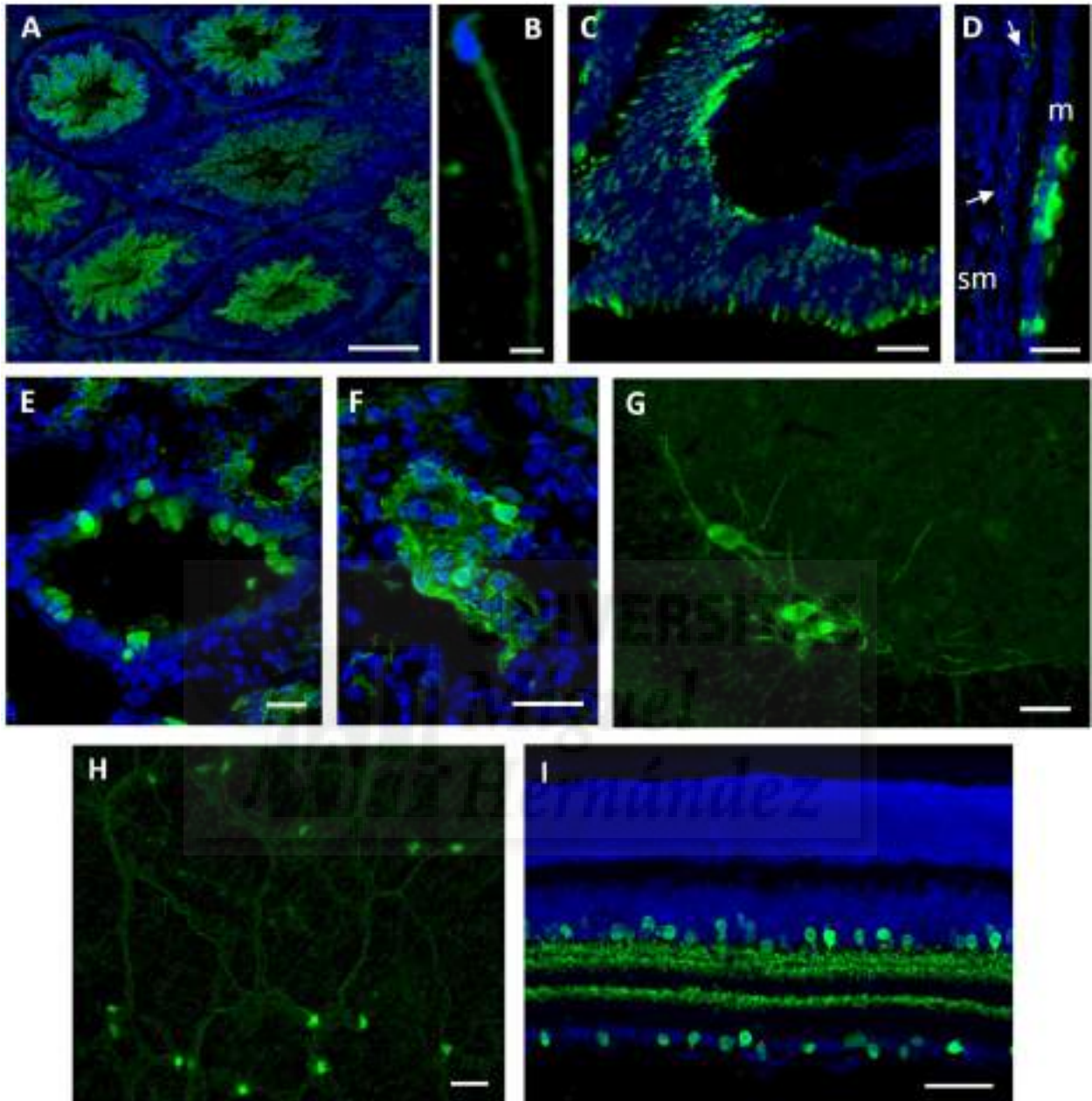


Figura 4.16 Expresión inmunofluorescente de GFP localizada en distintos tejidos y órganos del ratón TRPM8-EYFP1. (A) Células germinales fluorescentes en estado de espermatidas y espermatocitos en el testículo. (B) Espermatozoide. (C) Células en el epitelio olfativo. (D) Células en la mucosa traqueal (m). También se indica con flechas invasión fluorescente en la capa submucosa (sm). (E) Corte transversal de un bronquiolo en que se visualizan células recubriendo la superficie interna de la vía aérea. (F) Células marcadas en el epitelio alveolar. (G) Células de gran tamaño localizadas en el borde del asta ventral de la médula espinal a nivel lumbar-sacro. (H) Visualización en “whole mount” de una porción de la pared del estómago en la que se aprecian células marcadas. (I) Células ubicadas en la capa nuclear interna y en la capa ganglionar de la retina, sus proyecciones axonales conforman tres plexos en la capa plexiforme interna. Imágenes de microscopía confocal. Barra de escala: 5 μ m (B), 25 μ m (D, E, F), 50 μ m (A, C, G, H, I).

4.3 Estudio del canal iónico TRPM8 en el cerebro.

Algunos estudios previos han mostrado la existencia de expresión de TRPM8 en cerebro (Kunert-Keil et al., 2006; Mittag et al., 2013; Voronova et al., 2013; Wang et al., 2017; Bräunig et al., 2018). Sin embargo, hasta el momento, no se ha realizado un estudio sistemático que muestre la ubicación del canal en áreas y núcleos cerebrales concretos.

4.3.1 Expresión de TRPM8 en cerebro

Para constatar la existencia de expresión de TRPM8 en el SNC, se detectó la presencia de ARNm por RT-PCR. Para ello, se utilizó una muestra de hipotálamo de ratón. Se seleccionó esta área, porque en ella se han descrito previamente neuronas termosensibles al frío (Boulant y Dean, 1986), posible papel funcional que TRPM8 podría desempeñar a este nivel. Además, puesto que los valores de expresión esperados serían muy bajos, como parece indicar la bibliografía (Kunert-Keil et al., 2006; Voronova et al., 2013), pensamos que en este emplazamiento serían superiores a otras zonas del cerebro.

La amplificación obtenida dio lugar a una banda del tamaño esperado tanto en ganglio trigémino, utilizado como control positivo, como en hipotálamo. Sin embargo, fue evidente la diferencia de intensidad de marcaje existente entre ellas, indicando que los niveles de expresión de TRPM8 en hipotálamo son mucho más bajos que en trigémino (figura 4.17). Estos resultados replican otros datos obtenidos por miembros del grupo por qPCR, en los que se cuantifica que la expresión en trigémino es ≈ 240 veces superior que en hipotálamo.

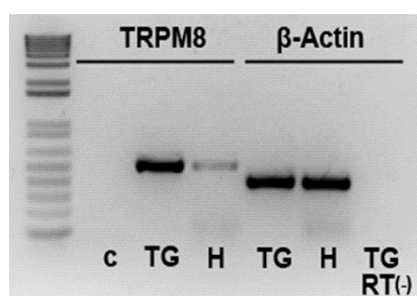


Figura 4.17 Expresión de TRPM8 detectada mediante RT-PCR en hipotálamo (H) y ganglio trigémino (TG) de ratón adulto. Nótese la diferencia de intensidad entre las bandas. Para la detección de *trpm8* en trigémino se utilizaron 0,5 μ l de ADNc en contraposición a los 3 μ l que se utilizaron en hipotálamo (reacción de retrotranscripción realizada con 2 μ g de RNA). Para el control de β -actina se añadió 1 μ l de ADNc. B: control negativo de la PCR (sin muestra). RT(-): muestra obtenida sin retrotranscriptasa.



Por otro lado, se aplicó la técnica de hibridación “in situ” para ubicar anatómicamente el ARNm detectado. Inicialmente se probaron ribosondas de pequeño tamaño (200-550 bases), habitualmente utilizadas en este tipo de detecciones. Sin embargo, a pesar de que en los ganglios sensoriales primarios se obtenía un claro y robusto marcaje en el cerebro no se consiguieron resultados positivos, ni siquiera aumentando los tiempos de revelado a una semana (datos no mostrados). Posteriormente, se optó por usar una ribsonda de gran tamaño (3,3 Kb), que abarcaba gran parte de la longitud total del ARNm de TRPM8, y se aplicó el protocolo descrito por Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser (1993) optimizado para detectar transcritos de baja expresión. De esta forma se consiguió aumentar la sensibilidad de la técnica y visualizar algunos núcleos con marcaje, principalmente localizados en el hipotálamo anterior, septum y tálamo.

Estos experimentos se realizaron en animales a edad P15, para reducir el fondo, y los resultados fueron comparados con el patrón de inmunofluorescencia de GFP obtenido en la línea transgénica reportera de ratón TRPM8-EGFPf a la misma edad, y posteriormente, en el adulto. Escogimos esta línea para hacer la comparativa por la buena relación entre marcaje y expresión funcional determinada en los primeros apartados de este trabajo; también, por resultar un excelente trazador axonal de TRPM8, que nos permitiría estudiar las proyecciones de estas neuronas hacia otras áreas. En paralelo, determinamos el marcaje GFP en la línea TRPM8-EYFP1 para también contrastar su patrón, pues a su alto nivel de fluorescencia, parece facilitar la detección celular TRPM8+ en el caso de neuronas con bajos niveles de expresión.

4.3.2 Distribución anatómica del canal TRPM8 en el cerebro de ratón

Se realizó un estudio comparativo sistemático de la distribución del ARNm de TRPM8 en ratones WT y de la inmunorreactividad GFP detectada en ambos modelos reporteros de ratón, en el cerebro y tronco cerebral. Para ello se utilizaron animales de ambos sexos indistintamente.

4.3.2.1 Telencéfalo

El septum lateral (LS) fue el primer emplazamiento en que localizamos la expresión de TRPM8. Células que contenían ARNm o inmunorreactividad GFP se detectaron en su parte

rostral (LSr) y caudal (LSc), pero no en su parte ventral (LSv) (figura 4.18, tabla 4.4). En el LSc algunas de las células positivas se localizaron muy cerca de la pared del ventrículo lateral (LV) extendiendo sus axones hacia la capa de las células ependimales (figura 4.18 A, B1-D1). Asimismo, las células positivas del LSr situadas más medialmente, se ubicaron rodeando a las células colinérgicas (ChAT) y parvalbúmina (PV) localizadas en el septum medial (MS) (figura 4.18 E-F).

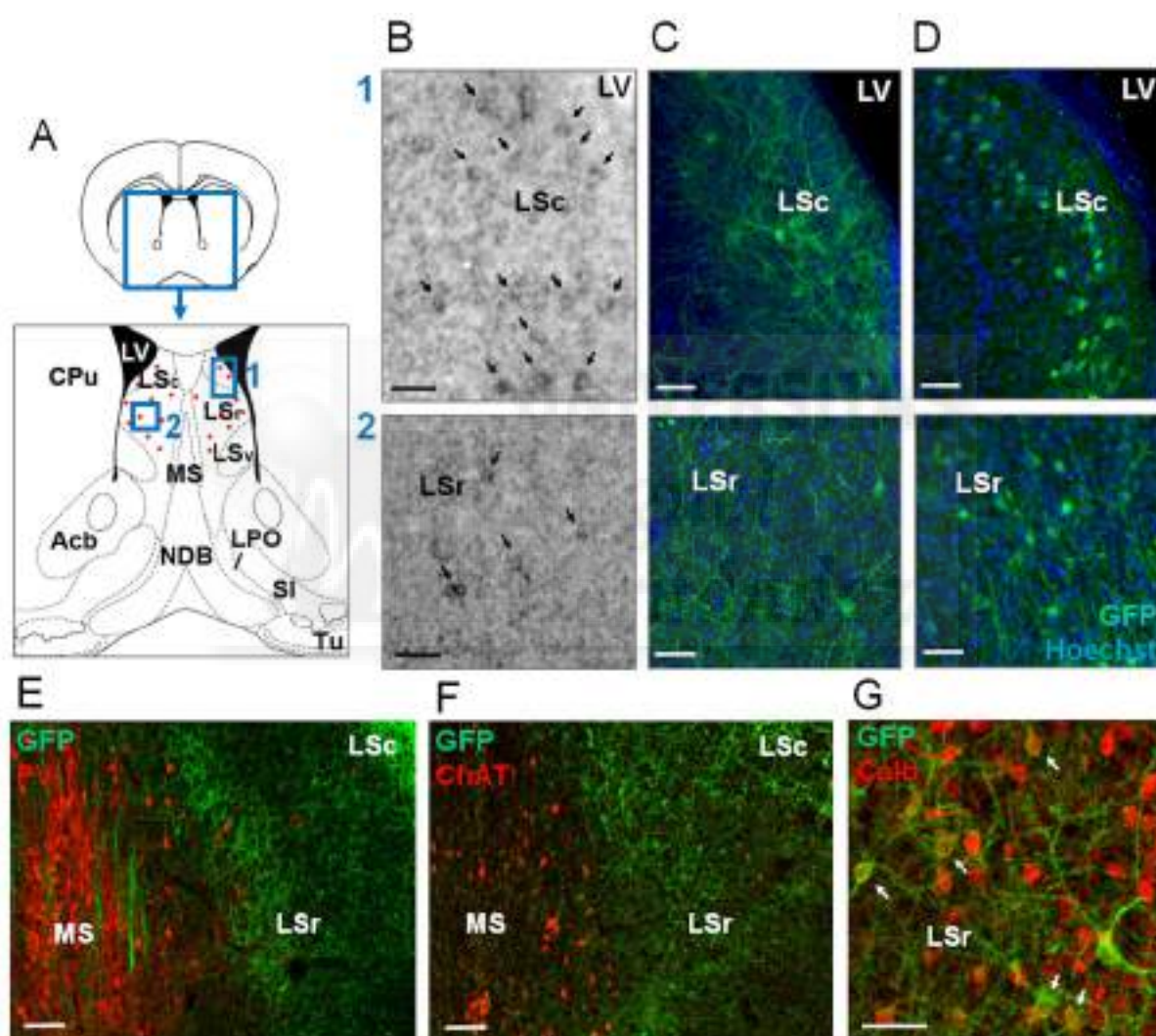


Figura 4.18 Expresión de TRPM8 en el núcleo lateral del septum (LS) de ratón. (A) Esquema de una sección coronal de cerebro de ratón a nivel del septum, en la que se representa con puntos rojos la ubicación de las células que mostraron expresión de ARNm o inmunorreactividad para GFP. Las localizaciones indicadas por los cuadros azules numerados como 1 y 2 se muestran en los paneles situados a la derecha. (B) Células con expresión de ARNm de TRPM8 detectadas por hibridación “in situ” indicadas con flechas negras. (C y D) Imágenes de microscopía confocal en las que se observa el marcaje de las líneas transgénicas de ratón TRPM8-EGFPf (C) y TRPM8-EYFP1 (D). (E-G) Detección inmunohistoquímica doble para la detección de GFP (verde) en combinación con PV (E), ChAT (F) y Calb (G) (rojo) en la línea TRPM8-EGFPf. La co-expresión de GFP y Calb se indica con flechas. Barras de escala: 50 μm (B-D, G) y 100 μm (E y F).



Para conseguir una mejor caracterización molecular de estas células, realizamos una doble inmunofluorescencia para GFP y GABA en la línea TRPM8-EGFPf, ya que el tipo neuronal más abundante de esta localización es GABAérgico. Sin embargo, al igual que otros autores indicaron previamente (Zhao et al., 2013), obtener un inmunomarcaje adecuado para GABA es difícil debido a la mala calidad de los anticuerpos existentes, y por ello, sólo conseguimos constatar que el $13,3 \pm 6,4$ % de las células GFP+ localizadas en el LS también expresaban este marcador.

Ante los pobres resultados obtenidos con el anticuerpo anti-GABA, decidimos analizar la expresión de calbindin-D28k (Calb). Este marcador identifica un subtipo de células GABAérgicas localizadas en el LS, y los anticuerpos disponibles para su inmunodetección son sensibles y específicos (Celio, 1990; Risold y Swanson, 1997; Lüttgen et al., 2005). Este doble marcaje se verificó en el $13,6 \pm 1,5$ % de las células con inmunorreactividad GFP identificadas; sin embargo las células GFP+ ubicadas en el LSr medial no mostraron colocalización, mientras que las ubicadas más lateralmente exhibieron co-expresión en el $68,6 \pm 7,0$ % de las células visualizadas (figura 4.18 G). Estos datos sugieren que las células que expresan TRPM8 en el LS no constituyen una población homogénea.

Otra ubicación en la que también observamos células con ARNm de TRPM8 y células con inmunorreactividad a GFP fue en la parte más anterior del núcleo preóptico lateral (LPO) y en la “substantia innominata” (SI). El marcaje se situó bordeando las neuronas que expresan ChAT y PV dentro del complejo conformado por el MS y el núcleo de la banda diagonal (NDB), aunque sin llegar a colocalizar con ellas (figura 4.19, tabla 4.4). Aunque no se encontraron células positivas en el complejo MS-NDB, si se visualizaron fibras inmunorreactivas para GFP discurriendo a lo largo de esta estructura (tabla 4.4).

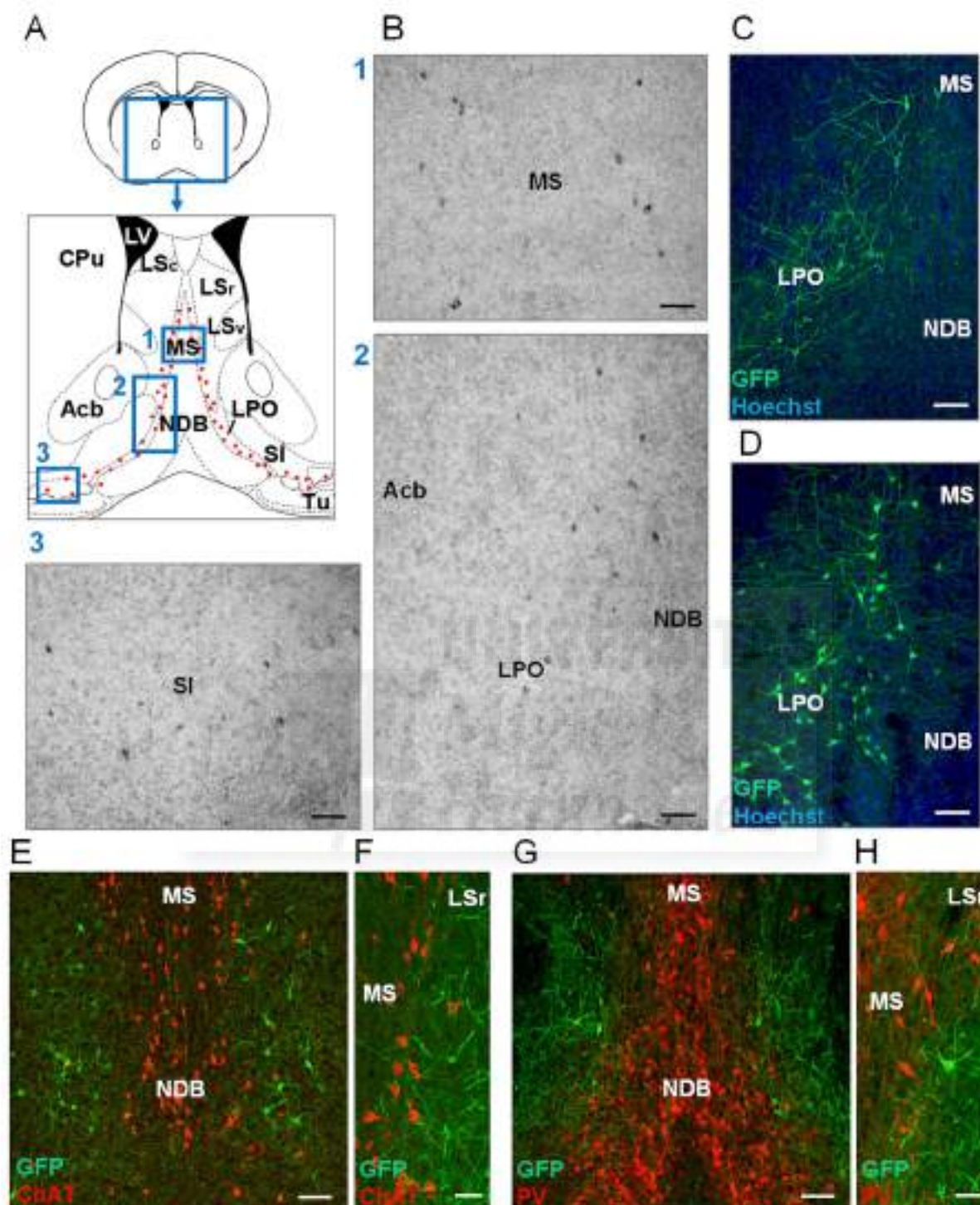
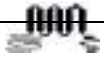


Figura 4.19 Expresión de TRPM8 en el área lateral anterior preóptica (LPO) y en la “substantia innominata” anterior (SI) de ratón. (A) Esquema descriptivo de la ubicación de la expresión de TRPM8 representada por puntos rojos. (B, 1-3) Células que expresan ARNm de TRPM8 localizadas en los 3 cuadros azules representados en el panel A. (C y D) Imágenes de microscopía confocal en las que se muestra el marcaje fluorescente detectado en las líneas transgénicas de ratón TRPM8-EGFPf (C) y TRPM8-EYFP1 (D). (E-H) Doble detección inmunohistoquímica de GFP (verde) en combinación con ChAT (E-F) y PV (G-H) (rojo) en la línea TRPM8-EGFPf. Barras de escala: 100 μ m (B-E, G) y 50 μ m (F y H).



Igualmente, en otras áreas del telencéfalo se identificaron células GFP+, aunque, no se consiguió una clara detección de ARNm de TRPM8, probablemente por estar trabajando en el límite de detección de la señal de hibridación “in situ”. Estas áreas incluyen partes del córtex cerebral como son la corteza olfatoria, corteza piriforme, tenia tecta y corteza entorrinal (figura 4.20 A, B1-B4, B8; tabla 4.4), y también el núcleo endopiriforme, hipocampo y “pallidum” ventral (figura 4.20 A, B5-B6, B9; tabla 4.4). En el hipocampo el marcaje fluorescente mayormente se restringió a fibras y algunos somas dispersos localizados en la capa de las células piramidales del subiculum y la división CA1, concretamente en su parte ventral y la zona más caudal de su parte dorsal (figura 4.20 A, B9; tabla 4.4).

En la amígdala observamos numerosas fibras GFP+, especialmente en los núcleos lateral, basolateral y central (figura 4.24 E), pero apenas detectamos somas marcados. Igualmente, en la línea TRPM8-EGFPf en las cortezas retrosplenial y cingular identificamos algunas fibras positivas, aunque en la línea TRPM8-EYFP1 además se visualizaron algunos somas diseminados (figura 4.24 J). Asimismo, constatamos la presencia de algunas células fluorescentes dispersas en la corteza prefrontal de ambas líneas, principalmente en el orbital y en las áreas prelímbicas (tabla 4.4).

4.3.2.2 *Diencefalo*

En el hipotálamo, la mayoría de las células positivas estaban localizadas en la región preóptica. Así, rodeando la parte más anterior del tercer ventrículo, observamos células GFP+ en la parte más lateral del núcleo preóptico ventromedial (figura 4.20 A, B7), aunque en esta ubicación no se detectó ARNm de TRPM8. Más caudalmente, células con inmunorreactividad GFP y señal positiva de “in situ” se detectaron en neuronas del área preóptica medial (MPO), núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) y LPO, al igual que en la zona de la SI (figura 4.21 A-D). Las células marcadas rodean a las células colinérgicas del NDB y a las células con expresión de PV localizadas en el núcleo preóptico magnocelular (MCPO) (figura 4.21 E-F); sin embargo, no vimos colocalización con estos marcadores en ninguna ubicación del hipotálamo o de la SI.

También se detectaron algunas células positivas para GFP en la parte anterior del núcleo arcuato y en el área hipotalámica lateral; aunque en estos lugares no obtuvimos una señal clara de ARNm de TRPM8 (tabla 4.4).

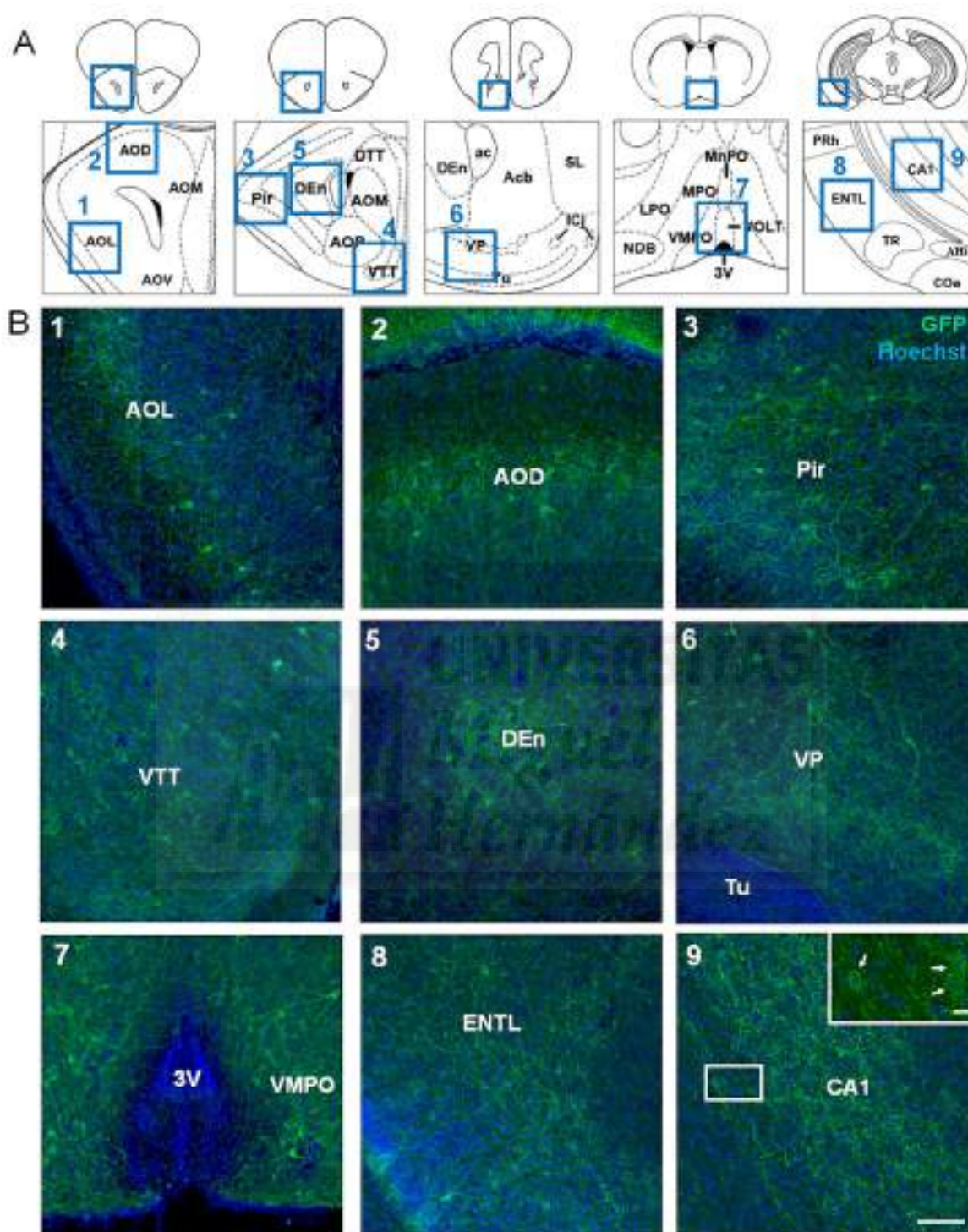


Figura 4.20 Áreas con neuronas marcadas en la línea transgénica de ratón TRPM8-EGFPf en las que no se ha detectado ARNm de TRPM8. (A) Diagramas de cortes coronales del cerebro de ratón a distintas alturas en los que se representa mediante puntos rojos la localización de células GFP+. (B) Imágenes de microscopía confocal de las células GFP+ encontradas en las regiones indicadas por los cuadros azules numerados en A: (B1-2) Núcleo anterior olfatorio (se muestran la parte lateral (AOL) y dorsal, (AOD)), (B3) corteza piriforme (Pir), (B4) tenia tecta ventral (VTT), (B5) núcleo endopiriforme dorsal (DEn), (B6) “pallidum” ventral (VP), (B7) núcleo preóptico ventromedial (VMPO), (B8) corteza entorrinal lateral (ENTL), (B9) área CA1 del hipocampo, parte ventral (CA1). Barras de escala: 50 µm; detalle en B9, 10 µm.

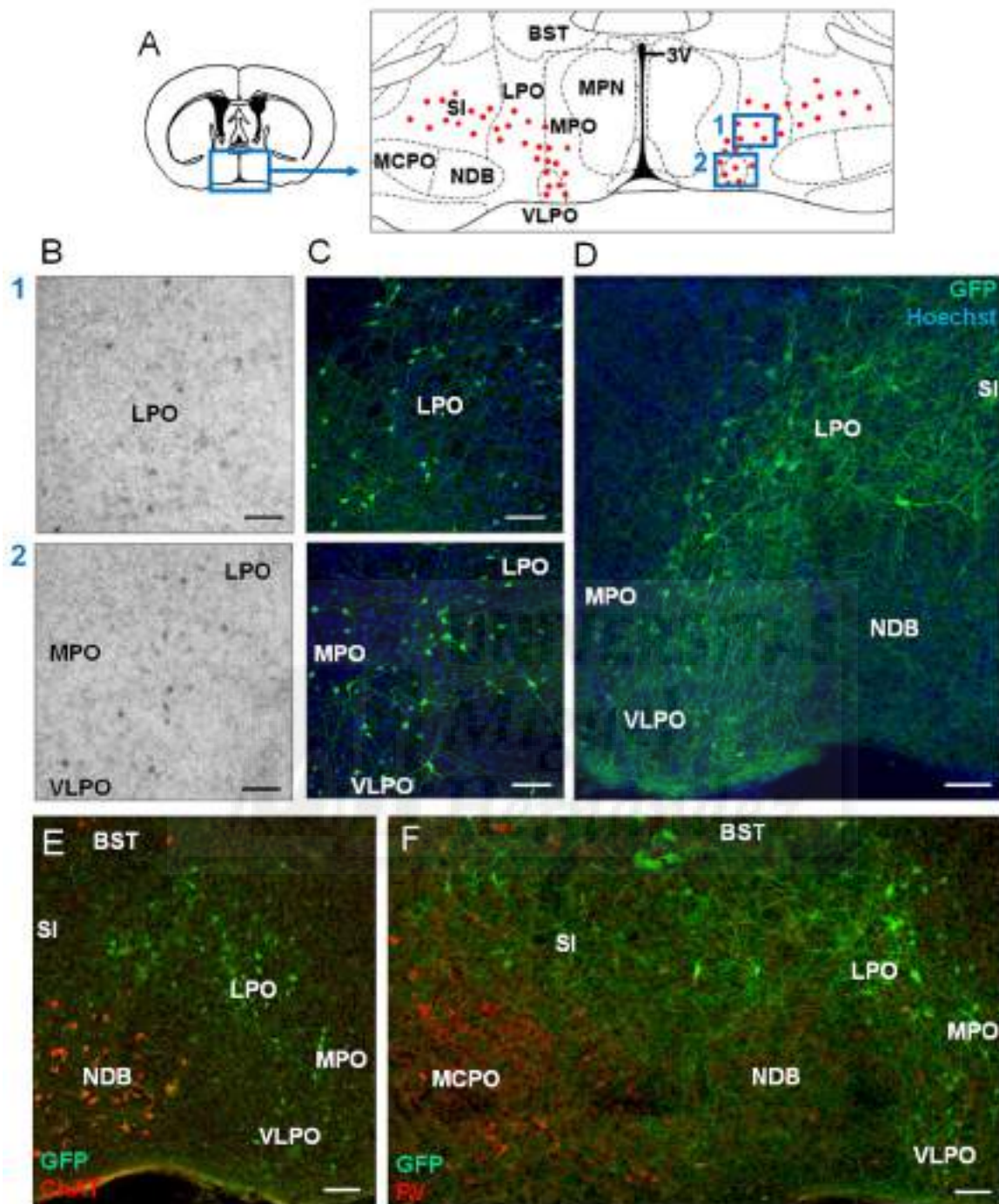


Figura 4.21 Expresión de TRPM8 en el área preóptica del hipotálamo (POA) en ratón. (A) Esquema ilustrativo en el que se localiza la expresión de TRPM8 identificada, representada mediante puntos rojos, en un corte coronal de cerebro de ratón. Las células positivas encontradas en las ubicaciones representadas por los cuadros azules 1 y 2, se muestran inmediatamente debajo (B-D). (B) Señal detectada por hibridación “in situ”. (C-D) Imágenes de microscopía confocal en las que se muestra el marcaje detectado por inmunohistoquímica en las líneas transgénicas de ratón TRPM8-EYFP1 (C) y TRPM8-EGFPf (D). La imagen mostrada en D es una vista general del área representadas por los cuadros azules ubicados en A. (E-F) Doble detección inmunohistoquímica de GFP (verde) en combinación con ChAT (E) o PV (F) (rojo) en la línea transgénica de ratón TRPM8-EGFPf. Barras de escala: 100 μ m.

Además del marcaje celular descrito, observamos numerosas fibras con inmunorreactividad GFP ampliamente distribuidas por el hipotálamo, estando presentes en diversas ubicaciones como el núcleo preóptico medial, el núcleo supraóptico y paraventricular, el área retroquiasmática, el núcleo dorsomedial, el núcleo tuberal, núcleo supramamilar y la zona incerta (tabla 4.4; figura 4.24 A-D).

En el tálamo, en el núcleo talámico reticular (RT), se detectó la mayor expresión de ARNm para TRPM8 de todo el cerebro (figura 4.22 A-D; tabla 4.4). Este núcleo está compuesto por neuronas GABAérgicas inhibitorias que principalmente co-expresan PV y/o somatostatina (Clemente-Perez et al., 2017). El marcaje se ubicó especialmente en su parte ventral y dorsal; en ésta última a pesar del pobre marcaje generado por el anticuerpo anti-GABA, cuantificamos que el $58,5 \pm 10,3$ % de las células con inmunorreactividad GFP eran GABAérgicas, y que además el $95,5 \pm 2,4$ % co-expresaban PV (figura 4.22 E-F). Poniendo el foco de mira en la población total de células PV+ detectadas, estimamos que solamente el $11,7 \pm 2,4$ % de ellas eran GFP+, lo que sugiere que las células que expresan TRPM8 son una subpoblación muy pequeña dentro de las neuronas talámico-reticulares con expresión de PV.

Otro núcleo talámico en el que encontramos señal de ARNm de TRPM8 es el núcleo anterodorsal del tálamo (AD), aunque, sorprendentemente, no se visualizaron células con expresión de GFP en esta ubicación en ninguna de las líneas transgénicas estudiadas, únicamente se visualizaron algunas fibras (figura 4.23; tabla 4.4).

En el resto del tálamo también se observaron fibras inmunorreactivas en varios núcleos, como el mediodorsal (MD), laterodorsal, centrolateral (CL), reuniens y complejo posterior, así como el núcleo geniculado en su parte dorsal, intergeniculado y ventral (tabla 4.4). En el MD y CL también observamos algunas células dispersas, sin embargo no se detectó una señal de hibridación "in situ" clara.

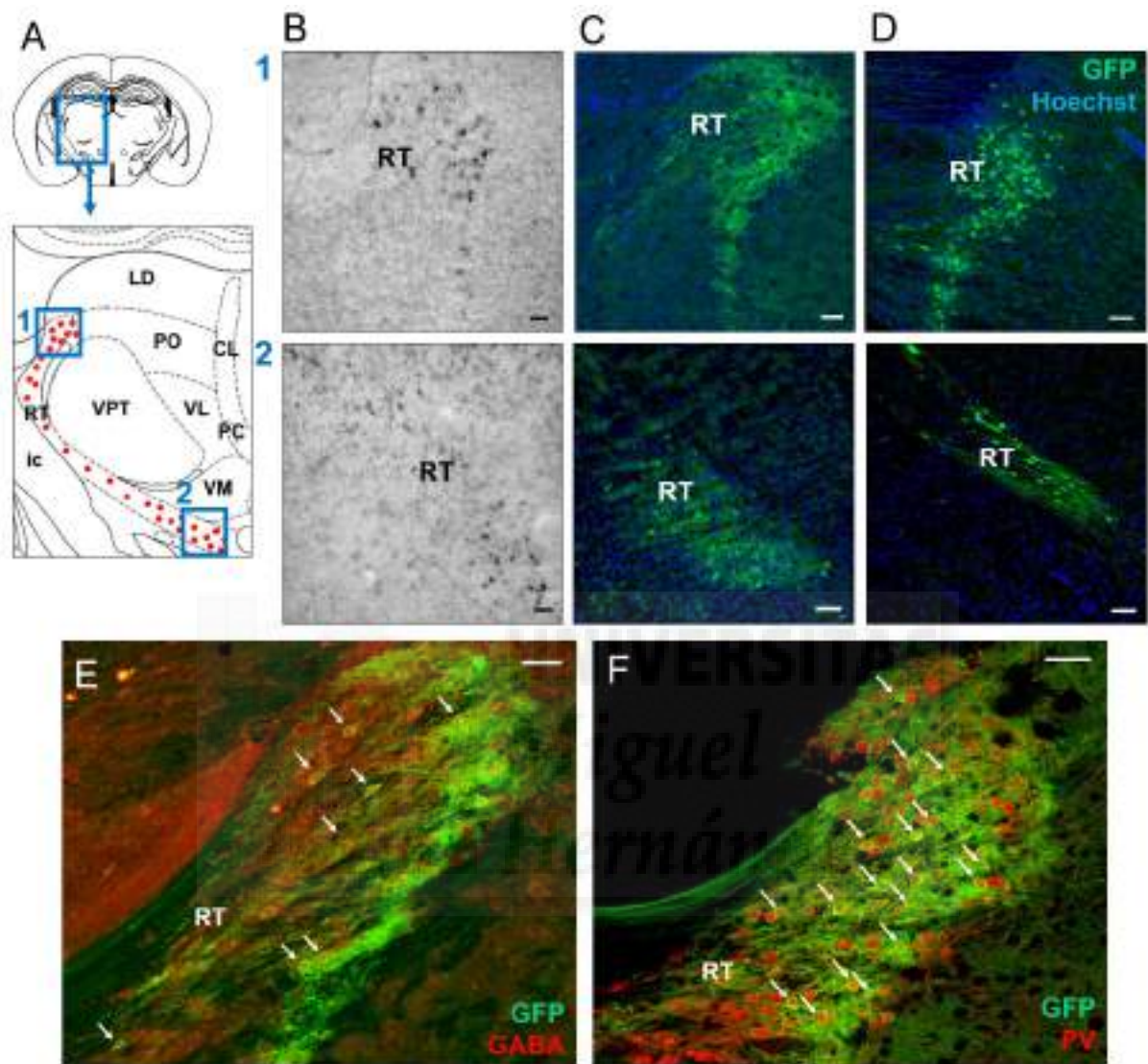


Figura 4.22 Expresión de TRPM8 en el núcleo reticular del tálamo (RT) en ratón. (A) Diagrama que muestra la expresión de TRPM8, mediante puntos rojos, sobre un corte coronal del cerebro de ratón a la altura del RT. El marcaje positivo localizado por los cuadros azules 1 y 2 se muestra en los paneles situados a la derecha (B-D). (B) Señal detectada por hibridación "in situ". (C y D) Imágenes de microscopía confocal en que se muestra el marcaje fluorescente detectado en las líneas transgénicas de ratón TRPM8-EGFPf (C) y TRPM8-EYFP1 (D). Co-expresión de GFP (verde) y GABA (E) o PV (F) en la línea transgénica de ratón TRPM8-EGFPf. Barras de escala: 50 μm .

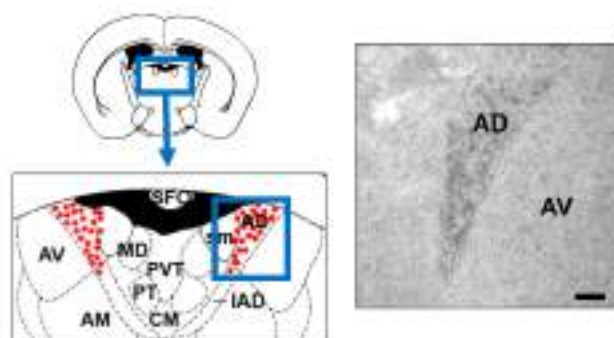


Figura 4.23 Expresión de TRPM8 en el núcleo anterodorsal del tálamo (AD) en ratón. A la izquierda, diagrama de un corte coronal del cerebro de ratón ubicando con puntos rojos el patrón de marcaje obtenido para la expresión de TRPM8 en el AD. A la derecha, señal de hibridación “in situ” cuya ubicación se corresponde con el área indicada por el cuadro azul en el diagrama. Barra de escala: 100 μ m.

4.3.2.3 Cerebelo

No se encontraron células con ARNm de TRPM8 en el cerebelo, ni tampoco se visualizó ninguna fluorescencia en el ratón TRPM8-EGFPf en esta ubicación; sin embargo, en la línea TRPM8-EYFP1 se observaron algunas células marcadas con GFP de las denominadas “basket cells” dispersas por toda el área (tabla 4.4).

4.3.2.4 Tronco encefálico

Se detectaron fibras con inmunorreactividad GFP en varias zonas del mesencéfalo y el puente, entre ellas, en la sustancia negra (principalmente en la pars compacta), el colículo superior, núcleo líneal del rafe, núcleo del rafe dorsal y las partes lateral y ventrolateral de la sustancia gris periacueductal (tabla 4.4; figura 4.24 G). Igualmente, como era de esperar, la presencia de TRPM8 en el sistema trigeminal fue muy evidente, observándose una gran acumulación de fibras positivas viajando a través del tracto trigeminal espinal, y algunas de ellas, dispersas en el núcleo trigeminal (figura 4.24 H; tabla 4.4 y 4.4).

4.3.2.5 Tractos límbicos

Tras constatar la presencia de fibras positivas en varias áreas cerebrales límbicas, decidimos estudiar la presencia de inmunorreactividad en los grandes tractos límbicos. Así, detectamos numerosas fibras con marcaje viajando a lo largo de la estría terminal, la estría medular, el fórnix, la comisura anterior y el cíngulo (figura 4.24 I-L; tabla 4.3). Estos tractos comunican estructuras como la amígdala, septum, hipocampo, núcleos talámicos y corteza retrosplenial, cingulada, entorrinal y olfatoria, determinando la memoria afectiva del individuo y su conducta ante el medio externo.

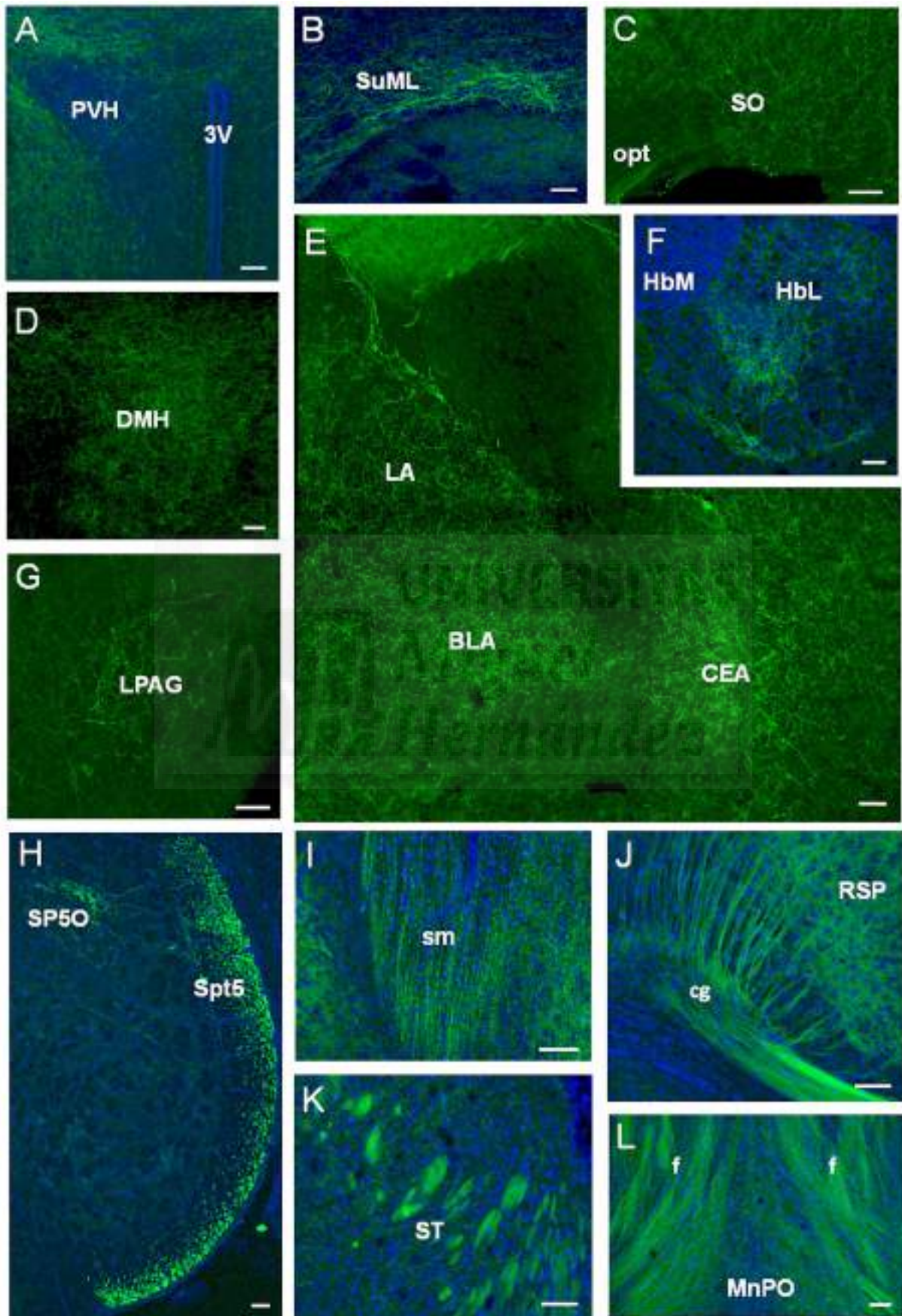


Figura 4.24 Áreas con marcaje GFP en fibras nerviosas en el ratón transgénico TRPM8-EGFPf. (A) Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH). (B) Núcleo supramamilar, parte lateral. (C) Núcleo supraóptico del hipotálamo (SO). (D) Núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH). (E) Amígdala (núcleo lateral (LA), basolateral (BLA), y central (CEA)). (F) Núcleo habenuar lateral (HbL). (G) Substancia periacueductal gris, parte lateral (LPAG). (H) Tracto espinal del nervio trigémino (Spt5) y núcleo trigeminal, parte oral (SP5O). (I) Estría medular del tálamo (sm). (J) Estría terminal (ST). (K) Cíngulo (cg) de dónde salen fibras positivas hacia la corteza retrosplenial (RSP). (L) fórnix (f). En azul se visualiza la detección nuclear con Hoechst. Barras de escala: 50 μ m.

Tabla 4.3 Tractos nerviosos con inmunorreactividad GFP en el cerebro de ratón. La señal se clasificó en cuanto a la cantidad de fibras visualizadas y se indica como: (+++) abundante, (++) moderada y (+) baja.

Tactos nerviosos	Fibras TRPM8-EGFPf	Fibras Trpm8-EYFP1
Comisura anterior, tracto olfatorio	+	+
Cíngulo	+	+
Estría medular	++	++
Estría terminal	++	++
Fimbria	++	++
Fórnix	++	++
Tracto espinal del nervio trigémino	+++	+++
Nervio óptico	+	+

El patrón de marcaje observado por inmunofluorescencia en cerebro en ambas líneas transgénicas se mantuvo constante en todos los animales evaluados independientemente de su sexo. Igualmente, constatamos que los emplazamientos que presentaban células con inmunorreactividad GFP en el ratón P15 de TRPM8-EGFPf mantenían el marcaje en el adulto ([figura 4.25](#)); sin embargo, se observó, una disminución fibrilar considerable en algunos núcleos. Estos núcleos fueron el supraquiasmático, geniculado y el colículo superior, curiosamente, todos ellos relacionados con la vía visual.

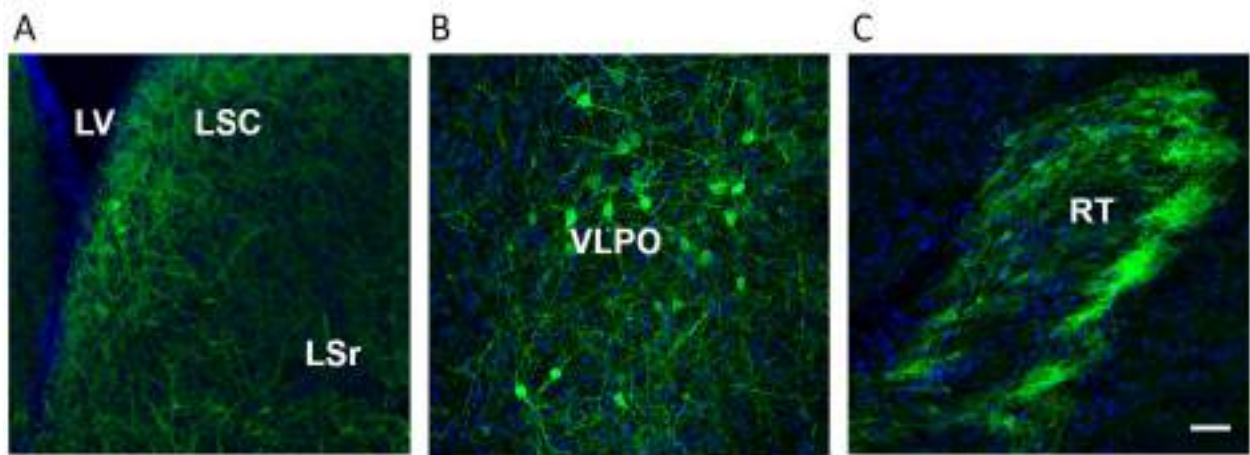


Figura 4.25 Células con inmunorreactividad GFP localizadas en el ratón adulto TRPM8-EGFPf en el septum lateral (A), en el núcleo preóptico ventrolateral (B) y el núcleo reticular del tálamo (C). En azul se visualiza la detección nuclear con Hoechst. Barra de escala: 50 μ m

4.3.3 Distribución anatómica del canal TRPM8 en el cerebro de rata

Para finalizar, se aplicó el mismo protocolo de hibridación “in situ” llevado a cabo en el cerebro de ratón al cerebro de rata. El patrón de expresión de ARNm localizado fue anatómicamente muy similar al descrito para ratón (figura 4.26; tabla 4.4).

Curiosamente, en algunas zonas del córtex cerebral en que se habían detectado células GFP+ pero no ARNm de TRPM8 en ratón, ahora sí se detectó expresión; así como en otras localizaciones telencefálicas como el núcleo endopiriforme dorsal o el “pallidum” ventral.

También cabe resaltar la identificación de células marcadas en la corteza motora, tanto primaria como secundaria, y en la somatosensorial primaria; ubicaciones que, aunque en el ratón transgénico TRPM8-EGFPf no mostraron un marcaje celular claro, sí que fueron detectadas en el ratón TRPM8-EYFP1, en que se visualizaron algunas células dispersas (tabla 4.4).

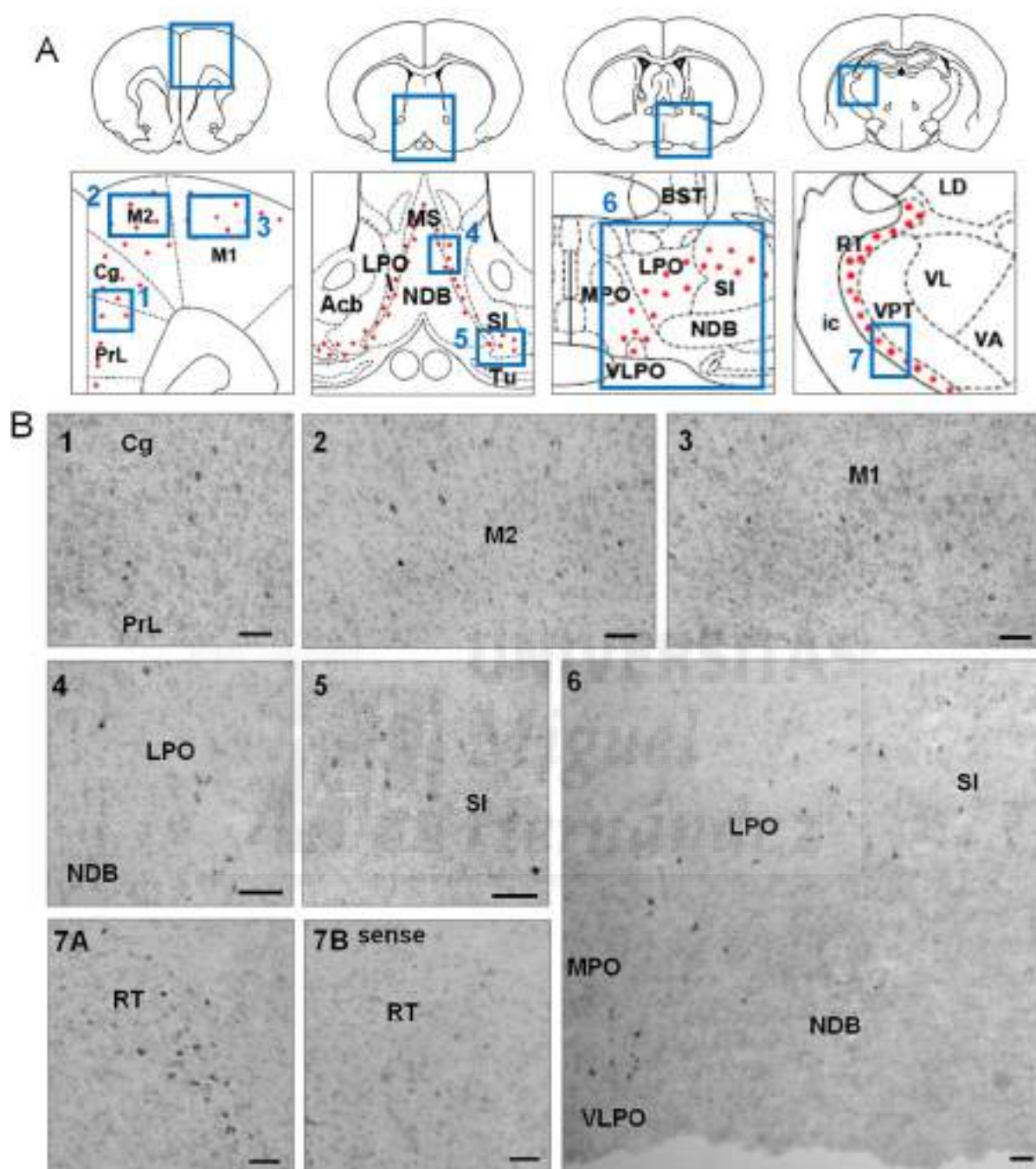


Figura 4.26 Expresión de TRPM8 cerebro de rata detectada por hibridación “in situ” a P15. (A) Representación esquemática de varias secciones coronales del cerebro de rata realizadas a distintas alturas. Los puntos rojos indican el patrón de marcaje detectado. Las células localizadas en las ubicaciones indicadas por los cuadros azules numerados son mostradas debajo. (B) Marcaje localizado en: corteza cerebral (B1-3), parte anterior del núcleo preóptico lateral (LPO) y de la “substantia innominata” (SI) (B4-5), área preóptica hipotalámica (B6) y núcleo reticular del tálamo (RT) (B7A). Se muestra control negativo realizado con la sonda “sense” hidrolizada, nótese la falta de señal (B7B). Cg, corteza cingulada; PrL, corteza prelímbica; M2, corteza motora secundaria; M1, corteza motora primaria; NDB, banda diagonal; VLPO (núcleo preóptico ventrolateral; MPO, área preóptica medial. Barras de escala: 50 µm (B1-5, B7), 100 µm (B6).



Tabla 4.4 Patrón de expresión de TRPM8 localizado en el cerebro de ratón y rata. Se muestra el nivel relativo de expresión de ARNm utilizando la siguiente escala: (+++) alto, (++) intermedio, (+) bajo y (-) sin expresión. En relación a la señal inmunorreactiva GFP la escala indica: (+++) abundancia, (++) cantidad moderada, (+) bajo número y (-) no visualización de células/fibras marcadas.

Área cerebral	ARNm TRPM8 ratón	TRPM8-EGFPf somas positivos	TRPM8-EGFPf fibras positivas	TRPM8-EYFP1 somas positivos	TRPM8-EYFP1 fibras positivas	ARNm TRPM8 rata
Corteza						
Núcleo olfatorio anterior	-	++	+	++	+	-
Tubérculo olfatorio	-	-	+	-	+	-
Piriforme	-	++	+	++	+	-
Tenia tecta	-	+	+	+	+	-
Entorrinal	-	++	+	++	+	-
Cingulada, parte anterior	-	-	+	+	+	++
Retrosplenial	-	-	+	+	+	++
Hipocampo, caudal CA1	-	+	++	+	++	-
Subiculum	-	+	+++	+	++	-
Prelímbica	-	+	+	+	+	++
Orbital, parte anterior	-	+	+	+	+	-
Motora primaria	-	-	-	+	+	++
Motora secundaria	-	-	-	+	+	++
Somatosensorial	-	-	-	+	+	+
Núcleos del septum						
Lateral caudal	+	+++	+++	+++	+++	+
Lateral rostral	+	+++	+++	+++	+++	+
Medial	-	-	+	-	+	-
Amígdala						
Lateral	-	-	+++	+	++	-
Basolateral	-	-	+++	+	+	-
Central	-	-	+++	+	+	-
Núcleo endopiriforme	-	++	+	++	+	+
Epitálamo						
Habénula lateral	-	+	+++	+	++	-
Núcleos talámicos						
Reticular	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cuerpo geniculado	-	-	+	-	++	-
Intergenicular	-	-	+	-	+++	-
Anterodorsal	+++	-	+	-	+	-
Centrolateral	-	+	+	+	+	-
Laterodorsal	-	-	+	+	+	-
Mediodorsal	-	+	+	+	+	-
Reuniens	-	-	+	-	+	-
Grupo nuclear posterior	-	-	+	-	+	-
Núcleos hipotalámicos						
Preóptico ventromedial	-	+	+	+	+	-
Área preóptica medial	++	+++	+++	+++	+++	++
Preóptico ventrolateral	++	+++	+++	+++	+++	++
Área lateral preóptica	++	+++	+++	+++	+++	++
Anterior	-	+	+	+	+	-
Supraquiasmático	-	-	+	-	+	-
Supraóptico	-	-	++	-	++	-

Arcuato	-	+	+	+	+	-
Área retroquiasmática	-	-	+	-	+	-
Ventromedial	-	-	+	-	+	-
Tuberal	-	-	+	-	+	-
Paraventricular	-	-	+	+	+	-
Dorsomedial	-	-	+	-	+	-
Área hipotalámica lateral	-	+	+	+	+	-
Zona incerta	-	-	+	+	+	-
Supramamilar	-	-	++	+	+	-
"Substantia innominata"	++	+++	+++	+++	+++	++
"Pallidum" ventral	-	++	++	++	++	++
Núcleos del mesencéfalo						
Lineal del rafe	-	+	+	+	+	-
Substancia periacueductal	-	-	+	-	+	-
Rafe dorsal	-	-	+	+	+	-
Central líneal del rafe	-	+	+	+	+	-
Interpeduncular lateral	-	-	+	-	+	-
Colículo superior	-	-	+	-	++	-
Substancia negra compacta	-	-	+	-	+	-
Ventral tegmental área	-	-	+	+	+	-
Romboencéfalo						
Núcleo trigeminal espinal	-	-	+	-	+	-
Cerebelo	-	-	-	++	+	-



4.4 Estudio del canal iónico TRPM8 en la retina.

La presencia de fibras GFP positivas en el núcleo supraquiasmático, colículo superior, geniculado lateral, y en el nervio óptico nos hacía hipotetizar que podría haber expresión de TRPM8 en neuronas de la retina. Está bien descrita la proyección de las células retinianas ganglionares a estas zonas del cerebro, regulando el sentido de la visión, así como los ritmos circadianos o la apertura y cierre pupilar (Sanes y Masland, 2015). Igualmente, la presencia de células GFP+ en la retina de los ratones TRPM8-EYFP1 resultaba un dato muy prometedor a la par que novedoso. Por todo ello, nos planteamos estudiar en detalle la expresión de TRPM8 en la retina.

4.4.1 Detección de ARNm de TRPM8 en retina.

En primer lugar tratamos de detectar la presencia de ARNm de TRPM8 en retina mediante RT-PCR. Sin embargo, aun utilizando 6 veces más cantidad de ADNc de retina que de trigémino para la reacción de PCR (reacción de retrotranscripción realizada con 2 μ g de RNA), no conseguimos detectar una clara señal de amplificación para TRPM8 en la retina. Sin embargo, en trigémino se obtuvo una robusta señal positiva, como puede observarse en la [figura 4.27 A](#).

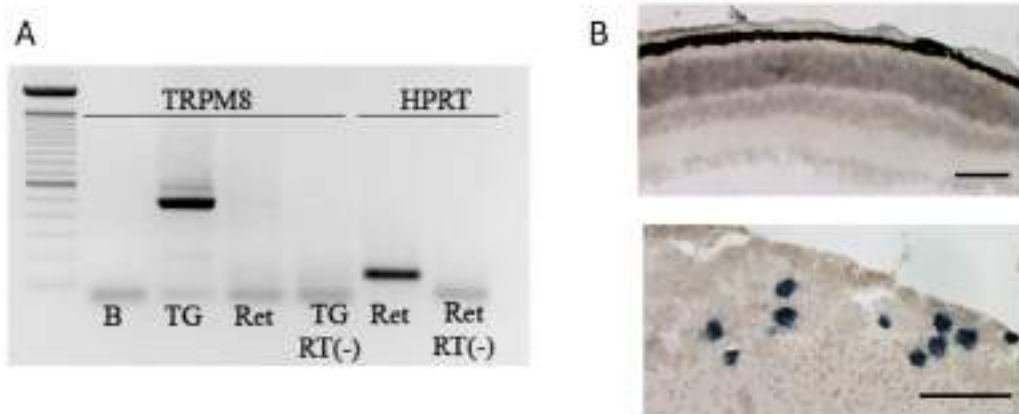


Figura 4.27 Detección de expresión de *trpm8* en retina (Ret) y ganglio trigémino (TG) de ratón C57 a edad P15. (A) RT-PCR. Para la detección de *trpm8* en retina se utilizó 0,5 μ l de ADNc en contraposición a los 3 μ l que se utilizaron en retina (reacción de retrotranscripción realizada con 2 μ g de RNA). Para el control de HPRT se añadió 1 μ l de ADNc. B: control negativo de la PCR (sin muestra). RT(-): muestra obtenida sin retrotranscriptasa. (B) Hibridación “in situ” para la detección de ARNm de *trpm8* en corte de retina (arriba) y trigémino (abajo) (20 μ m). Barra de escala: 100 μ m

La utilización de la técnica de hibridación “in situ”, optimizada para la detección de bajos niveles de expresión, usando una ribosonda de 3,3 Kb, tampoco permitió obtener un marcaje positivo en retina; ni siquiera, con la incubación en solución de revelado durante 6 días. Por el contrario, la señal en el ganglio trigémino fue visible con el mismo protocolo en solo unas pocas horas (figura 4.27 B). Todo ello sugiere un nivel de expresión de TRPM8 mucho más bajo en retina que en ganglios sensoriales, por debajo de los límites de detección de los sistemas utilizados en este trabajo.

4.4.2 Utilización de líneas transgénicas reporteras de TRPM8 para caracterizar su expresión en la retina de ratón.

Ante los bajos niveles de expresión con que TRPM8 estaría presente en la retina decidimos valernos de las líneas transgénicas descritas al inicio de este trabajo (TRPM8-EYFP(1-4), TRPM8-Cre, TRPM8-EGFPf y TRPM8-DTR-GFP) para tratar de sacar alguna conclusión sobre su posible localización y funcionalidad en este tejido.

La retina de los mamíferos, se estructura en tres capas de cuerpos neuronales bien organizadas. La capa nuclear más externa es la capa de los fotorreceptores, la capa intermedia se denomina nuclear interna (NI) y la capa más interior, capa ganglionar (CG). Entre estas capas nucleares se observan dos capas plexiformes, la externa (PLE) y la interna (PLI), compuesta por las proyecciones axonales de las neuronas de las capas celulares que las flanquean (revisado por Masland, 2012)(figura 4.28 A).

Los patrones de marcaje detectados en retina para cada línea transgénica no resultaron totalmente coincidentes, sin embargo, todas ellas presentaban células marcadas en mayor o menor medida, en la capa NI y en la CG.

En la línea TRPM8-EYFP1 se observaron multitud de células marcadas tanto en la capa CG como en la capa NI, siendo perfectamente distinguibles tres plexos nerviosos en la capa plexiforme interna (PLI) (figura 4.28 B). En las líneas TRPM8-EYFP2 y 3, el número de células positivas fue bastante inferior, ubicándose principalmente en la capa CG, aunque algunas células también pudieron visualizarse en la capa NI (figura 4.28 C y D). En la línea TRPM8-EYFP4 el marcaje celular obtenido también fue poco abundante y mayormente restringido a la capa NI, aunque algunas células también se detectaron en la capa CG (figura 4.28 E). En



ninguna de las líneas TRPM8-EYFP2, 3 o 4, se distinguió ningún plexo en la PLI. Por otro lado, las líneas TRPM8-Cre, TRPM8-EGFPf y TRPM8-DTR-GFP mostraron un marcaje similar entre ellas, con abundantes células con inmunorreactividad GFP (aunque no tantas como en TRPM8-EYFP1) tanto en la capa CG como en la NI, permitiendo distinguir dos plexos nerviosos en la capa PLI en la misma posición (figura 4.28 F-H).

En el caso de la línea TRPM8-EGFPf, a causa de la baja fluorescencia exhibida y la farnesilación de la GFP, el marcaje resultó muy notable en los plexos nerviosos, mientras que la detección de los somas se hizo mucho más dificultosa, en ocasiones imposible. Curiosamente, la señal fue perfectamente distinguible en animales neonatales hasta la edad de P23, a partir de ese momento, se observó una reducción de la inmunorreactividad GFP hasta prácticamente desaparecer a la edad de P30 (figura 4.28 G). Esta disminución ocurre tanto en los ratones homocigotos, es decir KO, como en los hemocigotos.

En la línea TRPM8-DTR-GFP la señal inmunofluorescente de GFP era muy tenue y como consecuencia, en los cortes transversales solo logramos visualizar células con marcaje en la capa NI, ya que en la CG la técnica siempre genera mayor autofluorescencia. Como alternativa, realizamos también una inmunodetección en “whole mount”, constatándose que también se detectaban células con fluorescencia en la capa CG, aunque éstas, eran mucho menos brillantes, al igual que el plexo más interno detectado en la capa PLI (figura 4.28 H).

Los resultados coincidentes obtenidos en las distintas líneas sugieren la expresión de TRPM8 en la retina, en células amacrinas de la capa nuclear interna y en células ganglionares. Por ello nos planteamos un estudio más detallado con marcadores celulares específicos.

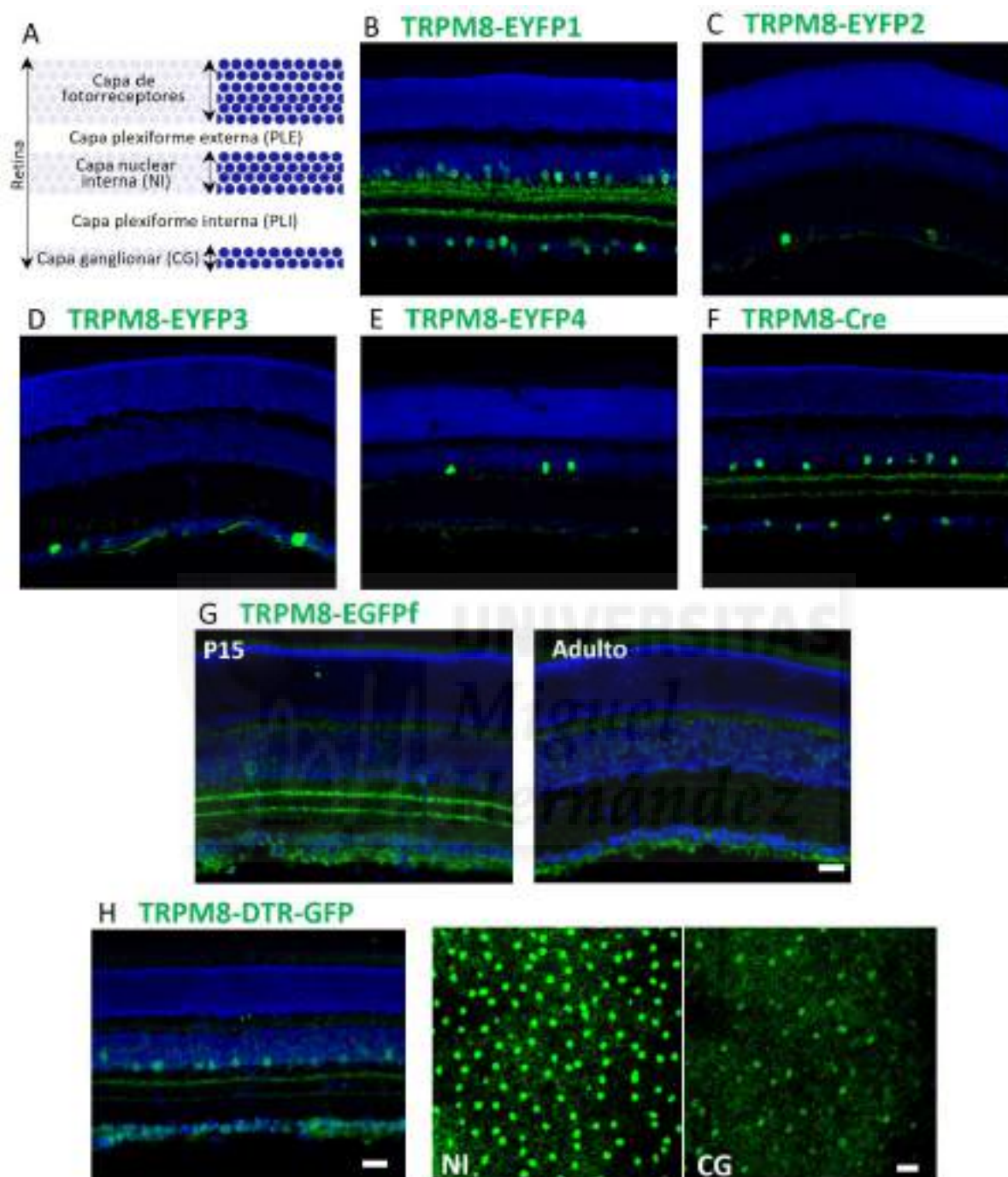


Figura 4.28 (A) Organización estructural esquemática de la retina de mamíferos. (B-H) Detección inmunofluorescente de neuronas reporteras en cortes transversales de retina (20 μ m) pertenecientes a las distintas líneas transgénicas para TRPM8 indicadas. Muestras tomadas en animales adultos. Para la línea TRPM8-EGFPf (G), también se muestra el marcaje en animales a edad P15. Para la línea TRPM8-DTR-GFP (H) se muestran imágenes de un animal en que una retina se utilizó para hacer cortes transversales en criostato (izquierda), y la otra para hacer una preparación en “whole mount” (derecha) donde se muestra por separado la proyección máxima de los planos correspondientes a la capa NI y la capa CG. Barra de escala: 25 μ m.



4.4.3 Caracterización celular del marcaje retiniano para TRPM8.

Para la identificación molecular de las células con inmunorreactividad GFP+, realizamos estudios de colocalización en los que usamos como marcadores de expresión la enzima ChAT y el pigmento fotosensible melanopsina, ya que marcan subpoblaciones de neuronas retinianas bien definidas.

4.4.3.1 *Acetiltransferasa de colina (ChAT)*.

La enzima ChAT, esencial en la síntesis de acetilcolina, es un marcador molecular de células amacrinas colinérgicas. Dentro de la retina su distribución se localiza en la capa nuclear interna, o desplazadas a la capa ganglionar, desde donde proyectan sus dendritas a la PLI conformando dos plexos nervios a distintas profundidades, y que definen la localización de las sinápsis con las dendritas de células ganglionares OFF y ON (Vaney y Pow, 2000) (figura 4.29).

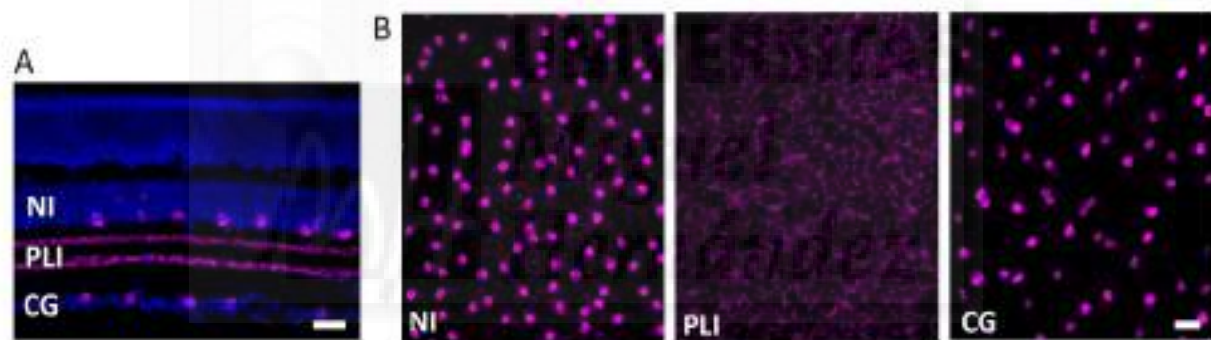


Figura 4.29 Marcaje inmunohistológico generado por el marcador ChAT en retina de ratón. (A) Visualización en un corte transversal (20 μm). (B) Visualización en disposición “whole mount”; se muestran por separado las proyecciones máximas correspondientes a los planos que abarcan las capas NI, PLI y CG. Barra de escala: 25 μm

Los estudios de co-expresión de GFP y ChAT mostraron que aquellas líneas que en su patrón de marcaje identificaba plexos diferenciados en la PLI (TRPM8-EYFP1, TRPM8-Cre, TRPM8-EGFPf y TRPM8-DTR-GFP), mostraban una buena colocalización entre ambos marcadores.

En la figura 4.30 se muestra una imagen representativa, en cortes transversales, de la colocalización obtenida entre GFP y ChAT por inmunohistoquímica en cada una de las líneas transgénicas estudiadas. A continuación se remarcan las principales observaciones extraídas del estudio de cada línea transgénica.

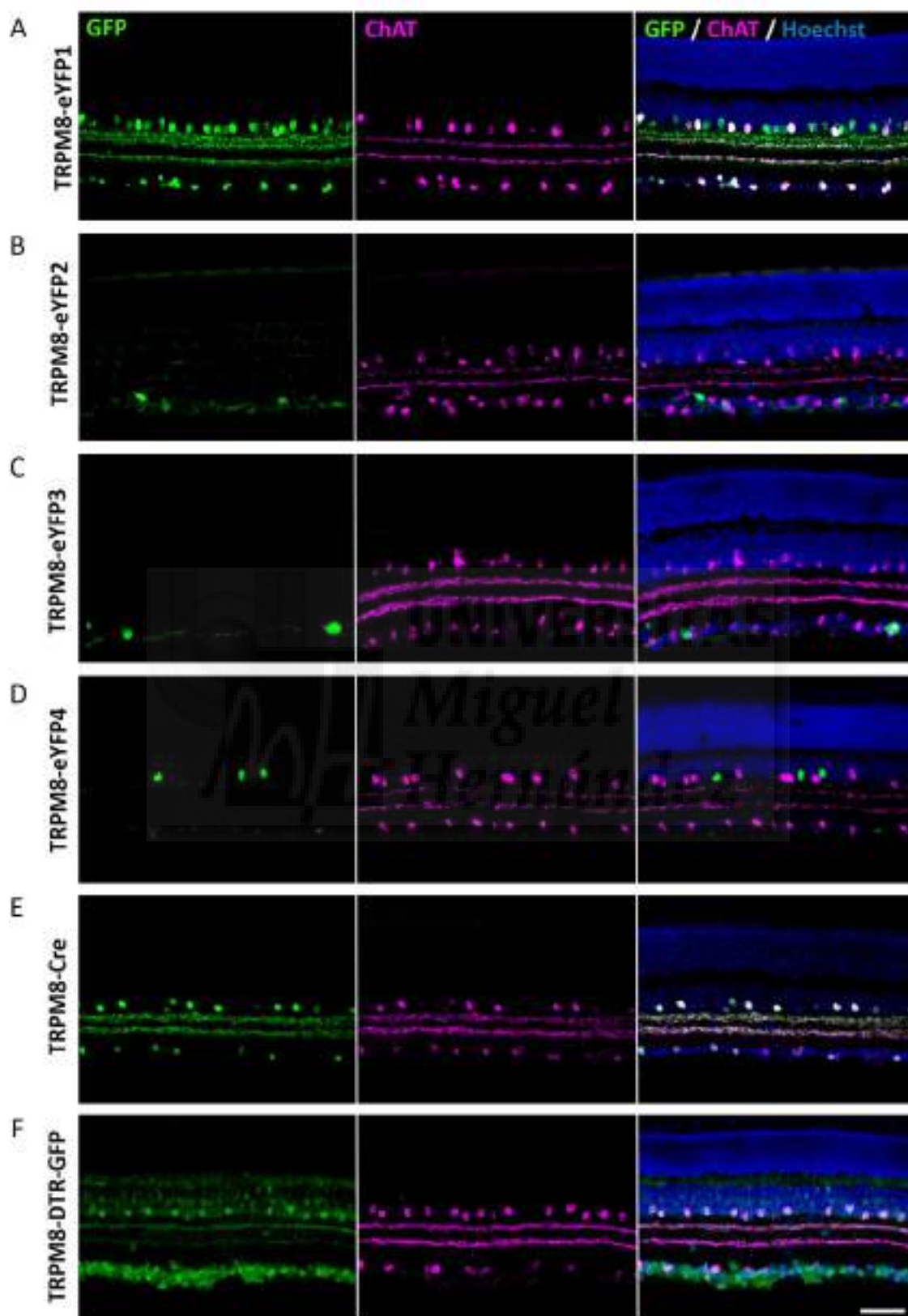


Figura 4.30 (A-F) Colocalización de neuronas con inmunorreactividad a GFP (verde) y el marcador de células colinérgicas ChAT (púrpura) en cortes transversales de retina (20 μm), en las distintas líneas transgénicas para TRPM8 indicadas. Barra de escala: 50 μm .



- TRPM8-EYFP1. El 65% de las células GFP+ se localizaron en la capa NI, mientras que el 35% restante lo hizo en la CG. Cerca del 60% de estas células co-expresaron el marcador de células colinérgicas ChAT; no obstante, la práctica totalidad de la población ChAT+ quedó restringida a la población inmunofluorescente ($\approx 95\%$). El grado de co-expresión observado fue mayor en la capa CG ($\approx 75\%$) respecto del localizado en la capa NI ($\approx 45\%$). Los dos plexos GFP+ más internos se correspondieron con las proyecciones de las células ChAT+, no así el más exterior (figuras 4.30 A y 4.31).

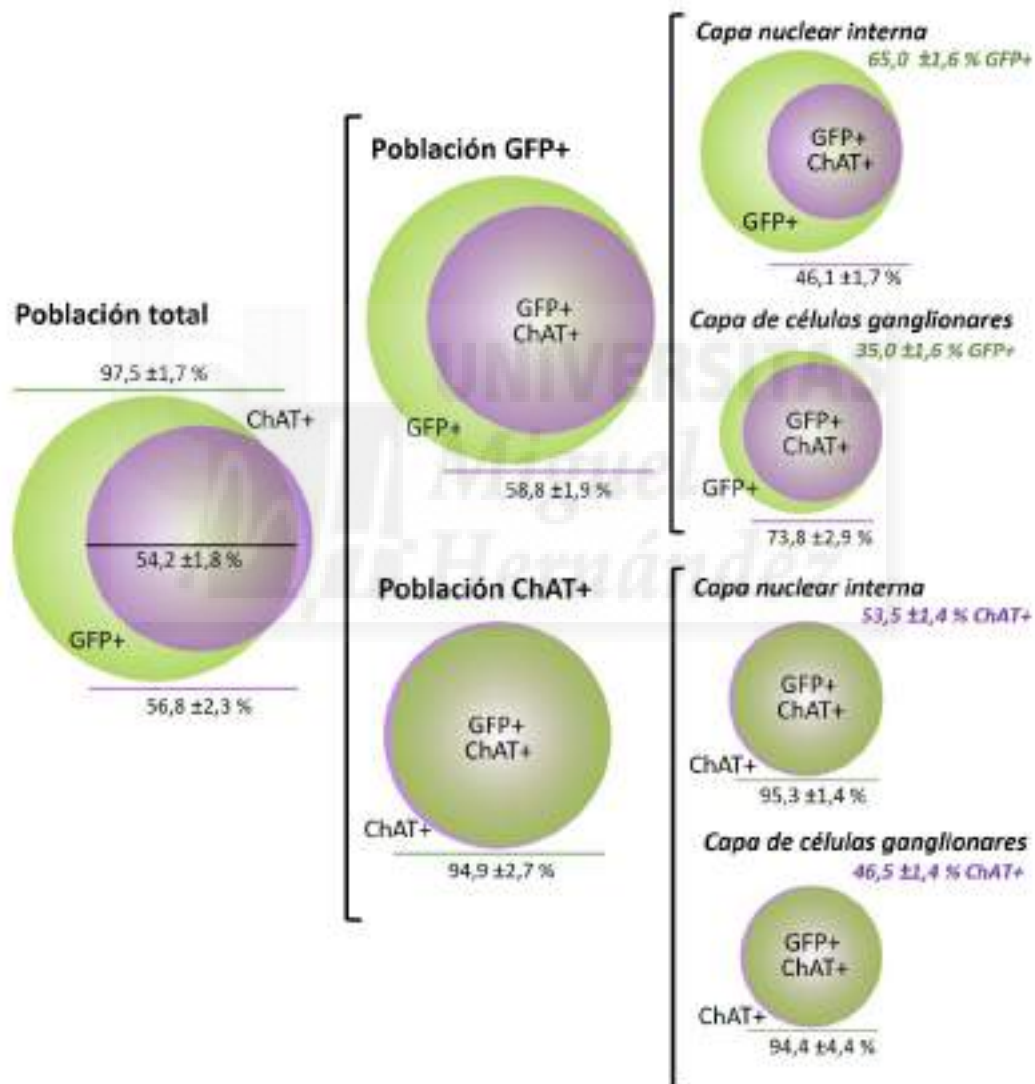


Figura 4.31 Cuantificación de la colocalización de células con inmunorreactividad GFP (verde) y el marcador de células colinérgicas ChAT (púrpura) en cortes transversales de retina (20 μm) en la línea transgénica TRPM8-EYFP1. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como ChAT+ (línea púrpura) y la co-expresión entre ambas (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. En los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o púrpura). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.

Estas observaciones sugieren que las células amacrinas colinérgicas representan una importante subpoblación de las células GFP+ en la línea TRPM8-EYFP1.

- TRPM8-EYFP2. El grado de co-expresión entre células GFP+ y ChAT+ fue muy bajo en esta línea transgénica ($\approx 1\%$), sugiriendo que ambos marcajes identifican poblaciones distintas (figura 4.30 B). Aun así, cabe destacar que la colocalización se mantuvo circunscrita a células alojadas en la capa NI, alcanzando un valor cercano al 10% entre las células GFP+ de esta ubicación (figuras 4.32).

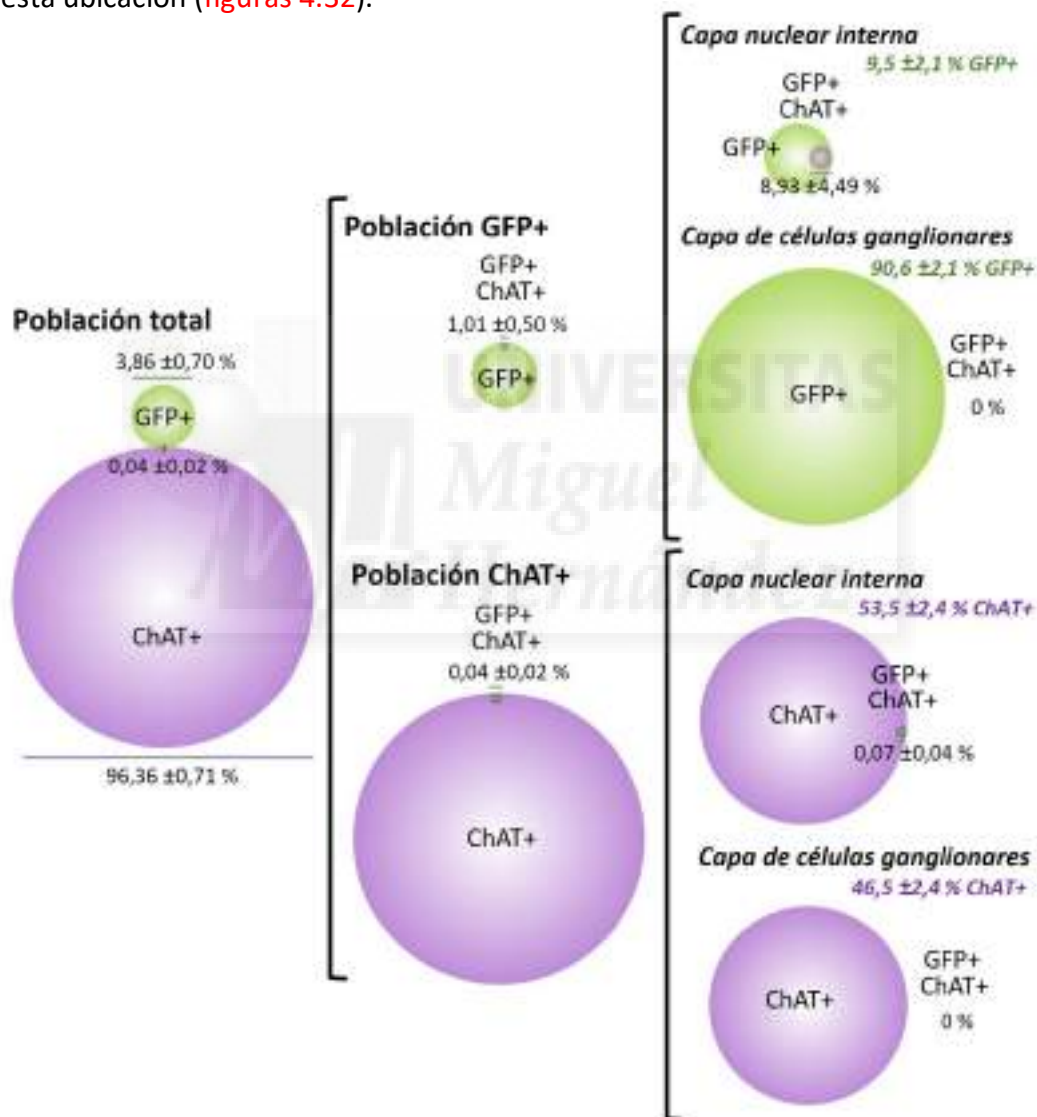


Figura 4.32 Cuantificación de la colocalización de células con inmunorreactividad GFP (verde) y el marcador de células colinérgicas ChAT (púrpura) en cortes transversales de retina (20 μm) en la línea transgénica TRPM8-EYFP2. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como ChAT+ (línea púrpura) y co-expresión entre ambas (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. En los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o púrpura). Se muestra la media ± sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.



- TRPM8-EYFP3. Las células con inmunorreactividad GFP mostraron una colocalización con ChAT inferior al 2%, sugiriendo que son poblaciones, en su amplia mayoría, independientes. Estudiando la distribución de esta colocalización en la población GFP+, se observó que era del $\approx 7\%$ en la capa NI, y del $\approx 1,5\%$ en la CG (figuras 4.30 C y 4.33).

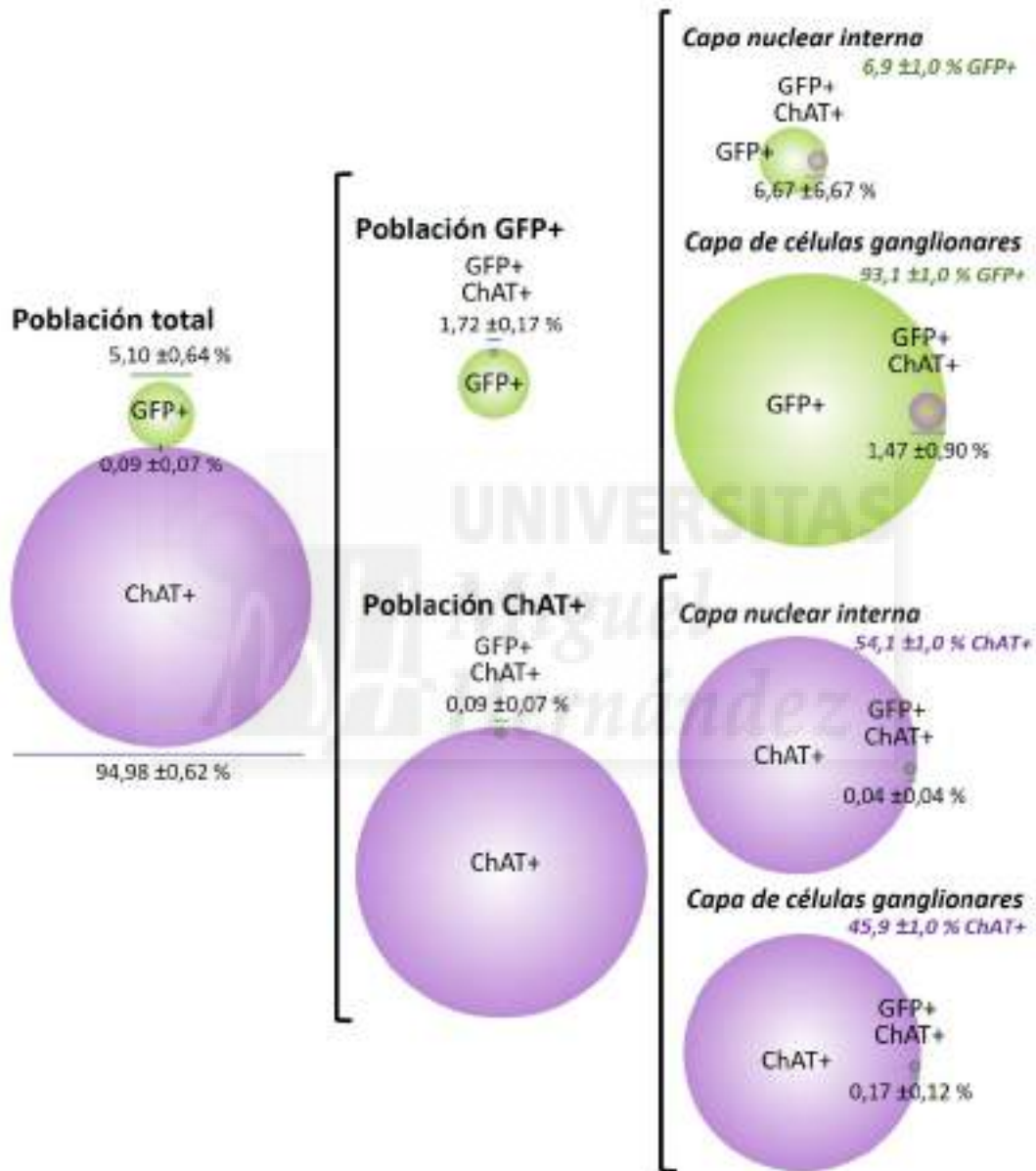


Figura 4.33 Cuantificación de la colocalización de células con inmunorreactividad GFP (verde) y el marcador de células colinérgicas ChAT (púrpura) en cortes transversales de retina (20 μ m) en la línea transgénica TRPM8-EYFP3. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como ChAT+ (línea púrpura) y co-expresión entre ambas (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. En los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o púrpura). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.

- TRPM8-EYFP4. Apenas se encontró colocalización entre las células con inmunorreactividad GFP y las células con expresión de ChAT ($\approx 2\%$) indicando que son poblaciones sin apenas relación. Sin embargo, cabe destacar que al igual que en la línea TRPM8-EYFP2, la colocalización se restringió a las células reporteras de TRPM8 ubicadas en la capa NI, aunque en menor proporción ($\approx 2\%$) (figuras 4.30 D y 4.34).

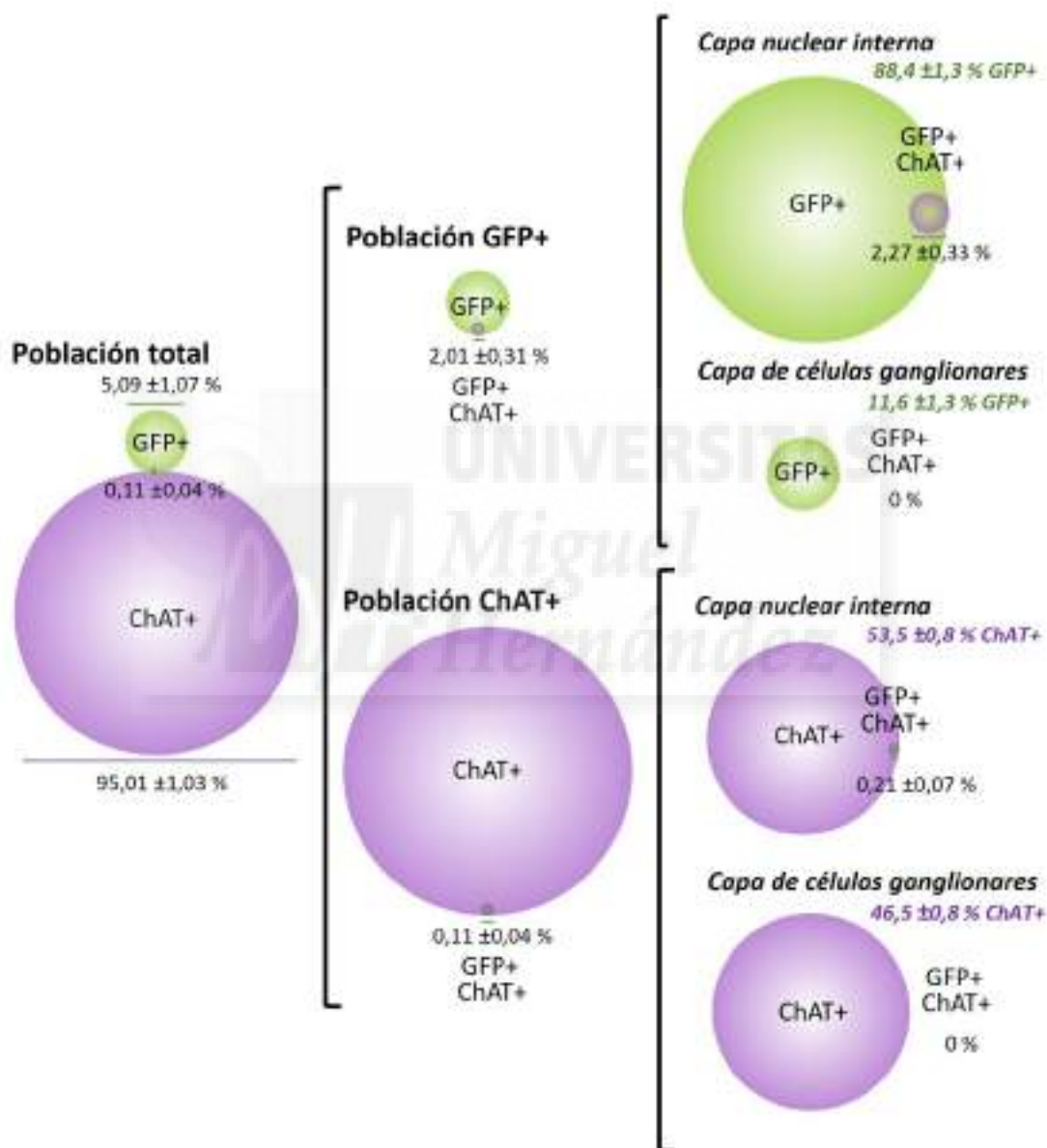


Figura 4.34 Cuantificación de la colocalización de células con inmunorreactividad GFP (verde) y el marcador de células colinérgicas ChAT (púrpura) en cortes transversales de retina (20 μm) en la línea transgénica TRPM8-EYFP4. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como ChAT+ (línea púrpura) y co-expresión entre ambas (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. Además, en los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o púrpura). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.



- TRPM8-Cre. Las células GFP+, tanto en la capa CG como la NI, mostraron co-expresión con ChAT en muy alto grado ($\approx 98\%$); y consecuentemente ambos plexos ubicados en la PLI también mostraron colocalización inmunofluorescente (figuras 4.30 E y 4.35). Estos datos sugieren que la práctica totalidad de células GFP+ forman parte de la población ChAT+ en esta línea reportera.

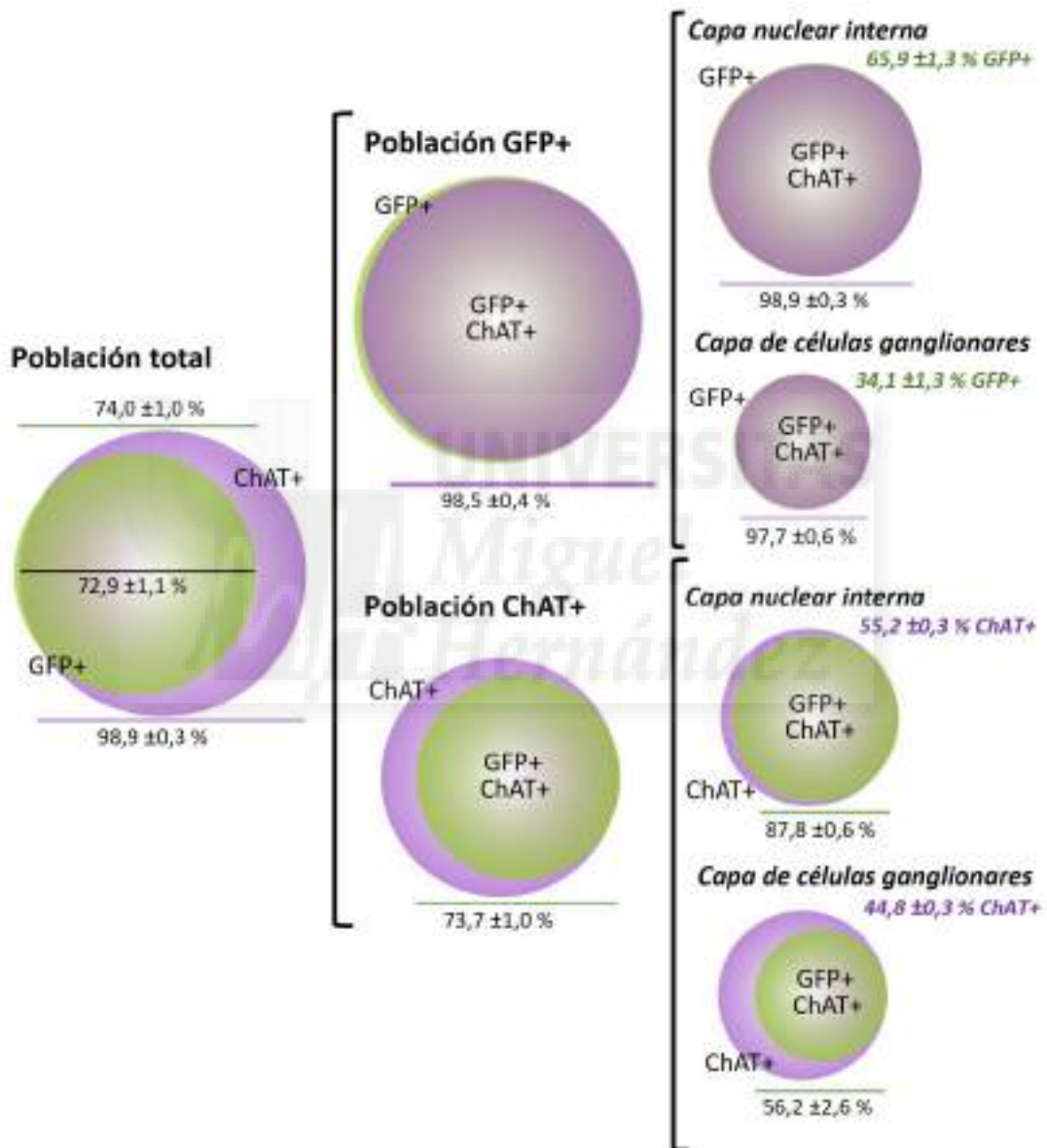


Figura 4.35 Cuantificación de la colocalización de células con inmunorreactividad GFP (verde) y el marcador de células colinérgicas ChAT (púrpura) en cortes transversales de retina (20 μ m) en la línea transgénica TRPM8-Cre. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como ChAT+ (línea púrpura) y co-expresión entre ambas (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. Además, en los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o púrpura). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.

- TRPM8-DTR-GFP. Debido a que el análisis poblacional se hizo en cortes transversales de retina, no se pudieron cuantificar adecuadamente las células GFP+ en la capa CG. En la capa NI casi todas las células GFP+ visualizadas co-expresaron el marcador colinérgico ChAT ($\approx 97\%$) al igual que ambos plexos marcados ([figura 4.30 F y 4.36](#)). Posteriormente, como se observa en la [figura 4.37](#), se analizó el doble marcaje en preparaciones “whole mount” de un animal, lo que nos permitió comprobar que efectivamente había células GFP+ en la capa CG que co-expresaban ChAT en una alta proporción. Estos datos sugieren que la práctica totalidad de las células GFP+ expresan ChAT en esta línea transgénica.

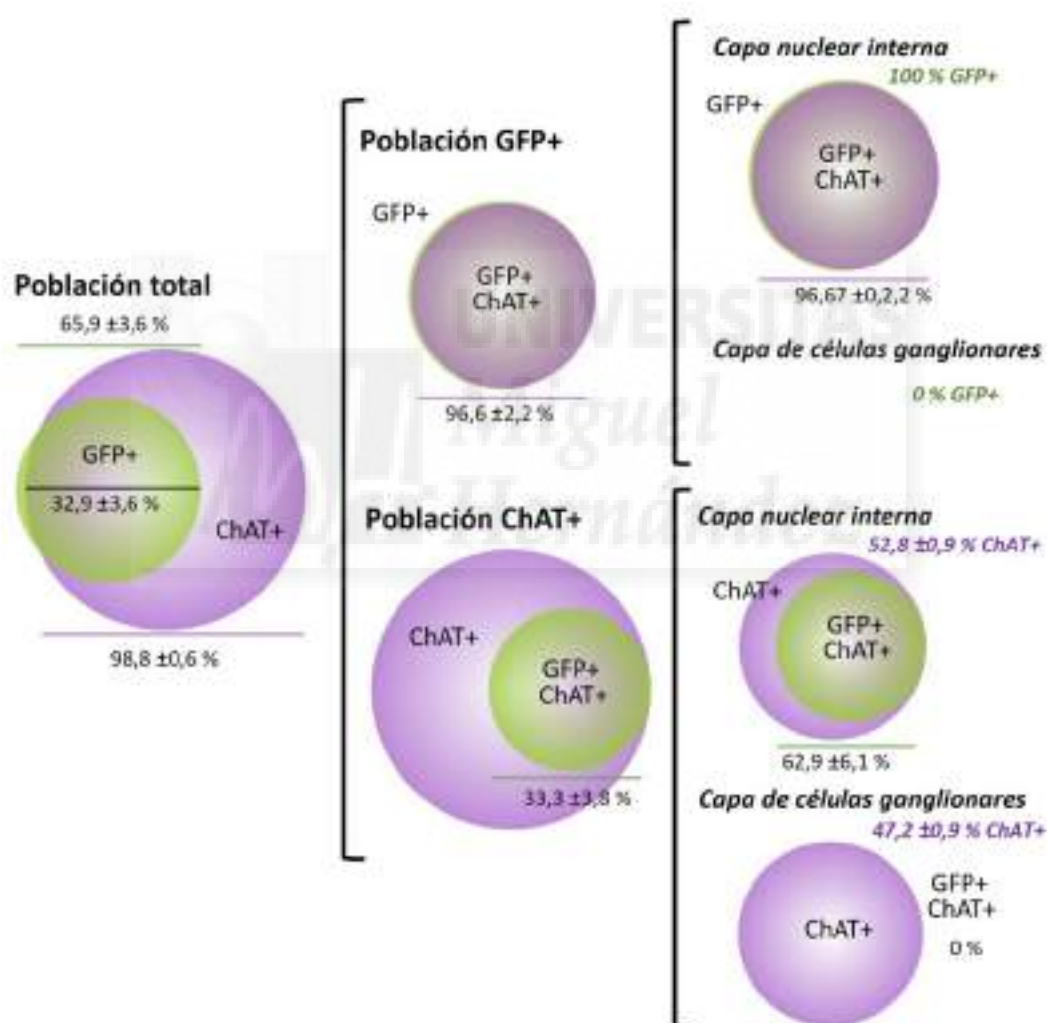


Figura 4.36 Cuantificación de la colocalización de células con inmunorreactividad GFP (verde) y el marcador de células colinérgicas ChAT (púrpura) en cortes transversales de retina (20 μ m) en la línea transgénica TRPM8-DTR-GFP. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como ChAT+ (línea púrpura) y co-expresión entre ambas (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. Además, en los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o púrpura). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.

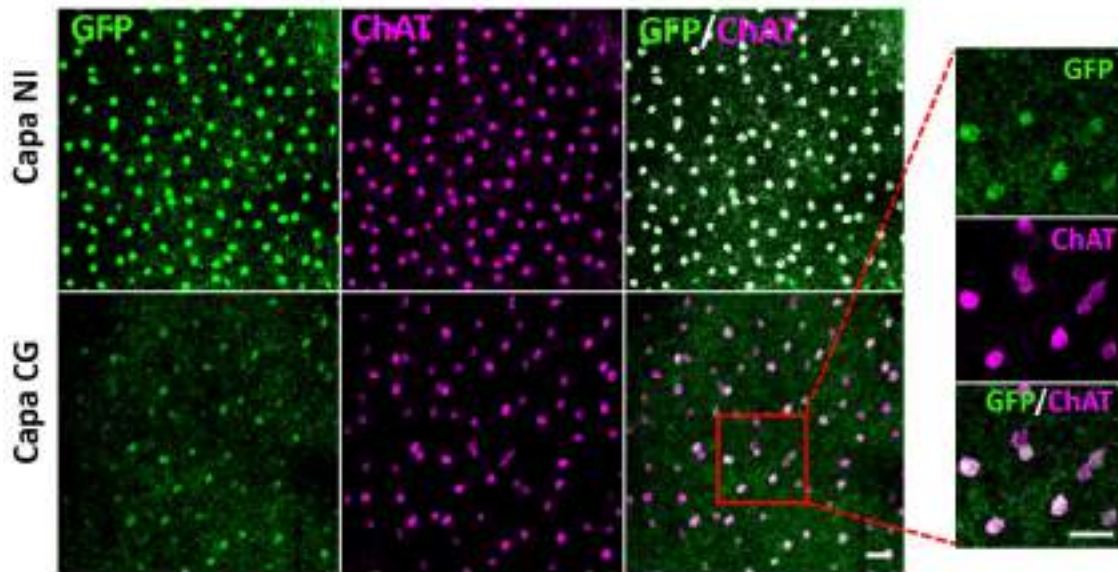


Figura 4.37 (A) Colocalización de neuronas con inmunorreactividad a GFP (verde) y el marcador colinérgico ChAT (púrpura) en la retina de un ratón DTR-GFP+, evaluadas en disposición “whole mount”. Se muestra la proyección máxima correspondiente a los planos que abarcan la capa CG y la capa NI. A la derecha se muestra un detalle de la colocalización observada en la capa CG. Barras de escala: 25 μ m.

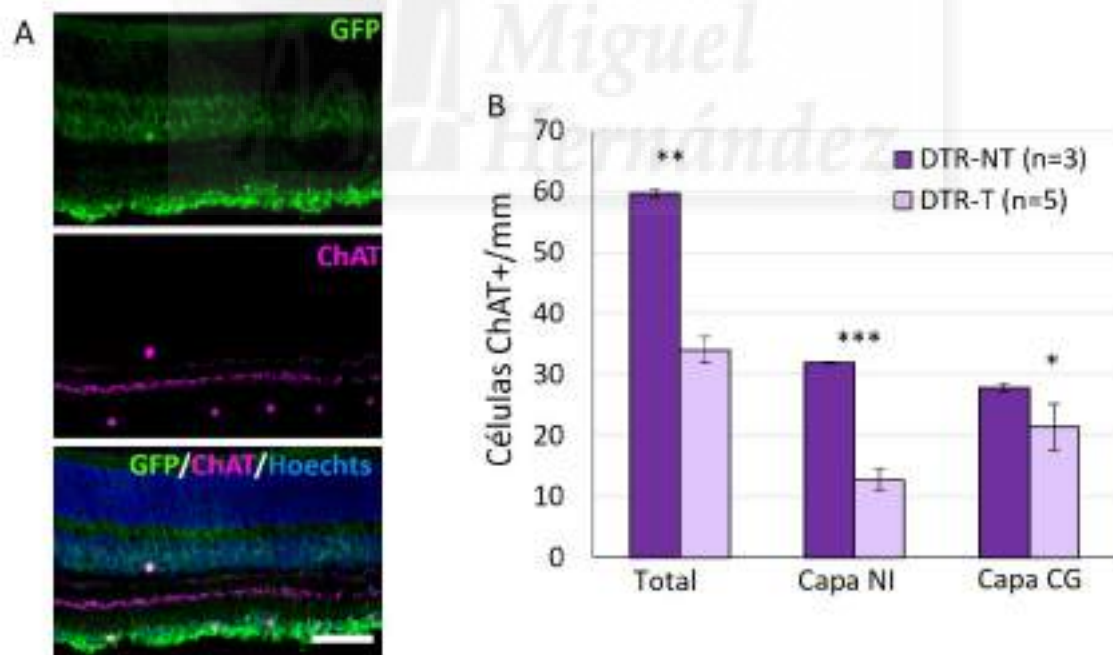


Figura 4.38 (A) Imagen de microscopía confocal representativa del marcaje visualizado en cortes transversales de retina (20 μ m) en un ratón DTR sometido a tratamiento con la toxina diftérica. Barra de escala: 50 μ m. (B) Cuantificación del número de células que expresan ChAT en la retina de animales tratados con la toxina diftérica (DTR-T) y no tratados (DTR-NT) (n=3). Diferencias evaluadas con el test de Student para muestras no pareadas.

La elevada co-expresión de las células GFP+ con ChAT queda también demostrada por el hecho de que al analizar el marcaje retinal de animales sometidos a tratamiento con toxina diftérica, que produce la ablación de las células que expresan el DTR; observamos una reducción del $\approx 60\%$ en la capa NI y del $\approx 30\%$ en la capa CG de las células ChAT+ (figura 4.38 A y B).

- TRPM8-EGFPf. Ante la dificultad de visualizar los somas celulares adecuadamente, no se realizó un recuento de la colocación entre GFP y ChAT en cortes transversales, pues consideramos que los valores dentro de la población GFP+ resultarían muy infravalorados. No obstante, se constató que la co-expresión en los plexos nerviosos de la PLI era coincidente, y que el 96% de las células GFP+ visualizadas en la capa NI ($n=74$) y el 27% de la detectadas en la capa CG ($n=33$) mostraban co-expresión (figura 4.39).

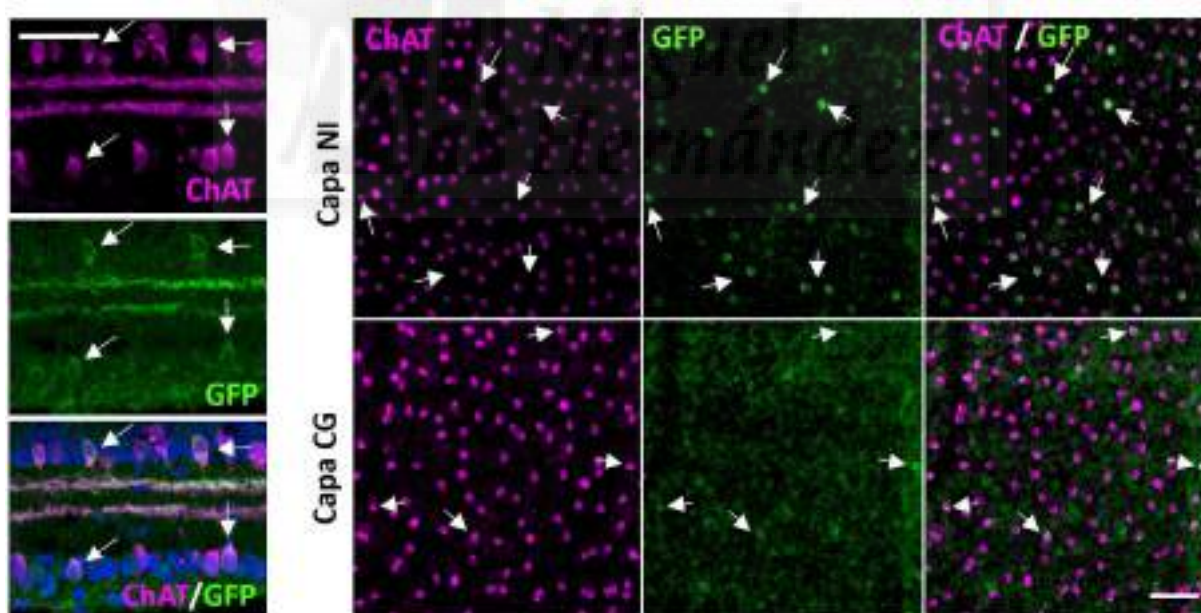


Figura 4.39 Marcaje inmunofluorescente en retina en la línea TRPM8-EGFPf a edad P15. Se visualiza la detección de neuronas GFP+ (verde), en combinación con células que expresan ChAT (purpura). A la izquierda, corte transversal realizado en criostato ($20\ \mu\text{m}$). A la derecha montaje en “whole mount”, donde se visualizan separadamente la proyección máxima correspondiente a la capa NI y la capa CG. Se indican con flechas algunos lugares en que se aprecia co-expresión. Barras de escala: $50\ \mu\text{m}$.



4.4.3.2 *Melanopsina*.

A continuación, se analizó la co-expresión de GFP+ con la melanopsina, el fotorpigmento propio de neuronas ganglionares intrínsecamente fotosensibles (Provencio et al., 2000). Se estima que estas neuronas representan únicamente el 2% del total de células ganglionares, conformando una red dendrítica fotorreceptiva en la capa del PLI. Sus somas se ubican principalmente en la capa CG, aunque una pequeña proporción (según nuestros datos $\approx 10\%$) se encuentra desplazada a la capa NI (revisado por Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002; y Provencio et al., 2002) (*figura 4.40*).



Figura 4.40 Detección inmunohistológica del fotorpigmento melanopsina en retina de ratón en disposición “whole mount”. A la izquierda se muestra la proyección máxima completa, a la derecha, se muestran separadas las proyecciones máximas correspondientes a las capas NI y CG. Barra de escala: 50 μm

En la *figura 4.41* se muestra una imagen representativa del doble marcaje obtenido en cada una de las líneas transgénicas estudiadas y, a continuación, se destacan las principales observaciones extraídas del análisis de cada una de ellas.

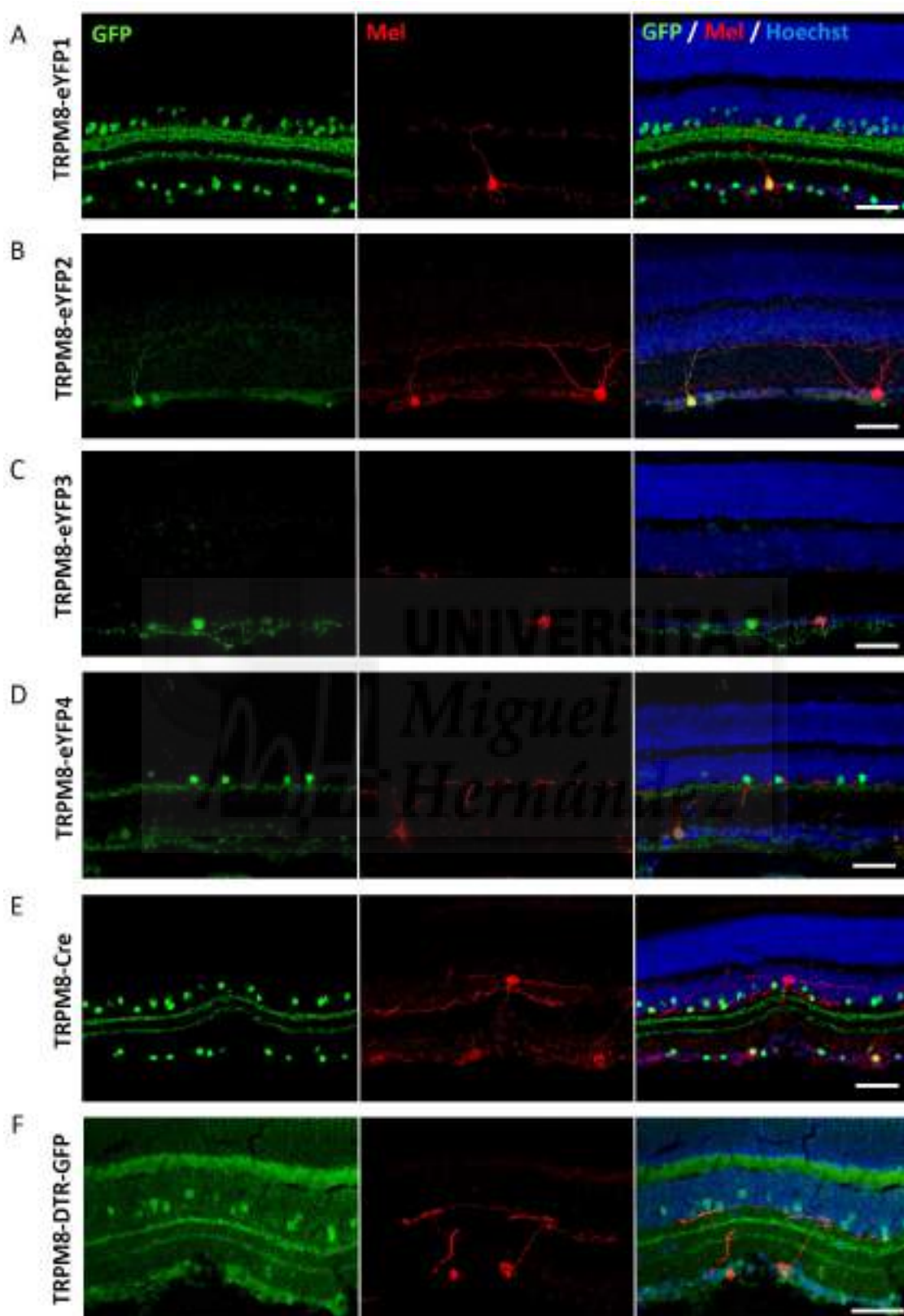


Figura 4.41 (A-F) Colocalización de neuronas con inmunorreactividad GFP (verde) y melanopsina (rojo) en cortes de retina (20 μm) en las distintas líneas transgénicas para TRPM8 indicadas. Barra de escala: 50 μm .



- TRPM8-EYFP1. El porcentaje de colocalización estimado dentro de la población GFP+ fue muy bajo ($\approx 1,5\%$). Sin embargo, al analizar la población de neuronas con expresión de melanopsina, observamos que se correspondía con el $\approx 45\%$ de esta, presentándose en similar proporción tanto en la capa NI, como en la capa CG. (figuras 4.41 A y 4.42).

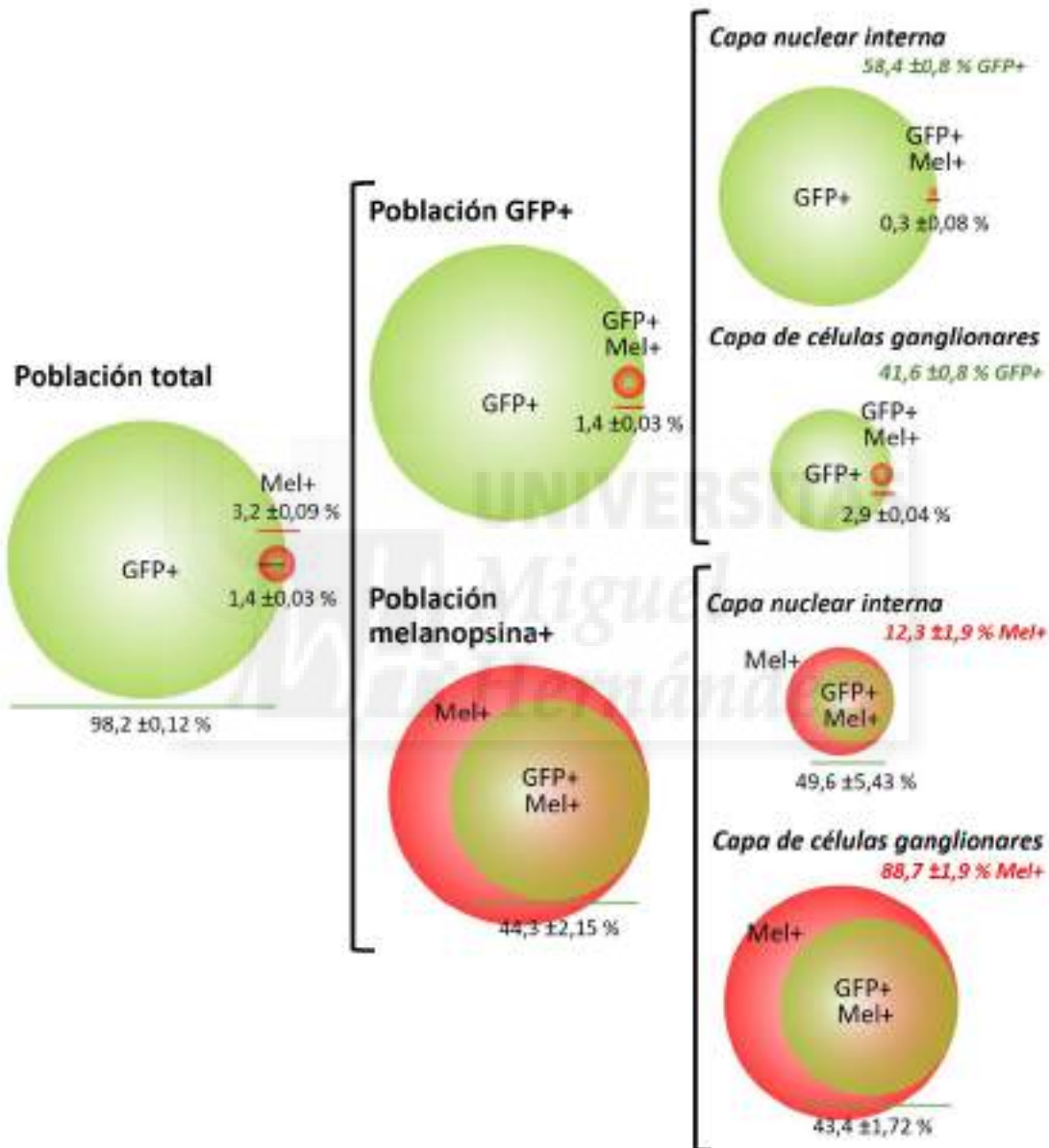


Figura 4.42 Cuantificación de la colocalización de células con expresión GFP+ (verde) y el pigmento fotosensible melanopsina (rojo) en cortes transversales de retina (20 μm) en la línea transgénica TRPM8-EYFP1. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como melanopsina+ (línea roja) y co-expresión entre ambos (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. Además, en los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o rojo). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.

- TRPM8-EYFP2: En esta línea, cómo ya se ha mencionado, el número de células que expresan GFP es muy bajo. Sin embargo, cerca del 60% de las células con inmunorreactividad GFP mostraron co-expresión con melanopsina. La distribución de la colocalización dentro de la población GFP+, se distribuyó por igual en las capas NI y CG (figuras 4.41 B y 4.43).

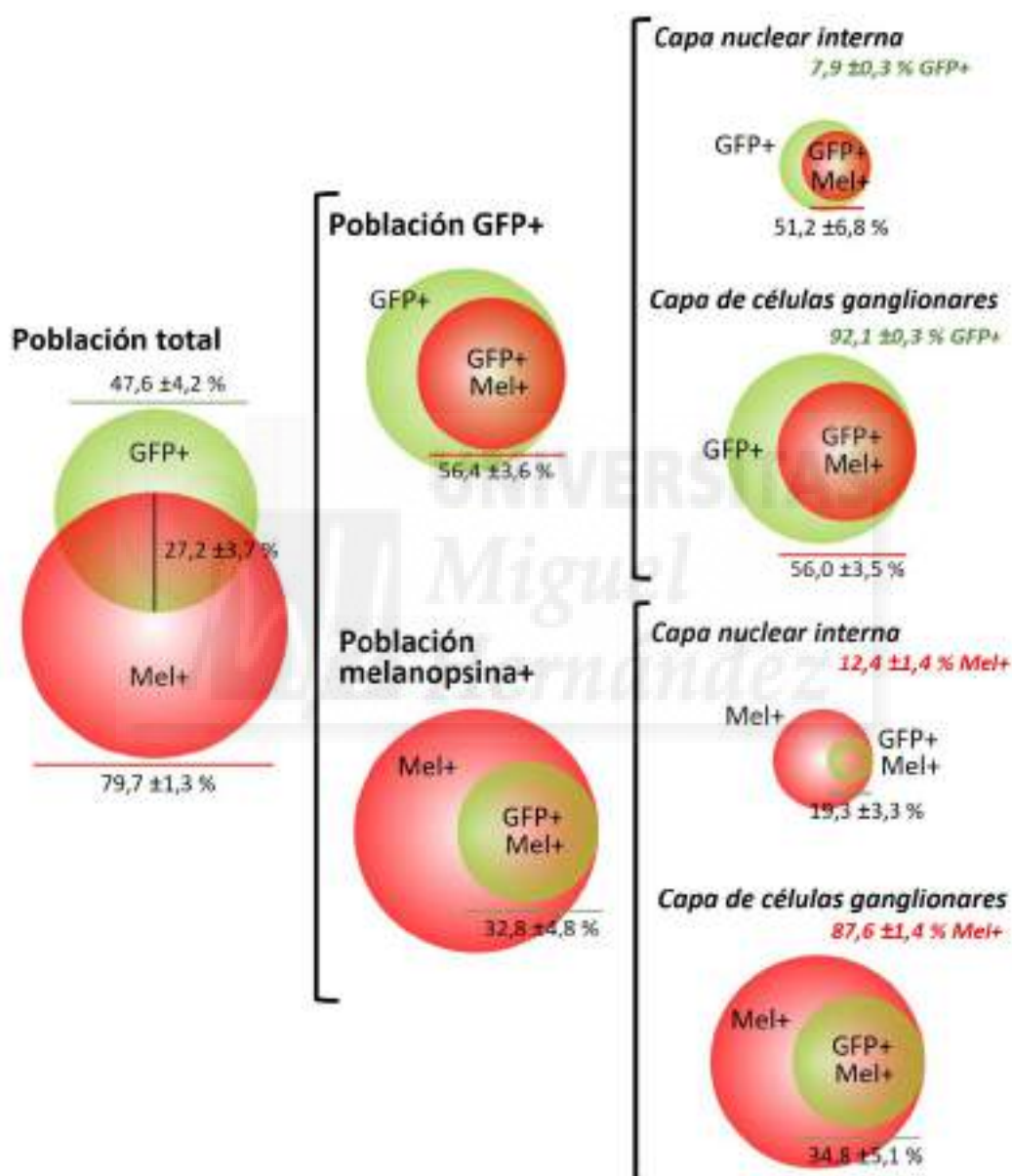


Figura 4.43 Cuantificación de la colocalización de células con expresión GFP+ (verde) y el pigmento fotosensible melanopsina (rojo) en cortes transversales de retina ($20 \mu\text{m}$) en la línea transgénica TRPM8-EYFP2. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como melanopsina+ (línea roja) y co-expresión entre ambos (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. Además, en los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o rojo). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.

- TRPM8-EYFP3: En esta línea, al igual que en la línea TRPM8-EYFP2, el número de células GFP+ es muy bajo. Se observó que el $\approx 25\%$ de las células con inmunorreactividad a GFP colocalizaban con la expresión de melanopsina, y que esta co-expresión se circunscribía a células alojadas en la capa de CG. (figuras 4.41 C y 4.44).

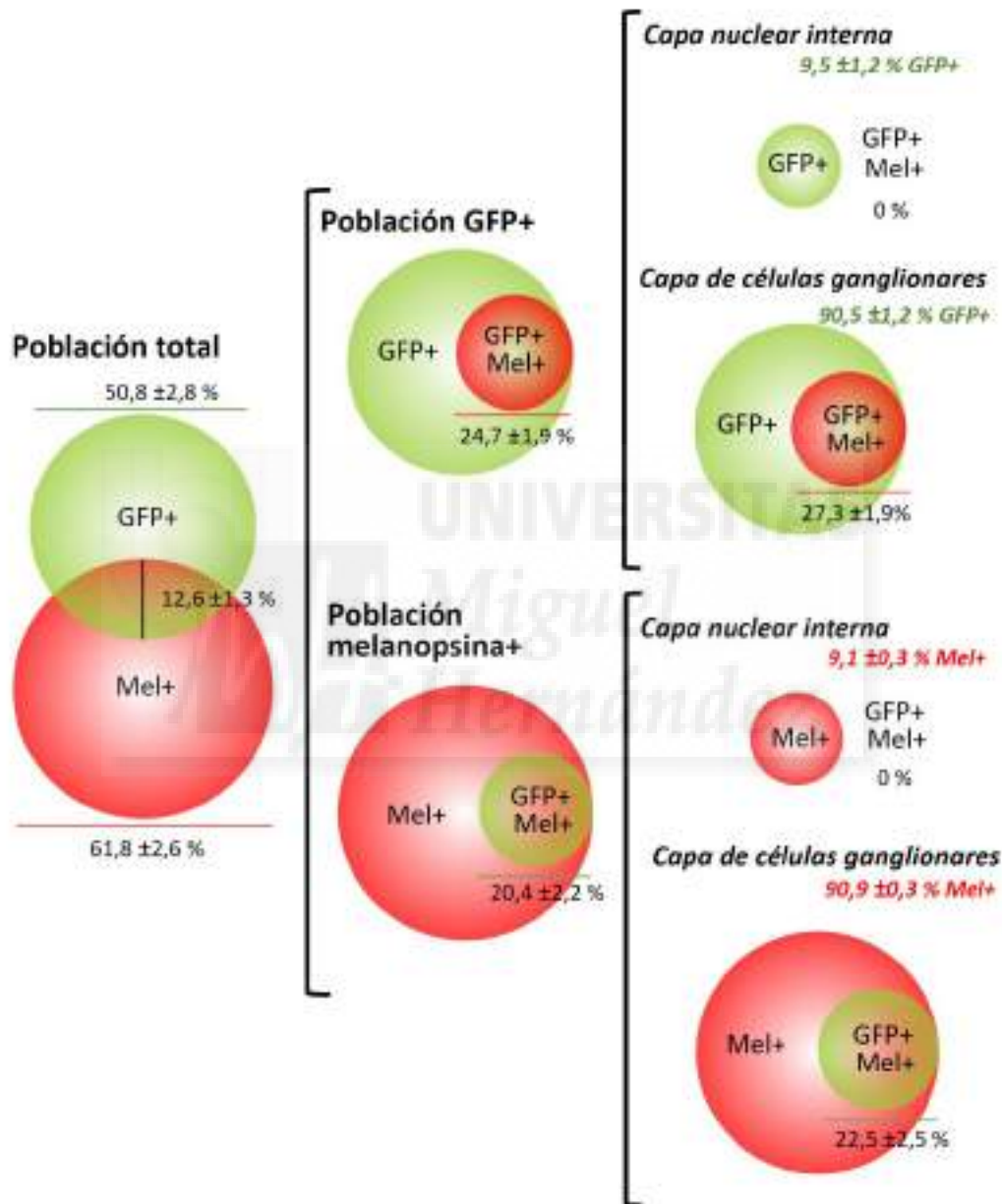


Figura 4.44 Cuantificación de la colocalización de células con expresión GFP+ (verde) y el pigmento fotosensible melanopsina (rojo) en cortes transversales de retina (20 μ m) en la línea transgénica TRPM8-EYFP3. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como melanopsina+ (línea roja) y co-expresión entre ambos (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. Además, en los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o rojo). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes

- TRPM8-EYFP4: La co-expresión mostrada en la población GFP+ con melanopsina, fue relativamente pequeña ($\approx 7\%$). Sin embargo, al analizar la ubicación de la misma, comprobamos que la gran mayoría se produce en la capa de la CG, abarcando en $\approx 40\%$ de las células con inmunorreactividad a GFP (figuras 4.41 D y 4.45).

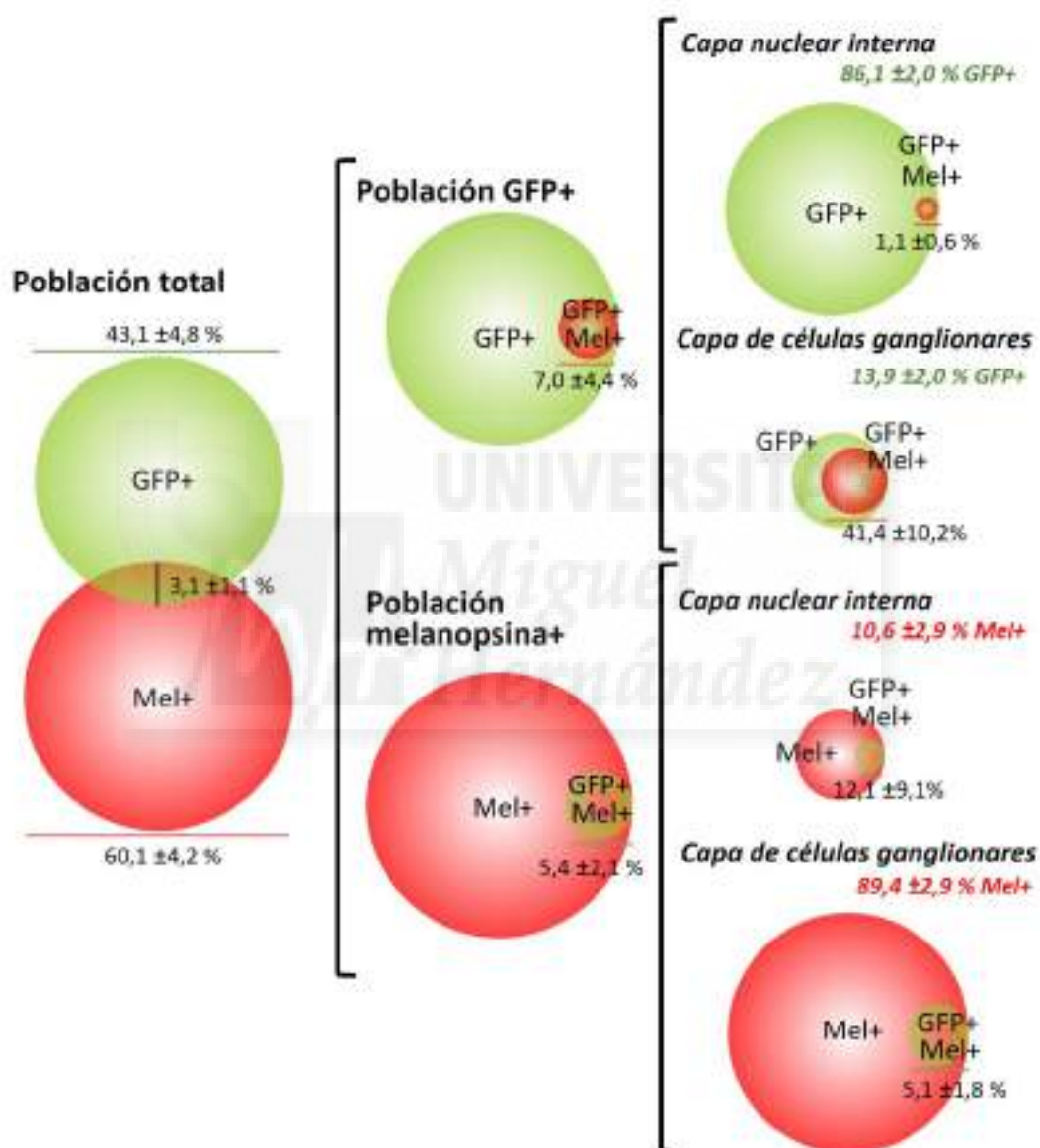


Figura 4.45 Cuantificación de la colocalización de células con expresión GFP+ (verde) y el pigmento fotosensible melanopsina (rojo) en cortes transversales de retina (20 μ m) en la línea transgénica TRPM8-EYFP4. En la población total se indican los porcentajes de células identificadas como GFP+ (línea verde), como melanopsina+ (línea roja) y co-expresión entre ambos (línea negra); en el resto de diagramas se presenta la co-expresión detectada en la población indicada. Además, en los diagramas de la derecha, se indica la proporción de células localizadas en cada capa para cada población (valores en verde o rojo). Se muestra la media \pm sem de los datos obtenidos en tres ratones en forma de porcentajes.



- En las líneas TRPM8-Cre y TRPM8-DTR-GFP no se visualizó colocalización entre células GFP+ y células con expresión de melanopsina (figuras 4.41 E y F).
- TRPM8-EGFPf: La dificultad para visualizar los somas de las células GFP+, nos impidió realizar un recuento fiable de la colocalización con melanopsina. Sin embargo, tanto en cortes transversales como en preparaciones en “whole mount” confirmamos la existencia de co-expresión en células ubicadas en la CG. Aproximadamente, un 50% de las células GFP+ identificadas (n=47) mostraban colocalización con melanopsina y se ubicaron principalmente en zonas periféricas de la retina. (figura 4.46).

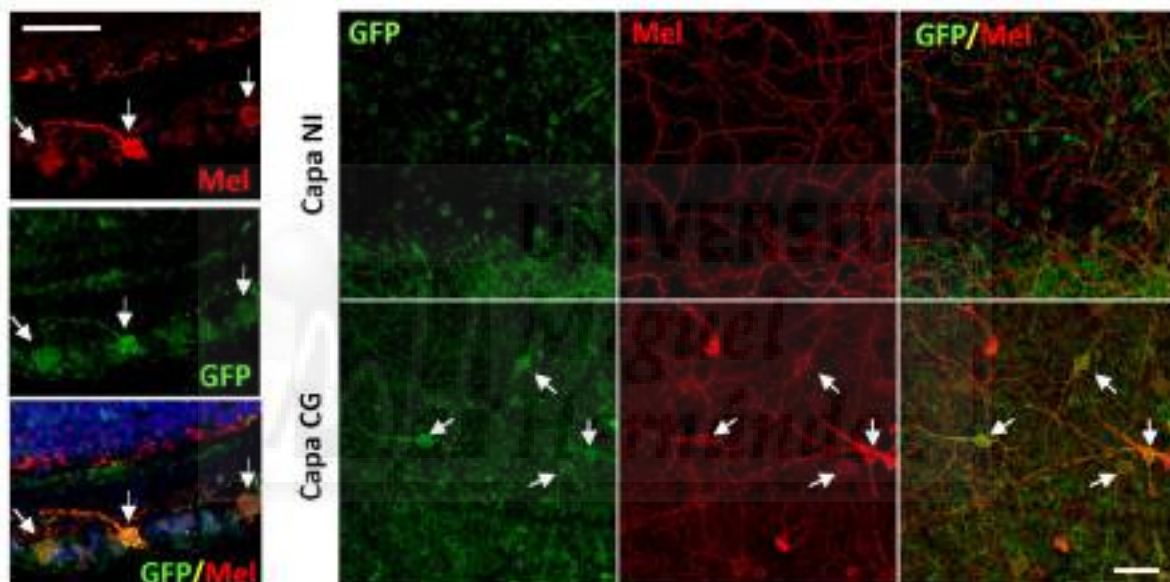


Figura 4.46 Marcaje inmunofluorescente en retina en la línea TRPM8-EGFPf a edad P15. Se visualiza la detección de células GFP+ (verde), en combinación con células que expresan el fotopigmento melanopsina (rojo). A la izquierda, corte transversales realizados en criostato (20 μ m). A la derecha montaje en “whole mount”, donde se visualizan separadamente la proyección máxima correspondiente a la capa NI y a la capa CG. Se indican con flechas algunos lugares en que se observa colocalización. Barras de escala: 50 μ m

4.4.4 Proyecciones retinianas de neuronas GFP+ al cerebro.

4.4.4.1 Proyecciones al núcleo supraquiasmático.

Las neuronas ganglionares que expresan melanopsina proyectan sus axones hacia regiones concretas del SNC a través del nervio óptico. Su principal diana de proyección es el núcleo supraquiasmático (Sch), aunque también llegan hasta otras estructuras como el núcleo

geniculado lateral, la oliva pretectal y el colículo superior (Hattar et al., 2006; Ecker et al., 2010). Se describen varios subtipos de células melanopsínicas y todos proyectan al Sch, aunque lo hacen en distinto grado (revisado por Schmidt et al., 2011). Puesto que algunos de los modelos transgénicos estudiados marcan una subpoblación de células ganglionares con expresión de melanopsina, decidimos estudiar la señal de GFP en el Sch. La distribución de las fibras visualizadas podría indicarnos si las poblaciones con inmunorreactividad GFP detectadas en cada línea están relacionadas.

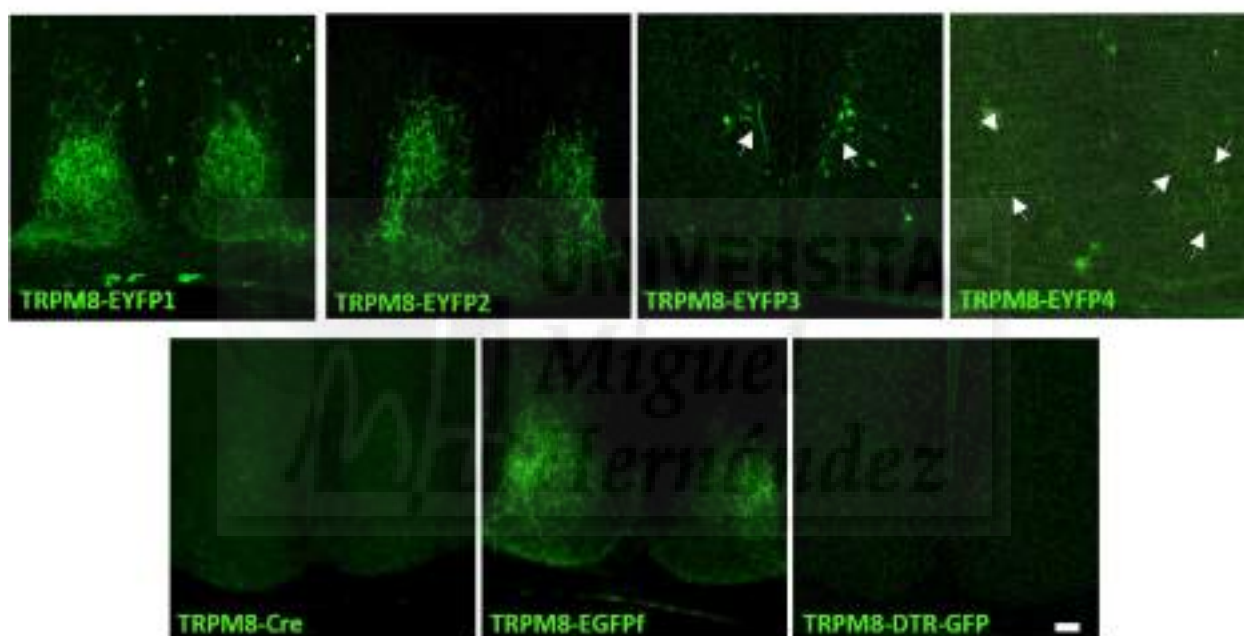
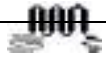


Figura 4.47 Fibras GFP+ en el núcleo supraquiasmático. Cortes coronales (70-80 μm) de cerebro de ratones procedentes de las líneas transgénicas para TRPM8 indicadas. Las imágenes pertenecen a animales adultos de entre 1-3 meses, excepto en la línea TRPM8-EGFPf que es un animal a edad P15. En las líneas TRPM8-EYFP3 y 4 se indican con flechas la ubicación de algunas fibras. Las imágenes mostradas para las líneas TRPM8-EYFP4 y TRPM8-EGFPf son de microscopía de fluorescencia, el resto son de microscopía confocal. Barra de escala: 50 μm .

El patrón de marcaje axonal encontrado en las líneas TRPM8-EYFP1, TRPM8-EYFP2, TRPM8-EYFP4 y TRPM8-EGFPf mostró bastantes similitudes. En TRPM8-EYFP1, aunque el marcaje fue más generalizado y abundante, las fibras predominantes se observaron en la zona central, lateral y dorsal, al igual que el marcaje más restringido de los modelos TRPM8-EYFP2 y TRPM8-EGFPf. Las fibras GFP observadas en la línea TRPM8-EYFP4 predominaron en posición



central y dorsal en mucha menor cantidad. En la línea TRPM8-EYFP3, aunque se visualizaron unas fibras aisladas en la zona más dorsal, también se observaron unos somas en baja proporción en este lugar, de donde podrían provenir. Finalmente, en las líneas TRPM8-Cre y TRPM8-DTR-GFP no se observó ningún marcaje axonal en el núcleo supraquiasmático ([figura 4.47](#)), un dato esperable ya que estas líneas marcan únicamente neuronas amacrinias.

4.4.4.2 Proyecciones retinianas GFP+ al cerebro en las líneas TRPM8-EGFPf y TRPM8-EYFP1.

Para caracterizar con más detalle el resto de las posibles proyecciones de las neuronas ganglionares GFP+ al cerebro utilizamos la línea TRPM8-EGFPf, a edad juvenil, por ser un excelente trazador axonal. A modo comparativo, también se estudió el patrón visualizado en la línea TRPM8-EYFP1. Como ya hemos indicado, ambas líneas mostraron un buen marcaje en el núcleo supraquiasmático, lo que sugiere la presencia de fibras de proyección de las neuronas melanopsínicas. Para asegurarnos del origen retiniano de las fibras axonales estudiadas en el cerebro, se procedió a realizar, mediante inyección intraocular (consultar métodos), un marcaje anterógrado generalizado de las proyecciones ganglionares hacia el sistema nervioso central con CTB (toxina colérica, subunidad B) acoplada al marcador fluorescente Alexa-Fluor 594.

La inyección intraocular se realizó en ambos ojos para obtener un marcaje anterógrado bilateral, y 72 horas después de la inyección, se visualizó en cortes histológicos transversales de las retinas y coronales del cerebro. Como se puede ver en las [figuras 4.49 y 4.51](#), la capa de las células ganglionares de la retina se observó completamente teñida con el fluoróforo CTB-594, al igual que los núcleos receptores de sus proyecciones en el cerebro, que de este modo, fueron fácilmente identificados. Las áreas cerebrales en las que se obtuvo un abundante marcaje CTB positivo, y que se estudiaron, fueron: el quiasma óptico ([figura 4.48](#)), el núcleo supraquiasmático ([figura 4.49 B y 4.51 B](#)), la oliva pretectal ([figura 4.49 C y 4.51 C](#)), el núcleo geniculado lateral ([figura 4.49 D-F y 4.51 D-F](#)) y el colículo superior ([figura 4.49 G y 4.51 G](#)); todas ellas principales zonas de proyección de neuronas ganglionares melanopsínicas (Hattar et al., 2006; Ecker et al., 2010). El marcaje, que abarcaba toda la superficie de estos núcleos, se comprobó similar al descrito en trabajos previos que también utilizaron CTB para el estudio de proyecciones retinianas al cerebro en roedores (Johnson et al., 1988; Levine et al., 1991;

Mikkelsen, 1992; Jaubert-Miazza et al., 2005; Lyckman et al., 2005; Hattar et al., 2006; Güler et al., 2008; Morin et al., 2014; Langel et al., 2015).

En todos los núcleos estudiados se visualizaron fibras GFP+ en ambas líneas reporteras. El patrón de marcaje identificado fue relativamente similar entre ellas, aunque siempre más abundante en la línea TRPM8-EYFP1. El marcaje se observó en ambos hemisferios del cerebro por igual y fue persistentemente identificado en todos los animales analizados, independientemente de su sexo.

En la línea TRPM8-EGFPf, se hizo un estudio más detallado en cuanto a colocación. A pesar de la dificultad que suponía este análisis debido a la gran densidad de fibras CTB+ presentes, pudimos comprobar que en estas ubicaciones había fibras que co-expresaban GFP y CTB, lo que aseguraba su procedencia desde neuronas ganglionares de la retina.

Así se identificaron fibras GFP+ distribuyéndose por todo el quiasma óptico (figura 4.48), donde pudimos identificar algunas fibras marcadas con CTB-594.

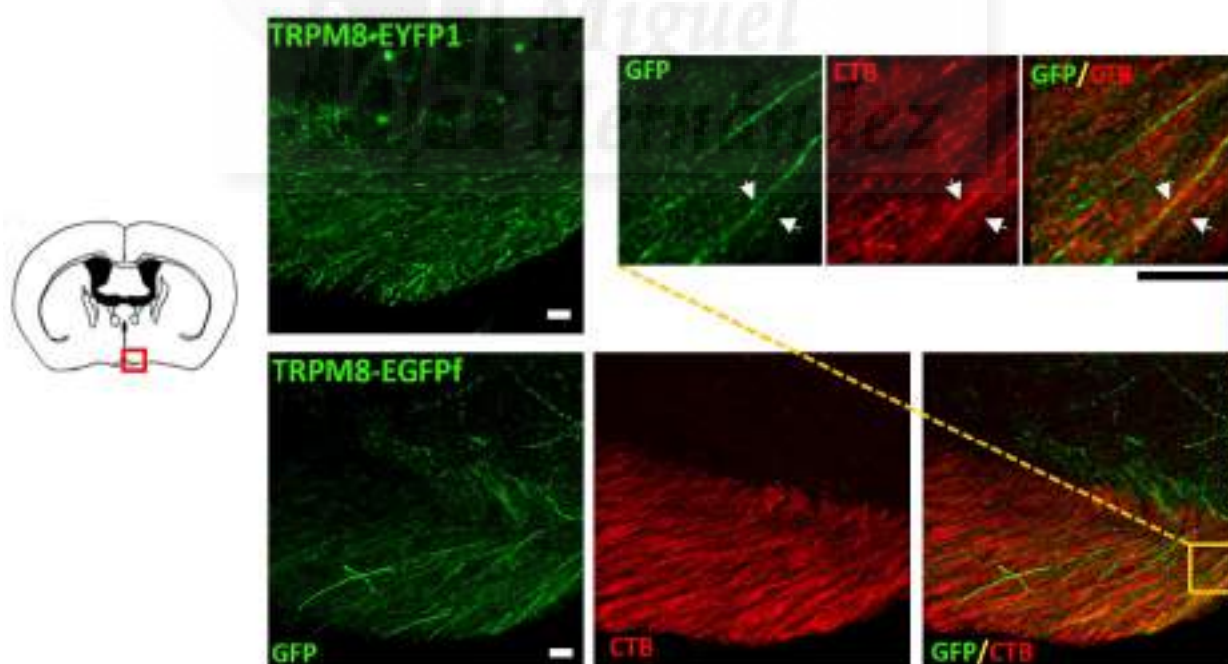
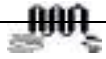


Figura 4.48 Imagen confocal en la que se aprecian axones GFP+ (verde) que discurren por el quiasma óptico en las líneas transgénicas TRPM8-EYFP1 y TRPM8-EGFPf. En la línea TRPM8-EGFPf también se muestra el marcaje CTB+ en rojo. El detalle encuadrado se muestra encima. Las fibras que colocalizan ambos marcajes se indican con flechas. Barra de escala: 25 μ m.

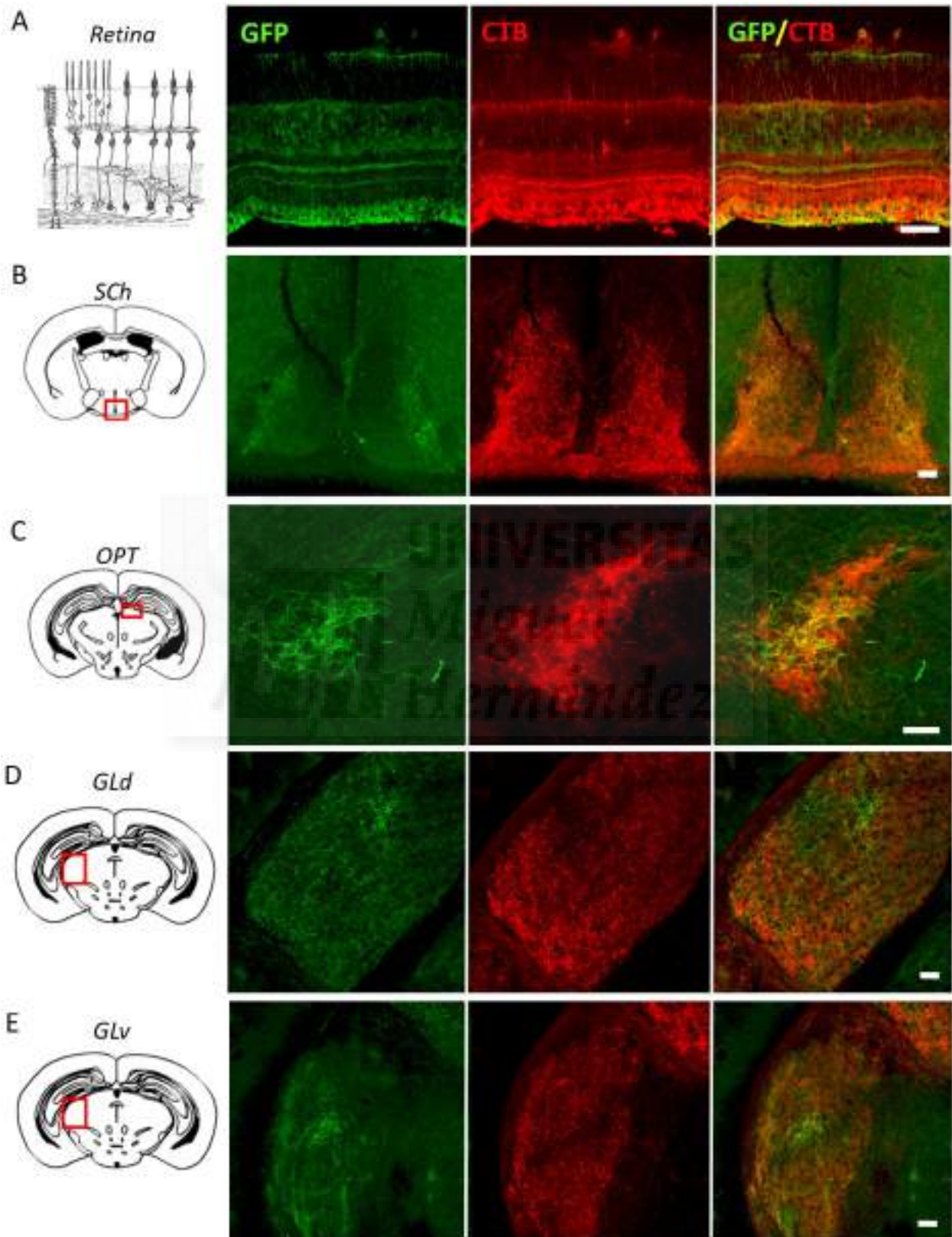


Igualmente, se identificaron fibras con inmunorreactividad GFP en el núcleo supraquiasmático, distribuyéndose con el patrón de marcaje descrito en el apartado anterior (figura 4.49 B y 4.51 B), y en la oliva pretectal dispersas por su superficie (figura 4.49 C y 4.51 C). En ambas ubicaciones también se determinaron fibras GFP+ con co-expresión CTB+ (figura 4.50).

En el núcleo geniculado lateral en su parte dorsal (Gld), en la línea TRPM8-EGFPf, se detectaron fibras dispersas en toda su superficie, excepto en su parte más medial en que no se visualizó marcaje; en la línea TRPM8-EYFP1 el marcaje fue similar pero ubícuo, además de mostrar largos axones que recorrían todo el lateral (figura 4.49 D y 4.51 D). En ambas líneas, en la parte más anterior de este emplazamiento, se visualizó una llamativa acumulación de fibras fluorescentes en situación dorso-medial que por su ubicación podrían corresponderse con proyecciones ipsilaterales (Jaubert-Miazza et al., 2005)(figura 4.52). Por otro lado, en la parte ventral de núcleo geniculado lateral (Glv), en ambas líneas, el marcaje principal se concentró en su parte central, aunque también se visualizaron algunas fibras dispersas. Además, en la línea TRPM8-EYFP1 se observó una agrupación de fibras en la parte dorsal y algunos axones que, al igual que en el Gld, recorrían todo el lateral del núcleo (figura 4.49 E y 4.51 E). El núcleo intergenicular (iGL), que separa ambas regiones del núcleo geniculado lateral (Gld y Glv), presentó una densidad homogénea de fibras GFP+ a lo largo de toda su superficie en ambas líneas transgénicas, aunque evidentemente superior en la línea TRPM8-EYFP1 (figura 4.49 F y 4.51 F).

Tanto en el núcleo geniculado lateral como en el intergenicular se detectaron fibras GFP+ que co-expresaban CTB-594. En la figura 4.50 muestra un ejemplo de esta colocación en el Gld.

Para terminar, en el colículo superior, en la línea TRPM8-EGFPf se observaron fibras fluorescentes de forma homogénea por la parte más central y ventral del núcleo. En la línea TRPM8-EYFP1 las fibras se observan en las mismas ubicaciones, aunque en la parte ventral son mucho más abundantes que en el centro (figura 4.49 G y 4.51 G). No se analizó la co-expresión con CTB-594 en esta ubicación.



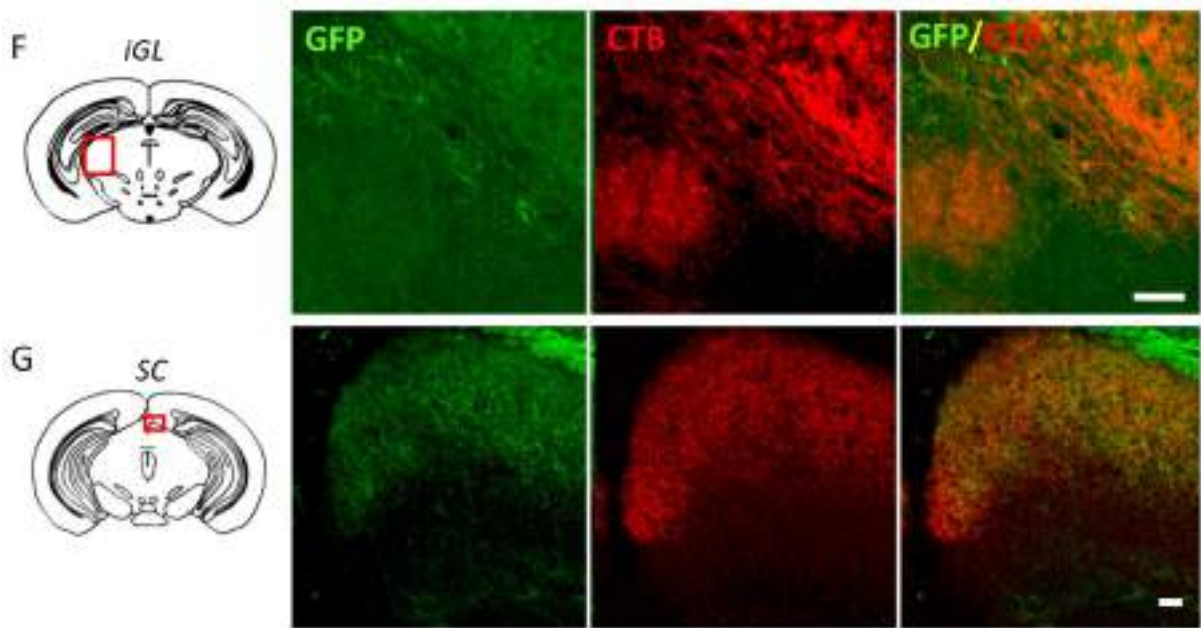
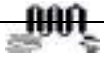


Figura 4.49 Fibras GFP+ (verde) visualizadas en el cerebro de animales P15-P21 homocigotos en la línea TRPM8-EGFPf en combinación con el marcaje anterógrado CTB-594 (rojo) de axones retinianos generado mediante inyección binocular. (A-G) A la izquierda se muestra un esquema de la retina (A) o del corte coronal en que se ubica el núcleo mostrado en las imágenes de microscopía confocal que se muestran a la derecha (B-G). Áreas indicadas: núcleo supraquiasmático (SCh), núcleo geniculado en su parte dorsal (GLd), parte intergenérica (iGL) y parte ventral (GLv), oliva pretectal (OPT), colículo superior (SC) y quiasma óptico (Op). Grosor de corte: 20 μm (retina) y 60 μm (resto). Barra de escala: 50 μm .

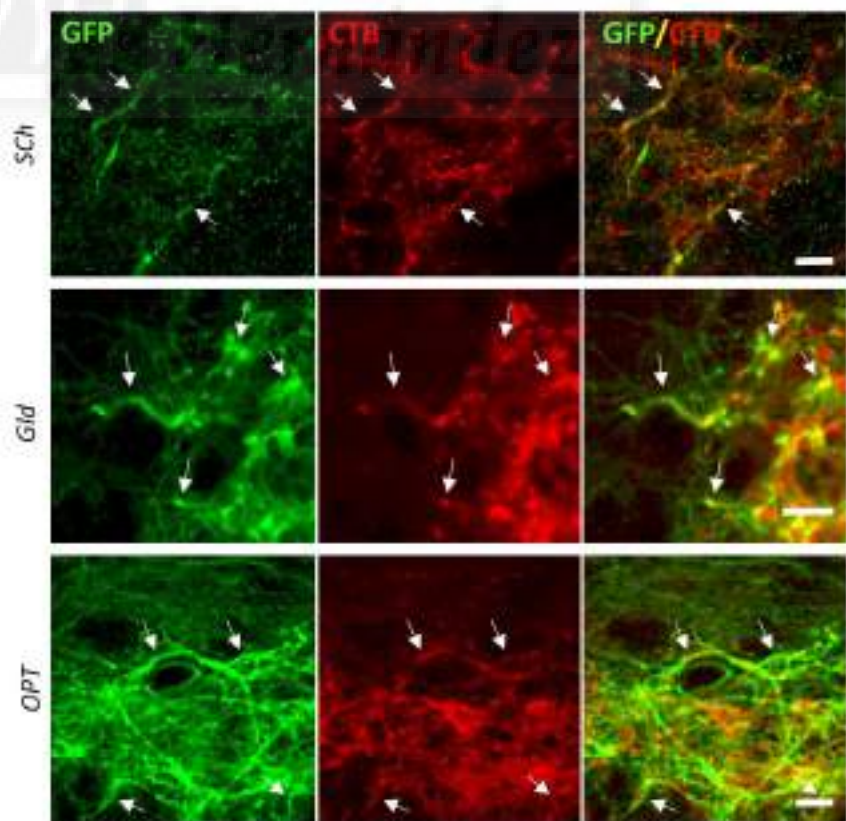
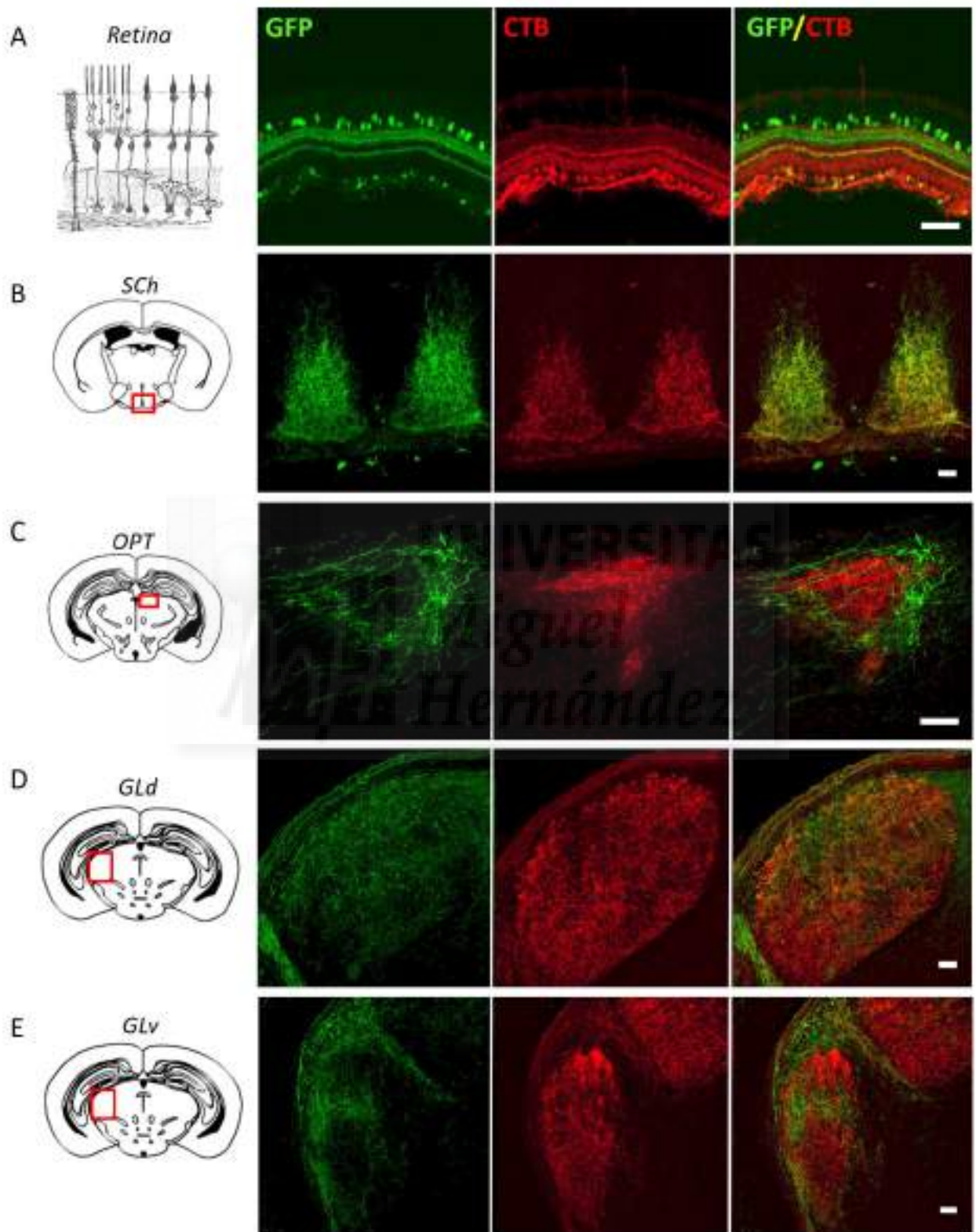


Figura 4.50 Detalle de la colocalización entre fibras GFP+ (verde) y proyecciones retinianas marcadas anterógradamente con CTB-594 (rojo) en la línea TRPM8-EGFPf en el núcleo supraquiasmático (SCh), geniculado dorsal (GLd) y oliva pretectal (OPT). Barra de escala: 10 μm .



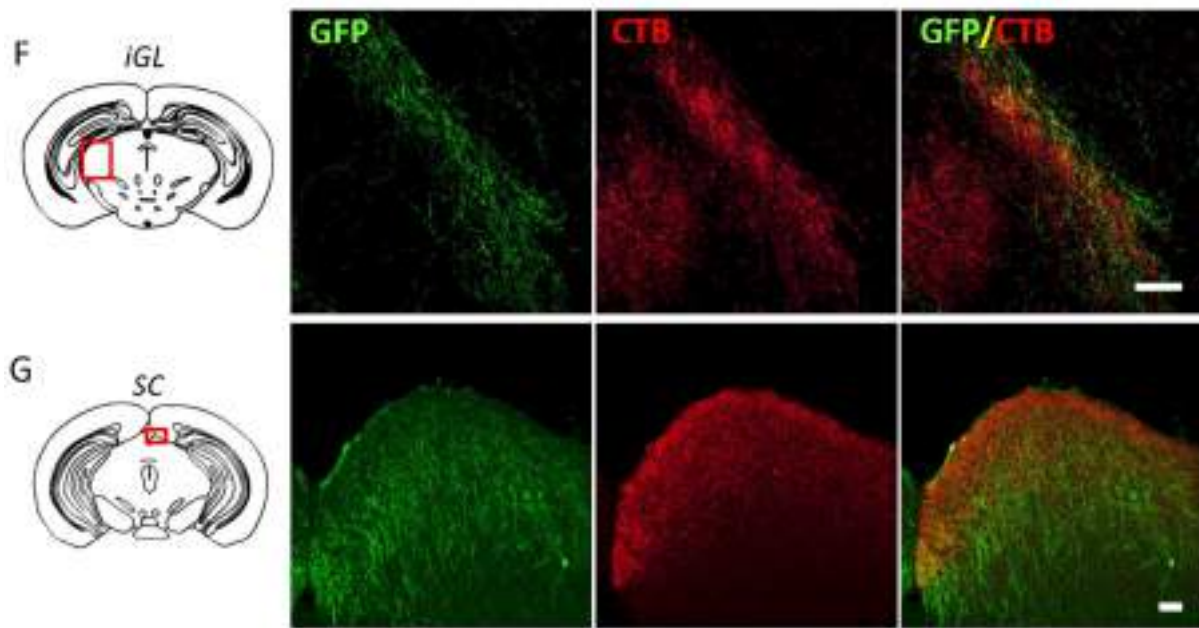


Figura 4.51 Fibras GFP+ (verde) visualizadas en el cerebro de animales adultos de la línea TRPM8-EYFP1 en combinación con el marcaje anterógrado CTB-594 (rojo) de axones retinianos generado mediante inyección binocular. (A-G) A la izquierda se muestra un esquema de la retina (A) o del corte coronal en que se ubica el núcleo mostrado en las imágenes de microscopía confocal situadas a la derecha (B-G). Áreas mostradas: núcleo supraquiasmático (Sch), núcleo geniculado en su parte dorsal (GLd), parte intergenicular (iGL) y parte ventral (GLv), oliva pretectal (OPT) y colículo superior (SC). Grosor de corte: 20 μm (retina) y 60 μm (resto). Barra de escala: 50 μm .

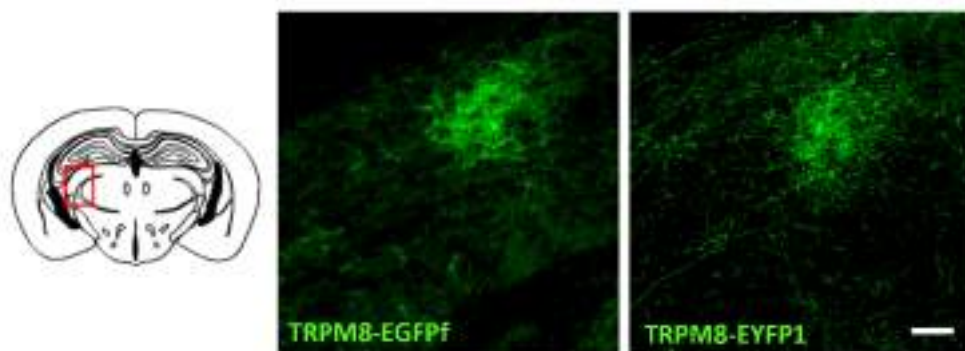


Figura 4.52 Imagen confocal que muestra la agrupación de fibras marcadas visualizadas en un corte coronal del área más anterior de la parte dorsal del núcleo geniculado (GLd) en las líneas transgénica TRPM8-EGFPf y TRPM8-EYFP1. Barra de escala: 50 μm .

Para finalizar, queda comentar que en los animales adultos de la línea TRPM8-EGFPf, en paralelo a la importante disminución de la inmunorreactividad GFP observada en la retina, se observó la desaparición o reducción considerable de las fibras GFP+ en los núcleos de proyección mencionados. En la **figura 4.53 H** se muestra este hallazgo en el quiasma óptico, núcleo supraquiasmático y núcleo geniculado dorsal y ventral.

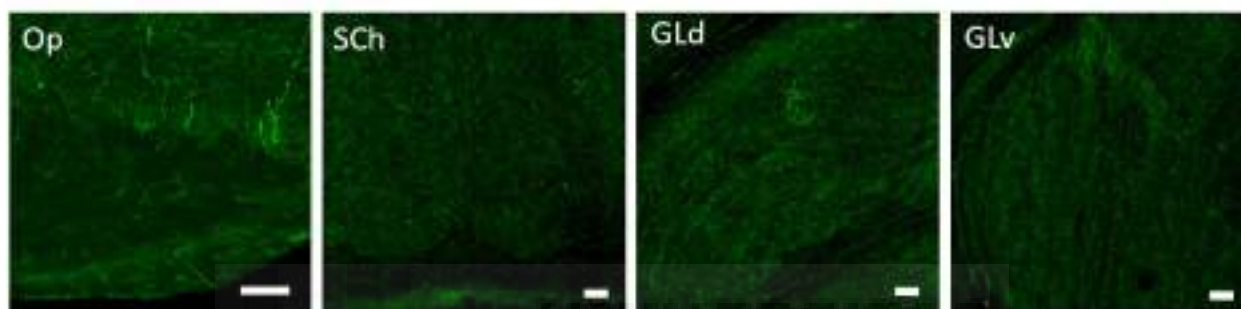


Figura 4.53 Áreas del cerebro receptoras de fibras GFP+ en ratones homocigotos (EGFPf/EGFPf) adultos de la línea TRPM8-EGFPf en que se puede apreciar una clara disminución/desaparición de las fibras positivas identificadas. Áreas mostradas: Quiasma óptico (Op), núcleo supraquiasmático (Sch), núcleo geniculado en su parte dorsal (GLd), y ventral (GLv). Grosor de corte: 60 μm . Barra de escala: 50 μm



4.5 Papel de TRPM8 en la osmorregulación.

Experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio parecen indicar que TRPM8 tendría cierta influencia en el mecanismo osmorregulatorio que desencadena la sed, viéndose funcionalmente disminuido en animales que no expresan este termorreceptor (Denlinger, 2014).

Con el objetivo de averiguar si esta alteración se produce a nivel central, estudiamos el posible papel de TRPM8 en los mecanismos de osmorregulación y sed. En primer lugar hemos analizado la expresión de TRPM8 en regiones del cerebro relacionadas con estas funciones y, posteriormente, hemos determinado el nivel de activación de Fos en respuesta a un estímulo hiperosmolar en las neuronas de estas ubicaciones. Para estos estudios hemos utilizado la línea TRPM8-EGFPf ya que nos permite comparar animales homocigotos, carentes de TRPM8, con sus parientes hemocigotos y silvestres.

4.5.1 Expresión de TRPM8 en núcleos osmorreguladores del hipotálamo.

Los núcleos cerebrales VOLT, SFO y MnPO constituyen la lámina terminal (LT), el principal centro osmorregulador del organismo (Zimmerman et al., 2017). Tanto el VOLT como el SFO poseen neuronas osmosensibles que detectan las alteraciones de la osmolaridad del plasma, y ponen en marcha los mecanismos fisiológicos necesarios para su restablecimiento, mediante la activación de neuronas en otros núcleos hipotalámicos, principalmente las neuronas de vasopresina del SO y PVH (revisado por Leib et al., 2016). El MnPO jugaría un papel integrador importante también en la osmorregulación.

En primer lugar estudiamos en detalle la expresión de TRPM8 en estas regiones cerebrales osmorreguladoras mediante la utilización del ratón reportero TRPM8-EGFPf. Así, constatamos la presencia de células GFP+ alrededor del núcleo VOLT, una zona donde precisamente se ha descrito la presencia de osmorreceptores (figura 4.54 1) (Kinsman et al., 2017). Además, hemos observado abundantes fibras inmunorreactivas atravesando o rodeando el MnPO, PVH y SO (figura 4.54 2, 4 y 5) lo que podría indicar una posible influencia de TRPM8 sobre la actividad de estos núcleos. A diferencia de ello no hemos encontrado inmunorreactividad GFP en el SFO (figura 4.54 3).

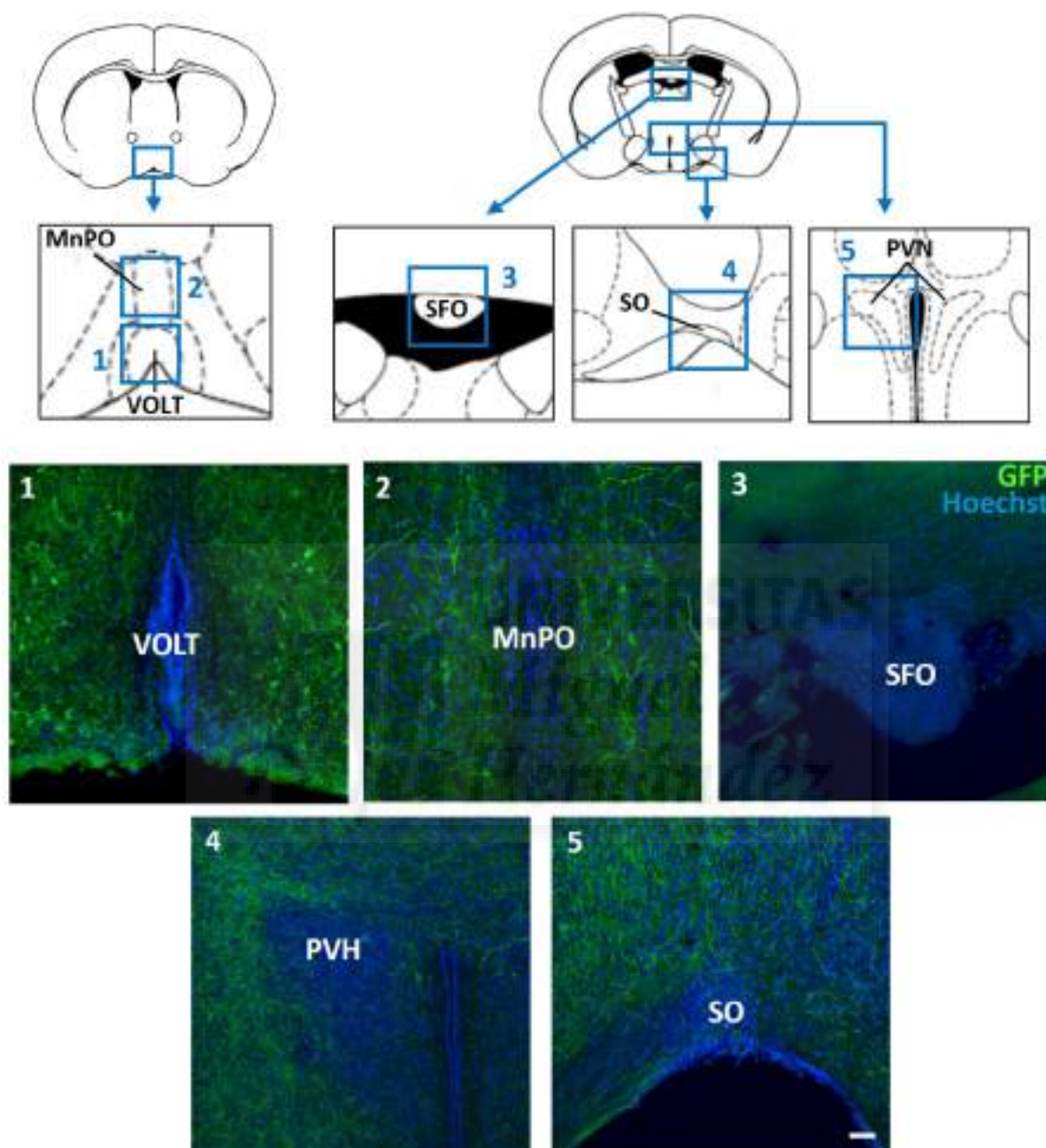


Figura 4.54 Detección inmunohistológica de GFP en la línea TRPM8-EGFPf en los principales núcleos del hipotálamo relacionados con la osmorregulación. En la parte superior se muestran varios esquemas que ubican el emplazamiento de los núcleos a estudio en el hipotálamo anterior. Los cuadros numerados hacen referencia a la localización de las imágenes de microscopía confocal que se muestran en los cuadros inferiores y en las que se distinguen los siguiente núcleos: VOLT (1), MnPO (parte anterior) (2), SFO (3), PVH (4) y SO (5). Barra de escala 50 μ m



4.5.2 Efecto de la hipernatremia aguda en la activación de *cfos* en el hipotálamo anterior.

Para comprobar si la presencia de TRPM8 tiene algún efecto sobre la funcionalidad de los núcleos mencionados, se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de *cfos* en estas estructuras en respuesta a un incremento agudo en la osmolaridad circulante. Para ello, se inyectaron ratones homocigotos (KO), hemicigotos y silvestres de la línea TRPM8-EGFPf, con solución hiperosmolar alta en sodio (NaCl 1M), o solución salina (0.15 M, control).

Cuando los ratones fueron inyectados con solución control, se detectaron muy pocas células con expresión de Fos en los núcleos VOLT, SFO, MnPO, y SO; sin embargo, la inyección hiperosmolar generó un aumento evidente, y significativo, en el número de células Fos+, detectándose un marcaje de alta intensidad en estos núcleos, en todos los genotipos estudiados (figura 4.56-60 A y B). El análisis estadístico con el test ANOVA de dos vías indicó que el factor osmolaridad es significativo en cuanto a la activación de c-fos en todos los núcleos estudiados.

Es importante destacar que, en el caso de VOLT, la activación de Fos no se produjo en las células GFP+ que rodean al núcleo, lo que indica que no son osmoceptoras; no obstante, algunos de sus axones parecen hacer sinapsis con células activas lo que podría aportar información térmica o de otro tipo e influir de manera indirecta en el proceso osmorregulador (figura 4.55).

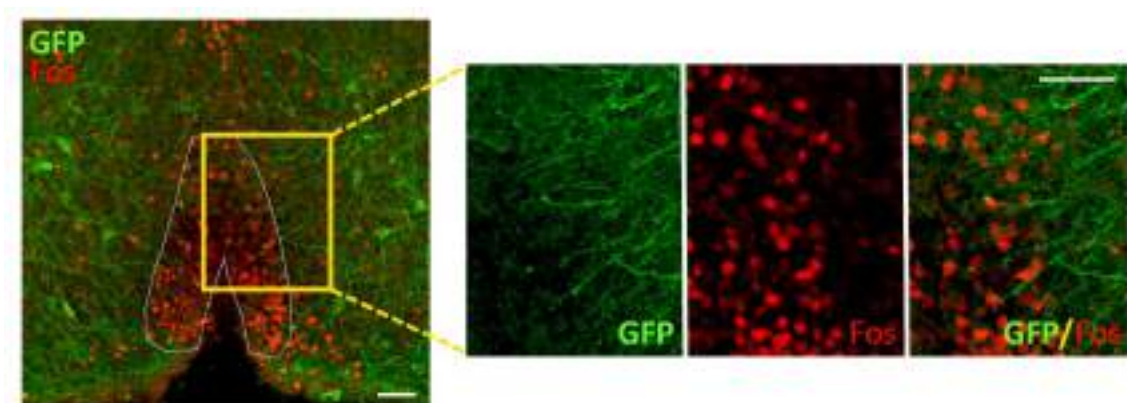


Figura 4.55 Activación de la expresión de Fos (rojo) en neuronas del VOLT en un ratón homocigoto de la línea TRPM8-EGFPf en respuesta a una inyección hiperosmótica de NaCl 1M. Se ha dibujado el contorno del núcleo VOLT con una línea blanca para facilitar su localización. A la derecha, se muestra el detalle encuadrado, en que se puede apreciar la llegada de axones GFP+ (verde) al núcleo VOLT desde la periferia. Cortes coronales de hipotálamo (60 μ m). Barras de escala: 50 μ m.

En el núcleo PVH, el incremento en el número de neuronas que expresaban Fos a causa de la inyección hiperosmolar, aunque significativo, lo fue en menor grado que en los otros núcleos, debido a un alto número de células ya activas que se pudieron apreciar en algunos animales tras la inyección de solución control. No obstante, la activación reportada por la inyección hiperosmolar fue mucho más contundente como se puede apreciar por el nivel de intensidad de la inmunodetección (figura 4.60 C).

Al comparar el grado de activación entre genotipos, en el VOLT, se constató un incremento general del número de células que expresaron Fos en los animales homocigotos respecto de los hemicigotos y silvestres (figura 4.56 B). Por otro lado, se observó una disminución del número de células en hemicigotos y homocigotos respecto de los animales silvestres en la parte medial del núcleo SFO (figura 4.57 B). En el resto de los núcleos estudiados, MnPO, PVH y SO, no encontramos diferencias significativas en el número de células con Fos cuantificadas para cada genotipo (figura 4.58-60 B).

En el núcleo MnPO se estudió por separado su parte anterior de su parte posterior, pero al no encontrar diferencias, se muestran los resultados conjuntos (figura 4.58 B).

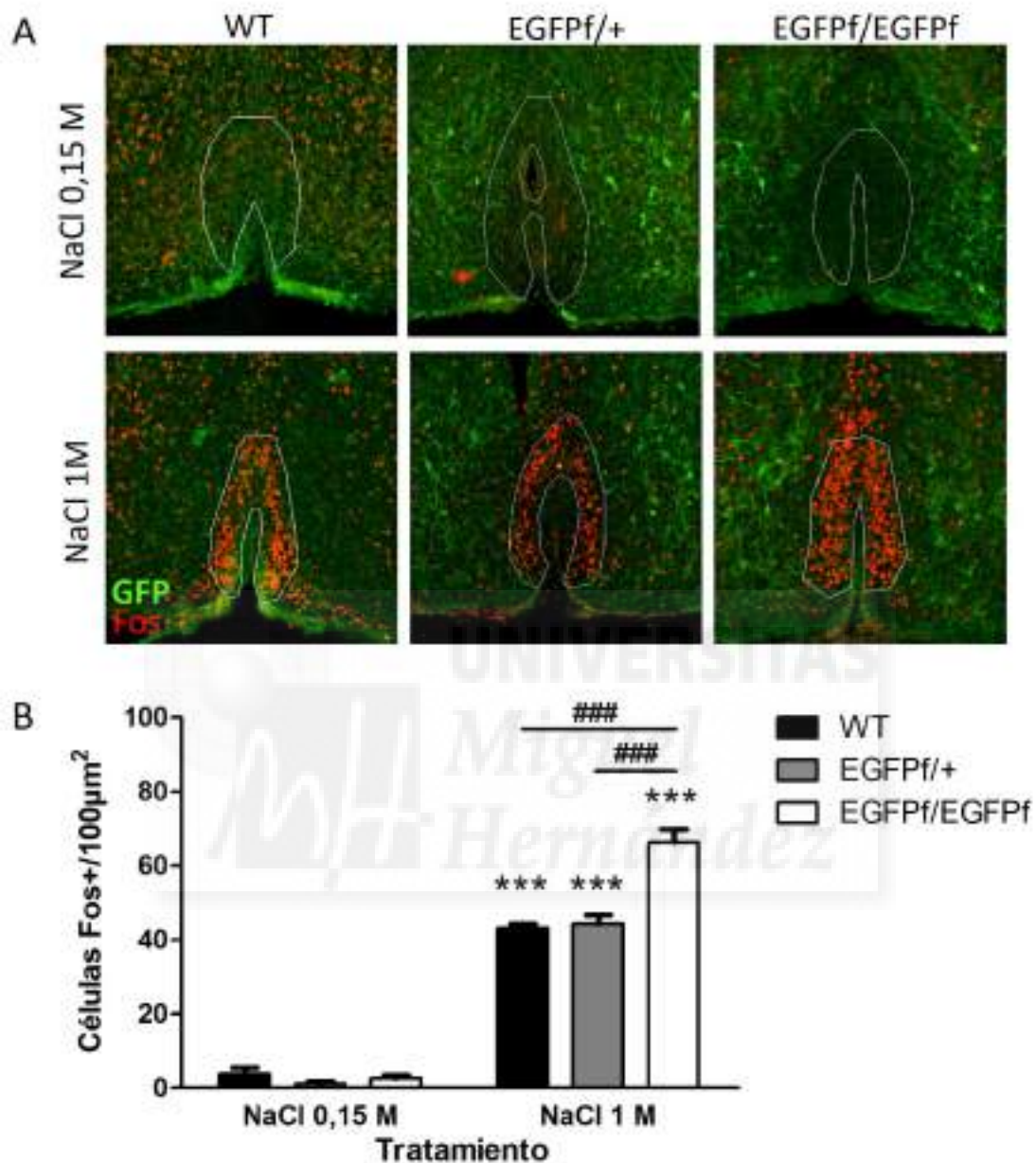


Figura 4.56 Activación de *c-fos* en neuronas del VOLT en ratones de la línea TRPM8-EGFPf. (A) VOLT en cortes coronales de hipotálamo (60 μm) en que se puede apreciar el incremento de la expresión de Fos (rojo) en animales silvestres (WT), hemicigotos (EGFPf/+) y homocigotos (EGFPf/EGFPf), en respuesta al tratamiento con solución hiperosmótica (NaCl 1M) respecto al tratamiento con solución salina (NaCl 0,15M). Se ha dibujado el contorno del núcleo con línea blanca para facilitar su localización. Barra de escala: 50 μm . (B) Cuantificación del número de células Fos+ identificadas en respuesta a cada tratamiento en cada genotipo. Los datos fueron analizados con el test ANOVA de dos vías, con osmolaridad y genotipo como factores. El factor osmolaridad fue estadísticamente significativo ($P < 0,001$), al igual que el factor genotipo ($P < 0,001$). El test posthoc de Bonferroni constató niveles más elevados de activación de Fos en el ratón homocigoto respecto de los heterocigotos y silvestres (### $P < 0,001$).

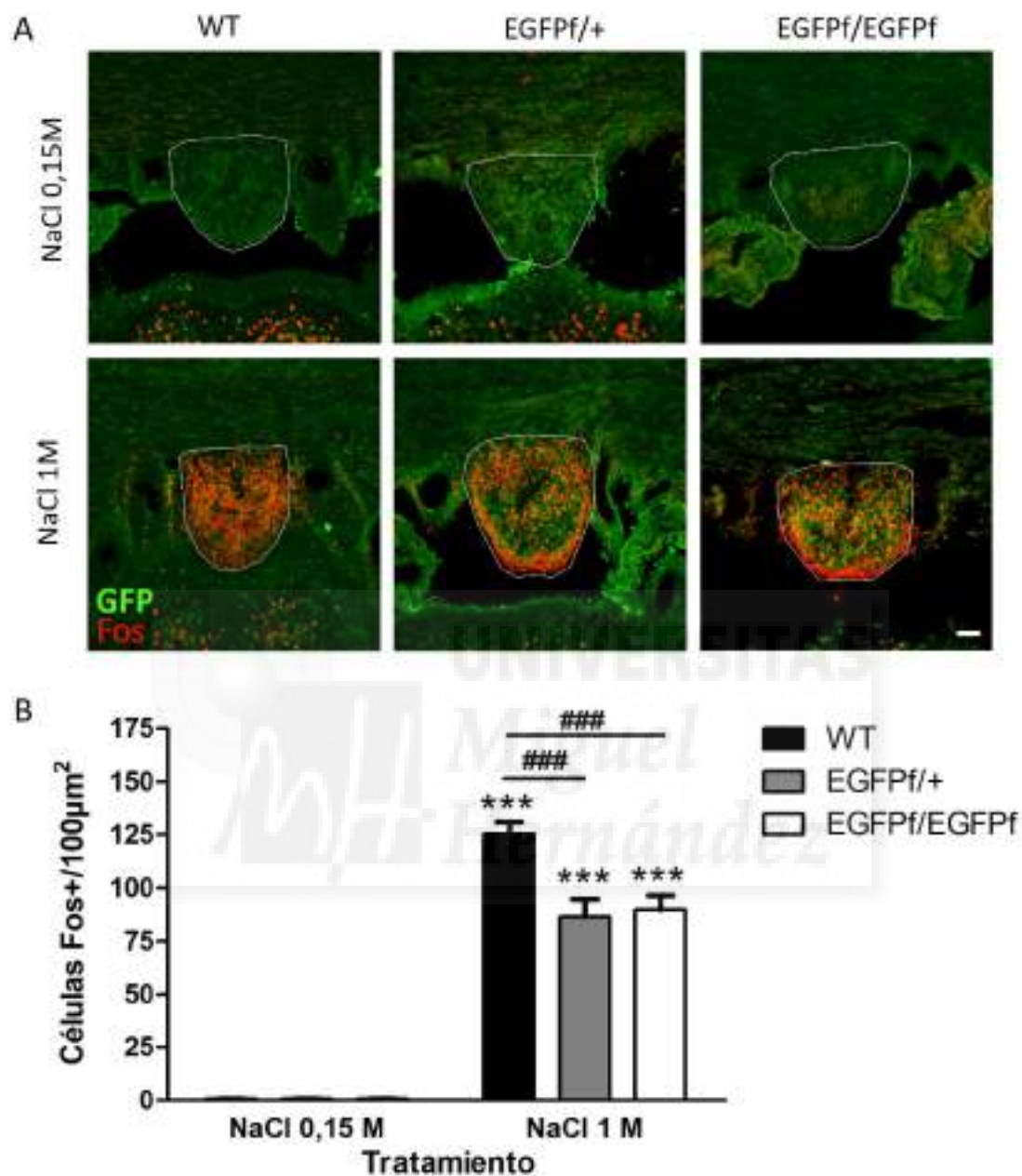


Figura 4.57 Activación de *cfos* en neuronas del SFO en ratones de la línea TRPM8-EGFPf. (A) SFO en cortes coronales de hipotálamo (60 μm) en que se puede apreciar el incremento de la expresión de Fos (rojo) en animales homocigotos (EGFPf/EGFPf), hemicigotos (EGFPf/+) y silvestres (WT), en respuesta al tratamiento con solución hiperosmótica (NaCl 1M) respecto al tratamiento con solución salina (NaCl 0,15M). El contorno del núcleo se muestra dibujado con línea blanca para facilitar su localización. Barra de escala: 50 μm . (B) Cuantificación del número de células Fos+ identificadas en respuesta a cada tratamiento en cada genotipo. Los datos fueron analizados con el test ANOVA de dos vías. El factor osmolaridad fue estadísticamente significativo ($P < 0,001$), al igual que el factor genotipo ($P < 0,001$). El test posthoc de Bonferroni evidenció mayores niveles de activación de Fos en el ratón silvestre respecto de los heterocigotos y homocigotos (### $P > 0,001$).

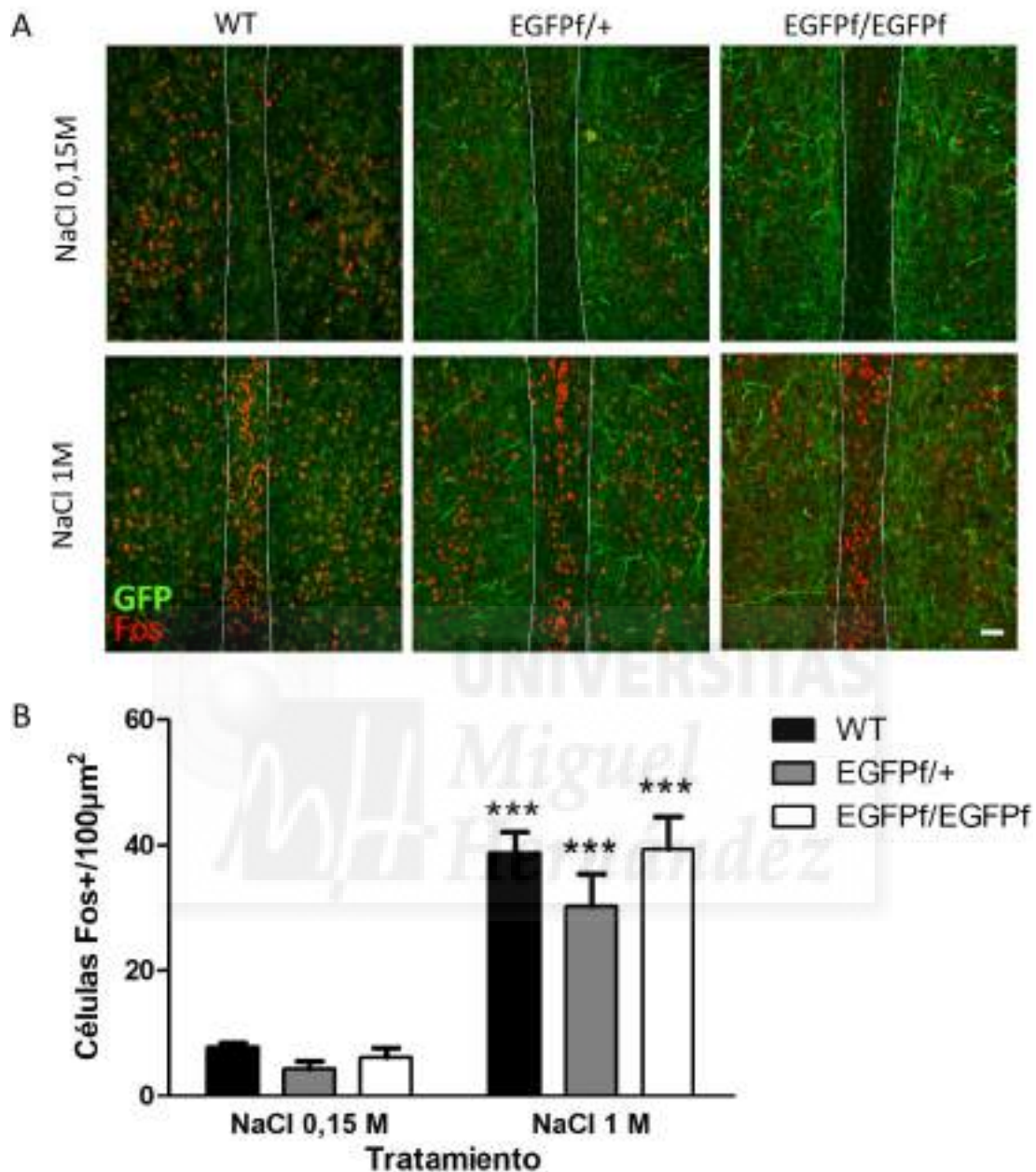


Figura 4.58 Activación de *cfos* en neuronas del núcleo MnPO en ratones de la línea TRPM8-EGFPf. (A) MnPO (parte anterior) en cortes coronales de hipotálamo (60 μ m) en que se puede apreciar el incremento de la expresión de Fos (rojo) en animales homocigotos (EGFPf/EGFPf), hemicigotos (EGFPf/+) y silvestres (WT), en respuesta al tratamiento con solución hiperosmótica (NaCl 1M) respecto al tratamiento con solución salina (NaCl 0,15M). El contorno del núcleo aparece dibujado con línea blanca para facilitar su localización. Barra de escala: 50 μ m. (B) Cuantificación del número de células Fos+ identificadas en respuesta a cada tratamiento en cada genotipo. Los datos fueron analizados con el test ANOVA de dos vías. El factor osmolaridad fue estadísticamente significativo ($P < 0,001$), no así el factor genotipo.

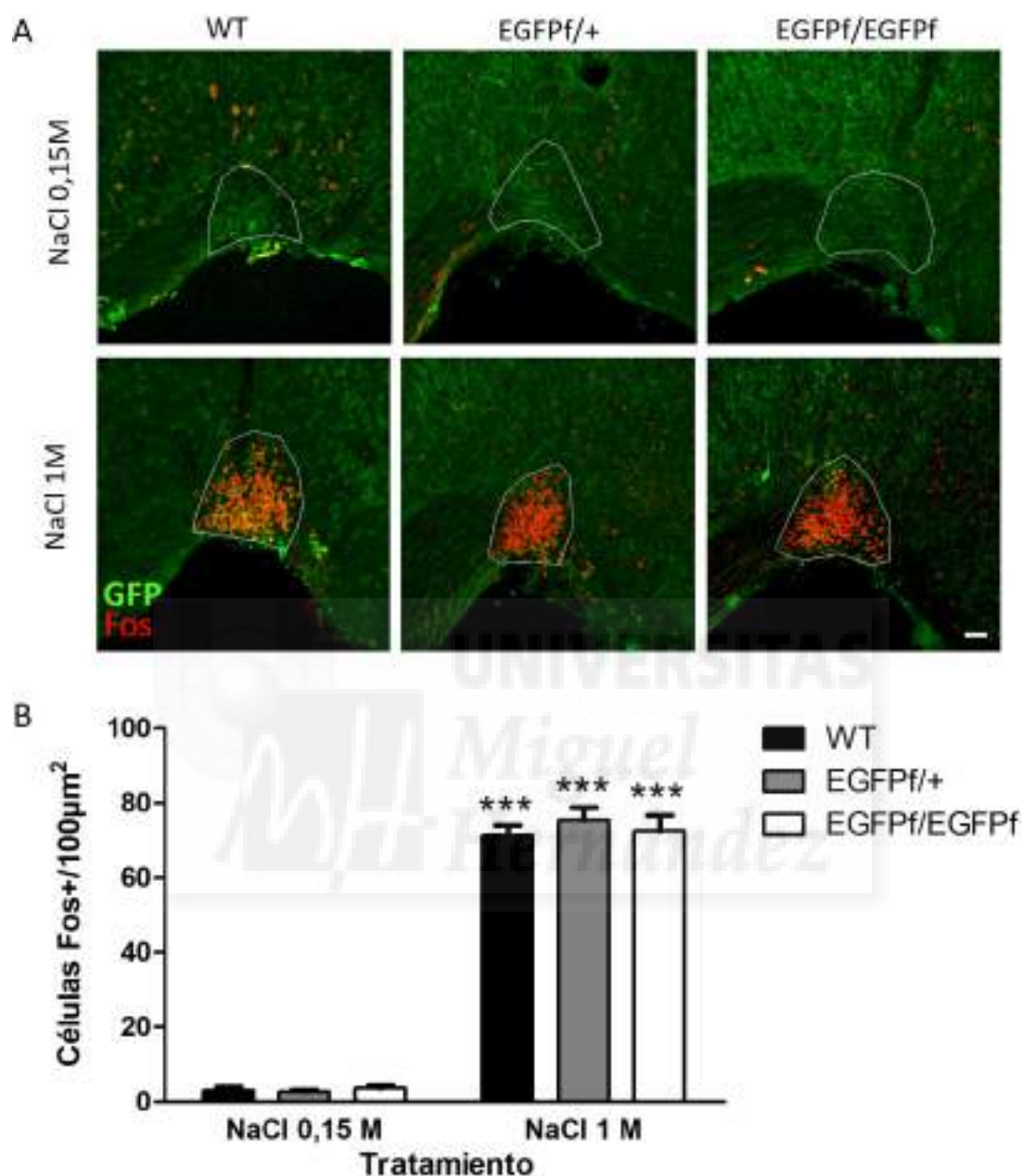


Figura 4.59 Activación de *cfos* en neuronas del núcleo SO en ratones de la línea TRPM8-EGFPf. (A) Cortes coronales del núcleo SO en hipotálamo (60 μm) en que se puede apreciar el incremento de la expresión de Fos (rojo) en animales homocigotos (EGFPf/EGFPf), hemicigotos (EGFPf/+) y silvestres (WT), en respuesta al tratamiento con solución hiperosmótica (NaCl 1M) respecto al tratamiento con solución salina (NaCl 0,15M). Se ha dibujado el contorno del núcleo con línea blanca para mostrar su localización. Barra de escala: 50 μm . (B) Cuantificación del número de células Fos+ identificadas en respuesta a cada tratamiento en cada genotipo. Los datos fueron analizados con el test ANOVA de dos vías. El factor osmolaridad fue estadísticamente significativo ($P < 0.001$), pero no el factor genotipo.

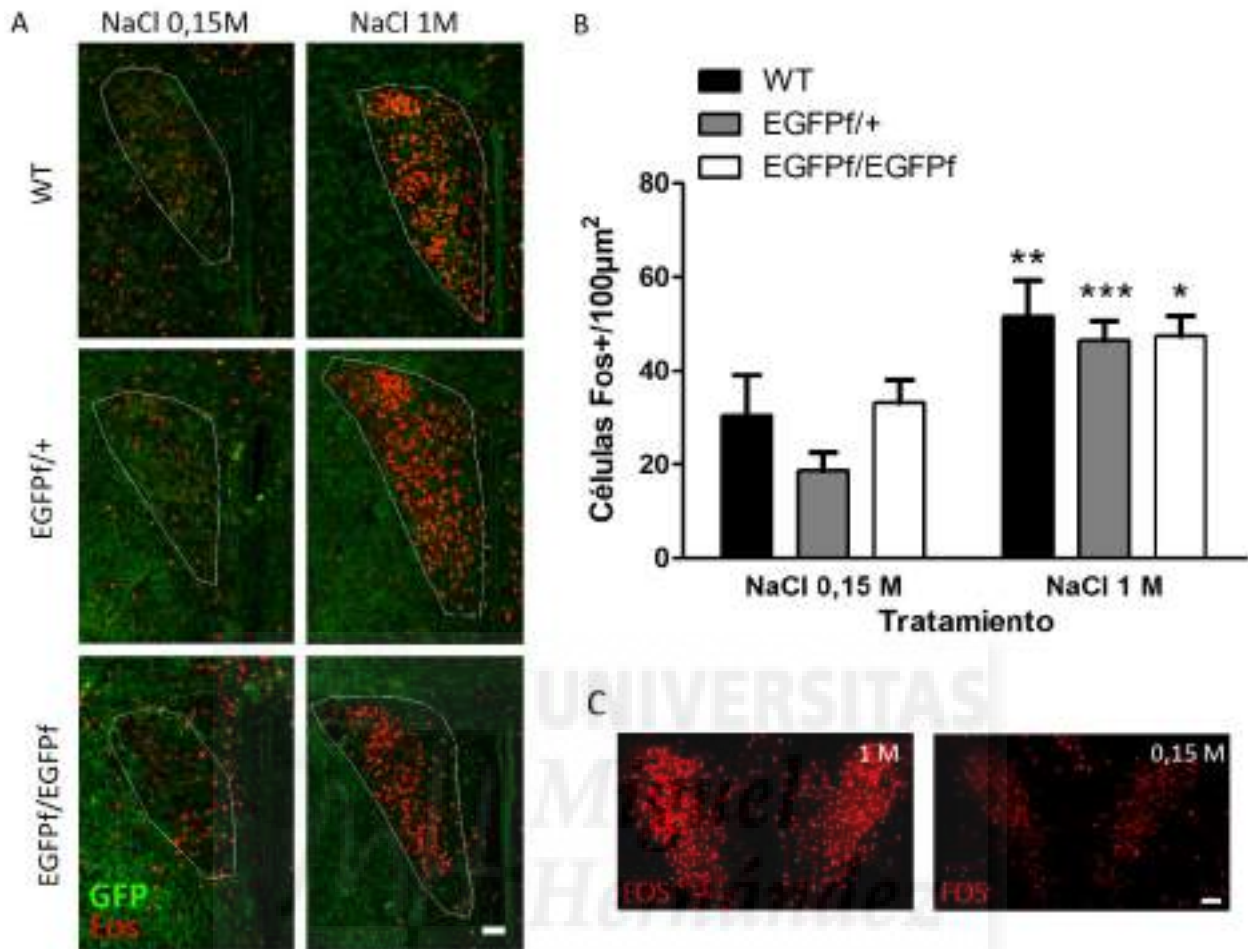


Figura 4.60 Activación de cfos en neuronas del núcleo PVH en ratones de la línea TRPM8-EGFPf. (A) PVH en cortes coronales de hipotálamo (60 μm) en que se puede ver el incremento de la detección de Fos (rojo) en animales homocigotos (EGFPf/EGFPf), hemocigotos (EGFPf/+) y silvestres (WT), en respuesta al tratamiento con solución hiperosmótica (NaCl 1M) respecto al tratamiento con solución salina (NaCl 0,15M). Se ha dibujado el contorno del núcleo con línea blanca para facilitar su localización. Barra de escala: 50 μm . (B) Cuantificación del número de células Fos+ identificadas en respuesta a cada tratamiento en cada genotipo. Los datos fueron analizados con el test ANOVA de dos vías. El factor osmolaridad fue estadísticamente significativo ($P < 0.001$), pero no el factor genotipo. (C) A la izquierda, marcaje típico encontrado en animales sometidos a tratamiento hiperosmótico; a la derecha, marcaje ocasionalmente encontrado en animales con tratamiento salino.

5. Discusión.



5.1 Evaluación de líneas transgénicas de ratón que expresan el canal iónico TRPM8 en combinación con reporteros fluorescentes.

El canal iónico termosensible TRPM8 se encuentra bien caracterizado dentro de un pequeño subgrupo de neuronas sensoriales primarias; se sabe que son de pequeño tamaño y que desempeñan un papel clave en la detección del frío moderado (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b). Por el contrario, se conoce muy poco sobre su expresión fuera de estos ganglios, así como de sus implicaciones funcionales en otros procesos biológicos. Sin embargo, su presencia en tejidos que no están expuestos a variaciones térmicas importantes, como la próstata o en distintos tumores, sugiere que podría tener funciones adicionales en el organismo.

Las distintas técnicas inmunohistoquímicas existentes podrían ser muy útiles para realizar estudios con esta finalidad, pero implican la utilización de anticuerpos que muestren una gran sensibilidad y especificidad para obtener así una señal de marcaje clara y veraz. En el caso de TRPM8, aunque en la bibliografía se pueden encontrar diversos trabajos en los que detectan el canal por esta metodología, en nuestras manos, no hemos logrado conseguir ningún anticuerpo comercial que nos ofrezca resultados lo suficientemente satisfactorios y fiables. Por ello, con el fin de arrojar luz sobre estas cuestiones, y como alternativa al uso de anticuerpos, se han generado distintos modelos animales transgénicos que expresan reporteros fluorescentes en las células de interés, lo que facilita su localización y análisis. La falta de anticuerpos fiables para la detección de TRPM8, implica que estas estrategias genéticas se conviertan en una herramienta fundamental para el estudio de la distribución y función del canal a todos los niveles. No obstante, antes de usar un modelo transgénico como reportero, es necesario evaluarlo cuidadosamente a fin de establecer una relación real entre marcaje, expresión y funcionalidad.

Con esta premisa, nos hemos propuesto caracterizar en detalle siete líneas de ratones transgénicos reporteros para TRPM8, las cuales co-expresan en las mismas células que la proteína, un reportero fluorescente (GFP o YFP). En este apartado, evaluamos la fiabilidad de cada una de ellas, discutiendo los pros y contras de su uso.



5.1.1 Análisis del marcaje fluorescente: intensidad y detección inmunohistoquímica.

En cada una de las líneas transgénicas a estudio, se evaluó el marcaje fluorescente que localiza la expresión del canal termosensible TRPM8. Así, pudimos constatar notables diferencias en cuanto a la intensidad de la fluorescencia exhibida y su posibilidad de detección mediante métodos inmunohistoquímicos.

En la línea TRPM8-EYFP1 se consiguió una visualización adecuada de las células marcadas en cortes histológicos, tanto al observar la fluorescencia endógena del reportero (muestras únicamente fijadas), como en muestras en las que se amplificó su señal, utilizando un anticuerpo anti-GFP. En el resto de las líneas, fue necesario realizar esta inmunodetección para poder conseguir niveles de fluorescencia aceptables para su estudio.

Igualmente, al observar las células en cultivo, se observaron distinciones de intensidad en la misma dirección, pasando de un extremo en la línea TRPM8-EYFP1 en que es muy alta, al polo totalmente opuesto de la línea TRPM8-DTR-GFP en que resultó imperceptible.

Estas diferencias en la intensidad de la señal se pueden atribuir a una relación directa con el nivel de proteína fluorescente expresado en las células de cada línea. En el caso de las líneas generadas mediante BACs, la intensidad de la señal es dependiente del número de copias insertadas y el efecto posicional que las module (revisado por Gong et al., 2003). En el caso de la línea TRPM8-EGFPf, generada por “gene targeting” (Dhaka et al., 2007), principalmente de la regulación endógena del gen modificado (revisado por Bronson et al., 1996), en este caso, TRPM8. Por lo tanto, en base a nuestras observaciones, clasificamos a la línea TRPM8-EYFP1 como de muy alta fluorescencia, a las líneas TRPM8-EYFP2, 3, 4 y línea TRPM8-Cre como intermedia, a la línea TRPM8-EGFPf como de baja fluorescencia y a la TRPM8-DTR-GFP como de muy baja fluorescencia. Por dicha razón, esta última línea no sería adecuada para la identificación de neuronas “in vivo”.

El marcaje conseguido con el anticuerpo anti-GFP en cortes tisulares, además de mejorar la visualización del soma, en las líneas TRPM8-EYFP (1-4) y TRPM8-EGFPf, aportó un mayor detalle, permitiendo visualizar múltiples axones neuronales procedentes de las células marcadas. Este hecho indica que es conveniente aplicar la técnica inmunohistológica para conseguir la mejor visualización posible del marcaje.

La línea TRPM8-DTR-GFP demostró tener un nivel de fluorescencia ínfimo, únicamente detectable por amplificación de la señal, y aun así, presentando dificultad en su observación regular, lo que lleva a concluir que es el modelo menos apropiado para obtener resultados a nivel histológico o en experimentos en que se requiera una discriminación celular basada en la observación del marcador.

La línea TRPM8-EGFPf presenta una característica singular, a pesar de presentar una baja expresión de la proteína fluorescente, ésta, al ser farnesilada, se ubica únicamente en la membrana celular. Tanto en cultivo como en muestras de tejido sometidas a inmunohistoquímica, la visualización del soma resulta dudosa al no estar marcado homogéneamente; no obstante, sus dendritas y axones se marcan con gran detalle. Esta peculiaridad la convierte en un modelo muy interesante para el estudio de los circuitos neurales en que TRPM8 pueda estar implicado. Curiosamente, en la descripción inicial de esta línea reportera, los autores mencionan la ausencia de fluorescencia (Dhaka et al., 2007). En una publicación posterior, tras la eliminación del casete de selección de neomicina (flanqueado por secuencias *loxP*) presente en el vector de recombinación original, comenzaron a visualizar la señal, que describen como robusta (Dhaka et al., 2008). Esta escisión se realiza mediante el cruce con un ratón transgénico con expresión ubicua de Cre; y ese mismo procedimiento fue implementado en nuestro laboratorio sobre el ratón original (Dhaka et al., 2007) para generar el modelo aquí estudiado. Sin embargo, en nuestras manos, en ningún caso describiríamos la señal de fluorescencia obtenida como robusta. En cualquier caso, el nivel de expresión es suficiente para su detección en neuronas sensoriales primarias “in vivo”, como se ha demostrado en distintas publicaciones.

Finalmente, en la línea TRPM8-EYFP1 resultó llamativa la diferencia de intensidad de señal fluorescente exhibida entre sus neuronas. Este contraste se podría atribuir a una variación en la expresión de TRPM8 entre diferentes células, de modo que, neuronas con menos expresión de TRPM8 expresarían el reportero de forma más moderada. Por otro lado, también se podría deber a un efecto posicional en células con una determinada identidad genética (revisado por Bronson et al., 1996, y Gong et al., 2007). Los datos funcionales obtenidos en este modelo sugieren que la primera hipótesis es la correcta, pues según describen Alcalde et al. (2018), mediante electrofisiología es posible detectar pequeñas



despolarizaciones en respuesta a la aplicación conjunta de los agonistas de TRPM8 frío moderado y mentol en las neuronas de baja fluorescencia. Sería conveniente realizar estudios adicionales con activadores más específicos y más potentes de TRPM8, como el WS-12 (Ma et al., 2008), para intentar verificar la expresión funcional de TRPM8 en las neuronas de baja fluorescencia.

5.1.2 Análisis morfológico y funcional de neuronas sensoriales marcadas con reporteros fluorescentes en cultivo celular de ganglios raquídeos.

5.1.2.1 Líneas TRPM8-YFP2, 3 y 4

Durante el estudio de las líneas transgénicas TRPM8-EYFP2, 3 y 4 se comprobó que la mayoría del marcaje mostrado se circunscribe a neuronas de tamaño pequeño en un porcentaje cercano al 10%, lo que concuerda con trabajos previos (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b; Dhaka et al., 2007; Takashima et al., 2007).

Igualmente, mediante fluorimetría de calcio, se comprobó que la mayoría de estas células, respondían a los agonistas clásicos descritos de TRPM8, frío y mentol (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b). La combinación de ambos estímulos generó una mayor proporción de respuestas, aproximándose a valores cercanos al 90%, e incluso superándolo en algún caso. Del mismo modo, la aplicación de BCTC, un antagonista de TRPM8, disminuyó las respuestas a frío, bloqueándolas por completo en su mayoría. En contraposición, la población sin marcador fluorescente apenas registró respuestas a frío o mentol. Estos datos sugieren que dichas líneas son adecuadas para la caracterización de TRPM8 ganglionar.

No obstante, no podemos obviar ese pequeño porcentaje de células con marcaje que no mostraron respuesta. Existen varias posibilidades al respecto. Primero, es posible que la expresión del canal sea tan baja que no se haya podido visualizar una respuesta funcional mediante imagen de calcio; si las neuronas no alcanzan su umbral de disparo durante la estimulación térmica, la señal de calcio es apenas detectable (Madrid et al., 2006). Segundo, es posible que las células estén parcialmente dañadas debido a la manipulación que conlleva todo el proceso de cultivo. Finalmente, podría tratarse de una expresión ectópica. El marcaje simultáneo con un buen anticuerpo contra TRPM8 podría solventar esta cuestión.

Por otro lado, el porcentaje de respuestas a AITC (agonista descrito de TRPA1 (Bautista et al., 2005)) entre la población con marcaje fluorescente no superó el 10%, lo que sugiere que la expresión de TRPA1 se encuentra mayoritariamente en otra población neuronal. Previamente ya se ha descrito que la expresión de TRPM8 y TRPA1 apenas solapan (Story et al., 2003; Pogorzala et al., 2013), lo que también apoya la correcta expresión del transgén en estas líneas reporteras.

En su conjunto, estos resultados demuestran que estas líneas transgénicas pueden resultar buenas herramientas para la localización y estudio de las neuronas que expresan el canal iónico TRPM8 tanto “in vivo” como “in vitro”.

5.1.2.2 Línea TRPM8-EGFPf.

Los resultados obtenidos a partir del análisis morfológico y funcional de la línea TRPM8-EGFPf arrojaron datos muy similares a los comentados para las líneas TRPM8-YFP2, 3 y 4.

No obstante, en el caso de la línea TRPM8-EGFPf los resultados aún resultan más contundentes al tener la posibilidad de analizar el animal homocigoto, que no expresa el canal TRPM8, y comprobar que las respuestas dentro de la población con marcaje fluorescente desaparecen prácticamente en su totalidad.

Previamente al uso de la línea TRPM8-EGFPf, quisimos asegurarnos del correcto fenotipo KO que presenta el ratón homocigoto y comprobar por métodos de biología molecular e histología que, efectivamente, la expresión del canal termorreceptor TRPM8 no estaba presente. Indudablemente, se comprobó la desaparición de la expresión por RT-PCR y se constató la no detección del ARNm mediante hibridación “in situ”. Asimismo, se combinó la técnica de hibridación “in situ” con la inmunofluorescencia anti-GFP en el animal hemocigoto, constatando que prácticamente la totalidad de las células que presentaban fluorescencia contenían ARNm de TRPM8. Igualmente, se detectó un ≈25% de neuronas con expresión de TRPM8 pero sin fluorescencia, hecho que atribuimos a las limitaciones de la técnica inmunofluorescente al ser aplicada sobre muestras tisulares que se han sometido a hibridación. Las prolongadas incubaciones a tan altas temperaturas como las que usamos en nuestro protocolo pueden provocar la desnaturalización de la GFP (Tsien, 1998), afectando a la detección de sus epitopos. Así, hemos comprobado que la señal fluorescente obtenida en



estos experimentos fue considerablemente más débil que la visualizada en los experimentos de inmunohistoquímica aislados.

Se intentó aplicar el mismo protocolo, combinando estas técnicas, a otras líneas del presente estudio para mejorar su caracterización y evaluar su especificidad, pero fue imposible detectar la señal reportera por la técnica inmunofluorescente. Una posible explicación es que en la línea TRPM8-EGFPf, la farnesilación de la GFP provoca su anclaje a la membrana. En el resto de las líneas, al tratarse de una GFP soluble, esta podría perderse más fácilmente del interior celular por el efecto de distintos reactivos sobre la integridad de la membrana (p.e. apertura de poros). Posiblemente sea necesario implementar mejoras en el protocolo o buscar otras alternativas como una hibridación “in situ” doble.

5.1.2.3 Línea TRPM8-EYFP1.

El caso de la línea TRPM8-EYFP1 resulta bastante particular. Como ya se ha comentado previamente, es bastante llamativa la intensidad de la fluorescencia máxima, así como la diferencia de intensidad de señal fluorescente mostrada entre sus células en el ganglio. La alta intensidad mostrada, en comparación con las otras cepas generadas por el mismo BAC, sugiere que en esta línea se ha producido una mayor inserción de copias del constructo. Una manera de comprobarlo sería mediante la aplicación de la técnica qPCR (Navarro et al., 2015), o la secuenciación de su genoma.

Si analizamos las características morfológicas y funcionales de la población marcada con EYFP, observamos que hay dos poblaciones celulares diferenciables. Una población de neuronas pequeñas que presentan una alta intensidad de fluorescencia y que responden a los agonistas de TRPM8 de la forma esperada y, una segunda población de células con una señal fluorescente de menor intensidad y mayor tamaño medio, que no responde a los estímulos habituales de TRPM8. La primera se correspondería con los datos clásicos descritos en la literatura y con la población detectada en las otras líneas transgénicas aquí caracterizadas.

Resulta importante discernir si la población de baja fluorescencia está compuesta por neuronas con bajo nivel de expresión de TRPM8 o simplemente un marcaje espurio. En un trabajo reciente realizado en esta línea transgénica, se describe que estas neuronas no responden a la aplicación aislada de frío o mentol, tan solo experimentan despolarizaciones

en su potencial de membrana en respuesta a la aplicación combinada de ambos estímulos. Los experimentos fueron realizados en neuronas trigeminales y los autores indican que las corrientes eléctricas registradas por electrofisiología durante la estimulación son muy pequeñas, llegando a generar potenciales de acción solo en unas pocas neuronas (Alcalde et al., 2018).

Este resultado sugiere que TRPM8 también está presente en estas neuronas sensoriales, pero en muy bajos niveles de expresión, lo que se correspondería con su bajo nivel de fluorescencia. También da sentido a la falta de observación de respuestas funcionales mediante fluorometría de calcio, pues la técnica no sería lo suficientemente sensible como para detectar los pequeños flujos de calcio producidos con la apertura de los canales en la membrana celular (Madrid et al., 2006).

5.1.2.4 Línea TRPM8-Cre.

La línea TRPM8-Cre es la que arroja los resultados más confusos. En los animales jóvenes, aunque el número de neuronas marcadas se aproximaba al esperado, la señal fluorescente se visualizó en una población neuronal de tamaño heterogéneo, que no mostraba una correlación clara entre el marcaje y la respuesta funcional esperada para TRPM8+. Del mismo modo, las respuestas a AITC se observaron por igual en ambas poblaciones. Estas observaciones, inicialmente, nos llevaban a concluir que el transgén se estaba expresando sin un control genético estricto relacionado con TRPM8.

Al tratarse de una línea Cre no inducible, es posible que el control de *Trpm8* sobre la expresión de la recombinasa varíe a lo largo del desarrollo. Dado que la acción de Cre sobre la expresión del reportero resulta permanente en la neurona marcada y es transmitida a todo su linaje, es factible que algunas neuronas no expresen TRPM8 en la etapa del desarrollo en que fueron registradas (revisado por Matthaie, 2007, Gong et al., 2007; Heffner et al., 2012; Kim et al., 2018). Un problema similar se ha descrito en otras líneas Cre, como por ejemplo en TRPV1-Cre; en ella únicamente una fracción de las células marcadas responde a capsaicina en el ratón adulto, hecho que se asocia a un cambio de expresión celular tras la embriogénesis (Patil et al., 2018). Por otro lado, el no marcaje de células con respuestas TRPM8+ podría deberse a la falta, o a un escaso nivel, de actividad de Cre en ellas. Este mosaicismo en la



actividad de Cre se ha descrito previamente en distintas líneas (revisado por Nagy, 2000; Heffner et al., 2012).

El análisis de los animales de edad avanzada reveló que el porcentaje de células que expresaban el reportero se había triplicado, aumentando sobre todo la proporción de neuronas de tamaño pequeño. El número de respuestas funcionales TRPM8+ detectadas en la población fluorescente fue baja ($\approx 20\%$), aunque se mantuvo circunscrita a ella. Estos datos indicarían que CRE aumenta su expresión, o se hace más efectivo, con el tiempo, aumentando el número de células que expresan el reportero fluorescente por alguna regulación desconocida. No sabemos si este incremento se produce de manera progresiva o de una manera abrupta en un momento puntual, sin embargo, no parece que sea fruto del azar, pues la población identificada funcionalmente como TRPM8 incrementa su marcaje.

Por lo tanto, sería necesario un análisis más detallado para elucidar si las neuronas fluorescentes observadas en el animal de edad avanzada tienen relación con la expresión de TRPM8. En este sentido, técnicas electrofisiológicas y de análisis de expresión génica en célula única podrían resultar útiles para determinar si el fenotipo observado es correcto, apareciendo de forma retardada, o si, por el contrario, es el producto de un control genético erróneo. También sería conveniente el realizar este análisis a lo largo del tiempo, para determinar cuál es el grado de concordancia entre expresión de TRPM8 y expresión del marcador fluorescente a las distintas edades del animal y así, valorar en qué momento es apropiado su uso según la aplicación que se le quiera dar. Aunque esta línea reportera se ha utilizado para dirigir la expresión de GCamp5 e identificar neuronas sensibles a frío “in vivo” (Yarmolinsky et al., 2016), debemos alertar que otras respuestas podrían deberse a la expresión errónea de la sonda reportera en neuronas TRPM8 negativas.

5.1.3 Análisis funcional de neuronas sensoriales en la línea TRPM8-DTR-GFP.

En la línea TRPM8-DTR-GFP, al no visualizarse la fluorescencia de las neuronas transgénicas en cultivo, no se pudo realizar una caracterización morfológica y funcional de las mismas que nos permitiera evaluar la relación entre marcaje y expresión, como sí hicimos con el resto de las líneas.

Sin embargo, debido al potencial que esta línea muestra ante experimentos

conductuales, en los que podamos comparar condiciones fisiológicas antes y después del tratamiento con toxina diftérica, hemos querido validar funcionalmente la efectividad de la toxina diftérica para conseguir la ablación de las neuronas que expresan TRPM8 mediante la técnica de fluorometría de calcio con la sonda radiométrica fura-2AM.

Se comenzó por validar las respuestas de TRPM8 en los animales transgénicos sin ser sometidos a tratamiento (DTR-NT), con el fin de comprobar que el proceso de transgénesis no altera el comportamiento en cultivo de estas neuronas, conservando sus propiedades funcionales. Efectivamente, se obtuvieron respuestas a los agonistas típicos de TRPM8, frío y mentol, en un subgrupo de neuronas de pequeño tamaño que representaron un valor cercano al 10% de la población, y sus respuestas a frío se vieron afectadas por la aplicación de BCTC en su amplia mayoría. Posteriormente, se procedió a realizar el mismo experimento en animales sometidos al tratamiento con la toxina diftérica (DTR-T). La idea inicial era hacer la comparativa con animales de las mismas características (edad y sexo), pero por problemas técnicos, una vez tratados los ratones no pudieron ser estudiados hasta 8 meses después, cuando ya rondaban el año y medio de edad.

La efectividad del tratamiento se comprobó mediante el test comportamental del hielo seco (Brenner et al., 2012) que mostró que los animales tratados presentaban un mayor tiempo de reacción ante la aplicación del estímulo frío; este hecho revela el déficit sensorial que causa la falta de expresión de TRPM8 en el sistema periférico de detección del frío. Del mismo modo, tal y como indicamos en Reimúndez et al. (2018), se confirmó la desaparición de las neuronas con expresión de TRPM8 en los ganglios raquídeos mediante RT-PCR, y mediante inmunohistoquímica.

Del estudio de estos animales concluimos que la proporción de respuestas neuronales en cultivo encontradas a los agonistas típicos de TRPM8 se veían reducidas a más de la mitad. Si nos hubiésemos quedado únicamente con este dato global, pudiera parecer que el efecto del tratamiento sólo había sido parcialmente exitoso, en contraposición a la efectividad en la ablación de las neuronas TRPM8+ que sugieren los resultados de RT-PCR e inmunohistoquímica. No obstante, observamos que las células que respondieron a estos estímulos se distribuían en un amplio rango de tamaños, haciendo suponer que con la ablación de las células que expresan TRPM8 se habría producido un cambio en el perfil de la respuesta



de una o varias poblaciones neuronales que antes no respondían, hecho que no observamos en el análisis del ratón TRPM8-EGFPf homocigoto (KO) en el que únicamente se eliminó la expresión del gen *trpm8*. Profundizando en el perfil de las respuestas celulares individuales obtenidas en los ratones DTR-T, se observa que las respuestas a frío están mucho más disminuidas ($\approx 93\%$) que las respuestas a mentol ($\approx 71\%$), y que las células que respondieron a frío no fueron las mismas que respondieron a mentol y viceversa, lo que es un patrón muy poco habitual si se tratasen de células que expresan el canal termosensible TRPM8. Además, hemos observado que las respuestas a AITC están incrementadas en la población estudiada de los animales DTR-T y que las células que muestran respuesta a frío o mentol mayoritariamente también responden a AITC, lo que lleva a pensar que expresan el canal termorreceptor de frío nocivo TRPA1.

Esta descrito que el mentol puede actuar como agonista de TRPA1 a concentraciones muy bajas, en principio inferiores a las que estamos usando en estos experimentos (Karashima et al., 2007). Sin embargo, al comparar las poblaciones que responden a AITC en animales DTR-T y DTR-NT, eliminando del estudio las células identificadas como TRPM8+, se comprueba que únicamente las respuestas a mentol se han visto aumentadas significativamente.

El conjunto de estos datos podría indicarnos que la desaparición de la población de neuronas que expresan TRPM8, desencadena un mecanismo de compensación por el que TRPA1 se vuelve más sensible a la activación por sus agonistas químicos.

Sin embargo, se hace imprescindible un estudio más exhaustivo para poder confirmar esta teoría, pues no podemos asegurar que las diferencias encontradas se deban únicamente al tratamiento o a la edad. Sería necesario validar que esta mayor activación de TRPA1 también se genera en animales tratados jóvenes, así como comprobar que no ocurre de forma habitual en animales de edad avanzada independientemente del tratamiento. Por otro lado, también sería preciso evaluar si el cambio de respuesta se desarrolla inmediatamente o es necesario que pase un tiempo tras el tratamiento con la toxina diftérica para ser detectado.

Aunque se abre ante nosotros una nueva línea de investigación, con los datos presentados podemos responder a la pregunta inicial, objetivo del experimento, y confirmar que el tratamiento con toxina diftérica provoca la ablación de neuronas que expresan TRPM8 y que este hecho es constatable tanto conductualmente como funcionalmente mediante

fluorometría de calcio.

5.1.4 Relación entre la expresión de TRPM8 y CGRP.

Al analizar las neuronas marcadas procedentes del ratón TRPM8-EYFP1, hemos comprobado una co-expresión con CGRP en el 48% de éstas, restringiéndose ampliamente a neuronas de baja fluorescencia.

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) se localiza principalmente en el sistema nervioso, tanto a nivel central como periférico, relacionándose funcionalmente con la regulación de las respuestas nociceptivas e inflamatorias (revisado por Van Rossum et al., 1997, y Arkless et al., 2018). La expresión de CGRP, así como otros péptidos (p.e. sustancia P), define una subpoblación de neuronas sensoriales primarias. Clásicamente, su expresión se ha asociado a neuronas nociceptivas polimodales que expresan TrkA (el receptor del factor del crecimiento nervioso, NGF), de las que al menos una parte son capaces de responder a estímulos termales nocivos (revisado por Van Rossum et al., 1997; Patapoutian y Reichardt, 2001; Patapoutian et al., 2003, Durham y Vause, 2010). Estudios más recientes, utilizando técnicas de transcriptómica en célula única, indican que la expresión de CGRP se ubica fundamentalmente en varias subpoblaciones de neuronas periféricas peptidérgicas y en algún subgrupo de neuronas catalogadas como no peptidérgicas (Zeisel et al., 2018).

Se ha descrito que la crías del ratón KO para el receptor TrkA, no expresan el canal termosensible TRPM8 (Peier et al., 2002b). En este modelo las neuronas que deberían expresar TrkA mueren durante el desarrollo debido a su dependencia del ligando NGF, lo que establece una relación de expresión entre ambos marcadores, al menos durante esta etapa. Puesto que TrkA y CGRP colocalizan ampliamente (Averill et al., 1995), esta observación también podría indicar un nexo entre CGRP y el termorreceptor. Sin embargo, los estudios realizados en neuronas sensoriales que expresan TRPM8 no las vinculan con los marcadores típicos de nocicepción, tampoco con CGRP (Peier et al., 2002b). Aun así, hay estudios que asocian la expresión de TRPM8 con la transducción de estímulos nociceptivos termales, y situaciones de hiperalgesia y alodinia (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007). En este sentido, recientemente se ha descrito la participación de TrkA en una ruta de señalización que incrementa los niveles de expresión de TRPM8 ante la presencia de NGF (Kayama et al., 2017).



El NGF también ha demostrado incrementar la sensibilidad al frío del ratón adulto (Lippoldt et al., 2013), lo que podría sugerir la presencia de esta ruta en las situaciones de hiperalgesia y alodinia mencionadas; y por tanto, indicar que la presencia de TRPM8 sólo sería fácilmente detectable en estas neuronas nociceptivas en situaciones alteradas.

El alto porcentaje de colocalización en las neuronas de baja fluorescencia ($\approx 75\%$) nos lleva a teorizar con la existencia de una subpoblación neuronal CGRP+ que presente bajos niveles de expresión de TRPM8 y que sólo pueda ser detectada fácilmente en este modelo debido a sus elevados niveles de fluorescencia. La expresión conjunta de ambos marcadores sugeriría que TRPM8 podría estar participando en funciones relacionadas con la nocicepción, como por ejemplo la detección del frío doloroso, desde esta población.

Al aplicar la técnica de inmunofluorescencia para amplificar la señal fluorescente del reportero, el porcentaje de co-expresión se incrementó hasta el 60%, dando aún mayor peso a esta relación. Atribuimos el aumento en la co-expresión a neuronas de muy baja fluorescencia para EYFP que antes no eran detectadas y que gracias al uso de un anticuerpo anti-GFP ahora sí lo son y colocalizan; sin embargo, la separación poblacional entre células de alta y baja fluorescencia se hizo menos clara debido a un cambio producido en la distribución del nivel de fluorescencia de las neuronas reporteras. Este cambio parece ser consecuencia de una relación no lineal entre la expresión de proteína y amplificación fluorescente de la que no conocemos la causa.

Takashima et al. (2007), desarrollaron un modelo transgénico similar a TRPM8-EYFP1, en que las células que expresan TRPM8 co-expresan GFP gracias a un BACs de integración. En su modelo también analizaron las neuronas sensoriales primarias y describen que el 80% de las células marcadas en cultivo responden a los agonistas de TRPM8. Curiosamente, también reportan una colocalización con CGRP del 20% en ganglio raquídeo haciendo la doble inmunodetección. Aunque no lo mencionan, en las fotos histológicas que muestran, también se ven células de distinta fluorescencia, en las que al visualizar la colocalización con CGRP, ésta se encuentra claramente ausente de las células más brillantes para GFP. Estos datos, acercan su modelo transgénico al nuestro, arrojando, sin conocer todos los detalles, conclusiones similares a este respecto.

Por otro lado, se realizó el mismo experimento de colocalización entre GFP y CGRP en la

línea TRPM8-EGFPf que marca principalmente células pequeñas. Los resultados mostraron también co-expresión, aunque únicamente en el 10% de las células GFP+; no obstante, la localización se dio en el 92% de los casos en células con bajos niveles de fluorescencia.

En resumen, los datos recabados en estos modelos transgénicos apoyarían la existencia de una segunda población con bajos niveles de expresión de TRPM8 que co-expresa CGRP, y que solo es ampliamente detectada en la línea TRPM8-EYFP1. Esto sugiere que esta línea puede resultar de gran utilidad en la caracterización de esta segunda población de neuronas TRPM8+.

McCoy y su equipo, estudiaron la expresión de CGRP en ganglios sensoriales usando un modelo transgénico de ratón que co-expresa GFP y DTR en las mismas células que el péptido. Funcionalmente, sólo un 2% de las neuronas identificadas como CGRP+ respondieron al agonista de TRPM8 icilina. Este valor nos lleva a establecer un paralelismo con el bajo número de respuestas obtenidas ($\approx 5\%$) a los agonistas TRPM8 (frío y mentol) en la población de neuronas de baja fluorescencia de nuestro modelo de ratón TRPM8-EYFP1 y que mayoritariamente co-expresan este péptido. Por otro lado, haciendo una doble detección con un anticuerpo anti-TRPM8, solo detectaron una co-expresión del 1% con CGRP (McCoy et al., 2012); teniendo en cuenta la dificultad para hallar anticuerpos anti-TRPM8 específicos y los bajos niveles en que TRPM8 se expresarían en las células de baja fluorescencia, creemos bastante probable que este anticuerpo únicamente evidencie las neuronas con altos niveles de expresión del canal, lo que explicaría el bajo porcentaje de co-expresión reportado.

Posteriormente, estos autores comprobaron que al provocar la ablación de estas neuronas peptidérgicas, inesperadamente, se observaba un incremento de las respuestas nociceptivas ante estímulos fríos. Este hecho ocurría a pesar de no haberse alterado ningún factor en el circuito nervioso periférico del mismo, como son el número de campos receptivos, la cantidad de neuronas sensoriales con expresión de TRPM8 detectable o la excitabilidad de las fibras cutáneas (McCoy et al., 2013b). Además, observaron que las neuronas de la médula espinal postsinápticas eran un 50% menos activas en respuesta a la aplicación de capsaicina, y quintuplicaban su actividad en respuesta a frío/icilina. Este resultado sugería que las aferencias CGRP+ (50% de las cuales son TRPV1+, el receptor de la capsaicina) inhiben la actividad promovida por frío en las neuronas espinales, y que en su ausencia se generaba la



alodinia observada. Finalmente, mediante el cruce de este modelo con un ratón KO para TRPM8, demostraron que dicho comportamiento era responsabilidad de la presencia de expresión de TRPM8 (McCoy y Zylka, 2014). Nuestros resultados podrían sugerir cierta implicación de TRPM8 en este déficit de integración central, pues también aportaría información complementaria periférica a través de esta subpoblación neuronal con expresión de TRPM8 y CGRP.

A pesar de los bajos niveles de co-expresión de TRPM8 y CGRP descritos a nivel de los ganglios sensoriales en la literatura, existen datos que indican una amplia co-expresión en la inervación de tejidos y órganos periféricos obtenidos mediante técnicas inmunohistoquímicas (Abe et al., 2005; Axelsson et al., 2009; Hayashi et al., 2009, Harrington et al., 2011; De Jong et al., 2015). Aunque debido a la mala calidad de los anticuerpos anti-TRPM8 estos datos nos resultan cuestionables, también sugieren que esta población de neuronas sensoriales que expresan TRPM8 y CGRP tendría una mayor prevalencia en los órganos internos, pudiendo mediar en otros procesos de nocicepción e inflamación de forma aún no descrita.

5.1.5 Valoración general de los modelos transgénicos evaluados.

En general, las líneas reporteras para TRPM8 estudiadas arrojaron datos satisfactorios, demostrando ser buenas herramientas para el estudio del canal; algunas poseen características más o menos ventajosas para el desarrollo de estudios concretos.

Con las líneas TRPM8-EYFP2, 3 y 4 se consiguió una correcta visualización del reportero fluorescente, tanto en cultivo como con la aplicación de los métodos inmunohistoquímicos, comprobándose que la correlación entre marcaje y expresión funcional era buena. Estas observaciones las hacen apropiadas para estudios anatómicos e inmunohistológicos del canal y estudios funcionales celulares basados en la detección de fluorescencia en endógena, tanto “in vitro” como “in vivo”.

La línea TRPM8-EGFPf (Dhaka et al., 2007), arrojó conclusiones similares a las anteriores, pero el hecho de permitir comparar a los animales silvestres con sus parientes “knockout”, la convierte en un modelo excepcional para el estudio de las implicaciones fisiológicas de TRPM8 a todos los niveles. Además, el buen marcaje axonal que exhibe también hace de ella una herramienta excelente para el estudio de los circuitos neurales que implican a TRPM8

mediante inmunohistología. Sin embargo, su baja fluorescencia la hace menos adecuada para análisis celulares en cultivo que no se centren en el estudio axonal, y totalmente inapropiada para estudios tisulares que necesiten detección celular de fluorescencia endógena.

En el ratón TRPM8-EYFP1 hemos hipotetizado sobre una posible relación entre la expresión del canal y el nivel de fluorescencia celular exhibida. De esta forma, hemos determinado la existencia de dos poblaciones de neuronas sensoriales primarias que expresan TRPM8; una de alto nivel de expresión que se asociaría a un papel termosensor de frío inocuo y otra de bajo nivel, posiblemente orientada a mediar en funciones nociceptoras, como demostraría su buena co-expresión con CGRP. El papel de TRPM8 como sensor de frío nocivo es consistente con los resultados de distintos estudios analizando el fenotipo de animales TRPM8 KO (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Knowlton et al., 2010, 2013). Puesto que esta segunda población no es detectable en las otras líneas estudiadas, la convierte en un modelo único para el estudio de poblaciones neuronales con distinto grado de expresión de TRPM8. Igualmente, gracias a la elevada fluorescencia exhibida, esta línea es muy apropiada para estudios que requieran esta detección “in vivo” , “in vitro” o en análisis inmunohistoquímicos; así como para estudios que requieran de una selección poblacional por citometría de fluorescencia (FACS) (Morenilla-Palao et al., 2014).

La línea TRPM8-DTR-GFP únicamente parece un buen modelo para el estudio de la función fisiológica del canal “in vivo”, permitiendo estudiar el efecto de la ablación de las neuronas que lo expresan. Recientemente, utilizamos esta estrategia para evaluar el papel de las neuronas TRPM8+ en la termorregulación (Reimúndez et al., 2018). La fluorescencia que presenta es ínfima y difícilmente detectable por inmunohistoquímica, por lo que no es un buen modelo para estudios que requieran de su visualización.

Finalmente, la línea TRPM8-Cre fue la que arrojó los resultados más controvertidos a la hora de relacionar marcaje, expresión y funcionalidad, por lo que se necesita una caracterización más profunda a la aquí realizada antes de poder ser utilizada como reportero de TRPM8.



5.2 Uso del ratón TRPM8-EYFP1 como herramienta para el estudio de la expresión e inervación extraganglionar de TRPM8.

La expresión extraganglionar de TRPM8 no se encuentra bien definida todavía. Existen varios estudios sobre expresión general de canales TRPs en diversos tejidos y órganos, donde la detección de TRPM8 o no se produce, o se hace en unos niveles muy bajos (Fonfria et al., 2006; Inada et al., 2006; Kunert-Keil et al., 2006; Jang et al., 2012). Esta diferencia en el grado de expresión respecto a los ganglios sensoriales, indicaría que la termosensación es su principal función en el organismo. No obstante, también existen trabajos más específicos que sugerirían que su distribución es bastante más amplia, describiendo su presencia en próstata (Bidaux, 2005), esperma (de Blas et al., 2009), pulmón (Sabnis et al., 2008a), macrófagos (Khalil et al., 2016), y otros tejidos, lo cual sugiere que podría estar desarrollando y/o influyendo en distintas funciones fisiológicas.

Puesto que el ratón TRPM8-EYFP1 parece localizar poblaciones de muy baja expresión de TRPM8 que otros modelos transgénicos no detectan, puede ser una herramienta potencialmente adecuada para la detección del canal en ubicaciones extraganglionares, en las que su expresión será comparativamente mucho más baja. Por este motivo, hemos escogido esta línea como modelo de estudio para caracterizar el patrón de expresión en distintos tejidos.

Hemos realizado estudios de inmunofluorescencia anti-GFP a distintos niveles y hemos comparado el marcaje fluorescente obtenido con lo reportado en la bibliografía, para así seguir validando el modelo, y tratar de localizar nuevos emplazamientos de expresión e inervación de TRPM8. A continuación, comentamos los principales tejidos y órganos en los que hemos detectado expresión de TRPM8 de acuerdo a la presencia de marcaje contra GFP.

5.2.1 Piel y vasculatura.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y juega un papel fundamental en la termosensación y la temrorregulación. Numerosas fibras nerviosas sensoriales la recorren, detectando los cambios térmicos ambientales, que en conexión con la información de los órganos internos, se integran para conseguir el mantenimiento de la homeostasis térmica. La

activación de fibras termosensibles genera respuestas autónomas termorreguladoras y comportamientos animales de adaptación a la temperatura (revisado por Gavva et al., 2012, y Señarís et al., 2018).

El inicio de la sensación de frío se atribuye a la activación de estas terminales cutáneas que pertenecen a neuronas sensoriales primarias que expresan TRPM8 (Peier et al., 2002b; Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008; Schepers y Ringkamp, 2009; Milenkovic et al., 2014). En concordancia, al analizar la piel pilosa del modelo transgénico TRPM8-EYFP1, hemos encontrado fibras fluorescentes a modo de terminaciones libres, discurriendo tanto por la dermis como la epidermis, sin inervar otras estructuras como folículos pilosos o la microvasculatura. Esta descripción concuerda completamente con la descrita previamente en otros modelos transgénicos (Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008).

En la bibliografía se describe que estas fibras pueden ser de conducción rápida (A δ) o lenta (C), lo que sugiere que pueden mediar en estímulos de frío inocuo, frío nocivo y de nocicepción (Campero et al., 2001; Peier et al., 2002b; Bautista et al., 2007; Takashima et al., 2007; Belmonte et al., 2009; Schepers y Ringkamp 2009). La capacidad sensitiva de la piel para la detección del frío no es continua, si no que existen “puntos de frío” especializados (<1mm de diámetro) (Kenshalo y Gallegos, 1967; Iggo, 1969) cuya distribución y densidad es variable. En el caso de la piel pilosa de la pata del ratón, se visualizaron fibras de forma persistente y poco densa, pues estuvieron presentes en todos los cortes histológicos analizados pero en bajo número.

Recientemente, Milenkovic y su grupo (2014), han sido capaces de caracterizar el circuito somatosensorial para el frío inocuo, comprobando la funcionalidad de TRPM8 en la integración del mensaje térmico que llega a la corteza somatosensorial. Sin embargo, otros autores previamente ya habían demostrado su importancia en esta función “in vivo”, al comprobar que los comportamientos de evasión ante la exposición al frío estaban disminuidos en los ratones sin expresión de TRPM8, lo que era atribuible a una pérdida de percepción sensorial (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007, Dhaka et al., 2007).

Por otro lado, los queratinocitos y las células de Merkel también podrían estar contribuyendo a la transducción de la sensación del frío, pues diversos autores han detectado expresión de TRPM8 en estas estructuras y se ha comprobado que son capaces de responder



ante estímulos de frío moderado (Denda et al., 2010; Tsutsumi et al., 2010; Bouvier et al., 2018). En nuestras preparaciones, al igual que en modelos previos (Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008), no hemos encontrado marcaje celular cutáneo que indique esta expresión. No obstante, Bidaux y su grupo (2015), apuntan a que la expresión de TRPM8 en queratinocitos está limitada a una isoforma más corta del canal, cuya transcripción podría ser dirigida por un promotor diferente al del TRPM8 canónico (Bidaux et al., 2012), y por tanto, distinto al utilizado para obtener la expresión del transgén EYFP en esta y otras líneas. La identificación de un buen anticuerpo contra TRPM8 permitiría dilucidar esta cuestión.

Con respecto a la termorregulación, el ajuste del flujo sanguíneo a nivel cutáneo resulta un mecanismo fundamental, pues permite modificar la tasa de pérdida de calor a nivel local (revisado por Señarís et al., 2018). El estímulo primario de vasoconstricción es predominantemente simpático, mediado por noradrenalina, pero también requiere de la participación de factores endoteliales y, al menos en su etapa inicial, de la inervación sensorial cutánea (Johnson et al., 2005, 2009; Craighead et al., 2017).

Estudios recientes sugieren que TRPA1 y TRPM8 trabajan conjuntamente en la detección del frío ambiental para regular el tono vascular de la microvasculatura cutánea. La respuesta vasoconstrictora inicial y la vasodilatación secundaria, conocida como reacción de Lewis (Lewis T., 1930), parecen ser dependientes de TRPA1; sin embargo, la presencia de TRPM8 es necesaria para alcanzar una contracción completa. Asimismo, es imprescindible el bloqueo de ambos canales para suprimir completamente ambas respuestas (Aubdool et al., 2014; Pan et al., 2017). En relación a estos resultados, recientemente nuestro grupo ha mostrado la alteración de la respuesta vasoconstrictora en la cola del ratón con delección de TRPM8 ante la exposición a bajas temperaturas (Reimúndez et al., 2018). Al analizar la inervación del ratón TRPM8-EYFP1 en esta zona, hemos visto fibras marcadas cercanas a la superficie de la piel, pero también alrededor de los vasos sanguíneos principales (arteria central y venas laterales), mostrando un contacto íntimo con ellos. Este hallazgo refuerza la idea de la implicación de TRPM8 en la regulación vasomotora como mecanismo de termorregulación. Además, buena parte de estas fibras perivasculares mostraron co-expresión con CGRP, lo que sugiere la implicación de este neuropéptido vasodilatador en el proceso, y que la población de neuronas sensoriales con bajos niveles de fluorescencia identificada en este ratón, mediaría en esta

función, al menos en parte.

Poniendo el foco en los grandes vasos internos que irrigan el organismo, también se ha descrito el efecto de TRPM8 en su tono muscular (Johnson et al., 2009; Xiong et al., 2017). En este caso, las variaciones externas de temperatura no serían el factor desencadenante, pues los individuos sanos no experimentan grandes cambios en su temperatura interna cuando son expuestos a frío extremo, y tendríamos que pensar en algún agonista endógeno. Diversos estudios describen la expresión funcional del canal TRPM8, tanto en la musculatura como en el endotelio de los grandes vasos sanguíneos, y afirman que su activación por medio de agonistas produce un efecto predominantemente vasodilatador (Yang et al., 2006; Johnson et al., 2009; Cheang et al., 2013; Liu et al., 2013b; Chen et al., 2014; Sun et al., 2014; Melanaphy et al., 2016; Xiong et al., 2017). Sorprendentemente, y en contraposición a estos datos mencionados, nosotros no hemos detectado expresión de TRPM8 en los distintos tipos celulares de los grandes vasos sanguíneos, pero sí inervación positiva en la pared vascular de todos los vasos estudiados, arteria aorta y venas cava, pulmonar y porta.

La posible función de TRPM8 inervando los grandes vasos sanguíneos aún no ha sido estudiada, y sólo ha sido descrita previamente en el caso de la vena porta (McCoy et al., 2013a); en los otros vasos analizados resulta un dato totalmente novedoso en la literatura. Su caracterización reveló que al igual que en las fibras que rodeaban los vasos centrales de la cola, se detecta una muy buena co-expresión con CGRP en estas fibras nerviosas.

Además, TRPM8 podría jugar un papel importante sobre la respuesta hipertensora al frío, ya que los ratones KO muestran una inhibición del proceso hipertensivo mediado por el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA); efecto que se asocia a una disminución en la expresión de todos sus componentes (Chan et al., 2018).

5.2.2 Médula espinal.

Las neuronas de los ganglios raquídeos proyectan hacia la médula espinal a través de las raíces dorsales (Light, 1988; Dhaka et al., 2008; Ran et al., 2016). Estas proyecciones centrales terminan en distintas capas o láminas del asta dorsal de la médula espinal, segregándose de acuerdo a su función (Takahashi et al., 2003). La médula espinal en función de su citoarquitectura se puede dividir en 10 regiones diferentes (I-X) denominadas láminas. Las



láminas I y II se corresponden con la región situada en el borde de las astas dorsales (Rexed, 1952). Estudios previos han demostrado que las neuronas que expresan TRPM8 proyectan principalmente hacia la lámina I de la médula espinal y en varias subcapas de la lámina II donde desarrollan múltiples sinapsis (Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008; Knowlton et al., 2010). De acuerdo con estos resultados, en el ratón TRPM8-EYFP1 se observa un claro marcaje de fibras fluorescentes en estas ubicaciones.

Estudios electrofisiológicos muestran que las neuronas medulares localizadas en la lámina I codifican estímulos nociceptivos y termales (Christensen y Perl, 1970; Craig y Dostrovsky, 1991; Bester et al., 2015). Esto sugiere que las aferencias positivas para TRPM8 podrían participar en la integración de señales térmicas por ambas vías. Otra publicación reciente, ha mostrado que el enfriamiento cutáneo activa múltiples neuronas glutamatérgicas de la lámina I (Ran et al., 2016). Mediante el uso de animales transgénicos que permiten la ablación selectiva de las células que expresan TRPM8 y TRPV1, se ha comprobado que durante los descensos moderados de temperatura (29-26 °C), las respuestas están mediadas por neuronas raquídeas que expresan exclusivamente el termorreceptor TRPM8; en el caso de disminuciones mayores de temperatura, estas neuronas también tendrían influencia, pero ejercerían su función junto a otra población celular que expresa TRPV1 (Wrigley et al., 2009; Ran et al., 2016).

Además de las aferencias detectadas en la lámina I, y exclusivamente a nivel lumbar-sacro de la médula espinal, también visualizamos algunas fibras que alcanzan las láminas inferiores del asta dorsal (láminas III-VI) y en la parte más dorsal del canal central (lámina X). Este patrón de marcaje es coincidente al descrito en otros modelos de ratones transgénicos para TRPM8 (Dhaka et al., 2008; Takashima et al., 2007); y a su vez, muy similar al que encontraron Tominaga y colaboradores (1998), al estudiar las proyecciones del canal TRPV1 a la médula espinal por inmunohistoquímica. Los patrones de ambos termorreceptores pueden estar relacionados, pues se detecta co-expresión de TRPV1 en el 40-50% de las células que expresan TRPM8 mediante experimentos funcionales de imagen de calcio en neuronas sensoriales (McKemy et al., 2002; Hjerling-Leffler et al., 2007; Dhaka et al., 2008; Morenilla-Palao et al., 2014), lo que sugiere que la inervación para las vías de transducción del frío y el calor son, al menos en parte, las mismas.

También, únicamente a nivel lumbar-sacro, hemos detectado unas células fluorescentes de gran tamaño situadas en el borde del asta ventral (lamina IX). Las neuronas de esta localización son interneuronas y motoneuronas que se asocian al control del movimiento (Brown, 1981). Mandadi y sus colaboradores (2009), describieron la mediación de TRPM8 en la modulación de la actividad locomotora, e hipotetizaron que pudiera deberse a su expresión en motoneuronas precisamente en esta ubicación. Utilizando otro modelo de ratón reportero, identificaron algunas células positivas en la zona, pero no lograron caracterizarlas.

5.2.3 Meninges.

El cerebro y la médula espinal están envueltos por 3 capas membranosas de tejido conectivo denominadas meninges que les proporcionan protección. La más externa es la duramadre, la cual se encuentra bien vascularizada y ricamente inervada por terminaciones de neuronas sensoriales trigeminales (revisado por Patel y Kirmi, 2009 y Coles et al., 2017). La expresión de TRPM8 en estas terminaciones ya ha sido previamente demostrada mediante experimentos de retromarcaje (Ren et al., 2018) o mediante el uso de otros modelos transgénicos (Huang et al., 2012; Ren et al., 2015). Nuestras observaciones corroborarían estos estudios pues hemos visualizado marcaje axonal fluorescente en este tejido.

La inervación de las meninges ha sido estudiada en profundidad pues está directamente relacionada con la patofisiología de la migraña, un desorden neurovascular que afecta a millones de personas en el mundo (Burgos-Vega et al., 2015). Esta enfermedad presenta un alto componente genético y, en estudios de asociación del genoma completo (GWAS), el gen para TRPM8 ha sido consistentemente relacionado con la enfermedad, aunque su papel en el proceso aún no ha sido esclarecido (revisado por Freilinger et al., 2012; Dussor y Cao 2016).

Los estudios de neurobiología relacionan el desarrollo de esta patología con la liberación de CGRP por parte de las neuronas trigeminales en la duramadre (revisado por Dussor y Cao 2016 y Edvinsson, 2019). Esto nos lleva a hipotetizar que la colocalización que demostramos entre CGRP y TRPM8 en neuronas sensoriales primarias, podría estar relacionada con la patología.



5.2.4 Globo ocular.

Encontramos abundante expresión de TRPM8 en la córnea, tejido ricamente innervado por axones trigeminales (Oliveira-Soto y Efron, 2001). En relación a esta diana, este modelo de ratón ya ha sido objeto de análisis detallado en la literatura (Parra et al., 2010; Alcalde et al., 2018); donde los investigadores han obtenido interesantes resultados que implican funcionalmente a TRPM8 en el mantenimiento del flujo de la lagrime basal y la regulación del parpadeo. El termorreceptor se ocuparía de detectar los pequeños cambios de temperatura y osmolaridad producidos en la superficie ocular como consecuencia de la evaporación de la lágrima, contribuyendo a la activación del conjunto de mecanismos necesarios para su reposición húmeda. En este contexto, el canal ha demostrado jugar un papel importante en el desarrollo de la patología del ojo seco. (Parra et al., 2010, 2014; Quallo et al., 2015).

Igualmente, hemos encontrado fibras con marcaje fluorescente, aunque en baja densidad, en la membrana coroidea y los cuerpos ciliares. La primera, es un tejido ricamente vascularizado que proporciona a la retina oxígeno y nutrientes, y regula su temperatura mediante variaciones del flujo sanguíneo (revisado por Nickla y Wallman, 2010); dado el papel de TRPM8 en la termorregulación, y en particular sobre la vasculatura, no es de extrañar la detección de fibras en esta ubicación.

La retina es una estructura neuronal fotosensible que recubre la parte más posterior del interior del globo ocular. Constituye un tejido celular altamente organizado y anatómicamente se considera parte del SNC (revisado por Masland, 2012). Este tejido, es el único perteneciente al globo ocular en que hemos encontrado marcaje de somas celulares. Las células positivas se localizaron en la capa CG y en la capa NI exclusivamente; además, se observan tres plexos nerviosos en la PLI, lo que indica que el marcaje se corresponde con una o varias poblaciones neurales concretas, que presentan una citoarquitectura común. Este marcaje es novedoso en la bibliografía, pues únicamente hemos encontrado un trabajo en que se reporta una tenue señal de expresión en retina (Gilliam y Wensel, 2011) sin hacer referencia a su emplazamiento o posible función en este órgano. Curiosamente, distintos trabajos han descrito la expresión funcional de TRPM8 en el endotelio corneal y de la conjuntiva, sin mostrar su localización (Khajavi et al., 2015). En otra sección discutiremos en profundidad el marcaje retiniano de TRPM8.

5.2.5 Sistema olfatorio y respiratorio.

La cavidad nasal contiene las terminales nerviosas especializadas que participan del sentido del olfato y es también la puerta de entrada al sistema respiratorio. Entre sus principales funciones se incluyen el calentamiento, hidratación y filtrado del aire inhalado antes de alcanzar los pulmones.

En la literatura es posible encontrar varios trabajos que describen expresión de TRPM8 en la cavidad nasal, sin embargo los resultados parecen contradecirse. Nakashimo y colaboradores (2010), mediante inmunohistoquímica, determinaron que TRPM8 se expresaría en el epitelio olfatorio, principalmente en células receptoras olfativas; este resultado otorgaría al canal un papel esencial en la quimiosensación, asociando la modulación de la transducción de las señales olfatorias a la temperatura. Sin embargo, el marcaje obtenido en el ratón TRPM8-EYFP1 no apoyaría estos resultados, pues únicamente observamos células marcadas en el epitelio respiratorio, y no visualizamos fibras aferentes positivas en el bulbo olfativo.

Liu et al., (2013b), al igual que nosotros, localizaron expresión de TRPM8 en las células ciliadas del epitelio respiratorio, pero también describen marcaje celular en la lámina propia nasal, alrededor de las glándulas de Bowman y vasos sanguíneos, donde nosotros únicamente hemos encontrado inervación. Este marcaje axonal coincide con el obtenido por Keh y colaboradores (2011), que únicamente hallaron abundantes fibras positivas para TRPM8 en estas localizaciones, alrededor de toda la cavidad nasal.

La inervación de la cavidad nasal es mayormente trigeminal, y junto al olfato y el gusto, constituye el tercer sentido de detección química que posee el organismo. Las terminaciones libres nasales detectan información quimiosensorial que influye en la percepción de los olores (Laska et al., 1997; Frasnelli et al., 2011; Filiou et al., 2015), y además evita la inhalación de agentes nocivos promoviendo respuestas reflejas en las vías aéreas como el estornudo (Anton et al., 1991; Sant'Ambrogio et al., 1995; Baraniuk y Kim, 2007).

Mediante experimentos de retromarcaje y PCR de célula única, se ha detallado que el 60% de la neuronas trigeminales que inervan la mucosa nasal expresan TRPM8 (Plevkova et al., 2013), por lo que es muy probable que las fibras que observamos en nuestro ratón provengan del trigémino. La funcionalidad de la inervación de TRPM8 en esta localización se



ha descrito con anterioridad, asociándose con la generación de sensaciones de frescor (Frasnelli et al., 2011; Lübbert et al., 2013; Filiou et al., 2015). Su influencia protectora también ha sido descrita; el movimiento de aire en la cavidad nasal, provoca la evaporación acuosa del fluido de revestimiento que recubre el epitelio; este hecho se traduce en una bajada de temperatura que TRPM8 detecta llevando a una disminución en la funcionalidad de la musculatura en las vías aéreas, reduciendo la frecuencia respiratoria y aumentando la secreción mucosa (Baraniuk, 2011).

Igualmente, en la bibliografía se describe la inervación de TRPM8 a lo largo de todo el tracto respiratorio (Xing et al., 2008; Willis et al., 2011; Banner et al., 2011) y expresión celular, principalmente, a nivel bronquial y pulmonar (Banner et al., 2011; Li et al., 2011; Grace et al., 2014; Kim et al., 2017; Liu et al., 2018a). Nosotros hemos estudiado la tráquea y el pulmón y hemos detectado marcaje celular en el epitelio traqueal, epitelio de los bronquiolos y epitelio alveolar; además, en la tráquea también se aprecian fibras GFP fluorescentes que la inervan.

La inervación de las vías aéreas, fuera de la cavidad nasal, es principalmente simpática y parasimpática. Es responsable de la generación de respuestas autónomas como la tos, la constricción de las vías aéreas o la secreción mucosa (Barnes, 1986; De Jongste et al., 1991; Chang et al., 2015), las cuales se ven favorecidas por la aspiración de aire frío (Sant'Ambrogio et al., 1995; Banner et al., 2011). Mediante experimentos de retromarcaje, se ha comprobado que algunas de estas neuronas vagales expresan TRPM8 y por consiguiente, su funcionalidad se asocia con la modulación de estas respuestas autónomas (Xing et al., 2008). No obstante, su implicación causa controversia, pues aunque el frío las favorece, el mentol presenta un efecto claramente antitusivo y descongestionante (Laude et al., 1994; Bonvini et al., 2015; Millqvist 2016). Recientemente, se ha descrito la existencia de dos poblaciones de neuronas trigeminales TRPM8+ que inervan la mucosa nasal, una de ellas co-expresa TRPA1 y TRPV1, y la otra no, sugiriendo que esta última sería la responsable de la supresión de los reflejos por parte del mentol a nivel nasal (Plevkova et al., 2013). En cualquier caso, debemos señalar que el mentol, a altas concentraciones puede bloquear distintos tipos de canales iónicos, por lo que su acción puede no estar mediada exclusivamente por TRPM8 (Swandulla et al., 1987; Melanaphy et al., 2016).

La expresión de TRPM8 a nivel bronquio-pulmonar también se ha asociado a la elevación

de citoquinas e histamina promovidas por la inhalación de aire frío (Sabnis et al., 2008a; Cho et al., 2010; Banner et al., 2011; Kim et al., 2017; Liu et al., 2018b). El asma es una enfermedad que cursa con una inflamación crónica de las vías aéreas que afecta a millones de personas en el mundo; es causada por alérgenos o por otras sustancias nocivas. La histamina es el principal mediador de las alergias, y también participa en los procesos inflamatorios, por lo que estos resultados sugieren que el canal puede tener gran importancia en el desarrollo de su patología (Sabnis et al., 2008b; Liu et al., 2018a). Recientemente, se ha descrito un incremento de la expresión del canal en experimentos realizados en un modelo murino experimental de asma (Liu et al., 2018b)

5.2.6 Sistema digestivo.

Estudios previos indican la presencia de TRPM8 en la inervación de todo el tracto digestivo (Zhang et al., 2004; Abe et al., 2005; Zhao et al., 2010; Harrington et al., 2011; Yu et al., 2014; Yu et al., 2016) con una función principalmente sensorial. En concordancia, al realizar un análisis histológico pormenorizado a distintos niveles del tubo digestivo en la línea TRPM8-EYFP1, hemos detectado fibras GFP+ en la cavidad oral, a nivel del colón y del estómago. Además hemos encontrado células con inmunorreactividad GFP en algunas localizaciones.

En la lengua, hemos observado algunas fibras con marcaje que la atraviesan, aunque la señal principal se localiza en torno a las papilas fungiformes, situadas en las dos terceras partes anteriores de la lengua. Las fibras GFP+ las rodean sin llegar a penetrar en ellas, patrón que sugeriría que el canal TRPM8 no tiene influencia en el sentido del gusto. Este marcaje concuerda con lo publicado anteriormente en varios trabajos de detección de TRPM8 por inmunohistoquímica (Abe et al., 2005; Sato et al., 2013; Yajima et al., 2015). Lo más probable es que la procedencia de estas fibras sea trigeminal, pero también puede ser del ganglio geniculado, dónde recientemente se ha descrito la expresión de TRPM8 (Tatsumi et al., 2015). Igualmente, en el paladar hemos observado fibras con marcaje fluorescente que discurren por la mucosa bucal, penetrando en el epitelio ocasionalmente. Esta inervación, también proviene del ganglio trigémino, y ya ha sido descrita previamente (Sato et al., 2013).

Dentro de la cavidad oral también se ha descrito expresión e inervación de TRPM8 en los fibroblastos de la pulpa dental (El Karim et al., 2011; Tokuda et al., 2015), odontoblastos



(Tsumura et al., 2013; Tokuda et al., 2015; Tazawa et al., 2017) y en las glándulas salivares (Sobhan et al., 2013; Yajima et al., 2015). No obstante, no hemos encontrado en nuestro modelo marcaje en estas ubicaciones.

La funcionalidad del canal en todas estas localizaciones se describe principalmente como termosensora, viéndose modulado por los cambios térmicos producidos como consecuencia de ingestión de comida y bebida. A la par, presentaría una función quimiosensora; la presencia de sustancias moduladoras de su actividad en los alimentos, puede generar experiencias térmicas que influyan en la apreciación gustativa final generada por los mismos (Sato et al., 2013; Leijon et al., 2019). Además, se ha descrito que la aplicación de mentol en la cavidad oral incrementa el nivel de salivación por un corto periodo de tiempo (Houghton et al., 2017), y acelera el reflejo de deglución (Ebihara et al., 2014; 2016; Alvarez-Berdugo et al., 2016), lo que sugiere que aparte de transducir las señales de temperatura, también podría tener influencia en procesos fisiológicos relacionados con la función digestiva.

En nuestro estudio, hemos realizado cortes transversales del tracto digestivo a distintos niveles. Quizás la metodología no haya sido la más apropiada, pues se han quedado atrapados restos alimenticios en la luz digestiva que exhiben autofluorescencia en las preparaciones; este inconveniente nos ha hecho prácticamente imposible analizar con seguridad un posible marcaje en la mucosa digestiva y ha dificultado la visualización en la musculatura. En un futuro estudio sería mejor hacer un lavado previo del tejido con solución salina por perfusión a través del tubo digestivo. En el caso del estómago, también hemos utilizado la configuración “whole mount” lo que mejoró la obtención de resultados.

A nivel del esófago, no hemos sido capaces de visualizar marcaje GFP+ de ningún tipo; sin embargo, está descrita su inervación por parte de neuronas que co-expresan TRPM8 y TRPV1 que responden a pH ácido. Esta población neuronal estaría relacionada con la transducción de la sensación de ardor cuando se presenta acidez estomacal (Yu et al., 2014, 2015).

Igualmente, se ha mostrado que hay neuronas que expresan TRPM8 inervando el estómago desde el ganglio nodoso (Zhang et al., 2004; Zhao et al., 2010), y el intestino desde los ganglios raquídeos (Harrington et al., 2011; Yu et al., 2016). Acorde a estos datos, hemos encontrado fibras positivas en la musculatura digestiva que podrían provenir de estas

ubicaciones. Además, a este nivel también hemos detectado células aisladas GFP+, principalmente en algunas zonas de la pared del estómago. Esta expresión gastrointestinal de TRPM8 no se ha descrito previamente. Estas neuronas podrían pertenecer al sistema nervioso entérico, una red neuronal distribuida a lo largo del tracto digestivo que mantiene su homeostasis. Se ocupa de regular cometidos tan importantes como la motilidad, el intercambio de fluidos a través de la mucosa y la secreción de hormonas intestinales, entre otras (Yamada et al., 2008). De manera que si TRPM8 se expresa en algún subtipo celular de esta red podría tener influencia en estas funciones.

Para finalizar, sólo queda comentar la existencia de múltiples estudios que apuntan los efectos beneficiosos de las sustancias mentoladas en condiciones patológicas del aparato digestivo. Ha demostrado tener un efecto antiinflamatorio (Ramachandran et al., 2013; Khalil et al., 2016; Balemans et al., 2017; Beckers et al., 2017) y analgésico (Cappello et al., 2007; Kligler y Chaudhary 2007; Merat et al., 2010; Khanna et al., 2014; Cash et al., 2016), aunque su mecanismo de acción aún no ha sido elucidado. Sin embargo, existen distintas teorías donde el canal TRPM8 estaría implicado, pudiendo mediar tanto las aferencias provenientes de los ganglios periféricos como las neuronas entéricas.

5.2.7 Vejiga.

Es fácil encontrar estudios que impliquen a TRPM8 en la funcionalidad de la vejiga, pues es ampliamente reconocida la influencia del frío en este órgano tanto en individuos sanos como en pacientes con desordenes en las vías urinarias inferiores (Ghei y Malone-Lee, 2005; Imamura et al., 2013; Uvin et al., 2015).

El estudio desarrollado, nos ha permitido visualizar abundante inervación GFP+ en el músculo detrusor, detección que ya había sido previamente detallada por Mukerji et al., (2006). Otros autores, mediante experimentos de retromarraje, han comprobado que hay fibras que inervan la vejiga desde neuronas alojadas en los ganglios raquídeos (Hayashi et al., 2009; Gardiner et al., 2014), expresándose TRPM8 en aproximadamente un 8% de ellas (Shibata et al., 2011), por lo que es muy probable que las fibras visualizadas provengan de esta ubicación.

La inervación sensorial de la vejiga desempeña un papel fundamental en su



funcionamiento. Durante el almacenamiento de la orina, se produce una monitorización continua e inconsciente de su estado de llenado mediante inervación aferente mecanosensitiva. Cuando se llena por completo, al aumentar la presión intravesical, la información pasa a ser consciente, y se genera la necesidad de vaciado (Skryma et al., 2011; Everaerts y De Ridder, 2016). Las aferencias sensoriales con expresión de TRPM8 formarían parte de este circuito reflejo (Ito et al., 2016).

En cuanto a expresión celular en el propio órgano, encontramos cierta controversia en la literatura. Hay varios autores que dicen detectar su expresión en el urotelio (Stein et al., 2004; Vahabi et al., 2013; Gardiner et al., 2014) en contraposición a otros que lo niegan (Everaerts et al., 2010; Yu et al., 2011). Nocchi et al., (2014) señalaron una posible explicación a estas diferencias, pues mostraron que en ratones de edad avanzada (>24 meses) se detecta expresión de TRPM8, mientras que en ratones jóvenes (<5 meses) es prácticamente imperceptible. Además, esta expresión se ve incrementada en patologías de la vejiga, tanto en urotelio como en el ganglio raquídeo (Mukerji et al., 2006; Hayashi et al., 2011; Jun et al., 2012; Nocchi et al., 2014). Nosotros no hemos encontrado marcaje celular en el urotelio, pero hay que tener en cuenta que hemos usado animales jóvenes y sanos.

La exposición al frío ambiental (4 °C), produce hiperactividad en la musculatura detrusora y reduce la capacidad de la vejiga, por lo que se incrementa la frecuencia de vaciado (Lei et al., 2013). Además, se observa una correlación entre estos efectos y la disminución de la temperatura corporal (Imamura et al., 2013). Se ha demostrado que en estados de hipotermia disminuye la liberación de hormona antidiurética lo que explicaría los síntomas comentados. No obstante, también se ha visto que la aplicación de mentol intravesicular produce efectos similares a los reportados por la estimulación con frío (Nomoto et al., 2008; Hayashi et al., 2011; Lei et al., 2013), los cuales se ven fuertemente atenuados en el ratón KO (Uvin et al., 2015) y con el pretratamiento de antagonistas específicos para TRPM8 (Imamura et al., 2013; Lei et al., 2013; Winchester et al., 2014; Uvin et al., 2015; Mistretta et al., 2016), lo que indicaría que TRPM8 media en el proceso.

Igualmente, estímulos fríos aislados, que no generan una hipotermia corporal, evocan síntomas de urgencia urinaria (Vahabi et al., 2013; Gardiner et al., 2014), lo que sugeriría que la activación de sensores periféricos como TRPM8, influyen directamente en la función de la

vejiga a modo de reflejo (Stein et al., 2004; Hayashi et al., 2009; Shibata et al., 2011; Gardiner et al., 2014, Uvin et al., 2015).

5.2.8 Aparato reproductor.

Hay varios trabajos que asocian a TRPM8 con la función reproductiva en machos, concretamente con su presencia en el esperma (De Blas et al., 2009; Gibbs et al., 2011; Martínez-López et al., 2011; Borowiec et al., 2016). En la mayoría de los mamíferos, los testículos, se encuentran externalizados del cuerpo, presentando una temperatura inferior respecto de la corporal (Borowiec et al., 2016). Tanto la hipertermia como la hipotermia en estos órganos provoca la apoptosis de las células germinales, pudiendo llevar a la infertilidad (Macdonald y Harrison, 1954; Blanco-Rodríguez, 1997; Yazawa et al., 2003). Este hecho, pone de manifiesto la importancia de la termosensibilidad en la gametogénesis y sugiere la existencia de rutas moleculares específicas de protección para controlar y mantener la viabilidad celular ante las variaciones térmicas (Borowiec et al., 2016).

En la histología realizada a nivel testicular hemos encontrado un fuerte marcaje en los tubos seminíferos, concretamente en células germinales en etapas de maduración avanzada. Este hallazgo concuerda con lo mostrado en la bibliografía, dónde se detecta expresión de TRPM8 en células del epitelio seminífero a partir de la etapa de espermatocito (De Blas et al., 2009; Gibbs et al., 2011; Borowiec et al., 2016). En ratones, se ha descrito que esta expresión se ve aumentada a partir del mes de edad, lo que sugeriría un papel relevante de este canal en la espermatogénesis y la madurez del esperma (Martínez-López et al., 2011).

En los espermatozoides ya funcionales también se ha descrito la expresión de TRPM8, tanto en la cabeza como en el flagelo (De Blas et al., 2009; Gibbs et al., 2011; Martínez-López et al., 2011). En consonancia, en los espermatozoides del ratón TRPM8-EYFP1 también se detecta marcaje en estas ubicaciones, no obstante, parece ser bastante más intensa en el flagelo que en la cabeza. La presencia de TRPM8 en los gametos masculinos podría tener relevancia en varios procesos. El más estudiado es su relación en la reacción del acrosoma, proceso por el cual, la membrana acrosomal del espermatozoide, adquiere capacidad de fusión en previsión al contacto con el gameto femenino (De Blas et al., 2009; Martínez-López et al., 2011; Gibbs et al., 2011). Igualmente, se le atribuye un papel termoprotector, evitando



la muerte celular ante la exposición a descensos moderados de la temperatura (Borowiec et al., 2016), cierta influencia en la movilidad flagelar de los espermatozoides (Martínez-López et al., 2011), y se asocia con los procesos de termotaxis que guían a estos gametos hasta el ovulo dentro de las vías reproductoras femeninas (Bahat et al., 2003; Eisenbach y Giojalas 2006; Martínez-López et al., 2011).

Por otro lado, en relación al testículo, es importante comentar el papel descrito para TRPM8 como receptor de andrógenos, incluida la testosterona, totalmente necesaria para el correcto desarrollo y mantenimiento de la función reproductora en machos. Se ha comprobado que la testosterona es capaz de activar TRPM8 a concentraciones en el rango picomolar, y además estimula su expresión (Bidaux et al., 2005; Yang et al., 2012; Asuthkar et al., 2015a; 2015b), lo que sugiere que TRPM8 podría ejercer su función en el testículo estando regulado por testosterona, y también tener influencia en las distintas funciones, a un nivel más general, asociadas a la misma.

En cualquier caso, lo que está claro es que la función de TRPM8 en la reproducción, no sería decisiva, si no de refinamiento del proceso, pues ninguna de las cepas de ratones KO descritas son estériles (Bautista et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Bidaux et al., 2015).

En el aparato reproductor masculino no hemos estudiado otros tejidos. Sin embargo, no podemos dejar de comentar que la presencia de expresión de TRPM8 en la próstata está bien documentada en la literatura, ubicación donde se describió el canal por primera vez (revisado por Noyer et al., 2018).

En cuanto a la presencia de TRPM8 en el aparato reproductor femenino no hay nada descrito en la bibliografía. No obstante, tratamos de evaluar la presencia de marcaje con inmunorreactividad GFP en el ovario y las trompas de Falopio. El estudio de estos órganos no resultó totalmente concluyente; consideramos necesaria una mejora del protocolo inmunohistoquímico aplicado para concluir este análisis.

5.3 Expresión del canal iónico TRPM8 en cerebro.

La expresión de TRPM8 a nivel del sistema nervioso central ya ha sido señalada previamente, aunque siempre de una manera muy general y sin aportar datos anatómicos concretos (Kunert-Keil et al., 2006; Mittag et al., 2013; Wang et al., 2017; Bräunig et al., 2018).

Mediante la técnica de RT-PCR, hemos conseguido detectar su ARNm en muestras procedentes de hipotálamo de ratón y rata, poniendo de manifiesto unos niveles de expresión muy inferiores a los encontrados en los ganglios sensoriales primarios. Un conocimiento detallado del patrón de expresión de TRPM8 en el cerebro permitiría entender mejor sus implicaciones homeostáticas a nivel central y evaluar las consecuencias de su alteración. Sin embargo, hasta ahora, esta labor no ha podido realizarse debido a las dificultades técnicas encontradas. Las más destacables, el bajo nivel de expresión en que parece encontrarse, y la falta de anticuerpos anti-TRPM8 funcionales que permitan el uso de técnicas de inmunodetección. El uso de los ratones transgénicos que expresan reporteros fluorescentes, como los que hemos caracterizado en esta tesis, resultan de gran ayuda en cuanto a este respecto; no obstante, las técnicas de hibridación “in situ” e inmunohistoquímica específicas contra el marcador de interés se hacen necesarias para asegurar el emplazamiento y evitar posibles falsos positivos.

La detección de ARNm de TRPM8 en los ganglios sensoriales se consigue fácilmente aplicando los protocolos de hibridación “in situ” habituales. Sin embargo, la aplicación del mismo método a nivel central no dio lugar a resultados positivos. Por ello, decidimos focalizar nuestros esfuerzos en optimizar la técnica a fin de aumentar su sensibilidad, para después comparar los resultados con los datos obtenidos por detección de inmunorreactividad GFP en las líneas transgénicas TRPM8-EGFPf y TRPM8-EYFP1.

En estos experimentos encontramos que la ubicación de las células que contenían ARNm de TRPM8 y el marcaje GFP en ambas líneas transgénicas mostraba un patrón de distribución similar, lo que indica una buena correlación de expresión. Solamente en algunas localizaciones encontramos células marcadas pero ausencia de ARNm, lo que probablemente indica que estamos trabajando en el límite de la detección de la técnica de hibridación “in situ”. También es importante señalar que todas las zonas marcadas en la línea TRPM8-EGFPf también mostraron inmunorreactividad en la línea TRPM8-EYFP1, aunque ésta última mostró un marcaje más abundante y disperso. Esta diferencia en las señales puede ser el reflejo de la menor intensidad de marcaje celular que presenta la línea TRPM8-EGFPf y la aparente mayor sensibilidad de la línea TRPM8-EYFP1 para detectar bajos niveles de expresión. Por otro lado, el buen marcaje axonal visualizado en la línea TRPM8-EGFPf en los ganglios periféricos



también fue constatado a nivel central. Este marcaje axonal puede llegar a dificultar la detección de los somas, especialmente, en aquellos lugares en los que se observa una gran acumulación de fibras.

5.3.1 Hibridación “in situ” optimizada para la detección de transcritos a bajos niveles de expresión.

Para la optimización de la técnica de hibridación “in situ” nos basamos en el protocolo original descrito por Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser (1993), al que aplicamos algunas adaptaciones.

El empleo de ribosondas de tamaño corto nos permitía detectar fácilmente el ARNm de TRPM8 en ganglios sensoriales, pero no en cerebro. Por ello, la primera modificación fue utilizar una ribosonda marcada con DIG de gran tamaño, que abarcara toda la longitud del transcrito, y que necesariamente hubo que hidrolizar para facilitar su penetración celular. La segunda, fue la eliminación de los pasos de deshidratación de la metodología seguida; la incubación en series crecientes de etanol antes de la fase de hibridación es comúnmente utilizada en la mayoría de protocolos con el objetivo de mejorar la conservación a largo plazo, y su empleo se hace prácticamente obligatorio en los protocolos con sondas marcadas con 35S para evitar la unión inespecífica a lípidos (Young, 1989). Sin embargo, en los protocolos basados en la detección de ribosondas marcadas con DIG, este tratamiento puede generar efectos negativos (Schaeren-Wiemers y Gerfin-Moser, 1993). Tercero, la hibridación y los lavados se realizaron en condiciones de temperatura muy astringentes, a 72 °C, para evitar al máximo las uniones inespecíficas y reducir el fondo. Por último, la incubación final que permite revelar la señal de marcaje se mantuvo durante 4-6 días; incubaciones más cortas se demostraron insuficientes para revelar el marcaje con la sonda “antisense”, mientras que la sonda “sense” no generó señal, demostrando la especificidad de la señal detectada para TRPM8.

5.3.2 Patrón de expresión de TRPM8 en cerebro.

A partir de la detección de ARNm de TRPM8 a nivel central y su comparativa con la mostrada por la expresión de los reporteros fluorescentes en las líneas transgénicas TRPM8-

EGFPf y TRPM8-EYFP1, hemos identificado una serie de núcleos y áreas cerebrales en los que aparece la expresión de TRPM8 delimitada. Estas ubicaciones incluyen el área preóptica del hipotálamo, septum, algunos núcleos del tálamo y ciertas estructuras límbicas.

El número de somas observados fue bajo, localizándose en zonas muy concretas, lo que contrasta con la amplia dispersión de fibras positivas observadas dentro de todo el cerebro y el tronco encefálico. Este marcaje sugiere que las células con expresión de TRPM8 participan en distintos circuitos neuronales y, por tanto, podrían participar no solo en procesos locales sino también a larga distancia desde estas ubicaciones.

Las áreas de expresión localizadas se ajustan y complementan los datos recientemente publicados por Zeisel y sus colaboradores (2018), que muestran un atlas de expresión de TRPM8 en el sistema nervioso, basado en un análisis de expresión en célula única a gran escala, mediante la metodología de RNASeq. Los autores, encuentran niveles detectables de ARNm de TRPM8 en muy pocas áreas del cerebro, que incluyen el septum, proyección hipocampo septal, tálamo, mesencéfalo, cerebelo y cerebro posterior.

Las neuronas que expresan TRPM8 en el hipotálamo aparecen principalmente en el área preóptica, incluyendo núcleos como el VOLT, MPO y LPO, aunque también en el área lateral hipotalámica. En algunas de estas localizaciones se han descrito células termosensibles de frío con anterioridad (Boulant y Dean, 1986) pero, curiosamente, también aparecen en otras ubicaciones dónde se han encontrado células activadas por calor, como es el caso del VMPO (Tan et al., 2016). Asimismo, hemos visualizado fibras con inmunorreactividad GFP de forma generalizada por toda esta región, observándose en abundancia en zonas implicadas en la regulación de las funciones termorreguladoras autonómicas, como el MnPO o el DMH. En relación a este dato, también hemos visto fibras en el núcleo dorsal del rafe situado en el tronco del encéfalo, un punto efector clave para el desencadenamiento de los mecanismos termorregulatorios (revisado por Morrison y Nakamura, 2018). Todos estos datos, sugieren un posible papel de las células que expresan TRPM8 en la regulación de las respuestas autónomas de termorregulación a nivel central.

Por otro lado, TRPM8 también se expresa en núcleos no relacionados con la regulación termal, aunque sí implicados en otras funciones homeostáticas influenciadas por temperatura, como es el caso del VLPO, implicado en la regulación del sueño (Chou et al.,



2002; Lu et al., 2000), o el arcuato, involucrado en la promoción de la ingesta alimenticia (Cowley et al., 2001). Igualmente, hemos detectado numerosas fibras atravesando o rodeando núcleos como el SO y el PVH que, como profundizaremos más adelante, son claves en la regulación osmótica del organismo. Estos datos podrían indicar la influencia de TRPM8 en estos mecanismos, integrando la información térmica con otros procesos fisiológicos y comportamentales, como son la osmorregulación, el inicio del deseo de beber o de ingerir comida y los ciclos de sueño-vigilia.

Otra ubicación con notable expresión de TRPM8 es el LS, concretamente las subregiones LSr y LSc. En esta ubicación también se habían descrito previamente neuronas termosensibles de frío implicadas en la regulación de respuestas termorreguladoras (Cunningham et al., 1967; Eisenman y Jackson, 1967; Eisenman, 1969; Boulant y Demieville, 1977). Hemos comprobado que estas células no presentan una identidad genética homogénea, pues la gran mayoría ($\approx 70\%$) de las células del LSr analizadas expresaron el marcador calbindin D-28k, a diferencia de las localizadas en el LSc donde apenas llegaron al 15%. Las células que expresan calbindin D-28k en el LS, se han descrito como somatoespinales GABAérgicas (Celio, 1990; Jakab y Leranthy, 1990) que reciben señales principalmente de neuronas hipocampales (Jakab y Leranthy, 1990) y que proyectan al hipotálamo, amígdala y en cierta medida al complejo MS-NDB (Risold y Swanson, 1997; Lüttgen et al., 2005). De acuerdo a estos datos, hemos visualizado algunas neuronas aisladas marcadas en la región caudal CA1 del hipocampo y en el subiculum, que podrían proyectar a estas áreas septales, y fibras fluorescentes en los núcleos mencionados como receptores de sus axones. Se considera que el septum actúa como intermediario en la transmisión de señales desde la formación reticular del mesencéfalo al hipocampo, donde se almacena la memoria (Boulant y Demieville, 1977), lo que hace probable la implicación de neuronas TRPM8 en las rutas hipocampales.

También hemos detectado células y fibras axonales marcadas en algunas estructuras límbicas que incluyen la amígdala, corteza olfativa, cingulada, retrosplenial y entorrinal; además, de numerosas proyecciones axonales con fluorescencia que discurren a través de los grandes tractos límbicos. Esta expresión, junto con la existencia de células en la corteza prefrontal, especialmente en la orbital y prelímbica, podría indicar que TRPM8 también participan en los componentes afectivos derivados de la experiencia térmica sensorial,

incluyendo los ajustes comportamentales necesarios para alcanzar el confort térmico (Farrell, 2016). Este punto resulta muy interesante, pues los estudios sobre termorregulación realizados hasta ahora se han focalizado mayoritariamente en la comprensión del funcionamiento de los procesos regulatorios autónomos, dejando a un lado las complejas consecuencias comportamentales de los mismos que a día de hoy apenas se conocen (Señarís et al., 2018).

A nivel del tálamo es donde hemos localizado la señal más contundente de ARNm, en el núcleo reticular del tálamo (RT), lo que la identifica como la zona con mayores niveles de expresión de TRPM8 en el cerebro. Las neuronas que conforman este núcleo son mayoritariamente interneuronas GABAérgicas inhibitorias que modulan la información excitatoria enviada desde el tálamo a la corteza (revisado por Halassa y Acsady, 2016; Clemente-Pérez et al., 2017). Nuestros datos indicarían que la gran mayoría de las neuronas que expresan TRPM8 en esta ubicación co-expresan PV (>95%), células consideradas como moduladoras, preferencialmente, de señales somatosensoriales (Clemente-Perez et al., 2017), por lo que podrían constituir una pequeña población de células reguladoras de los procesos somatosensoriales termales.

Curiosamente, también en el tálamo, hemos encontrado una clara señal de hibridación “in situ” en el núcleo AD, que no se correlaciona con marcaje GFP+ en células de este núcleo en ninguna de las dos líneas transgénicas estudiadas. Se han descrito varias isoformas del canal TRPM8 en otros tejidos (Sabnis et al., 2008a; Bidaux et al., 2012, 2015, 2016), y se indica que algunas, que son más cortas, comienzan a transcribirse en un exón posterior al descrito como inicial para TRPM8, sugiriendo que para ello podrían emplear un promotor diferente al canónico (Bidaux et al., 2012). Teniendo en cuenta que la sonda utilizada abarca toda la longitud del transcrito original, y que ha sido hidrolizada a fin de mejorar su penetración celular, sería muy probable que también detectase un transcrito alternativo de ARNm de TRPM8 con una secuencia altamente coincidente con la primigenia; y si además, dicha forma estuviera dirigida por un promotor diferente al canónico que dirige la expresión transgénica, también sería factible la falta de expresión de fluorescencia en los modelos animales utilizados. Este núcleo se relaciona íntimamente con el sistema límbico y la integración de información sensorial (Wijesinghe et al., 2015), implicaciones funcionales ya sugeridas para



TRPM8 por su localización en otros núcleos.

Para terminar, falta por comentar el destacado marcaje encontrado en el sistema trigeminal, concretamente en el tracto trigeminoespinal, proveniente de las neuronas sensoriales que expresan TRPM8 alojadas en el ganglio trigémino.

En resumen, la mayoría de las células con expresión de TRPM8 las hemos localizado en el área preóptica, en núcleos relacionados con la termorregulación autónoma. Asimismo, se pueden observar muchas fibras GFP+ en otros núcleos hipotalámicos y del tronco encefálico involucrados en el control de la temperatura corporal, lo que apoya su participación en esta función. Igualmente hemos visualizado neuronas TRPM8+ y fibras inmunorreactivas en otros núcleos homeostáticos no-termales, lo que puede reflejar su implicación en otros procesos regulatorios a nivel central aún no descritos. Curiosamente, también hemos detectado somas y/o fibras positivas en estructuras límbicas y de la corteza prefrontal, que podrían indicar la influencia de TRPM8 en los procesos generadores de emociones, comportamentales y sociales en relación al control de la temperatura. En la [figura 5.1](#) se muestra un resumen de las principales ubicaciones detectadas para la expresión de TRPM8.

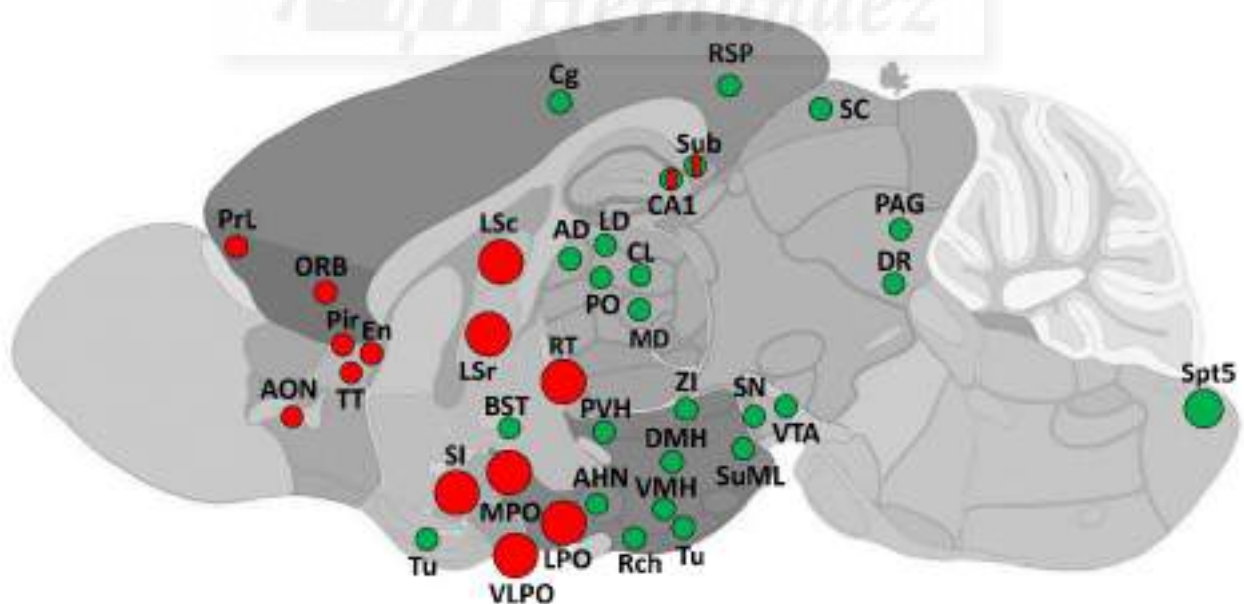


Figura 5.1 Resumen de los principales emplazamientos con detección de expresión de TRPM8 proyectados sobre una sección sagital del cerebro. Los círculos rojos localizan somas neuronales y los verdes fibras inmunofluorescentes. El tamaño de los círculos indican niveles relativos de expresión o abundancia de somas/axones.

5.4 Estudio del canal iónico TRPM8 en células neuronales de la retina y sus proyecciones al cerebro.

La retina es una red neural situada en la parte posterior del ojo que está especializada en la captación e integración de estímulos lumínicos, para lo que cuenta con una gran diversidad celular. Estructuralmente, en mamíferos, se organiza en tres capas de cuerpos neuronales diferenciadas y ordenadas. La capa nuclear más externa está constituida por los fotorreceptores clásicos (conos y bastones), la capa nuclear intermedia, denominada interna (NI), está formada por una mezcla de células horizontales, bipolares y sobretodo amacrinas, y la capa más interior, la ganglionar (CG), está mayormente compuesta por células ganglionares. Entre estas capas nucleares se distinguen dos capas plexiformes, la externa (PLE) y la interna (PLI), compuesta por las proyecciones axonales de las neuronas de las capas nucleares que las flanquean, donde hacen sinapsis entre sí (revisado por Masland, 2012). Aunque las células amacrinas y ganglionares tradicionalmente se han ubicado en las capas mencionadas, desde hace tiempo se viene comprobando la existencia de grupos desplazados entre ambas ubicaciones (Bunt y Minckler, 1977; Hughes y Wieniawa-Narkiewicz, 1980; Linden, 1987; Pérez De Sevilla Müller et al., 2007).

La información lumínica es captada por los fotorreceptores gracias a la expresión de pigmentos fotosensibles y, a continuación, integrada a través de circuitos retinianos en el que participan los distintos tipos celulares. Las células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico, son el punto de salida de la información visual, proyectando hacia distintas regiones del cerebro para su procesamiento final. Como resultado, se consigue tanto la formación de imágenes por la vía visual como la obtención de otras respuestas a la luz como la contracción pupilar o los la regulación del ritmo circadiano (revisado por Hattar et al., 2002, Güler et al., 2008, Masland, 2012 y Seung y Sümbül, 2014).

El estudio de la línea TRPM8-EYFP1 confirmó un notable marcaje fluorescente en células de la retina, lo que podría indicar la presencia del canal en este tejido. En la literatura, la única referencia que hemos encontrado a este respecto es un trabajo donde se analiza la expresión de diversos canales de la familia TRP en la retina; los autores indican que el canal TRPM8 se expresaría a un nivel muy bajo, posiblemente presentando varias isoformas (Gilliam y Wensel,



2011). En nuestras manos, aplicando las técnicas de RT-PCR e hibridación “in situ”, tanto en animales adultos como en juveniles, no hemos conseguido detectar la presencia de ARNm. Este hecho, indicaría unos niveles de expresión extremadamente bajos, lo que contrasta con la abundante señal observada en el ratón de la línea TRPM8-EYFP1.

Con el objetivo de profundizar en esta cuestión, hemos analizado las otras líneas transgénicas para TRPM8 examinadas en los primeros apartados de este trabajo, para así evaluar su similitud de marcaje. En todas ellas hemos encontrado marcaje celular localizado en las capas NI y GC, con una mayor o menor profusión. Las líneas TRPM8-EYFP1, TRPM8-Cre, TRPM8-DTR-GFP y TRPM8-EGFPf mostraron patrones de marcaje similares, con una amplia cantidad de células marcadas en ambas capas nucleares, que proyectan a la PLI conformando dos plexos nerviosos a igual altura; por otro lado en las líneas TRPM8-EYFP(2-4), se observó un marcaje mucho menos abundante sin diferenciarse plexos nerviosos marcados.

Además, es importante destacar el hecho de que el patrón visualizado en la línea TRPM8-EGFPf deja de ser visible en ratones adultos. En este modelo, la expresión del reportero se produce bajo el control del promotor nativo del gen *trpm8*, por lo que una disminución en la señal puede ser directamente atribuible a un descenso en el nivel de expresión génica del canal, indicando que su papel funcional en este tejido sería más relevante durante el desarrollo del circuito visual.

5.4.1 Caracterización molecular de células fluorescentes de la retina.

Para corroborar la similitud entre patrones de expresión en las distintas líneas, se procedió a realizar una caracterización de las células retinianas con marcaje fluorescente. Tradicionalmente, el estudio de los distintos tipos celulares de la retina se ha venido realizando en base a su morfología, teniendo gran relevancia en ella el grado de arborización axonal en la capa PLI, pues su morfología, profundidad y distribución está directamente relacionada con sus conexiones sinápticas (Ramón y Cajal, 1893; Masland, 2001; Seung y Sümbül, 2014). Más recientemente, se ha comenzado a utilizar marcadores moleculares, lo que ha permitido identificar un gran número de subpoblaciones celulares (Karten y Brecha, 1983; Haverkamp y Wässle, 2000; de Souza et al., 2016).

Se ha comprobado que la capa PLI es multilaminar, agrupando las prolongaciones de

determinadas neuronas amacrinas con morfologías y substancias neuroactivas concretas de forma estratificada (Karten y Brecha, 1983; Roska y Werblin, 2001). Según los autores y el tipo de estudio realizado, el número de estratos considerados en la bibliografía puede ser variable, sin embargo el más utilizado para caracterización anatómica es de cinco (numerando del exterior al interior), el número de capas establecidas por Ramón y Cajal en 1893.

Los marcadores de expresión empleados en este trabajo fueron ChAT, para neuronas amacrinas, y melanopsina, para neuronas ganglionares. Puesto que la anatomía y distribución celular de la retina puede variar de una zona a otra, y para evitar una cuantificación sesgada influenciada por emplazamiento, se realizó un muestreo estratificado de los cortes utilizados en el análisis para asegurar que todas las regiones retinianas estuvieran representadas en el estudio

Por los resultados obtenidos sobre esta co-expresión hemos podido clasificar las líneas transgénicas estudiadas en tres grupos, las que co-expresan ChAT exclusivamente, las que co-expresan melanopsina y finalmente, las que co-expresan ambos marcadores.

5.4.1.1 Líneas que co-expresan ChAT: comparativa.

Se han descrito alrededor de 40 tipos de células amacrinas distintas (Zandt et al., 2017) Estas células juegan un importante papel en el procesamiento de la información visual, pues aportan propiedades espaciales y temporales a las señales visuales captadas en los fotorreceptores (Pérez De Sevilla Müller et al., 2007; Zandt et al., 2017).

El marcador molecular ChAT, específico de células amacrinas colinérgicas, es uno de los pocos que identifica una única población celular dentro de la retina. Se trata de una subpoblación de neuronas amacrinas denominada “starburst” por su morfología, y que son responsables de la selectividad direccional en respuesta a estímulos en movimiento que presentan las células ganglionares (Euler et al., 2002; Yoshida et al., 2001; Fried et al., 2002). Igualmente, estas células están implicadas en la generación de las ondas electrofisiológicas que recorren la retina durante su desarrollo, y que se asocian a la correcta formación de las conexiones neurales entre retina y cerebro (Feller et al., 1996; Zhou, 1998).

Las neuronas ChAT+ se distribuyen en la capa nuclear interna o desplazadas a la capa ganglionar, proyectando sus dendritas a los estratos 2 y 4 de la PLI respectivamente (Masland



y Mills, 1979; Karten y Brecha, 1983; Masland et al., 1984). Desde el punto de vista electrofisiológico, el plexo más exterior se sitúa en la llamada sublámina b (OFF, que abarca los estratos 1 y 2), zona que ante el incremento de intensidad lumínica, desempeña un papel hiperpolarizante sobre las células bipolares. Estas células a su vez afectan a las ganglionares, modificando la señal final que se transmite al cerebro informando sobre la señal lumínica captada. El plexo más interior, se localiza en la sublámina a (ON, que abarca los estratos 3, 4 y 5), que ante las mismas condiciones realiza una función despolarizante (figura 5.2). Ante una disminución de la intensidad lumínica se genera la funcionalidad inversa, propiciando así la generación de los campos receptivos ON-OFF mostrados por las células ganglionares (Famiglietti, 1983b, 1983a; Liu, 1995; Balasubramanian y Sterling, 2009; Ravi et al., 2018)

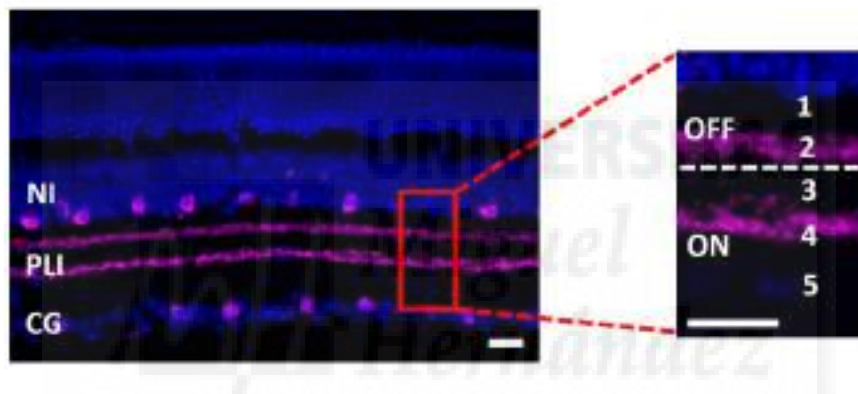


Figura 5.2 Marcaje inmunohistológico generado por el marcador ChAT en un corte transversal de la retina de ratón (20 μ m). A la izquierda, se indica la ubicación de la capa nuclear interna (NI), de la capa ganglionar (CG) y de la capa plexiforme interna (PLI). A la derecha, se muestra una ampliación de la PLI en la que se indica la distribución de sus estratos (ON, OFF) y subláminas (1-5). Barra de escala: 25 μ m

Las líneas TRPM8-Cre y TRPM8-DTR-GFP mostraron un patrón de marcaje aparentemente coincidente entre ellas, e igual al descrito para las células amacrinas colinérgicas, si bien en la línea TRPM8-DTR-GFP fue mucho menos intenso, especialmente en la capa CG.

La colocalización neuronal con el marcador ChAT se reveló muy buena en ambos modelos, resultando perfectamente coincidente en los dos plexos. En la capa NI, la colocalización estuvo presente en más del 95% de las células con marcaje, siendo también muy alta en la población ChAT+. El grado de colocalización fue algo inferior en la línea TRPM8-DTR-GFP, posiblemente a causa de la pobre visualización de su reportero. En la capa CG la colocalización en la línea TRPM8-Cre se mostró igual de buena que en la capa NI, sin embargo,

en la línea TRPM8-DTR-GFP no se pudo cuantificar por la dificultad de la inmunodetección de las células transgénicas. Aun así, su visualización se consiguió en la configuración “whole mount”, y aunque no se cuantificó se apreció que también era muy alta.

Por lo tanto, según estos datos, ambas líneas parecen mostrar un marcaje fluorescente coincidente y mayoritario de células amacrinas colinérgicas. Lo que en el caso de la línea TRPM8-Cre puede constituir una herramienta muy interesante para el estudio de la funcionalidad de estas células pues podría permitir su silenciamiento o su activación selectiva por optogenética.

La atenuación en la intensidad de marcaje observado en la capa de CG en la línea TRPM8-DTR-GFP, indicaría que el transgén se expresa en menor medida en esta subpoblación. Esta regulación pudiera deberse a un efecto posicional específico de este subgrupo de neuronas ChAT+, o a una activación menor del promotor de TRPM8. Este último caso, indicaría que la presencia del canal tendría mayor influencia en las respuestas moduladas por el plexo OFF, que en moduladas por plexo ON. Además, esta disminución de expresión del transgén en la CG, también se refleja en la efectividad del tratamiento con la toxina diftérica, pues en esta ubicación la ablación de células DTR+ en animales tratados, fue inferior al 25%, mientras que en la capa NI fue del ~60%. El tratamiento realizado, como se mostró en la [figura 4.11](#), es suficiente para eliminar por completo las células fluorescentes visualizadas en ganglios sensoriales, donde hay más riego sanguíneo y muy probablemente mayor expresión de receptor, por lo que seguramente sea necesario alargar el tiempo de tratamiento para conseguir una ablación completa en retina.

5.4.1.2 Líneas que co-expresan melanopsina: comparativa.

El marcaje fluorescente de las líneas TRPM8-EYFP2, 3 y 4 no fue totalmente coincidente entre ellas. En las dos primeras se detectaron células marcadas en escasa proporción, ubicadas principalmente en la capa CG, y en mucha menor medida en la NI, mientras que en la última, el patrón mostrado fue el inverso. Sin embargo, en todas las líneas se registró co-expresión con melanopsina en un grado considerable, que merece ser tenido en cuenta y discutido.

La melanopsina es un fotopigmento encontrado en una pequeña subpoblación de células ganglionares (~2%) que las hace fotosensibles (ipRGC, “Intrinsically photosensitive



retinal ganglion cells” en inglés). Sus somas se ubican principalmente en la capa CG, aunque una pequeña proporción, se encuentra desplazada a la capa NI (revisado por Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002; y Provencio et al., 2002). Las ipRGCs se consideran el tercer tipo de fotorreceptor de la retina, que junto con los conos y bastones, captan y transducen la información lumínica recibida (Hattar et al., 2006). Además de presentar una morfología y emplazamiento totalmente diferente a los fotorreceptores clásicos, su principal funcionalidad no parece tener relación con la vía de formación de imágenes. Se asocia a la regulación de otras respuestas visuales necesarias para el correcto funcionamiento del sistema visual (p.e. el reflejo pupilar), así como con la regulación de los ritmos circadianos, actuando como integradores de las señales de cambio de intensidad lumínica (Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002; Lucas et al., 2003; Güler et al., 2008).

En este contexto, se ha comprobado que los animales que no expresan melanopsina desarrollan ciclos circadianos relativamente normales, presentando alteraciones en los cambios de fase de actividad cuando el ciclo lumínico es alterado, lo que sugiere que el fotorreceptor no es el responsable de la generación del ritmo circadiano propiamente dicho, pero sí que tiene gran influencia sobre su sincronía y la magnitud de respuesta a la luz (Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002).

Se han identificado 5 tipos de células ganglionares que expresan melanopsina (M1-M5), diferenciadas principalmente por su morfología en la retina y sus características electrofisiológicas. El tipo M1 es el que mejor caracterizado está, el que mayor nivel de expresión de melanopsina muestra y por tanto el más sensible a la luz. Sus proyecciones principalmente van a parar al núcleo supraquiasmático, el centro regulador del ritmo circadiano, y al núcleo intergeniculado (Hattar et al., 2006; Baver et al., 2008; Ecker et al., 2010). Los otros tipos también proyectan al núcleo supraquiasmático, aunque en menor medida. Otras dianas mayoritarias de inervación son el núcleo geniculado, la oliva pretectal y el colículo superior (Hattar et al., 2002; Hattar et al., 2006; Ecker et al., 2010). Los subtipos M4 y M5 muestran muy bajos niveles de expresión de melanopsina y no son identificables mediante inmunohistoquímica; su identificación se ha logrado mediante el uso de un animal transgénico que expresa GFP bajo el promotor de *Opn4*, el gen de la melanopsina (Ecker et al., 2010).

Las líneas TRPM8-EYFP2 y 3, inicialmente parecían mostrar un patrón de marcaje coincidente, sin embargo, al comparar el grado de co-expresión de melanopsina y las proyecciones al núcleo supraquiasmático se observaron grandes diferencias. En la línea TRPM8-EYFP2 se observó una co-expresión con melanopsina superior al 30% dentro de la población total de células GFP+, que se distribuyó por igual en las capas NI y CG; mientras que en la línea TRPM8-EYFP3 el porcentaje disminuyó hasta el 20% y se restringió únicamente a células de la capa CG. Además, la línea TRPM8-EYFP2 presentó un considerable número de fibras inmunorreactivas en el núcleo supraquiasmático, lo que sugiere que gran parte de las células que co-expresan melanopsina son del subtipo M1. En contraposición, en la línea TRPM8-EYFP3, apenas se observó marcaje en este núcleo, sugiriendo que la co-expresión detectada ocurre en otro subtipo de célula con expresión de melanopsina. Estos datos indicarían que ambas líneas presentan marcajes en subtipos celulares diferentes de células melanopsínicas y que, consecuentemente, sus patrones de marcaje en la retina no son equivalentes. Esta interpretación requiere un estudio más detallado de su morfología y su respuesta a estímulos lumínicos.

Por otro lado, la línea TRPM8-EYFP4, no mostró un porcentaje de colocalización alto de melanopsina en la población GFP+ ($\approx 7\%$). No obstante, esta colocalización quedó restringida a la a la capa CG, representando el $\approx 40\%$ de ella. Las proyecciones axonales visualizadas en el núcleo supraquiasmático fueron escasas, ubicándose en la porción central y dorsal del núcleo. Puesto que la línea TRPM8-EYFP2 también mostró buena colocalización en las células GFP+ de la CG y que parte de sus proyecciones axonales se ubicaron en igual situación en el supraquiasmático, este patrón podría indicar que la población con co-expresión GFP+ en la línea TRPM8-EYFP4 está incluida, al menos en parte, dentro de población inmunofluorescente de la línea TRPM8-EYFP2.

En todas estas líneas se encontró alguna célula aislada que colocalizó con ChAT, pero la cuantificación fue tan baja que la consideramos despreciable.

5.4.1.3 Líneas que co-expresan ChAT y melanopsina: relación con otras líneas transgénicas a estudio y comparativa.

La línea TRPM8-EGFPf resultó bastante problemática a la hora de ser cuantificada



debido a la ubicación de la GFP en la membrana plasmática y la baja intensidad de fluorescencia exhibida. Las fibras fluorescentes que conforman los dos plexos situados en la capa PLI se visualizaron fácilmente, constatándose su co-expresión colinérgica; no así ocurrió con los somas, pues sólo unas pocas células fueron distinguibles tanto en la capa NI como en la CG, cantidad que parece incompatible con el persistente marcaje visualizado en los plexos. Este hecho nos sugiere que se está perdiendo la visualización de los cuerpos neurales inmunofluorescentes.

Ante esta situación, se decidió no realizar el mismo estudio de cuantificación estratificado como en las otras líneas, pues consideramos que los valores de co-expresión dentro de la población GFP+ quedarían muy infravalorados; no obstante, sí que se estudió el perfil de expresión de aquellas células visualizadas, constatándose la existencia de co-expresión con ChAT y melanopsina. Las células localizadas en la capa NI fueron prácticamente en su totalidad ChAT+, y de las localizadas en la capa CG la mitad expresaron melanopsina y $\approx 25\%$ ChAT.

La alta colocación con ChAT, sobre todo la visualizada en los plexos ubicados en la capa PLI, nos lleva a establecer una similitud de marcaje con las líneas TRPM8-Cre y TRPM8-DTR-GFP.

La visualización de las proyecciones axonales al supraquiasmático reveló un patrón de marcaje muy similar al indicado en la línea TRPM8-EYFP2, aunque un poco menos abundante; igualmente, ambas líneas mostraron un nivel de colocación similar con melanopsina en la capa CG. Estos datos podrían sugerir que, al menos en parte, ambas líneas identifican la misma población ganglionar de células con expresión de melanopsina, y que, como ya comentamos en el apartado anterior, podría también incluir a la población caracterizada dentro de la línea TRPM8-EYFP4 con co-expresión.

La línea TRPM8-EYFP1 marca una gran cantidad de células inmunofluorescentes, tanto en la capa NI como en la CG, permitiendo detectar tres plexos GFP+ en la capa PLI. La co-expresión con ChAT se demostró muy alta, observándose la práctica totalidad de la población colinérgica incluida dentro de la población transgénica ($\approx 95\%$). Este resultado sugiere, que al igual que en la línea TRPM8-EGFPf, los patrones detectados en las líneas TRPM8-Cre y TRPM8-DTR-GFP estarían incluidos dentro del visualizado en TRPM8-EYFP1.

Por otro lado, cerca de la mitad de la población que expresa melanopsina también estaría incluida dentro de la población GFP+, en la misma proporción, tanto en las células ubicadas en capa NI como en la CG. El estudio de las proyecciones al núcleo supraquiasmático reveló un abundante marcaje axonal, mucho más profuso que en las otras líneas, y ampliamente distribuido, lo que sugiere, que el marcaje de la línea TRPM8-EYFP1 podría incluir, al menos en parte, a los marcajes de las líneas TRPM8-EGFPf, TRPM8-EYFP2 y TRPM8-EYFP4, además de a otra población de células ganglionares no reportadas en las otras líneas transgénicas estudiadas.

A parte, se detectó un $\approx 40\%$ adicional de células GFP+, las cuales mayormente se ubicaron en la capa NI. El plexo fluorescente más exterior de la PLI detectado en esta línea, tampoco colocalizó con ninguno de los dos marcadores empleados en este estudio, pero es de suponer que se conforme a partir de una población de células amacrinas aún sin caracterizar situadas en la capa NI y quizás también desplazadas a la capa CG. Debemos destacar que, en ratón, se han descrito más de 40 subtipos de células amacrinas, en función de su morfología, localización del soma y estratificación dendrítica (Masland, 2012; Zandt et al., 2017). El neurotransmisor inhibitorio (GABA o glicina), los neuropéptidos que contienen, así como distintas proteínas fijadoras de calcio (calretinina, calbindina, parvalbúmina) también permiten distinguir distintas clases de células amacrinas. A falta de un marcador que las identifique, no sería descabellado pensar que se correspondiesen con algunas células que todavía no hemos caracterizado en las otras líneas transgénicas estudiadas.

Por lo tanto, pareciera que tanto la línea TRPM8-EGFPf como la TRPM8-EYFP1 incluyeran características comunes de prácticamente todas las demás, aunque visualizándose una mayor cantidad de células marcadas en la línea TRPM8-EYFP1.

Analizando estos datos en su conjunto, no nos es posible afirmar la expresión del canal termorreceptor TRPM8 en retina. La ausencia de marcaje mediante la técnica de hibridación "in situ" sugiere un bajo nivel de expresión. Sin embargo, negarla categóricamente tampoco sería correcto, pues no deja de ser sorprendente que todas las líneas estudiadas den resultados tan relacionados entre sí, habiendo sido desarrolladas por distintos laboratorios, mediante estrategias, técnicas, y constructos genéticos distintos. Es posible que la retina exprese una variante desconocida de TRPM8 o que dicha expresión sufra cambios durante el



desarrollo que será necesario analizar en mayor profundidad en futuros estudios.

5.4.2 Proyecciones retinianas al cerebro en las líneas transgénicas TRPM8-EGFPf y TRPM8-EYFP1.

Las líneas TRPM8-EGFPf y TRPM8-EYFP1 parecen incluir a la gran mayoría de las poblaciones con marcaje fluorescente encontradas en las otras líneas. Parte de ellas, son células ganglionares, algunas que hemos caracterizado como ipRCGs, y otras a las que no hemos atribuido ninguna identidad genética. Estas células ganglionares GFP+ proyectarán a algunas partes del cerebro cuyo estudio puede arrojar luz sobre la posible funcionalidad de canal TRPM8 en la retina, y por ello decidimos estudiar su patrón de trazado.

La aplicación de CTB conjugado con el marcador fluorescente Alexa-Fluor 594 en la retina, nos permitió obtener un marcaje anterógrado generalizado de las proyecciones axonales ganglionares al cerebro. De este modo, fuimos capaces de ubicar y examinar distintos núcleos integradores de información lumínica, tanto de la vía visual como de la formadora de imágenes. Obtuvimos un claro marcaje en el núcleo supraquiasmático, el geniculado, la oliva pretectal y el colículo superior.

Se observaron fibras con inmunorreactividad a GFP en ambos modelos transgénicos, tanto discurriendo por el quiasma óptico como llegando a los núcleos indicados. Además, se comprobó que algunas de estas fibras co-expresaban GFP y CTB, lo que permitía asegurar su origen retiniano. Esta colocalización no siempre fue fácil de determinar debido a la gran densidad de fibras CTB+ marcadas. No obstante, en el ratón TRPM8-EGFPf, este hecho queda demostrado al observarse una reducción en el marcaje de fibras GFP+ en estas ubicaciones con la edad, en paralelo a la disminución de inmunorreactividad en la retina.

Las proyecciones mostradas guardan cierto parecido con las descritas previamente para las células que expresan melanopsina (Hattar et al., 2006; Ecker et al., 2010). El modelo transgénico de Hattar et al., (2006), parece marcar principalmente células del tipo M1, identificando proyecciones al núcleo supraquiasmático y núcleo intergenicular, y algunas fibras en baja densidad a la oliva pretectal y al geniculado ventral. Posteriormente, el mismo grupo de investigación creó otro modelo transgénico basado en el uso de la recombinasa Cre; este modelo resultó ser mucho más sensible permitiendo identificar dos nuevas clases de

células ipRGC con muy bajos niveles de expresión de melanopsina (M4 y M5). De este modo se amplió el conocimiento sobre sus dianas de inervación, demostrando una mayor presencia en todos los núcleos antes nombrados, además de en el núcleo geniculado dorsal y el colículo superior (Ecker et al., 2010)

Nuestros modelos transgénicos, parecen mostrar un patrón de marcaje intermedio al descrito por ambos grupos, lo que concuerda con el hecho aquí probado de que ambas líneas transgénicas presentan células ganglionares que co-expresan el reportero fluorescente y el ftopigmento en un alto porcentaje. Estos datos podrían indicar que la población GFP+ detectada incluiría, al menos en parte, a la población descrita en el primer modelo de Hattar; pero también podría incluir a otras células que expresan bajos niveles de melanopsina, que no son detectables por inmunohistoquímica, como las M4 y M5 observadas en su segundo modelo.

Por otro lado, las células ganglionares marcadas que no expresan melanopsina también proyectarán a estos núcleos integradores; sin embargo, al no poder discernir entre ambos tipos de fibras, no sabemos si anidan en alguno en mayor medida. Si así fuera, podrían indicar una cierta relevancia en otras funciones no relacionadas con las ipRCGs.

Como ya hemos comentado, el núcleo supraquiasmático es el centro regulador de los ritmos circadianos, y la principal diana de las ipRGC (Hattar et al., 2006; Moore, 2013). Es bilobulado y, anatómicamente, cada lóbulo, se puede subdividir en dos regiones neuropeptídicas diferentes, interconectadas sinápticamente: el núcleo o “core”, situado inmediatamente encima del quiasma óptico, y el caparazón o “shell” que se organiza rodeándolo. Se cree que el “core” desempeña un mayor papel integrador de la información lumínica para la generación del ritmo circadiano endógeno, pues recibe la mayoría de las señales visuales integratorias primarias, directamente de la retina, y secundarias, desde la oliva pretectal y el núcleo intergenicular. Por otro lado, el “shell”, tendría un papel modulador, recibiendo señales desde otras ubicaciones de integración no lumínica, como el hipotálamo o el córtex límbico. Sin embargo, a día de hoy su complejo funcionamiento aún está lejos de ser totalmente comprendido (revisado por Moore, 2013; Hastings et al., 2019). En los modelos analizados, las fibras fluorescentes de origen retiniano se visualizan en ambas regiones.

En el núcleo geniculado dorsal fue especialmente llamativo el acúmulo puntual de fibras



visualizadas en su parte anterior en situación dorsal y medial que por su emplazamiento pudieran corresponderse con proyecciones retinianas ipsilaterales (Hayhow et al., 1962; Jaubert-Miazza et al., 2005). No obstante, al no haber realizado marcajes anterógrados unilaterales (en un solo ojo), no podemos asegurarlo. Se sabe que este núcleo constituye un punto clave de preintegración de los estímulos visuales antes de ser transmitidos a la corteza visual (revisado por Kerschensteiner y Guido, 2017), pero el significado funcional de las proyecciones ipsilaterales, a día de hoy no es comprendido.

En el núcleo intergenicular, y en parte del núcleo geniculado ventral, se observó un marcaje bastante más generalizado; ambos núcleos están estrechamente relacionados entre sí y las principales funciones que se les atribuyen se asocian con el control circadiano y el control visumotor y vestibular (Harrington, 1997; Horowitz et al., 2004).

Igualmente, en la oliva pretectal y el colículo superior se visualizaron fibras marcadas en toda su superficie. La oliva pretectal es un elemento crítico en la vía de regulación del reflejo pupilar a los cambios de luz (Trejo y Cicerone, 1984) y el colículo superior en la orientación y fijación de los movimientos oculares hacia las dianas visuales (revisado por Isa, 2002).

5.4.3 Posibles implicaciones funcionales

Es difícil asegurar algún tipo de funcionalidad específica del canal TRPM8 dentro de la retina basándonos únicamente en nuestros datos. Sin embargo, por la caracterización celular del marcaje descrito y el bajo nivel de expresión que presentaría, podemos teorizar con un posible papel de refinamiento funcional en las actividades relacionadas con las células amacrinas colinérgicas y celulares ganglionares fotosensibles.

La colocalización con melanopsina indicaría cierto papel en la regulación de respuestas visuales no formadoras de imagen y en la regulación de los ciclos circadianos. Igualmente, el análisis de las proyecciones retinianas al cerebro apoyaría la influencia de TRPM8 en esta vía; no obstante, también podría influir en la vía visual, pues los axones ganglionares fluorescentes se visualizaron en todos los núcleos integradores implicados. Recientemente, en relación a su influencia en los ritmos circadianos, Moraes y sus colaboradores (2017), demostraron que los ratones sin expresión de TRPM8 cuando son sometidos a un ciclo continuo de oscuridad, presentan una alteración menor en el inicio de la fase circadiana de actividad locomotora ante

la aplicación de un pulso lumínico. Los autores encuentran variaciones en genes relacionados con el control circadiano en grasa parda y ojo, e indican que debido a la falta de estudios relacionados es difícil distinguir a qué nivel se produce la regulación mediada por TRPM8, si periférico o central. La presencia de este termorreceptor en células ipRGCs proyectando al supraquiasmático, podría ser un punto clave a este respecto, pues exactamente estas células parecen regular la sincronía en las alteraciones de la fase lumínica (Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002).

La expresión de TRPM8 en células amacrinas colinérgicas lo relacionaría con la modulación de la información visual espacial captada por los fotorreceptores. Aunque como células amacrinas que son, simplemente podrían estar generando señales modulatorias sobre las células ganglionares de alguna forma aún no descrita. Por otro lado, este tipo celular es de los primeros en diferenciarse, alrededor de E11, y se sabe que juegan un papel importante en el correcto desarrollo de la retina (Voinescu et al., 2009). La colocalización de ambos marcajes sugiere una posible implicación en la formación de las conexiones neurales durante el desarrollo, lo que guardaría cierta lógica con la disminución de expresión en la edad adulta que parece mostrar la línea transgénica TRPM8-EGFPf. La variación en la invasión axonal tras completar el desarrollo ontogénico, ya ha sido descrita previamente, tanto en densidad como en expresión (Roth y Bruns, 1993; Davidson et al., 2012; Huang et al., 2015). Así, en la duramadre se ha determinado una disminución progresiva de los axones trigeminales que la inervan durante el primer año de vida (Davidson et al., 2012). Entre estos axones, se encuentran los provenientes de neuronas sensoriales con expresión de TRPM8 (Ren et al., 2015, 2018), lo que apoya la posible relevancia del canal durante el desarrollo.

Hasta el momento, no se han descrito cambios de temperatura en el interior del ojo asociados al desarrollo de las funciones relacionadas con la expresión de ChAT y melanopsina, por lo que la implicación de TRPM8 podría no estar relacionada con la temperatura y ser dependiente de agonistas endógenos. No obstante, un trabajo anterior ha mostrado que una bajada brusca de la temperatura medioambiental provoca una leve disminución térmica intraocular "in vivo" (≈ 4 °C) (Schwartz y Feller, 1962; Schwartz, 1965) que podría ser activadora de TRPM8, pudiendo indicar que el canal termorreceptor ejerce su función, mayormente, ante estas circunstancias. En este contexto, se ha visto que en la retina se



produce un aumento de la expresión de proteínas de shock térmico en respuesta a la exposición a bajas temperaturas (Larrayoz et al., 2016) y que la presencia de TRPM8 es necesaria para que se produzca su inducción en otros tejidos como el pulmón (Fujita et al., 2018) y el testículo (Borowiec et al., 2016). Se ha comprobado que la hipotermia previene a la retina del desarrollo de algunas patologías como la angiogénesis, gliosis o isquemia retiniana (Rey-Funes et al., 2011; 2013; Salido et al., 2013) y se especula que las proteínas de shock térmico, por su papel protector ante el frío manteniendo la viabilidad y la integridad celular, podrían estar involucradas en el proceso (Al-Fageeh y Smales, 2006; Larrayoz et al., 2016). Por tanto, TRPM8 también podría estar desarrollando un papel termoprotector en este órgano, teniendo sentido que se expresase en mayor medida en la edad juvenil, pues se ha comprobado que las crías son más propensas a padecer hipotermia (Larrayoz et al., 2016).

5.5 Influencia del canal TRPM8 en la osmorregulación.

Experimentos desarrollados por nuestro grupo sugieren que TRPM8 tiene una función osmorreceptora, además de la termosensora (Quallo et al., 2015). Asimismo, en otro estudio hemos comprobado que la presencia de TRPM8 es necesaria para una correcta integración de las señales osmorreguladoras, pues su ausencia provoca una disminución de la sensación de sed o un saciado más temprano de la misma (Denlinger, 2014). Ya que en nuestro estudio a nivel cerebral hemos encontrado células con expresión de TRPM8 rodeando el VOLT y numerosas fibras marcadas bordeando y/o atravesando el MnPO, SO y PVH, núcleos y áreas hipotalámicas esenciales en los mecanismos centrales de osmorregulación, decidimos estudiar con más detalle el posible papel de este canal a nivel cerebral en estos mecanismos.

Para ello usamos el modelo de ratón TRPM8-EGFPf, que nos permite comparar ratones silvestres con sus hermanos hemicigotos y homocigotos. Hemos aplicado una inyección hiperosmótica de alto contenido en sodio (NaCl 1M) que genera un incremento de la osmolaridad plasmática, hipernatremia y dispara el mecanismo de la sed (Freiria-Oliveira et al., 2009; Kinsman et al., 2014). Como consecuencia de este tratamiento se produce un incremento de la expresión de *cfos* en los núcleos directamente relacionados con la osmorregulación, lo que indica su grado de activación neuronal en respuesta al cambio osmolar producido (Oldfield et al., 1991). En concordancia, mediante técnicas

inmunohistoquímicas hemos comprobado que una única inyección hiperosmótica de NaCl 1M es capaz de incrementar vigorosamente la expresión *cfos* en los núcleos VOLT, SFO, MnPO, SO y PVH. Estos datos encajan con descripciones previas de otros autores (Oldfield et al., 1991; Larsen y Mikkelsen, 1995; Rowland et al., 1996; Shi et al., 2008; Taylor et al., 2008; Kinsman et al., 2014). Además este incremento se observó en todos los genotipos, lo cual indica que TRPM8 no es esencial para la osmorregulación. Sin embargo, al comparar entre genotipos la cantidad de neuronas activadas por el choque hipersmolar, hemos encontrado variaciones en el SFO y en el VOLT, los principales órganos de integración de señales osmorregulatorias. En el SFO se observa una menor activación en animales hemicigotos y homocigotos, en relación a los ratones controles, especialmente en su parte anatómica más central. Por el contrario, en el VOLT se detecta una mayor respuesta en los ratones homocigotos. En este último emplazamiento, es importante remarcar que en las neuronas con inmunorreactividad GFP+, las cuales se encuentran ubicadas en la periferia del núcleo, no se observó incremento de niveles de *cfos*, lo que indicaría que estas células marcadas no son osmorreceptoras. Sin embargo, como mostramos en la sección de resultados, parte de sus axones proyectan hacia el VOLT de forma que podrían estar influyendo en el proceso osmorregulador de forma indirecta.

Por su parte, en los núcleos MnPO, SO y PVH no se observaron diferencias en cuanto al número de neuronas activadas en los ratones tratados entre los distintos genotipos. Sin embargo, en el núcleo PVH se detectó una ligera activación en parte de los animales utilizados como control tras la inyección de solución salina a concentración fisiológica; este incremento se observó en ratones de todos los genotipos. Teniendo en cuenta que la inyección control no tiene por qué afectar a la osmolaridad del animal y que este efecto se vio únicamente en este núcleo, asociamos esta señal a otra causa ajena al tratamiento, como puede ser la situación de estrés generada en el ratón por la inmovilización a la que es sometido para aplicarle la inyección. Este núcleo ya ha sido previamente identificado como mediador de estrés, y se ha visto que ciertos estímulos pueden elevar su expresión de *cfos* (Honkaniemi et al., 1992; Pezzone et al., 1992; Larsen y Mikkelsen, 1995).

En conjunto, estos datos sugieren que TRPM8 tiene cierta influencia en el mecanismo primario que detecta los cambios en hiperosmolaridad e hipernatremia a nivel central y que



disparan la sensación de la sed, aunque su implicación no resultaría esencial. Las alteraciones detectadas fueron pequeñas, pero en los núcleos descritos como los mayores reguladores del impulso dipsogénico. Estos ligeros cambios podrían desembocar en una disminución de la sensación de sed, que llevaría a la ingestión inferior de agua detectada en los animales KO.

En los núcleos SFO y VOLT, se ha comprobado la existencia de dos poblaciones celulares que responden ante el estímulo hiperosmótico, una excitatoria que libera glutamato y que al activarse estimula la sed (Abbott et al., 2016; Leib et al., 2017), y otra inhibitoria que secreta GABA, y que al activarse genera el efecto contrario (Oka et al., 2015; Abbott et al., 2016). Dentro de estas poblaciones se están empezando a diferenciar subpoblaciones implicadas en el proceso (Oka et al., 2015; Leib et al., 2017; Augustine et al., 2018). Por tanto, parece necesario realizar un análisis más exhaustivo sobre el perfil de expresión de las neuronas activadas, para así entender mejor estos resultados y evaluar el efecto que promueven.

En relación a este tema, los canales TRPV1 y TRPV4 también han sido identificados como participantes del proceso osmorregulador y del impulso dipsogénico. Su expresión se ubica en las propias células osmoceptivas que conforman la LT, y/o en los núcleos SO y PVH (Liedtke et al., 2000; Naeini et al., 2006; Zaelzer et al., 2015), lo que les otorga una implicación mucho más directa que en el caso de TRPM8. Aunque su papel funcional no está bien caracterizado, está claro que su implicación tampoco sería determinante para la generación del impulso dipsogénico, pues los animales que no expresan estos canales responden a situaciones hiperosmolares (Liedtke y Friedman, 2003; Mizuno et al., 2003; Ciura y Bourque, 2006; Naeini et al., 2006; Taylor et al., 2008; Kinsman et al., 2014; Tucker y Stocker, 2016). El descubrimiento de nuevos canales y proteínas implicadas, como podría ser TRPM8, abre nuevas vías de estudio para una mejor comprensión de este importante mecanismo homeostático.

Por otro lado, queda comentar la relación de TRPM8 con el sistema RAA (renina-angiotensina-aldosterona). Una de las respuestas más importantes a la hipovolemia e hipotensión generadas por la deshidratación o pérdida del volumen de sangre circulante, es la generación de AngII a través de la vía RAA. El riñón detecta la bajada de presión sanguínea y como respuesta libera renina que se acaba traduciendo en la liberación de AngII (Leib et al., 2016). La AngII presenta múltiples efectos fisiológicos. A nivel periférico, promueve la

vasoconstricción y reabsorción de agua en el riñón. A nivel central, induce el consumo de sal y el mecanismo de la sed por acción directa sobre la LT, que posee receptores específicos para su detección (Fitzsimons, 1998; Leib et al., 2016). Como ya hemos comentado en otro apartado, TRPM8 podría tener influencia sobre el sistema RAA. Los ratones KO muestran resistencia a desarrollar hipertensión porque los componentes de esta vía no incrementan su expresión en la misma medida que en el ratón silvestre (Chan et al., 2018). Si esta disminución de expresión se diera en todos los mecanismos homeostáticos asociados al sistema RAA, pudiera ser, que en casos de deshidratación, menos cantidad de AngII llegase a la LT en los ratones KO y por ello experimentasen menos sed.

Igualmente, se identifican otras ubicaciones de expresión de receptores para la AngII a nivel central que parecen ser osmosensitivas e influir en el proceso de activación de la sed (Fitzsimons, 1998), y que también podrían verse reguladas a la baja por la ausencia de TRPM8. Entre estas localizaciones, está el LS, que cuando es destruido se observa una reducción de la ingestión de agua promovida por AngII tras 24 horas de privación hídrica (Simonnet et al., 1980; Saad et al., 2004; Freiria-Oliveira et al., 2009). Este es uno de los principales núcleos en que hemos demostrado la expresión de TRPM8 a nivel central, y visto este resultado, podría también indicar que el canal modula el efecto de la AngII desde esta ubicación afectando al desarrollo del instinto de la sed.

Para finalizar, hay que remarcar que, al no encontrar variaciones en el número de neuronas que incrementan su expresión de *cfos* a nivel de los núcleos SO y PVH, se podrían pensar que la regulación por vasopresina se mantiene más o menos intacta. Sin embargo, sería interesante analizar otros parámetros como la concentración de sodio en plasma o la capacidad de concentrar y excretar el exceso de NaCl por la orina. De este modo se verificaría que TRPM8 sólo tiene influencia sobre la sed, y no sobre otros procesos osmorregulatorios dirigidos a nivel central por estos núcleos; pues, aunque haya igualdad en el número de neuronas activadas por *cfos*, éstas podrían tener alteraciones en los niveles de expresión no detectables por la técnica inmunohistoquímica.

6. Conclusiones.



1. Las líneas transgénicas TRPM8-EYFP(1-4), TRPM8-EGFPf y TRPM8-DTR-GFP permiten identificar la expresión del canal iónico TRPM8 con fiabilidad, mediante la visualización de reporteros fluorescentes. La intensidad y ubicación celular del marcaje detectado en cada línea transgénica fue diferente, lo que condiciona la conveniencia de su uso según la técnica experimental a utilizar.
2. En la línea TRPM8-Cre no existe una buena correspondencia entre la expresión del reportero y la funcionalidad del canal TRPM8. Sería recomendable el desarrollo de una nueva línea que permita la utilización de esta estrategia genética para manipular la función de las neuronas positivas para TRPM8.
3. La línea TRPM8-EYFP1 se distingue del resto por mostrar la mayor intensidad de marcaje fluorescente, además permite diferenciar dos poblaciones neuronales con expresión de TRPM8 en ganglios sensoriales con características morfológicas, moleculares y funcionales diferenciadas. Asimismo, este modelo constituye una buena herramienta para la identificación y análisis de las dianas de expresión e innervación de TRPM8, tanto a nivel central como periférico.
4. El ratón transgénico TRPM8-GFP-DTR permite la ablación selectiva de las células que expresan TRPM8. Como consecuencia de este procedimiento, se observó un cambio en el comportamiento funcional de las neuronas con expresión de TRPA1, mostrándose más activas en respuesta sus agonistas químicos AITC y mentol.
5. Mediante la utilización de las líneas reporteras TRPM8-EGFPf, TRPM8-EYFP1 y la técnica de hibridación "in situ" se ha demostrado la presencia de TRPM8 en el cerebro de roedor. Las neuronas positivas se localizaron en unos pocos núcleos cerebrales, la mayoría ubicados en el área hipotalámica preóptica, así como en el septum lateral y el núcleo reticular del tálamo, aunque con una amplia distribución axonal en el cerebro. Todas estas estructuras están relacionadas con la termorregulación o con otras funciones homeostáticas relacionadas con la temperatura.



6. Las líneas transgénicas reporteras utilizadas en este trabajo ubican la expresión de TRPM8 en la retina, concretamente en células ganglionares y en células amacrinas colinérgicas. Las células ganglionares marcadas presentan una buena coexpresión con melanopsina y proyectan a regiones cerebrales relacionadas con ritmos circadianos y respuestas fotosensibles, lo que apoyaría la implicación de TRPM8 en la regulación de estas respuestas.
7. TRPM8 no es esencial en la activación de las principales regiones osmorreceptoras del sistema nervioso central por un estímulo hiperosmolar, pero parece tener un papel indirecto en el grado de activación de las neuronas de los núcleos SFO y VOLT ubicados en la LT.



7. Bibliografía.



- Abbott, S.B.G., Machado, N.L.S., Geerling, J.C., and Saper, C.B. (2016). Reciprocal control of drinking behavior by median preoptic neurons in mice. *J. Neurosci.* 36, 8228–8237.
- Abdullah, M., and Firmansyah, M.A. (2012). Diagnostic approach and management of acute abdominal pain. *Acta Med. Indones.* 44, 344–350.
- Abe, T., and Fujimori, T. (2013). Reporter Mouse Lines for Fluorescence Imaging. *Dev. Growth Differ.* 55, 390–405.
- Abe, J., Hosokawa, H., Okazawa, M., Kandachi, M., Sawada, Y., Yamanaka, K., Matsumura, K., and Kobayashi, S. (2005). TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Mol. Brain Res.* 136, 91–98.
- Abrão Saad, W., Antonio de Arruda Camargo, L., Sérgio Cerri, P., Simões, S., Abrão Saad, W., Garcia, G., Izabel Gutierrez, L., Guarda, I., and Saad Guarda, R. (2004). Influence of arginine vasopressin receptors and angiotensin receptor subtypes on the water intake and arterial blood pressure induced by vasopressin injected into the lateral septal area of the rat. *Auton. Neurosci.* 111, 66–70.
- Ahern, G.P. (2013). Transient receptor potential channels and energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 554–560.
- Al-Fageeh, M.B., and Smales, C.M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem. J.* 397, 247–259.
- Alcalde, I., Íñigo-Portugués, A., González-González, O., Almaraz, L., Artime, E., Morenilla-Palao, C., Gallar, J., Viana, F., Merayo-Lloves, J., and 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.
- Allen, W.E., DeNardo, L.A., Chen, M.Z., Liu, C.D., Loh, K.M., Fenno, L.E., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., and Luo, L. (2017). Thirst-associated preoptic neurons encode an aversive motivational drive. *Science* (80-.). 357, 1149–1155.
- Almaraz, L., Manenschijn, J., Pena, E. De, and Viana, F. (2014). Trpm8. *Handbook of experimental pharmacology.* pp. 547–579.
- Almeida, M.C., Hew-Butler, T., Soriano, R.N., Rao, S., Wang, W., Wang, J., Tamayo, N., Oliveira, D.L., Nucci, T.B., Aryal, P., et al. (2012). Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *J. Neurosci.* 32, 2086–2099.
- Alvarez-Berdugo, D., Rofes, L., Casamitjana, J.F., Padrón, A., Quer, M., and Clavé, P. (2016). Oropharyngeal and laryngeal sensory innervation in the pathophysiology of swallowing disorders and sensory stimulation treatments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1380, 104–120.
- Andersson, D.A., Nash, M., and Bevan, S. (2007). Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J. Neurosci.* 27, 3347–3355.
- Angelucci, A., Clascá, F., and Sur, M. (1996). Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J. Neurosci. Methods* 65, 101–112.
- Anton, F., and Peppel, P. (1991). Central projections of trigeminal primary afferents



- innervating the nasal mucosa: A horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 41, 617–628.
- Arcas, J.M., González, A., Gers-Barlag, K., González-González, O., Bech, F., Demirkhanyan, L., Zakharian, E., Belmonte, C., Gomis, A., and Viana, F. (2018). The immunosuppressant macrolide tacrolimus activates cold-sensing TRPM8 channels. *J. Neurosci.* 39, 1726–18.
- Arkless, K., Argunhan, F., and Brain, S.D. (2018). CGRP Discovery and Timeline. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, p.
- Asuthkar, S., Elustondo, P.A., Demirkhanyan, L., Sun, X., Baskaran, P., Velpula, K.K., Thyagarajan, B., Pavlov, E. V, and Zakharian, E. (2015a). The TRPM8 protein is a testosterone receptor: I. Biochemical evidence for direct TRPM8-testosterone interactions. *J. Biol. Chem.* 290, 2659–2669.
- Asuthkar, S., Demirkhanyan, L., Sun, X., Elustondo, P.A., Krishnan, V., Baskaran, P., Velpula, K.K., Thyagarajan, B., Pavlov, E. V, and Zakharian, E. (2015b). The TRPM8 protein is a testosterone receptor: II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. *J. Biol. Chem.* 290, 2670–2688.
- Aubdool, A.A., Graepel, R., Kodji, X., Alawi, K.M., Bodkin, J. V, Srivastava, S., Gentry, C., Heads, R., Grant, A.D., Fernandes, E.S., et al. (2014). TRPA1 is essential for the vascular response to environmental cold exposure. *Nat. Commun.* 5, 5732.
- Augustine, V., Gokce, S.K., Lee, S., Wang, B., Davidson, T.J., Reimann, F., Gribble, F., Deisseroth, K., Lois, C., and Oka, Y. (2018). Hierarchical neural architecture underlying thirst regulation. *Nature* 555, 204–209.
- Averill, S., McMahon, S.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F., and Priestley, J. V. (1995). Immunocytochemical Localization of trkA Receptors in Chemically Identified Subgroups of Adult Rat Sensory Neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1484–1494.
- Axelsson, H.E., Minde, J.K., Sonesson, A., Toolanen, G., Högestätt, E.D., and Zygmunt, P.M. (2009). Transient receptor potential vanilloid 1, vanilloid 2 and melastatin 8 immunoreactive nerve fibers in human skin from individuals with and without Norrbottnian congenital insensitivity to pain. *Neuroscience* 162, 1322–1332.
- Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L.C., Breitbart, H., and Eisenbach, M. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat. Med.* 9, 149–150.
- Balasubramanian, V., and Sterling, P. (2009). Receptive fields and functional architecture in the retina. *J. Physiol.* 587, 2753–2767.
- Balemans, D., Boeckxstaens, G.E., Talavera, K., and Wouters, M.M. (2017). Transient receptor potential ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades underlying visceral hypersensitivity. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 312, G635–G648.
- Bandell, M., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Orth, A., Mathur, J., Hwang, S.W., and Patapoutian, A. (2006). High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat. Neurosci.* 9, 493–500.
- Banner, K.H., Igney, F., and Poll, C. (2011). TRP channels: Emerging targets for respiratory disease. *Pharmacol. Ther.* 130, 371–384.

- Baraniuk, J.N. (2011). Subjective nasal fullness and objective congestion. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8, 62–69.
- Baraniuk, J.N., and Kim, D. (2007). Nasonasal reflexes, the nasal cycle, and sneeze. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7, 105–111.
- Barnes, P.J. (1986). Neural control of human airways in health and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 1289–1314.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284.
- Bautista, D.M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H.E., Sterner, O., Hogestatt, E.D., Julius, D., Jordt, S.-E., and Zygmunt, P.M. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 12248–12252.
- Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269–1282.
- Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.-E., and Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204–208.
- Baver, S.B., Pickard, G.E., Sollars, P.J., and Pickard, G.E. (2008). Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1763–1770.
- Beckers, A.B., Weerts, Z.Z.R.M., Helyes, Z., Masclee, A.A.M., and Keszthelyi, D. (2017). Review article: transient receptor potential channels as possible therapeutic targets in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 46, 938–952.
- Behrendt, H.-J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H., and Jostock, R. (2004). Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br. J. Pharmacol.* 141, 737–745.
- Belmonte, C., and Viana, F. (2008). Molecular and Cellular Limits to Somatosensory Specificity. *Mol. Pain* 4, 1744-8069-4–14.
- Belmonte, C., Brock, J.A., and Viana, F. (2009). Converting cold into pain. *Exp. Brain Res.* 196, 13–30.
- Benavides, F., and Guénet, J. (2003). La transgénesis y la clonación en los roedores de laboratorio. In *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios Básicos y Aplicaciones*, pp. 227–263.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* (80-). 295, 1070–1073.
- Bester, H., Chapman, V., Besson, J., and Bernard, J.-F. (2000). Physiological Properties of the Lamina I Spinoparabrachial Neurons in the Rat. *J. Neurophysiol.* 83, 2239–2259.
- Bidaux, G. (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 367–382.
- Bidaux, G., Beck, B., Zholos, A., Gordienko, D., Lemonnier, L., Flourakis, M., Roudbaraki, M., Borowiec, A.-S., Fernández, J., Delcourt, P., et al. (2012). Regulation of activity of



- transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel by its short isoforms. *J. Biol. Chem.* **287**, 2948–2962.
- Bidaux, G., Borowiec, A., Gordienko, D., Beck, B., Shapovalov, G.G., Lemonnier, L., Flourakis, M., Vandenberghe, M., Slomianny, C., Dewailly, E., et al. (2015). Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a cold-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3345–E3354.
- Bidaux, G., Borowiec, A.-S., Dubois, C., Delcourt, P., Schulz, C., Abeele, F. Vanden, Lepage, G., Desruelles, E., Bokhobza, A., Dewailly, E., et al. (2016). Targeting of short TRPM8 isoforms induces 4TM-TRPM8-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Oncotarget* **7**.
- Bishnoi, M., Khare, P., Brown, L., and Panchal, S.K. (2018). Transient receptor potential (TRP) channels: a metabolic TR(i)P to obesity prevention and therapy. *Obes. Rev.* **19**, 1269–1292.
- Blackshaw, L.A. (2014). Transient receptor potential cation channels in visceral sensory pathways. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2528–2536.
- Blanco-Rodríguez, J., and Martínez-García, C. (1997). Mild hypothermia induces apoptosis in rat testis at specific stages of the seminiferous epithelium. *J. Androl.* **18**, 535–539.
- de Blas, G.A., Darszon, A., Ocampo, A.Y., Serrano, C.J., Castellano, L.E., Hernández-González, E.O., Chirinos, M., Larrea, F., Beltrán, C., and Treviño, C.L. (2009). TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* **4**, e6095.
- Bonvini, S.J., Birrell, M.A., Smith, J.A., and Belvisi, M.G. (2015). Targeting TRP channels for chronic cough: from bench to bedside. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **388**, 401–420.
- Borowiec, A.-S., Sion, B., Chalmel, F., D. Rolland, A., Lemonnier, L., De Clerck, T., Bokhobza, A., Derouiche, S., Dewailly, E., Slomianny, C., et al. (2016). Cold/menthol TRPM8 receptors initiate the cold-shock response and protect germ cells from cold-shock-induced oxidation. *FASEB J.* **30**, 3155–3170.
- Boulant, J.A., and Dean, J.B. (1986). Temperature receptors in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **48**, 639–654.
- Boulant, J.A., and Demieville, H.N. (1977a). Responses of thermosensitive preoptic and septal neurons to hippocampal and brain stem stimulation. *J. Neurophysiol.* **40**, 1356–1368.
- Boulant, J.A., and Demieville, H.N. (1977b). Responses of thermosensitive preoptic and septal neurons to hippocampal and brain stem stimulation. *J. Neurophysiol.* **40**, 1356–1368.
- Bourque, C.W. (2008). Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 519–531.
- Bräunig, J., Mergler, S., Jyrch, S., Hoefig, C.S., Rosowski, M., Mittag, J., Biebermann, H., and Khajavi, N. (2018). 3-iodothyronamine activates a set of membrane proteins in murine hypothalamic cell lines. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 1–12.
- Brenner, D.S., Golden, J.P., and Gereau, R.W. (2012). A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice. *PLoS One* **7**, e39765.
- Bronson, S.K., Plaehn, E.G., Kluckman, K.D., Hagaman, J.R., Maeda, N., and Smithies, O. (1996). Single-copy transgenic mice with chosen-site integration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**,

9067–9072.

- Brown, A.G. (1981). Spinal cord organization: an introduction. In *Organization in the Spinal Cord*, (London: Springer London), pp. 1–12.
- Brunstrom, J.M., and Macrae, A.W. (1997). Effects of temperature and volume on measures of mouth dryness, thirst and stomach fullness in males and females. *Appetite* 29, 31–42.
- Buggy, J., and Jonhson, a K. (1977). Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: thirst deficits and hypernatremia. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 233, R44–R52.
- Bunt, A.H., and Minckler, D.S. (1977). Displaced ganglion cells in the retina of the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 95–98.
- Burgos-Vega, C., Moy, J., and Dussor, G. (2015). Meningeal Afferent Signaling and the Pathophysiology of Migraine. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier Inc.), pp. 537–564.
- del Camino, D., Murphy, S., Heiry, M., Barrett, L.B., Earley, T.J., Cook, C.A., Petrus, M.J., Zhao, M., D’Amours, M., Deering, N., et al. (2010). TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J. Neurosci.* 30, 15165–15174.
- Campero, M., Serra, J., Bostock, H., and Ochoa, J.L. (2001). Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin. *J. Physiol.* 535, 855–865.
- Cappello, G., Spezzaferro, M., Grossi, L., Manzoli, L., and Marzio, L. (2007). Peppermint oil (Mintoil®) in the treatment of irritable bowel syndrome: A prospective double blind placebo-controlled randomized trial. *Dig. Liver Dis.* 39, 530–536.
- Cash, B.D., Epstein, M.S., and Shah, S.M. (2016). A novel delivery system of peppermint oil is an effective therapy for irritable bowel syndrome symptoms. *Dig. Dis. Sci.* 61, 560–571.
- Caterina, M.J. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* (80-.). 288, 306–313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.
- Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436–441.
- Cazemier, J.L., Clascá, F., and Tiesinga, P.H.E. (2016). Connectomic Analysis of Brain Networks: Novel Techniques and Future Directions. *Front. Neuroanat.* 10, 1–22.
- Celio, M.R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375–475.
- Chan, H., Huang, H., Sun, D., Lee, C., Lien, T.-S., and Chang, H.-H. (2018). TRPM8 and RAAS-mediated hypertension is critical for cold-induced immunosuppression in mice. *Oncotarget* 9, 12781–12795.
- Cheang, W.S., Lam, M.Y., Wong, W.T., Tian, X.Y., Lau, C.W., Zhu, Z., Yao, X., and Huang, Y. (2013). Menthol relaxes rat aortae, mesenteric and coronary arteries by inhibiting calcium influx. *Eur. J. Pharmacol.* 702, 79–84.
- Chen, G.-Y., Jiao, H.-X., Wang, M.-Y., Wang, R.-X., and Lin, M.-J. (2014). [Decreased amplitude



- of $[Ca^{2+}]_i$ elevation induced by menthol in pulmonary arterial smooth muscle cells of pulmonary hypertensive rats]. *Sheng Li Xue Bao* 66, 267–275.
- Chen, T., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300.
- Cheng, W., Yang, F., Takanishi, C.L., and Zheng, J. (2007). Thermosensitive TRPV Channel Subunits Coassemble into Heteromeric Channels with Intermediate Conductance and Gating Properties. *J. Gen. Physiol.* 129, 191–207.
- Cheng, W., Sun, C., and Zheng, J. (2010). Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity. *Protein Cell* 1, 802–810.
- Cho, Y., Jang, Y., Yang, Y.D., Lee, C.-H., Lee, Y., and Oh, U. (2010). TRPM8 mediates cold and menthol allergies associated with mast cell activation. *Cell Calcium* 48, 202–208.
- Chou, T.C., Bjorkum, A.A., Gaus, S.E., Lu, J., Scammell, T.E., and Saper, C.B. (2002). Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J. Neurosci.* 22, 977–990.
- Christensen, B.N., and Perl, E.R. (1970). Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J. Neurophysiol.* 33, 293–307.
- Chuang, 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, 859–869.
- Chukyo, A., Chiba, T., Kambe, T., Yamamoto, K., Kawakami, K., Taguchi, K., and Abe, K. (2018). Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. *Neuropeptides* 67, 95–101.
- Ciardo, M.G., and Ferrer-Montiel, A. (2017). Lipids as central modulators of sensory TRP channels. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1859, 1615–1628.
- Ciura, S., and Bourque, C.W. (2006). Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. *J. Neurosci.* 26, 9069–9075.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524.
- Clemente-Perez, A., Makinson, S.R., Higashikubo, B., Brovarney, S., Cho, F.S., Urry, A., Holden, S.S., Wimer, M., Dávid, C., Fenno, L.E., et al. (2017). Distinct thalamic reticular cell types differentially modulate normal and pathological cortical rhythms. *Cell Rep.* 19, 2130–2142.
- Clemmensen, C., Jall, S., Kleinert, M., Quarta, C., Gruber, T., Reber, J., Sachs, S., Fischer, K., Feuchtinger, A., Karlas, A., et al. (2018). Coordinated targeting of cold and nicotinic receptors synergistically improves obesity and type 2 diabetes. *Nat. Commun.* 9, 4304.
- Colburn, R.W., Lubin, M., Lou, Stone, D.J., Wang, Y., Lawrence, D., D’Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M., and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54, 379–386.
- Coles, J.A., Myburgh, E., Brewer, J.M., and McMenamin, P.G. (2017). Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Prog. Neurobiol.* 156, 107–148.

- Conte, W.L., Kamishina, H., and Reep, R.L. (2009). Multiple neuroanatomical tract-tracing using fluorescent Alexa Fluor conjugates of cholera toxin subunit B in rats. *Nat. Protoc.* *4*, 1157–1166.
- Cosens, D.J., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* *224*, 285–287.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480–484.
- Cox, B.C., Liu, Z., Lagarde, M.M.M., and Zuo, J. (2012). Conditional gene expression in the mouse inner ear using cre-loxP. *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.* *13*, 295–322.
- Craig, a D., and Dostrovsky, J.O. (2001). Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat. *J. Neurophysiol.* *86*, 856–870.
- Craig, A.D., and Dostrovsky, J.O. (1991). Thermoreceptive lamina I trigeminothalamic neurons project to the nucleus submedius in the cat. *Exp. Brain Res.* *85*, 470–474.
- Craighead, D.H., McCartney, N.B., Tumlinson, J.H., and Alexander, L.M. (2017). Mechanisms and time course of menthol-induced cutaneous vasodilation. *Microvasc. Res.* *110*, 43–47.
- Cunningham, D., Stolwijk, J., Murakami, N., and Hardy, J. (1967). Responses of neurons in the preoptic area to temperature, serotonin, and epinephrine. *Am. J. Physiol. Content* *213*, 1570–1581.
- Dalloz, F., Osinska, H., and Robbins, J. (2001). Modelos animales genéticamente modificados en investigación cardiovascular. *Rev. Española Cardiol.* *54*, 764–789.
- Damann, N., Voets, T., and Nilius, B. (2008). TRPs in Our Senses. *Curr. Biol.* *18*, 880–889.
- 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. *J. Biol. Chem.* *284*, 1570–1582.
- Davidson, J.R., Mack, J., Gutnikova, A., Varatharaj, A., Darby, S., and Squier, W. (2012). Developmental changes in human dural innervation. *Child's Nerv. Syst.* *28*, 665–671.
- Deaux, E. (1973). Thirst satiation and the temperature of ingested water. *Science (80-)*. *181*, 1166–1167.
- Denda, M., Tsutsumi, M., and Denda, S. (2010). Topical application of TRPM8 agonists accelerates skin permeability barrier recovery and reduces epidermal proliferation induced by barrier insult: role of cold-sensitive TRP receptors in epidermal permeability barrier homeostasis. *Exp. Dermatol.* *19*, 791–795.
- Denlinger, B. (2014). Cold-sensitive fibers of the mouse tongue: Molecular and functional types and modulatory role on drinking behavior (Doctoral thesis). Universidad Miguel Hernandez, San Juan de Alicante. España.
- Denton, D., Shade, R., Zamarippa, F., Egan, G., Blair-West, J., McKinley, M., Lancaster, J., and Fox, P. (1999). Neuroimaging of genesis and satiation of thirst and an interoceptor-driven theory of origins of primary consciousness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 5304–5309.
- Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J., and Patapoutian, A. (2007).



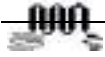
- TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54, 371–378.
- Dhaka, A., Earley, T.J., Watson, J., and Patapoutian, A. (2008). Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J. Neurosci.* 28, 566–575.
- Doerner, J.F., and Clapham, D.E. (2018). Transient Receptor Potential channels. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY webpage. Last modified on 26/02/2018. Accessed on 28/10/2018.
<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=78>.
- Dong, H.W. and The Allen Institute for Brain Science (2008). The Allen Reference Atlas: A Digital Color Brain Atlas of the C57BL/6J Male Mouse.
- Dragoni, I., Guida, E., and McIntyre, P. (2006). The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functionally important double cysteine motif. *J. Biol. Chem.* 281, 37353–37360.
- Dragunow, M., and Faull, R. (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Methods* 29, 261–265.
- Duncan, L.M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L.M., Woolf, E.A., Tepper, R.I., and Shyjan, A.W. (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* 58, 1515–1520.
- Durham, P.L., and Vause, C. V (2010). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonists in the treatment of migraine. *CNS Drugs* 24, 539–548.
- Dussor, G., and Cao, Y.-Q. (2016). TRPM8 and Migraine. *Headache* 56, 1406–1417.
- Dutta Banik, D., Martin, L.E., Freichel, M., Torregrossa, A.-M., and Medler, K.F. (2018). TRPM4 and TRPM5 are both required for normal signaling in taste receptor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E772–E781.
- Ebihara, S., Ebihara, T., Gui, P., Osaka, K., Sumi, Y., and Kohzuki, M. (2014). Thermal taste and anti-aspiration drugs: a novel drug discovery against pneumonia. *Curr. Pharm. Des.* 20, 2755–2759.
- Ebihara, S., Izukura, H., Miyagi, M., Okuni, I., Sekiya, H., and Ebihara, T. (2016). Chemical senses affecting cough and swallowing. *Curr. Pharm. Des.* 22, 2285–2289.
- Eccles, R. (2000). Role of cold receptors and menthol in thirst, the drive to breathe and arousal. *Appetite* 34, 29–35.
- Ecker, J.L., Dumitrescu, O.N., Wong, K.Y., Alam, N.M., Chen, S.K., LeGates, T., Renna, J.M., Prusky, G.T., Berson, D.M., and Hattar, S. (2010). Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: Cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* 67, 49–60.
- Edith J. Applegate (2000). *The anatomy & physiology learning system*. 2nd Edition. W.B. Saunders.
- Edvinsson, L. (2019). Role of CGRP in Migraine. p.
- Egan, G., Silk, T., Zamarripa, F., Williams, J., Federico, P., Cunnington, R., Carabott, L., Blair-West, J., Shade, R., McKinley, M., et al. (2003). Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15241–15246.
- Eisenbach, M., and Giojalas, L.C. (2006). Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 276–285.

- Eisenman, J. (1969). Pyrogen-induced changes in the thermosensitivity of septal and preoptic neurons. *Am. J. Physiol. Content* 216, 330–334.
- Eisenman, J.S., and Jackson, D.C. (1967). Thermal response patterns of septal and preoptic neurons in cats. *Exp. Neurol.* 19, 33–45.
- Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L., and Ge, S. (2015). Viral and transgenic reporters and genetic analysis of adult neurogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, 1–18.
- Erlanger, J., and Gasser, H.S. (1937). *Electrical signs of nervous activity*. 2nd Edition. University of Pennsylvania Press.
- Erler, I., Al-Ansary, D.M.M., Wissenbach, U., Wagner, T.F.J., Flockerzi, V., and Niemeyer, B.A. (2006). Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *J. Biol. Chem.* 281, 38396–38404.
- Euler, T., Detwiler, P.B., and Denk, W. (2002). Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells. *Nature* 418, 845–852.
- Everaerts, W., and De Ridder, D. (2016). TRPM8 antagonists to treat lower urinary tract symptoms: don't lose your cool just yet. *BJU Int.* 117, 384–385.
- Everaerts, W., Vriens, J., Owsianik, G., Appendino, G., Voets, T., De Ridder, D., and Nilius, B. (2010). Functional characterization of transient receptor potential channels in mouse urothelial cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 298, F692–F701.
- Famiglietti, E. V. (1983a). "Starburst" amacrine cells and cholinergic neurons: mirror-symmetric on and off amacrine cells of rabbit retina. *Brain Res.* 261, 138–144.
- Famiglietti, E. V. (1983b). On and off pathways through amacrine cells in mammalian retina: The synaptic connections of "starburst" amacrine cells. *Vision Res.* 23, 1265–1279.
- Farrell, M.J. (2016). Regional brain responses in humans during body heating and cooling. *Temperature* 3, 220–231.
- Farrell, M.J., Bowala, T.K., Gavrilescu, M., Phillips, P.A., McKinley, M.J., McAllen, R.M., Denton, D.A., and Egan, G.F. (2011). Cortical activation and lamina terminalis functional connectivity during thirst and drinking in humans. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 301, R623–R631.
- Feketa, V. V., Balasubramanian, A., Flores, C.M., Player, M.R., and Marrelli, S.P. (2013). Shivering and tachycardic responses to external cooling in mice are substantially suppressed by TRPV1 activation but not by TRPM8 inhibition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R1040-50.
- Feller, M.B., Wellis, D.P., Stellwagen, D., Werblin, F.S., and Shatz, C.J. (1996). Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science* (80-). 272, 1182–1187.
- Fernandez-Pena, C. (2013). Targeting TRPM8 for pain relief. *Open Pain J.* 6, 154–164.
- Filiou, R.-P., Lepore, F., Bryant, B., Lundström, J.N., and Frasnelli, J. (2015). Perception of trigeminal mixtures. *Chem. Senses* 40, 61–69.
- Fitzsimons, J.T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol. Rev.* 78, 583–686.
- Fonfria, E., Murdock, P.R., Cusdin, F.S., Benham, C.D., Kelsell, R.E., and McNulty, S. (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J. Recept. Signal*



- Transduct. Res. 26, 159–178.
- Frasnelli, J., Albrecht, J., Bryant, B., and Lundström, J.N. (2011). Perception of specific trigeminal chemosensory agonists. *Neuroscience* 189, 377–383.
- Freilinger, T., Anttila, V., de Vries, B., Malik, R., Kallela, M., Terwindt, G.M., Pozo-Rosich, P., Winsvold, B., Nyholt, D.R., van Oosterhout, W.P.J., et al. (2012). Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat. Genet.* 44, 777–782.
- Freiria-Oliveira, A.H., Blanch, G.T., Camargo, L.A.A., Menani, J. V., and Saad, W.A. (2009). Involvement of the intermediate nucleus of the lateral septal area on angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses. *Regul. Pept.* 157, 14–18.
- Fried, S.I., Münch, T.A., and Werblin, F.S. (2002). Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina. *Nature* 420, 411–414.
- Fromy, B., Josset-Lamaugarny, A., Aimond, G., Pagnon-Minot, A., Marics, I., Tattersall, G.J., Mochrich, A., and Sigaudou-Roussel, D. (2018). Disruption of TRPV3 impairs heat-evoked vasodilation and thermoregulation: a critical role of CGRP. *J. Invest. Dermatol.* 138, 688–696.
- Fujita, T., Liu, Y., Higashitsuji, H., Itoh, K., Shibasaki, K., Fujita, J., and Nishiyama, H. (2018). Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 935–940.
- Gage, G.J., Kipke, D.R., and Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J. Vis. Exp.* 1–9.
- Gardiner, J.C., Kirkup, A.J., Curry, J., Humphreys, S., O'Regan, P., Postlethwaite, M., Young, K.C., Kitching, L., Ethell, B.T., Winpenny, D., et al. (2014). The role of TRPM8 in the Guinea-pig bladder-cooling reflex investigated using a novel TRPM8 antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 398–409.
- Gavva, N.R., Bannon, A.W., Surapaneni, S., Hovland, D.N., Lehto, S.G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., et al. (2007). The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci.* 27, 3366–3374.
- Gavva, N.R., Treanor, J.J.S., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A., Darling, M., Gore, A., et al. (2008). Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 136, 202–210.
- Gavva, N.R., Davis, C., Lehto, S.G., Rao, S., Wang, W., and Zhu, D.X.D. (2012). Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels are involved in body temperature regulation. *Mol. Pain* 8, 36.
- Ghei, M., and Malone-Lee, J. (2005). Using the circumstances of symptom experience to assess the severity of urgency in the overactive bladder. *J. Urol.* 174, 972–976.
- Gibbs, G.M., Orta, G., Reddy, T., Koppers, A.J., Martínez-López, P., de la Vega-Beltrán, J.L., Lo, J.C.Y., Veldhuis, N., Jamsai, D., McIntyre, P., et al. (2011). Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 7034–7039.
- Gilliam, J.C., and Wensel, T.G. (2011). TRP channel gene expression in the mouse retina. *Vision Res.* 51, 2440–2452.

- Gizowski, C., Zaelzer, C., and Bourque, C.W. (2016). Clock-driven vasopressin neurotransmission mediates anticipatory thirst prior to sleep. *Nature* 537, 685–688.
- Gong, K., and Jasmin, L. (2017). Sustained Morphine Administration Induces TRPM8-Dependent Cold Hyperalgesia. *J. Pain* 18, 212–221.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M.L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U.B., Nowak, N.J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M.E., et al. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425, 917–925.
- Gong, S., Doughty, M., Harbaugh, C.R., Cummins, A., Hatten, M.E., Heintz, N., and Gerfen, C.R. (2007). Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J. Neurosci.* 27, 9817–9823.
- González-Muñiz, R., Bonache, M.A., Martín-Escura, C., and Gómez-Monterrey, I. (2019). Recent Progress in TRPM8 Modulation: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2618.
- Grace, M.S., Baxter, M., Dubuis, E., Birrell, M.A., and Belvisi, M.G. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2593–2607.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Gu, H., Marth, J., Orban, P., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* (80-). 265, 103–106.
- Güler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., and Caterina, M. (2002). Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. *J. Neurosci.* 22, 6408–6414.
- Güler, A.D., Ecker, J.L., Lall, G.S., Haq, S., Altimus, C.M., Liao, H.-W., Barnard, A.R., Cahill, H., Badea, T.C., Zhao, H., et al. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102–105.
- Hadjantonakis, A.-K., and Nagy, A. (2001). The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. *Histochem. Cell Biol.* 115, 49–58.
- Harrington, M.E. (1997). The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 705–727.
- Harrington, A.M., Hughes, P.A., Martin, C.M., Yang, J., Castro, J., Isaacs, N.J., Blackshaw, L.A., and Brierley, S.M. (2011). A novel role for TRPM8 in visceral afferent function. *Pain* 152, 1459–1468.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., and Brancaccio, M. (2019). The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. *Biology (Basel).* 8, 13.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., and Yau, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* (80-). 295, 1065–1070.
- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., and Berson, D.M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326–349.
- Haverkamp, S., and Wässle, H. (2000). Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J.*



- Comp. Neurol. 424, 1–23.
- Hayashi, T., Kondo, T., Ishimatsu, M., Yamada, S., Nakamura, K. ichiro, Matsuoka, K., and Akasu, T. (2009). Expression of the TRPM8-immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons innervating the rat urinary bladder. *Neurosci. Res.* 65, 245–251.
- Hayashi, T., Kondo, T., Ishimatsu, M., Takeya, M., Igata, S., Nakamura, K., and Matsuoka, K. (2011). Function and expression pattern of TRPM8 in bladder afferent neurons associated with bladder outlet obstruction in rats. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 164, 27–33.
- Hayhow, W.R., Sefton, A., and Webb, C. (1962). Primary optic centers of the rat in relation to the terminal distribution of the crossed and uncrossed optic nerve fibers. *J. Comp. Neurol.* 118, 295–321.
- Heffner, C.S., Herbert Pratt, C., Babiuk, R.P., Sharma, Y., Rockwood, S.F., Donahue, L.R., Eppig, J.T., and Murray, S.A. (2012). Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nat. Commun.* 3, 1218.
- Hensel, H. (1981). Thermoreception and temperature regulation. *Monogr. Physiol. Soc.* 38, 1–321.
- Hensel, H., and Zotterman, Y. (1951a). The response of the cold receptors to constant cooling. *Acta Physiol.* 22, 96–105.
- Hensel, H., and Zotterman, Y. (1951b). Action potentials of cold fibres and intracutaneous temperature gradient. *J. Neurophysiol.* 14, 377–385.
- Hensel, H., and Zotterman, Y. (1951c). The effect of menthol on the thermoreceptors. *Acta Physiol.* 24, 27–34.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Hjerling-Leffler, J., Alqatari, M., Ernfors, P., and Koltzenburg, M. (2007). Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *J. Neurosci.* 27, 2435–2443.
- Hollis, J.H., McKinley, M.J., D’Souza, M., Kampe, J., and Oldfield, B.J. (2008). The trajectory of sensory pathways from the lamina terminalis to the insular and cingulate cortex: a neuroanatomical framework for the generation of thirst. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1390-401.
- Honda, K., Negoro, H., Higuchi, T., and Tadokoro, Y. (1989). The role of the anteroventral 3rd ventricle area in the osmotic control of paraventricular neurosecretory cells. *Exp. Brain Res.* 76, 497–502.
- Honkaniemi, J., Kainu, T., Ceccatelli, S., Recharadt, L., Hökfelt, T., and Pelto-Huikko, M. (1992). Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *Neuroreport* 3, 849–852.
- Horowitz, S.S., Blanchard, J.H., and Morin, L.P. (2004). Intergeniculate leaflet and ventral lateral geniculate nucleus afferent connections: An anatomical substrate for functional input from the vestibulo-visuomotor system. *J. Comp. Neurol.* 474, 227–245.
- Houghton, J.W., Hans, J., Pesaro, M., Ley, J.P., Carpenter, G.H., and Proctor, G. (2017). Sensory effects of transient receptor potential channel agonists on whole mouth saliva extensional rheology. *J. Texture Stud.* 48, 313–317.

- Huang, D., Li, S., Dhaka, A., Story, G.M., and Cao, Y.-Q. (2012). Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Mol. Pain* 8, 66.
- Huang, F., Ni, M., Zhang, J.-M., Li, D.-J., and Shen, F.-M. (2017). TRPM8 downregulation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells is involved in hypertension. *Mol. Med. Rep.* 15, 1900–1908.
- Huang, T., Ma, L., and Krimm, R.F. (2015). Postnatal reduction of BDNF regulates the developmental remodeling of taste bud innervation. *Dev. Biol.* 405, 225–236.
- Hughes, A., and Wieniawa-Narkiewicz, E. (1980). A newly identified population of presumptive microneurons in the cat retinal ganglion cell layer. *Nature* 284, 468–470.
- Iggo, A. (1969). Cutaneous thermoreceptors in primates and sub-primates. *J. Physiol.* 200, 403–430.
- Imamura, T., Ishizuka, O., and Nishizawa, O. (2013). Cold stress induces lower urinary tract symptoms. *Int. J. Urol.* 20, 661–669.
- Inada, H., Iida, T., and Tominaga, M. (2006). Different expression patterns of TRP genes in murine B and T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 762–767.
- Iovino, M., and Steardo, L. (1984). Vasopressin release to central and peripheral angiotensin II in rats with lesions of the subfornical organ. *Brain Res.* 322, 365–368.
- Isa, T. (2002). Intrinsic processing in the mammalian superior colliculus. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 668–677.
- Ito, H., Aizawa, N., Sugiyama, R., Watanabe, S., Takahashi, N., Tajimi, M., Fukuhara, H., Homma, Y., Kubota, Y., Andersson, K.-E., et al. (2016). Functional role of the transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) ion channel in the urinary bladder assessed by conscious cystometry and ex vivo measurements of single-unit mechanosensitive bladder afferent activities in the rat. *BJU Int.* 117, 484–494.
- Jakab, R.L., and Leranthy, C. (1990). Somatospinal neurons in the rat lateral septal area are synaptic targets of hippocamposeptal fibers: a combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse* 6, 10–22.
- Jall, S., Finan, B., Collden, G., Fischer, K., Dong, X., Tschöp, M.H., Müller, T.D., and Clemmensen, C. (2019). Pirt deficiency has subtle female-specific effects on energy and glucose metabolism in mice. *Mol. Metab.* 23, 75–81.
- Jang, Y., Lee, Y., Kim, S.M., Yang, Y.D., Jung, J., and Oh, U. (2012). Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Arch. Pharm. Res.* 35, 1823–1830.
- Jankowski, M.P., Rau, K.K., and Koerber, H.R. (2017). Cutaneous TRPM8-expressing sensory afferents are a small population of neurons with unique firing properties. *Physiol. Rep.* 5, 1–11.
- Jaubert-Miazza, L., Green, E., Lo, F.-S., Bui, K., Mills, J., and Guido, W. (2005). Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Vis. Neurosci.* 22, 661–676.
- Jiang, W., and Hunter, T. (1998). Analysis of cell-cycle profiles in transfected cells using a membrane targeted GFP. *Biotechniques* 24, 348–354.
- Johnson, C.D., Melanaphy, D., Purse, A., Stokesberry, S.A., Dickson, P., and Zholos, A. V (2009).



- Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H1868-77.
- Johnson, J.M., Yen, T.C., Zhao, K., and Kosiba, W.A. (2005). Sympathetic, sensory, and nonneuronal contributions to the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1573-9.
- Johnson, R.F., Morin, L.P., and Moore, R.Y. (1988). Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.* 462, 301–312.
- de Jong, P.R., Takahashi, N., Peiris, M., Bertin, S., Lee, J., Gareau, M.G., Paniagua, A., Harris, A.R., Herdman, D.S., Corr, M., et al. (2015). TRPM8 on mucosal sensory nerves regulates colitogenic responses by innate immune cells via CGRP. *Mucosal Immunol.* 8, 491–504.
- de Jongste, J.C., Jongejan, R.C., and Kerrebijn, K.F. (1991). Control of airway caliber by autonomic nerves in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143, 1421–1426.
- Jordt, S., Bautista, D.M., Chuang, H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265.
- Julius, D. (2013). TRP Channels and Pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355–384.
- Jun, J.H., Kang, H.J., Jin, M.H., Lee, H.Y., Im, Y.J., Jung, H.J., and Han, S.W. (2012). Function of the cold receptor (TRPM8) associated with voiding dysfunction in bladder outlet obstruction in rats. *Int. Neurourol. J.* 16, 69.
- Kandel, E.R. (2013). Principles of neural science. 5th Edition. McGraw-Hill Medical.
- Kaneko, Y., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2474–2507.
- Kapatos, G., and Gold, R.M. (1972). Tongue cooling during drinking: a regulator of water intake in rats. *Science* (80-.). 176, 685–686.
- Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T., and Nilius, B. (2007). Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.* 27, 9874–9884.
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B., and Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1273–1278.
- El Karim, I.A., Linden, G.J., Curtis, T.M., About, I., McGahon, M.K., Irwin, C.R., Killough, S.A., and Lundy, F.T. (2011). Human dental pulp fibroblasts express the “cold-sensing” transient receptor potential channels TRPA1 and TRPM8. *J. Endod.* 37, 473–478.
- Karten, H.J., and Brecha, N. (1983). Localization of neuroactive substances in the vertebrate retina: evidence for lamination in the inner plexiform layer. *Vision Res.* 23, 1197–1205.
- Kashio, M., and Tominaga, M. (2017). The TRPM2 channel: A thermo-sensitive metabolic sensor. *Channels* 11, 426–433.
- Kayama, Y., Shibata, M., Takizawa, T., Iбата, K., Nakahara, J., Shimizu, T., Toriumi, H., Yuzaki, M., and Suzuki, N. (2017). Signaling Pathways Relevant to Nerve Growth Factor-induced Upregulation of Transient Receptor Potential M8 Expression. *Neuroscience*

367, 178–188.

- Keh, S.M., Facer, P., Yehia, A., Sandhu, G., Saleh, H.A., and Anand, P. (2011). The menthol and cold sensation receptor TRPM8 in normal human nasal mucosa and rhinitis. *Rhinology* 49, 453–457.
- Kenshalo, D.R., and Gallegos, E.S. (1967). Multiple temperature-sensitive spots innervated by single nerve fibers. *Science* (80-). 158, 1064–1065.
- Kerschensteiner, D., and Guido, W. (2017). Organization of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. *Vis. Neurosci.* 34, E008.
- Khajavi, N., Reinach, P.S., Slavi, N., Skrzypski, M., Lucius, A., Strauß, O., Köhrle, J., and Mergler, S. (2015). Thyronamine induces TRPM8 channel activation in human conjunctival epithelial cells. *Cell. Signal.* 27, 315–325.
- Khalil, M., Babes, A., Lakra, R., Försch, S., Reeh, P.W., Wirtz, S., Becker, C., Neurath, M.F., and Engel, M.A. (2016). Transient receptor potential melastatin 8 ion channel in macrophages modulates colitis through a balance-shift in TNF-alpha and interleukin-10 production. *Mucosal Immunol.* 9, 1500–1513.
- Khanna, R., MacDonald, J.K., and Levesque, B.G. (2014). Peppermint oil for the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Gastroenterol.* 48, 505–512.
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., and Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab. Anim. Res.* 34, 147.
- Kim, J.-H., Jang, Y.-S., Jang, S.-H., Jung, K.-S., Kim, S.-H., Ye, Y.-M., and Park, H.-S. (2017). Toluene diisocyanate exposure induces airway inflammation of bronchial epithelial cells via the activation of transient receptor potential melastatin 8. *Exp. Mol. Med.* 49, e299–e299.
- Kim, Y.S., Park, J.H., Choi, S.J., Bae, J.Y., Ahn, D.K., McKemy, D.D., and Bae, Y.C. (2014). Central connectivity of transient receptor potential melastatin 8-expressing axons in the brain stem and spinal dorsal horn. *PLoS One* 9.
- Kinsman, B., Cowles, J., Lay, J., Simmonds, S.S., Browning, K.N., and Stocker, S.D. (2014). Osmoregulatory thirst in mice lacking the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) and/or type 4 (TRPV4) receptor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R1092-100.
- Kinsman, B.J., Simmonds, S.S., Browning, K.N., and Stocker, S.D. (2017). Organum vasculosum of the lamina terminalis detects NaCl to elevate sympathetic nerve activity and blood pressure. *Hypertension* 69, 163–170.
- Kistnert, A., Gossent, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., and Bujardt, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice (tet system/genetic switch/kinetics of induction/liver-specific control). *Genetics* 93, 10933–10938.
- Kligler, B., and Chaudhary, S. (2007). Peppermint oil. *Am. Fam. Physician* 75, 1027–1030.
- Knowlton, W.M., Bifulco-Fisher, A., Bautista, D.M., and McKemy, D.D. (2010). TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150, 340–350.



- Knowlton, W.M., Daniels, R.L., Palkar, R., McCoy, D.D., and McKemy, D.D. (2011). Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice. *PLoS One* 6, e25894.
- Knowlton, W.M., Palkar, R., Lippoldt, E.K., McCoy, D.D., Baluch, F., Chen, J., and McKemy, D.D. (2013). A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J. Neurosci.* 33, 2837–2848.
- Kunert-Keil, C., Bisping, F., Krüger, J., and Brinkmeier, H. (2006). Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 7, 159.
- Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.-S., Woolf, C.J., and Corey, D.P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50, 277–289.
- de la Peña, E., Mälkiä, A., Cabedo, H., Belmonte, C., and Viana, F. (2005). The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *J. Physiol.* 567, 415–426.
- Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., and Cemazar, M. (2018). Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front. Oncol.* 8, 1–18.
- Langel, J.L., Smale, L., Esquivá, G., and Hannibal, J. (2015). Central melanopsin projections in the diurnal rodent, *Arvicanthus niloticus*. *Front. Neuroanat.* 9, 1–17.
- Larrayoz, I.M., Rey-Funes, M., Contartese, D.S., Rolón, F., Sarotto, A., Dorfman, V.B., Loidl, C.F., and Martínez, A. (2016). Cold shock proteins are expressed in the retina following exposure to low temperatures. *PLoS One* 11, e0161458.
- Larsen, P.J., and Mikkelsen, J.D. (1995). Functional identification of central afferent projections conveying information of acute “stress” to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurosci.* 15, 2609–2627.
- Laska, M., Distel, H., and Hudson, R. (1997). Trigeminal perception of odorant quality in congenitally anosmic subjects. *Chem. Senses* 22, 447–456.
- Latorre, R., Brauchi, S., Madrid, R., and Orio, P. (2011). A cool channel in cold transduction. *Physiology* 26, 273–285.
- Laude, E.A., Morice, A.H., and Grattan, T.J. (1994). The antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious guinea-pigs. *Pulm. Pharmacol.* 7, 179–184.
- Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M.J. (2005). Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J. Neurosci.* 25, 1304–1310.
- Lei, Z., Ishizuka, O., Imamura, T., Noguchi, W., Yamagishi, T., Yokoyama, H., Kurizaki, Y., Sudha, G.S., Hosoda, T., Nishizawa, O., et al. (2013). Functional roles of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels in the cold stress-induced detrusor overactivity pathways in conscious rats. *NeuroUrol. Urodyn.* 32, 500–504.
- Leib, D.E., Zimmerman, C.A., and Knight, Z.A. (2016). Thirst. *Curr. Biol.* 26, R1260–R1265.
- Leib, D.E., Zimmerman, C.A., Poormoghaddam, A., Huey, E.L., Ahn, J.S., Lin, Y.-C., Tan, C.L., Chen, Y., and Knight, Z.A. (2017). The forebrain thirst circuit drives drinking through negative reinforcement. *Neuron* 96, 1272-1281.e4.

- Leijon, S.C.M., Neves, A.F., Breza, J.M., Simon, S.A., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2019). Oral thermosensing by murine trigeminal neurons: modulation by capsaicin, menthol and mustard oil. *J. Physiol.* *597*, 2045–2061.
- Levine, J.D., Weiss, M.L., Rosenwasser, A.M., and Miselis, R.R. (1991). Retinohypothalamic tract in the female albino rat: A study using horseradish peroxidase conjugated to cholera toxin. *J. Comp. Neurol.* *306*, 344–360.
- Lewis T. (1930). Observations upon the reactions of the vessels of the human skin to cold. *Heart* *15*, 177–208.
- Li, H. (2017). TRP Channel Classification. Y. Wang, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 1–8.
- Li, M., Li, Q., Yang, G., Kolosov, V.P., Perelman, J.M., and Zhou, X.D. (2011). Cold temperature induces mucin hypersecretion from normal human bronchial epithelial cells in vitro through a transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-mediated mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*, 626-34.e1-5.
- Liedtke, W., and Friedman, J.M. (2003). Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 13698–13703.
- Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., AndrejŠali, Hudspeth, A.J., Friedman, J.M., and Heller, S. (2000). Vanilloid Receptor–Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor. *Cell* *103*, 525–535.
- Light, A.R. (1988). Normal anatomy and physiology of the spinal cord dorsal horn. *Appl. Neurophysiol.* *51*, 78–88.
- Linden, R. (1987). Displaced ganglion cells in the retina of the rat. *J. Comp. Neurol.* *258*, 138–143.
- Linte, R.M., Ciobanu, C., Reid, G., and Babes, A. (2007). Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurones by inflammatory mediators. *Exp. Brain Res.* *178*, 89–98.
- Lippoldt, E.K., Elmes, R.R., McCoy, D.D., Knowlton, W.M., and McKemy, D.D. (2013). Artemin, a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Member, Induces TRPM8-Dependent Cold Pain. *J. Neurosci.* *33*, 12543–12552.
- Liu, J. (1995). The Anatomy and Physiology of Direction-Selective Retinal Ganglion Cells. *Webvision Organ. Retin. Vis. Syst.* 1–14.
- Liu, B., Fan, L., Balakrishna, S., Sui, A., Morris, J.B., and Jordt, S.-E. (2013a). TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. *Pain* *154*, 2169–2177.
- Liu, H., Liu, Q., Hua, L., and Pan, J. (2018a). Inhibition of transient receptor potential melastatin 8 alleviates airway inflammation and remodeling in a murine model of asthma with cold air stimulus. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *50*, 499–506.
- Liu, H., Hua, L., Liu, Q., Pan, J., and Bao, Y. (2018b). Cold stimuli facilitate inflammatory responses through transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) in primary airway epithelial cells of asthmatic mice. *Inflammation* *41*, 1266–1275.
- Liu, S.-C., Lu, H.-H., Cheng, L.-H., Chu, Y.-H., Lee, F.-P., Wu, C.-C., and Wang, H.-W. (2015).



- Identification of the cold receptor TRPM8 in the nasal mucosa. *Am. J. Rhinol. Allergy* 29, e112-6.
- Liu, S.-C., Lu, H.-H., Fan, H.-C., Wang, H.-W., Chen, H.-K., Lee, F.-P., Yu, C.-J., and Chu, Y.-H. (2017). The identification of the TRPM8 channel on primary culture of human nasal epithelial cells and its response to cooling. *Medicine (Baltimore)*. 96, e7640.
- Liu, X.-R., Liu, Q., Chen, G.-Y., Hu, Y., Sham, J.S.K., and Lin, M.-J. (2013b). Down-regulation of TRPM8 in pulmonary arteries of pulmonary hypertensive rats. *Cell. Physiol. Biochem*. 31, 892–904.
- Lock, J.T., Parker, I., and Smith, I.F. (2015). A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells. *Cell Calcium* 58, 638–648.
- Lu, J., Greco, M.A., Shiromani, P., and Saper, C.B. (2000). Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J. Neurosci.* 20, 3830–3842.
- Lübbert, M., Kyereme, J., Schöbel, N., Beltrán, L., Wetzels, C.H., and Hatt, H. (2013). Transient receptor potential channels encode volatile chemicals sensed by rat trigeminal ganglion neurons. *PLoS One* 8, e77998.
- Lucas, R.J., Hattar, S., Takao, M., Berson, D.M., Foster, R.G., and Yau, K.-W. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science (80-)*. 299, 245–247.
- Luppi, P.H., Sakai, K., Salvert, D., Fort, P., and Jouvet, M. (1987). Peptidergic hypothalamic afferents to the cat nucleus raphe pallidus as revealed by a double immunostaining technique using unconjugated cholera toxin as a retrograde tracer. *Brain Res.* 402, 339–345.
- Lüttgen, M., Ogren, S.O., and Meister, B. (2005). 5-HT_{1A} receptor mRNA and immunoreactivity in the rat medial septum/diagonal band of Broca-relationships to GABAergic and cholinergic neurons. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 93–111.
- Lyckman, A.W., Fan, G., Rios, M., Jaenisch, R., and Sur, M. (2005). Normal eye-specific patterning of retinal inputs to murine subcortical visual nuclei in the absence of brain-derived neurotrophic factor. *Vis. Neurosci.* 22, 27–36.
- Ma, S., G, G., Ak, V.-E., Jf, D., and H, H. (2008). Menthol derivative WS-12 selectively activates transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) ion channels. *Pak. J. Pharm. Sci.* 21, 370–378.
- Ma, S., Yu, H., Zhao, Z., Luo, Z., Chen, J., Ni, Y., Jin, R., Ma, L., Wang, P., Zhu, Z., et al. (2012). Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 88–96.
- Macdonald, J., and Harrison, R.G. (1954). Effect of low temperatures on rat spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 5, 205–216.
- Madej, M.G., and Ziegler, C.M. (2018). Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 470, 213–225.
- Madrid, R., Donovan-Rodríguez, T., Meseguer, V., Acosta, M.C., Belmonte, C., and Viana, F. (2006). Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *J. Neurosci.* 26, 12512–12525.
- Malkia, A., Pertusa, M., Fernández-Ballester, G., Ferrer-Montiel, A., and Viana, F. (2009).

- Differential role of the menthol-binding residue Y745 in the antagonism of thermally gated TRPM8 channels. *Mol. Pain* 5, 62.
- Mandadi, S., Nakanishi, S.T., Takashima, Y., Dhaka, A., Patapoutian, A., McKemy, D.D., and Whelan, P.J. (2009). Locomotor networks are targets of modulation by sensory transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential melastatin 8 channels. *Neuroscience* 162, 1377–1397.
- Mangiapane, M.L., Thrasher, T.N., Keil, L.C., Simpson, J.B., and Ganong, W.F. (1983). Deficits in drinking and vasopressin secretion after lesions of the nucleus medianus. *Neuroendocrinology* 37, 73–77.
- Martínez-López, P., Treviño, C.L., de la Vega-Beltrán, J.L., De Blas, G., Monroy, E., Beltrán, C., Orta, G., Gibbs, G.M., O'Bryan, M.K., and Darszon, A. (2011). TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *J. Cell. Physiol.* 226, 1620–1631.
- Masland, R.H. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 431–436.
- Masland, R.H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76, 266–280.
- Masland, R.H., and Mills, J.W. (1979). Autoradiographic identification of acetylcholine in the rabbit retina. *J. Cell Biol.* 83, 159–178.
- Masland, R.H., Mills, J.W., and Cassidy, C. (1984). The functions of acetylcholine in the rabbit retina. *Proc. R. Soc. London* 223, 121–139.
- Matthaei, K.I. (2007). Genetically manipulated mice: a powerful tool with unsuspected caveats. *J. Physiol.* 582, 481–488.
- McCoy, E.S., and Zylka, M.J. (2014). Enhanced behavioral responses to cold stimuli following CGRP α sensory neuron ablation are dependent on TRPM8. *Mol. Pain* 10, 69.
- McCoy, D.D., Zhou, L., Nguyen, A.-K., Watts, A.G., Donovan, C.M., and McKemy, D.D. (2013a). Enhanced insulin clearance in mice lacking TRPM8 channels. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E78–88.
- 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, e36355.
- McCoy, E.S., Taylor-Blake, B., Street, S.E., Pribisko, A.L., Zheng, J., and Zylka, M.J. (2013b). Peptidergic CGRP α primary sensory neurons encode heat and itch and tonically suppress sensitivity to cold. *Neuron* 78, 138–151.
- McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58.
- McKinley, M.J., Mathai, M.L., Pennington, G., Rundgren, M., and Vivas, L. (1999). Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. *Am. J. Physiol.* 276, R673–83.
- McKinley, M.J., Denton, D.A., Oldfield, B.J., De Oliveira, L.B., and Mathai, M.L. (2006). Water intake and the neural correlates of the consciousness of thirst. *Semin. Nephrol.* 26, 249–257.
- McKinley, M.J., Yao, S.T., Uschakov, A., McAllen, R.M., Rundgren, M., and Martelli, D. (2015). The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol.* 214, 8–32.



- Melanaphy, D., Johnson, C.D., Kustov, M. V., Watson, C.A., Borysova, L., Burdyga, T. V., and Zholos, A. V. (2016). Ion channel mechanisms of rat tail artery contraction-relaxation by menthol involving, respectively, TRPM8 activation and L-type Ca²⁺ channel inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *311*, H1416–H1430.
- Merat, S., Khalili, S., Mostajabi, P., Ghorbani, A., Ansari, R., and Malekzadeh, R. (2010). The effect of enteric-coated, delayed-release peppermint oil on irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* *55*, 1385–1390.
- Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* *24*, 71–80.
- Mikkelsen, J.D. (1992). Visualization of efferent retinal projections by immunohistochemical identification of cholera toxin subunit B. *Brain Res. Bull.* *28*, 619–623.
- Milenkovic, N., Zhao, W.-J., Walcher, J., Albert, T., Siemens, J., Lewin, G.R., and Poulet, J.F.A. (2014). A somatosensory circuit for cooling perception in mice. *Nat. Neurosci.* *17*, 1560–1566.
- Millqvist, E. (2016). TRPV1 and TRPM8 in treatment of chronic cough. *Pharmaceuticals* *9*, 45.
- Mistretta, F.A., Russo, A., Castiglione, F., Bettiga, A., Colciago, G., Montorsi, F., Brandolini, L., Aramini, A., Bianchini, G., Allegretti, M., et al. (2015). DFL23448, A novel transient receptor potential melastin 8-selective ion channel antagonist, modifies bladder function and reduces bladder overactivity in awake rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *356*, 200–211.
- Mittag, J., Lyons, D.J., Sällström, J., Vujovic, M., Dudazy-Gralla, S., Warner, A., Wallis, K., Alkemade, A., Nordström, K., Monyer, H., et al. (2013). Thyroid hormone is required for hypothalamic neurons regulating cardiovascular functions. *J. Clin. Invest.* *123*, 509–516.
- Mizuno, A., Matsumoto, N., Imai, M., and Suzuki, M. (2003). Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C96–C101.
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., et al. (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* (80-.). *272*, 1339–1342.
- Molday, L.L., Cheng, C.L., and Molday, R.S. (2019). Cell-Specific Markers for the Identification of Retinal Cells and Subcellular Organelles by Immunofluorescence Microscopy. In *Experimental Eye Research*, (Elsevier Ltd), pp. 293–310.
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci. Signal.* *2005*, re3–re3.
- Montell, C., and Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* *2*, 1313–1323.
- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Bruford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., et al. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* *9*, 229–231.
- Moore, R.Y. (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *119*, 1–28.
- Moore, E.D., Becker, P.L., Fogarty, K.E., Williams, D.A., and Fay, F.S. (1990). Ca²⁺ imaging in

- single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium* 11, 157–179.
- Moore, K.L., Dalley, A.F., and Agur, A.M.R. (2007). *Anatomía con orientación clínica*. 5th Edition. Editorial Médica Panamericana. (Editorial Médica).
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* (80-). 307, 1468–1472.
- Moraes, M.N., de Assis, L.V.M., Henriques, F. dos S., Batista, M.L., Güler, A.D., and Castrucci, A.M. de L. (2017). Cold-sensing TRPM8 channel participates in circadian control of the brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 1864, 2415–2427.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J.L., Bayliss, D.A., and 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.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., and Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* (80-). 237, 192–197.
- Morin, C., and Bushnell, C.M. (1998). Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: a psychophysical study. *Pain* 74, 67–73.
- Morin, L.P., Studholme, K.M., Lawrence, P.M., and Studholme, K.M. (2014). Retinofugal projections in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 522, 3733–3753.
- Morrison, S.F. (2016). Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 196, 14–24.
- Morrison, S.F., and Nakamura, K. (2019). Central Mechanisms for Thermoregulation. *Annu. Rev. Physiol.* 81, 285–308.
- Mukerji, G., Yiangou, Y., Corcoran, S.L., Selmer, I.S., Smith, G.D., Benham, C.D., Bountra, C., Agarwal, S.K., and Anand, P. (2006). Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC Urol.* 6, 6.
- Muller, C., Morales, P., and Reggio, P.H. (2019). Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–15.
- Müller, U. (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech. Dev.* 82, 3–21.
- Naeini, R.S., Witty, M.-F., Séguéla, P., and Bourque, C.W. (2006). An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nat. Neurosci.* 9, 93–98.
- Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G., and García-Añoveros, J. (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J. Neurosci.* 25, 4052–4061.
- Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051–1061.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99–109.
- Nakashimo, Y., Takumida, M., Fukui, T., Anniko, M., and Hirakawa, K. (2010). Expression of transient receptor potential channel vanilloid (TRPV) 1–4, melastin (TRPM) 5 and 8,



- and ankyrin (TRPA1) in the normal and methimazole-treated mouse olfactory epithelium. *Acta Otolaryngol.* 130, 1278–1286.
- Nakayama, T., Eisenman, J.S., and Hardy, J.D. (1961). Single unit activity of anterior hypothalamus during local heating. *Science* (80-.). 134, 560–561.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M.J., and Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clin. Chim. Acta* 439, 231–250.
- Nedungadi, T.P., Dutta, M., Bathina, C.S., Caterina, M.J., and Cunningham, J.T. (2012). Expression and distribution of TRPV2 in rat brain. *Exp. Neurol.* 237, 223–237.
- Nickla, D.L., and Wallman, J. (2010). The multifunctional choroid. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 144–168.
- Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 12, 218.
- Nilius, B., and Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66, 676–814.
- Nocchi, L., Daly, D.M., Chapple, C., and Grundy, D. (2014). Induction of oxidative stress causes functional alterations in mouse urothelium via a TRPM8-mediated mechanism: implications for aging. *Aging Cell* 13, 540–550.
- Nomoto, Y., Yoshida, A., Ikeda, S., Kamikawa, Y., Harada, K., Ohwatashi, A., and Kawahira, K. (2008). Effect of menthol on detrusor smooth-muscle contraction and the micturition reflex in rats. *Urology* 72, 701–705.
- Noyer, L., Grolez, G.P., Prevarskaya, N., Gkika, D., and Lemonnier, L. (2018). TRPM8 and prostate: a cold case? *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 470, 1419–1429.
- Oka, Y., Ye, M., and Zuker, C.S. (2015). Thirst driving and suppressing signals encoded by distinct neural populations in the brain. *Nature* 520, 349–352.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997). ‘Green mice’ as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313–319.
- Oldfield, B.J., Bicknell, R.J., McAllen, R.M., Weisinger, R.S., and McKinley, M.J. (1991). Intravenous hypertonic saline induces Fos immunoreactivity in neurons throughout the lamina terminalis. *Brain Res.* 561, 151–156.
- Oliveira-Soto, L., and Efron, N. (2001). Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 20, 374–384.
- Pan, Y., Thapa, D., Baldissera, L., Argunhan, F., Aubdool, A.A., and Brain, S.D. (2018). Relevance of TRPA1 and TRPM8 channels as vascular sensors of cold in the cutaneous microvasculature. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 470, 779–786.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., and Kay, S.A. (2002). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* (80-.). 298, 2213–2216.
- Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S.N., Koltzenburg, M., and Caterina, M.J. (2011). TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J. Neurosci.* 31, 11425–11436.
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M.C., Gallar, J., Dhaka, A., Viana, F., and Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by

- TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat. Med.* *16*, 1396–1399.
- Parra, A., Gonzalez-Gonzalez, O., Gallar, J., and Belmonte, C. (2014). Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain* *155*, 1481–1491.
- Patapoutian, A., and Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 272–280.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 529–539.
- Patel, N., and Kirmi, O. (2009). Anatomy and imaging of the normal meninges. *Semin. Ultrasound. CT. MR* *30*, 559–564.
- Patel, R., Goncalves, L., Newman, R., Jiang, F.L., Goldby, A., Reeve, J., Hendrick, A., Teall, M., Hannah, D., Almond, S., et al. (2014). Novel TRPM8 Antagonist Attenuates Cold Hypersensitivity after Peripheral Nerve Injury in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *349*, 47–55.
- 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* *13*, e0198601.
- Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). *s* (Academic Press).
- Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Academic Press).
- Pedersen, S.F., and Nilius, B. (2007). Transient Receptor Potential Channels in Mechanosensing and Cell Volume Regulation. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier Masson SAS), pp. 183–207.
- Pedersen, S.F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* *38*, 233–252.
- Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., et al. (2002a). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* (80-.). *296*, 2046–2049.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002b). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* *108*, 705–715.
- Pérez De Sevilla Müller, L., Shelley, J., and Weiler, R. (2007). Displaced amacrine cells of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* *505*, 177–189.
- Pertusa, M., Madrid, R., Morenilla-Palao, C., Belmonte, C., and Viana, F. (2012). N-glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons. *J. Biol. Chem.* *287*, 18218–18229.
- Pertusa, M., Rivera, B., González, A., Ugarte, G., and Madrid, R. (2018). Critical role of the pore domain in the cold response of TRPM8 channels identified by ortholog functional comparison. *J. Biol. Chem.* *293*, 12454–12471.
- Pezzone, M.A., Lee, W. Sen, Hoffman, G.E., and Rabin, B.S. (1992). Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Brain Res.* *597*, 41–50.



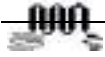
- Phelps, C.B., and Gaudet, R. (2007). The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization. *J. Biol. Chem.* *282*, 36474–36480.
- Plevkova, J., Kollarik, M., Poliacek, I., Brozmanova, M., Surdenikova, L., Tatar, M., Mori, N., and Canning, B.J. (2013). The role of trigeminal nasal TRPM8-expressing afferent neurons in the antitussive effects of menthol. *J. Appl. Physiol.* *115*, 268–274.
- Pogorzala, L.A., Mishra, S.K., and Hoon, M.A. (2013). The cellular code for mammalian thermosensation. *J. Neurosci.* *33*, 5533–5541.
- Prager-Khoutorsky, M. (2017). Mechanosensing in hypothalamic osmosensory neurons. *Semin. Cell Dev. Biol.* *71*, 13–21.
- Premkumar, L.S., Raisinghani, M., Pingle, S.C., Long, C., and Pimentel, F. (2005). Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J. Neurosci.* *25*, 11322–11329.
- Proudfoot, C.J., Garry, E.M., Cottrell, D.F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D.C., Fleetwood-Walker, S.M., and Mitchell, R. (2006). Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.* *16*, 1591–1605.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., and Rollag, M.D. (2000). A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *J. Neurosci.* *20*, 600–605.
- Provencio, I., Rollag, M.D., and Castrucci, A.M. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature* *415*, 493–493.
- Purves, D. (2004). *Neuroscience*. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Quallo, T., Vastani, N., Horridge, E., Gentry, C., Parra, A., Moss, S., Viana, F., Belmonte, C., Andersson, D.A., and Bevan, S. (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat. Commun.* *6*, 7150.
- Quiroz, F. (1993). *Anatomía humana*. Ed Porrúa.
- Ramachandran, R., Hyun, E., Zhao, L., Lapointe, T.K., Chapman, K., Hirota, C.L., Ghosh, S., McKemy, D.D., Vergnolle, N., Beck, P.L., et al. (2013). TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 7476–7481.
- Ramón y Cajal, S. (1893). La rétine des vertébrés. *Cellule* *9*, 119–257.
- Ran, C., Hoon, M.A., and Chen, X. (2016). The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nat. Neurosci.* *19*, 1201–1209.
- Ravi, S., Ahn, D., Greschner, M., Chichilnisky, E.J., and Field, G.D. (2018). Pathway-Specific Asymmetries between ON and OFF Visual Signals. *J. Neurosci.* *38*, 9728–9740.
- Reid, G., Babes, A., and Pluteanu, F. (2002). A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *J. Physiol.* *545*, 595–614.
- Reimúndez, A., Fernández-Peña, C., García, G., Fernández, R., Ordás, P., Gallego, R., Pardo-Vazquez, J.L., Arce, V., Viana, F., and Señarís, R. (2018). Deletion of the cold thermoreceptor TRPM8 increases heat loss and food intake leading to reduced body temperature and obesity in mice. *J. Neurosci.* *38*, 3643–3656.
- Ren, L., Dhaka, A., and Cao, Y.-Q. (2015). Function and Postnatal Changes of Dural Afferent

- Fibers Expressing TRPM8 Channels. *Mol. Pain* 11, s12990-015–0043.
- Ren, L., Chang, M.J., Zhang, Z., Dhaka, A., Guo, Z., and Cao, Y.-Q. (2018). Quantitative analysis of mouse dural afferent neurons expressing TRPM8, VGLUT3, and NF200. *Headache* 58, 88–101.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.* 96, 415–495.
- Rey-Funes, M., Ibarra, M.E., Dorfman, V.B., Serrano, J., Fernández, A.P., Martínez-Murillo, R., Martínez, A., Coirini, H., Rodrigo, J., and Loidl, C.F. (2011). Hypothermia prevents nitric oxide system changes in retina induced by severe perinatal asphyxia. *J. Neurosci. Res.* 89, 729–743.
- Rey-Funes, M., Dorfman, V.B., Ibarra, M.E., Peña, E., Contartese, D.S., Goldstein, J., Acosta, J.M., Larráyoz, I.M., Martínez-Murillo, R., Martínez, A., et al. (2013). Hypothermia prevents gliosis and angiogenesis development in an experimental model of ischemic proliferative retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2836–2846.
- Risold, P.Y., and Swanson, L.W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res. Rev.* 24, 115–195.
- Rohács, T., Lopes, C.M.B., Michailidis, I., and Logothetis, D.E. (2005). PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8, 626–634.
- Roska, B., and Werblin, F. (2001). Vertical interactions across ten parallel, stacked representations in the mammalian retina. *Nature* 410, 583–587.
- Rossato, M., Granzotto, M., Macchi, V., Porzionato, A., Petrelli, L., Calcagno, A., Vencato, J., De Stefani, D., Silvestrin, V., Rizzuto, R., et al. (2014). Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production. *Mol. Cell. Endocrinol.* 383, 137–146.
- Van Rossum, D., Hanisch, U.K., and Quirion, R. (1997). Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 649–678.
- Roth, B., and Bruns, V. (1993). Late developmental changes of the innervation densities of the myelinated fibres and the outer hair cell efferent fibres in the rat cochlea. *Anat. Embryol. (Berl.)* 187, 565–571.
- Rowland, N.E., Fregly, M.J., Li, B.H., and Han, L. (1996). Angiotensin-related induction of immediate early genes in rat brain. *Regul. Pept.* 66, 25–29.
- Ruby, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C., and O’Hara, B.F. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* (80-.). 298, 2211–2213.
- Rutter, A.R., Ma, Q., Leveridge, M., and Bonnert, T.P. (2005). Heteromerization and colocalization of TrpV1 and TrpV2 in mammalian cell lines and rat dorsal root ganglia. *Neuroreport* 16, 1735–1739.
- Sabnis, A.S., Shadid, M., Yost, G.S., and Reilly, C.A. (2008a). Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 466–474.
- Sabnis, A.S., Reilly, C. a, Veranth, J.M., and Yost, G.S. (2008b). Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by



- cold temperatures. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *295*, L194-200.
- Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* *19*, 746–750.
- Salido, E.M., Dorfman, D., Bordone, M., Chianelli, M., González Fleitas, M.F., and Rosenstein, R.E. (2013). Global and ocular hypothermic preconditioning protect the rat retina from ischemic damage. *PLoS One* *8*, e61656.
- Sanes, J.R., and Masland, R.H. (2015). The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification. *Annu. Rev. Neurosci.* *38*, 221–246.
- Sant’Ambrogio, G., Tsubone, H., and Sant’Ambrogio, F.B. (1995). Sensory information from the upper airway: role in the control of breathing. *Respir. Physiol.* *102*, 1–16.
- Sato, T., Fujita, M., Kano, M., Hosokawa, H., Kondo, T., Suzuki, T., Kasahara, E., Shoji, N., Sasano, T., and Ichikawa, H. (2013). The distribution of transient receptor potential melastatin-8 in the rat soft palate, epiglottis, and pharynx. *Cell. Mol. Neurobiol.* *33*, 161–165.
- Schaeren-Wiemers, N., and Gerfin-Moser, A. (1993). A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* *100*, 431–440.
- Schepers, R.J., and Ringkamp, M. (2009). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *33*, 205–212.
- Schmidt, T.M., Do, M.T.H., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., and Matynia, A. (2011). Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. *J. Neurosci.* *31*, 16094–16101.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* *9*, 671–675.
- Scholz, J., and Woolf, C.J. (2002). Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* *5*, 1062–1067.
- Schwartz, B. (1965). Environmental Temperature and the Ocular Temperature Gradient. *Arch. Ophthalmol.* *74*, 237–243.
- Schwartz, B., and Feller, M.R. (1962). Temperature gradients in the rabbit eye. *Invest. Ophthalmol.* *1*, 513–521.
- Señarís, R., Ordás, P., Reimúndez, A., and Viana, F. (2018). Mammalian cold TRP channels: impact on thermoregulation and energy homeostasis. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* *470*, 761–777.
- Seung, H.S., and Sümbül, U. (2014). Neuronal cell types and connectivity: lessons from the retina. *Neuron* *83*, 1262–1272.
- Shi, P., Martinez, M.A., Calderon, A.S., Chen, Q., Cunningham, J.T., and Toney, G.M. (2008). Intra-carotid hyperosmotic stimulation increases Fos staining in forebrain organum vasculosum laminae terminalis neurones that project to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Physiol.* *586*, 5231–5245.
- Shibata, Y., Ugawa, S., Imura, M., Kubota, Y., Ueda, T., Kojima, Y., Ishida, Y., Sasaki, S., Hayashi, Y., Kohri, K., et al. (2011). TRPM8-expressing dorsal root ganglion neurons project dichotomizing axons to both skin and bladder in rats. *Neuroreport* *22*, 61–67.

- Silverthorn, D.U., Ober, W.C., Garrison, C.W., Silverthorn, A.C., and Johnson, B.R. (2008). *Fisiología humana: Un enfoque integrado*.
- Simonnet, G., Bioulac, B., Rodriguez, F., and Vincent, J.D. (1980). Evidence of a direct action of angiotensin II on neurones in the septum and in the medial preoptic area. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *13*, 359–363.
- Skryma, R., Prevarskaya, N., Gkika, D., and Shuba, Y. (2011). From urgency to frequency: facts and controversies of TRPs in the lower urinary tract. *Nat. Rev. Urol.* *8*, 617–630.
- Snouwaert, J.N., Brigman, K.K., Latour, A.M., Malouf, N.N., Boucher, R.C., Smithies, O., and Koller, B.H. (1992). An Animal Model for Cystic Fibrosis Made by Gene Targeting. *Science (80-.)*. *257*, 1083–1088.
- Sobhan, U., Sato, M., Shinomiya, T., Okubo, M., Tsumura, M., Muramatsu, T., Kawaguchi, M., Tazaki, M., and Shibukawa, Y. (2013). Immunolocalization and distribution of functional temperature-sensitive TRP channels in salivary glands. *Cell Tissue Res.* *354*, 507–519.
- Song, K., Wang, H., Kamm, G.B., Pohle, J., Reis, F. de C., Heppenstall, P., Wende, H., and Siemens, J. (2016). The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science (80-.)*. *353*, 1393–1398.
- Stein, R.J., Santos, S., Nagatomi, J., Hayashi, Y., Minnerly, B.S., Xavier, M., Patel, A.S., Nelson, J.B., Futrell, W.J., Yoshimura, N., et al. (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J. Urol.* *172*, 1175–1178.
- Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* *150*, 467–486.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* *112*, 819–829.
- Sukumar, P., Sedo, A., Li, J., Wilson, L.A., O’Regan, D., Lippiat, J.D., Porter, K.E., Kearney, M.T., Ainscough, J.F.X., and Beech, D.J. (2012). Constitutively active TRPC channels of adipocytes confer a mechanism for sensing dietary fatty acids and regulating adiponectin. *Circ. Res.* *111*, 191–200.
- Sun, J., Yang, T., Wang, P., Ma, S., Zhu, Z., Pu, Y., Li, L., Zhao, Y., Xiong, S., Liu, D., 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*, 1354–1363.
- Sun, M., Goldin, E., Stahl, S., Falardeau, J.L., Kennedy, J.C., Acierno, J.S., Bove, C., Kaneski, C.R., Nagle, J., Bromley, M.C., et al. (2000). Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2471–2478.
- Sun, W., Uchida, K., Suzuki, Y., Zhou, Y., Kim, M., Takayama, Y., Takahashi, N., Goto, T., Wakabayashi, S., Kawada, T., et al. (2016). Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. *EMBO Rep.* *17*, 383–399.
- Suto, K., and Gotoh, H. (1999). Calcium signaling in cold cells studied in cultured dorsal root



- ganglion neurons. *Neuroscience* 92, 1131–1135.
- Swandulla, D., Carbone, E., Schäfer, K., and Lux, H.D. (1987). Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 409, 52–59.
- Swonger, J.M., Liu, J.S., Ivey, M.J., and Tallquist, M.D. (2016). Genetic tools for identifying and manipulating fibroblasts in the mouse. *Differentiation* 92, 66–83.
- Taberner, F.J., López-Córdoba, A., Fernández-Ballester, G., Korchev, Y., and Ferrer-Montiel, A. (2014). The region adjacent to the C-end of the inner gate in transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels plays a central role in allosteric channel activation. *J. Biol. Chem.* 289, 28579–28594.
- Tajino, K., Matsumura, K., Kosada, K., Shibakusa, T., Inoue, K., Fushiki, T., Hosokawa, H., and Kobayashi, S. (2007). Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R2128-35.
- Tajino, K., Hosokawa, H., Maegawa, S., Matsumura, K., Dhaka, A., and Kobayashi, S. (2011). Cooling-sensitive TRPM8 is thermostat of skin temperature against cooling. *PLoS One* 6, e17504.
- Takahashi, Y., Chiba, T., Kurokawa, M., and Aoki, Y. (2003). Dermatomes and the central organization of dermatomes and body surface regions in the spinal cord dorsal horn in rats. *J. Comp. Neurol.* 462, 29–41.
- Takashima, Y., Daniels, R.L., Knowlton, W., Teng, J., Liman, E.R., and McKemy, D.D. (2007). Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J. Neurosci.* 27, 14147–14157.
- Takashima, Y., Ma, L., and McKemy, D.D. (2010). The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience* 169, 828–842.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F., and Nilius, B. (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438, 1022–1025.
- Tan, C.-H., and McNaughton, P.A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536, 460–463.
- Tan, C.L., Cooke, E.K., Leib, D.E., Lin, Y.-C., Daly, G.E., Zimmerman, C.A., and Knight, Z.A. (2016). Warm-sensitive neurons that control body temperature. *Cell* 167, 47-59.e15.
- Tatsumi, E., Katsura, H., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tsuzuki, K., Noguchi, K., and Sakagami, M. (2015). Changes in transient receptor potential channels in the rat geniculate ganglion after chorda tympani nerve injury. *Neuroreport* 26, 856–861.
- Taylor, A.C., McCarthy, J.J., and Stocker, S.D. (2008). Mice lacking the transient receptor vanilloid potential 1 channel display normal thirst responses and central Fos activation to hypernatremia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1285-93.
- Tazawa, K., Ikeda, H., Kawashima, N., and Okiji, T. (2017). Transient receptor potential melastatin (TRPM8) is expressed in freshly isolated native human odontoblasts. *Arch. Oral Biol.* 75, 55–61.
- Thompson, L.H., and Björklund, A. (2009). Transgenic reporter mice as tools for studies of

- transplantability and connectivity of dopamine neuron precursors in fetal tissue grafts. In *Progress in Brain Research*, pp. 53–79.
- Thrasher, T.N., Simpson, J.B., and Ramsay, D.J. (1982). Lesions of the subfornical organ block angiotensin-induced drinking in the dog. *Neuroendocrinology* 35, 68–72.
- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., and Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* 25, 1804–1815.
- Tokuda, M., Tatsuyama, S., Fujisawa, M., Morimoto-Yamashita, Y., Kawakami, Y., Shibukawa, Y., and Torii, M. (2015). Dentin and pulp sense cold stimulus. *Med. Hypotheses* 84, 442–444.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531–543.
- Touska, F., Winter, Z., Mueller, A., Vlachova, V., Larsen, J., and Zimmermann, K. (2016). Comprehensive thermal preference phenotyping in mice using a novel automated circular gradient assay. *Temperature* 3, 77–91.
- Tran, T.D.N., Zolochovska, O., Figueiredo, M.L., Wang, H., Yang, L.-J., Gimble, J.M., Yao, S., and Cheng, H. (2014). Histamine-induced Ca^{2+} signalling is mediated by TRPM4 channels in human adipose-derived stem cells. *Biochem. J.* 463, 123–134.
- Trejo, L.J., and Cicerone, C.M. (1984). Cells in the pretectal olivary nucleus are in the pathway for the direct light reflex of the pupil in the rat. *Brain Res.* 300, 49–62.
- Tsavalier, L., Shapero, M.H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.* 61, 3760–3769.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509–544.
- Tsumura, M., Sobhan, U., Sato, M., Shimada, M., Nishiyama, A., Kawaguchi, A., Soya, M., Kuroda, H., Tazaki, M., and Shibukawa, Y. (2013). Functional expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts. *PLoS One* 8, e82233.
- Tsuruda, P.R., Julius, D., and Minor, D.L. (2006). Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* 51, 201–212.
- Tsutsumi, M., Denda, S., Ikeyama, K., Goto, M., and Denda, M. (2010). Exposure to low temperature induces elevation of intracellular calcium in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1945–1948.
- Tucker, A.B., and Stocker, S.D. (2016). Hypernatremia-induced vasopressin secretion is not altered in TRPV1-/- rats. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 311, R451–R456.
- Uvin, P., Franken, J., Pinto, S., Rietjens, R., Grammet, L., Deruyver, Y., Alpizar, Y.A., Talavera, K., Vennekens, R., Everaerts, W., et al. (2015). Essential role of transient receptor potential M8 (TRPM8) in a model of acute cold-induced urinary urgency. *Eur. Urol.* 68, 655–661.
- Vahabi, B., Parsons, B.A., Doran, O., Rhodes, A., Dean, S., and Drake, M.J. (2013). TRPM8 agonists modulate contraction of the pig urinary bladder. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*



- 91, 503–509.
- Vandewauw, I., Owsianik, G., and Voets, T. (2013). Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC Neurosci.* 14, 21.
- Vaney, D.I., and Pow, D. V. (2000). The dendritic architecture of the cholinergic plexus in the rabbit retina: Selective labeling by glycine accumulation in the presence of sarcosine. *J. Comp. Neurol.* 421, 1–13.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417.
- Viana, F. (2018). Nociceptors: thermal allodynia and thermal pain. In *Handbook of Clinical Neurology*, pp. 103–119.
- Viana, F., de la Peña, E., and Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat. Neurosci.* 5, 254–260.
- Vizin, R.C.L., Scarpellini, C. da S., Ishikawa, D.T., Correa, G.M., de Souza, C.O., Gargaglioni, L.H., Carrettiero, D.C., Bicego, K.C., and Almeida, M.C. (2015). TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats. *Acta Physiol.* 214, 275–289.
- Voets, T., Owsianik, G., Janssens, A., Talavera, K., and Nilius, B. (2007). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat. Chem. Biol.* 3, 174–182.
- Voinescu, P.E., Kay, J.N., and Sanes, J.R. (2009). Birthdays of retinal amacrine cell subtypes are systematically related to their molecular identity and soma position. *J. Comp. Neurol.* 517, 737–750.
- Voronova, I.P., Tuzhikova, A.A., and Kozyreva, T. V. (2013). Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the rat brain structures: Effect of adaptation to cold. *J. Therm. Biol.* 38, 300–304.
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., et al. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70, 482–494.
- Wang, H., and Siemens, J. (2015). TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temperature* 2, 178–187.
- Wang, X.-P., Yu, X., Yan, X.-J., Lei, F., Chai, Y.-S., Jiang, J.-F., Yuan, Z.-Y., Xing, D.-M., and Du, L.-J. (2017). TRPM8 in the negative regulation of TNF α expression during cold stress. *Sci. Rep.* 7, 45155.
- Wasner, G., Schattschneider, J., Binder, A., and Baron, R. (2004). Topical menthol a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. *Brain* 127, 1159–1171.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G., and Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 47044–47051.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gan, A., Levine, M., and R. Losick (2006). *Molecular Biology of the Gene* (Editorial Médica Panamericana).
- Wells, D.J. (2010). Genetically modified animals and pharmacological research. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 213–226.

- Weyer, A., and Lehto, S. (2017). Development of TRPM8 Antagonists to Treat Chronic Pain and Migraine. *Pharmaceuticals* 10, 37.
- Wijesinghe, R., Protti, D.A., and Camp, A.J. (2015). Vestibular Interactions in the Thalamus. *Front. Neural Circuits* 9, 1–8.
- Willis, D.N., Liu, B., Ha, M.A., Jordt, S.-E., and Morris, J.B. (2011). Menthol attenuates respiratory irritation responses to multiple cigarette smoke irritants. *FASEB J.* 25, 4434–4444.
- Winchester, W.J., Gore, K., Glatt, S., Petit, W., Gardiner, J.C., Conlon, K., Postlethwaite, M., Saintot, P.-P., Roberts, S., Gosset, J.R., et al. (2014). Inhibition of TRPM8 channels reduces pain in the cold pressor test in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 351, 259–269.
- Winter, Z., Gruschwitz, P., Eger, S., Touska, F., and Zimmermann, K. (2017). Cold temperature encoding by cutaneous TRPA1 and TRPM8-carrying fibers in the mouse. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 209.
- Wrigley, P.J., Jeong, H.-J., and Vaughan, C.W. (2009). Primary afferents with TRPM8 and TRPA1 profiles target distinct subpopulations of rat superficial dorsal horn neurones. *Br. J. Pharmacol.* 157, 371–380.
- Wu, L.-J., Sweet, T.-B., and Clapham, D.E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62, 381–404.
- Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W., and Gu, J.G. (2007). TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *J. Neurosci.* 27, 13680–13690.
- Xing, H., Ling, J.X., Chen, M., Johnson, R.D., Tominaga, M., Wang, C.-Y., and Gu, J. (2008). TRPM8 mechanism of autonomic nerve response to cold in respiratory airway. *Mol. Pain* 4, 22.
- Xiong, S., Wang, B., Lin, S., Zhang, H., Li, Y., Wei, X., Cui, Y., Wei, X., Lu, Z., Gao, P., et al. (2017). Activation of transient receptor potential melastatin subtype 8 attenuates cold-induced hypertension through ameliorating vascular mitochondrial dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* 6, 1–18.
- Yadav, R., Jaryal, A.K., and Mallick, H.N. (2017). Participation of preoptic area TRPV4 ion channel in regulation of body temperature. *J. Therm. Biol.* 66, 81–86.
- Yahiro, T., Kataoka, N., Nakamura, Y., and Nakamura, K. (2017). The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation. *Sci. Rep.* 7, 5031.
- Yajima, T., Sato, T., Hosokawa, H., Kondo, T., Saito, M., Shimauchi, H., and Ichikawa, H. (2015). Distribution of transient receptor potential melastatin-8-containing nerve fibers in rat oral and craniofacial structures. *Ann. Anat.* 201, 1–5.
- Yamada, T., Alpers, D.H., Kalloo, A.N., Kaplowitz, N., Owyang, C., and Powell, D.W. (2008). *Textbook of Gastroenterology* (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.).
- Yang, X.-R., Lin, M.-J., McIntosh, L.S., and Sham, J.S.K. (2006). Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, L1267–76.



- Yang, Z., Wang, X., Zhu, G., Zhou, Z., Wang, Y., Chen, D., and Meng, Z. (2012). Effect of surgical castration on expression of TRPM8 in urogenital tract of male rats. *Mol. Biol. Rep.* 39, 4797–4802.
- Yarmolinsky, D.A., Peng, Y., Pogorzala, L.A., Rutlin, M., Hoon, M.A., and Zuker, C.S. (2016). Coding and plasticity in the mammalian thermosensory system. *Neuron* 92, 1079–1092.
- Yazawa, T., Nakayama, Y., Fujimoto, K., Matsuda, Y., Abe, K., Kitano, T., Abé, S.-I., and Yamamoto, T. (2003). Abnormal spermatogenesis at low temperatures in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*: possible biological significance of the cessation of spermatocytogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 60–66.
- Yin, Y., Wu, M., Zubcevic, L., Borschel, W.F., Lander, G.C., and Lee, S.-Y. (2018). Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science* (80-.). 359, 237–241.
- Yin, Y., Le, S.C., Hsu, A.L., Borgnia, M.J., Yang, H., and Lee, S.-Y. (2019). Structural basis of cooling agent and lipid sensing by the cold-activated TRPM8 channel. *Science* (80-.). 363, eaav9334.
- Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I., and Nakanishi, S. (2001). A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. *Neuron* 30, 771–780.
- Young, W.S. (1989). In situ hybridization histochemical detection of neuropeptide mRNA using DNA and RNA probes. In *Methods*, pp. 702–710.
- Yu, W., Hill, W.G., Apodaca, G., and Zeidel, M.L. (2011). Expression and distribution of transient receptor potential (TRP) channels in bladder epithelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 300, F49-59.
- Yu, X., Hu, Y., and Yu, S. (2014). Effects of acid on vagal nociceptive afferent subtypes in guinea pig esophagus. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G471-8.
- Yu, X., Hu, Y., Ru, F., Kollarik, M., Undem, B.J., and Yu, S. (2015). TRPM8 function and expression in vagal sensory neurons and afferent nerves innervating guinea pig esophagus. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 308, G489-96.
- Yu, X., Yu, M., Liu, Y., and Yu, S. (2016). TRP channel functions in the gastrointestinal tract. *Semin. Immunopathol.* 38, 385–396.
- Zaelzer, C., Hua, P., Prager-Khoutorsky, M., Ciura, S., Voisin, D.L., Liedtke, W., and Bourque, C.W. (2015). δ N-TRPV1: A Molecular Co-detector of Body Temperature and Osmotic Stress. *Cell Rep.* 13, 23–30.
- Zandt, B.-J., Liu, J.H., Veruki, M.L., and Hartveit, E. (2017). All amacrine cells: quantitative reconstruction and morphometric analysis of electrophysiologically identified cells in live rat retinal slices imaged with multi-photon excitation microscopy. *Brain Struct. Funct.* 222, 151–182.
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., et al. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174, 999-1014.e22.
- Zhang, L., Jones, S., Brody, K., Costa, M., and Brookes, S.J.H. (2004). Thermosensitive transient receptor potential channels in vagal afferent neurons of the mouse. *Am. J. Physiol.*

- Gastrointest. Liver Physiol. 286, G983-91.
- Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.-M., Sablitzky, F., Littlewood, T.D., and Reth, M. (1996). Inducible Site-Directed Recombination in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nucleic Acids Res.* 24, 543–548.
- Zhao, C., Eisinger, B., and Gammie, S.C. (2013). Characterization of GABAergic neurons in the mouse lateral septum: a double fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical study using tyramide signal amplification. *PLoS One* 8, e73750.
- Zhao, H., Sprunger, L.K., and Simasko, S.M. (2010). Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G212-21.
- Zhou, Z.J. (1998). Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina. *J. Neurosci.* 18, 4155–4165.
- Zimmerman, C.A., Lin, Y.-C., Leib, D.E., Guo, L., Huey, E.L., Daly, G.E., Chen, Y., and Knight, Z.A. (2016). Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking. *Nature* 537, 680–684.
- Zimmerman, C.A., Leib, D.E., and Knight, Z.A. (2017). Neural circuits underlying thirst and fluid homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 459–469.
- Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., and Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18114–18119.
- Zurborg, S., Yurgionas, B., Jira, J.A., Caspani, O., and Heppenstall, P.A. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat. Neurosci.* 10, 277–279.

8. Anexo: Publicación.



Expression of the cold thermoreceptor TRPM8 in rodent brain thermoregulatory circuits

Purificación Ordás¹, Pablo Hernández-Ortego¹, Hugo Vara¹, Carlos Fernández-Peña¹, Alfonso Reimúndez², Cruz Morenilla-Palao¹, Ana Guadaño-Ferraz³, Ana Gomis¹, Mark Hoon⁴, Félix Viana¹ and Rosa Señarís².

1. Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, San Juan de Alicante, Spain.
2. Departamento de Fisiología, CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.
3. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Universidad Autónoma de Madrid-CSIC, Madrid, Spain.
4. Molecular Genetics Section, National Institute of Dental and Craniofacial Research/NIH, Bethesda, MD, USA.

J Comp Neurol. 2019;1–23.

Received: 5 November 2018/ Revised and accepted: 26 March 2019

DOI: 10.1002/cne.24694

§Corresponding authors: Rosa Señarís. Departamento de Fisiología. CIMUS. Universidad de Santiago de Compostela. 15782. Santiago de Compostela. Spain. Félix Viana. Instituto de Neurociencias de Alicante. UMH-CSIC, 03550. San Juan de Alicante. Spain.

Acknowledgements: The authors are grateful to L. Casas, M. Tora, E. Quintero and A. Miralles for their excellent technical assistance. We thank Emilio Geijo for his help in preliminary slice recordings of septal neurons. The study was supported by the projects SAF2009-11175 and PI12/0058 (RS), SAF2010-14990-R and SAF2016-77233-R (FV, AG), co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), the “Severo Ochoa”. Programme for Centres of Excellence in R&D (SEV-2017-0723) and the IRP of the National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH (MAH). CF-P, PO and PH held predoctoral fellowships of the Generalitat Valenciana and Spanish MINECO (GRISOLIA/2008/025, BES-2011-047063 and BES-2017-080782). The authors declare no competing financial interests.

ABSTRACT

The cold- and menthol-activated ion channel TRPM8 is the principal detector of environmental cold in mammalian sensory nerve endings. Although it is mainly expressed in a subpopulation of peripheral sensory neurons, it has also been identified in non-neuronal tissues. Here we show, by *in situ* hybridization and by the analysis of transgenic reporter expression in two different reporter mouse strains, that TRPM8 is also expressed in the central nervous system. Although it is present at much lower levels than in peripheral sensory neurons, we found cells expressing TRPM8 in restricted areas of the brain, especially in the hypothalamus, septum, thalamic reticular nucleus, certain cortices and other limbic



structures, as well as in some specific nuclei in the brainstem. Interestingly, positive fibers were also found travelling through the major limbic tracts, suggesting a role of TRPM8-expressing central neurons in multiple aspects of thermal regulation, including autonomic and behavioral thermoregulation. Additional *in situ* hybridization experiments in rat brain demonstrated a conserved pattern of expression of this ion channel between rodent species. We confirmed the functional activity of this channel in the mouse brain using electrophysiological patch-clamp recordings of septal neurons. These results open a new window in TRPM8 physiology, guiding further efforts to understand potential roles of this molecular sensor within the brain.

Number of words: 211

Keywords: TRPM8, rodents, hypothalamus, septum, reticular thalamus, limbic system, RRID: AB_2721225, RRID: AB_2079751, RRID: AB_514497, RRID: AB_514500, RRID: AB_477652, RRID: AB_300798, RRID: AB_2631173, RRID: AB_2340375, RRID: AB_10989474, RRID: AB_141359.

INTRODUCTION

Transient receptor potential channel subfamily M member 8 (TRPM8) is a nonselective cation channel of the Transient Receptor Potential (TRP) family that is activated by mild cold temperatures and different cold-mimetic compounds, like menthol and icilin (McKemy, Neuhausser, & Julius, 2002; Peier et al., 2002). TRPM8 is mainly expressed in a subpopulation of primary sensory neurons and their peripheral endings (Dhaka, Earley, Watson, & Patapoutian, 2008; Takashima et al., 2007). Besides the dorsal root (DRG) and trigeminal ganglia (TG), TRPM8 is also expressed in non-neuronal tissues including the prostate, sperm, skin keratinocytes, brown adipose tissue and colonic epithelium (Bidaux et al., 2005; De Blas et al., 2009; Denda, Tsutsumi, & Denda, 2010). Studies using pharmacological agonists and antagonists, as well as experiments with TRPM8-deficient mice, demonstrated a critical role of TRPM8 in thermosensation (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Parra et al., 2010), but also a function in thermoregulation and energy homeostasis (Almeida et al., 2012; Reimundez et al., 2018).

Previous studies reported the expression of TRPM8 in the rodent hypothalamus and in hypothalamic cell lines (Braunig et al., 2018; Kunert-Keil, Bisping, Kruger, & Brinkmeier, 2006;

Mittag et al., 2013; Voronova, Tuzhikova, & Kozyreva, 2013; Wang et al., 2017), but a precise mapping of the distribution of neurons expressing this ion channel in the brain is still lacking. Identifying TRPM8-containing neurons at the central level has been hindered by several technical difficulties, including the very low levels of expression (Kunert-Keil et al., 2006) and the lack of reliable antibodies against mouse TRPM8, which limited the use of antibody-based detection methods. More recently, transgenic TRPM8 reporter mice have been generated, and used to identify and characterize TRPM8-expressing cells and fibers in sensory ganglia, the spinal cord and in the periphery (Dhaka et al., 2008; Morenilla-Palao et al., 2014; Takashima et al., 2007). Nevertheless, although analysis of transgenically-expressed phenotypic markers is a highly effective tool to identify and map specific cell types in the brain, *in situ* hybridization (ISH) techniques are needed to faithfully reflect native gene expression in them (Mishra, Tisel, Orestes, Bhangoo, & Hoon, 2011; Sunkin & Hohmann, 2007).

In the present study, we aimed to characterize the expression and anatomical distribution of TRPM8 channels in the rodent brain. To this end, we employed ISH and GFP immunohistochemistry in two transgenic TRPM8 reporter mouse models: TRPM8-green fluorescent protein (GFP) knock-in mice, *Trpm8^{EGFPf}* (Dhaka et al., 2007) and TRPM8-yellow fluorescent protein (YFP) transgenic mice, *Trpm8^{BAC}-EYFP+* (Morenilla-Palao et al., 2014). We show that TRPM8 is expressed in neurons in certain areas of the brain, although with much lower levels than in peripheral sensory ganglia. Interestingly, cell positive somas are found in relatively restricted regions of the central nervous system (CNS) but their projections are widely distributed within the brain, connecting areas like the hypothalamus, cortical and limbic structures and nuclei in the brainstem. Patch-clamp recordings in *Trpm8^{BAC}-EYFP+* cells revealed the functionality of these ion channels in septal neurons. Finally, we found a similar pattern of expression of TRPM8 mRNA in the rat brain, which indicates a conserved distribution of this ion channel in rodent species. These results should help to dissect the function of this ion channel in the brain.

MATERIAL AND METHODS

Animal models.

We studied the expression of TRPM8 in P15-P20 and adult mice and rats (Sprague-Dawley). We used both males and females interchangeably, since we observed no major



differences in the sites of expression of TRPM8 between sexes. In addition to wild-type C57B6J mice, two different transgenic mouse lines were used: 1) Mice engineered to express the farnesylated enhanced green fluorescent protein (EGFPf) from the TRPM8 locus (*Trpm8*^{EGFPf}; B6;129S1(FVB)-*Trpm8*^{tm1Apat/J}) were obtained from Ardem Patapoutian (Scripps Research Institute). The targeted insertion of EGFPf into the TRPM8 start codon was described previously (Dhaka et al., 2007) and homozygous *Trpm8*^{EGFPf} mice (*Trpm8*^{EGFPf/EGFPf}) are null for TRPM8. As previously described, to enhance EGFPf expression the lox-P-flanked neomycin selection cassette introduced into the *Trpm8* locus during the generation of the transgene (Dhaka et al., 2008) was excised. 2) We also used a BAC transgenic mouse line expressing the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) under the TRPM8 promoter (*Trpm8*^{BAC-EYFP+}), previously generated by our laboratory (Morenilla- Palao et al., 2014).

For analysis of the correspondence between endogenous gene expression and transgene, we performed immunohistochemistry on tissues from *Trpm8*^{EGFPf} mice. We used *Trpm8*^{BAC-EYFP+} mice to validate the results.

All animal procedures were approved by the local Ethics Committee on Animal Care at the University of Santiago de Compostela and the University Miguel Hernández of Elche and were conducted in accordance to European guidelines.

RNA isolation and RT-PCR.

TG and hypothalamus were isolated from adult C57B6J mice and Sprague- Dawley rats (P60-P120). RNA was extracted using TRIzol™ Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA, in the case of the hypothalamus, and 0.5 µg in the case of TG, using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers. Control reactions were performed omitting enzyme. For amplification, conventional PCR was performed using KAPA2G Fast DNA Polymerase (Sigma) with the following specific primers: mouse TRPM8 forward 5'- GGAAGTCCATGATGCATCTCTC-3' and reverse 5'- GGGGATGATGAATAGACACAGG-3' (amplicon 466 pb) and constitutive gene β-actin forward 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3' and reverse 5'- GCCACAGGATTCCATACCCA-3' (amplicon 342 pb). Rat TRPM8 forward 5'- CAAGTTTGTCCGCCTCTCC-3' and reverse ACCGCCAGCTCCAGACAGTT- 3' (amplicon 570 nt). To avoid genomic amplification, amplicons were designed to span introns.

Real time PCR: Total RNA was isolated from mouse TG, hypothalamus and liver using TRIzol (Invitrogen). cDNA was synthesized with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), and reactions of quantitative real-time PCR were done using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Alcobendas, Spain) on iCycler equipment (7500 PCR Systems, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Samples were denatured at 95 °C for 15 s, annealed at 58 °C for 15 s, and extended at 72 °C for 60 s for a total of 35 cycles. The samples were quantified using Sequence Detection Software 1.4 (Applied Biosystems), with HPRT as normalization control.

Specific primers: TRPM8 forward 5'-GTACATCTCTGAGCGCACCA-3' and reverse 5'-CTCCTTGGGCAAAACACACG-3' (amplicon 74 pb). HPRT forward 5'-CAGTCCCAGCGTCGTGATTA-3' and reverse 5'-AGCAAGTCTTTCAGTCCTGTC-5' (amplicon 69 pb). TRPM8 mRNA expression levels in TG and hypothalamus was quantified relative to *Trpm8* levels in liver.

Immunohistochemistry.

For immunohistochemistry neonatal (P15-P20) homozygous *Trpm8*^{EGFPf} mice (*Trpm8*^{EGFPf/EGFPf}), as well as adult (P60-P90) *Trpm8*^{BAC-EYFP+} mice were used. We corroborated the results in adult (P60-P80) *Trpm8*^{EGFPf/EGFPf} mice, studying separately males and females. Mice were perfused with 4 % paraformaldehyde (PFA). Brains were dissected, post-fixed with 4 % PFA overnight at 4 °C and left in phosphate buffer saline (PBS) at 4 °C until processed. Tissues were cut on a vibratome (Leica, VT1000S) and placed in PBS. Free floating coronal sections (60-70 µm) were rinsed in Tween-Tris Buffered Saline (TTBS, 0.5 M Tris Base, 9 % NaCl, 0.5 % Tween 20, pH 7.4) for 10 min (twice) and then incubated in blocking buffer solution (BB, 5 % bovine serum albumin (BSA) in TTBS containing 1 % Triton-X100) for 1 hour at room temperature (RT). Next, BB was replaced by primary antibody solution containing chicken anti-GFP antibody (Abcam, ab13970, RRID: AB_300798) 1:2000 diluted in BB and incubated at 4 °C for 72 hours (in the case of *Trpm8*^{EGFPf} mice) or overnight (O/N) (in *Trpm8*^{BAC-EYFP+} animals). This antibody recognizes both GFP and YFP. Sections were washed four times with TTBS (15 min) and incubated in the secondary antibody solution containing donkey anti-chicken Alexa 488 antibody (Jackson ImmunoResearch 703-545-155, RRID: AB_2340375) 1:800 diluted in BB O/N at 4 °C (in the case of *Trpm8*^{EGFPf} mice) or 2 hours at room temperature (in *Trpm8*^{BAC-EYFP+} mice). Then, sections were washed again four times with TTBS (15 min) and incubated



in Hoechst nuclear staining solution (0.5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen H1399) in PBS pH: 7.4) for 5 min. Finally, the samples were mounted on microscopic slides with Fluoromount™ aqueous medium (Sigma).

For double immunostaining, the same protocol was followed with the addition of the following primary antibodies: rabbit anti-GABA antibody (Sigma A2052, RRID: AB_477652) at 1:200 dilution, rabbit anti-parvalbumin antibody (Swant PV27, RRID: AB_2631173) at 1:1000 dilution, goat anti-ChAT antibody (Merk- Millipore AB144P, RRID: AB_2079751) at 1:250 dilution, rabbit anti-Calbindin D-28k antibody (Swant CB38a, RRID: AB_2721225) at 1:5000 dilution; and the following appropriate secondary antibodies: goat anti-rabbit Alexa 594 antibody (Invitrogen A11012, RRID: AB_141359) at 1:1000 dilution or donkey anti goat CFL555 antibody (Santa Cruz Biotechnology sc-362265, RRID: AB_10989474) at 1:400 dilution. For quantification of colocalization at least 3 independent experiments were performed.

In situ hybridization (ISH)

ISH was performed using digoxigenin (DIG) labelled riboprobes. TG and brains were collected and rapidly frozen in TissueTek (Sakura). ISH was performed on 20 µm thick cryosections, adhered on microscope slides (Polysine™ Microscope Adhesion Slides, Thermo Scientific). We used TG sections from P15 *Trpm8*^{EGFPf} mice and rats as controls of the specificity of the ISH signal. Brain TRPM8 ISH was done on sections from P15 C57B6J mice and Sprague-Dawley rats.

Preparation of the DNA template: We used a pCR®II-TOPO plasmid system (Invitrogen K466001) containing a 3.3 kb fragment of TRPM8 cDNA. We amplified the TRPM8 cDNA by PCR with pUC/M13 primers with Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific #EP0702). The PCR product was run on a 1 % agarose gel, purified with Wizard®SV Gel and PCR clean-up System (A9282 Promega), and dissolved in diethylpyrocarbonate (DEPC) water.

In vitro transcription: We used the Riboprobe Combination System SP6/T7 kit (Promega P1460), adding digoxigenin-11-UTP nucleotides (Roche 11209256910) following the manufacturer instructions to synthesize a riboprobe of coding sequence of *Trpm8*, 3.3 kb. We routinely synthesized antisense and sense transcripts. The sense riboprobe was used as control in all ISH assays performed. To improve cell penetration, the labelled probes were alkali-hydrolyzed to obtain fragments of an average length of 100-250 bases, as described

previously by Schaeren-Wiemers & Gerfin-Moser (1993).

Prehybridization, hybridization and washing: Sections were fixed in freshly prepared 4 % PFA in phosphate buffer (PB, 0.1 M) for 10 min, washed three times in PBS, acetylated for 10 min (0.1 M Triethanolamine (Sigma 33729), 0.25 % acetic anhydride) and washed again three times with PBS for 5 min each. For prehybridization 300 µl of the prehybridization buffer was added to every slide (50% formamide (Sigma F9037), 5X Saline-Sodium Citrate buffer (SSC), 1X Denhardt's (Sigma D2532), 0.1 % Dextran sulfate (Sigma D8906), 250 µg/ml of tRNA (from baker's yeast, Sigma 83853) and 500 µg/ml single stranded DNA from salmon testes (Sigma D7656)). Sections were prehybridized O/N at RT in a humidified box with 5X SSC. For hybridization the prehybridization buffer was discarded and new buffer was added containing the DIG-labeled riboprobe (1:100 dilution). Sections were covered with glass coverslips and incubated in the same humidified chamber at 72 °C, O/N. The following day slices were washed at 72 °C, first 10 min with 5X SSC, and later 1 hour with 0.2X SSC. A last wash was performed with 0.2X SSC at RT during 10 min. All solutions were prepared with DEPC water.

Immunological detection of DIG-labelled hybrids: We used the DIG Nucleic Acid Kit (Roche11175041910) following manufacturer's instructions. Anti-DIG AP antibody (Roche 11093274910, RRID: AB_514497) was used at 1:500 dilution. To detect the DIG signal in TG, we incubated in the color substrate O/N. After 1 hour the signal started to appear. In contrast, to visualize the signal in the hypothalamus, we left the sections in the color substrate for 4-6 days. Samples were dehydrated in an increasing alcohol battery followed by xylol and mounted with DPX mounting medium (Scharlau DP0050).

Fluorescence ISH combined with immunohistochemistry in TG: TG from hemizygous *Trpm8*^{EGFPf} P15 mice (*Trpm8*^{EGFPf/+}) were collected, and rapidly frozen in TissueTek (Sakura). Ganglia were cryo-sectioned at 20 µm and sections adhered on microscope slides (Polysine™ Microscope Adhesion Slides, Thermo Scientific). ISH was performed as described above until the immunological detection step. In this case, after blocking, sections were incubated with chicken anti-GFP antibody (Abcam, ab13970, RRID: AB_300798) at 1:2000, diluted in blocking solution at 4 °C O/N. The following day, the slides were washed four times with wash buffer (WB) for 15 min, incubated with donkey anti-chicken Alexa 488 antibody (Jackson ImmunoResearch 703-545-155, RRID: AB_2340375) at 1:800 dilution and anti- DIG-



POD conjugate antibody (Roche 11207733910, RRID: AB_514500) at 1:500 dilution at RT for 2 hours. After 6 WB washes of 20 min each, we used the Tyramide Signal Amplification kit (PerkinElmer NEL760001KT) for Tetramethylrhodamine (TMR) fluorescence system following the manufacturer instructions. Finally, sections were stained with Hoechst nuclear staining solution (0.5 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen H1399) in PBS, pH: 7.4) for 5 min and mounted with Flouromount aqueousTM (Sigma).

Image acquisition and analysis: ISH sections were photographed on a Leica DM4000B microscope with a MBFCX9000 camera (10X or 20X objectives). Fluorescence ISH and immunofluorescence z-stacks images were collected with an Olympus FV1200 confocal microscope using the appropriate settings for single-, double- or triple-channel fluorescence recordings with 10X dry or 20X and 40X oil immersion objectives.

The open-source imaging software ImageJ, running on the Fiji platform (Schindelin et al., 2012), was used for image processing, to obtain the maximum projections, adjust intensity levels for brightness or contrast, and merging the different channels. To enhance the visibility of the fluorescence images, we adjusted the gamma factor to a value of 0.75. No further manipulation of images was performed.

Antibody Characterization

Anti-Calbindin D-28k (Swant Cat# CB38, RRID: AB_2721225): polyclonal antibody generated in rabbit against recombinant rat calbindin D-28k. It crossreacts with many other species, including the mouse. **Anti-ChAT** (Millipore Cat# AB144P, RRID: AB_2079751): polyclonal antibody obtained from goat and purified by affinity. The choline acetyltransferase enzyme (ChAT) from human placenta was use as immunogen. It cross-reacts with several species, including the mouse. **Anti-DIG-AP** (Roche Cat# 11093274910, RRID: AB_514497): polyclonal antibody produced in sheep using digoxigenin (DIG) molecule as immunogen. It was purified by ion exchange chromatography and the specific IgG fraction was isolated by immunoabsorption. The Fab fragments obtained by papain digestion were conjugated with alkaline phosphatase (AP). **Anti-DIG-POD** (Roche Cat# 11207733910, RRID: AB_514500): polyclonal antibody produced in sheep using digoxigenin (DIG) molecule as immunogen. It was purified by ion exchange chromatography and the specific IgG fraction was isolated by immunoabsorption. The Fab fragments obtained by papain digestion were conjugated with

horseradish peroxidase (POD). **Anti-GABA** (Sigma-Aldrich Cat# A2052, RRID: AB_477652): polyclonal antibody obtained in rabbit against the γ -aminobutyric acid (GABA) conjugated with bovine serum albumin (BSA). The antibody was isolated by immunospecific methods of purification. The antibody shows positive binding with GABA but not with BSA. It cross-reacts with many species, including the mouse. **Anti-GFP** (Abcam Cat# ab13970, RRID: AB_300798): polyclonal antibody (YgG fraction) raised in chicken using as immunogen a recombinant full-length protein corresponding to GFP from *Aequorea Victoria*. **Anti-Parvalbumin** (Swant Cat# PV27, RRID: AB_2631173): polyclonal antibody generated in rabbit against recombinant rat parvalbumin protein. It cross-reacts with many species, including the mouse. **Anti-chicken Alexa 488** (Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 703-545-155, RRID: AB_2340375): Antibody produced in donkey against immunoglobulins from chicken and purified by immunoaffinity chromatography. It is conjugated with the Alexa Fluor[®]488 fluorescent dye which absorb light maximally at 493 nm and fluoresce with a peak around 519 nm. The antibody reacts with whole molecule chicken IgY and also reacts with the light chains of other chicken immunoglobulins. **Anti-goat CFL555** (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-362265, RRID: AB_10989474): Antibody generated in donkey against immunoglobulins from goat and purified by preadsorption in affinity column. It is conjugated with the CruzFluor[™]555 fluorescent dye that absorb light at 559 nm and fluoresce at 569 nm. It recognizes the whole molecule of IgG from goat. **Anti-rabbit Alexa 594** (Molecular Probes Cat# A-11012, RRID: AB_141359): Antibody obtained from goat against immunoglobulins from rabbit and purified by preadsorption in affinity column. It is conjugated with the Alexa Fluor[®]594 fluorescent dye with excitation ideally suited to the 594 nm laser line. It recognizes the whole molecule of IgG from rabbit.

Whole-cell patch-clamp recordings from septal neurons in brain slices

The preparation of brain slices and electrophysiological recordings followed our previously published methods (de la Pena et al., 2012). In brief, *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice were killed by cervical dislocation and their brains were quickly removed from the skull and placed in cold standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF). Transverse slices (400 μ m thick) were cut with a vibratome (Pelco,TPI, series 1000, St. Louis, USA) and placed in a submerged holding chamber for at least 1 hour at RT. The composition of the standard ACSF was (in mM): NaCl



120, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.0, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 26.2, glucose 11, pH 7.4 when equilibrated with carbogen (95 % O₂ – 5 % CO₂). For recordings, individual slices were transferred to a submerged chamber and perfused with oxygenated ACSF at 36-37 °C at a constant rate (2-3 ml/min).

Neurons were visualized through a 40X water immersion objective in an Olympus FV500 upright confocal microscope. To establish the YFP labeling, the field was briefly exposed to 460 nm light with a Polychrome V monochromator (Till Photonics) and the fluorescence emission captured on a cooled CCD camera (sencam, PCO AG, Kelheim, Germany).

Standard patch-pipettes (5–7 MΩ resistance) were pulled out of borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus Ltd, UK). The intracellular solution contained (in mM): 125 K-gluconate, 2 NaCl, 2 MgCl₂, 3 Na₂-ATP, 0.3 Li-GTP, 10 EGTA, 10 HEPES and the pH 7.2, adjusted with KOH. In some experiments, this solution also contained 500 μM menthol, dissolved from a 500 mM stock in DMSO.

Whole-cell recordings were obtained in the current-clamp configuration. The glass microelectrodes were connected to the input stage of a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Data were digitized with an analog-to-digital converter (Digidata 1322; Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Stimulus delivery and data acquisition were performed using pCLAMP software (versions 8–9, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Temperature stimulation: Slices were placed in a microchamber and continuously perfused with solutions warmed at 36–37 °C, from here on referred to as baseline temperature. The temperature of ACSF in the bath was measured by a TA-29 thermistor and adjusted with a water-cooled a CL-100 bipolar temperature controller and a SC-20 dual inline heater/cooler Peltier device (Warner Instruments, Hamden, CT, USA). Cold-sensitivity of the electrical activity was tested during transient temperature drops of the bath solution.

Chemical compounds: L-Menthol was purchased from Scharlau Chemie and 3,4-Dihydro-3-(2-hydroxyphenyl)-6-(3-nitrophenyl)-(1H)-pyrimidin-2-one (icilin) was purchased from Tocris. Both were prepared as concentrated stocks in DMSO, kept frozen in small aliquots and diluted into ACSF before used.

Brain illustrations.

All mouse brain diagrams were adapted and modified from Paxinos's mouse atlas (Paxinos & Franklin, 2001) and Allen mouse brain atlas (Hong Wei Dong and The Allen Institute for Brain Science, 2008); rat brain diagrams were adapted and modified from Paxinos's rat atlas (Paxinos & Watson, 1998).

Statistical analysis.

Data are represented as mean \pm SEM. Statistical significance between two groups or for multiple comparisons was determined by T-test or one-way ANOVA, respectively. A two-tailed Fisher exact test was used in the analysis of contingency tables.

RESULTS

1.- TRPM8 mRNA expression in the brain.

To determine the expression of TRPM8 in the brain we first analyzed by RTPCR the presence of mRNA encoding this ion channel in the mouse and rat hypothalamus (H), comparing the expression levels in this brain area with those observed in TG. Interestingly, *Trpm8* was amplified from both the TG and H from mouse and rat. Notably, the levels of TRPM8 mRNA were much lower in H than in the peripheral sensory ganglia (Fig.1a). The quantitative SYBR Green real time RT-PCR confirmed an approximately 240- fold lower content of TRPM8 mRNA in H relative to that in TG (relative units (RU): 158.3 ± 19.6 vs 37814.8 ± 3428.5 ; unpaired t-test, $p < 0.001$, $n = 3$) (Fig. 1b).

2.- Specificity of the TRPM8 mRNA ISH signal and GFP labelling.

To study the anatomical and cellular distribution of TRPM8 in the rodent brain, we determined the expression pattern of TRPM8 mRNA by ISH. The specificity of the ISH signal was confirmed by performing a series of controls in TG and brain tissue sections from wildtype (WT) and *Trpm8*^{EGFPf} mice, as well as in rats. As shown in Figure 1c, the incubation with the antisense probe revealed a clear positive cell signal in the TG of WT or hemizygous *Trpm8*^{EGFPf/+} mice, or in the rat (Fig. 1d). In contrast, no signal was observed when we used the sense probe in WT animals or an antisense probe in *Trpm8*^{EGFPf/EGFPf} mice (Figs. 1c and 1d).

A combined ISH and GFP immunofluorescence in trigeminal sections from hemizygous *Trpm8*^{EGFPf/+} mice showed that nearly all TG GFP(+) (98.3 %) neurons expressed TRPM8 mRNA



(Figs. 1e and 1f). These findings indicate that EGFP expression in the *Trpm8^{EGFPf}* mouse line can be used as a proxy to map TRPM8 localization.

In addition, controls of the ISH and GFP immunohistochemistry were also performed in brain tissue. As expected, no mRNA signal was detected using a sense probe (Figs. 9b7a and 9b7b). Furthermore, although clearly labelled neurons were observed in *Trpm8^{EGFPf/+}* mice brain sections, no GFP(+) cells were found in the same brain area of WT mice (Fig. 1g).

3.- Anatomical distribution of TRPM8 in the mouse brain

Telencephalon

We found cells expressing TRPM8 mRNA or GFP immunoreactivity in the lateral septal nucleus (LS), especially in the rostral (LSr) and caudal part (LSc) (Fig. 2 and table 1). Some of the positive neurons were placed very near the lateral ventricle (LV) wall, with axons widely spread in the vicinity of the ependymal cell layer (Figs. 2a, 2b1, 2c1 and 2d1). Other labelled cells were located more medially in the LSr, even surrounding the parvalbumin (PV)- and cholinergic (ChAT)-containing cells of the medial septum (MS) (Figs. 2e and 2f). For further molecular characterization, we performed double immunohistochemistry with GFP and GABA antibodies, as GABAergic neurons are the most abundant type in the LS (Zhao, Eisinger & Gammie, 2013). As reported by other authors, we were unable to obtain a good quality GABA immunolabelling and only 13.3 ± 6.4 % of GFP(+) cells in LS exhibited clear GABA immunoreactivity. Nevertheless, previous studies have shown the existence of numerous calbindin D-28k containing cells in the LS, which were demonstrated to be GABAergic (Luttgen, Ogren & Meister, 2005; Risold & Swanson, 1997). Interestingly, GFP-immunoreactive cells placed medially in the LSr showed no co-localization with calbindin D-28k (Calb), while 68.6 ± 7 % of GFP(+) cells located laterally in this nucleus co-expressed this marker (Fig. 2g). Furthermore, 13.6 ± 1.5 % of Calb(+) cells in the lateral LSr exhibited GFP immunoreactivity. Altogether, these results indicate the existence of different groups of TRPM8-containing neurons within the LS.

Neurons expressing TRPM8 mRNA, or GFP, were also found in the anterior part of the lateral preoptic nucleus (LPO) and anterior substantia innominata (SI), bordering the ChAT- and PV- neurons of the medial septum-diagonal band complex (MS-DB) (Fig. 3 and table 1). No positive cells were found in the MSDB itself, but GFP-immunoreactive fibers were observed

travelling along this structure (table1).

In some areas of the telencephalon we identified GFP-immunoreactivity in both reporter mouse lines, but we were unable to detect a clear signal of TRPM8 mRNA by ISH. These areas include structures of the cortex, hippocampus and ventral pallidum. Specifically, we found GFP-labelled somas in the olfactory system: anterior olfactory nucleus, lateral and dorsal (AOL and AOD), piriform cortex (Pir), ventral and dorsal taenia tecta (VTT and DTT), as well as in the entorhinal cortex (ENT) (Figs. 4a, 4b1-b4, 4b8 and table 1). GFP(+) cells were also observed in the dorsal endopiriform nucleus (DEn) and ventral pallidum (VP) (Figs. 4a, 4b5, 4b6 and table 1). In the hippocampus, GFP immunoreactive fibers and scattered somas were found especially in the pyramidal layer of ventral and dorsal subiculum (Sub), ventral CA1 and the caudal part of dorsal CA1. (Figs. 4a, 4b9 and table 1).

In the amygdala we found many fibers with GFP immunoreactivity, especially in the lateral (LA), basolateral (BLA) and central (CEA) amygdalar nuclei (Fig. 7e and table 1).

Similarly, in the retrosplenial (RSP) and cingulate (Cg) cortices, we found immunoreactive fibers in the *Trpm8^{EGFPf}* mouse line (Fig. 7j), although in *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice spared positive cells were also observed in these locations (table 1). On the other hand, scattered labelled-neurons were identified in the prefrontal cortex, mainly orbital (ORB) and prelimbic areas (PrL) in both reporter mouse lines (table 1).

Diencephalon

In the hypothalamus, positive cells were mainly located in the preoptic area. Surrounding the rostral part of the third ventricle (3V) we observed GFPimmunoreactive cells in the lateral part of the ventromedial preoptic nucleus (VMPO) (Figs. 4a and 4b7), although we were unable to detect mRNA in this region. More caudally, TRPM8 mRNA and GFP immunoreactivity was observed in neurons in the medial preoptic area (MPO), ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) and LPO, with many positive neurons reaching the SI (Figs. 5a-5d). Positive cells surrounded ChAT(+) neurons of the nucleus of the diagonal band (NDB) (Fig. 5e), and PV-containing neurons of the magnocellular preoptic nucleus (MCPO) (Fig. 5f). We did not find colocalization of GFP with PV or ChAT in any area of the preoptic hypothalamus or SI. Positive cells were also uncovered in the anterior part of the arcuate nucleus (ARC) and in the lateral hypothalamic area (LHA); nevertheless, we did not detect a clear signal of TRPM8



mRNA in these locations (table 1). Of note, although most of the positive cell somas in the hypothalamus were found in the preoptic region, we observed GFP-immunoreactive nerve fibers widely distributed in other hypothalamic nuclei: surrounding and within the median preoptic nucleus (MnPO), surrounding the supraoptic (SO) and paraventricular (PVH) nuclei, in the retrochiasmatic area (Rch), dorsomedial nucleus (DMH), tuberal nucleus (Tu), supramammillary nucleus (SuM) and zona incerta (ZI) (table 1 and Figs. 7a-7d).

In the thalamus, neurons containing TRPM8 mRNA or exhibiting GFP immunoreactivity were found in the reticular thalamic nucleus (RT) (Figs. 6a-6d and table 1), a nucleus composed by GABAergic inhibitory neurons coexpressing principally PV or somatostatin (SOM) (Clemente-Perez et al., 2017). Indeed, this is the brain area with the highest levels of TRPM8 mRNA. Despite the poor labelling with the GABA antibody, we found that 58.5 ± 10.3 % of GFP(+) cells in the RT head presented GABA immunoreactivity and 95.5 ± 2.4 % were PV(+) (Figs. 6e and 6f). On the other hand, we estimated that only 11.7 ± 2.4 % of PV(+) cells were GFP(+). This indicates that TRPM8(+) cells represent a small subpopulation of PV-containing cells in the RT.

In the rest of the thalamus many GFP(+) fibers were observed in several nuclei including the mediodorsal (MD), laterodorsal (LD), centrolateral (CL), nucleus reuniens (RE), posterior complex (PO), as well as in the dorsal, intergeniculate leaflet and ventral lateral geniculate nuclei (LGd, IGL and LGv) (table 1). In MD and CL spared positive somas were also detected. TRPM8 mRNA containing cells were found in the anterodorsal nucleus (AD) (table 1). Surprisingly, we were unable to detect clear GFP-labelled somas in this location and only positive axons were observed (table 1).

Abundant GFP-fibers were also found in the lateral habenula (HbL) (Fig. 7f and table 1).

Midbrain and Hindbrain.

GFP(+) fibers were detected in several areas of the mid- and hindbrain, including the substantia nigra (SN) (principally the pars compacta), the superior colliculus (SC), the rostral linear nucleus of the raphe (LR) (where sparse labelled somas were also distinguished), the dorsal raphe (DR) and in the caudal lateral and ventrolateral periaqueductal gray (LPAG and VLPAG) (table 1 and Fig. 7g). As expected, the presence of TRPM8 was very evident in the trigeminal system, with a thick bundle of positive fibers travelling along the spinal trigeminal

tract (Spt5) and GFP immunoreactive fibers present in the spinal trigeminal nucleus (SP5) (Fig. 7h and tables 1 and 2).

Cerebellum.

We did not encounter TRPM8 mRNA in the cerebellum. Similarly, we did not observe any GFP immunoreactivity in *Trpm8^{EGFPf}* mice cerebellar tissue. Nevertheless, we found GFP labelling in the basket cells of *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice (table 1).

Limbic tracts.

Because numerous GFP(+) fibers were observed in many areas of limbic structures, we searched for labelled axons in the major limbic tracts. We observed GFP immunoreactivity in fibers travelling along the stria terminalis (ST), stria medularis (sm), fornix (f), anterior commissure (ac), fimbria (fi) and cingulum (cg) (Figs. 7i-7l and table 2). These nervous tracts are known to intercommunicate limbic areas including the amygdala, septum, hippocampus, thalamic nuclei, retrosplenial, cingulate, entorhinal and olfactory cortices. This finding implicates some of the TRPM8-containing neurons in distant neural circuits within the limbic system.

Comparable sites of expression of TRPM8 in adult male and female mice.

The pattern of expression shown above in P15-P20 *Trpm8^{EGFPf}* mice was corroborated in adult animals (P60-P80) of this mouse line. In Fig. 8 we show TRPM8(+) neurons in representative brain areas in both sexes: septum (a), RT (b) and preoptic hypothalamus (c). A similar distribution of labelled cells was found in males versus females.

4.- TRPM8 expression pattern in the rat brain

The pattern of TRPM8 mRNA expression in the rat brain was very similar to the anatomical locations mentioned above for the mouse (Fig. 9 and table 1). Interestingly, in the rat we did detect TRPM8 mRNA in areas of the cortex, and in other telencephalic locations where GFP(+) cells were found in the mouse, but not TRPM8 mRNA (e.g. dorsal endopiriform nucleus (DEn), ventral pallidum (VP), cingulate cortex (Cg), prelimbic cortex (PrL)). Furthermore, cells with TRPM8 mRNA were also observed in the primary (M1) and secondary motor (M2) area and in the primary somatosensory cortex (S1). Of note, we also detected spared GFP-labelled cells in these latter cortical areas in *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice, although no



clear signal was visible in *Trpm8*^{EGFPf} animals (table 1).

5.- Functional expression of TRPM8 channels in the brain.

To evaluate the activity of TRPM8 channels in central neurons, we performed whole-cell recordings from brain slices in *Trpm8*^{BAC-EYFP+} mice, because their levels of endogenous fluorescence are much higher than in *Trpm8*^{EGFPf} animals. We focused on septal neurons because they showed a good labelling in both transgenic mouse lines and also a clear signal of TRPM8 mRNA.

After establishing the whole-cell current-clamp configuration, we examined the responses of visually identified YFP(+) neurons to extracellular solution cooling and to the application of TRPM8 agonists. Figure 10a shows the identification of a YFP(+) neuron in the septum and its response to a cooling ramp, characterized by a modest and reversible depolarization of its resting membrane potential. On average, YFP(+) neurons in the septum depolarized 10.4 ± 1.7 mV ($n = 9$) during cooling to 20 °C. Only 2 out of these 9 cells fired action potentials during the cooling ramp. To examine the function of TRPM8 in these neurons, we applied a second cooling ramp in the presence of chemical agonists of TRPM8 (menthol or icilin). As shown in Figure 10a, menthol (500 μ M) failed to potentiate the response to a cooling stimulus in the YFP(+) neuron. Similar results were obtained with application of icilin (20 μ M), a very potent TRPM8 agonist, to the bath. A summary of these results is shown in Figure 10b. The recent crystal structure revealed that the menthol binding site in TRPM8 is located intracellularly (Yin et al., 2018). We reasoned that menthol may have a limited access to this binding site when applied extracellularly to the slice. Thus, we decided to test the effects of intracellular application of menthol (500 μ M) through the patch-pipette. As shown in Figure 10c, cooling YFP(+) septal neurons in this configuration produced a marked increase in their excitability. In this case, 10 out of 14 cells fired action potentials during the cooling ramp, with an average of 24.5 ± 7.5 action potentials fired during the cooling period. In contrast, only 2 out of 12 neighboring septal YFP(-) neurons (Fig. 10d) fired action potentials, a significant lower fraction ($P = 0.0084$, two-tailed Fisher test). Furthermore, YFP(-) neurons displayed a much more reduced firing during cooling ramps, with an average of 0.16 ± 0.11 action potentials ($p < 0.01$, unpaired Student t-test) (Fig. 10e).

Collectively, these results suggest that the expression of functional TRPM8 channels in

septal neurons is low and firing of the neurons requires the combined application of thermal and chemical stimuli upon TRPM8.

DISCUSSION

Although the expression of TRPM8 channels in sensory ganglia and in certain peripheral organs has been described in detailed (reviewed by Almaraz, Manenschijn, de la Pena, & Viana, 2014; McCoy, Knowlton, & McKemy, 2011; Señaris, Ordas, Reimundez, & Viana, 2018), the putative anatomical distribution of this thermosensitive ion channel in the CNS has been poorly characterized. The lack of reliable TRPM8 antibodies in mice, together with the very low levels of the mRNA encoding this ion channel in the brain (Kunert-Keil et al., 2006) has hampered the identification and mapping of TRPM8-expressing central neurons.

In the present study, we demonstrate, using a combination of histological and molecular techniques, the expression of TRPM8 channels in the mouse and rat brain and show their distribution at the cellular level. Furthermore, patch-clamp recordings in TRPM8-expressing septal neurons revealed their functional response to thermal and chemical agonists, suggesting a role of this ion channel in central circuits. We found very low levels of TRPM8 expression in brain neurons of both mice and rats. Positive cells were located in restricted areas of the brain but exhibited abundant connections with numerous regions of the CNS. Our findings suggest a potential role for TRPM8-containing central neurons in autonomic and behavioral thermoregulation in rodents, as well as in other non-thermal homeostatic functions.

Similar to our results, previous studies have suggested very low levels of expression of TRPM8, as well as other thermoTRPs in the CNS. Only TRPM3 showed slightly higher levels (Kunert-Keil et al., 2006; Voronova et al., 2013). Furthermore, in cases like TRPV1, different authors report variable expression sites in the brain, with some studies illustrating a rather extensive pattern of expression (Cristino et al., 2006; Mezey et al., 2000; Roberts, Davis, & Benham, 2004), while others revealing a very restrictive presence (Cavanaugh, Chesler, Jackson, et al., 2011; Mishra et al., 2011). These apparent discrepancies may reflect the technical difficulties involved in detecting very low levels of transcripts and proteins, differences in the specificity and sensitivity of the techniques employed, as well as factors like the age or strain of the experimental animals (Cavanaugh, Chesler, Braz, et al., 2011; Kunert-



Keil et al., 2006; Mezey et al., 2000; Tominaga et al., 1998). All these considerations emphasize the importance of definitively resolving the distribution of these ion channels in the brain that will lead to a better understanding of the real impact of thermoTRPs in brain function, a subject still elusive at present. Recent data on the role of TRPM2 as a physiologically relevant heat sensor in the preoptic hypothalamus (Song et al., 2016) represents an important breakthrough point in the field.

ISH conditions and reporter mouse lines.

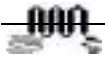
Because the levels of TRPM8 mRNA in the CNS were very low, as revealed by standard and SYBR Green RT-PCR, we had to optimize the ISH conditions to be able to detect such reduced content of mRNA. First, we used a very long riboprobe (3.3 kb) labelled with digoxigenin. Despite repeated efforts, we were not able to observe positive signals in the brain with shorter riboprobes or cocktails of oligonucleotide probes. In contrast, short riboprobes were perfectly valid to reveal the TRPM8 mRNA in TG (data not shown). Second, we did not dehydrate tissue sections in ethanol prior to the hybridization procedure. Dehydration in an ascending series of ethanol is widely used in most hybridization protocols and permits convenient long-term storage. It is also almost mandatory in ISH with ³⁵S-labelled probes for delipidation, due to the non-specific sticking of the sulphur to lipids (Young, 1989). However, for detection with DIG-labelled hybrids, the ethanol treatment has negative effects, as it has been previously shown by Schaeren-Wiemers & Gerfin-Moser (1993). Third, we performed hybridization at very high stringency to prevent nonspecific binding (incubation at 72 °C O/N, and washes at 72 °C 0.2X SSC, 60 min). Fourth, the color reaction with NBT and BCIP was maintained for 4-6 days. Nevertheless, even after such long incubation times, we did not observe staining of cells with the sense probe (see Fig. 8b7b), indicating that the signals obtained are specific for TRPM8. Similar stringent hybridization conditions were used before for TRPM8 mRNA detection in DRG by Pogorzala et al. (Pogorzala, Mishra, & Hoon, 2013) and are based on the original protocol described by Schaeren-Wiemers & Gerfin-Moser (1993).

Our TRPM8 ISH results were complemented with GFP immunohistochemistry in two TRPM8 transgenic mouse lines. *Trpm8*^{EGFPf} mice were engineered to express the farnesylated enhanced green fluorescent protein (EGFPf) from the TRPM8 locus, therefore targeting the axonal tracer EGFPf to TRPM8- expressing neurons (Dhaka et al., 2008). This allowed the

detection of many labelled fibers. Functional characterization of this mouse line has been shown previously. Thus, although GFP(+) cultured DRG neurons from hemizygous mice (*Trpm8^{EGFPf/+}*) responded to cold and menthol, GFP(+) DRGs from homozygous mice (*Trpm8^{EGFPf/EGFPf}*) had drastically reduced responses to these stimuli (Arcas et al., 2018; Dhaka et al., 2008). To obtain a good GFP signal from *Trpm8^{EGFPf}* mouse brains, we incubated the tissue sections with an anti- GFP primary antibody for 72 hours at 4 °C.

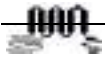
In *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice, EYFP was inserted under the control of the TRPM8 promoter (Morenilla-Palao et al., 2014) and the signal was mainly found in the cell soma. This mouse line has been used previously to characterize TRPM8- expressing sensory cell fibers in peripheral tissues, like the cornea (Alcalde et al., 2018; Parra et al., 2010) or the mouse tail vessels (Reimundez et al., 2018), as well as to study the physiology of peripheral cold thermoreceptor neurons (Morenilla-Palao et al., 2014). Positive cells showed a very good correspondence between fluorescence labeling and functional responses to TRPM8 agonists (i.e. cold or menthol) (Alcalde et al., 2018; Arcas et al., 2018; Morenilla-Palao et al., 2014). In the case of *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice, only 24 hours of incubation with the antiGFP-primary antibody were required to detect the labeled neurons in the CNS.

In most brain areas, we found a similar distribution of TRPM8 mRNA containing neurons in C57B6J mice and GFP(+) cells in *Trpm8^{EGFPf}* animals, indicating an accurate correlate of TRPM8 expression. In only a few locations did we find GFP(+) cells but not TRPM8 mRNA. This probably indicates that we have been working near the lower limit of detection of the hybridization technique. Importantly, all the brain areas showing GFP immunoreactivity in the *Trpm8^{EGFPf}* animals were also stained for GFP in *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice. Nevertheless, the labeling in *Trpm8^{BAC}-EYFP+* was more intense and a bit more widespread than in *Trpm8^{EGFPf}* animals. One important factor to take into consideration is that the farnesylated form of EGFP in *Trpm8^{EGFPf}* mice favors the visualization of labelled fibers, as we discussed previously, but it might hinder the detection of positive somas, which, in contrast, are clearly detected in *Trpm8^{BAC}-EYFP+* mice. Expression pattern of TRPM8 in the brain. We found neurons expressing TRPM8 in restricted areas of the brain, especially in the preoptic hypothalamus, septum, thalamus and some limbic structures. In contrast to this relatively limited distribution of positive cell bodies, GFPimmunoreactive fibers showed a more widely spread pattern within



the brain and brainstem, some of them travelling through the major limbic tracts. This indicates the participation of TRPM8-containing neurons in local and long-range neural circuits. All these findings agree, complement and enlarge the information obtained in a very recent large-scale single cell RNASeq expression atlas of the mouse nervous system (Zeisel et al., 2018) that showed detectable levels of TRPM8 mRNA in very few areas of the brain, including the septum, hippocamptoseptal projection, thalamic nuclei, midbrain, cerebellum and hindbrain (<http://mousebrain.org/genesearch.html>). Similarly, a previous publication in the rat also found low levels of expression of TRPM8 in the rat hypothalamus, frontal cortex, hippocampus and midbrain by quantitative RTPCR (Voronova et al., 2013). We identified neurons expressing TRPM8 in the hypothalamus, principally in the preoptic region, including areas surrounding the VOLT, in the MPO, and LPO, but also in the LHA. Furthermore, immunoreactive fibers were found very widely spread in the hypothalamus. Many of the hypothalamic TRPM8(+) neurons were located in areas that contain cold thermosensitive cells (see Boulant & Dean, 1986 for review) or surround locations where warmth-activated neurons have been described, as it is the case of the VMPO (Tan et al., 2016). Furthermore, abundant GFP-immunoreactive axons were observed in hypothalamic nuclei with autonomic thermoregulatory functions, like MnPO or DMH and in brainstem structures known to regulate thermal autonomic outputs like DR or LPAG. All these findings suggest a putative role for TRPM8-containing cells in the autonomic responses of thermoregulation. Noteworthy, TRPM8 is also expressed in neurons of hypothalamic nuclei involved in non-thermal homeostatic functions, like the VLPO, mainly involved in sleep regulation (Chou et al., 2002; Lu, Greco, Shiromani, & Saper, 2000) or the ARC, with functions in feeding. Similarly, numerous positive fibers surrounded the SO or PVH nuclei, key in hydroelectrolytic balance. Whether this indicates the participation of TRPM8 in the integration of temperature detection and thermoregulation with other physiological processes, like osmoregulation, drinking, energy homeostasis or sleep-wake cycle and arousal merits further investigation. In addition, we found neurons expressing TRPM8 in the LS, mainly in the LSr and LSc. We have studied these positive neurons in detail because classical studies already demonstrated that the septum contains cold thermosensitive neurons and is also implicated in physiological and behavioral thermoregulatory responses (Boulant & Demieville, 1977; Cunningham, Stolwijk,

Murakami, & Hardy, 1967; Eisenman, 1969; Eisenman & Jackson, 1967). Furthermore, c-fos expression in response to cold stimuli has been previously reported in septal neurons (Miyata et al., 1995). Although TRPM8 expressing cells in the LS are not a homogeneous population, most of the GFP(+) neurons in the lateral LSr (~70 %) were calbindin D-28k positive. Calb(+) cells in this nucleus are GABAergic somatospiny cells (Celio, 1990; Jakab & Leranath, 1990), which receive their main input from hippocampal neurons (Jakab & Leranath, 1990) and project principally to the hypothalamus, amygdala and to some extent to the MS-DB (Luttgen et al., 2005; Risold & Swanson, 1997). Our data, showing GFP-immunoreactive neurons in caudal CA1 and Sub, together with the fact that the septal area is considered to act as a relay station for sensory and arousal signals passing from the midbrain reticular formation to the hippocampus (Boulant & Demieville, 1977) makes plausible a function of TRPM8 in the hippocamoseptal pathways, participating in the interlink between thermoregulation and arousal. Of note, we also found somas and fibers of TRPM8-containing neurons in many limbic structures, including the amygdala, anterior thalamic nuclei, olfactory areas, cingulate, retrosplenial and entorhinal cortices and hippocampus. Furthermore, TRPM8(+) fibers were found travelling along the major limbic tracts, suggesting that neurons containing this ion channel are part of limbic neural circuits. This is an interesting finding, indicating that TRPM8 neurons may also be involved in the affective component of the thermal sensory experience, including the behavioral adjustments necessary for satisfactory thermoregulation and thermal comfort. Moreover, the existence of GFP(+) cells in the prefrontal cortex (especially ORB and PrL areas) may suggest a function of TRPM8 neurons in regulating the planning of thermal behavioral responses and motivated behaviors (Farrell, 2016). Finally, in addition to the very prominent signal observed in the trigeminal system, especially the labelled fibers of the Spt5, it is important to highlight the relatively high expression levels of TRPM8 in the RT. This lateral encapsulating nucleus of the thalamus contains almost exclusively GABAergic inhibitory interneurons and is the main source of inhibition for the excitatory relay thalamus in rodents, modulating its interactions with the cerebral cortex (Clemente-Perez et al., 2017; Halassa & Acsady, 2016). Our data indicate that most TRPM8 neurons in the RT (more than 95 %) also co-express PV. Because PV cells in this nucleus are principally included in sensory circuits and modulate preferentially somatosensory inputs (Clemente-Perez et al., 2017), the



subpopulation of PV cells also expressing TRPM8 might be involved in thermal somatosensory processing. Functional characteristics of TRPM8 channels in central neurons It is premature to assign a specific functional role for TRPM8 channels in central neurons. On one hand, their levels of expression are much lower than in peripheral sensory ganglia, raising questions about their function as central thermosensors. On the other hand, the inherent thermosensitivity of central cold-sensitive neurons is still controversial. Our data show that, although septal neurons express TRPM8 ion channels, either cooling alone, or the addition of a TRPM8 agonist, was not enough to fully activate these neurons. Nevertheless, when cooling was associated with the presence of an agonist like menthol in the patch-pipette solution, TRPM8(+) septal neurons increased firing significantly; this activation did not occur in TRPM8(-) neighboring cells. Because TRPM8 channels are polymodal receptors, also responding to chemical and biochemical cues, it is possible that yet unknown factors could modulate their expression levels or even their thermal sensitivity in vivo. In this regard, a recent report described the upregulation of TRPM8 expression in the mouse hypothalamus after the exposure of mice to cold temperatures (Wang et al., 2017). Another possibility, based on genomic structure, is that TRPM8 may be expressed in several alternative spliced forms. Indeed, TRPM8 isoforms have been described in certain cell types, like prostate cancer cells (Bidaux et al., 2012), in which the interaction of the short isoforms with the C-terminal region of the full-length channel stabilizes its closed state. Therefore, alternative spliced variants can clearly contribute to the regulation of TRPM8 channel function. More investigations are required to establish the presence of spliced TRPM8 isoforms in the brain. Moreover, the expression of particular groups of ion channels or the action of specific TRPM8 modulators in these central neurons might confer distinct characteristics of gating and physiology to central TRPM8 ion channels. In the case of TRPV1, a number of endogenous lipids are known to act as potent agonists of the channel (Van Der Stelt & Di Marzo, 2004; Zygmunt et al., 2013), supporting their functional relevance in brain circuits, independently of their thermal sensitivity. The putative action of lipids, or other endogenous agonists, like androgens (Asuthkar et al., 2015), on TRPM8(+) central neurons described here will certainly merit more investigation. Summary and perspective In summary, we describe the presence of TRPM8-expressing neurons in the rodent brain. In the hypothalamus, the labelled cells were mainly located in the preoptic

area, in nuclei related to autonomic thermoregulation and other nonthermal homeostatic functions. Many positive fibers innervate other hypothalamic and brain stem nuclei involved in body-temperature control. This probably reflects a role of these neurons in thermosensitive mechanisms associated with autonomic thermoregulation. Interestingly, labelled somas and/or fibers were also found in limbic structures and prefrontal cortices, which may indicate a role of these neurons in motivated, emotional, behavioral and social processes involved in temperature control (see Figure 11). The functionality of the receptor was confirmed in TRPM8(+) neurons of the septal area, requiring combined thermal and intracellular chemical stimulation. The recent description of a *Trpm8*-Cre transgenic mouse line (Yarmolinsky et al., 2016), combined with our cellular mapping of TRPM8 distribution, will allow the selective manipulation of these populations for further probing of their physiological functions.

References:

- Alcalde I, Inigo-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*.
- Almaraz L, Manenschijn JA, de la Pena E, Viana F. 2014. *Trpm8*. *Handb Exp Pharmacol* 222:547-579.
- Almeida MC, Hew-Butler T, Soriano RN, Rao S, Wang W, Wang J, Tamayo N, Oliveira DL, Nucci TB, Aryal P, Garami A, Bautista D, Gavva NR, Romanovsky AA. 2012. Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(6):2086-2099.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. 2007. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448(7150):204-208.
- Bidaux G, Beck B, Zholos A, Gordienko D, Lemonnier L, Flourakis M, Roudbaraki M, Borowiec AS, Fernandez J, Delcourt P, Lepage G, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. 2012. Regulation of activity of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel by its short isoforms. *J Biol Chem* 287(5):2948-2962.
- Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crepin A, Delcourt P, Slomianny C, Thebault S, Bonnal JL, Benahmed M, Cabon F, Mauroy B, Prevarskaya N. 2005. Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocrine-related cancer* 12(2):367-382.
- Boulant JA, Dean JB. 1986. Temperature receptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 48:639-654.
- Boulant JA, Demieville HN. 1977. Responses of thermosensitive preoptic and septal neurons to



- hippocampal and brain stem stimulation. *J Neurophysiol* 40(6):1356-1368.
- Braunig J, Mergler S, Jyrch S, Hoefig CS, Rosowski M, Mittag J, Biebermann H, Khajavi N. 2018. 3-Iodothyronamine Activates a Set of Membrane Proteins in Murine Hypothalamic Cell Lines. *Frontiers in endocrinology* 9:523.
- Cavanaugh DJ, Chesler AT, Braz JM, Shah NM, Julius D, Basbaum AI. 2011a. Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(28):10119-10127.
- Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, O'Donnell D, Nicoll RA, Shah NM, Julius D, Basbaum AI. 2011b. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(13):5067-5077.
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35(2):375-475.
- Clemente-Perez A, Makinson SR, Higashikubo B, Brovarney S, Cho FS, Urry A, Holden SS, Wimer M, David C, Fenno LE, Acsady L, Deisseroth K, Paz JT. 2017. Distinct Thalamic Reticular Cell Types Differentially Modulate Normal and Pathological Cortical Rhythms. *Cell Rep* 19(10):2130-2142.
- Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Jr., Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N. 2007. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54(3):379-386.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139(4):1405-1415.
- Cunningham DJ, Stolwijk JA, Murakami N, Hardy JD. 1967. Responses of neurons in the preoptic area to temperature, serotonin, and epinephrine. *The American journal of physiology* 213(6):1570-1581.
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB. 2002. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(3):977-990.
- De Blas GA, Darszon A, Ocampo AY, Serrano CJ, Castellano LE, Hernandez-Gonzalez EO, Chirinos M, Larrea F, Beltran C, Trevino CL. 2009. TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS one* 4(6):e6095.
- de la Pena E, Malkia A, Vara H, Caires R, Ballesta JJ, Belmonte C, Viana F. 2012. The influence of cold temperature on cellular excitability of hippocampal networks. *PLoS One* 7(12):e52475.
- Denda M, Tsutsumi M, Denda S. 2010. Topical application of TRPM8 agonists accelerates skin permeability barrier recovery and reduces epidermal proliferation induced by barrier insult: role of cold-sensitive TRP receptors in epidermal permeability barrier homeostasis. *Experimental dermatology* 19(9):791-795.
- Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A. 2008. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci* 28(3):566-575.
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. 2007. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54(3):371-378.
- Eisenman JS. 1969. Pyrogen-induced changes in the thermosensitivity of septal and preoptic neurons. *The American journal of physiology* 216(2):330-334.

- Eisenman JS, Jackson DC. 1967. Thermal response patterns of septal and preoptic neurons in cats. *Experimental neurology* 19(1):33-45.
- Farrell MJ. 2016. Regional brain responses in humans during body heating and cooling. *Temperature (Austin, Tex)* 3(2):220-231.
- Halassa MM, Acsady L. 2016. Thalamic Inhibition: Diverse Sources, Diverse Scales. *Trends Neurosci* 39(10):680-693.
- Hong Wei Dong and The Allen Institute for Brain Science. 2008. The Allen Reference Atlas: A Digital Color Brain Atlas of the C57BL/6J Male Mouse.
- Jakab RL, Leranath C. 1990. Somatospiny neurons in the rat lateral septal area are synaptic targets of hippocamposeptal fibers: a combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse* 6(1):10-22.
- Kunert-Keil C, Bisping F, Kruger J, Brinkmeier H. 2006. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 7:159.
- Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB. 2000. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(10):3830-3842.
- Luttgen M, Ogren SO, Meister B. 2005. 5-HT1A receptor mRNA and immunoreactivity in the rat medial septum/diagonal band of Broca-relationships to GABAergic and cholinergic neurons. *Journal of chemical neuroanatomy* 29(2):93-111.
- McCoy DD, Knowlton WM, McKemy DD. 2011. Scraping through the ice: uncovering the role of TRPM8 in cold transduction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(6):R1278-1287.
- McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416(6876):52-58.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(7):3655-3660.
- Mishra SK, Tisel SM, Orestes P, Bhangoo SK, Hoon MA. 2011. TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *The EMBO journal* 30(3):582-593.
- Mittag J, Lyons DJ, Sallstrom J, Vujovic M, Dudazy-Gralla S, Warner A, Wallis K, Alkemade A, Nordstrom K, Monyer H, Broberger C, Arner A, Vennstrom B. 2013. Thyroid hormone is required for hypothalamic neurons regulating cardiovascular functions. *J Clin Invest* 123(1):509-516.
- Morenilla-Palao C, Luis E, Fernandez-Pena 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(5):1571-1582.
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C. 2010. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 16(12):1396-1399.
- Paxinos G, Franklin K. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th edition.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108(5):705-715.



- Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. 2013. The cellular code for mammalian thermosensation. *J Neurosci* 33(13):5533-5541.
- Reimundez A, Fernandez-Peña C, Garcia G, Fernandez R, Ordas P, Gallego R, Pardo-Vazquez JL, Arce V, Viana F, Señaris R. 2018. Deletion of the Cold Thermoreceptor TRPM8 Increases Heat Loss and Food Intake Leading to Reduced Body Temperature and Obesity in Mice. *The Journal of Neuroscience* 38(15):3643-3656.
- Risold PY, Swanson LW. 1997. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain research Brain research reviews* 24(2-3):115-195.
- Roberts JC, Davis JB, Benham CD. 2004. [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain research* 995(2):176-183.
- Schaeren-Wiemers N, Gerfin-Moser A. 1993. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100(6):431-440.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676-682.
- Señaris R, Ordas P, Reimundez A, Viana F. 2018. Mammalian cold TRP channels: impact on thermoregulation and energy homeostasis. *470(5):761-777.*
- Song K, Wang H, Kamm GB, Pohle J, Reis FC, Heppenstall P, Wende H, Siemens J. 2016. The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* 353(6306):1393-1398.
- Sunkin SM, Hohmann JG. 2007. Insights from spatially mapped gene expression in the mouse brain. *Human molecular genetics* 16 Spec No. 2:R209-219.
- Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD. 2007. Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J Neurosci* 27(51):14147-14157.
- Tan CL, Cooke EK, Leib DE, Lin Y-C, Daly GE, Zimmerman CA, Knight ZA. 2016. Warm-Sensitive Neurons that Control Body Temperature. *Cell* 167(1):47-59.e15.
- 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(3):531-543.
- Van Der Stelt M, Di Marzo V. 2004. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 271(10):1827-1834.
- Wang XP, Yu X, Yan XJ, Lei F, Chai YS, Jiang JF, Yuan ZY, Xing DM, Du LJ. 2017. TRPM8 in the negative regulation of TNF α expression during cold stress. *Sci Rep* 7:45155.
- Yarmolinsky DA, Peng Y, Pogorzala LA, Rutlin M, Hoon MA, Zuker CS. 2016. Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System. *Neuron* 92(5):1079-1092.
- Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC, Lee SY. 2018. Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science* 359(6372):237-241.
- Young WS, 3rd. 1989. In situ hybridization histochemical detection of neuropeptide mRNA using DNA and RNA probes. *Methods in enzymology* 168:702-710.
- Zeisel A, Hochgerner H, Lonnerberg P, Johnsson A, Memic F, van der Zwan J, Haring M, Braun E, Borm LE, La Manno G, Codeluppi S, Furlan A, Lee K, Skene N, Harris KD, Hjerling-Leffler J,

- Arenas E, Ernfors P, Marklund U, Linnarsson S. 2018. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174(4):999-1014 e1022.
- Zhao C, Eisinger B, Gammie SC. 2013. Characterization of GABAergic neurons in the mouse lateral septum: a double fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical study using tyramide signal amplification. *PLoS One* 8(8):e73750.
- Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jonsson BA, Blomgren A, Birnir B, Bevan S, Eschalier A, Mallet C, Gomis A, Hogestatt ED. 2013. Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One* 8(12):e81618.

Figure legends:

Figure 1: TRPM8 expression in the hypothalamus of mouse and rat. (a) TRPM8 RT-PCR in adult mouse and rat. Notice the different intensities of the bands corresponding to trigeminal ganglia (TG) and hypothalamus (H). Control samples are also shown: without cDNA (c), without reverse transcriptase (RT(-)). β -actin amplification is shown for both tissues in mouse. (b) Quantitative realtime PCR (qPCR) was performed in mouse to quantify the observed differences between both tissues. Expression levels in TG are \approx 240 times higher than in H. Liver (L) tissue was used as negative control. (c and d) TRPM8 mRNA expression in TG from *Trpm8^{EGFPf}* mice (c) and rat (d). TG sections from wildtype (WT), hemizygous *Trpm8^{EGFPf/+}* and homozygous *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice were incubated with an antisense (AS) or a sense (SS) riboprobe labelled with digoxigenin. The signal was visualized with BCIP/NBT. Note the lack of TRPM8 mRNA positive cells in KO mice or after incubation with the sense probe. (e) Combination of fluorescent TRPM8 mRNA ISH (magenta) and fluorescent immunohistochemistry of GFP protein (green) in trigeminal sections from hemizygous *Trpm8^{EGFPf/+}* mice. Confocal image of the colocalization. The riboprobe was labelled with digoxigenin and visualized with TMR. The area within the square is shown below at higher magnification in separate imaging channels. (f) Quantification of cells expressing TRPM8 mRNA and/or GFP signal in mouse TG. Positive cells in 10 sections from different mice were analyzed. (g) GFP-immunoreactivity (in green) in the hypothalamic VLPO nucleus of a hemizygous *Trpm8^{EGFPf/+}* (1) and a WT mouse (2). Hoechst staining in blue. Scale bars: 50 μ m.

Figure 2: TRPM8 expression in the lateral septal area (LS) in mice. (a) Diagram of a coronal section of the brain at the level of the septum. In this and following figures the presence of cells with TRPM8 mRNA and GFP signal is illustrated with red dots. Positive cells



located in the areas indicated by the blue squares and labelled as 1 and 2 are shown at higher magnification in the right panels. (b) Example of TRPM8 mRNA containing cells (black arrows). Photograph in black and white. (c and d) Immunofluorescent confocal images of GFP in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* (c) or *Trpm8^{BAC}-EYFP+* (d) mice. (e - g) Double immunofluorescence for GFP (in green) and parvalbumin, PV (e), choline acetyltransferase, ChAT (f) or calbindin D28k, Calb (g) (in magenta) in brain tissue slices from *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice. Neurons with colocalizations are pointed with arrows. Colocalizations were evaluated in at least three independent experiments. Hoechst staining in blue. Scale bars: 50 μm (b-d, g) and 100 μm (e and f).

Figure 3: TRPM8 expression surrounding the medial septum-diagonal band complex (MS-DB) in mice. (a) Diagram illustrating the expression of TRPM8, indicated by red points. (b1- b3) TRPM8 mRNA containing cells located in the areas indicated by the 3 blue boxes in panel a. Photographs in black and white. (c and d) Confocal images showing fluorescent cells detected by GFP immunohistochemistry in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* (c) and *Trpm8^{BAC}-EYFP+* (d) mice. (e-h) Double immunofluorescence for GFP (green) and choline acetyltransferase, ChAT (e, f) or parvalbumin, PV (g, h) (magenta) in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice. Hoechst staining in blue. Scale bars: 100 μm (b-e, g) and 50 μm (f and h).

Figure 4: GFP-labelled cells in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice in areas with no detectable TRPM8 mRNA signal. (a) Illustrative diagrams of brain areas with GFP-immunoreactive cells. (b) Photographs of positive cells in the regions indicated by the numbered blue squares. (b1 and b2) Anterior olfactory nucleus, lateral and dorsal (AOL and AOD), (b3) piriform cortex (Pir), (b4) ventral taenia tecta (VTT), (b5) dorsal endopiriform nucleus (DEn), (b6) ventral pallidum (VP), (b7) ventromedial preoptic nucleus (VMPO), (b8) lateral entorhinal cortex (ENTL), (b9) ventral CA1 of the hippocampus (CA1). Hoechst staining in blue. Scale bars: 50 μm ; detail in b9, 10 μm .

Figure 5: TRPM8 expression in the hypothalamic preoptic area (POA) in mice. (a) Coronal diagram showing with red points the expression of TRPM8 mRNA and GFP-containing cells in the preoptic hypothalamus. Positive neurons found in the areas indicated by the 2 blue squares are shown below (bd). (b) Black and white images of TRPM8 mRNA expressing cells. (c and d) Confocal photographs of fluorescent GFP immunohistochemistry in *Trpm8^{BAC}-EYFP+* (c) and in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* (d) mice. The image in (d) is a general view of the whole area

represented by the 2 blue squares illustrated in (a). (e and f) Double immunofluorescence for GFP (green) and choline acetyltransferase, ChAT (e) or parvalbumin, PV (f) (magenta) in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice. Hoechst staining in blue. Scale bars: 100 μ m.

Figure 6: TRPM8 expressing neurons in the reticular thalamic nucleus (RT) in mice. (a) Diagram of a coronal brain section illustrating the expression pattern of TRPM8 in the reticular thalamic nucleus. Positive cells observed in the areas indicated by the 2 blue squares are shown in the right panels (b - d). (b) Black and white images of TRPM8 mRNA containing cells. (c and d) Confocal images of fluorescent GFP-immunoreactive neurons in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* (c) and *Trpm8^{BAC}-EYFP+* (d) mice. Co-expression of GFP (green) with Gamma-aminobutyric acid, GABA (e), or parvalbumin, PV (f) immunoreactivity (magenta) in the head of the RT in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice. Arrows point at cells with co-expression. Colocalizations were evaluated in at least three independent experiments. Hoechst staining in blue. Scale bars: 50 μ m.

Figure 7: GFP-labelled axons in *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice. In certain areas of the CNS GFP immunoreactivity was observed mainly in nerve fibers. (a) Paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). (b) Lateral part of Supramammillary nucleus (SuML). (c) Supraoptic nucleus of the hypothalamus (SO). (d) Dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH). (e) Amygdalar nuclei (lateral (LA), basolateral (BLA), and central (CEA) nucleus). (f) Lateral habenular nucleus (HbL). (g) Lateral periaqueductal grey, caudal part (LPAG). (h) Spinal trigeminal tract (Spt5) and spinal trigeminal nucleus, oral part (Sp5O). (i) Stria medullaris of the thalamus (sm). (j) Stria terminalis (ST). (k) Cingulum (cg) and positive fibers in the retrosplenial cortex (RSP). (l) fornix (f). Hoechst staining in blue. Scale bars: 50 μ m.

Fig. 8: TRPM8 positive cells in adult male and female mice. GFP immunoreactivity is shown in adult male and female *Trpm8^{EGFPf/EGFPf}* mice in septum (a), RT (b) and preoptic hypothalamus (c). Similar sites and patterns of expression were found in animals of both sexes. Scale bars: 100 μ m.

Figure 9: TRPM8 mRNA expression in the rat brain detected by ISH. (a) Representation of coronal sections of the rat brain at different rostrocaudal levels. Red dots show the pattern of expression of TRPM8. TRPM8 mRNA containing cells located in the areas represented by the blue squares are shown in (b). (b1- 3) Cerebral cortex. (b4 and b5) Anterior part of the lateral preoptic nucleus (LPO) and of the substantia innominate (SI). (b6) Hypothalamic preoptic area.



(b7a) Reticular thalamic nucleus (RT) (b7b) RT nucleus hybridized with a sense probe. Note the lack of positive signal. Cg (Cingulate cortex), PrL (Prelimbic cortex), M2 (Secondary motor cortex), M1 (Primary motor cortex), NDB (Diagonal band nucleus), VLPO (Ventrolateral preoptic nucleus), MPO (Medial preoptic area). Scale bars: 50 μm (b1-b5, b7), 100 μm (b6).

Figure 10: Cold-evoked responses in TRPM8-expressing septal neurons. (a) Current-clamp recording of a YFP(+) septal neuron during application of temperature ramps. The top trace shows the membrane potential and the bottom trace the temperature of the bath, recorded simultaneously. The blue bar marks the application of menthol (500 μM). The photograph shows the fluorescence image of the recorded neuron, superimposed of the transmitted image of the same field (20 μm calibration). The right inset shows the response of the same neuron to 300 ms duration hyperpolarizing and depolarizing current pulses. (b) Summary histogram of mean depolarization evoked by cooling ramps in control solution and during cooling with menthol (500 μM) or icilin (20 μM). The differences were not statistically significant (One-way ANOVA). (c) Current-clamp recording of a YFP(+) septal neuron dialyzed with an intracellular solution containing 500 μM menthol. Note the large depolarization and firing evoked by the cooling ramp. The photograph shows the fluorescence image of the recorded neuron. The insets show voltage responses to current pulses. (d) The same protocol applied to a YFP(-) septal neuron, also containing 500 μM menthol. Note the absence of a cold-evoked depolarization. The inset shows the response of the same neuron to current steps. (e) Summary of mean number of actions potentials evoked during cooling ramps in YFP(-) and YFP(+) neurons. The difference was statistically significant (unpaired Student t-test, $p < 0.01$).

Figure 11: Summary of the main places of expression of TRPM8 illustrated in a sagittal section of the brain. Magenta circles indicate positive cell bodies. Green circles, positive fibers. The size of the circles represents the levels of expression or abundance of the positive somas/axons.

Author contributions: RS, FV: Conceptualization; PO, PH, HV, CM-P, CF-P: Investigation; RS, FV: Writing original draft; RS, FV, PO, PH, HV, CF-P, AR, CM-P, AG-F, AG, MH: Writing, review and editing; RS, FV, CM-P, AG-F, AG, MH: Supervision; PO, PH, HV, CF-P, AR, FV, RS: Visualization; RS, FV: Funding acquisition and management.

Index of brain abbreviations:

3V: 3rd ventricle. **ac:** anterior commissure. **Acb:** accumbens nucleus. **AD:** anterodorsal thalamic nucleus. **AHi:** amygdalohippocampal area. **AHN:** anterior hypothalamic nucleus. **Aq:** cerebral aqueduct. **AON:** anterior olfactory nucleus. **AOD:** anterior olfactory nucleus, dorsal part. **AOL:** anterior olfactory nucleus, lateral part. **AOM:** anterior olfactory nucleus, medial part. **AOP:** anterior olfactory nucleus, posterior part. **AOV:** anterior olfactory nucleus, ventral part. **ARC:** Arcuate nucleus. **BLA:** basolateral amygdalar nucleus. **BST:** bed nucleus of stria terminalis. **CA1:** field CA1 of hippocampus. **CEA:** central amygdalar nucleus. **Cg:** cingulate cortex. **cg:** cingulum. **CL:** centrolateral thalamic nucleus. **CLI:** Central linear raphe nucleus. **COa:** posteromedial cortical amygdaloid nucleus. **CPu:** caudoputamen. **DEn:** dorsal endopiriform nucleus. **DMH:** dorsomedial hypothalamic nucleus. **DR:** Dorsal raphe nucleus. **DTT:** dorsal taenia tecta. **En:** endopiriform nucleus. **ENT:** entorhinal cortex. **ENTL:** lateral entorhinal cortex. **f:** fornix. **fi:** fimbria. **HbL:** lateral habenular nucleus. **HbM:** medial habenular nucleus. **ic:** internal capsule. **ICj:** islands of Calleja. **IPN:** Interpeduncular nucleus **LA:** lateral amygdalar nucleus. **LD:** laterodorsal thalamic nucleus. **LHA:** Lateral hypothalamus area. **LPAG:** lateral periaqueductal gray. **LPO:** lateral preoptic nucleus. **LR:** rostral linear nucleus of raphe. **LS:** lateral septal nucleus. **LSc:** lateral septal nucleus, caudal part. **LSr:** lateral septal nucleus, rostral part. **LSv:** lateral septal nucleus, ventral part. **LV:** lateral ventricle. **M1:** primary motor cortex. **M2:** secondary motor cortex. **MCPO:** magnocellular preoptic nucleus. **MD:** mediodorsal thalamic nucleus. **MM:** medial mammillary nucleus. **MnPO:** median preoptic nucleus. **MPN:** medial preoptic nucleus. **MPO:** medial preoptic area. **MS:** medial septal nucleus. **MS-DB:** medial septum-diagonal band complex. **NDB:** diagonal band nucleus. **och:** optic chiasma. **ORB:** Orbital cortex. **OT:** Olfactory tubercle. **PAG:** periaqueductal gray. **PC:** paracentral thalamic nucleus. **Pir:** piriform cortex. **PO:** posterior thalamic nucleus group. **PRh:** perirhinal cortex. **PrL:** prelimbic cortex. **PVH:** paraventricular hypothalamic nucleus. **Rch:** Retrochiasmatic area. **RE:** reuniens nucleus. **RSP:** retrosplenial cortex. **RT:** reticular thalamic nucleus. **S1:** primary somatosensory cortex. **SC:** superior colliculus. **Sch:** Suprachiasmatic area. **SI:** substantia innominata. **SL:** semilunar nucleus. **sm:** stria medullaris of the thalamus. **SN:** substantia nigra. **SO:** supraoptic nucleus. **SP5:** spinal trigeminal nucleus. **SP5O:** spinal trigeminal nucleus, oral part. **Spt5:** spinal trigeminal tract. **ST:** stria terminalis. **Sub:** Subiculum. **SuM:** supramammillary nucleus. **SuML:** supramammillary nucleus, lateral part. **TR:** amygdalopiriform transition area. **TT:** taenia tecta. **Tu:** tuberal nucleus. **VA:** ventral anterior thalamic nucleus. **VL:** ventrolateral thalamic nucleus. **VLPAAG:** ventrolateral periaqueductal gray. **VLPO:** ventrolateral preoptic nucleus. **VM:** ventromedial thalamic nucleus. **VMH:** ventromedial hypothalamic nucleus. **VMPO:** ventromedial preoptic nucleus. **VOLT:** vascular organ of the lamina terminalis. **VP:** ventral pallidum. **VPT:** ventral posterior thalamic nucleus. **VTA:** ventral tegmental area. **VTT:** ventral taenia tecta. **ZI:** zona incerta.



Tables

Table 1: Pattern of expression of TRPM8 in the mouse and rat brain. As stated in the text TRPM8 mRNA levels were very low. The scale used here indicates relative values. (-) no signal, (+) low, (++) intermediate, (+++) highest levels. In relation to the GFP signal a scale from (-) to (+++) was used as follows: (-) no signal, (+) scattered, (++) moderate number, (+++) abundant cell bodies/fibers.

Brain area	Mouse <i>Trpm8</i> mRNA	<i>Trpm8</i> ^{EGFPf} positive somas	<i>Trpm8</i> ^{EGFPf} positive fibers	<i>Trpm8</i> - EYFP ⁺ positive somas	<i>Trpm8</i> - EYFP ⁺ positive fibers	Rat <i>Trpm8</i> mRNA
Allocortex						
Anterior olfactory n. (AON)	-	++	+	++	+	-
Olfactory tubercle (OT)	-	-	+	-	+	-
Piriform cortex (Pir)	-	++	+	++	+	-
Taenia tecta (TT)	-	+	+	+	+	-
Entorhinal cortex (ENT)	-	++	+	++	+	-
Anterior cingulate cortex (Cg)	-	-	+	+	+	++
Retrosplenial cortex (RSP)	-	-	+	+	+	++
Hippocampus (Caudal CA1)	-	+	++	+	++	-
Subiculum (Sub)	-	+	+++	+	++	-
Isocortex						
Prelimbic cortex (PrL)	-	+	+	+	+	++
Anterior orbital cortex (ORB)	-	+	+	+	+	-
Primary motor cortex (M1)	-	-	-	+	+	++
Secondary motor cortex (M2)	-	-	-	+	+	++
Somatosensory cortex (S1)	-	-	-	+	+	+
Septum						
Lateral caudal nucleus (LSc)	+	+++	+++	+++	+++	+
Lateral rostral nucleus (LSr)	+	+++	+++	+++	+++	+
Medial septal nucleus (MS)	-	-	+	-	+	-
Amygdala						
Lateral (LA)	-	-	+++	+	++	-
Basolateral (BLA)	-	-	+++	+	+	-
Central (CEA)	-	-	+++	+	+	-
Endopiriform nucleus (En)	-	++	+	++	+	+
Epithalamus						
Lateral habenula (HbL)	-	+	+++	+	++	-
Thalamic nuclei						
Reticular thalamic (RT)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Anterodorsal (AD)	+++	-	+	-	+	-
Mediodorsal (MD)	-	+	+	+	+	-
Laterodorsal (LD)	-	-	+	+	+	-
Centrolateral (CL)	-	+	+	+	+	-
Reuniens (RE)	-	-	+	-	+	-
Posterior complex (PO)	-	-	+	-	+	-
Lateral geniculate body (LGN)	-	-	+	-	++	-
Intergeniculate leaflet (IGL)	-	-	+	-	+++	-
Hypothalamic nuclei						
Ventromedial preoptic (VMPO)	-	+	+	+	+	-

Medial preoptic area (MPO)	++	+++	+++	+++	+++	++
Ventrolateral preoptic (VLPO)	++	+++	+++	+++	+++	++
Lateral preoptic area (LPO)	++	+++	+++	+++	+++	++
Anterior (AHN)	-	+	+	+	+	-
Suprachiasmatic (Sch)	-	-	+	-	+	-
Supraoptic (SO)	-	-	++	-	++	-
Arcuate (ARC)	-	+	+	+	+	-
Retrochiasmatic area (Rch)	-	-	+	-	+	-
Ventromedial (VMH)	-	-	+	-	+	-
Tuberal (Tu)	-	-	+	-	+	-
Paraventricular (PVH)	-	-	+	+	+	-
Dorsomedial (DMH)	-	-	+	-	+	-
Lateral area (LHA)	-	+	+	+	+	-
Zona incerta (ZI)	-	-	+	+	+	-
Supramammillary (SuM)	-	-	++	+	+	-
Substantia innominata (SI)	++	+++	+++	+++	+++	++
Ventral pallidum (VP)	-	++	++	++	++	++
Midbrain nuclei						
Linear of the raphe (LR)	-	+	+	+	+	-
Periaqueductal gray (PAG)	-	-	+	-	+	-
Dorsal raphe (DR)	-	-	+	+	+	-
Central linear raphe (CLI)	-	+	+	+	+	-
Interpeduncular (IPN), lateral	-	-	+	-	+	-
Superior colliculus (SC)	-	-	+	-	++	-
Substantia nigra (SN)	-	-	+	-	+	-
Ventral tegmental area (VTA)	-	-	+	+	+	-
Hindbrain nuclei						
Spinal trigeminal (SP5)	-	-	+	-	+	-
Cerebellum	-	-	-	++	+	-

Table 2: GFP-immunoreactivity in nerve tracts in mouse brain. A scale of (+) to (+++) was used as follows: (+) few, (++) moderate number, (+++) abundant immunoreactive fibers.

Nerve tract	<i>Trpm8^{EGFPf}</i> positive fibers	<i>Trpm8-EYFP⁺</i> positive fibers
Anterior commissure, olfactory limb (ac)	+	+
Cingulum (cg)	+	+
Fimbria (fi)	++	++
Fornix (f)	++	++
Optic tract (op)	+	+
Stria medullaris (sm)	++	++
Stria terminalis (ST)	++	++
Spinal trigeminal tract (Spt5)	+++	+++



Figure 1.

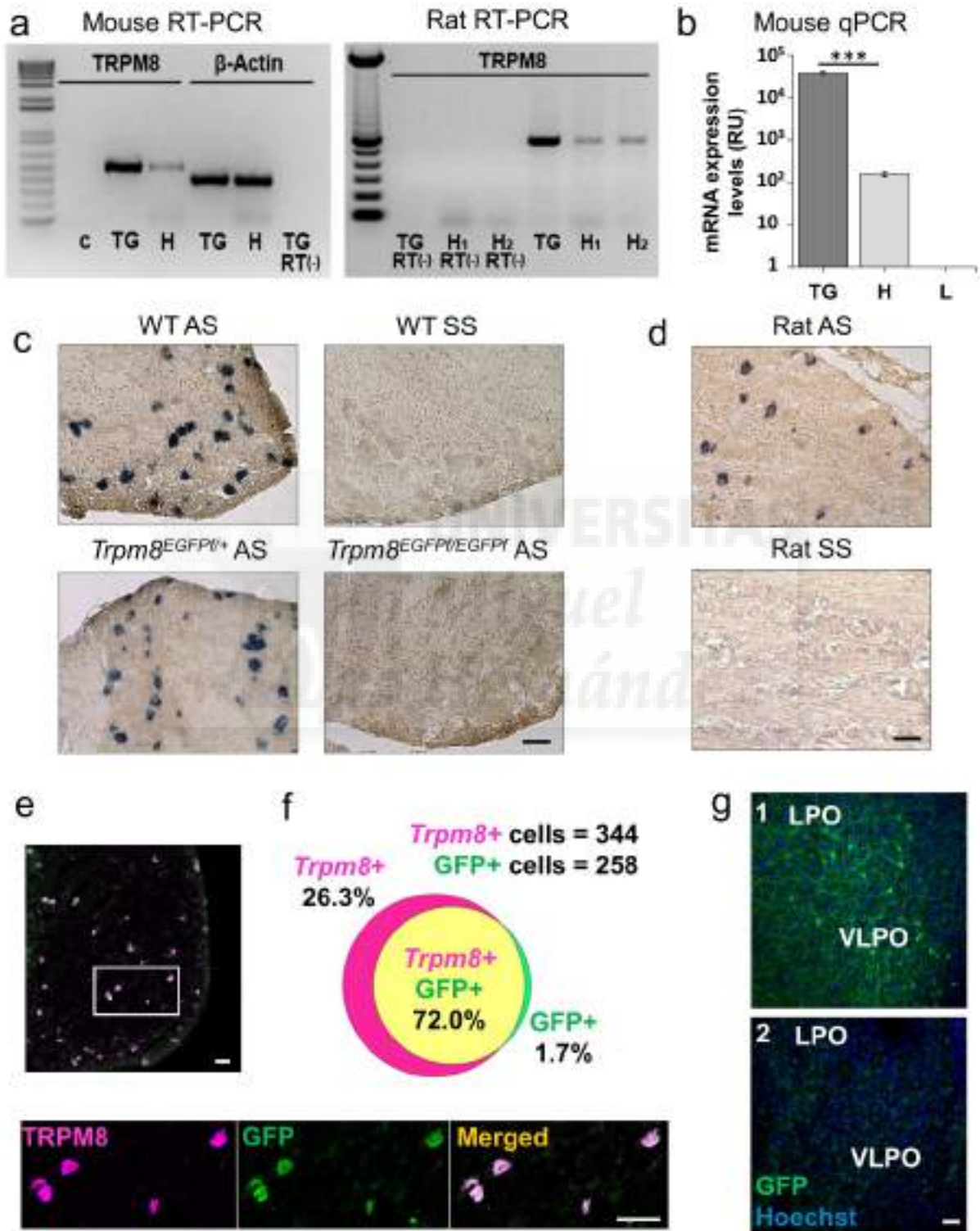


Figure 2.

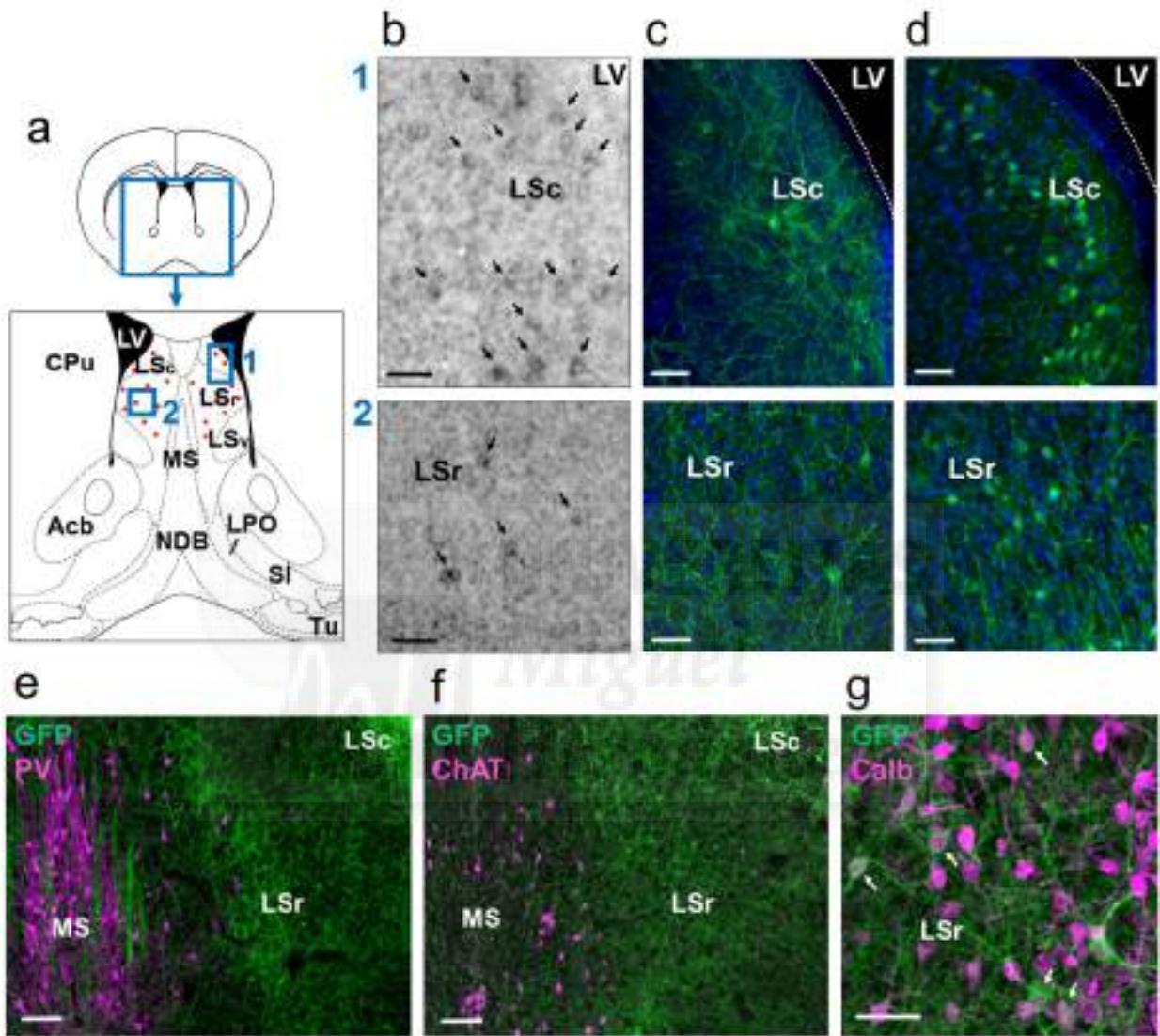




Figure 3.

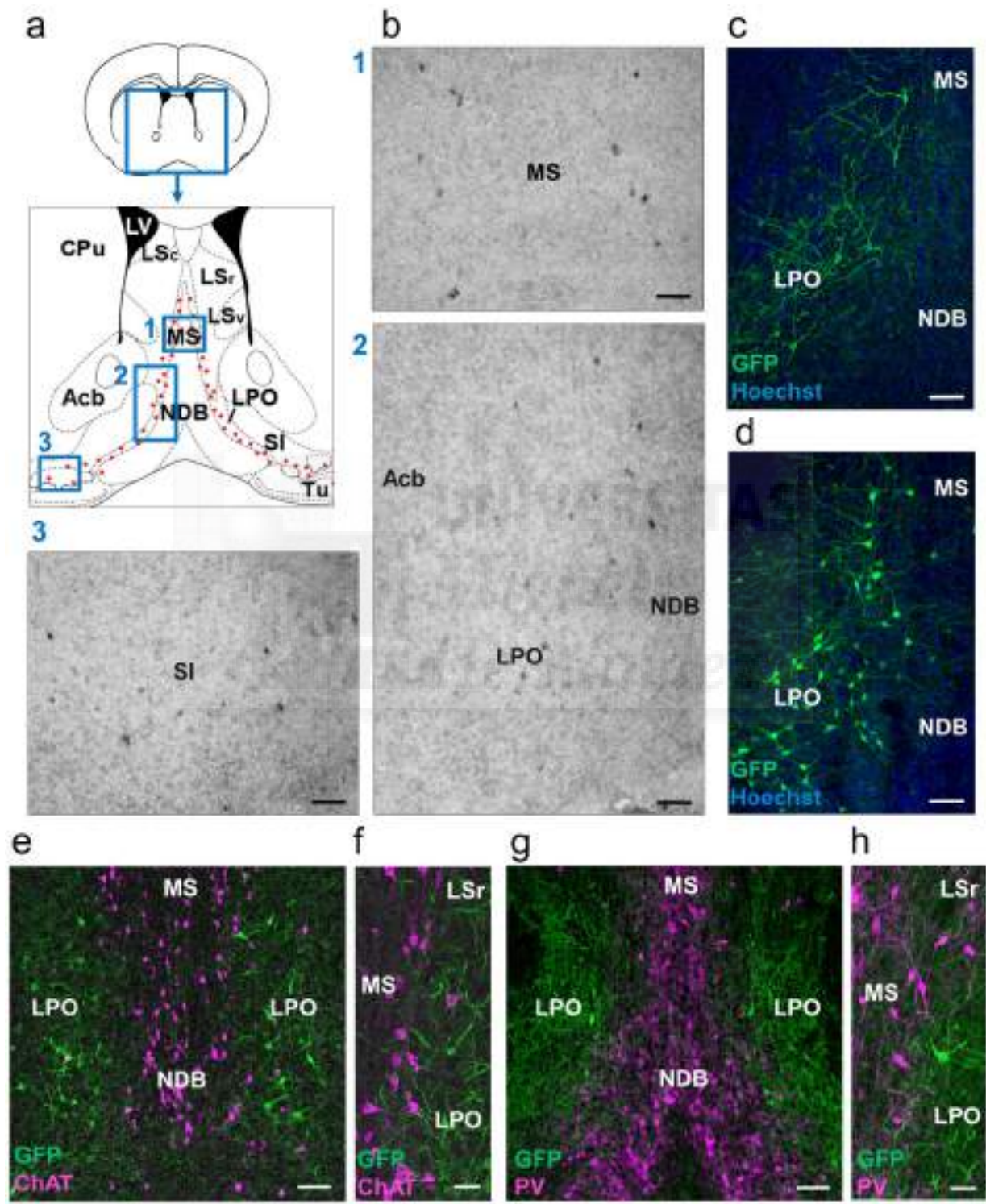


Figure 4.

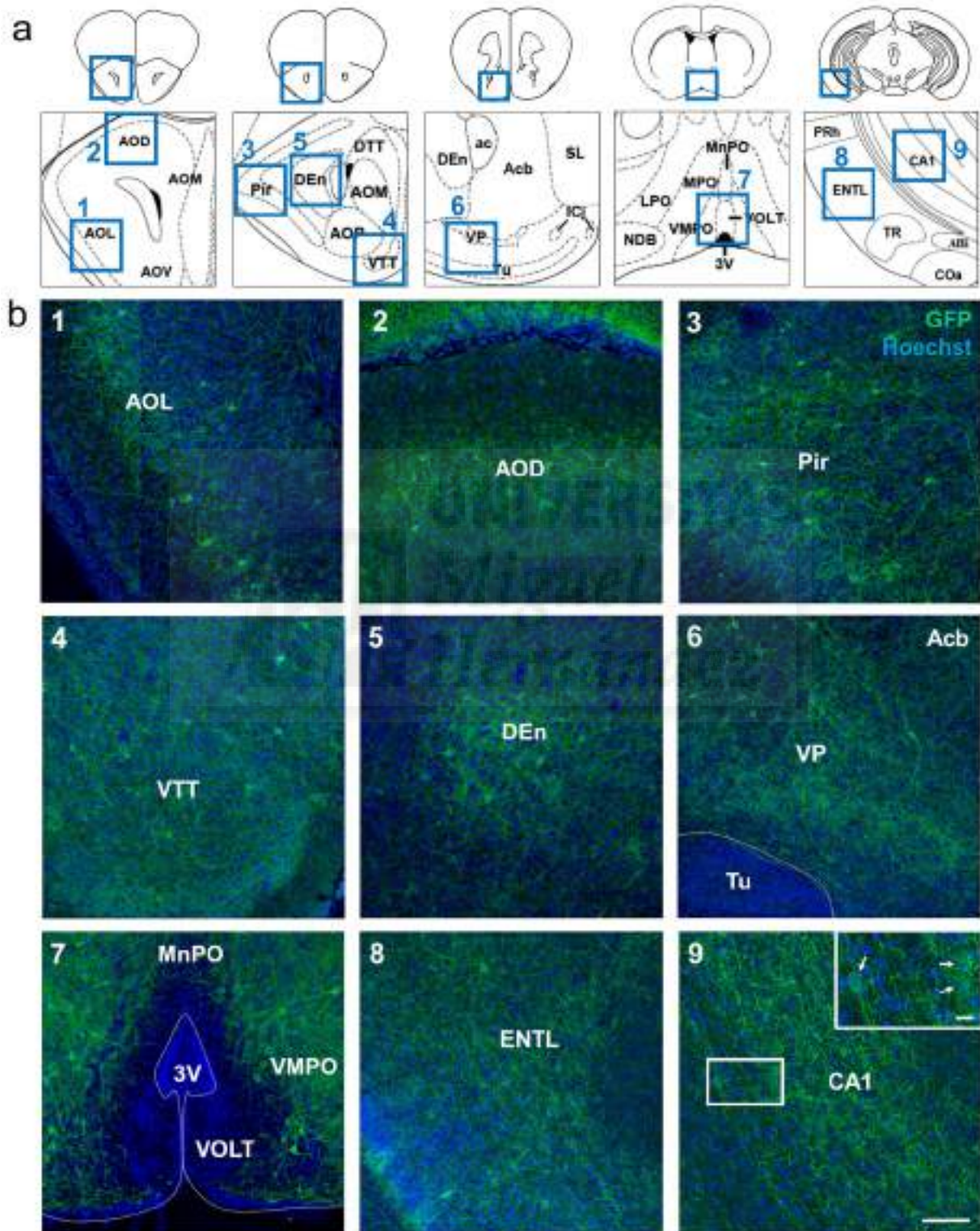




Figure 5.

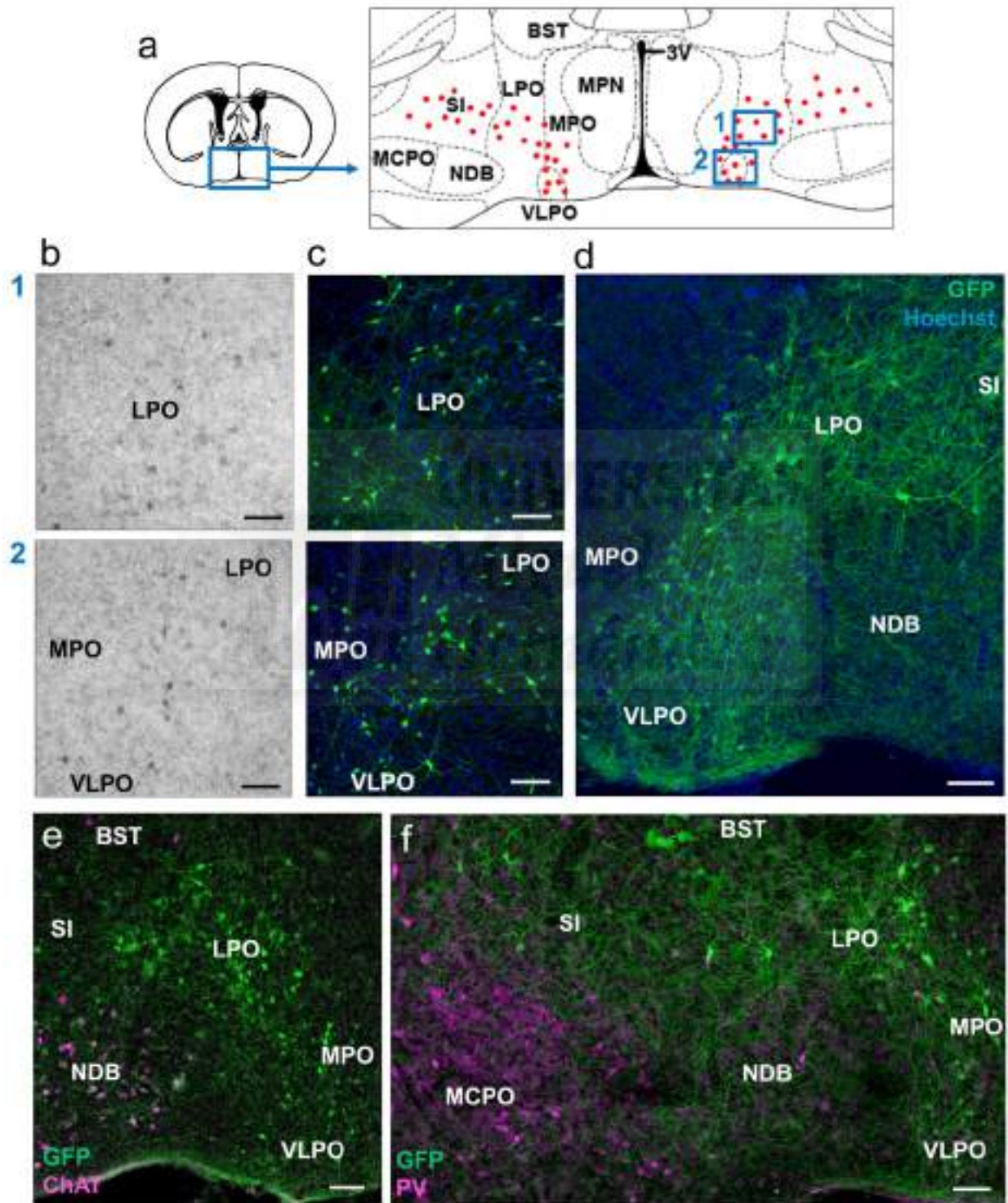


Figure 6.

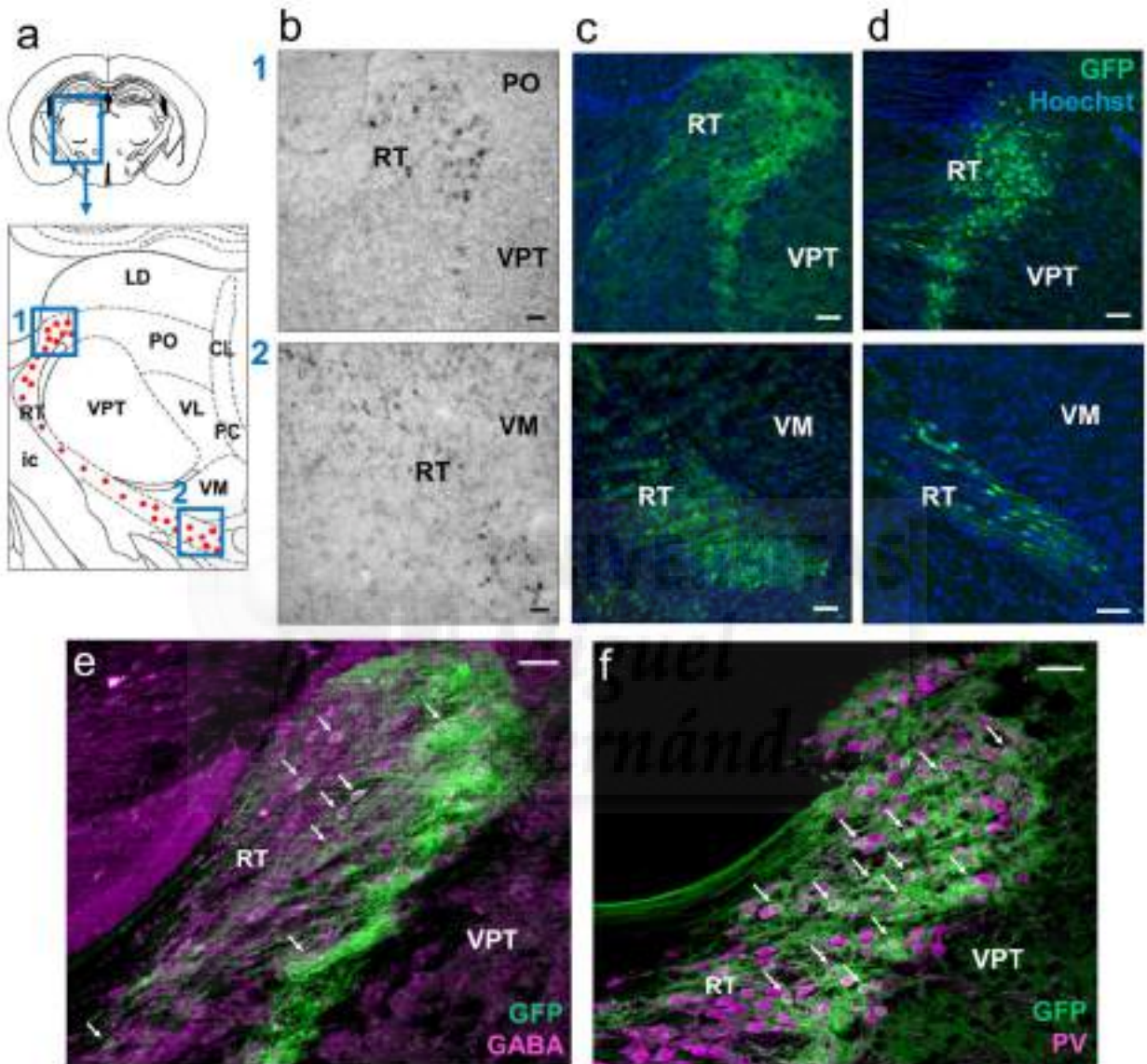




Figure 7.

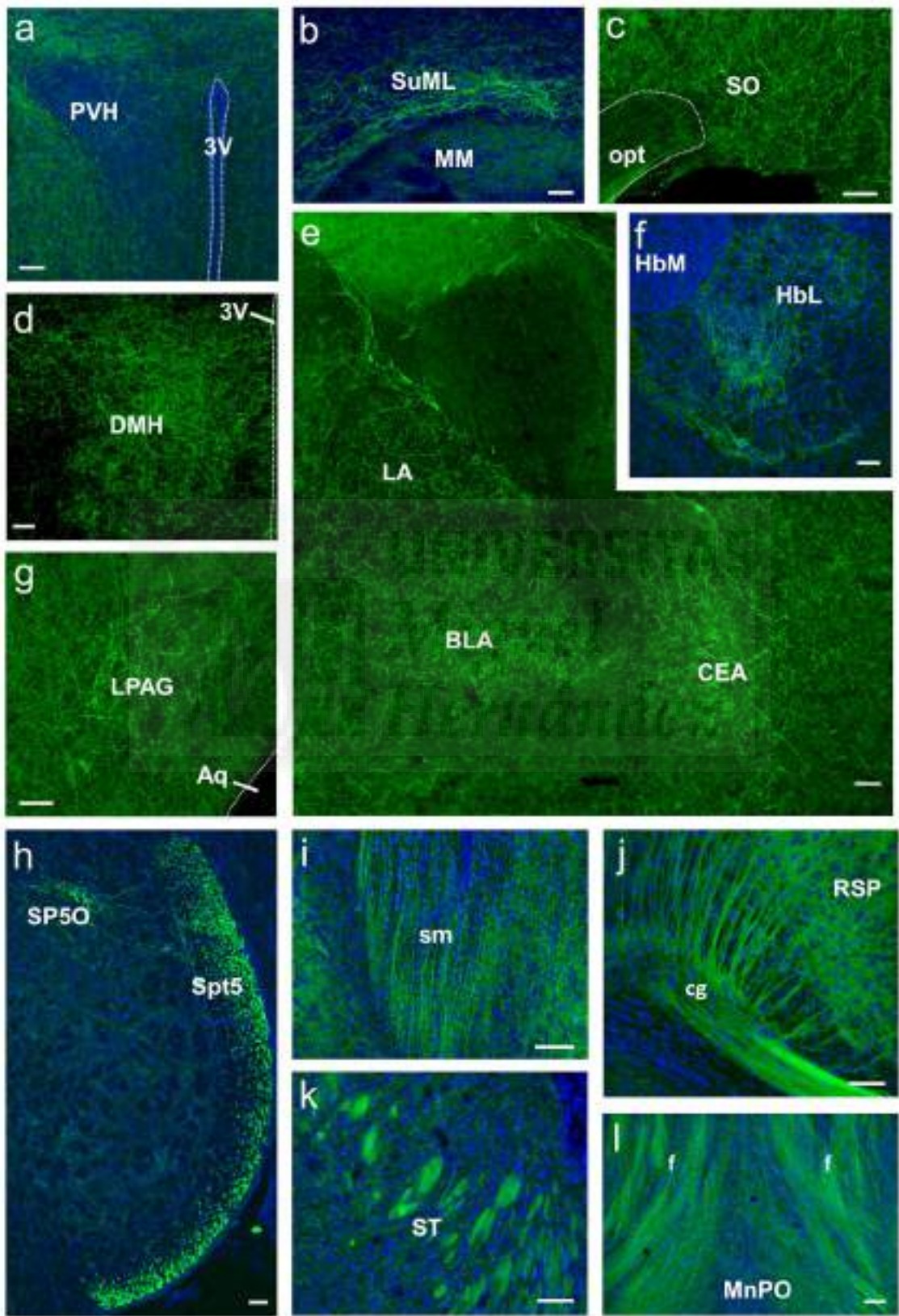


Figure 8.

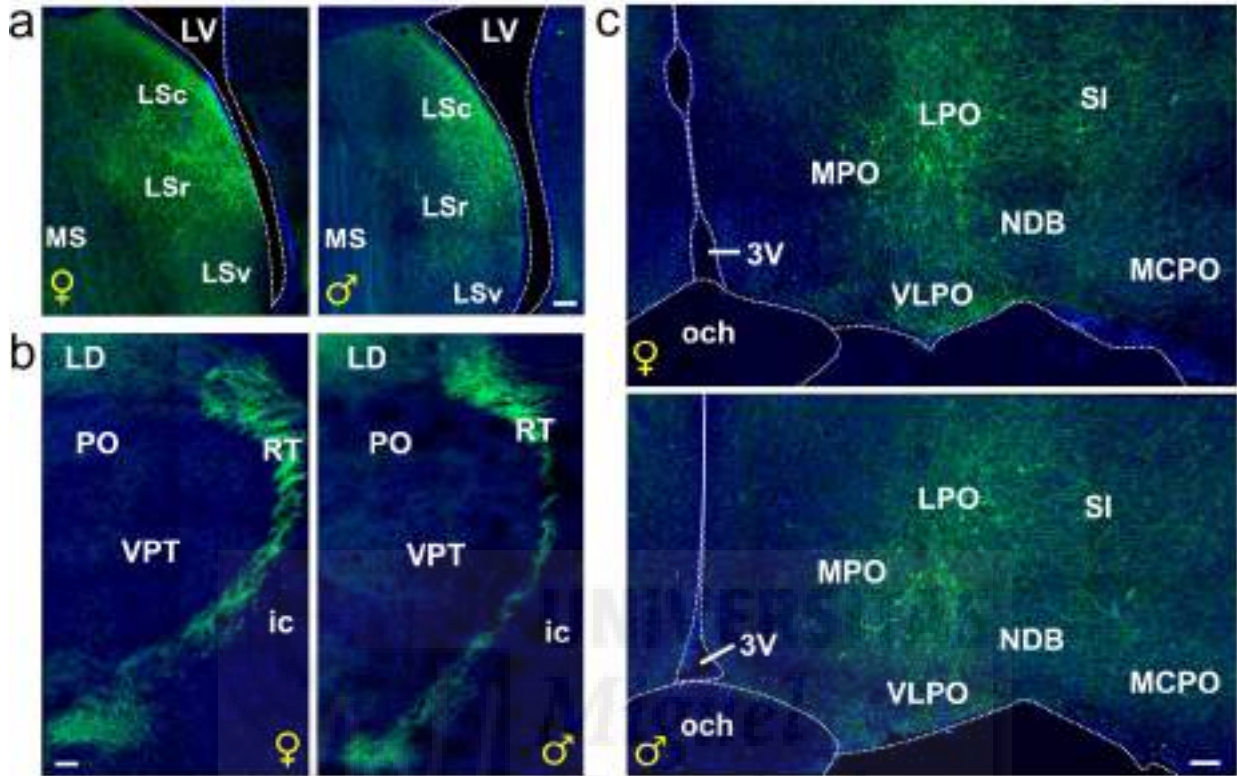




Figure 9.

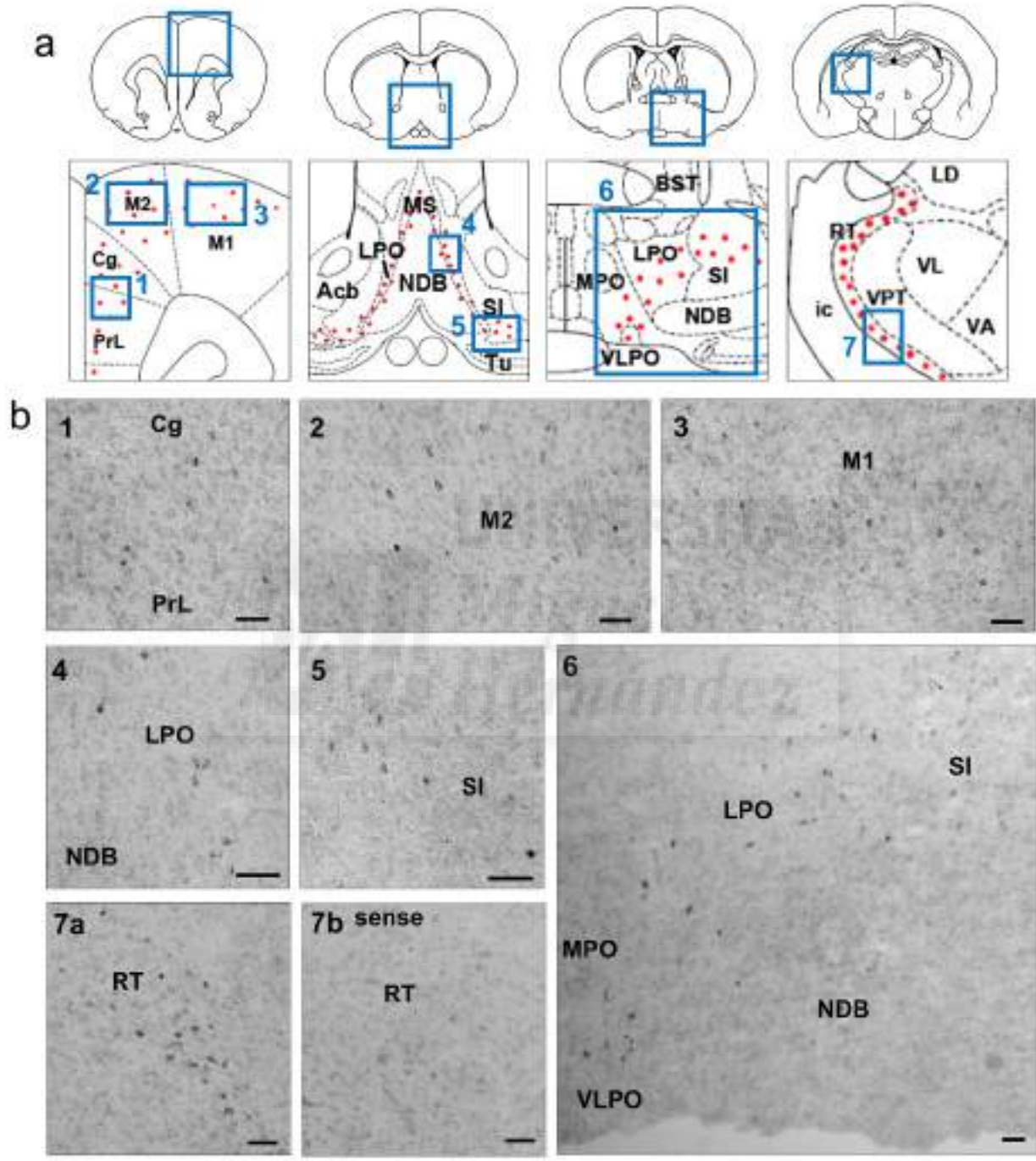


Figure 10.

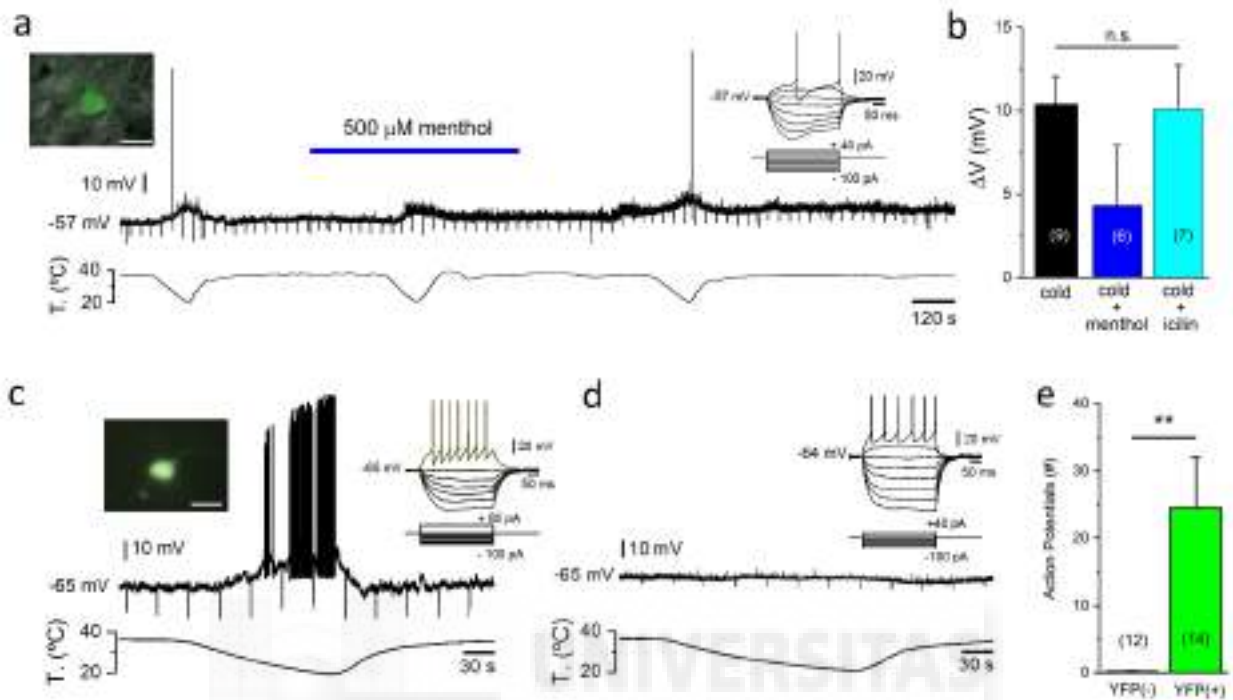


Figure 11.

