

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**PAPEL DE LA CORRIENTE DE FRENO I_{KD} EN LA HIPERSENSIBILIDAD
DOLOROSA AL FRÍO INDUCIDA POR LESIÓN EN NEURONAS
SENSORIALES PRIMARIAS**

CARLOS ANÍBAL RESTREPO BRAVO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCION FISIOLÓGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Rodolfo Madrid Montecinos

2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

CARLOS ANÍBAL RESTREPO BRAVO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magíster en Ciencias Médicas con mención en Fisiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 4 de Julio de 2013.

**Prof. Dr. Rodolfo Madrid.
Director de Tesis
Laboratorio de Neurociencias
Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. Dr. Mario Campero.

PROF. Dr. Diego Varela.

**PROF. Dr. Juan Bacigalupo.
Presidente Comisión de Examen**

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado a mis padres Aníbal y Esperanza, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional, por ser pilares importantes en este proceso y siempre demostrarme su cariño de manera incondicional, a mi abuela Gabriela que siempre ha estado ahí y que quiero como a una madre, a mi hermano Camilo por su apoyo y especialmente a mi novia Juliana, por su comprensión, apoyo, paciencia, cariño, amor y compañía incondicional a lo largo de todo este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer este trabajo de tesis primero a Dios, a mis padres, tíos, primos y a mi novia por apoyarme y ser parte fundamental en mi vida para la culminación de este proceso. Agradecer la oportunidad brindada por la Universidad CES para ser formado como docente e investigador en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y en la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile. Agradezco a aquellas personas que contribuyeron con su colaboración, apoyo y dirección a lo largo del Magíster, en especial a:

A mi tutor, el profesor Rodolfo Madrid por los consejos, disposición, paciencia y confianza depositada en mi durante el desarrollo de este proceso. A los profesores integrantes de la comisión evaluadora Juan Bacigalupo, Mario Campero y Diego Varela por su disposición y participación activa, sugerencias realizadas y atención prestada en los avances.

Quiero agradecer a Ricardo y Gonzalo, por su apoyo continuo durante el desarrollo de los experimentos, por enseñarme acerca del compañerismo y del trabajo en equipo, a Paulina, María y demás integrantes del grupo de investigación del laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Santiago de Chile por abrirme sus puertas y acogerme en el grupo.

Quiero agradecer a mis amigos Cristian, Diana, Julián y Paula por hacer de mi estancia en Chile una gran etapa de mi vida, acogerme como una familia y llegarlos a querer como mis hermanos.

Por último quiero agradecer a los proyectos Anillo ACT-1113, FONDECYT 1100983 y 1131064, por el financiamiento para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

1 RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. Fisiología de las neuronas termorreceptoras de frío de alto y bajo umbral	11
2.2. El canal termosensible TRPM8 como receptor de frío en neuronas somatosensoriales primarias.....	13
2.3. El canal termosensible TRPA1 como receptor de frío nocivo en neuronas sensoriales primarias	15
2.4. TRPV1, un canal expresado en neuronas somatosensoriales primarias que participa en la transducción de estímulos térmicos	16
2.5. Modificaciones en la transducción sensorial y expresión de canales inducidas por la lesión de axones periféricos	16
2.6. Papel de TRPM8 en la hipersensibilidad al frío inducida por lesión en los axones periféricos	19
2.7. La corriente de freno I_{KD} como determinante molecular en la hipersensibilidad dolorosa al frío post-lesión	21
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO GENERAL	23
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1. Modelo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo inducida por daño axonal	25
6.2. Evaluación de la conducta mediante la prueba de acetona	26
6.3. Preparación de neuronas disociadas de los ganglios raquídeos	27
6.4. Imagen de Ca^{2+}	28
6.5. Electrofisiología	29
6.6. Estimulación de las neuronas sensoriales primarias en cultivo con temperatura	30
6.7. Protocolo experimental para la estimulación con diferentes agentes farmacológicos	31
7. RESULTADOS	33
7.1. La constricción crónica del nervio ciático (LCC) en ratones como modelo de lesión axonal que genera hipersensibilidad al frío inocuo	33

7.2. Las neuronas somatosensoriales primarias de animales lesionados muestran mayor sensibilidad individual y poblacional al frío que las neuronas de animales control	34
7.3. El umbral de las respuestas de frío de las NsSF lesionadas no se modifica al bloquear la corriente de freno I_{KD}	38
7.4. La fracción de neuronas insensibles al frío que son transformadas en neuronas sensibles al frío por supresión de la corriente I_{KD} está reducida en neuronas provenientes de animales lesionados	41
7.5. La densidad de la corriente I_{KD} esta reducida en las NsSF de animales lesionados	44
7.6. La sensibilidad a agonistas químicos de los canales TRPM8, TRPA1, TRPV1 no se ve modificada en las NsSF de los animales LCC	46
7.7. No son necesarios cambios en la expresión funcional de canales TRPM8 para el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en respuesta a lesión	48
8. DISCUSIÓN.....	51
8.1. La lesión crónica constrictiva del nervio ciático (LCC) como modelo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo	51
8.2. La LCC produce un desplazamiento del umbral de temperatura hacia temperaturas más altas y un aumento en la población de las neuronas sensibles al frío de bajo umbral	53
8.3. Una disminución en la expresión funcional de los canales responsables de la corriente de freno I_{KD} se relaciona con la hipersensibilidad al frío inocuo en respuesta a lesión	54
8.4. Los canales termosensibles de la superfamilia TRP y la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en respuesta a lesión	56
9. CONCLUSIÓN.....	60
10. REFERENCIAS.....	61

1. RESUMEN

El daño axonal produce cambios funcionales en las neuronas sensoriales primarias. Estos cambios incluyen una descarga anormal de impulsos nerviosos, tanto espontáneos como evocados, que causan alteraciones en la percepción de estímulos ambientales, tales como la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo (sensibilidad dolorosa aumentada frente a un estímulo de frío no doloroso), una forma común de dolor neuropático. Esta forma de dolor, es un síntoma frecuente e inhabilitante en neuropatías que siguen al daño postquirúrgico de nervios periféricos, neuralgia post-herpética, diabetes ó quimioterapia en cáncer y es en gran medida refractaria al tratamiento con analgésicos y antiinflamatorios tradicionales. Algunos de los determinantes celulares y moleculares asociados al desarrollo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo son hasta ahora desconocidos. Las neuronas somatosensoriales primarias sensibles al frío (NsSF) expresan una gran variedad de canales iónicos, tanto de transducción como dependientes de potencial, implicados en al respuesta al frío. Entre estos canales iónicos destaca el canal termosensible TRPM8, principal entidad molecular responsable de la generación del potencial de receptor despolarizante que induce el aumento de la frecuencia de disparo ante un descenso de la temperatura en las neuronas sensibles al frío inocuo. Otro canal implicado en la termotransducción del frío es el TRPA1, el cual está presente en nociceptores y se activa con frío lesivo. Por otro lado, los canales de K^+ tipo *Shaker* Kv1.1 y Kv1.2, responsables de la corriente de freno I_{KD} , actúan como freno de excitabilidad en neuronas sensoriales primarias, ajustando su sensibilidad al frío en condiciones fisiológicas. El objetivo general de este trabajo de tesis fue determinar el papel de la corriente I_{KD} en la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en neuronas sensoriales primarias lesionadas de ganglios raquídeos. La hipótesis de trabajo de esta tesis es que la hipersensibilidad dolorosa al frío de las neuronas primarias sensoriales lesionadas resulta, en gran medida, de una reducción en la expresión funcional de los canales iónicos Kv1.1 y Kv1.2, responsables de la corriente de freno I_{KD} en respuesta a lesión.

Utilizamos la lesión crónica constrictiva del nervio ciático (LCC) como modelo de daño axonal periférico que induce hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo, en combinación con las técnicas de imagen de calcio y *patch clamp* en neuronas disociadas de ganglios raquídeos L3, L4 y L5. Estudiando las NsSF por imagen de calcio, hemos encontrado un incremento en la fracción de NsSF en los cultivos provenientes de animales lesionados. Este incremento viene acompañado de un desplazamiento en el umbral medio de temperatura de $2.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ hacia temperaturas más altas. En las NsSF control, la supresión farmacológica de la corriente de freno I_{KD} con 4-aminopiridina (4-AP) ó α -dendrotoxina (α -DTx) desplazó el umbral más de 2°C hacia temperaturas más altas. Este desplazamiento no fue observado en NsSF del grupo lesionado, sugiriendo que la corriente I_{KD} está disminuida en estas neuronas. Este resultado fue confirmado analizando la amplitud de la corriente I_{KD} por la técnica de *patch clamp*. Encontramos que la densidad promedio de la corriente I_{KD} está reducida en las NsSF del grupo lesionado, comparado con las NsSF de animales control. Adicionalmente, encontramos una subpoblación de neuronas insensibles al frío (NsIF), que se transformaron en neuronas sensibles al frío luego de la supresión farmacológica de la corriente de freno I_{KD} con 4-AP. Este fenómeno se encuentra reducido en neuronas somatosensoriales primarias del grupo lesionado, apoyando la idea que la corriente I_{KD} se encuentra disminuida en estas neuronas producto de la lesión axonal. Así, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, sugieren que la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo postlesión axonal podría estar relacionado con una reducción de la expresión funcional de la corriente de freno I_{KD} en neuronas somatosensoriales primarias lesionadas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Fisiología de las neuronas termorreceptoras de frío de alto y bajo umbral

En condiciones fisiológicas, la exposición de áreas del cuerpo a reducciones en la temperatura puede evocar una amplia variedad de sensaciones térmicas, que van desde el confort refrescante y el frío moderado hasta el dolor intenso (1-4), dependiendo de la intensidad del estímulo. El frío es detectado por termorreceptores cutáneos específicos, que incluyen las fibras aferentes primarias C amielínicas y las fibras pobremente mielinizadas A δ (5-8). La transducción del frío en impulso eléctrico propagado ocurre en las terminaciones libres de estas fibras termorreceptoras, que corresponden a los axones de las neuronas sensibles al frío de los ganglios trigémino y raquídeos (**Figura 1**).

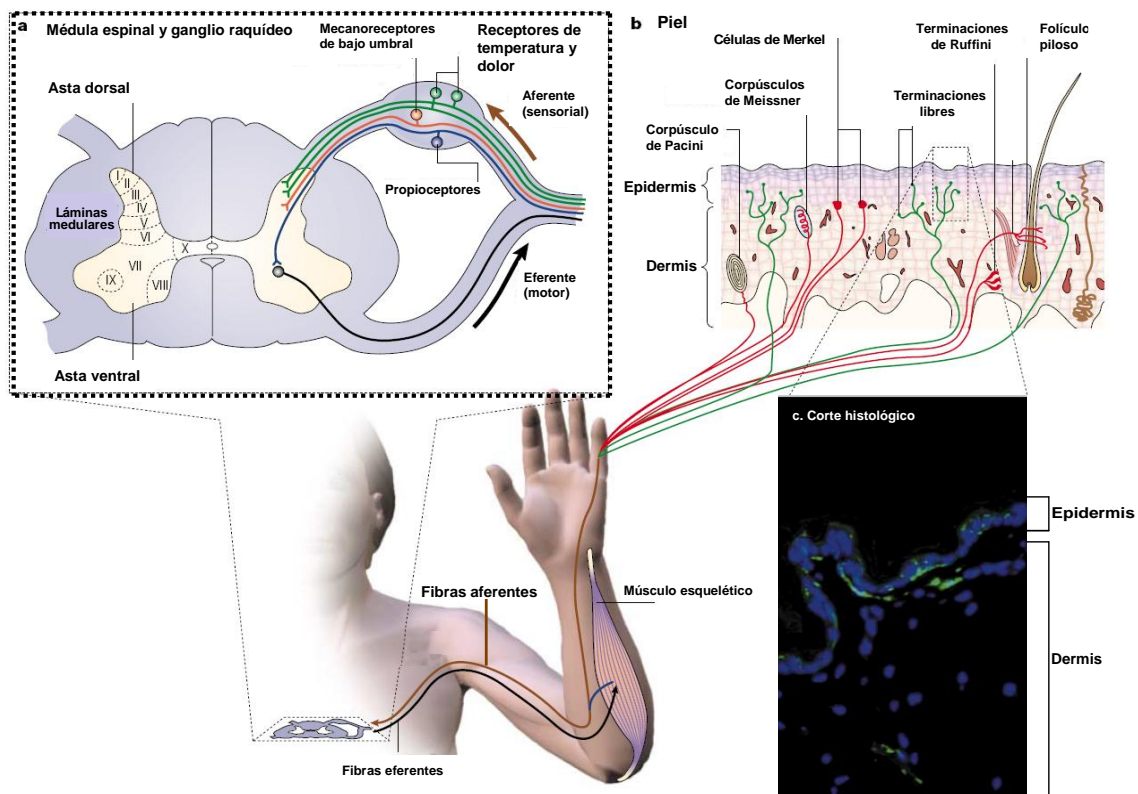


Figura1. Organización funcional y anatómica del sistema somatosensorial. **A.** Los nervios espinales son formados por la unión de raíces aferentes (sensoriales) y eferentes (motoras) y son los responsables de la inervación periférica de la piel, músculo esquelético, vísceras y glándulas. Las flechas indican la dirección de entrada sensorial (café) y salida de impulsos motores (negra). Los cuerpos celulares de las neuronas motoras se encuentran en el asta ventral de la médula espinal. Los cuerpos celulares de las neuronas somatosensoriales se localizan en los ganglios raquídeos. Dentro de los ganglios existen subclases de neuronas sensoriales conocidas como propioceptivas (azul), mecanosensores de bajo umbral (rojo) y neuronas sensibles a temperatura y estímulos potencialmente dolorosos (verde). Estas neuronas se proyectan centralmente a las interneuronas del asta dorsal y periféricamente a los tejidos blanco. **B.** Las neuronas sensibles a temperatura y nociceptores (verde) presentan terminaciones libres y se encuentran en todas las capas de la piel, vasos sanguíneos y cerca de folículos pilosos. **C.** Inmunofluorescencia para el marcador neuronal PGP9.5 (en verde) en sección transversal de piel que muestra las terminaciones nerviosas libres de las neuronas termorreceptoras y nociceptores. Modificado de Patapoutian et al 2003 (9).

Las neuronas sensibles al frío muestran un amplio rango de umbrales de temperatura capaces de evocar una respuesta eléctrica, y pueden ser clasificadas de acuerdo a la intensidad del estímulo en neuronas sensibles al frío inocuo y neuronas sensibles al frío lesivo, estas últimas con un papel de detección de frío doloroso en condiciones fisiológicas. A la temperatura normal de la piel (34-35°C), los receptores sensibles al frío inocuo o moderado presentan actividad eléctrica espontánea, principalmente en un patrón de descargas en estallido de potenciales de acción de impulsos nerviosos que aumenta su frecuencia en respuesta a reducciones en la temperatura incluso menores a 1°C (10). Esta respuesta es suprimida por calentamiento y potenciada por mentol (11-13). En contraste con los receptores de frío inocuo, los nociceptores que responden al frío lesivo están silentes en reposo y comienzan a disparar en respuesta a reducciones mayores en la temperatura (14;15). Este subgrupo de neuronas nociceptoras sensibles al frío responde también a otras modalidades de estímulos mecánicos lesivos (14;14-16), y se cree que su activación subyace a la sensación de frío doloroso (2;17).

Debido a la dificultad de registrar directamente desde los terminales de las neuronas sensibles al frío presentes en la piel, se ha utilizado entre otros el cultivo primario de los somas de las neuronas de ganglios raquídeos y trigémino como modelo de la terminal.

2.2. El canal termosensible TRPM8 como receptor de frío en neuronas somatosensoriales primarias

Las neuronas termorreceptoras de frío expresan una gran variedad de canales iónicos tanto de transducción como dependientes de potencial, cuya activación puede modificar su excitabilidad. Entre estos se encuentran principalmente los canales de la superfamilia TRP TRPM8 y TRPA1, canales de K^+ de fuga (o canales de *background*) como TREK-1 y TRAAK, y canales de K^+ tipo *Shaker* Kv1.1-1.2 (Figura 2).

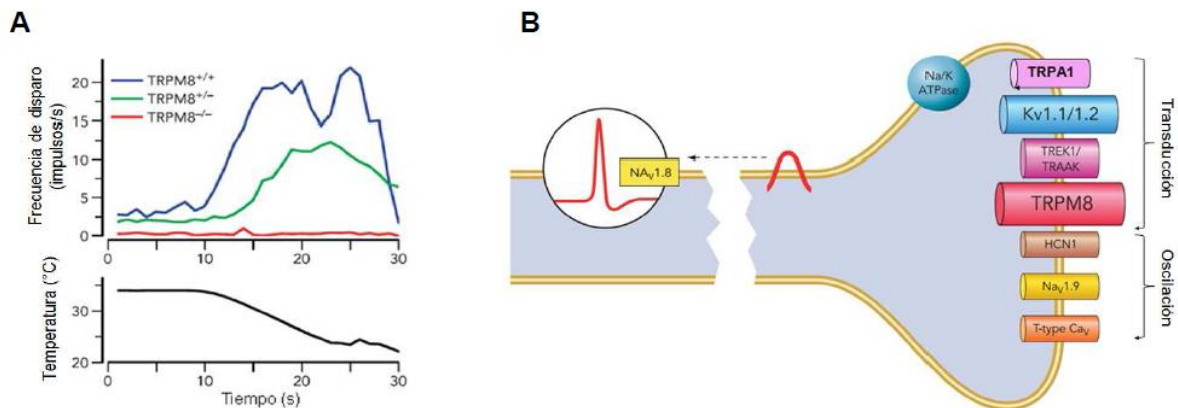


Figura 2. Representación esquemática de la función de TRPM8 y otros canales de iones en la actividad eléctrica y en la transducción térmica en neuronas sensibles al frío. **A.** Tasa de disparo de terminales libres de neuronas termosensibles de la córnea de ratón sometida a un descenso en la temperatura, provenientes de animales TRPM8^{+/+}, TRPM8^{+/-} y TRPM8^{-/-} (Adaptado de de Parra *et al.*, 2010 (10)). **B.** Diversidad de canales iónicos implicados en la transducción del frío. El sitio de transducción (derecha, terminal) se representa aparte del lugar de generación del potencial de acción (a la izquierda, axón). Modificado de Latorre *et al.*, 2011 (18).

La transducción del frío en impulsos eléctricos propagados, ocurre en las terminaciones libres de las fibras termorreceptoras. El canal termosensible TRPM8, identificado inicialmente como una proteína que se sobreexpresa en células de cáncer de próstata (19), fue clonado simultáneamente por dos grupos independientemente en 2002 (20;21). Este canal, pertenece a la superfamilia de los canales TRP (de *Transient Receptor Potential*), es una conductancia catiónica no selectiva, permeable al calcio, activada por frío, por sustancias que generan sensación de frío como el mentol, y por voltaje. Este canal iónico es considerado la principal entidad molecular responsable de la sensibilidad al frío inocuo y lesivo en neuronas sensoriales primarias del sistema somatosensorial. TRPM8 se expresa en el 10-15% del total de neuronas en el ganglio trigémino y en el 5-10% del total de neuronas en los ganglios raquídeos (22), principalmente en una subpoblación de neuronas sensibles al frío de diámetro pequeño (23). Evidencias recientes muestran que la población de neuronas que expresan TRPM8 no conforman una población homogénea (23). Estudios utilizando ratones nulos para TRPM8 indican que en estos animales existe una reducción de neuronas sensibles al frío tanto de alto como de bajo umbral, relacionando así a este canal con la sensibilidad tanto al frío inocuo como al frío lesivo (23-25). TRPM8 tiene un umbral de activación por temperatura en sistemas de expresión heteróloga de ~25°C, mientras que en los sistemas nativos su umbral de activación es de ~29°C (26;27). Esta diferencia se debe a un desplazamiento de su curva de dependencia de potencial hacia valores hiperpolarizantes en los sistemas nativos, lo que se traduce en una diferencia en el umbral de excitación

de la neurona sensorial primaria respecto del sistema heterólogo (27;28). Esta diferencia en la sensibilidad al frío observado en los sistemas nativos como consecuencia del desplazamiento en el umbral de respuesta hacia temperaturas más altas es fisiológicamente relevante. Los gradientes térmicos a través de la piel frente a un estímulo de frío extremo (como aplicar hielo sobre la piel), evitan descensos bruscos en la temperatura intradérmica (donde se encuentran las terminales libres), la cual implica que la temperatura en esta región no descenderá más allá de los 8°C por debajo de su temperatura normal (29;30). Esto implica que, frente a disminuciones leves de la temperatura del medio, una conductancia cuyo umbral de activación se encuentre lejos del valor de temperatura normal de la piel no podría dar cuenta de la extraordinaria sensibilidad térmica de las terminales de frío inocuo.

2.3. El canal termosensible TRPA1 como receptor de frío nocivo en neuronas sensoriales primarias

Luego del descubrimiento de TRPM8, fue identificado y clonado en el año 2003 otro canal TRP sensible a frío, el canal TRPA1 (31). Este canal responde a frío en sistemas de expresión heteróloga a temperaturas cercanas a los 17°C, muy por debajo del umbral de TRPM8. TRPA1 es un canal catiónico no selectivo, permeable a Ca^{2+} , activado por sustancias irritantes como la icilina y el cinamaldehído (32) y por agentes oxidantes (33;34). Este canal se coexpresa junto con TRPV1 en una subpoblación de nociceptores, sugiriendo su participación en la activación de neuronas somatosensoriales que responden a frío intenso (35). Evidencias recientes sugieren que la sensibilidad al frío intenso

no depende únicamente del canal TRPA1 (36). Madrid y colaboradores, han propuesto que la expresión diferencial de canales iónicos con efectos opuestos sobre la excitabilidad neuronal puede explicar la sensibilidad a frío extremo de las neuronas sensoriales, sin la participación significativa de TRPA1 (36). Sin embargo, se ha reportado que existen cambios en la expresión funcional de TRPA1 relacionados con el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa al frío post-lesión en axones periféricos (37-39).

2.4. TRPV1, un canal expresado en neuronas somatosensoriales primarias que participa en la transducción de estímulos térmicos

El canal termosensible TRPV1 es un canal catiónico no selectivo, permeable al calcio, activado por capsaicina (el compuesto vaniloide irritante presente en ajíes y pimientos), por calor nocivo ($>42^{\circ}\text{C}$) y por protones (40), entre otros. TRPV1 es regulado por una variedad de mediadores inflamatorios como la bradiquinina y la prostaglandina E2, y por neuroreguladores como el factor de crecimiento nervioso (NGF). Este canal es un importante blanco molecular que jugaría un papel fundamental en la sensibilización neuronal causada por mediadores de la inflamación y daño nervioso periférico (41;42). TRPV1 colocaliza con TRPA1 en una subpoblación de nociceptores y podría ser activado por mediadores inflamatorios y daño nervioso (37;43).

2.5. Modificaciones en la transducción sensorial y expresión de canales inducidas por la lesión de axones periféricos

En los últimos años, se ha logrado obtener evidencia experimental importante acerca de las propiedades electrofisiológicas de las terminaciones libres en las

neuronas somatosensoriales primarias sensibles al frío. Esto ha permitido en buena medida identificar los mecanismos moleculares implicados en la transducción del frío y en la génesis del patrón de disparo de impulsos nerviosos característico de las neuronas sensibles al frío (18;44). Sin embargo, aún se desconocen en gran parte las modificaciones celulares y moleculares que subyacen a los cambios en la capacidad transductora y la actividad espontánea, y que aparecen tras el daño de las terminaciones periféricas o del axón de neuronas nociceptoras y de bajo umbral. En principio, este cambio en la excitabilidad podría ser el origen de sensaciones patológicas (disestesias) y de dolor neuropático postlesión de origen periférico (45). La excitabilidad aumentada de las neuronas sensoriales dañadas estaría relacionada con cambios en la expresión de receptores y canales iónicos, así como también a modificaciones en sus propiedades funcionales tanto en el cuerpo celular como en los terminales axotomizados (46-49). Por ejemplo, se han reportado cambios en la expresión de canales de sodio dependientes de voltaje, encargados de la iniciación y propagación de los impulsos nerviosos a través del axón y cuerpo neuronal (50;51). El daño axonal produce un aumento en la expresión de un canal de Na⁺ antes silente, Nav1.3, y una reducción en la expresión de los canales Nav1.8 y Nav1.9 (50-52). Esto determina una modificación en las corrientes de Na⁺ que favorece el desarrollo de descargas ectópicas atípicas en los neuromas traumáticos (tumores benignos de tejido nervioso que surgen luego de procesos de daño axonal) que se forman en las zonas lesionadas (53).

Por otro lado, se ha propuesto que algunos tipos de canales de Ca^{2+} también participarían en la regulación del dolor neuropático (54). Los canales de Ca^{2+} tipo N (Cav2.2) se expresan sólo en neuronas, serían críticos en la neurotransmisión del dolor (54). Se ha reportado que la delección de este gen que codifica para los canales de Ca^{2+} tipo N reduce el dolor inflamatorio y el dolor neuropático (54). El bloqueo de la liberación de neurotransmisores regulada por canales de calcio tipo N es determinante en la supresión del dolor neuropático en estos modelos de dolor neuropático en ratón. Los canales de Ca^{2+} tipo R (Cav2.3) también tendrían un papel importante en la transmisión del dolor en neuronas sensoriales periféricas (55). En el caso de los canales de Ca^{2+} tipo T, que se expresan principalmente en la lamina superficial de la medula espinal y en los ganglios raquídeos, parecen tener un papel prominente en la regulación de la excitabilidad espinal que sigue a la estimulación repetitiva de las fibras C (56). Adicionalmente, la hipersensibilidad neuronal inducida por daño se reduce en presencia de ethosuximida, un bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo T, el que también inhibe la alodinia mecánica en algunos modelos de dolor neuropático (57). Además, se ha relacionado otros canales de Ca^{2+} tipo T (Cav3.2) con el desarrollo de dolor neuropático (58). La evidencia del papel de Cav3.2 proviene de estudios realizados en ganglios raquídeos de ratas con neuropatía diabética y en ganglios raquídeos provenientes de ratas sometidas a lesión constrictiva crónica del nervio ciático, evidenciándose en ambos modelos un incremento significativo de la corriente dependiente de estos canales de Ca^{2+} tipo T (58;59). Por otro lado, ratones *knockout* de Cav3.2 sometidos a pruebas

conductuales en presencia de estímulos agudos de tipo mecánico, químico y térmico, muestran una marcada disminución de sus respuestas nocifensivas en comparación con individuos silvestres (55).

Por otra parte, se han descrito cambios en los niveles de expresión de varios tipos de canales de potasio en respuesta a lesión axonal (60-64). Los canales de potasio TREK-1 y TRAAK, que se encuentran abiertos a la temperatura de la piel (34°C) impidiendo la activación de nociceptores, sufren modificaciones en sus niveles de expresión postlesión (63;64). Se ha reportado que ratones dobles nulos para TREK-1 y TRAAK, sometidos a lesión constrictiva en terminales periféricas de ganglios raquídeos, muestran hipersensibilidad al frío en pruebas conductuales (65). Así mismo, otro estudio ha establecido que la percepción dolorosa a frío en pacientes sometidos a quimioterapia, resulta de la modulación en la expresión ejercida por oxaliplatino (agente antineoplásico) sobre TREK-1 y TRAAK (66). Este fármaco, induce una disminución en los niveles de mRNA de los canales TREK-1 y TRAAK así como también un aumento en los niveles de mRNA del canal iónico activado por hiperpolarización HCN 1 (66).

2.6. Papel de TRPM8 en la hipersensibilidad al frío inducida por lesión en los axones periféricos

TRPM8 es considerado actualmente como la principal entidad molecular encargada de la termotransducción del frío en neuronas somatosensoriales primarias (18). Estudios recientes han demostrado que la expresión de TRPM8 no está limitada únicamente a neuronas sensibles al frío inocuo o de bajo

umbral, sino que además este canal se expresa en neuronas sensoriales primarias sensibles al frío de alto umbral conectadas con rutas nociceptivas (49). Estos hallazgos sugieren la participación de TRPM8 en la detección de frío doloroso en condiciones fisiológicas. Se ha descrito un aumento en la expresión de TRPM8 luego de lesiones nerviosas periféricas asociado al desarrollo y mantenimiento de la hipersensibilidad dolorosa al frío (67-69). Xing y colaboradores, utilizando el modelo de constricción crónica del nervio ciático en ratones, han reportado un aumento en la expresión de TRPM8 mediante inmunohistoquímica en los ganglios raquídeos a nivel de L5, respecto a los ganglios L5 de animales control (69). Sin embargo, este estudio no analiza posibles cambios en la distribución de umbrales de respuesta en las neuronas sensibles al frío o cambios en las propiedades biofísicas de las neuronas lesionadas. Por otro lado, evidencia más reciente ha sugerido que la hipersensibilidad dolorosa al frío no estaría relacionada con modificaciones significativas en la expresión del canal TRPM8 (70-72). En 2009, Caspani y colaboradores reportaron una disminución en la expresión funcional de TRPM8 en un modelo de lesión axonal periférica equivalente al utilizado en el trabajo de Xing de 2007 mencionado previamente (71). Estos resultados disímiles dejaron abierta la pregunta acerca del papel de TRPM8 en el desarrollo y mantenimiento en la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en respuesta a lesión. Por otra parte, en humanos la hipersensibilidad al frío inducida por el daño axonal periférico no parece estar relacionada a TRPM8 ni a TRPA1 (73). Estos resultados sugieren que los cambios en la expresión de los canales

termosensibles de la superfamilia TRP, por si solos, no son suficientes para explicar la aparición de los cuadros de hipersensibilidad dolorosa. Por lo tanto, estos cambios podrían estar asociados a modificaciones en otros canales iónicos implicados en la respuesta al frío, los cuales no han recibido la atención necesaria y probablemente sean la clave para entender estos resultados contradictorios y finalmente el mecanismo de la alodinia o hipersensibilidad dolorosa al frío.

2.7. La corriente de freno I_{KD} como determinante molecular en la hipersensibilidad dolorosa al frío post-lesión

Diversos canales de K^+ sensibles a voltaje juegan un rol en la excitabilidad de las neuronas somatosensoriales primarias. Utilizando herramientas de electrofisiología y biología molecular, se ha encontrado una reducción en los niveles de expresión de estos canales luego de la lesión periférica de axones, sugiriendo una participación en los procesos fisiopatológicos implicados en la transducción del frío (60-64;74;75). En 2009, Madrid y colaboradores, demostraron la influencia de una corriente de potasio tipo *Shaker* sobre la sensibilidad al frío en neuronas primarias del sistema somatosensorial (36). Esta corriente, denominada I_{KD} y asociada a heteromultímeros de canales de potasio Kv1.1 y 1.2, es una corriente de activación rápida e inactivación lenta, sensible a bajas concentraciones de 4-aminopiridina (4-AP). Esta conductancia está presente en las neuronas sensibles al frío y en neuronas de otras modalidades sensoriales (76) y funciona como un freno a la excitabilidad en neuronas sensoriales primarias (36;76). La corriente I_{KD} se activa a potenciales

de membrana subumbrales al disparo de potenciales de acción, una característica relevante para el control de la respuesta al frío en neuronas sensoriales primarias. De este modo, la activación de esta corriente por despolarización se opone al efecto despolarizante de TRPM8, que se activa ante un descenso en la temperatura. Por lo tanto, la corriente de freno I_{KD} amortigua al aumento del valor del potencial de membrana desde el valor de reposo (-50 a -60 mV) hacia desvalores de potencial de membrana umbral al disparo de potenciales de acción (~-38 mV en las neuronas sensibles al frío) (36). En este mismo trabajo, Madrid y colaboradores encontraron una correlación entre el umbral térmico y el nivel de expresión de la corriente I_{KD} , concluyéndose que las neuronas sensibles al frío con alto umbral de respuesta expresaban altos niveles de I_{KD} y bajos niveles de corriente dependiente de TRPM8 (36). Por el contrario las neuronas que presentan una mayor corriente de frío dependiente de TRPM8 y baja densidad de corriente I_{KD} presentan umbrales de activación más bajos, es decir, se activan ante descensos menores en la temperatura respecto de la temperatura normal en la piel (34°C). Estos datos sugieren que la expresión funcional tanto de I_{TRPM8} , como de I_{KD} es crítica en la determinación del umbral de temperatura en las neuronas sensibles al frío. Así, el umbral térmico de las neuronas termorreceptoras de frío dependería en buena medida de un balance en la expresión funcional de canales TRPM8 y canales de potasio Kv1.1-1.2.

Así, tanto TRPM8 como Kv1.1-1.2, canales iónicos cuya activación tiene efectos contrapuestos sobre la excitabilidad neuronal, podrían sufrir modificaciones en su expresión luego de procesos de lesión axonal periférica.

Estas modificaciones podrían tener una contribución central en la aparición y mantenimiento de los cuadros de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo, cuyas bases celulares y moleculares aún no han sido completamente aclaradas. Basados en la evidencia actual y los antecedentes presentados, planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

3. HIPÓTESIS

La hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo, inducida por lesión en las neuronas sensoriales primarias, resulta en gran medida, de una reducción en la expresión funcional de los canales de potasio tipo *Shaker* Kv1.1-1.2, responsables de la corriente de freno I_{KD} .

Para el desarrollo de este trabajo de tesis, se definieron los siguientes objetivos:

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la corriente I_{KD} en la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo postlesión en neuronas sensoriales primarias.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Poner a punto un modelo para la generación de daño axonal periférico e inducción de cuadros alterados de sensibilidad al frío en ratones.

2. Determinar por imagen de calcio las alteraciones en la respuesta a frío (umbral y amplitud) de las neuronas sensoriales primarias control y lesionadas en cultivo.
3. Caracterizar, utilizando imagen de calcio, los diferentes tipos de neuronas sensoriales involucrados en la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo, mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos de canales iónicos de interés (TRPM8, TRPA1, TRPV1).
4. Determinar la densidad de corriente I_{KD} y de la corriente de frío despolarizante dependiente de TRPM8 en neuronas provenientes de animales control y lesionados, con el fin de establecer un correlato electrofisiológico de los cambios en la excitabilidad de las neuronas sensibles a frío con las modificaciones en su sensibilidad a estímulos químicos y físicos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado utilizando 48 ratones (24 controles y 24 lesionados) adultos jóvenes (P21) de la cepa BalbC. Los animales fueron mantenidos en jaulas con un máximo de 4 ratones por caja, y alimentados *ad libitum*, con un régimen de luz de 12 horas con temperatura regulada. El manejo, cuidado y realización de los experimentos con animales se realizó siguiendo las normas bioéticas de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) y con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Chile. Se adjunta formulario de protocolo para manejo y cuidado de los animales de laboratorio y carta de aceptación del comité.

6.1. Modelo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo inducida por daño axonal

Se utilizó la constricción crónica del nervio ciático como modelo para inducir hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en la superficie plantar de la pata trasera derecha del ratón. Previa asepsia y antisepsia, se aplicó anestesia intraperitoneal con 80 mg/Kg de ketamina y 10 mg/Kg xilazina. Posteriormente se realizó una incisión en piel y se separaron las cabezas del músculo bíceps femoral para exponer el nervio ciático. El nervio fue liberado del tejido conectivo que lo rodea aproximadamente 7-8 mm. Luego, se realizó una doble constricción del nervio con sutura no absorbible 8-0, con una separación de 5 mm entre ambas constricciones, localizadas 5 mm proximales a la bifurcación tibio-peroneal. La constricción fue realizada bajo lupa con una reducción del diámetro del nervio de aproximadamente 20%. Con el fin de prevenir la pérdida de

presión de la sutura atada al nervio a cada circunferencia se le realizaron dos contranudos. En el grupo de los ratones control se llevo a cabo el mismo procedimiento que en los ratones lesionados, donde se avanzó hasta la exposición del nervio y liberación del tejido conectivo, para posteriormente cerrar con sutura el músculo y la piel. Una vez terminado el procedimiento, se aplicó analgesia con buprenorfina al 10%, 0.02-0.05 mg/Kg y luego se continuó el tratamiento analgésico cada 6 horas por 3 dosis durante las primeras 24 horas. En el día uno, la analgesia se aplicó cada 8 horas, y en los días 2 y 3 cada 12 horas. Posteriormente, los animales fueron vigilados respecto a una correcta ganancia de peso y conducta de acuerdo al Protocolo de Morton y Griffiths 1985, modificado para lesión del nervio ciático.

6.2. Evaluación de la conducta mediante la prueba de acetona

La estimulación con frío inocuo de los animales se realizó mediante la prueba de acetona, que consiste en la aplicación de una gota de acetona sobre la piel del ratón en la región de interés, cuya evaporación produce un enfriamiento local a nivel de la piel. Los animales fueron sometidos a un período de adaptación de 30 minutos sobre la rejilla de evaluación de conducta, la cual permitía un fácil acceso a la región plantar de la pata del animal. Luego se aplicó una gota de acetona de 30 μ L con una jeringa de 1 mL, con extremo romo para evitar punciones, a través de la base de rejilla. Este procedimiento se realizó tanto en la pata lesionada (ipsilateral) como en la no lesionada (contralateral) en animales control y lesionados. Cada ratón se evaluó tres veces en cada pata, con una separación de 5 minutos por cada ensayo. La respuesta fue evaluada y

puntuada en base a la escala de Choi y colaboradores (77). El puntaje dado según la conducta del ratón luego de la aplicación de la acetona en la pata fue de 0 a 3, donde 0 corresponde a la ausencia de respuesta; 1 a la retirada ligera de la pata; 2 a la retirada ligera de la pata y movimiento repetido de ésta; 3 movimiento repetido de la pata asociado a lamido o no apoyo de la extremidad.

6.3. Preparación de neuronas disociadas de los ganglios raquídeos

A los 7 días luego del procedimiento de lesión, cada pareja de ratones (control y lesionado) fue sacrificada por inhalación de CO₂. Posteriormente, se procedió a extraer los ganglios raquídeos lumbares ipsilaterales a la lesión (L3, L4, L5) mediante extracción de la columna lumbar y torácica completa, y posterior extracción de los ganglios de la raíz dorsal lumbar (L3, L4, L5) bajo campana. La extracción se realizó fracturando con un bisturí las vértebras correspondientes, luego removiendo la medula espinal y posteriormente traccionando los ganglios a través de los orificios vertebrales. Los ganglios fueron recibidos en tampón fosfato salino (PBS) frío, retirando luego tejido conectivo y mielina, y se incubaron posteriormente a 37°C por 40 minutos en colagenasa tipo XI (650 UI/mL; sigma) y dispasa (5UI/mL, GIBCO) en una solución INC-mix (en mM: 155 NaCl, K₂HPO₄ 1.5, HEPES 10, Glucosa 5, pH: 7.4), bajo CO₂ al 5%. Después de este tiempo, los ganglios fueron disociados mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur de vidrio pulida, y la suspensión celular resultante se centrifugó a 2000 rpm (450 g) por 10 minutos. El pellet celular fue resuspendido y la suspensión fue aplicada sobre cristales de 6 mm de diámetro y 50 µm de espesor (#00) (Menzel-Glaser) recubiertos previamente

con poli-L-lisina. Luego de 4 horas, las placas de cultivo conteniendo los cristales fueron rellenas con 2 mL de medio MEM (Earle's salts, GIBCO) suplementado con MEM-vit (GIBCO), 10% suero bovino fetal (FBS-Invitrogen), 200 µg/mL de estreptomicina, 125 µg/mL penicilina, 17mM de glucosa y factor de crecimiento nervioso (NGF) 100 ng/mL. Los cultivos celulares se dejaron a 37°C para ser utilizados al cabo de 12 horas. Los cultivos neuronales fueron estudiados simultáneamente por parejas (1 control, 1 lesionado) alternando siempre cristales de ambos grupos.

6.4. Imagen de Ca²⁺

En los experimentos de imagen de calcio, las neuronas fueron preincubadas a 37°C con 5 µM de fura-2 AM (Invitrogen) disuelto en solución extracelular estándar suplementada con 0.02% de ácido plurónico (Invitrogen) durante una hora. La solución estándar del baño contenía (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, (298mOsm/Kg, pH 7.4 ajustado con NaOH). Las mediciones de fluorescencia fueron hechas utilizando el programa HClmage v3.0 (Hamamatsu) con un microscopio invertido Nikon modelo Ti equipado con una cámara refrigerada ORCA C8484-03G02 CCD (Hamamatsu) de 12 bit. El Fura-2 fue excitado a 340 nm y 380 nm con un monocromador Polychrome V (Till photonics), con tiempos de exposición no mayores a 40 ms. La temperatura del baño (ver descripción detallada más adelante) fue muestreada simultáneamente mediante un termómetro con microsonda Physitemp BAT-12 (Physitemp Instruments) suplementado con una termocupla (IT-18), usando el software Clampex 10.3 (Molecular Devices). Los umbrales de

temperatura fueron estimados como describen Madrid y colaboradores (2009), interpolando la temperatura que se encuentra justo en el punto medio del Ca^{2+} basal y el primer punto donde éste aumenta 4 veces por sobre la desviación estándar de la línea base (36). Se tomó como respuesta positiva al frío cuando el cambio en la razón de fluorescencia (ó Ratio) 340 nm / 380 nm fue mayor a 0.05. En las NsSF, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular observado en respuesta a un descenso en la temperatura es debido a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que son activados durante el disparo de potenciales de acción (26;76).

6.5. Electrofisiología

Los registros de potencial o corriente de membrana se llevaron a cabo por la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula-completa, simultáneamente con el registro de la temperatura. La solución estándar del baño contenía (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1.3 MgCl_2 , 2.4 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 glucosa, (298mOsm/Kg, pH 7.4 ajustado con NaOH). Las pipetas de registro (4-5 M Ω para registros de célula-completa convencional) fueron confeccionadas empleando un estirador SUTTER P-87, con vidrio capilar de borosilicato (GC150F-7.5, Harvard Apparatus Ltd, UK). Las pipetas fueron llenadas con solución intracelular que contenía (en mM): 105 gluconato de K^+ , 35 KCl, 8.8 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 4 NaATP, 0.4 NaGTP, (300 mOsm/kg y pH 7.4, ajustado con KOH). Las señales de corriente y voltaje fueron registradas con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices). Los protocolos para los registros de corriente y de voltaje y la adquisición de datos fueron hechos con el

software pClamp 10.3 (Molecular Devices). El umbral térmico de las neuronas sensibles al frío fue establecido previamente en todos los casos en condiciones no invasivas mediante imagen de Ca^{2+} .

Para los experimentos electrofisiológicos, luego de la determinación del umbral de temperatura mediante imagen de Ca^{2+} , se paso a caracterizar la corriente I_{KD} en las neuronas de los ganglios raquídeos en mayor detalle, las neuronas en cultivo fueron registradas en la configuración de célula completa bajo voltaje controlado, donde la corriente de mantenimiento fue de -50 mV, un pulso hiperpolarizante a -120 mV fue aplicado antes de alcanzar el potencial de membrana sub-umbral de -40 mV. La cuantificación de la corriente se realizó un segundo después de iniciado el pulso a -40m, como han descrito Madrid y colaboradores (36). Para el registro de la corriente de frío, las células fueron mantenidas a -60 mV, se hacía un descenso en la temperatura de $34 \pm 1^\circ\text{C}$ a $20 \pm 1^\circ\text{C}$; una vez alcanzados los 20°C , la temperatura era mantenida constante. La diferencia entre la corriente de mantención a ambas temperaturas fue considerada como la corriente sensible al frío ($I_{\text{frío}}$). La corriente máxima dependiente de TRPM8 se tomó como la corriente hacia el interior potenciada por 100 μM de mentol a 20°C ($I_{\text{frío+mentol}}$).

6.6. Estimulación de las neuronas sensoriales primarias en cultivo con temperatura

Los cristales con las neuronas dissociadas, fueron dispuestos en una microcámara continuamente perfundida (~ 1 mL/min), con la solución estándar de baño anteriormente descrita, a 34°C . La temperatura fue ajustada con un

dispositivo Peltier refrigerado por agua, controlado por un dispositivo de retroalimentación y con su salida muy cerca al campo de la imagen. Las neuronas sensibles al frío fueron identificadas mediante un descenso en la temperatura hasta los 19°C, de una duración aproximada de 40 segundos, a partir de los 34°C. Este estímulo térmico fue aplicado tanto en situación control como en presencia de diferentes agentes farmacológicos de interés.

6.7. Protocolo experimental para la estimulación con diferentes agentes farmacológicos

Se utilizó el protocolo de cambio de temperatura descrito anteriormente y de manera simultánea se monitorizó la $[Ca^{2+}]$ intracelular, identificando de esta manera las neuronas sensibles al frío. Luego de la identificación de las NsSF de ambos grupos, se aplicó 4-aminopiridina (4-AP) 100 μ M ó α -DTx 500 nM, ambos bloqueadores de los canales de potasio de interés, durante 90 segundos. Posteriormente, se realizó un segundo descenso en la temperatura, con el fin de observar el efecto sobre el umbral de respuesta a frío en las neuronas sensibles a este estímulo, seguido de un lavado de 5 minutos. Luego de esto se aplicó mentol (activador del canal TRPM8) 100 μ M durante 60 segundos, y se hizo un tercer descenso en la temperatura, seguido de un lavado de 5 minutos. Posteriormente se aplicó AITC (un activador del canal TRPA1) a una concentración de 100 μ M durante 60 segundos, seguido de un lavado de 5 minutos. Luego se aplicó capsaicina (activador del canal TRPV1) 100 nM durante 60 segundos seguido de un lavado. Por último se aplicó estímulo de

alto K^+ (30mM KCl) para estimar el número total de neuronas funcionales en el campo estudiado.

7. RESULTADOS

7.1. La constricción crónica del nervio ciático (LCC) en ratones como modelo de lesión axonal que genera hipersensibilidad al frío inocuo

En esta tesis se utilizó la constricción crónica del nervio ciático (LCC) como modelo de dolor neuropático (Figura 3A). Esta forma de lesión axonal periférica genera hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en respuesta al daño axonal de las neuronas sensoriales primarias. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de cuadros de hipersensibilidad dolorosa al frío en roedores (69;71;78). La Figura 3B muestra que los animales sometidos a LCC desarrollan conductas nocifensivas, incluso a tiempos tan cortos como un día después la lesión, frente a la estimulación con frío inocuo de acuerdo al ensayo de acetona descrito en detalle en el apartado de Metodología. El 87.5% de los ratones sometidos a LCC (21/24) mostraron respuestas de hipersensibilidad a la estimulación con frío inocuo, tales como lamido, aislamiento, o movimientos repetitivos de la pata. Estas respuestas alcanzaron su valor máximo en el tercer día ($p=0.003$, prueba t) y se mantuvieron estables al menos por 14 días, siendo significativamente mayor que en los ratones control (Figura 3B). Los experimentos que siguen fueron hechos al séptimo día luego de la lesión axonal.

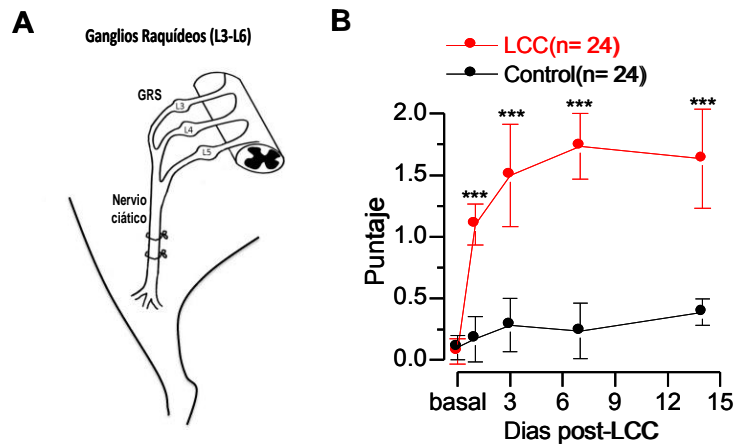


Figura 3. Conducta nocifensiva en ratones lesionados en respuesta a la estimulación con frío inocuo mediante el modelo de constricción crónica del nervio ciático. **A.** Esquema que representa el modelo de lesión constrictiva del nervio ciático. **B.** Curso temporal de la respuesta alodínica a la prueba de acetona en ratones control (n=24, línea y puntos negros) y lesionados (n=24 línea y puntos rojos), descrita en métodos. Los asteriscos corresponden a una p=0.001 para el día 1, p=0.001 para el día 3, p=0.002 para el día 7 y p=0.003 para el día 14 (prueba t).

7.2. Las neuronas somatosensoriales primarias de animales lesionados muestran mayor sensibilidad individual y poblacional al frío que las neuronas de animales control

Con el fin de caracterizar la respuesta al frío de las neuronas sensoriales primarias provenientes de animales control y lesionados, utilizamos la metodología de imagen de calcio. Utilizamos el indicador de Ca^{2+} Fura-2 en cultivos primarios de neuronas provenientes de los ganglios raquídeos (L3-L5), ganglio sensoriales que reúnen los somas de las neuronas somatosensoriales primarias que proyectan en el nervio ciático. La Figura 4A muestra una respuesta al frío típica de una neurona termorreceptora en cultivo de ganglios raquídeos control. El trazo superior muestra que la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta rápidamente ante el descenso en la temperatura del baño

(representado en el trazo inferior) y que se recupera a niveles basales luego de unos segundos. La temperatura umbral promedio de las respuestas al frío de los termorreceptores en cultivo de los animales control y LCC se muestra en la Figura 4B. La temperatura umbral promedio de respuesta al frío en las NsSF del grupo control fue de $28.2 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ($n= 112$), mientras que el umbral medio de respuesta al frío en las NsSF del grupo LCC fue de $30.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ($n= 119$) ($p<0.001$, prueba t). En la Figura 4C se representa el gráfico acumulativo de la población activa de NsSF de acuerdo a intervalos de temperatura umbral, frente a un descenso en la temperatura. La distribución de la temperatura umbral de las NsSF de animales con LCC muestra un desplazamiento significativo de aproximadamente dos grados Celsius hacia temperaturas más altas, comparada con la distribución de umbrales de las NsSF del grupo control. Adicionalmente, se analizó la amplitud de las respuestas al frío en ambos grupos de NsSF, evaluadas por la diferencia entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el punto máximo de las respuestas al frío. La respuesta máxima proporcional a la frecuencia de disparo de la neurona termorreceptora (26). Las respuestas sobrepuestas de 112 NsSF de animales control y 119 de animales lesionados frente a un descenso de la temperatura son mostradas en la Figura 4D. Encontramos que la respuesta máxima en las NsSF provenientes de animales lesionados es mayor, con un valor de 306 ± 19 nM ($n=112$) en las neuronas control y 436.88 ± 18 nM ($n=119$) respecto de las neuronas provenientes de animales control ($p<0.05$, prueba t) (Figura 4E). Estos resultados sugieren que, a nivel individual, las NsSF provenientes de animales sometidos a LCC presentan un incremento

en la concentración de Ca^{2+} intracelular mayor en respuesta a frío que las neuronas control, debido a una mayor frecuencia de disparo de potenciales de acción que activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (26). Para evaluar posibles cambios en la fracción de NsSF presentes en los cultivos de neuronas somatosensoriales provenientes de los dos grupos experimentales, se cuantificó el número de NsSF respecto al número total de neuronas analizadas por imagen de calcio. La Figura 4F (panel superior), muestra que existe un aumento significativo en el porcentaje de NsSF en el grupo LCC comparado con los animales control (8.1%, n=112 de 1385 neuronas control, versus 11.4%, n=119 de 1044 neuronas LCC; $p < 0.05$, prueba χ^2). Las NsSF presentan un amplio rango de umbrales de activación frente a un descenso en la temperatura, tanto *in vivo* como *in vitro*, y pueden ser clasificadas operacionalmente en NsSF de bajo y alto umbral (36;79). En este trabajo se clasificaron como NsSF de bajo umbral (NsSF-BU) a aquellas neuronas cuyo umbral de activación fue igual o mayor a 26.5°C . La Figura 4F (panel inferior) muestra que en los animales control las NsSF-BU representaron el 74.1% (n= 83) del total de la población de NsSF (umbral medio= $29.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$). El resto de ellas (25.9%, n=29) corresponden a NsSF de alto umbral (NsSF-AU), con un umbral medio de respuesta de $24.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$. Por su parte, en los animales con LCC, el 90.7% (n=108) de las NsSF ($p < 0.05$, prueba χ^2) corresponden a NsSF-BU, con un umbral medio de $31.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$, mientras que sólo el 9.3% (n=11) fueron NsSF-AU, con un umbral medio de $24.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Figura 4F), evidenciando un aumento importante de las neuronas sensibles al frío de bajo umbral en los ratones LCC.

En su conjunto, estos resultados sugieren que los mecanismos periféricos de hipersensibilidad dolorosa al frío en los animales LCC no incluyen sólo una mayor sensibilidad individual a los descensos en la temperatura, reflejado en el desplazamiento del umbral hacia temperaturas más altas, sino también un aumento en la población total de NsSF a partir de NsSF-AU. Una subpoblación de estas NsSF-AU, que señalizan frío intenso y doloroso, se transformarían en neuronas de bajo umbral sensibles a frío en el rango inocuo.

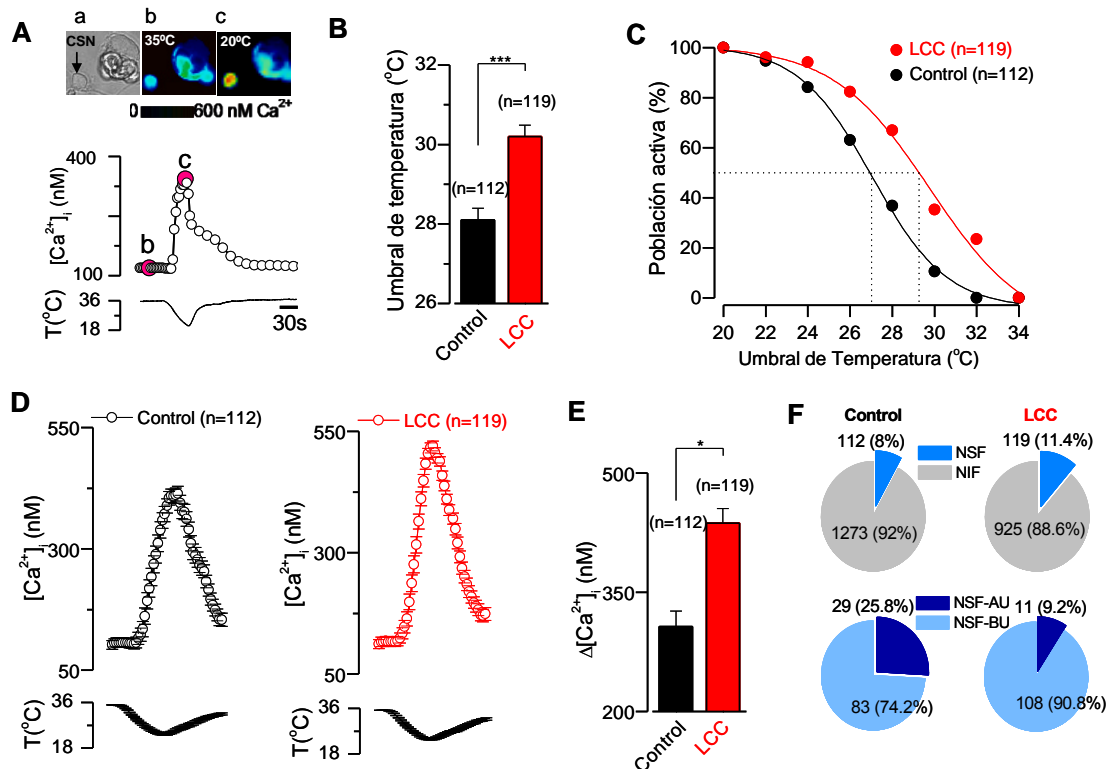


Figura 4. Sensibilidad al frío en las neuronas sensoriales primarias control y lesionadas.

A. Respuesta ratiométrica de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a enfriamiento (panel central) en una NsSF control, registrada simultáneamente con la temperatura del baño (panel inferior). En el panel superior se muestra la imagen de transmisión (a), en b y c se muestran las imágenes en pseudocolor de la respuesta ratiométrica de la $[Ca^{2+}]_i$ que corresponden con b y c en el panel central. **B.** Gráfica de barras que representa el umbral medio de la respuesta al frío obtenido mediante imagen de Ca^{2+} en las neuronas raquídeas en cultivo, control (barra negra) lesionadas (barra roja) Se indica el número total de neuronas en cada condición. ($p < 0.001$, prueba *t*). **C.**

Distribución acumulativa del umbral de temperatura de las neuronas sensibles al frío activadas durante un descenso en la temperatura. En línea y puntos negros el grupo control (n=112), en línea y puntos rojos el grupo lesionado (n=119). **D.** Respuesta media ratiométrica de la $[Ca^{2+}]_i$ (arriba) durante un descenso en la temperatura (abajo) en 112 NsSF control (panel izquierdo, negro) y en 119 NsSF lesionadas (panel derecho, rojo). **F** Gráfica de barras que representa la magnitud promedio de la respuesta inducida por frío en el grupo control (barra negra, n=112) y el grupo lesionado (barra roja, n=119), ($p < 0.05$, prueba t). **H.** Gráfica circular de distribución de la población de las NsSF provenientes de animales control (izquierda) y lesionados (derecha). NSF-AU indica neuronas sensibles al frío de alto umbral, NSF-BU indica neuronas sensibles a frío de bajo umbral. NIF corresponde a neuronas insensibles a frío.

7.3. El umbral de las respuestas de frío de las NsSF lesionadas no se modifica al bloquear la corriente de freno I_{KD}

Se ha reportado que el umbral de temperatura de las neuronas sensibles al frío es determinado en gran medida por actividad de la corriente de potasio I_{KD} (36). Esta corriente, de activación rápida e inactivación lenta, sensible a 4-Aminopiridina (4-AP), actúa como freno de la excitabilidad en las neuronas sensoriales primarias (36;76). Con el fin de determinar la contribución de la corriente I_{KD} en la determinación del umbral de respuesta al frío en las NsSF raquídeas control y lesionadas, se evaluó el efecto de la aplicación de 4-AP y α -Dendrotoxina (α -DTx), ambos bloqueadores de la corriente I_{KD} (36;76). En la Figura 5A, se muestra un registro representativo del efecto de la supresión farmacológica de la corriente de freno I_{KD} por 4-AP sobre la respuesta a un estímulo de frío, en una neurona sensible a frío del grupo control. En presencia de 4-AP, el umbral de la respuesta al frío se desplaza más de dos grados hacia temperaturas más altas (Figura 5A). Este desplazamiento del umbral hacia temperaturas más altas en respuesta a 4-AP, no fue observado en NsSF del grupo lesionado, tal como se muestra en la Figura 5B. Los umbrales de activación de las NsSF del grupo control fueron desplazados hacia temperaturas

más altas en el 83.3% de las células (20/24), en presencia del bloqueador de la corriente I_{KD} (Figura 5C). Sólo en una de las 24 neuronas, 4-AP desplazó el umbral de respuesta a frío hacia temperaturas más bajas (Figura 5C). En las NsSF del grupo control, el umbral promedio de respuesta al frío fue de $27.2 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ ($n=24$). En presencia del bloqueador de la corriente de freno, su umbral medio de activación fue desplazado hacia temperaturas más altas ($29.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) ($p= 0.007$, prueba t pareada) (Figura 5E). En 25 NsSF del grupo lesionado estudiadas en las mismas condiciones, el umbral promedio de activación se mantuvo prácticamente inalterado luego de la aplicación de 4-AP, mostrando incluso una tendencia a desplazar el umbral hacia temperaturas más bajas, la cual sin embargo no fue estadísticamente significativa ($30.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ contra $29.4 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$; $p= 0.678$, prueba t pareada) (Figura 5D y E). Sólo en el 16% de las NsSF (4/25), la 4-AP desplazó el umbral de respuesta al frío hacia temperaturas más altas, mientras que el 64% de las NsSF (16/25) no presentaron cambios en el umbral, y en el 20% de las NsSF (5/25) su umbral de respuesta a frío fue desplazado a temperaturas más bajas (Figura 5D).

Resultados similares fueron obtenidos utilizando α -DTx (Figura 5F), donde el umbral medio de respuesta a frío en las NsSF del grupo control fue $26.1 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$ ($n= 11$), y en presencia de α -DTx fue de $29.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ($p=0.03$, prueba t pareada), mientras que en las NsSF lesionadas, el umbral medio de respuesta al frío fue de $27.5 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ ($n= 9$) y en presencia de α -DTx fue de $26.6 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ($p= 0.69$, prueba t pareada). La ausencia de desplazamiento del umbral por 4-AP o α -DTX en las neuronas lesionadas sugiere que la corriente I_{KD} está

fuertemente disminuida en este grupo de neuronas, lo que podría dar cuenta de la hipersensibilidad térmica observada respecto de las neuronas control.

En su conjunto, estos resultados son consistentes con la idea que el aumento en la sensibilidad térmica de los animales LCC está ligado a una reducción de la expresión funcional de la corriente sensible a 4-AP y α -DTx (I_{KD}) en respuesta al daño axonal.

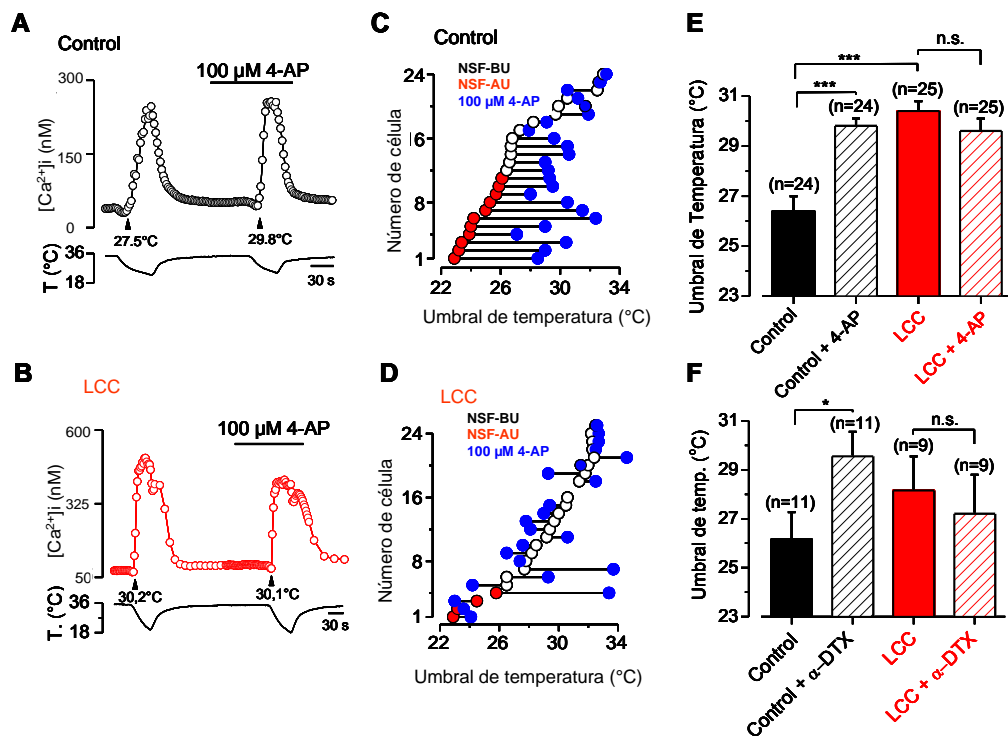


Figura 5. Efecto de la supresión farmacológica de la corriente I_{KD} sobre el umbral térmico de la respuesta al frío en NsSF control y lesionadas. **A.** Respuesta ratiométrica de la $[Ca^{2+}]_i$ en una NsSF control durante dos descensos consecutivos en la temperatura, el primero con solución control y el segundo en presencia de 100 μ M de 4-Aminopiridina. En esta neurona el umbral de respuesta a frío fue desplazado hacia temperaturas más altas, de 27.5 a 29.8°C (puntas de flecha negras). **B.** Respuesta ratiométrica de la $[Ca^{2+}]_i$ de una NsSF del grupo lesionado durante dos descensos consecutivos en la temperatura, el primero con solución control y el segundo en presencia de 100 μ M de 4-AP. En esta neurona el umbral de respuesta a frío no fue afectado por la aplicación del bloqueador (30.2 contra 30.1°C, puntas de flecha negras). **C.** Efecto individual de 100 μ M de 4-AP en el umbral de temperatura para 24 NsSF del grupo control. **D.** Efecto individual de 100 μ M de 4-AP en el umbral de temperatura para 25 NsSF del grupo lesionado. **E.** Gráfica de barras que representa el umbral medio de respuesta al frío en NsSF control (barra negra), control + 4-AP (barra achurada negra), lesionadas (barra roja) y lesionada + 4-AP (barra achurada roja). Nótese que el umbral medio de temperatura de respuesta a frío en las NsSF del grupo lesionado no es afectado por la presencia del inhibidor de

la corriente I_{KD} . F. Gráfica de barras resumen del umbral medio de respuesta al frío en NsSF control (barra negra), control + α -DTx (barra achurada negra), lesionadas (barra roja) y lesionada + α -DTx (barra achurada roja). Nótese que el umbral medio de temperatura de respuesta a frío en las NsSF del grupo lesionado no es afectado por la inhibición de la corriente I_{KD} por la toxina.

7.4. La fracción de neuronas insensibles al frío que son transformadas en neuronas sensibles al frío por supresión de la corriente I_{KD} está reducida en neuronas provenientes de animales lesionados

Se ha reportado que la supresión farmacológica de la corriente I_{KD} induce sensibilidad al frío en una subpoblación de neuronas somatosensoriales primarias insensibles al frío (76). Si efectivamente la corriente I_{KD} está disminuida en las neuronas sensibles a frío en respuesta al daño axonal, es razonable suponer que el fenómeno de reclutamiento de neuronas insensibles que se vuelven sensibles a frío por el bloqueo de la corriente de freno será menos frecuente en los cultivos de neuronas lesionadas. Nuestros resultados muestran que, efectivamente, en cultivos de neuronas control, la supresión de la I_{KD} por 4-AP indujo el reclutamiento de una subpoblación de NsIF que se transformaron en sensibles al frío (Figura 6). En la Figura 6A se muestra un trazo representativo de una NIF control, la cual se transforma en una neurona sensible al frío frente a un segundo descenso de la temperatura en presencia de 4-AP. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a frío en estas células es también el resultado del disparo de potenciales de acción de la neurona transformada, como se confirmó por registros de *patch clamp* en la modalidad de célula completa y corriente controlada (Figura 6B). La Figura 6B muestra el registro de potencial de membrana de una neurona que inicialmente era insensible a frío y que luego de la aplicación de la supresión de la corriente de freno I_{KD} respondió

a un segundo descenso en la temperatura con un tren de potenciales de acción. La Figura 6C muestra que el fenómeno de reclutamiento descrito anteriormente, está menos representado en cultivos de neuronas lesionadas. En cultivos control, el 7.9% (21/266) de las NsIF, respondieron a un estímulo de frío luego de 4-AP. En cambio, en los cultivos de neuronas lesionadas, la aplicación de 100 μ M de 4-AP sólo transforma el 2.5% de las NsIF (3/120) en neuronas sensibles al frío (Figura 6C) ($p < 0.05$). En el grupo control, la amplitud media de las respuestas obtenidas durante la estimulación con frío previa a la aplicación de 4-AP fue de -11 ± 17 nM, mientras que la respuesta inducida por frío en presencia de 4-AP fue de 101 ± 10 nM ($n = 21$) ($p < 0.001$, prueba *t* pareada) (Figura 6D panel izquierdo). El umbral medio de respuesta a frío de las NsIF que se transforman en sensibles al frío es de 24.4 ± 0.5 °C. En el grupo LCC, la amplitud media de las respuestas al frío previo a la aplicación de 4-AP fue de -18 ± 23 nM, mientras que la respuesta inducida por frío en presencia de 4-AP fue de 194 ± 23 nM ($n = 5$) ($p < 0.005$, prueba *t* pareada) (Figura 6D panel derecho). El umbral promedio de respuesta al frío de las neuronas LCC insensibles a frío que se transforman en sensibles fue de 24.6 ± 1.2 °C. Resultados similares fueron obtenidos al suprimir la I_{KD} con 500 nM de α -DTx, otro bloqueador específico de la corriente I_{KD} en neuronas sensoriales primarias (36). La Figura 6E muestra como la perfusión con α -DTx recluta neuronas insensibles al frío de forma análoga a la que lo hace la 4-AP.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la idea que la corriente I_{KD} estaría disminuida en las neuronas sensoriales primarias

provenientes de animales lesionados. Así, neuronas insensibles a frío de otras modalidades sensoriales que se hacen sensibles a frío por la reducción de la corriente de freno, podría contribuir a la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo observada en animales lesionados.

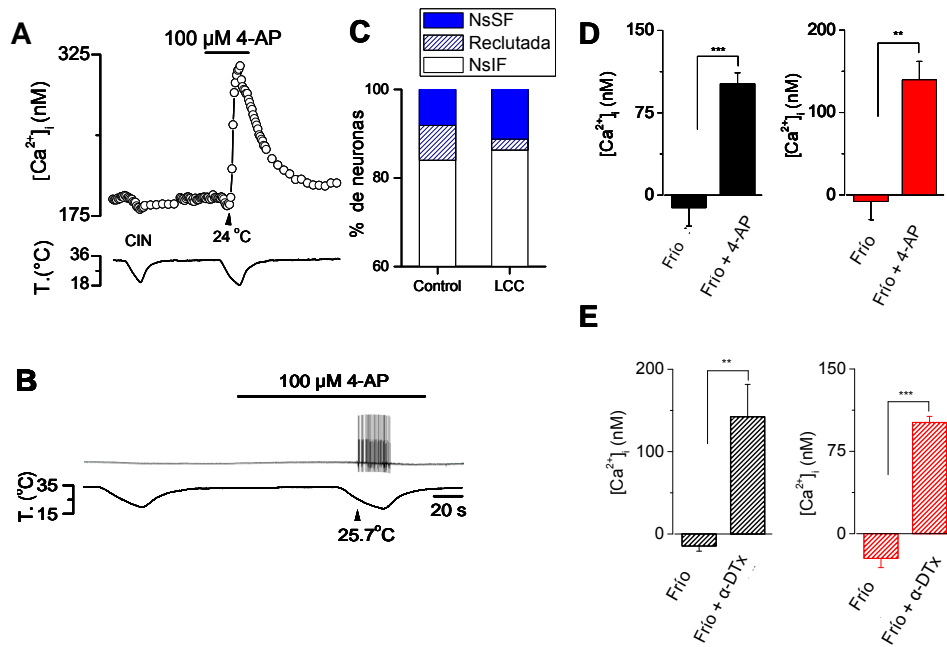


Figura 6. Modulación térmica de las neuronas insensibles a frío por la supresión de la corriente de freno I_{KD} . **A.** Curso temporal de la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en una NIF control transformada en una NSF en respuesta a la supresión farmacológica de la I_{KD} por 100 μM 4-AP. **B.** Registro simultáneo del potencial de membrana (trazo superior) y temperatura del baño (trazo inferior) durante dos descensos consecutivos en la temperatura en una neurona en cultivo control registrada bajo corriente controlada ($I_{hold} = 0$ pA), transformada en una NSF en presencia de 4-AP. **C.** Grafica de distribución de la población total de neuronas sensoriales primarias, que muestra el porcentaje de NsSF (azul), NsIF (blanco) y neuronas reclutadas por 4-AP en neuronas control y lesionadas (achurado negro). Nótese la reducción en la población de NsSF-AU y reclutadas por 4-AP en el grupo lesionado. **D.** Grafica de barras que muestra el valor medio de la respuesta de Ca^{2+} en la población entera de las neuronas reclutadas por 4-AP en ratones del grupo control (izquierda) y lesionado (derecha). **E.** Grafica de barras que muestra el valor medio de la respuesta de Ca^{2+} en la población entera de las neuronas reclutadas por αDTx en ratones del grupo control (izquierda) y lesionado (derecha).

7.5. La densidad de la corriente I_{KD} esta reducida en las NsSF de animales lesionados

Como se describió anteriormente, las NsSF provenientes de animales lesionados presentan un umbral medio de respuesta al frío desplazado más de 2°C hacia temperaturas más altas. Este desplazamiento en el umbral es muy similar al observado luego de la supresión farmacológica de la corriente I_{KD} en NsSF del grupo control, fenómeno no observado en las NsSF lesionadas. Esto sugiere que la corriente de freno I_{KD} podría estar disminuida luego del daño axonal. Para complementar los resultados obtenidos por experimentos de imagen de calcio con un correlato electrofisiológico, se determinó la densidad de corriente I_{KD} directamente por la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa en las NsSF de ambos grupos de neuronas, como se describe en Métodos. La Figura 7A muestra dos registros representativos de corriente obtenidos en dos NsSF, una proveniente del grupo control (panel izquierdo) y una proveniente del grupo lesionado (panel derecho). Los trazos de corrientes muestran el desarrollo de una corriente de salida cuando el potencial de mantención se lleva a -40 mV después de un pulso hiperpolarizante a -120 mV , corriente que corresponde a la corriente de potasio tipo I_{KD} (36;76). La corriente de entrada con cinética de activación lenta activada por el prepulso hiperpolarizante (requerido para remover la inactivación de la corriente I_{KD}) corresponde a la corriente I_h y que está involucrada en dar forma a los patrones de descarga de potenciales de acción de las neuronas sensibles al frío en el sistema somatosensorial (80). Al normalizar la amplitud de la corriente I_{KD} por la

capacidad de cada célula registrada, se determinó la densidad de corriente en neuronas control y lesionadas. La Figura 7B muestra que la densidad promedio de la corriente I_{KD} está disminuida en las NsSF lesionadas respecto a las neuronas del grupo control, al comparar neuronas con similar umbral de activación por frío de ambos grupos experimentales, 29.5 ± 1.2 °C para las neuronas control y 29.4 ± 1.5 °C para las neuronas sensibles al frío lesionadas. La densidad media de I_{KD} en las NsSF provenientes de animales control fue de 4.6 ± 1.2 pA/pF ($n=22$) y de 2.5 ± 0.4 pA/pF ($n=20$) en NsSF de animales LCC ($p<0.05$, prueba t).

El conjunto de estas evidencias, permiten sugerir que la expresión funcional de los canales responsables de la corriente de freno I_{KD} está reducida en las NsSF provenientes de animales sometidos a LCC, lo que podría explicar la aparición de hipersensibilidad dolorosa al frío luego del daño axonal en los animales lesionados.

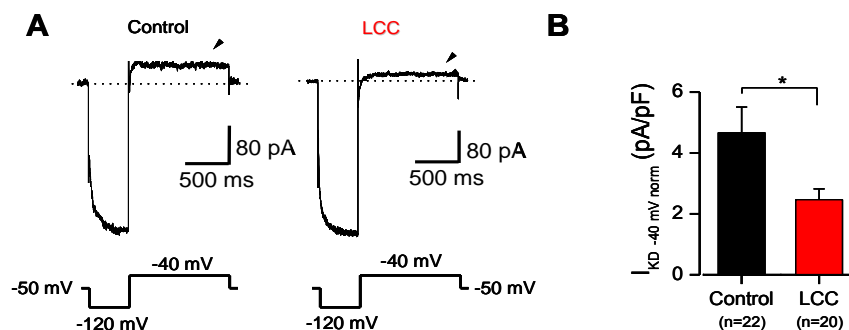


Figura 7. Densidad de corriente I_{KD} en neuronas sensibles al frío control y lesionadas. A. Registro de patch clamp en modalidad de célula completa (voltaje controlado) de la corriente I_{KD} en una NSF control (umbral 28.5°C , panel izquierdo) y de una NSF lesionada (umbral 28.7°C , panel derecho). El voltaje de mantenimiento fue de -50 mV, y la corriente I_{KD} fue estimada un segundo después de aplicar un pulso a -40 mV precedido de un prepulso a -120 mV. **B.** Gráfica de barras que representa la densidad promedio de corriente I_{KD} en 22 NsSF del grupo control (barra negra) y 20 NsSF del grupo lesionado (barra roja).

7.6. La sensibilidad a agonistas químicos de los canales TRPM8, TRPA1, TRPV1 no se ve modificada en las NsSF de los animales LCC

Respecto al cambio en la sensibilidad al frío observado en las neuronas lesionadas, éste puede involucrar la participación de NsSF-AU que aumentan su sensibilidad al frío, es decir, transformadas en NsSF-BU, y también el reclutamiento de nociceptores polimodales de tipo-C transformados en NsSF (37). Una subpoblación de nociceptores polimodales expresa los canales termosensibles TRPV1 y TRPA1, los que pueden ser usados como marcadores moleculares de este subtipo de neuronas somatosensoriales primarias que señalizan dolor (81). Con el fin de caracterizar el fenotipo de las neuronas sensibles al frío en cultivos de neuronas raquídeas provenientes de animales lesionados y control, se analizaron las respuestas de las NsSF de ambos grupos a activadores de TRPM8 y de los canales termoTRP TRPA1 y TRPV1 (Figura 8A). Para estimar la fracción de neuronas que expresan TRMP8, se estudiaron las respuestas a la aplicación de 100 μ M mentol, agonista químico de canales TRPM8. La Figura 8B (panel izquierdo) muestra el total de neuronas que respondieron a mentol en el grupo control. El 66.6% (20/30) de las NsSF del grupo control respondieron sólo a la aplicación de mentol, mientras que en el grupo lesionado la respuesta sólo a mentol fue de 34.3% (11/32) ($p > 0.05$, prueba *F*). Por otro lado, para estimar la fracción de neuronas sensibles al frío que expresan TRPA1, se analizaron las respuestas a la aplicación de 100 μ M AITC, agonista de canales TRPA1. La Figura 8B muestra que el 10% de las NsSF control (3/30) y 21.8% (7/32) de las neuronas provenientes de animales LCC

mostraron respuestas a mentol y AITC con aumentos en el calcio intracelular ($p > 0.05$, prueba *F*). Análogamente, con el fin de evaluar la población de neuronas que expresan TRPV1, se estudiaron las respuestas inducidas por 200 nM capsaicina, agonista específico de este canal. La Figura 8B muestra que el 23.3% de las NsSF en el grupo control (7/30) respondieron a mentol y capsaicina, mientras que el 37.5% (12/32) de las neuronas provenientes de animales lesionados mostraron este fenotipo ($p > 0.05$, prueba *F*). En el grupo lesionado el 6.25% de las neuronas respondieron tanto a mentol como AITC y capsaicina, conformando una subpoblación de neuronas TRPM8(+)/TRPV1(+)/TRPA1(+). Esta población de neuronas no fue observada en el grupo control ($p > 0.05$, prueba *F*). Aunque se observaron leves diferencias en las respuestas a activadores de los canales TRPM8, TRPA1, TRPV1 entre las NsSF lesionadas y las neuronas sensibles al frío del grupo control, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que la lesión constrictiva del nervio ciático no produce cambios significativos en la expresión de los canales TRPM8, TRPA1 y TRPV1 en las neuronas sensoriales primarias sensibles al frío, y que el fenómeno de hipersensibilidad dolorosa al frío estaría relacionado en mayor parte con cambios en la excitabilidad y umbral de respuesta al frío en estas neuronas, más que con cambios en los niveles de expresión de los canales termoTRP.

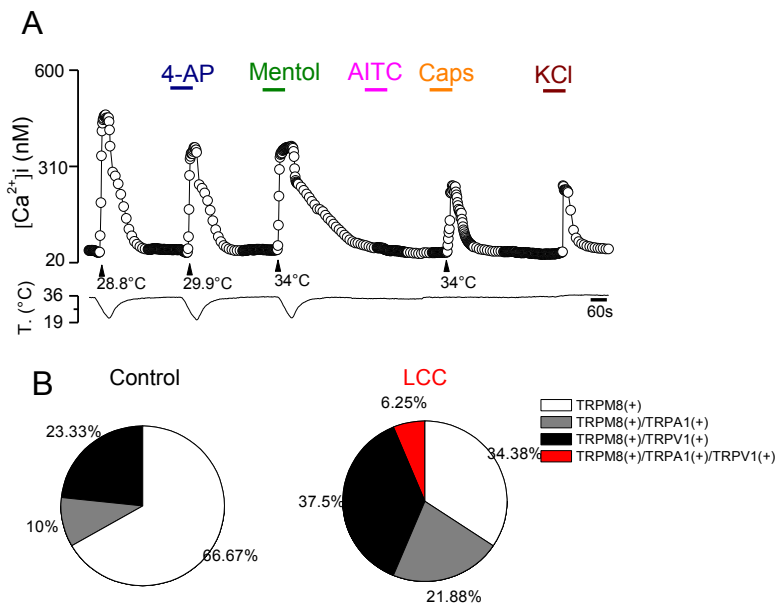


Figura 8. Sensibilidad a agonistas de canales termoTRP en neuronas sensoriales primarias sensibles al frío control y lesionadas. A. Protocolo de registro por imagen de Ca^{2+} , en una neurona sensorial control sensible al frío en cultivo, en presencia 4-AP (inhibidor de la corriente I_{KD}), de mentol 100 μ M (agonista de TRPM8), de AITC 100 μ M (agonista de TRPA1) y de capsaicina 200 nM (agonista de TRPV1). Un pulso de KCl (30mM) se aplicó al final del protocolo con el fin de evaluar viabilidad celular en el cultivo. La neurona en la figura muestra sensibilidad a 4-AP, mentol y capsaina y no

responde a AITC. **B.** Gráfico circular de la población de neuronas de frío TRPM8(+) en blanco, TRPM8(+)/TRPA1(+) en gris, TRPM8(+)/TRPV1(+) en negro y TRPM8(+)/TRPA1(+)/TRPV1(+) en rojo, tanto en condiciones control (n=30) (panel derecho) como lesionado (n=32) (panel izquierdo).

7.7. No son necesarios cambios en la expresión funcional de canales TRPM8 para el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en respuesta a lesión

Los canales TRPM8 son los responsables de la principal corriente excitatoria en respuesta al frío en las neuronas sensoriales primarias (18;44;82). Se han reportado evidencias contrapuestas respecto a cambios en la expresión de TRPM8 y su relación con el desarrollo y mantenimiento de la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo luego del daño nervioso periférico (23;67;69;71-73;83;84). Para evaluar posibles cambios en la expresión de canales TRPM8 que podrían contribuir a la hipersensibilidad térmica inducida por LCC, se determinó la

densidad de corriente TRPM8 por la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa en las NsSF de ambos grupos. La Figura 9A muestra un registro representativo de corriente de una neurona sensorial primaria que ha sido estimulada con pulso mantenido de frío y luego perfundida con 100 μM mentol, para estimar la amplitud de la corriente máxima dependiente de canales TRPM8. Al normalizar la amplitud de las corrientes dependientes de frío y de frío en presencia de mentol (corriente máxima dependiente de TRPM8) por la capacidad de cada célula, se determinó la densidad de corriente en neuronas control y lesionadas con el mismo umbral de respuesta al frío ($27.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$ en control versus $28.2 \pm 0.6^\circ\text{C}$ en las neuronas LCC) ($p > 0.05$, prueba *t*). La Figura 9B muestra que la densidad de corriente TRPM8 en las NsSF provenientes de animales lesionados es similar a la de las neuronas del grupo control. La densidad de corriente de frío ($I_{\text{frío}}$) fue de -3.4 ± 1.2 pA/pF ($n=18$) mientras que en las NsSF del grupo lesionado fue de -3.5 ± 0.6 pA/pF ($n=17$) ($p=0.756$, prueba *t*) (panel izquierdo). La corriente en respuesta a frío más mentol ($I_{\text{frío+mentol}}$) en las NsSF control fue de 16.0 ± 3.0 pA/pF ($n=18$), frente a 15.3 ± 4.6 pA/pF ($n=17$) en las NsSF provenientes de animales lesionados ($p=0.956$, prueba *t*) (Figura 9B) (panel derecho).

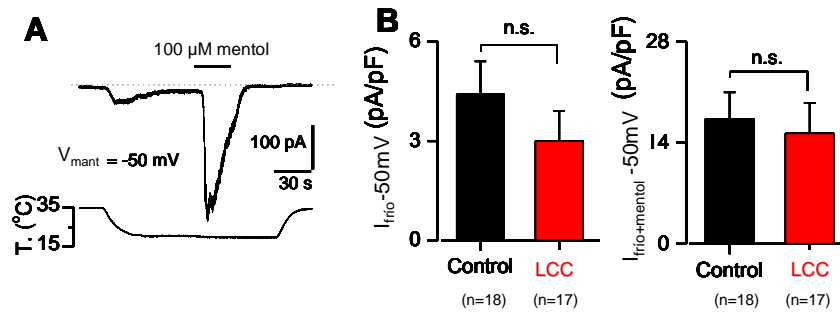


Figura 9. Densidad de corriente TRPM8 en neuronas sensibles al frío control y lesionadas. **A.** Registro simultáneo de la corriente de membrana (trazo superior) y la temperatura del baño (trazo inferior) durante un descenso de la temperatura desde 34°C hasta 20°C, en combinación con mentol. **B.** Gráfica de barras que representa la densidad promedio de corriente $I_{\text{frío}}$ y en $I_{\text{FRÍO}} + \text{MENTOL}$ en 21 NsSF del grupo control (barra negra) y 23 NsSF del grupo lesionado. ($V_{\text{mant}} = -60 \text{ mV}$).

Estos resultados sugieren que no son necesarios cambios en los niveles de expresión funcional de TRPM8 para el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en respuesta al daño axonal. Estos resultados son acordes a los obtenidos por imagen de Ca^{2+} , ya que la sensibilidad a mentol tanto en neuronas sensibles al frío control como lesionadas, no mostró diferencias significativas.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis, presentamos evidencia que soporta la idea que la hipersensibilidad dolorosa al frío esta ligada a una reducción en la expresión funcional de la corriente de freno I_{KD} en las neuronas sensoriales primarias. Estos datos proporcionan evidencias para un nuevo mecanismo molecular que podría explicar la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo que sigue al daño axonal en neuronas somatosensoriales primarias. Una representación esquemática de la sensibilidad térmica de las neuronas somatosensoriales primarias antes y después del daño axonal se muestra en la Figura 10.

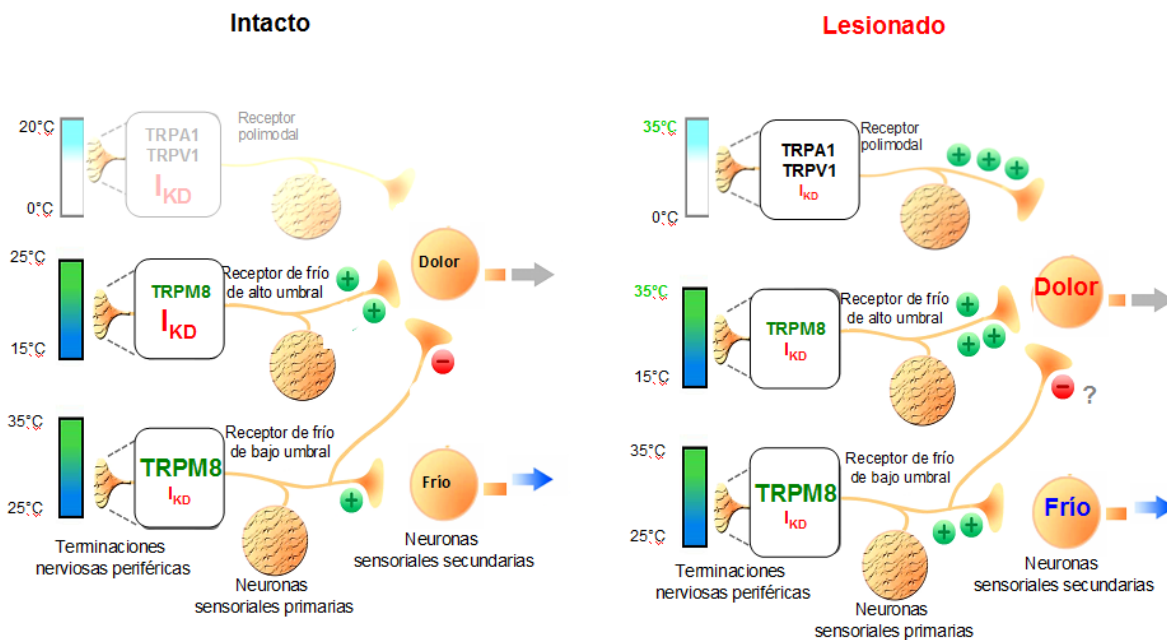


Figura 10. Representación esquemática de la sensibilidad térmica de las neuronas somatosensoriales primarias sensibles al frío antes y después de la lesión. Luego del daño axonal, la reducción en la expresión funcional de I_{KD} produce un aumento en la sensibilidad al frío en las neuronas de alto umbral que señalizan disconfort por frío y frío doloroso. Estas neuronas ahora tienen la capacidad de activarse en el rango de temperaturas correspondientes al frío inocuo, gatillando la hipersensibilidad dolorosa al frío. Este modelo incluye la posibilidad de que receptores polimodales normalmente activados por frío extremo a temperaturas que causan dolor sean reclutados por la reducción de la I_{KD} luego del proceso de lesión.

8.1. La lesión crónica constrictiva del nervio ciático (LCC) como modelo de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo

Como mencionamos anteriormente, la sensibilidad al frío puede verse alterada producto de la lesión de las neuronas encargadas de la termotransducción y nocicepción, transformando la integración de estímulos de frío inocuo a nivel periférico en una señal que luego es integrada como dolorosa a nivel central. En nuestro trabajo, hemos utilizado el modelo de LCC y estudios de imagen de calcio y *patch clamp in vitro* de las neuronas sensibles a frío de los ganglios raquídeos L3, L4 y L5 ipsilaterales a la lesión. Hemos usado el modelo de lesión constrictiva crónica del nervio ciático por tratarse de un modelo ampliamente utilizado en el estudio del dolor neuropático. Múltiples autores en el campo emplean este modelo para la inducción de cuadros de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo (57;69;71;78;85;86). Este es un modelo que induce rápidamente cuadros de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo, como lo evidencian nuestros resultados. Así, incluso desde el primer día, se observaron conductas nocifensivas con aumento de los reflejos de retirada en respuesta a la prueba de acetona. Este comportamiento nocifensivo alcanzó un máximo al tercer día y se mantuvo hasta al menos 14 días luego de la lesión, proporcionándonos una ventana amplia de tiempo para trabajar en la que elegimos el día siete para realizar los experimentos en todos los animales utilizados. Otra de las razones para emplear este modelo de lesión es su alta eficiencia y reproducibilidad; el 87.5% de los ratones (21/24) presentaron conductas nocifensivas luego de la lesión, confirmando que también en nuestras manos este modelo es altamente

eficiente para la inducción del fenotipo sensorial alterado de interés. En general, los resultados obtenidos con este modelo de lesión son similares tanto en su magnitud como en su curso temporal a los observados en trabajos anteriores en animales sometidos a este tipo de lesión (69;71;77), validando el uso de esta aproximación como modelo de lesión periférica con desarrollo de hipersensibilidad al frío a utilizar en este trabajo de tesis.

8.2. La LCC produce un desplazamiento del umbral de temperatura hacia temperaturas más altas y un aumento en la población de las neuronas sensibles al frío de bajo umbral

La temperatura en la superficie de la piel (específicamente en la epidermis) en humanos en condiciones normales oscila entre los 33 y 34°C (30). Ante descensos bruscos de la temperatura en la epidermis hasta por ejemplo -5°C, el cambio de la temperatura en la capa inmediatamente inferior (dermis), donde están localizadas buena parte de las terminales sensibles al frío, no es tan marcado, alcanzando temperaturas que no descienden más allá de los 23°C (30). Incluso desde los 28°C en esta región de la piel, la sensación evocada es de frío doloroso (30). Esto no es un asunto trivial. Debido a los gradientes térmicos a través de la piel y los poderosos reflejos termorreguladores que controlan la irrigación cutánea, incluso frente a un estímulo de frío extremo (como el que resulta de la aplicación de hielo sobre la piel), la temperatura en la región intracutánea no descenderá más allá de unos pocos grados Celsius por debajo de la temperatura normal (29;30). Como se mencionó en resultados, las NsSF lesionadas presentaron un desplazamiento del umbral medio fue de

~2.4°C hacia temperaturas más altas, este desplazamiento indica que estas neuronas lesionadas requieren descensos mucho menores de la temperatura en la capa más superficial de la piel para alcanzar su umbral de temperatura y activarse. Este fenómeno de sensibilidad aumentada al frío en las neuronas lesionadas, se suma al aumento en el porcentaje de neuronas sensibles al frío inocuo, algunas de las cuales antes de la lesión eran de alto umbral y señalizaban frío intenso y doloroso. Esto abre la posibilidad de que luego del daño axonal los estímulos de frío en el rango inocuo sean detectados por estas neuronas y señalicen frío intenso e incluso doloroso. Basados en nuestros resultados, podemos proponer que los procesos de lesión nerviosa periférica producen entonces un desplazamiento en el umbral de temperatura asociado a la conversión de neuronas de alto umbral que señalizan frío intenso y doloroso en neuronas de bajo umbral que se activan ante descensos de la temperatura en el rango inocuo. La combinación de estos factores gatilla la integración alterada de los estímulos de frío en el rango inocuo, que podrían ser interpretados como molestos e incluso dolorosos, desencadenando en cuadros de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo.

8.3. Una disminución en la expresión funcional de los canales responsables de la corriente de freno I_{KD} se relaciona con la hipersensibilidad al frío inocuo en respuesta a lesión

Como se mencionó anteriormente, la evidencia actual muestra que varios canales de potasio dependientes de potencial cambian sus patrones de expresión funcional en respuesta al daño axonal (60-62;62;63;74;75), incluyendo

una reducción importante de los niveles de expresión de canales Kv1.1-1.4 (64). Interesantemente, los ratones nulos para Kv1.1 muestran un disparo permanente de potenciales de acción en los nervios motores mielínicos en respuesta al frío (87). Sin embargo, la posibilidad de que estos canales iónicos puedan influir en la sensibilidad térmica de las neuronas termorreceptoras de frío o nociceptores sensibles al frío reclutados luego del daño axonal no había sido estudiada en detalle, incluso no se les había asociado con un cambio específico sobre un subgrupo funcional claramente definido de neuronas sensoriales primarias. Partiendo de la base que los canales heteromultiméricos Kv1.1-1.2 corresponden a la entidad molecular responsable de la corriente de freno I_{KD} en las neuronas sensibles al frío (36), nuestro razonamiento incluyó la idea que el daño axonal llevaría a una regulación a la baja de los niveles de expresión de los canales responsables de la I_{KD} en estas neuronas. Este fenómeno produciría un efecto similar sobre la sensibilidad térmica dolorosa al observado por la inhibición farmacológica selectiva de la I_{KD} *in vivo* (36). En este contexto, utilizamos en nuestro modelo experimental inhibidores de los canales de K^+ tipo *Shaker* dependientes de voltaje Kv1.1 y 1.2, responsables de la corriente de freno I_{KD} . Nuestro razonamiento fue que si las neuronas sensibles al frío lesionadas tienen disminuida la I_{KD} , entonces el efecto de estos bloqueadores debía estar disminuido en estas células, a diferencia de lo esperado para las neuronas control. Así, el desplazamiento del umbral medio de respuesta al frío observado en NsSF del grupo control fue evidente al exponerlas a los inhibidores de la corriente de freno, comportamiento previamente descrito en

neuronas trigeminales y reportado por primera vez en neuronas raquídeas en esta tesis (36;76). Este fenómeno se vio fuertemente reducido en neuronas provenientes de animales lesionados, sugiriendo que la expresión de los blancos moleculares de los inhibidores de la corriente I_{KD} se encuentra fuertemente reducida en animales sometidos a lesión crónica constrictiva del nervio ciático. El correlato electrofisiológico confirmó que en el grupo lesionado la densidad la corriente de freno es menor a la observada en las neuronas control sensibles al frío, apoyando idea que estas neuronas sufren cambios a nivel celular que resultan en una regulación a la baja de los canales de potasio Kv1.1 y 1.2.

8.4. Los canales termosensibles de la superfamilia TRP y la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo en respuesta a lesión

Aunque nuestros resultados apuntan a una disminución de la corriente I_{KD} luego de procesos de lesión axonal, nos preguntamos si la aparición de los cuadros de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo estaba relacionada con un aumento en la expresión funcional de TRPM8, la principal entidad molecular responsable de la sensibilidad al frío en las neuronas somatosensoriales primarias y que ha sido también involucrado en este fenómeno de hipersensibilidad térmica postlesión. Xing y colaboradores en 2007, utilizando el mismo modelo de estudio para la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo inducido por constricción crónica del nervio ciático en ratas, encontraron que el daño periférico resultaba en un aumento significativo en el porcentaje de neuronas sensibles a mentol y frío, y en una mejoría substancial de las respuestas de estas neuronas tanto a mentol como al frío. Estos cambios ocurrieron en neuronas sensibles a capsaicina, una

subpoblación de neuronas tipo nociceptor polimodal (69). Lamentablemente los autores no se extendieron en su estudio en puntos cruciales que pudieran hacer inequívoca la interpretación de sus resultados, tales como la descripción de la distribución de las umbrales de temperatura de la población de NsSF, o las propiedades biofísicas activas o pasivas de la membrana, que permitieran determinar si las neuronas que sobre expresan TRPM8 de hecho corresponden a neuronas sensibles al frío de alto umbral que coexpresan TRPV1, o a receptores polimodales como ellos concluyen en su estudio. En este trabajo, al igual que lo que indican nuestros resultados, los aumentos del Ca^{2+} intracelular inducidos por frío en las neuronas lesionadas fueron mucho mayores que en condiciones control, lo que los autores atribuyen al aumento en la expresión de TRPM8. Sin embargo, este hallazgo podría ser explicado por un aumento en la frecuencia de disparo en las neuronas lesionadas, independiente de un cambio en la expresión de TRPM8, y que presentaran el mismo umbral de disparo. Si este fuera el caso, esto implicaría cambios substanciales en la expresión de canales dependientes de voltaje que determinan la excitabilidad de las neuronas, y podrían estar reflejando una importante reducción en la capacidad de freno de la corriente I_{KD} , como indican nuestros resultados. Nosotros no encontramos diferencias en los niveles de expresión de los canales TRPM8 en experimentos electrofisiológicos ni por imagen de calcio. Es más, nuestros resultados sugieren que probablemente el daño axonal induce una reducción en la densidad de corriente, en concordancia con los resultados de Heppenstall y colaboradores (71). En este último trabajo, los autores observaron que la LCC

resulta en hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo, con una reducción en la densidad de corriente de TRPM8 y TRPA1, aunque nuevamente no ahondan en otros posibles mecanismos moleculares que puedan explicar el fenómeno. Nuestros resultados en este contexto podrían responder a las aparentes contradicciones a la literatura respecto del papel de algunos canales termoTRP en este fenómeno.

Por otro lado, el canal TRPA1, el principal sensor molecular de frío nocivo y sustancias imitativas en el sistema somatosensorial, también ha sido sindicado como con un papel relevante en la hipersensibilidad dolorosa al frío en respuesta a lesión. Este canal colocaliza con TRPV1 en una subpoblación de nociceptores polimodales (37;43) y su expresión aumenta ante daño neuronal o producción de mediadores proinflamatorios, gatillando una sensación de dolor quemante inducida por frío (37). Katsura y colaboradores estudiaron la incidencia de la hipersensibilidad dolorosa al frío y los cambios en la expresión de TRPA1 y TRPM8 en neuronas provenientes de los ganglios raquídeos L4-L5, seguido de la ligación del nervio espinal L5 (LNE) (38). Usando la LNE en ratas, los autores observaron un aumento en la expresión de mRNA de TRPA1 en neuronas trk-A positivas de mediano a pequeño diámetro cercanas al nervio L4 no lesionado. La sobreexpresión de TRPA1 en este modelo estaba directamente relacionada con el desarrollo y mantenimiento de la hipersensibilidad al frío, sin cambios en la expresión tanto del RNAm de TRPM8, como en la proteína a nivel de L4. Interesantemente, la expresión tanto de TRPM8 como de TRPA1 estaba reducida en el ganglio raquídeo lesionado (L5).

La administración intratecal del oligonucleótido antisentido de TRPA1, pero no de TRPM8, suprimió la hiperalgia al frío inducida por LNE a nivel de L5, sugiriendo una importante contribución de TRPA1, pero no de TRPM8, en la hipersensibilidad al frío en este modelo de dolor neuropático (38). En otro estudio, la inhibición farmacológica de TRPA1 en una subpoblación de neuronas sensoriales primarias reversó la hipersensibilidad dolorosa al frío causada por la inflamación y el daño nervioso periférico (37). Frederick y colaboradores, emplearon un ensayo de protección de ribonucleasa múltiple que permitió la cuantificación de los mensajeros de diferentes proteínas simultáneamente, para determinar los niveles de expresión de múltiples canales TRP en ganglios raquídeos de ratón luego del daño neuronal periférico inducido por la constricción crónica unilateral del nervio ciático. El RNAm de TRPA1, TRPV2 y TRPM8 mostraron un leve aumento luego de la lesión periférica del nervio (67). Interesantemente, en humanos la hipersensibilidad al frío inducida luego del daño axonal periférico no parece estar relacionada con alteraciones en los niveles de expresión de los canales iónicos TRPM8 ó de TRPA1 (73), demostrando que el incremento en el porcentaje de neuronas que expresan un único canal termosensible al frío no es suficiente para explicar el fenómeno detrás de la hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo. Como mencionamos anteriormente, en nuestras condiciones experimentales, nuestros resultados no evidenciaron cambios en la densidad de corriente dependiente de TRPM8 ni en la respuesta medida por imagen de Ca^{2+} de las neuronas sensibles al frío a los activadores específicos para TRPA1 y TRPV1 en ambos grupos. Sin embargo,

el número de células utilizado en nuestro trabajo para estudiar por imagen de calcio la respuesta a activadores de canales termoTRP en las neuronas de frío es relativamente bajo y son necesarios más experimentos para dirimir con claridad este punto.

9. CONCLUSIÓN

En resumen, nuestros resultados apoyan la idea que la hipersensibilidad dolorosa al frío es una propiedad resultante de un desbalance en la expresión de los canales iónicos presentes en la terminal axonal, donde los canales Kv1.1-1.2 sufren una regulación a la baja que puede ser independiente de las modificaciones en la expresión funcional de TRPM8, responsable de la corriente despolarizante en respuesta a frío. En este trabajo de tesis, se presentan evidencias que apoyan la idea que la hipersensibilidad dolorosa al frío esta ligada a una reducción en la expresión funcional de la corriente de freno I_{KD} en las neuronas de frío de alto umbral y en una subpoblación de neuronas de frío de otras modalidades sensoriales que se transforman en sensibles a frío inocuo por reducción de la corriente de freno, proporcionando un mecanismo molecular que podría explicar el desarrollo de esta alteración sensorial luego del daño axonal periférico.

10. REFERENCIAS

1. Acosta, M. C., Tan, M. E., Belmonte, C., and Gallar, J. (2001) Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2063-2067.
2. Chen, C. C., Rainville, P., and Bushnell, M. C. (1996) Noxious and innocuous cold discrimination in humans: evidence for separate afferent channels, *Pain* 68, 33-43.
3. Craig, A. D., Chen, K., Bandy, D., and Reiman, E. M. (2000) Thermosensory activation of insular cortex, *Nat. Neurosci.* 3, 184-190.
4. Yarnitsky, D. and Ochoa, J. L. (1991) Warm and cold specific somatosensory systems. Psychophysical thresholds, reaction times and peripheral conduction velocities, *Brain* 114 (Pt 4), 1819-1826.
5. Hensel, H. and Zotterman, Y. (1951) Action potentials of cold fibres and intracutaneous temperature gradient, *J. Neurophysiol.* 14, 377-385.
6. Hensel, H. (1981) Thermoreception and temperature regulation, *Monogr Physiol Soc.* 38, 1-321.
7. Heppelmann, B., Messlinger, K., Neiss, W. F., and Schmidt, R. F. (1990) Ultrastructural three-dimensional reconstruction of group III and group IV sensory nerve endings ("free nerve endings") in the knee joint capsule of the cat: evidence for multiple receptive sites, *J. Comp Neurol.* 292, 103-116.
8. Iriuchijima, J. and Zotterman, Y. (1960) The specificity of afferent cutaneous C fibres in mammals, *Acta Physiol Scand.* 49, 267-278.
9. 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.
10. Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., Del, O. 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.
11. Brock, J. A., Pianova, S., and Belmonte, C. (2001) Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea, *J. Physiol* 533, 493-501.

12. Hensel, H. and ZOTTERMAN, Y. (1951) [Quantitative relations between the discharge of individual cold-receptors and the temperature.], *Acta Physiol Scand.* 23, 291-319.
13. Hensel, H. and Zotterman, Y. (1951) The effect of menthol on the thermoreceptors, *Acta Physiol Scand.* 24, 27-34.
14. LaMotte, R. H. and Thalhammer, J. G. (1982) Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate, *Brain Res.* 244, 279-287.
15. Simone, D. A. and Kajander, K. C. (1997) Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold, *J. Neurophysiol.* 77, 2049-2060.
16. Bessou, P. and Perl, E. R. (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli, *J. Neurophysiol.* 32, 1025-1043.
17. Davis, K. D. and Pope, G. E. (2002) Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses, *Pain* 98, 179-185.
18. Latorre, R., Brauchi, S., Madrid, R., and Orio, P. (2011) A cool channel in cold transduction, *Physiology (Bethesda.)* 26, 273-285.
19. Tsavaler, 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.
20. 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., and Patapoutian, A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol, *Cell* 108, 705-715.
21. 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.
22. McKemy, D. D. (2005) How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation, *Mol. Pain* 1, 16.
23. Colburn, R. W., Lubin, M. L., Stone, D. J., Jr., 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.
24. 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.
25. 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.
 26. Madrid, R., Donovan-Rodriguez, 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.
 27. Malkia, A., Madrid, R., Meseguer, V., de la, P. E., Valero, M., Belmonte, C., and Viana, F. (2007) Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors, *J. Physiol* 581, 155-174.
 28. 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.
 29. Mauderli, A. P., Vierck, C. J., Jr., Cannon, R. L., Rodrigues, A., and Shen, C. (2003) Relationships between skin temperature and temporal summation of heat and cold pain, *J. Neurophysiol.* 90, 100-109.
 30. Morin, C. and Bushnell, M. C. (1998) Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: a psychophysical study, *Pain* 74, 67-73.
 31. Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., and Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures, *Cell* 112, 819-829.
 32. Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J., and Patapoutian, A. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin, *Neuron* 41, 849-857.
 33. Andersson, D. A., Chase, H. W., and Bevan, S. (2004) TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH, *J. Neurosci.* 24, 5364-5369.
 34. Sawada, Y., Hosokawa, H., Matsumura, K., and Kobayashi, S. (2008) Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide, *Eur. J. Neurosci.* 27, 1131-1142.

35. Sawada, Y., Hosokawa, H., Hori, A., Matsumura, K., and Kobayashi, S. (2007) Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels, *Brain Res.* 1160, 39-46.
36. Madrid, R., de la, P. E., Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C., and Viana, F. (2009) Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels, *J. Neurosci.* 29, 3120-3131.
37. Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M., and Noguchi, K. (2005) TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury, *J. Clin. Invest* 115, 2393-2401.
38. Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Sakagami, M., and Noguchi, K. (2006) Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats, *Exp. Neurol.*
39. 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., Brenner, G. J., Costigan, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Fanger, C. M., Woolf, C. J., Patapoutian, A., and Moran, M. M. (2010) TRPA1 contributes to cold hypersensitivity, *J. Neurosci.* 30, 15165-15174.
40. 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.
41. Ramsey, I. S., Delling, M., and Clapham, D. E. (2006) An introduction to TRP channels, *Annu. Rev. Physiol* 68, 619-647.
42. Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J. B., and McNaughton, P. A. (2001) Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide, *J. Physiol* 534, 813-825.
43. 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.
44. Babes, A., Ciobanu, A. C., Neacsu, C., and Babes, R. M. (2011) TRPM8, a sensor for mild cooling in mammalian sensory nerve endings, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 78-88.
45. Viana, F. (2009) understanding the mechanisms of cold-evoked pain in humans, *Pain* 147, 7-8.

46. Koschorke, G. M., Meyer, R. A., and Campbell, J. N. (1994) Cellular components necessary for mechano-electrical transduction are conveyed to primary afferent terminals by fast axonal transport, *Brain Res.* 641, 99-104.
47. Lai, J., Hunter, J. C., and Porreca, F. (2003) The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 291-297.
48. Roza, C., Laird, J. M., Souslova, V., Wood, J. N., and Cervero, F. (2003) The tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice, *J. Physiol* 550, 921-926.
49. Belmonte, C., Brock, J. A., and Viana, F. (2009) Converting cold into pain, *Exp. Brain Res.* 196, 13-30.
50. Baker, M. D. and Wood, J. N. (2001) Involvement of Na⁺ channels in pain pathways, *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 27-31.
51. Baker, M. D., Chandra, S. Y., Ding, Y., Waxman, S. G., and Wood, J. N. (2003) GTP-induced tetrodotoxin-resistant Na⁺ current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensory neurones, *J. Physiol* 548, 373-382.
52. Waxman, S. G., Dib-Hajj, S., Cummins, T. R., and Black, J. A. (1999) Sodium channels and pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 7635-7639.
53. Matzner, O. and Devor, M. (1994) Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels, *J. Neurophysiol.* 72, 349-359.
54. Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H., and Tanabe, T. (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel
4, *EMBO J.* 20, 2349-2356.
55. Fang, Z., Park, C. K., Li, H. Y., Kim, H. Y., Park, S. H., Jung, S. J., Kim, J. S., Monteil, A., Oh, S. B., and Miller, R. J. (2007) Molecular basis of Ca_v2.3 calcium channels in rat nociceptive neurons, *J. Biol. Chem.* 282, 4757-4764.
56. Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R., and Sandkuhler, J. (2003) Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia, *Science* 299, 1237-1240.
57. Flatters, S. J. and Bennett, G. J. (2013) Ethosuximide reverse paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy, *Pain* 109, 150-161.

58. Jagodic, M. M., Pathirathna, S., Nelson, M. T., Mancuso, S., Jokosovic.P.M., Rosenberng, E. R., Bayliss, D. A., Jevtovic-Todorovic.V., and Todorovic, S. M. (2007) Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons, *J. Neurosci.* 27, 3305-3316.
59. Jagodic, M. M., Pathirathna, S., Jokosovic.P.M., Lee, W., Nelson, M. T., Naik, A. K., Su, P., Jevtovic-Todorovic.V., and Todorovic, S. M. (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat neurons after chronic constriction injury of the sciatic nerve, *J. Neurophysiol.* 99, 3151-3156.
60. Chien, L. Y., Cheng, J. K., Chu, D., Cheng, C. F., and Tsaur, M. L. (2007) Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity, *J. Neurosci.* 27, 9855-9865.
61. Ishikawa, K., Tanaka, M., Black, J. A., and Waxman, S. G. (1999) Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy, *Muscle Nerve* 22, 502-507.
62. Kim, D. S., Choi, J. O., Rim, H. D., and Cho, H. J. (2002) Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 105, 146-152.
63. Rasband, M. N., Park, E. W., Vanderah, T. W., Lai, J., Porreca, F., and Trimmer, J. S. (2001) Distinct potassium channels on pain-sensing neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 13373-13378.
64. Yang, E. K., Takimoto, K., Hayashi, Y., de Groat, W. C., and Yoshimura, N. (2004) Altered expression of potassium channel subunit mRNA and alpha-dendrotoxin sensitivity of potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy, *Neuroscience* 123, 867-874.
65. Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., and Lazdunski, M. (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception, *EMBO J.* 28, 1308-1318.
66. Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., Lazdunski, M., Eschalier, A., Authier, N., and Bourinet, E. (2011) Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors, *EMBO Mol. Med.* 3, 266-278.
67. Frederick, J., Buck, M. E., Matson, D. J., and Cortright, D. N. (2007) Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 1058-1064.

68. 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.
69. 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.
70. Katsura, H., Tsuzuki, K., Noguchi, K., and Sakagami, M. (2006) Differential expression of capsaicin-, menthol-, and mustard oil-sensitive receptors in naive rat geniculate ganglion neurons, *Chem. Senses* 31, 681-688.
71. Caspani, O., Zurborg, S., Labuz, D., and Heppenstall, P. A. (2009) The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain, *PLoS. ONE*. 4, e7383.
72. Staaf, S., Oerther, S., Lucas, G., Mattsson, J. P., and Ernfors, P. (2009) Differential regulation of TRP channels in a rat model of neuropathic pain, *Pain* 144, 187-199.
73. Namer, B., Kleggetveit, I. P., Handwerker, H., Schmelz, M., and Jorum, E. (2008) Role of TRPM8 and TRPA1 for cold allodynia in patients with cold injury, *Pain*.
74. Everill, B. and Kocsis, J. D. (1999) Reduction in potassium currents in identified cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons after axotomy, *J. Neurophysiol*. 82, 700-708.
75. Takeda, M., Tsuboi, Y., Kitagawa, J., Nakagawa, K., Iwata, K., and Matsumoto, S. (2011) Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain, *Mol. Pain* 7, 5.
76. Viana, F., de la Pena, E., and Belmonte, C. (2002) Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression, *Nat. Neurosci*. 5, 254-260.
77. Choi, Y., Yoon, Y. W., Na, H. S., Kim, S. H., and Chung, J. M. (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain, *Pain* 59, 369-376.
78. Bennett, G. J. and Xie, Y. K. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain* 33, 87-107.
79. Thut, P. D., Wrigley, D., and Gold, M. S. (2003) Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro, *Neuroscience* 119, 1071-1083.

80. Orio, P., Parra, A., Madrid, R., Belmonte, C., and Viana, F. (2012) Role of Ih currents in the firing pattern of cold thermoreceptors. (*Submitted to J of Neurophysiology*).
81. Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2005) Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors, *J. Comp Neurol.* 493, 596-606.
82. McCoy, D. D., Knowlton, W. M., and McKemy, D. D. (2011) Scraping through the ice: uncovering the role of TRPM8 in cold transduction, *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 300, R1278-R1287.
83. Knowlton, W. M., Bifolck-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.
84. Su, L., Wang, C., Yu, Y. H., Ren, Y. Y., Xie, K. L., and Wang, G. L. (2011) Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain, *BMC. Neurosci.* 12, 120.
85. Flatters J.L. and Bennett J. (2004) Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy, *Pain* 150-161.
86. Bischofs S., Zelenka M., and Sommer C. (2004) Evaluation of topiramate as an anti-hyperalgesic and neuroprotective agent in the peripheral nervous system, *Journal of the Peripheral Nervous System* 9:70-78 70-78.
87. Lei Zhou, Chuan-Li Zhang, Albee Messing, and Shing Yan Chiu (1998) Temperature-Sensitive Neuromuscular Transmission in Kv1.1 Null Mice: Role of Potassium Channels under the Myelin Sheath in Young Nerves, *J. Neurosci.* 18, 7200-7215.