

MECANISMOS MOLECULARES DE LA SENSIBILIDAD AL FRÍO EN LAS VÍSCERAS

MOLECULAR MECHANISMS OF VISCERAL COLD SENSITIVITY

OTTO FAJARDO BENAVIDES

FRIEDRICH MIESCHER INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH, BASILEA, SUIZA

RESUMEN

La capacidad que poseemos para sentir la temperatura de los objetos al tocarlos con la piel se debe a terminales nerviosas sensibles a los cambios térmicos. Estas terminales nerviosas transforman el estímulo físico térmico en impulsos eléctricos que el sistema nervioso puede comprender y procesar. En el caso de la sensibilidad al frío moderado en la piel, se ha demostrado recientemente que la presencia de la proteína TRPM8 en las terminales nerviosas explica la capacidad de las mismas de sentir el frío. Por otra parte, los mamíferos poseemos terminales nerviosas sensibles al frío no sólo en la piel, sino además en los órganos internos. Sin embargo se conoce mucho menos acerca de las características y función de estas terminales nerviosas termosensibles viscerales. Nosotros nos preguntamos cuáles serían los mecanismos moleculares de la sensibilidad al frío en las terminales nerviosas viscerales termosensibles. Nuestros resultados demuestran que la proteína que brinda sensibilidad a esas terminales nerviosas viscerales es una proteína llamada TRPA1, en contraste con lo que sucede en la piel. Durante el desarrollo del trabajo antes descrito, descubrimos también que el nifedipino y otras dihidropiridinas, fármacos usados en el tratamiento de la hipertensión, activan la proteína TRPA1.

Descriptor: neurofisiología, frío, vísceras, TRPA1

ABSTRACT

We can sense the temperature of the objects we touch, thanks to thermosensible nerve terminals in the skin. These nerve terminals transform the thermal stimuli in electric impulses, which the nervous system can process. Regarding mild cold sensitivity in the skin, it has been recently demonstrated that the presence of the protein TRPM8 in nerve terminals can explain the sensitivity of these terminals to decreases in temperature. At the same time, mammals have thermosensible nerve terminals not only in the skin, but also in the internal organs. However, much less is known about the characteristics and function of these. Therefore, we decided to study the molecular mechanisms of the cold sensitivity of these thermosensible visceral nerve terminals. Our results demonstrate that the main protein mediating cold sensitivity on visceral nerve terminals is TRPA1 in high contrast with the skin, where it is TRPM8. While working in this project, we also found that nifedipine and other dihydropyridines, drugs used on arterial hypertension treatment, can activate the protein TRPA1.

Keywords: neurophysiology, cold, viscerae, TRPA1

INTRODUCCIÓN

El presente artículo explica en forma general parte del trabajo que realicé para la obtención del título de Doctor en Neurociencias, en el Instituto de Neurociencias de Alicante en España, en el Laboratorio de Transducción Sensorial y Nocicepción, bajo la dirección de los doctores Carlos Belmonte Martínez, Félix Viana de la Iglesia y Roberto Gallego Fernández. Este trabajo generó dos artículos publicados en sendas revistas internacionales [1, 2]. Actualmente realizo mi labor investigadora en Basilea, Suiza, como investigador postdoctoral, en el campo de la neurofisiología y optogenética.

Los órganos de los sentidos nos permiten a los humanos y a los seres vivos en general relacionarnos con el mundo exterior: ver una escultura, oír nuestra pieza musical preferida, saborear los alimentos, percibir el perfume de las flores, conocer la forma, textura y temperatura de los objetos que tocamos y evitar los estímulos dañinos al percibirlos como dolorosos. Los órganos de los sentidos captan lo que sucede en el medio que nos rodea y envían esta información al sistema nervioso central (que está compuesto por el cerebro y la médula espinal), el cual elaborará una respuesta adecuada, como por ejemplo alejarnos de un estímulo que nos causó dolor, o llevarnos un oloroso y apetitoso pastel a la boca.

El laboratorio en el cual realicé la tesis doctoral está interesado en ahondar el conocimiento en el sentido del tacto, en particular en las sensaciones de temperatura y dolor, ya que ambas pueden estar alteradas en pacientes con dolor crónico.

Las sensaciones de temperatura y dolor se originan en terminales nerviosas en la piel, en las cuales se lleva a cabo la transformación del estímulo físico (presión, calor, frío) o químico (sustancias irritantes) en impulsos eléctricos (llamados potenciales de acción), los cuales constituyen las “palabras” del código con el cual las diversas partes del sistema nervioso se comunican entre sí, al igual que los puntos y rayas en un telégrafo o los 0 y 1 en un ordenador. A este fenómeno de transformación de un estímulo externo se denomina “transducción sensorial”. Luego, los impulsos eléctricos viajan

a través de los nervios, como si fuese a través de cables, hasta neuronas en la médula espinal, y de allí la información es llevada al cerebro, en donde nacerá la sensación consciente de dolor, calor o frío (fig. 1).

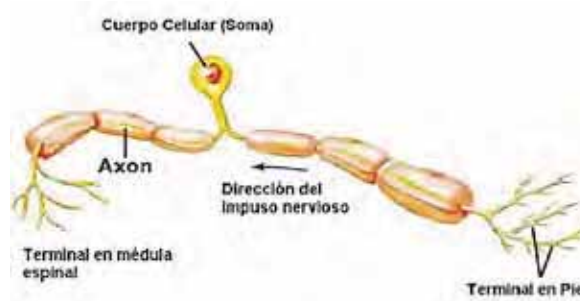


Figura 1: Esquema de una neurona sensorial primaria. Los somas de varias neuronas de este tipo se agrupan en estructuras llamadas ganglios sensoriales.

En los últimos años, ha habido un gran avance en el campo de la transducción sensorial de la temperatura, al descubrirse que muchos de los miembros de una familia de proteínas llamadas TRP (las siglas vienen del acrónimo inglés Transient Receptor Potential, o potencial de receptor transitorio) se activan por cambios de temperatura y se encuentran en las terminales nerviosas de la piel (para una revisión se puede consultar [3]).

El trabajo de diversos grupos en el mundo entero durante los últimos siete años ha demostrado que la molécula responsable de la detección de descensos de temperatura moderados en la piel (cambios de hasta 20 °C en el interior de la piel, donde residen las terminales nerviosas) es una proteína llamada TRPM8, la cual es sensible además al compuesto activo de la menta, el mentol (por ello si comemos un chicle con menta sentimos una sensación refrescante en la boca) [4-8]. Descensos de temperatura más pronunciados (de más de 20 °C, frío nocivo) evocan una sensación dolorosa y en este caso no se sabe aún si la molécula responsable es TRPM8 u otras diferentes, existiendo varias candidatas. Una de estas candidatas es la proteína TRPA1, la cual media la sensibilidad a una gran variedad de irritantes químicos como el gas lacrimógeno [9], hipoclorito de sodio (lejía) [10], humo de cigarrillo [11], aceite de mostaza [12] y de canela [13], etc., y cuyo papel en la sensibilidad al frío nocivo es sin embargo muy discutido, habiendo evidencia tanto

a favor de que media la sensibilidad al frío nocivo [13-15], como a favor de que no juega ningún papel en el fenómeno [9,12,16] .

Además de poseer terminales nerviosas en la piel, las tenemos en las vísceras, ya que también necesitamos información sobre el estado de nuestro interior. Curiosamente se ha reportado que algunas terminales del nervio vago (una de las principales fuentes de inervación visceral) en órganos como la laringe, el esófago o el estómago son sensibles al frío [17-20]. Sin embargo se sabe muy poco con respecto a estas terminales. Nosotros nos preguntamos si estos nervios sensibles al frío viscerales usan la misma molécula que las terminales cutáneas, TRPM8, para transformar los descensos de temperatura en impulsos nerviosos.

MÉTODO EXPERIMENTAL

Para responder a la pregunta de cuál es la proteína responsable de la sensibilidad al frío en las terminales nerviosas viscerales, medimos la actividad eléctrica de dichas neuronas en cultivo mediante los métodos de *patch clamp* e imagen de calcio, los cuales describiremos a continuación.

Cultivo de neuronas sensoriales viscerales

Las terminales nerviosas de la piel o las vísceras, son en realidad prolongaciones de neuronas, cuyos somas (es decir cuerpo) residen agrupados en un “ganglio sensorial” (fig.1). El nervio vago posee dos ganglios, el yugular y el nodoso, de los cuales el segundo es el más grande. Se considera clásicamente que el ganglio yugular es similar a los ganglios que inervan la piel (de hecho, inerva parte de la piel del oído), mientras que el nodoso inerva solamente las vísceras y posee características diferentes [21]. Por ello decidimos estudiar el ganglio nodoso. Decidimos hacer cultivos de las neuronas del ganglio nodoso, es decir extraer las neuronas y mantenerlas con vida *in vitro*. Para ello, se anestesia al animal (usamos ratas y ratones), se le eutanasia, y se disecan los ganglios nodosos. Una vez aislados, se cortan, se limpian y se transfieren a una solución enzimática que disgrega el tejido conjuntivo, es decir el cemento que mantiene unidas las células y por ello ayuda a separarlas. Luego de una hora se termina de separar las células haciéndolas pasar por

la punta de una pipeta pulida al fuego. Se añade un medio de cultivo para neuronas (una solución que posee todos los nutrientes necesarios para que las neuronas vivan y crezcan *in vitro*) y se depositan sobre cristales previamente preparados con un sustrato para que las neuronas se peguen. Tras un día en esta situación, las neuronas se recuperan, extienden nuevamente sus prolongaciones y es posible estudiar sus características.

Registro de patch clamp

Esta técnica permite medir directamente la actividad eléctrica de las neuronas. Para ello se fabrican, a partir de capilares de vidrio, pipetas cuyas puntas tienen unas pocas micras de diámetro. Las pipetas se rellenan con una solución de composición similar al fluido que lleva la neurona en el interior. Se coloca un electrodo de tierra o referencia en el fluido que rodea las neuronas. Luego se conecta la pipeta a una serie de amplificadores eléctricos y bajo un microscopio se pone la punta de la pipeta en contacto estrecho con la superficie de la célula a estudiar y se gana acceso a su interior. Gracias a este sistema se puede medir la diferencia de potencial entre el interior de la célula y el medio circundante y registrar directamente la actividad eléctrica de la neurona.

Imagen de calcio

Esta técnica permite medir la actividad eléctrica neuronal en una forma indirecta. Para ello se pone las neuronas en contacto con una sustancia que puede entrar al interior de dichas neuronas y que tiene la propiedad de emitir fluorescencia en longitudes de onda distintas según esté unida o no a calcio. El calcio es un ión abundante en el medio extracelular, pero escaso dentro de las neuronas. Cuando una neurona genera un impulso eléctrico, muchas veces los iones de calcio pueden pasar al interior de la neurona y unirse a la sustancia que hemos introducido, por lo cual podremos ver un cambio en la emisión de fluorescencia. Medimos, pues, cambios en los niveles intraneuronales de calcio, los cuales están relacionados con la actividad eléctrica neuronal. Esta técnica, si bien es indirecta, tiene la ventaja frente al *patch clamp*, que permite estudiar muchas neuronas al mismo tiempo, mientras que con el *patch clamp* sólo se puede

estudiar una neurona a la vez, lo cual desde luego, consume mucho tiempo.

Estimulación de las neuronas en cultivo

Mientras realizábamos los registros en imagen de calcio, *patch clamp*, o ambos al mismo tiempo, estimulábamos las neuronas en cultivo con descensos o ascensos de la temperatura, o la administración de diversos fármacos, con la finalidad de estudiar la respuesta de las neuronas a dichos estímulos. Los fármacos se eligieron según su capacidad para excitar o inhibir proteínas de la familia TRP y, por lo tanto, se usaron como herramienta para discernir la presencia y función de dichas proteínas en las neuronas del ganglio nodoso.

Expresión de proteínas en células CHO

Las neuronas tienen además de la proteína que uno pretende estudiar, muchas otras, las cuales pueden interferir con nuestro estudio. Para conocer más acerca de las propiedades de una proteína aislada, se puede expresar dicha proteína en una célula huésped, que normalmente no la exprese. Nosotros usamos células CHO (células provenientes de ovario de hámster chino) a las cuales se les había introducido el ADN de la proteína TRPA1, procedimiento que logra que las células CHO expresen dicha proteína, lo cual permite estudiarla en forma aislada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera pregunta que nos planteamos fue si las neuronas del ganglio nodoso de rata en cultivo respondían al frío. Para ello usamos la técnica de imagen de calcio, ya que permite el estudio de múltiples neuronas al mismo tiempo. Administramos descensos de temperatura, desde una temperatura basal de 35 °C a una temperatura de 12 °C, a un total de 857 neuronas, de las cuales 419 (49%), respondieron al frío con aumentos en la concentración de calcio intracelular (fig. 2A y 2B). Estas respuestas fueron altamente reproducibles, ya que se administró tres rampas consecutivas a 14 neuronas y todas ellas respondieron en cada una de las rampas administradas (fig. 2C).

Los incrementos del calcio intracelular son, como ya he explicado en el apartado de metodología,

un reportero indirecto de la actividad eléctrica neuronal. Esto quiere decir que el calcio intracelular puede también incrementarse debido a otras razones. Para averiguar si ese incremento en el calcio intracelular se debía realmente a la generación de impulsos eléctricos (lo cual indica que la función de esa neurona es realmente sentir el frío), registramos directamente la actividad eléctrica mediante la técnica de *patch clamp*. De esta manera corroboramos que el descenso en la temperatura provoca tanto un incremento en los niveles intracelulares de calcio como la generación de impulsos eléctricos (potenciales de acción) (fig. 3A y 3B).

Estos resultados demuestran que efectivamente existen neuronas sensibles a frío en el ganglio nodoso. La proporción de neuronas que respondieron con aumentos en el calcio intracelular en respuesta al frío en el ganglio nodoso fue muy alta (49%), en comparación a lo reportado para las neuronas que inervan la piel, ya que se ha descrito alrededor del 10% de neuronas sensibles a frío en dicho tejido [22, 23].

Una vez establecido que una proporción de neuronas del ganglio nodoso era sensible al frío, nos propusimos establecer cuál o cuáles eran las proteínas implicadas en dicha sensibilidad. Razonamos que si en las neuronas que inervan la piel, la principal proteína implicada en la sensibilidad al frío es el TRPM8, quizás en las neuronas del ganglio nodoso también fuera el TRPM8. Para ello administramos el compuesto mentol (que se extrae de la menta), el cual en aquel momento se pensaba activaba únicamente a la proteína TRPM8 [4, 5]. Vimos que una alta proporción de neuronas sensibles al frío (alrededor del 70%) respondieron al compuesto mentol incrementando los niveles intracelulares de calcio (fig. 4A). Este resultado se podía interpretar como que las neuronas del ganglio nodoso respondían a frío mediante la proteína TRPM8, al igual que aquellas que inervan la piel. ¡Parecía que el proyecto se había resuelto rápida y fácilmente!

En neuronas que inervan la piel, la proteína TRPA1 no se expresa en las mismas neuronas que expresan TRPM8 [14]. Se sabía que en el ganglio nodoso había gran cantidad de la proteína TRPA1 [24] y, ya que es otro candidato a mediar la sensibilidad al frío [14], decidimos corroborar que dicha proteína no se

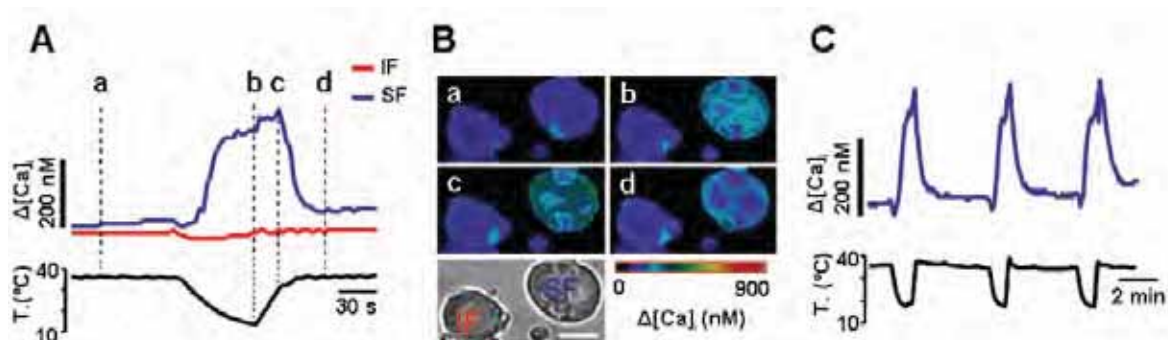


Figura 2: Caracterización de la respuesta a frío de las neuronas del ganglio nodoso. A. Registro simultáneo de calcio intracelular (trazos superiores) y temperatura (trazo inferior) durante la aplicación de rampas de frío en una neurona sensible (SF; trazo azul) y en otra insensible (IF; trazo rojo) al frío. B. Fotografías de luz transmitida y de fluorescencia en una escala de color, de las dos neuronas cuyos registros aparecen en A (la neurona SF, a la izquierda) y tomadas en los momentos indicados por las líneas con igual rotulación. C. Respuesta de una neurona sensible al frío a tres rampas sucesivas de frío.

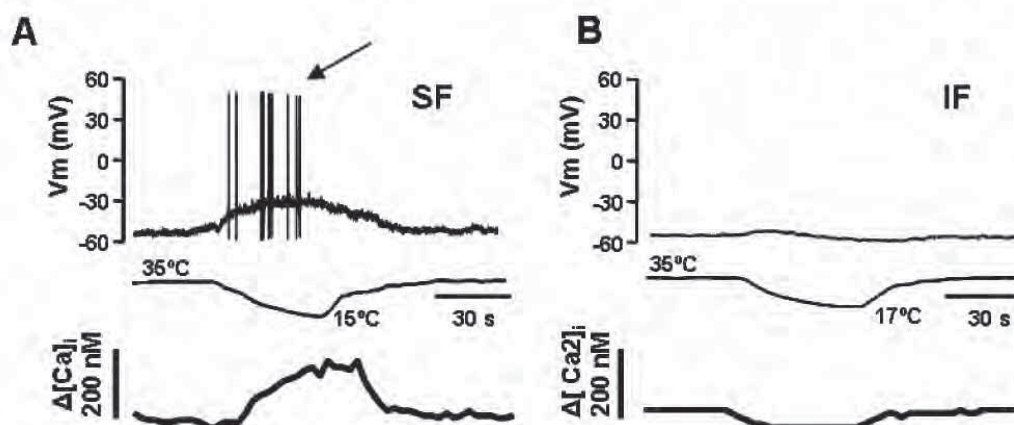


Figura 3: Cambios de voltaje y de calcio intracelular en respuesta al frío. A. Registros simultáneos del potencial de membrana, temperatura e imagen de calcio en una neurona sensible al frío (SF). Nótese la despolarización, generación de impulsos eléctricos (flecha) y elevación del calcio intracelular en respuesta al frío. B. Falta de respuesta en una neurona insensible al frío (IF).

encontraba en las neuronas sensibles a frío y mentol. Para ello aplicamos el fármaco cinamaldehído (que se extrae de la canela) y que activa específicamente la proteína TRPA1 [13]. Nos dimos con la sorpresa de que el 80% de las neuronas que respondían a frío, lo hacían también a cinamaldehído y al mentol (fig. 4A). Esta situación nos llamó mucho la atención, pues como ya he dicho, en la piel ambas proteínas TRPA1 y TRPM8 no se encuentran juntas en una misma neurona.

Este último experimento abrió la pregunta de si la TRPA1 estaría también implicada en la sensibilidad al frío. Para intentar resolver esto, usamos un fármaco llamado BCTC, que tiene la extraña propiedad de inhibir TRPM8 pero excitar TRPA1 [25]. Nosotros esperábamos que al aplicar este fármaco a la vez

que el frío, tuviéramos una inhibición total de la respuesta a frío, lo cual indicaría que sólo TRPM8 mediaba dicha respuesta o quizás una inhibición parcial, lo cual indicaría que TRPM8 y TRPA1 mediaban ambos la respuesta. ¡Sin embargo en lugar de obtener una inhibición obtuvimos una excitación o potenciación de la mayoría de respuestas a frío! (fig. 4B).

Para aclarar esta paradójica situación, usamos dos fármacos que inhiben TRPA1, el alcanfor (proveniente de la planta del mismo nombre) [26] y el HC-03001 (un compuesto sintético desarrollado recientemente para inhibir la TRPA1) [27], a la vez que las rampas de frío. En estos dos casos, vimos una inhibición completa de las respuestas a frío (figs. 4C y 4D). Estos resultados indicarían que

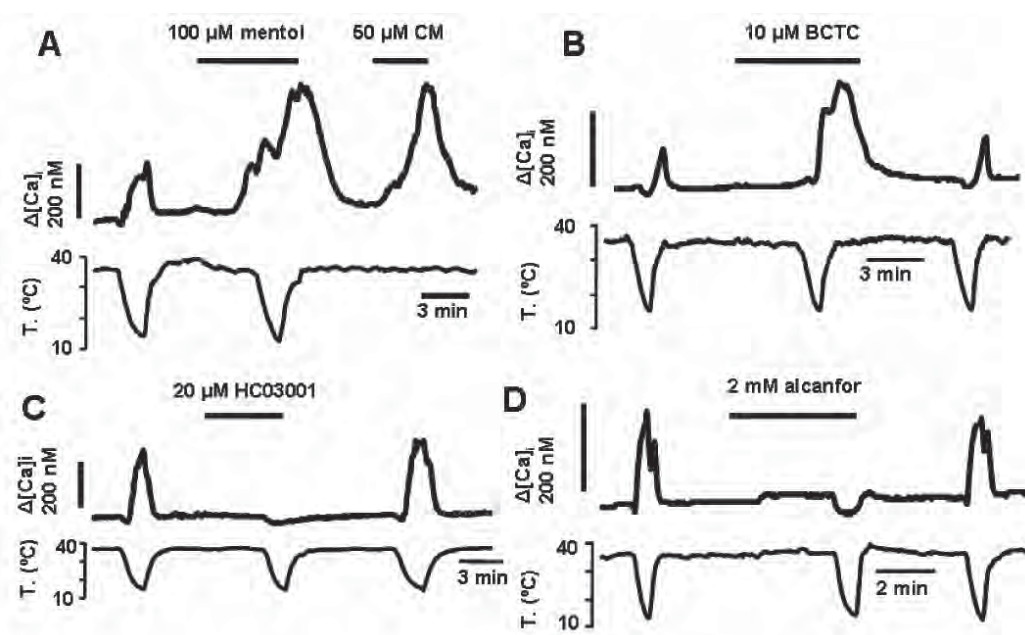


Figura 4: Registros simultáneos de imagen de calcio y temperatura de neuronas del ganglio nodoso mostrando el efecto de varios fármacos. A. Efecto excitador del mentol y cinamaldehído (CM). B. Efecto excitador del BCTC. C. Efecto inhibidor de HC03001. D. Efecto inhibidor del alcanfor.

Tabla 1: Efecto de agonistas y antagonistas de las proteínas TRPM8 y TRPA1 sobre la actividad de éstas y sobre las respuestas al frío registradas en neuronas cultivadas del ganglio nodoso.

	Mentol	Cinamal-dehído	BCTC	Alcanfor	HC03001
TRPM8	+	-	-	0	0
TRPA1	+/-	+	+	-	-
Nodoso	+	+	+	-	-

Nota: Los signos significan: activación (+), inhibición (-) o ninguna acción (0). Obsérvese que el patrón de respuesta de las neuronas del ganglio nodoso es similar a la de la TRPA1 aislado.

solo la TRPA1 mediaba las respuestas a frío. Sin embargo, ¿qué pasaba con la TRPM8 y las respuestas a mentol? La paradoja se aclaró al ser publicado un trabajo en el cual se describía que el mentol también puede activar el TRPA1, dependiendo de la dosis [28]. A la dosis que nosotros habíamos usado es posible explicar el efecto excitador del mentol sobre las respuestas a frío mediante TRPA1.

Para comprobar la hipótesis de que TRPA1 era la mediadora de la respuesta a frío en el 70% de las neuronas sensibles al descenso a temperatura, usamos ratones “Knock Out” de TRPA1, es decir, ratones a los cuales se les ha inhabilitado el gen que codifica la proteína TRPA1 y por ello carecen de dicha proteína [29]. En estos ratones vimos que todas aquellas neuronas sensibles a frío, mentol y cinamaldehído

estaban ausentes. Esto comprobó finalmente que TRPA1 es el principal mediador de la respuesta a frío en las neuronas del ganglio nodoso. Había sin embargo una pequeña población de neuronas cuya respuesta no estaba mediada por TRPA1 y cuya naturaleza podría ser desentrañada en estudios posteriores.

Estos resultados se publicaron en la revista internacional *The Journal of Neuroscience* [1] y ayudarán a aclarar el papel de la TRPA1 en la transducción del frío en la piel y además a comprender el rol fisiológico de las fibras vagales sensibles a frío. Se pueden proponer varias funciones fisiológicas para estas fibras nerviosas. En las vías aéreas humanas se producen importantes descensos de temperatura (de hasta 20 °C) cuando se respira aire frío [30]. El aire frío es un irritante de las vías aéreas y puede provocar

crisis en pacientes asmáticos [31, 32]. Justamente en el asma inducido por ejercicio, se ha propuesto que al respirar más hondo y más rápido hay menos tiempo de calentar el aire, y este aire frío está desencadenando la respuesta asmática. Si las fibras vagales sensibles a frío estuvieran implicadas en el origen del asma, serían una diana farmacológica para el tratamiento de esta enfermedad. Otras posibles funciones fisiológicas pueden ser el control de la respiración (el aire que inspiramos es más frío que el que espiramos), el control de la motilidad gastrointestinal (el frío reduce dicha motilidad) o la termorregulación (los fármacos agonistas de TRPA1 inducen hipertermia). Hará falta más trabajo de investigación para determinar cuáles de estas posibilidades son válidas y cuáles pueden tener utilidad en la clínica médica.

Durante el transcurso de la investigación antes descrita, también observamos que un fármaco usado para el tratamiento de la hipertensión arterial, la nifedipina, de la familia de las dihidropiridinas, producía incrementos

del calcio intracelular en neuronas del ganglio nodoso sensibles a frío y cinamaldehído (fig. 5A). Elaboramos la hipótesis de que la respuesta a la nifedipina podría estar mediada por la proteína TRPA1. Para comprobar esta hipótesis, aplicamos nifedipina y otras dihidropiridinas a células CHO (células de ovario de hámster chino) que tenían el gen de la TRPA1 y por lo tanto expresaban esta proteína en grandes cantidades. Vimos una notable respuesta en estas células (figs. 5B y 5C). Así comprobamos que la nifedipina y otras dihidropiridinas usadas en la práctica médica para combatir la hipertensión activan la proteína TRPA1. Este descubrimiento se publicó en la revista *Channels* [2] y podría ayudar a comprender mejor las acciones antihipertensivas de las dihidropiridinas (la TRPA1 también se expresa en las terminales que inervan los vasos sanguíneos, las cuales, cuando se excitan pueden liberar sustancias llamadas neuropéptidos, que a su vez pueden inducir vasodilatación y esto a su vez causar un descenso en la presión arterial [33]) y algunos efectos secundarios de estos fármacos.

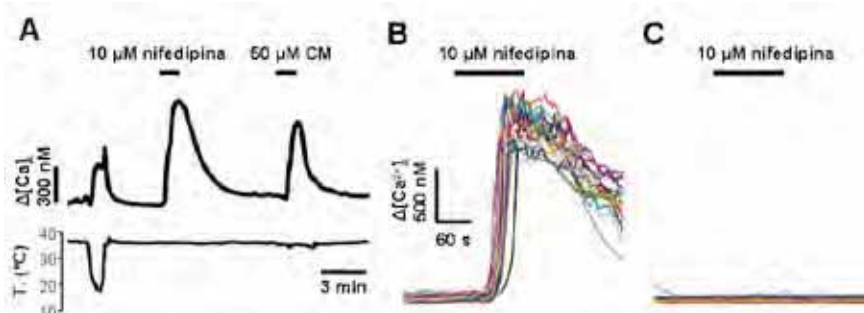


Figura 5: Efecto activador de la nifedipina sobre la TRPA1. A. Respuesta de una neurona del ganglio nodoso a nifedipina, frío y cinamaldehído (CM). B. Respuesta a la nifedipina en células CHO que expresan TRPA1. C. Falta de respuesta en células CHO control.

CONCLUSIONES

Con estos resultados demostramos que la proteína TRPA1 es la principal mediadora de la sensibilidad al frío en las neuronas del ganglio nodoso en cultivo. También demostramos que las dihidropiridinas, fármacos usados como antihipertensivos, tienen una acción excitadora sobre la proteína TRPA1, acción que no había sido descrita con anterioridad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las personas que participaron en el trabajo experimental: mis directores de tesis, los

doctores Carlos Belmonte Martínez, Félix Viana de la Iglesia y Roberto Gallego Fernández, así como en aquel entonces compañero de estudios de doctorado, y ahora ya doctor, Víctor Meseguer Viguera. El trabajo experimental fue realizado en el Instituto de Neurociencias de Alicante, España, en el laboratorio de Transducción Sensorial y Nocicepción. Agradezco también al resto de integrantes de dicho laboratorio, los cuales me ayudaron en diversas etapas del trabajo. Por último, agradezco a Ángela Vivó Aguado su ayuda con la corrección del presente manuscrito y su apoyo a lo largo de la realización del trabajo y en el presente.

REFERENCIAS

- [1] O. Fajardo, V. Meseguer, C. Belmonte, and F. Viana, TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence, *J. Neurosci.* 28 (2008) 7863-7875.
- [2] O. Fajardo, V. Meseguer, C. Belmonte, and F. Viana, TRPA1 channels: Novel targets of 1,4-dihydropyridines, *Channels (Austin.)* 2 (2008).
- [3] C. Belmonte and F. Viana, Molecular and cellular limits to somatosensory specificity, *Mol.Pain* 4 (2008) 14.
- [4] A. M. Peier, A. Moqrich, A. C. Hergarden, A. J. Reeve, D. A. Andersson, G. M. Story, T. J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, and A. Patapoutian, A TRP channel that senses cold stimuli and menthol, *Cell* 108 (2002) 705-715.
- [5] D. D. McKemy, W. M. Neuhusser, and D. Julius, Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation, *Nature* 416 (2002) 52-58.
- [6] D. M. Bautista, J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S. E. Jordt, and D. Julius, The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold, *Nature* 448 (2007) 204-208.
- [7] A. Dhaka, A. N. Murray, J. Mathur, T. J. Earley, M. J. Petrus, and A. Patapoutian, TRPM8 is required for cold sensation in mice, *Neuron* 54 (2007) 371-378.
- [8] R. W. Colburn, M. L. Lubin, D. J. Stone, Jr., Y. Wang, D. Lawrence, M. R. D'Andrea, M. R. Brandt, Y. Liu, C. M. Flores, and N. Qin, Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice, *Neuron* 54 (2007) 379-386.
- [9] D. M. Bautista, S. E. Jordt, T. Nikai, P. R. Tsuruda, A. J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A. I. Basbaum, and D. Julius, TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents, *Cell* 124 (2006) 1269-1282.
- [10] B. F. Bessac, M. Sivula, C. A. von Hehn, J. Escalera, L. Cohn, and S. E. Jordt, TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons, *J. Clin. Invest* 118 (2008) 1899-1910.
- [11] E. Andre, B. Campi, S. Materazzi, M. Trevisani, S. Amadesi, D. Massi, C. Creminon, N. Vaksman, R. Nassini, M. Civelli, P.G. Baraldi, D. P. Poole, N. W. Bunnett, P. Geppetti, and R. Patacchini, Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents, *J. Clin. Invest* 118 (2008) 2574-2582.
- [12] S. E. Jordt, D. M. Bautista, H. H. Chuang, D. D. McKemy, P. M. Zygmunt, E. D. Hogestatt, I. D. Meng, and D. Julius, Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1, *Nature* 427 (2004) 260-265.
- [13] M. Bandell, G. M. Story, S. W. Hwang, V. Viswanath, S. R. Eid, M. J. Petrus, T. J. Earley, and A. Patapoutian, Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin, *Neuron* 41 (2004) 849-857.
- [14] G. M. Story, A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, and A. Patapoutian, ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures, *Cell* 112 (2003) 819-829.
- [15] Y. Karashima, K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, K. Y. Kwan, R. Vennekens, B. Nilius, and T. Voets, TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (2009).
- [16] S. Zurborg, B. Yurgionas, J. A. Jira, O. Caspani, and P. A. Heppenstall, Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺, *Nat. Neurosci.* 10 (2007) 277-279.
- [17] El Ouazzani T. and N. Mei, Electrophysiologic properties and role of the vagal thermoreceptors of lower esophagus and stomach of cat, *Gastroenterology* 83 (1982) 995-1001.
- [18] J. K. Lennerz, C. Dentsch, N. Bernardini, T. Hummel, W. L. Neuhuber, and P. W. Reeh, Electrophysiological characterization of vagal afferents relevant to mucosal nociception in the rat upper oesophagus, *J. Physiol* 582 (2007) 229-242.
- [19] G. Sant'Ambrogio, O. P. Mathew, F. B. Sant'Ambrogio, and J. T. Fisher, Laryngeal cold receptors, *Respir. Physiol* 59 (1985) 35-44.
- [20] Y. Jammes, B. Nail, N. Mei, and C. Grimaud, Laryngeal afferents activated by phenyldiguanide and their response to cold air or helium-oxygen, *Respir. Physiol* 67 (1987) 379-389.
- [21] H. R. Berthoud and W. L. Neuhuber, Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system, *Auton. Neurosci.* 85 (2000) 1-17.
- [22] F. Viana, E. de la Peña, and C. Belmonte, Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression, *Nat. Neurosci.* 5 (2002) 254-260.
- [23] G. Reid, A. Babes, and F. Pluteanu, A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction, *J. Physiol* 545 (2002) 595-614.

- [24] K. Nagata, A. Duggan, G. Kumar, and J. Garcia-Anoveros, Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4052-4061.
- [25] R. Madrid, T. Donovan-Rodriguez, V. Meseguer, M.C. Acosta, C. Belmonte, and F. Viana, Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals, *J. Neurosci.* 26 (2006) 12512-12525.
- [26] L. J. Macpherson, S. W. Hwang, T. Miyamoto, A.E. Dubin, A. Patapoutian, and G. M. Story, More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds, *Mol. Cell Neurosci.* 32 (2006) 335-343.
- [27] C. R. McNamara, J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista, J. Siemens, K. L. Deranian, M. Zhao, N. J. Hayward, J. A. Chong, D. Julius, M. M. Moran, and C. M. Fanger, TRPA1 mediates formalin-induced pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104 (2007) 13525-13530.
- [28] Y. Karashima, N. Damann, J. Prenen, K. Talavera, A. Segal, T. Voets, and B. Nilius, Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1, *J. Neurosci.* 27 (2007) 9874-9884.
- [29] K. Y. Kwan, A. J. Allchorne, M. A. Vollrath, A. P. Christensen, D. S. Zhang, C. J. Woolf, and D. P. Corey, TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction, *Neuron* 50 (2006) 277-289.
- [30] E. R. McFadden, Jr., B. M. Pichurko, H. F. Bowman, E. Ingenito, S. Burns, N. Dowling, and J. Solway, Thermal mapping of the airways in humans, *J. Appl. Physiol* 58 (1985) 564-570.
- [31] Y. S. Cho, S.Y. Park, C. K. Lee, E. Y. Lee, J. H. Shin, B. Yoo, and H. B. Moon, Enhanced cough response to hyperpnea with cold air challenge in chronic cough patients showing increased cough sensitivity to inhaled capsaicin, *Allergy* 58 (2003) 486-491.
- [32] K. Larsson, G. Tornling, D. Gavhed, C. Muller-Suur, and L. Palmberg, Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects, *Eur. Respir. J.* 12 (1998) 825-830.
- [33] D. M. Bautista, P. Movahed, A. Hinman, H. E. Axelsson, O. Sterner, E. D. Hogestatt, D. Julius, S. E. Jordt, and P. M. Zygmunt, Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102 (2005) 12248-12252.

E-mail: ottofajardob@yahoo.es