

**Estudio a través de modelación matemática del papel del canal TRPM8
en el patrón de disparo de neuronas somatosensoriales primarias
sensibles al frío inocuo.**

Tesis entregada a la Universidad de Valparaíso en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencias.

Facultad de Ciencias

Por

Erick Olivares Bravo

Marzo 2013

Tesis dirigida por

Patricio Orio, PhD

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por:

Erick Olivares Bravo

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendida el día 18 del Mes de Marzo de 2014.

Director de Tesis:

Dr. Patricio Orio.....

Codirector de Tesis:

Dr. Alan Nelly.....

Comisión de Evaluación de la Tesis :

Dr. Ramón Latorre.....

Dr. Pierre Guiraud.....

Dr. Rodolfo Madrid.....

Agradecimientos

A mi tutor, Dr. Patricio Orio, quien está creando un nicho para el desarrollo de la neurociencia computacional en Chile y que tuve la suerte de inaugurar.

A mi cotutor, Dr. Alan Nelly, quien me hizo más familiar la termodinámica de canales.

Al Dr. Armin Bahl, quien me introdujo en el mundo de *Python* y me facilitó el uso de los algoritmos evolutivos de optimización.

A los habitantes del “laboratorio de neurociencia computacional” del CINV, Danilo Pezo, Miguel Piñeiro, Keber Flores, Daniela De Giorgis, Jean Maidana y Gaspar Herrera.

A los miembros de la comisión evaluadora, Dr. Ramón Latorre, Dr. Pierre Guiraud y Dr. Rodolfo Madrid, por sus valiosos comentarios en el desarrollo de esta tesis.

A las fuentes de financiamiento:

Beca CONICYT para estudios de Doctorado en Chile a Erick Olivares.

Proyecto Fondecyt Regular No 11090308 a Patricio Orio.

Proyecto Fondecyt Regular No 113106 a Rodolfo Madrid.

Proyecto Anillo ACT-1113 a Patricio Orio y Rodolfo Madrid.

Beca MECESUP para Pasantías en el Extranjero a Erick Olivares.

Y a mi familia y amigos, que aunque en su mayoría no tienen idea de lo que es esta tesis, siempre me dieron su apoyo.

Lista de abreviaciones

HCN	Canal catiónico activado por despolarización.
ISI	Intervalo inter espigas (<i>Inter spike interval</i>).
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato .
PLC	Fosfolipasa C.
SNC	Sistema nervioso central.
TNSF	Terminal nervioso sensible a frío.
TRAAK	<i>TWIK-1 Related arachidonic acid-stimulated K⁺ channel.</i>
TREK	<i>TWIK-1 RElated K⁺ channel.</i>
TRPM8	<i>Transient Receptor Potential Melastatin 8</i>

ÍNDICE

1 RESUMEN.....	X
1.1 ABSTRACT.....	XI
2 INTRODUCCIÓN.....	1
2.1 Neuronas somatosensoriales primarias sensibles a frío.....	1
2.1.1 Disparos de potenciales de acción en TNSF	2
2.1.1.1 Respuesta estática.....	2
2.1.1.2 Respuesta dinámica.....	4
2.1.2 Corrientes iónicas en TNSF.....	4
2.1.3 Geometría de los TNSF.....	6
2.2 Modelos matemáticos de TNSF.....	7
2.2.1 Oscilaciones subumbral y el modelo de Huber y Braun.....	7
2.2.2 Modelos de dos compartimentos.....	9
2.2.3 Parámetros libres y estrategias de ajuste.....	11
2.3 Hipótesis.....	13
2.3.1 Objetivo general.....	13
2.3.2 Objetivos específicos.....	13
3 MÉTODOS.....	14
3.1 Registros experimentales.....	15
3.2 Modelo de un compartimento.....	16
3.2.1 Activación del canal TRPM8.....	18
3.3 Modelo de dos compartimentos.....	20

3.4 Simulaciones.....	21
3.5 Ajuste del modelo.....	22
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Los modelos propuestos reproducen la respuesta estática de los TNSF.....	29
4.2 Los modelos propuestos reproducen la respuesta dinámica de los TNSF.....	31
4.3 Las soluciones del ajuste del modelo producen comportamientos disímiles.....	32
4.4 La función de distancia utilizada no asegura un buen comportamiento del modelo...43	
4.5 Distribución de parámetros del conjunto de soluciones obtenido mediante algoritmo evolutivo.....	44
4.5.1 Modelo de un compartimento.....	44
4.5.2 Modelo de dos compartimentos.....	46
4.6 Dinámica de las variables de adaptación dependiente de calcio del canal TRPM8...49	
4.7 Respuesta dependiente de TRPM8 en los modelos propuestos.....	51
5 DISCUSIÓN.....	54
5.1 El canal TRPM8 puede ser el responsable de la respuesta dinámica de los TNSF...54	
5.2 La diversidad natural de los TNSF y la diversidad de modelos.....	55
5.3 Modelo de un compartimento v/s modelo de dos compartimentos, nivel de complejidad del modelo.....	56
5.4 Ventajas y desventajas de la aplicación del algoritmo evolutivo.....	57
5.5 Conclusión general.....	58
6 REFERENCIAS.....	60

Lista de Figuras

Figura 1: Patrón de respuesta estática en TNSF.....	3
Figura 2: Circuito equivalente del modelo de Huber y Braun y su patrón de respuesta estática.....	8
Figura 3: Respuesta dinámica de TNSF y el comportamiento del modelo de Huber y Braun ante el mismo protocolo de estimulación por cambio de temperatura.....	10
Figura 4: Circuitos equivalentes de los modelos propuestos.....	15
Figura 5: Reproducción del comportamiento estático en TNSF.....	30
Figura 6: Reproducción del comportamiento dinámico en TNSF.....	32
Figura 7: Comportamiento de las soluciones obtenidas mediante algoritmo evolutivo de optimización.....	34
Figura 8: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce los comportamientos dinámico y estático de TNSF.....	35
Figura 9: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce el comportamiento estático pero no el dinámico de TNSF.....	36
Figura 10: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce el comportamiento dinámico pero no el estático de TNSF.....	37
Figura 11: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros con la que no muestra ni el comportamiento dinámico ni el estático de TNSF.....	38
Figura 12: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce los comportamientos dinámico y estático de TNSF.....	39
Figura 13: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que	

reproduce el comportamiento estático pero no el dinámico de TNSF.....	40
Figura 14: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce el comportamiento dinámico pero no el estático de TNSF.....	41
Figura 15: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que no muestra ni el comportamiento dinámico ni el estático de TNSF.....	42
Figura 16: Resultados de la función de distancia utilizada en el algoritmo de optimización..	43
Figura 17: Parámetros de la conductancia de la corriente de fuga obtenidos para el modelo de un compartimento.....	45
Figura 18: Parámetros de la conductancia de TRPM8 y dinámica de calcio obtenidos para el modelo de dos compartimentos.....	45
Figura 19: Parámetros de las conductancias tipo Huber y Braun obtenidos para el modelo de un compartimento.....	46
Figura 20: Parámetros de la conductancia axial obtenidos para el modelo de dos compartimentos.....	47
Figura 21: Parámetros de la conductancia de la corriente de fuga obtenidos para el modelo de dos compartimentos.....	47
Figura 22: Parámetros de la conductancia de TRPM8 y dinámica de calcio obtenidos para el modelo de dos compartimentos.....	48
Figura 23: Parámetros de las conductancias tipo Huber y Braun obtenidos para el modelo de dos compartimentos.....	48
Figura 24: Dinámicas de las variables dependientes de calcio del canal TRPM8.....	50
Figura 25: Dependencia de la conductancia de TRPM8 en la frecuencia de disparo producidos por el modelo propuesto.....	53

Lista de Tablas

Tabla I: Lista de parámetros fijos del modelo propuesto.....	21
Tabla II: Espacio de búsqueda del Algoritmo evolutivo.....	23

1 RESUMEN

En mamíferos, las neuronas somatosensoriales primarias sensibles al frío inocuo muestran diversos patrones de impulsos nerviosos. A temperatura constante, estas neuronas exhiben secuencias de disparos regulares o bien en ráfaga dependiendo de la temperatura (respuesta estática). Cambios bruscos de la temperatura producen un aumento en la tasa de disparo cuando baja la temperatura o la disminuyen cuando sube la temperatura (respuesta dinámica). Basados en las conductancias de algunos canales de iones presentes en estos terminales, Huber y Braun (1998) construyeron un modelo matemático que reproduce la respuesta estática de estas neuronas. Sin embargo, este modelo no reproduce la respuesta dinámica. En este trabajo expandimos el modelo de Huber y Braun incluyendo al canal activado por frío TRPM8 con el propósito de reproducir tanto la respuesta dinámica como la estática. Ajustamos el modelo mediante algoritmos de optimización evolutiva lo que nos permitió encontrar una población de conjuntos de parámetros con los cuales el modelo reproduce ambas respuestas. También evaluamos el comportamiento de nuestro modelo separando las conductancias de transducción y de generación de potenciales de acción en dos compartimentos diferentes, encontrando también grupos de parámetros en donde el modelo reproduce ambas respuestas. La amplia distribución de los grupos de parámetros que otorgan al modelo la capacidad de reproducir el comportamiento de estos terminales, sugiere la presencia de mecanismos compensatorios que garantizan una correcta codificación del estímulo térmico más allá de las densidades individuales de cada tipo de canal presentes en ellos.

1.1 ABSTRACT

In mammals, innocuous cold sensitive primary afferent neurons exhibit a variety of nerve impulse patterns. Under constant temperature, they show a tonic regular firing at normal skin temperature and a bursting behavior at temperatures below 30°C with a growing number of spikes per burst at lower temperatures (static response). Also, upon a sudden change of temperature, these neurons show a transient increase (when cooling) or decrease (when heating) in the firing rate (dynamic response). Based on the ionic channel conductances presumed to be present in the terminals, Huber & Braun (1998) built a conductance-based mathematical model that resembles the static response. However, this model lacks the dynamic response shown by the nerve fibers in vivo and notably it does not include the TRPM8 channel, known to be the most important cold transducer in mammals. We expanded the Huber&Braun model to include the cold activated TRPM8 channel with the aim of reproducing the dynamic response. We fit the model using evolutionary parameter optimization, and found a population of parameters sets in which the model resemble both, the dynamical and the static response. We also evaluated the behavior of our model separating transduction and action potential-generating conductances in two compartments. Under this condition we also found places in the parameter space in which the model resemble both, static and dynamical response. The wide distribution of parameter sets where the model reproduce both responses suggest compensatory mechanisms that allow the reliability in the response of this terminals despite variations in ion channel densities.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Neuronas somatosensoriales primarias sensibles a frío

En organismos homeotermos como los mamíferos, la detección de cambios de temperatura en el medio externo es una información fundamental para regular su homeostasis. Este fenómeno se origina principalmente neuronas somatosensoriales primarias, cuyos somas se ubican en los ganglios raquídeos y ganglios trigéminos y proyectan prolongaciones a órganos periféricos como la piel en donde se transforman en terminales nerviosos capaces de transducir e iniciar la codificación del estímulo térmico. En este proceso Intervienen diversos tipos neuronales, con especificidad de respuesta a temperaturas que representan para el organismo situaciones de calor nocivo, calor inocuo, frío nocivo o frío inocuo (Belmonte y Viana, 2007). Específicamente, los terminales nerviosos sensibles a frío inocuo (TNSF) corresponden a axones de neuronas del tipo A δ y C, es decir con axones pobremente mielinados o amielinados respectivamente (Kress y cols., 1992), tienen un máximo de actividad entre 20 y 30°C (Dubner y cols., 1975) y son en general insensibles a estímulos mecánicos (Hensel y Iggo, 1971).

Los TNSF han sido reportados en distintos géneros de mamíferos incluyendo roedores (Carr y cols., 2002; Parra y cols., 2010), felinos (bade y cols., 1979) y primates (Kenshalo y Duclax, 1977). En estos estudios se observa que, independientemente de la especie estudiada,

el comportamiento de los TNSF es consistente en cuanto a la tasa de disparo de potenciales de acción en función de la temperatura, como en los patrones de la secuencia temporal en que estos son generados (ver 2.1.1). Sin perjuicio de esto, tanto entre distintas especies, como en distintos terminales de un mismo organismo, se observa variabilidad con respecto a los rangos de temperatura en que ocurre la respuesta, así como en la estructura temporal de los disparos en ráfaga.

2.1.1 Disparos de potenciales de acción en TNSF

La sensación térmica depende tanto de la temperatura como de la variación de ésta (Spray, 1986). Conforme a esto, en el patrón de disparos de potenciales de acción en los TNSF, es posible distinguir dos componentes en la codificación del estímulo térmico. Por una parte, después de un tiempo de adaptación a una temperatura constante el registro alcanza un patrón de actividad característico para cada temperatura, la llamada respuesta estática, Por otra parte, modificaciones en la temperatura provocan un cambio transitorio en el patrón de actividad, lo que se conoce como respuesta dinámica. (Bade y cols., 1979; Braun y cols., 1980).

2.1.1.1 Respuesta estática

Normalmente la respuesta estática de los TNSF consiste en el disparo de potenciales de acción cuya frecuencia promedio y secuencia temporal varía dependiendo de la temperatura ambiente. La frecuencia promedio de estos disparos en función de la temperatura muestra una curva en forma de campana por lo que este parámetro no puede ser una señal unívoca en la codificación de la temperatura (Braun y cols., 1980; Spray, 1986; Braun y cols., 1998). Si bien la frecuencia promedio de disparos tiene una relación relativamente simple con la temperatura, la distribución de los intervalos entre espigas (ISI, del inglés *inter-spike interval*) muestra una gran diversidad de comportamientos a distintas temperatura (Fig. 1). Fenomenológicamente, estos comportamientos se pueden clasificar en cuatro tipos (Braun y cols., 1980), a saber:

Tónico regular, en donde las espigas ocurren a intervalos de tiempo regulares cuyo

período se encuentra entre los 100 a 300 ms dependiendo de la temperatura; Tónico irregular, que se caracteriza por la ausencia de uno o más espigas dentro de una serie de disparos regulares, lo que ocasiona un ISI múltiplo del período regular ; Ráfaga regular o disparos en ráfaga, que corresponde a uno o más ISIs muy cortos (10 a 60 ms) seguidos de un ISI largo, comparable al de los disparos regulares; Irregular, en donde la ocurrencia de potenciales de acción no presenta un patrón característico.

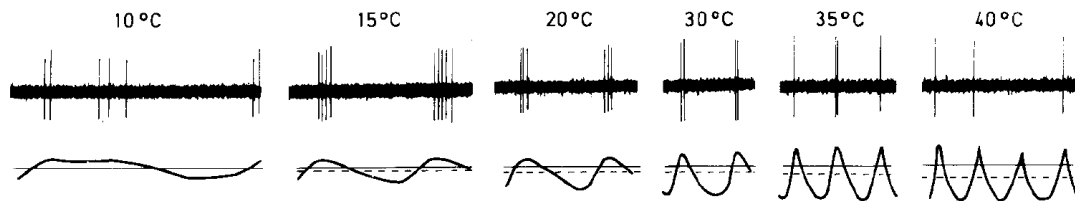


Figura 1: Patrón de respuesta estática en TNSF.

Arriba, registros extracelulares en TNSF de la lengua de gato a distintas temperaturas. Se observa el comportamiento tónico irregular a 40 °C. A 35 °C se observan disparos regulares con la presencia de un evento de disparos en ráfaga. Entre 30 y 15 °C a medida que la temperatura desciende se observan ráfagas con mayor número de espigas y periodos entre ráfagas más largos. A 10°C el patrón de disparos se puede definir como irregular. Abajo, hipotética oscilación subumbral del potencial de receptor, planteada como mecanismo de generación del patrón de disparos observado. (Figura de Braun y cols., (1980)).

Por lo general los TNSF muestran disparos tónico regular o irregular a temperaturas cercanas a la temperatura basal de la piel (~34°C), estos comportamientos pueden coexistir con disparos en ráfaga, los que se hacen más frecuentes a medida que la temperatura es menor (~30°C). A temperaturas entre 30 y 20 °C aumenta la frecuencia de disparo, lo que se relaciona con la mayor frecuencia de ráfagas, los cuales se hacen más abundantes en disparos a medida que la temperatura desciende. Frente a temperaturas aún menores, llegando al rango de frío nocivo (< 20°C), la ocurrencia de disparos en el TNSF se hace cada vez desordenada observándose una pérdida de estructura en la distribución de ISIs, apareciendo el comportamiento irregular (Fig. 1, 10°C). Esta diversidad de patrones regulares y su relación con la temperatura sugiere la presencia de un fenómeno oscilatorio subumbral, cuya frecuencia

estaría reguladas por temperatura (Fig.1). Cada vez que esta oscilación se encuentre por sobre el umbral, se producirían potenciales de acción los que podrían presentarse tanto en ráfagas como aislados dependiendo de la frecuencia de la oscilación (Braun y cols., 1980).

2.1.1.2 Respuesta dinámica

Variaciones de la temperatura del orden de 0.1 °C/s y mayores provocan la llamada respuesta dinámica de los termorreceptores de frío (Braun y cols., 1980; Carr y cols., 2003; Gallar y cols., 2003) la cual se caracteriza por un abrupto aumento de la frecuencia de disparo frente a descensos de temperatura (mayor a un 100% con respecto a la frecuencia de disparo estática), o al contrario, un silenciamiento casi absoluto de la terminación nerviosa frente a aumentos repentinos de temperatura. Los patrones temporales de la respuesta dinámica al enfriamiento de los termorreceptores de frío ha sido bien descritos (Braun y cols., 1980; Carr y cols., 2003) y de ellos se desprende que durante esta respuesta no se modifican drásticamente sus propiedades oscilatorias y que el aumento transitorio en la frecuencia de disparos es debido a la aparición de ráfagas, los que presentan al menos dos grupos de ISIs (período de tiempo entre dos espigas consecutivas), cortos y largos.

Tanto la respuesta estática como la dinámica involucran cambios dependientes de temperatura en la dinámica del potencial de membrana de los TNSF. Aún no resultan completamente claros los mecanismos por los cuales la temperatura influencia el patrón de disparos en TNSF, pero ciertamente involucra cambios en la actividad de los distintos canales de iones presentes en ellos.

2.1.2 Corrientes iónicas en TNSF

Experimentalmente no ha sido posible estudiar directamente las corrientes presentes en las TNSF debido a su pequeño tamaño, lo que impide realizar registros intracelulares o de *patch-clamp*. Por lo tanto, la información acerca de las corrientes que originan los patrones de disparos en TNSF sólo proceden de registros extracelulares, estudios farmacológicos y de

registros en neuronas somatosensoriales primarias sensibles a temperatura presentes en cultivos primarios de ganglios sensoriales.

Estos estudios muestran la presencia de distintas corrientes en las neuronas sensibles a frío, que de una forma u otra influyen en el patrón su patrón de disparo. Esta diversidad de canales hace suponer que la transducción del frío inocuo no depende de especie molecular en específico, sino más bien de la expresión de diferentes canales de iones en una combinación que favorece la aparición de patrones oscilatorios dependientes de temperatura (Viana y cols., 2002; Thut y cols., 2003; Madrid y cols., 2006).

Además de reportarse la presencia de distintas corrientes de sodio (Brock y cols., 1998; Brock y cols., 2001; Herzog y cols., 2001), potasio (Viana y cols., 2002; Thut y cols., 2003; Brock y cols., 2006; Madrid y cols., 2009) y calcio (Schafer y cols., 2001) responsables de la iniciación del potencial de acción y eventualmente de la oscilación subumbral, se ha descrito la presencia de corriente activada por hiperpolarización, la corriente de fuga sensible a temperatura y la corriente catiónica inespecífica debida al canal TRPM8.

Los canales HCN1 y HCN2 (responsables de la corriente activada por hiperpolarización) han mostrado tener una influencia sobre los patrones de disparo de las TNSF (Orio y cols., 2012), probablemente influenciando las propiedades oscilatorias del potencial de membrana (Orio y cols., 2009; Orio y cols., 2012).

La corriente de fuga sensible a temperatura es debida a la presencia de los canales TREK-1 y TRAAK, los cuales corresponden a canales de potasio activos a potencial de reposo que se cierran al disminuir la temperatura (Maingret y cols., 2000; Kang y cols., 2005). Su relación con la percepción de frío inocuo ha sido comprobada al observar un déficit de la percepción del frío en ratones *knockout* en un doble *knockout* TREK-1/TRAAK (Noel y cols., 2009).

El canal de iones TRPM8 es un canal catiónico no selectivo activado por voltaje, que aumenta su probabilidad de apertura al disminuir la temperatura (McKemy y cols., 2002; Peier y cols., 2002; Brauchi y cols., 2004; Voets y cols., 2004). Es sugerente que este canal sea

activado también por mentol, un compuesto que se asocia de manera natural a la sensación de frío. Por otra parte, TRPM8 corresponde a un canal con fuerte dependencia de voltaje, temperatura (Brauchi y cols., 2004; Voets y cols., 2004) y segundos mensajeros dependientes de calcio (Daniels y cols., 2009). Además, su relación con la percepción de frío inocuo ha sido comprobada al observar un déficit de la percepción del frío en ratones *knockout* del canal TRPM8 (Bautista y cols., 2007; Colburn y cols., 2007; Dhaka y cols., 2007). Además, los TNSF en estos ratones mutantes no presentan actividad espontánea a temperatura ambiente, la que sí es observada en ratones *wild-type* (Parra y cols., 2010).

Es interesante la relación que muestra el canal TRPM8 con el ion calcio. Por una parte el canal presenta permeabilidad a calcio, por lo que una apertura del canal induce la entrada de calcio al interior de la célula (Pedersen y cols., 2005). Por otra parte el canal muestra una desensibilización dependiente de calcio, en la cual el calcio activa la enzima Fosfolipasa C (PLC) disminuyendo los niveles de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), lo cual finalmente disminuye la activación del canal (Daniels y cols., 2009; Rohács y cols., 2005).

Estos antecedentes indican la presencia de un proceso de retroalimentación negativa en la actividad del canal TRPM8. Este proceso, dependiente de calcio, además de su fuerte regulación por temperatura, nos hace considerar a TRPM8 como un elemento importante al desarrollar un modelo matemático de TNSF.

2.1.3 Geometría de los TNSF

Los TNSF morfológicamente corresponden a neuronas pseudounipolares, con el soma alojado en los ganglios raquídeos o trigémino y presentando proyecciones axonales al SNC y a tejidos periféricos como piel y córnea. La información sensorial que envían estas neuronas al SNC comprende dos procesos distintos, la transducción del estímulo, entendida como la perturbación del potencial de membrana provocada por el estímulo y la codificación del estímulo que corresponde a la generación de un patrón de potenciales de acción que finalmente llegarán al SNC.

En las fibras del tipo A δ se cree que el potencial de acción se origina en el primer nodo de Ranvier en donde se encuentra una alta densidad de canales de sodio sensibles a voltaje (Moller, 2002). El fenómeno de transducción ocurriría entonces en la porción desnuda del terminal, espacialmente separado del proceso de generación de potenciales de acción.

También surge una separación espacial de los procesos de transducción y codificación el trabajo de Carr y cols., (2009), en donde mediante análisis de colisión en TNSF de córnea de cobayo se pudo observar que el sitio de transducción y el sitio de codificación son distintos y además, el punto en donde se genera el potencial de acción varía dependiendo de la temperatura.

La morfología observada en los TNSF (Carr y cols., 2009; Parra y cols., 2010) incluye ramificaciones y protuberancias en el tejido periférico que inervan. No es simple modelar esta compleja morfología, sin embargo, a efecto de considerar la geometría neuronal de TNSF en un modelo matemático, un primer paso evidente es el de separar los compartimentos de transducción y codificación del estímulo térmico.

2.2 Modelos matemáticos de TNSF

Puesto que los terminales nerviosos sensibles a frío no reciben estímulos sinápticos desde otras neuronas, su dinámica de voltaje (fluctuación de potencial de membrana) se puede modelar independiente de la actividad de otras neuronas, esto es, considerando solamente los canales de iones presentes en su membrana. Como se dijo anteriormente, la dinámica de voltaje en TNSF no ha podido ser registrada directamente, pero si los disparos de potenciales de acción, cuyo patrón sugiere fuertemente la presencia de oscilaciones subumbral (Fig. 1)

2.2.1 Oscilaciones subumbral y el modelo de Huber y Braun

Sobre la base de conductancias sensibles a voltaje, se han descrito modelos matemáticos que reproducen la oscilación subumbral y los potenciales de acción en ráfaga (Plant, 1981; Braun y cols., 1998; Lonting y Hinzer, 1996). Su uso ha permitido reproducir y

estudiar las propiedades y características de estas oscilaciones. En el caso de las TNSF el modelo mejor estudiado es el propuesto por Braun y cols., (1998) (Fig. 2), el cual se basa en conductancias de membrana comparables con canales de iones reales y cuenta con la ventaja de ser lo suficientemente simple como para poder ser estudiado mediante algunas aproximaciones analíticas (Feudel y cols., 2000; Braun y cols., 2003; Sosnovtseva y cols., 2004).

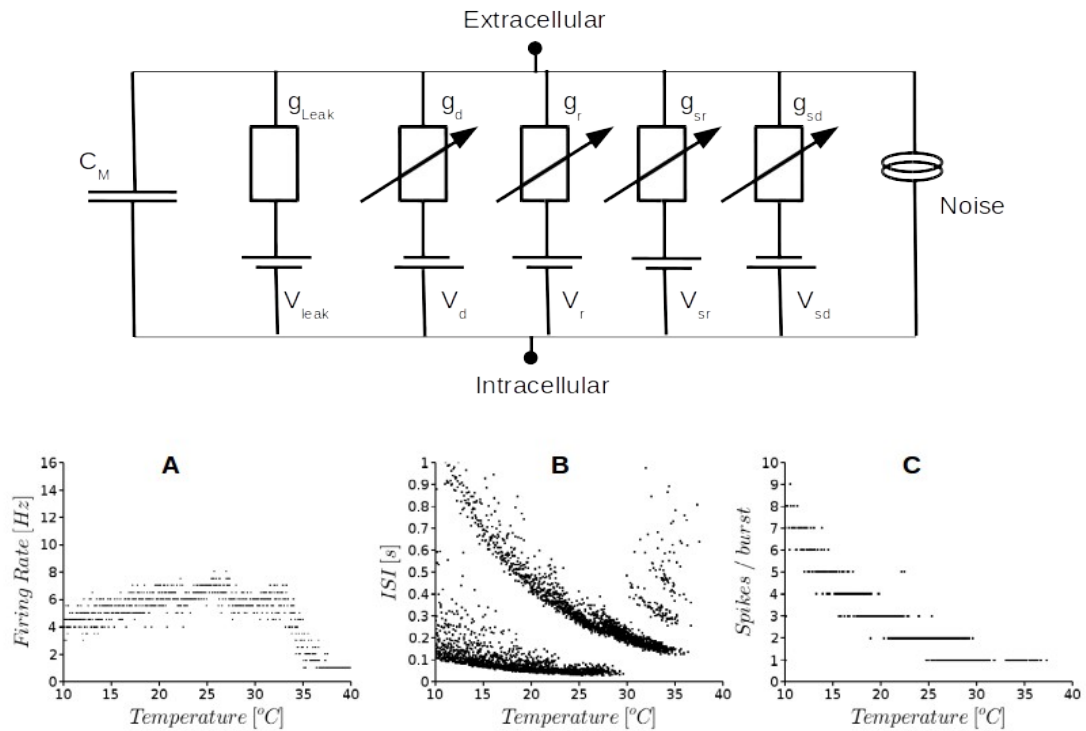


Figura 2: Circuito equivalente del modelo de Huber y Braun y su patrón de respuesta estática.

Arriba, circuito equivalente del modelo de Huber y Braun. Abajo (A) Frecuencia de disparo de potenciales de acción en función de la temperatura, se observa que la frecuencia se mantiene relativamente estable en un amplio rango de temperatura, sin embargo el tiempo entre ISI's (B) se ve modificado de modo similar a la respuesta estática experimental descrita en el texto. (C) corresponde al número de disparos por ráfaga, los que aumentan a medida que la temperatura desciende.

Básicamente, el modelo Huber y Braun (Fig. 2) consiste en la interacción de dos pares de conductancias con constantes de activación en distinto orden de magnitud (lenta y rápida). Cada par consiste en una conductancia despolarizante (corriente de entrada) y una

repolarizante (corriente de salida). Las conductancias lentas permiten reproducir la oscilación subumbral, mientras que las conductancias rápidas dan cuenta de la generación de potenciales de acción en una forma similar a la planteada en el modelo de Hodgkin y Huxley (Hodgkin y Huxley, 1952). La dependencia de temperatura se logra al incluir un factor de ajuste por temperatura en la cinética de las conductancias ($Q_{10}=3$). Con esto se modula la oscilación lenta, de manera tal que a temperaturas bajas el período de la oscilación lenta se alargue, manteniéndose más tiempo sobre el umbral y generando la aparición de ráfagas.

Si bien este modelo reproduce cabalmente el patrón de disparo de la respuesta estática, al ser sometido a simulaciones en donde la temperatura varía, su comportamiento dista mucho de las observaciones experimentales (Fig. 3). Al contrario de lo observado experimentalmente, el modelo se comporta de modo casi simétrico ante descensos y ascensos de temperatura. Entre las posibles causas por la que el modelo de Huber y Braun no logra reproducir la respuesta dinámica, está el hecho de que este modelo sólo considera conductancias con actividades dependientes exclusivamente de voltaje y no considera conductancias que dependan explícitamente de temperatura como TRPM8 y TREK-1. Otro factor que podría influir en la respuesta dinámica es la geometría particular de los TNSF, la cual no corresponde a un compartimento isopotencial como supone este modelo, sino más bien a un cilindro delgado con conductancias distribuidas en forma heterogénea.

2.2.2 Modelos de dos compartimentos

En casos en que las propiedades de una neurona no puedan ser explicadas por un sólo circuito equivalente, es necesario considerar modelos en compartimentos (D'Angelo y cols., 2012). En estos modelos, distintos sectores de la neurona son modelados como un circuito equivalente y se conectan entre sí mediante una resistencia axial. La cantidad de compartimentos puede ser de miles para modelos neuronales realistas (Achard y De Shutter, 2006), o sólo de dos compartimentos para el caso simplificado que considera un sitio de transducción y un sitio de codificación (Huber y cols., 2000).

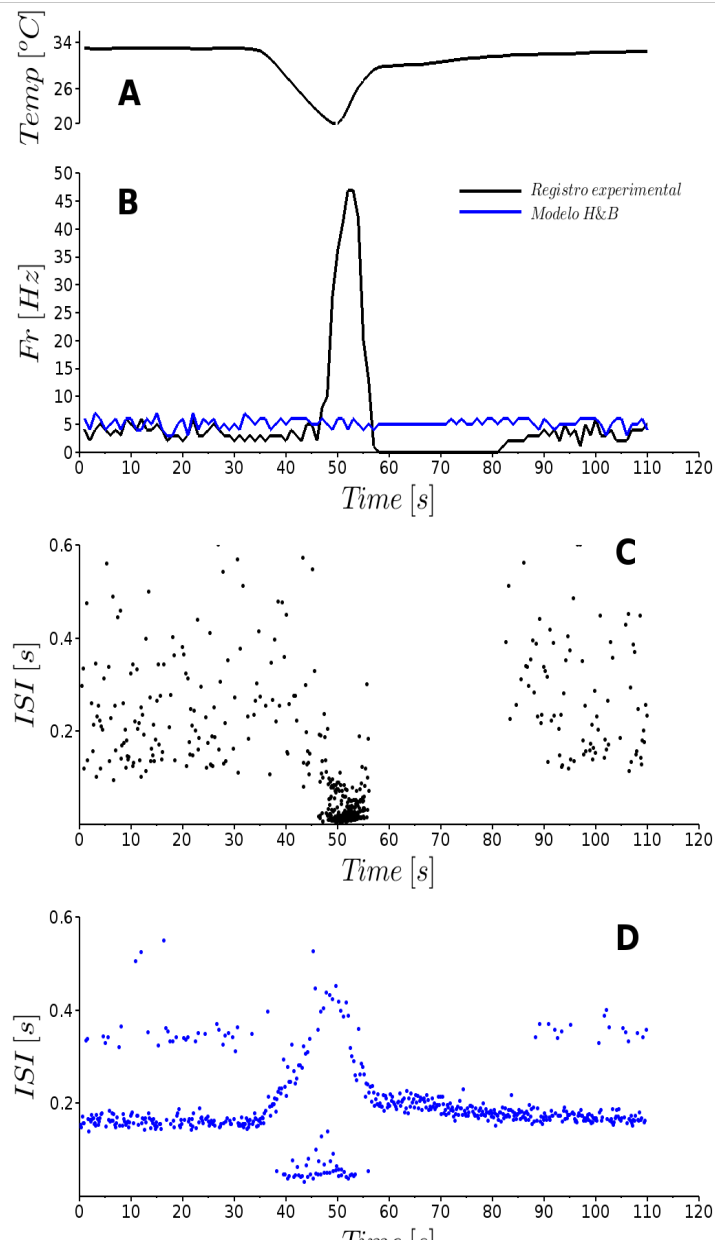


Figura 3: Respuesta dinámica de TNSF y el comportamiento del modelo de Huber y Braun ante el mismo protocolo de estimulación por cambio de temperatura.

(A) Protocolo de temperatura, (B) frecuencia de disparos obtenido del registro experimental (gentileza Dr. Rodolfo Madrid) y del modelo de Huber y Braun. (C) Intervalos entre disparos sucesivos (ISI's) registrados en TNSF de córnea de ratón y (D) reproducidos por el modelo de Huber y Braun. Se aprecia que el fuerte aumento en la frecuencia de disparo en el terminal ante el descenso de la temperatura, así como el silenciamiento al aumento de la temperatura no son reproducidos por el modelo de Huber y Braun.

2.2.3 Parámetros libres y estrategias de ajuste

Los modelos basados en conductancias contienen múltiples parámetros, algunos de los cuales pueden ser estimados directamente a través de registros experimentales. Sin embargo, a pesar de los adelantos en la capacidad técnica experimental no es posible obtenerlos todos. Para dar un valor numérico a estas cantidades fisiológicas, tradicionalmente se utilizó ajuste manual de parámetros por parte de un modelador altamente entrenado en el funcionamiento del modelo y con intuición acerca de los efectos de las distintas conductancias en la dinámica neuronal. Sin embargo la técnica de ajuste manual puede resultar “tediosa, frustrante e intelectualmente insatisfactoria” (Marder y cols., 2007).

Con las mejoras actuales en las máquinas de cómputo, se hace posible la utilización de ajustes automáticos de parámetros. El ajuste del modelo se transforma entonces en un problema de optimización matemático en el que se buscan puntos en el espacio de parámetros que minimizan una función dada. Esta función a minimizar corresponde a una evaluación de similitud entre el comportamiento del modelo y el comportamiento del fenómeno modelado.

Se han realizado ajustes automáticos de parámetros en múltiples tipos neuronales y con diversas metodologías de optimización (Achard y De Shutter, 2006; Druckmann y cols. 2007, Svensson y cols., 2012). De estos trabajos se desprende que para modelos neuronales con un gran número de parámetros libres y de dinámicas complejas, las estrategias evolutivas de optimización realizan una buena búsqueda en el espacio de parámetros. El éxito de la optimización depende en gran medida de la elección de una adecuada función de distancia, la que resume en una fórmula matemática la apreciación cualitativa que el experimentador efectúa durante un ajuste manual.

Un factor común en estos trabajos, es que corresponden a ajustes de modelos de neuronas de las cuales se cuenta con registros directos de la dinámica de voltaje (Achard y De Shutter 2006; Druckmann y cols., 2007; Lepora y cols., 2012, entre otros). El disponer de la dinámica de voltaje permite una gran variedad de funciones de distancia, que pueden considerar características del registro como la forma del potencial de acción, potencial de

reposo, o la distancia punto a punto del registro o del diagrama de fase V v/s dV/dt (Van Geit y cols., 2008). Pocos ajustes están pensados para trenes de potenciales de acción (Jovilet y cols., 2008; Rossant y cols., 2011), que es la única información disponible en el caso de registros extracelulares. Algunos de los métodos para evaluar similitud entre trenes de espigas de potenciales de acción pueden ser revisados en Lyttle y Fellous, (2011), trabajo en el cual se compara el desempeño de las medidas mayormente usadas para evaluar similitud entre trenes de espigas con dos medidas propuestas por los autores y que se basan en la correlación que presentan los ISIs de ambos trenes. Estas medidas son propuestas a fin de dar importancia a fenómenos como disparos en ráfaga y periodos de silencio.

Sobre la base del modelo propuesto por Huber y Braun (Braun y cols., 1998) y considerando las características del canal TRPM8 (activación dependiente de temperatura y de mecanismos dependientes de calcio), nos proponemos generar y ajustar un modelo que reproduzca las respuestas estática y dinámica de los TNSF. Para esto utilizaremos las herramientas matemáticas de ajuste de modelos matemáticos descritas anteriormente.

2.3 Hipótesis

La presencia del canal TRPM8 en un modelo matemático basado en conductancias permite reproducir las respuesta dinámica y estática de las neuronas termorreceptoras sensibles a frío inocuo.

2.3.1 Objetivo general

Construir y probar un modelo matemático de TNSF que incluya la conductancia del canal TRPM8 y que presente la respuestas estática y dinámica de los TNSF.

2.3.2 Objetivos específicos

- Formalizar matemáticamente dos modelos de TNSF de uno y dos compartimentos, incluyendo la dinámica frente a temperatura y voltaje de la conductancia del canal TRPM8, además de su adaptación dependiente de calcio.
- Someter los modelos a un ajuste de parámetros automático mediante estrategias de optimización evolutiva.
- Evaluar la respuesta de los modelos alimentados con las combinaciones de parámetros obtenidos del protocolo de ajuste.
- Evaluar la capacidad de los modelos ajustados en cuanto a la reproducción de la frecuencia de disparo observados en ratones mutantes con déficit de expresión del canal TRPM8.

3 MÉTODOS

El objetivo de este trabajo es construir un modelo de TNSF que describa sus principales características observables. Para ello utilizamos un set de registros experimentales de TNSF, que representan cualitativamente el comportamiento de los TNSF. El modelo se basa en modelos matemáticos de conductancias iónicas presentes en los TNSF previamente utilizados en el modelo de Huber y Braun. Se utiliza también un modelo matemático de la conductancia del canal TRPM8, que, hasta donde sabemos, no se ha utilizado anteriormente en modelos matemáticos de excitabilidad de membranas. Estas conductancias se insertaron en modelos de membrana homogénea (modelo de un compartimento) y discontinua (modelo de dos compartimentos) (Fig. 4).

Los modelos planteados contienen un conjunto de parámetros no cuantificables experimentalmente, cuyo valor se buscó a través de un algoritmo de optimización evolutiva. El objetivo de la optimización es encontrar conjuntos de valores de los parámetros, con los cuales el modelo reproduzca el comportamiento eléctrico de los TNSF. Para ello es necesario fijar criterios de semejanza, con los cuales optimizar y validar el comportamiento del modelo.

3.1 Registros experimentales

Se utilizaron registros extracelulares de terminales unitarios, obtenidos de terminales nerviosos sensibles a frío de córneas de ratón (ver Parra y cols., 2010). Inicialmente los TNSF se identifican porque presentan actividad espontánea a temperatura fisiológica (34°C). Se confirma que se está en presencia de un TNSF, en la medida de que se observa un aumento en la frecuencia de disparo ante una disminución en la temperatura o la exposición a mentol.

Cada registro presenta una serie de cambios de temperatura, de los cuales se decidió utilizar un breve pulso de cambio de temperatura que representa de buena manera la respuesta dinámica de los TNSF (ver por ejemplo Fig. 6, sección resultados).

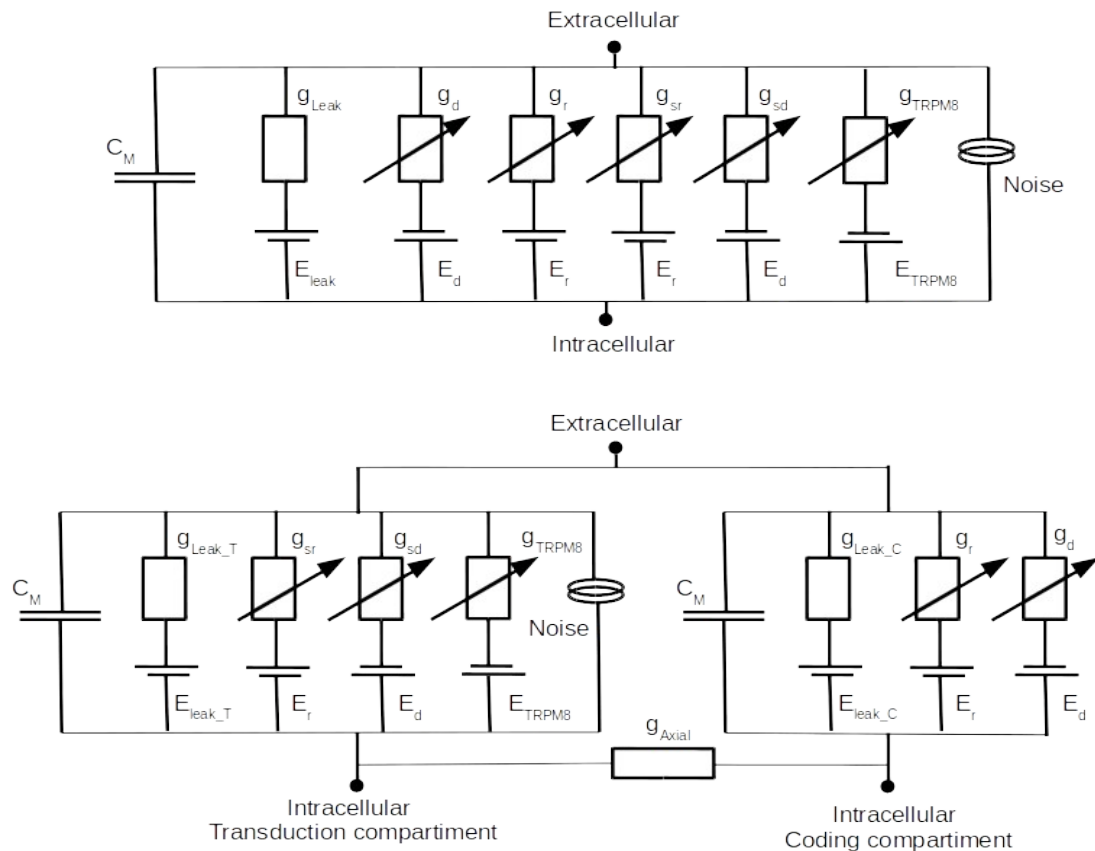


Figura 4: Circuitos equivalentes de los modelos propuestos.

Arriba, Circuito equivalente del modelo de un compartimento. Abajo, circuito equivalente del modelo de dos compartimento, en el que se distingue un compartimento de transducción del estímulo térmico, y un compartimento de codificación en que se generan los potenciales de acción.

3.2 Modelo de un compartimento

La dinámica del potencial de membrana se define en la ecuación 1

$$C_m \frac{dV}{dt} = -I_d - I_r - I_{sd} - I_{sr} - I_{leak} - I_{TRPM8} + I_n \quad [1]$$

donde C_m es la capacidad de la membrana, V el voltaje de membrana, I_d e I_{sd} corresponden a corrientes despolarizantes rápida y lenta, I_r e I_{sr} corrientes repolarizantes rápida y lenta, I_{leak} corresponde a una corriente de fuga y I_n , corresponde a un componente de ruido, el cual representa las perturbaciones aleatorias intrínsecas a la dinámica neuronal entre las que se encuentra la naturaleza estocástica de la apertura y cierre de los canales de iones. Estas corrientes han sido previamente utilizadas en el modelo de Huber y Braun y con algunas diferencias en cuanto a la formalización de las corrientes, en el modelo de disparos en ráfaga de Plant, (1981). Finalmente, nuestro modelo también considera la corriente sensible a frío dependiente del canal TRPM8 (I_{TRPM8}).

Las corrientes I_d e I_r , se definen por:

$$I_i = g_i a_i (V - E_i) \quad i=\{d,r\} \quad [2]$$

donde g_i corresponde a la conductancia máxima de cada corriente, E_i a el potencial de reversión y a_i la variable de activación de la corriente, entendida también como la fracción de canales de iones abiertos.

Para la corriente I_d (canales de sodio rápidos), la cinética de activación a_d se considera instantánea, es decir:

$$a_d = a_d^\infty = (1 + e^{(-s_d * (V - V_d^0))})^{-1} \quad [3]$$

La activación de la corriente I_r , se definen en función del tiempo y voltaje como

$$\frac{da_r}{dt} = \left(\frac{a_r^\infty - a_r}{\tau_r} \right) \quad [4]$$

y

$$a_r^\infty = (1 + e^{(-s_r * (V - V_r^0))})^{-1} \quad [5]$$

La dinámica de activación de la corriente I_{sd} , se describe como

$$\frac{da_{sd}}{dt} = \varphi \left(\frac{a_{sd}^{\infty} - a_{sd}}{\tau_{sd}} \right) \quad [6]$$

donde φ corresponde a un factor de ajuste por temperatura que considera cambios en la tasa de adaptación al estado estacionario.

$$a_{sd}^{\infty} = \left(1 + e^{(-s_{sd} * (V - V_{sd}^0))} \right)^{-1} \quad [7]$$

La dinámica de activación de la corriente I_{sr} , modela el comportamiento de canales de potasio activados por calcio, en que la entrada de calcio se supone proporcional a la corriente I_{sd} .

$$\frac{da_{sr}}{dt} = \varphi \frac{(-\eta I_{sd} - \kappa a_{sr})}{\tau_{sr}} \quad [8]$$

Las corrientes I_{sd} e I_{sr} incluyen un factor de ajuste por temperatura ρ que da cuenta del cambio en la velocidad del flujo iónico.

$$I_{sd} = \rho g_{sd} a_{sd} (V - E_d) \quad [9]$$

$$I_{sr} = \rho g_{sr} (V - E_r) \frac{a_{sr}^2}{a_{sr}^2 + K_{sr}^2} \quad [10]$$

El ajuste de la activación a_{sr} por una función de Hill responde al hecho de que la formalización matemática de la ecuación 8 no restringe la activación a valores dentro del rango [0,1]. Este ajuste está presente en el modelo de Plant, (1981), sin embargo no se considera en el modelo de Huber y Braun.

Los factores de ajuste por temperatura para la activación (φ) y para la conductancia (ρ) toman valores que dan cuenta de los efectos típicos de la temperatura sobre corrientes iónicas (Hille, 2001).

$$\rho = 1.3^{(T - T_0)/10} \quad [11]$$

y

$$\varphi = 3^{(T - T_0)/10} \quad [12]$$

La corriente de fuga I_{leak} se define como

$$I_{leak} = g_{leak} (V - E_{leak}) \quad [13]$$

donde g_{leak} corresponde a la conductancia y E_{leak} al potencial de reversión de la corriente.

Para la corriente debida al canal TRPM8 se consideró por una parte un flujo de corriente catiónico inespecífico y por otra parte el flujo de corriente del ión calcio. En estas condiciones la corriente I_{TRPM8} se define como

$$I_{TRPM8} = g_{TRPM8} a_{TRPM8} [p(V - E_{Ca}) + (1 - p)(V - E_{TRPM8})] \quad [14]$$

donde g_{TRPM8} corresponde a la conductancia máxima, p a la fracción de calcio permeando a través de canal TRPM8, E_{Ca} al potencial de reversión del ion calcio el cual es calculado a cada momento de acuerdo a la ecuación de Nernst, E_{TRPM8} al potencial de reversión catiónico inespecífico y a_{TRPM8} a la activación del canal TRPM8 (ver sección siguiente).

3.2.1 Activación del canal TRPM8.

Para modelar la activación dependiente de voltaje y temperature del canal TRPM8, se utilizó como base el modelo de dos estados propuesto por Voets y cols., (2004; 2007). Aunque este modelo no logra explicar datos experimentales como la apertura por ligando independiente de voltaje (Matta y Ahern, 2007), si logra reproducir satisfactoriamente la activación de TRPM8 dentro de los rangos fisiológicos de voltaje y temperatura. Dada su mayor simplicidad se utilizó en una primera aproximación este modelo y no el modelo alostérico propuesto por Brauchi y cols., (2004).

En el modelo de dos estados la activación del canal TRPM8 corresponde a la siguiente ecuación

$$a_{TRPM8} = \left(1 + \exp\left(\frac{-z F}{R T} (V - V_{1/2})\right) \right)^{-1} \quad [15]$$

donde z corresponde a la cantidad de cargas elementales transportadas durante la apertura o

cierre del canal, F la constante de Faraday, R la constante de gases ideales, T la temperatura en grados Kelvin y $V_{1/2}$ es una función de la diferencia de energía libre (ΔG) entre el estado abierto y cerrado del canal.

$$V_{1/2} = \Delta G / (zF) = (\Delta H - T \Delta S) / (zF) \quad [16]$$

Experimentalmente se han determinado los componentes entálpicos (ΔH) y entrópicos (ΔS) de la energía libre asociada (Brauchi y cols., 2004; Voets y cols., 2004). z y F mantienen la definición de la ecuación 15.

La dinámica de activación de TRPM8 se considerará instantánea, ya que, su constante de activación en rangos fisiológicos de temperatura y voltaje es tan rápida (~ 0.1 ms), como la de los canales de sodio rápidos, cuya cinética también es considerada instantánea.

En nuestra descripción del canal TRPM8 incluimos la regulación por calcio vía fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (Rohács y cols., 2004) como principal componente de adaptación. De acuerdo a Daniels y cols., (2009), la activación de TRPM8 es regulada por calcio modificando directamente el valor de $V_{1/2}$ de la ecuación 15. En nuestro modelo, esta influencia queda descrita por

$$V_{1/2} = V_{1/2}^0 + \delta V \quad [17]$$

donde $V_{1/2}^0$ corresponde al valor estimado en Voets y cols., (2004) y δV a la influencia del calcio sobre $V_{1/2}$.

La cinética de δV no es necesariamente instantánea, puesto que representa procesos moleculares intracelulares con dinámicas temporales lentas en comparación a la dinámica de los canales iónicos. Por lo tanto su dinámica se modeló de acuerdo a una ecuación diferencial ordinaria en la que δV se adapta a un valor estacionario δV_∞ con una tasa de adaptación $\tau_{\delta V}$.

$$\frac{d(\delta V)}{dt} = \frac{\delta V_\infty - \delta V}{\tau_{\delta V}} \quad [19]$$

El valor estacionario de la influencia de calcio sobre $V_{1/2}$ se consideró como una función sigmoidea dependiente de calcio

$$\delta V_{\infty} = \delta V_{min} + (\delta V_{max} - \delta V_{min}) * \left(\frac{[Ca^{+2}]}{[Ca^{+2}] + K_d} \right) \quad [18]$$

donde δV_{max} es la máxima inhibición de TRPM8 debida a calcio, δV_{min} es la influencia del calcio basal y K_d parámetro de la dependencia de concentración de calcio.

Para la dinámica de calcio intracelular se utilizó la formalización propuesta en Shutter, (2009), la cual considera sólo una fuente de ingreso de calcio, así como un solo proceso de extrusión. En nuestro modelo consideramos que el ingreso de calcio al terminal corresponde flujo de corriente del ión calcio de la corriente I_{TRPM8} . (ecuación 14). En estas condiciones, la dinámica de calcio puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{d[Ca^{+2}]}{dt} = p \frac{g_{TRPM8} a_{TRPM8} (V - E_{Ca})}{2F d} - \frac{1}{\tau_r} ([Ca^{+2}] - [Ca^{+2}]_{\infty}) \quad [20]$$

en donde F la constante de Faraday, d el diámetro del terminal, τ_r es la constante de velocidad de esta dinámica y $[Ca^{+2}]_{\infty}$ la concentración de calcio basal.

3.3 Modelo de dos compartimentos.

A fin de considerar en el modelo la segregación espacial de las conductancias de transducción y codificación, se analizó un modelo de dos compartimentos similar al propuesto en Huber y cols., (2000). El modelo se compone de dos compartimentos eléctricamente acoplados que representan los sitios de transducción y codificación (T, C). Las dinámicas de voltaje en estos compartimentos se definen por

$$C_m \frac{dV_T}{dt} = -I_{sd} - I_{sr} - I_{leak} - I_{TRPM8} - g_c (V_T - V_C) + g_n \quad [21]$$

$$C_m \frac{dV_C}{dt} = -I_d - I_r - I_{leak} - g_c (V_C - V_T) \quad [22]$$

en donde V_T y V_C corresponden al voltaje de membrana en los compartimento de transducción y codificación respectivamente, g_c corresponde a la conductancia entre compartimentos. Las demás expresiones mantienen las definiciones hechas para el modelo de un compartimento.

Parámetro	Valor	Ecuación	Parámetro	Valor	Ecuación
C_m	1	mF/cm ²	1	K_{sr}	0.4 ---- 10
E_d	50	mV	2	T_0	298 °K 11
E_r	-70	mV	2	p	---- 14
S_d	0.25	mV ⁻¹	3	E_{TRPM8}	0 mV 14
V_d^0	-25	mV	3	Z	0.82 ---- 15
τ_r	2	ms	4	F	96490 C/mol 15
S_r	0.25	mV ⁻¹	5	R	8.3144 J/(mol °K) 15
V_r^0	-25	mV	5	ΔH	157.3 kJ/mol 16
τ_{sd}	10	ms	6	ΔS	0,558 kJ/mol 16
S_{sd}	0.1	mV ⁻¹	7	δV_{min}	-120 mV 19
V_{sd}^0	-40	mV	7	δV_{max}	100 mV 19
η	12	cm ² /mA	8	K_d	0,005 mM 19
κ	0.17	----	8	d	1 mm 20
τ_{sr}	24	ms	8	$[Ca^{+2}]_{\infty}$	5x10 ⁻⁵ mM 20

Tabla 1: Lista de parámetros fijos del modelo propuesto.

Parámetro, valor, unidad y ecuación en la cual se utiliza el parámetro. La descripción de cada parámetro puede encontrarse en el texto anexo a la ecuación correspondiente. Estos parámetros provienen del modelo previo de Huber y Braun ($C_m, E_d, E_r, S_d, V_d^0, \tau_r, S_r, V_r^0, \tau_{sd}, S_{sd}, V_{sd}^0, \eta, \kappa, \tau_{sd}, K_{sr}, T^0$), del modelo de TRPM8 propuesto en Voets y cols., (2004) ($E_{TRPM8}, Z, \Delta H, \Delta S$), corresponden a constantes físicas (F, R) o bien, se fijaron luego de ajustes manuales del modelo ($\delta V_{min}, \delta V_{max}, K_d, d, [Ca^{+2}]_{\infty}, p$).

3.4 Simulaciones.

Los modelos se implementaron en el software de distribución libre NEURON (www.neuron.yale.edu). Las ecuaciones de cada conductancia del modelo se incorporan en un archivo .mod, el cual es compilado junto a las demás conductancias y pueden ser insertadas tanto en los modelos de uno, como de dos compartimentos. Para ejecutar las simulaciones se utilizó una interfaz con Python (www.python.org) que nos permite controlar tanto los parámetros del modelo, como el protocolo de de temperatura. Esta interfaz también nos permite detectar los potenciales de acción ocurridos durante la simulación, obteniendo como resultado un tren de disparos, que corresponde a un vector que contiene el tiempo de en que se produjo cada uno de los potenciales de acción generados durante la simulación.

Para el análisis de la respuesta en función de la combinación de parámetros se implementaron rutinas en el software Scilab (www.scilab.org) que nos permiten extraer del tren de disparos índices relevantes para la evaluación de la respuesta, como la frecuencia de disparos e ISIs.

3.5 Ajuste del modelo.

Dentro de los parámetros del modelo propuesto fue posible asignar valores a los parámetros presentados en la Tabla I. Por otra parte, se observó en ajustes manuales previos, que las máximas conductancias rápidas de sodio y de potasio (g_d y g_r) que permiten al modelo generar potenciales de acción, muestran una dependencia lineal. Esta relación nos permite comprimir ambos parámetros libres en sólo uno, al relacionarlos con la siguiente ecuación:

$$g_r = 0.09 g_d + 0.001 \quad [23]$$

En estas condiciones el número de parámetros libres se reduce al presentado en la tabla II, generando un espacio multidimensional acotado, cuyos límites se escogieron respetando criterios fisiológicamente razonables. Para buscar zonas de este espacio en las cuales el modelo reproduzca los datos experimentales, se utilizó un algoritmo de optimización evolutivo (Druckmann y cols., 2007; Bahl y cols., 2012) implementado en Python y disponible para uso libre en <http://projects.g-node.org/emoo/>.

Los algoritmos de optimización evolutiva se inspiran en el paradigma de selección natural de las poblaciones biológicas. La idea detrás de ellos es simular una evolución filogenética en que la “población” corresponde a un conjunto de puntos en el espacio de parámetros o “individuos”. A través de sucesivas iteraciones del algoritmo, la población cambia con procesos matemáticos que semejan la ocurrencia de procesos de mutación y recombinación genética (*crossing-over*) en poblaciones biológicas. La selección natural opera sobre los individuos de la población en cuanto a su probabilidad de dejar descendencia, para esto se utiliza un criterio de evaluación definido por una función de aptitud (en inglés: *fitness*).

Un compartimento				Dos compartimentos			
Parámetro	Rango			Parámetro	Rango		
g_{TRPM8}	0,4	1	S/cm ²	g_{TRPM8}	0,4	1	S/cm ²
g_{Leak}	0,05	0,2	S/cm ²	$g_{Leak T}$	0,05	0,2	S/cm ²
g_{sd}	0,1	0,5	S/cm ²	$g_{Leak C}$	0,05	0,2	S/cm ²
g_{sr}	0,1	0,5	S/cm ²	g_{sd}	0,1	0,5	S/cm ²
g_d	0,5	5	S/cm ²	g_{sr}	0,1	0,5	S/cm ²
E_{Leak}	-90	-60	mV	g_d	0,5	5	S/cm ²
$\tau_{\delta V}$	3	100	s	g_{Axial}	0,01	1	S/cm ²
τ_{Calcio}	0,5	50	s	E_{Leak}	-90	-60	mV
				$\tau_{\delta V}$	3	100	s
				τ_{Calcio}	0,5	50	s

Tabla II: Espacio de búsqueda del Algoritmo evolutivo.

Rangos de búsqueda utilizados para la optimización de modelo. Se utilizaron 8 parámetros libres para el modelo de 1 compartimento (izquierda) y 10 parámetros libres para el modelo de 2 compartimentos (derecha)

En la primera iteración del algoritmo se forma una población inicial con parámetros elegidos aleatoriamente dentro del espacio de búsqueda. En las sucesivas iteraciones, la población es sometida a tres procesos que originan una nueva población. El proceso se repite hasta alcanzar un criterio de término, que en nuestro caso consistió en un número fijo de iteraciones que garantiza la convergencia de la población a un conjunto homogéneo en cuanto al comportamiento que entregan al modelo.

A continuación se describen las etapas que utiliza el algoritmo en cada iteración.

Etapas de simulación: En esta fase se simula el modelo alimentándolo con cada una de las combinaciones de parámetros de la población. El protocolo de temperatura con que se realiza la simulación proviene de un registro experimental de prueba. Tanto el tren de disparos obtenido en el registro de prueba como el producido durante la simulación son utilizados en la siguiente etapa para calcular la aptitud de cada individuo.

Etapa de estimación de aptitud: En esta fase se extrae un índice de semejanza del comportamiento de los individuos de la población con respecto a los datos experimentales del registro de prueba. En la medida de que esta medida sea menor, se considera que el individuo evaluado presenta mayor aptitud

Para todas las implementaciones de ajuste de modelos neuronales mediante algoritmos evolutivos encontrados en nuestra revisión bibliográfica, se utiliza para la etapa de estimación de aptitud dinámica de voltaje de registros experimentales (Achard y cols., 2006; Druckmann y cols., 2007; Rossant y cols., 2011). Desgraciadamente, como se indicó anteriormente, no se dispone hasta el momento de registros intracelulares de TNSF, por lo que fue necesario utilizar índices de semejanza basados en trenes de disparos.

Matemáticamente un tren de disparos se define como una serie de funciones delta

$$S(t) = \sum_{i=1}^M \delta(t - t_i) \quad [24]$$

donde $\{t_i\}_{i=1:M}$ corresponde al tiempo en que se produjo cada disparo y M el número total de disparos en el registro.

Se dispone de varios métodos para evaluar la similitud entre trenes de disparos (Kreuz y cols., 2007; Du y cols., 2009; Lyttle y Fellous, 2011). Luego de algunos ajustes preliminares en que se usaron distancias basadas en frecuencia de disparos y distribución de ISIs, se encontró que los mejores ajustes se obtuvieron utilizando una métrica de convolución (Lyttle y Fellous, 2011) y que fue la métrica utilizada en este trabajo.

Coloquialmente hablando, un tren de disparos se puede considerar como puntos aislados en una recta que representa el tiempo. La convolución corresponde entonces a difuminar cada uno de estos puntos generando una función suavizada del tren de disparos. En este trabajo se utilizó un kernel tipo Blackman con un ancho de 20s, que permite suavizar moderadamente el tren de disparos. Tanto el Kernel como el tren de disparos se discretizaron temporalmente utilizando un punto cada 10ms.

En la métrica de convolución, la diferencia entre trenes de disparos se calcula como:

$$Distancia = \int (S_{Registro} * K - S_{Simulacion} * K)^2 \quad [25]$$

donde $S_{Registro}$ corresponde al tren de disparos del registro experimental de prueba y $S_{Simulacion}$ corresponde al tren de disparos obtenido de la simulación. Ambos trenes son convolucionados con el mismo kernel K descrito anteriormente.

Etapas de generación de la nueva población: Conociendo la aptitud de los individuos de la población precedente, se forma una población parental que generará los individuos “nuevos”. En el proceso de selección de individuos se elijen parejas al azar de la población precedente y se selecciona aquel más apto. Este proceso asegura que el mejor individuo será parte de la población parental, y que el peor individuo será excluido.

Posteriormente son generados los nuevos individuos a partir de la población parental, a través de “mutación” (pequeña perturbación aleatoria del individuo) y “recombinación” (combinación de dos individuos). En estos procesos los parámetros de cada individuo son normalizados con respecto al rango de búsqueda a fin de generalizar el proceso para los distintos órdenes de magnitud en que se encuentran los parámetros.

El algoritmo de optimización utilizado considera un operador de mutación conocido como mutación polinomial, en el cual cada parámetro del individuo mutado se modifica por un valor δ_i

$$x_i \rightarrow x_i + \delta_i$$

en donde la magnitud de la mutación δ_i es calculada a partir de una variable aleatoria r_i proveniente de una distribución uniforme entre 0 y 1.

$$\delta_i = \begin{cases} (2 \cdot r_i)^{\frac{1}{\eta_m + 1}} - 1 & , \text{ Si } r_i < 0.5 \\ 1 - [2 \cdot (1 - r_i)]^{\frac{1}{\eta_m + 1}} & , \text{ Si } r_i \geq 0.5 \end{cases}$$

El parámetro η_m define la fuerza del operador de mutación. En caso que el operador de mutación otorgue valores fuera del rango de búsqueda, el parámetro toma el valor límite más

cercano.

El operador de recombinación utilizado en el algoritmo de optimización corresponde a un cruce binario simulado (Deb y Agrawal, 1994). Este operador produce dos individuos nuevos (hijos) a partir de un par de individuos de la generación anterior (padres). Cada parámetro de los hijos se calcula como:

$$y_i^1 = 0.5 \cdot [(1 + \beta_{qi}) \cdot x_i^1 + (1 - \beta_{qi}) \cdot x_i^2]$$

$$y_i^2 = 0.5 \cdot [(1 - \beta_{qi}) \cdot x_i^1 + (1 + \beta_{qi}) \cdot x_i^2]$$

donde y_i^1 e y_i^2 corresponden al i -ésimo parámetro de ambos hijos y x_i^1 y x_i^2 son el i -ésimo parámetro de los padres. β_{qi} se calcula a partir de una variable aleatoria u_i proveniente de una distribución uniforme entre 0 y 1 de acuerdo a:

$$\beta_{qi} = \begin{cases} (2 \cdot u_i)^{\frac{1}{\eta_c + 1}} - 1 & , \text{ Si } u_i < 0.5 \\ [2 \cdot (1 - u_i)]^{\frac{-1}{\eta_c + 1}} & , \text{ Si } u_i \geq 0.5 \end{cases}$$

El parámetro η_c controla la fuerza de la mezcla entre los padres. Valores altos de η_c producen hijos con parámetros más cercanos a los presentados por los padres. Nuevamente, en caso que el operador de mutación otorgue valores fuera del rango de búsqueda, el parámetro toma el valor límite más cercano.

Los individuos así generados pasan por las etapas de simulación y estimación de aptitud. Finalmente los nuevos individuos y los de la generación anterior son ordenados y pasan a formar la siguiente generación aquellos que presentan mayor aptitud. Estas condiciones de selección asegura que el individuo más apto pase a la generación siguiente, y a menos que aparezca un nuevo individuo de mejor aptitud, el individuo sigue formando parte de la población sin variación en sus parámetros.

Se realizaron 160 búsquedas independientes con 48 generaciones y poblaciones consistentes en 48 individuos. Los parámetros de mutación y recombinación del algoritmo de

optimización se fijaron en $\eta_m = 1$, $\eta_c = 10$. En estas condiciones se comprobó que el algoritmo alcanza una convergencia de la población (datos no mostrados).

Posteriormente, se evaluó de forma visual el mejor individuo de la última generación de cada una de las 160 búsquedas (ej: Figs. De la 8 a la 15). De esta búsqueda se encontraron conjuntos de parámetros que confieren al modelo la capacidad de responder dinámicamente a cambios de temperatura y que además, presenten el patrón de disparo característico de los terminales nerviosos sensibles a frío frente a temperaturas fijas (respuesta estática).

Se utilizaron criterios fenomenológicos para considerar las respuestas estática y dinámica. En el caso de la respuesta estática se buscó la presencia de disparos regulares a temperaturas cercanas a 34°C con la aparición de ráfaga a temperaturas menores aumentando el número de disparos en cada ráfaga a medida que la temperatura es menor. Para evaluar esto, se sometió cada solución del modelo a una rampa lenta de temperatura (de 15 a 35 °C con una tasa de variación de 0,05°C/s).

Para evaluar la respuesta dinámica, el criterio utilizado corresponde a la presencia de un aumento a más del doble en la frecuencia de disparo cuando la temperatura disminuye bruscamente, además de un silenciamiento del terminal durante el aumento brusco en la temperatura, para esto se simuló el modelo a un pulso de descenso y posterior aumento en la temperatura.

4 RESULTADOS

Como se describió en la sección de Métodos, construimos dos modelos matemáticos (de uno y dos compartimentos), con la intención de reproducir tanto la respuesta estática como la dinámicas de los TNSF. Los modelos propuestos contienen una serie de parámetros fisiológicos, algunos de los cuales fueron fijados o bien porque sus valores provienen del modelo de Huber y Braun (Braun y cols., 1998) o de modelo del canal TRPM8 propuesto por Voets y cols., (2004), o bien porque sus valores se desprendieron de manipulaciones preliminares del modelo. Los restantes parámetros fueron ajustados mediante un algoritmo de optimización evolutiva, método que es intrínsecamente aleatorio.

La naturaleza aleatoria del método de optimización elegido, implica que optimizaciones independientes pueden entregar soluciones distintas. Es así que al realizar 160 optimizaciones independientes para cada modelo, obtuvimos como resultado un conjunto de 160 combinaciones de parámetros distintas que minimizan la función de distancia utilizada.

Al observar el comportamiento de los modelos, se encuentra que ciertas combinaciones de parámetros pueden reproducir las respuestas estática y dinámica de los TNSF. Sin embargo, las soluciones que entregó el algoritmo de optimización otorgan al modelo comportamientos disímiles, los cuales clasificamos de acuerdo a la capacidad para reproducir las respuestas estática, dinámica, ambas o ninguna.

Sobre la base de esa clasificación, analizamos la distribución de parámetros del

conjunto de soluciones a fin de buscar patrones que permitan explicar los distintos comportamientos de los modelos. También analizamos los valores de ajuste que presentan las soluciones en las distintas categorías de la clasificación utilizada.

Finalmente, a modo de validación, sometimos a prueba los modelos ajustados comparando sus comportamientos con observaciones realizadas en TNSF de ratones mutantes que presentan distintas cantidades de regiones codificantes para el canal TRPM8 en su ADN.

4.1 Los modelos propuestos reproducen la respuesta estática de los TNSF

Para evaluar si los modelos reproducen la respuesta estática, se sometieron a una rampa lenta de temperatura desde 35 a 15°C (0.05 °C/s). El criterio utilizado para considerar respuesta estática consistió en el cambio de disparos tónico regular o irregular a temperaturas cercanas a 34°C, cambiando a disparos en ráfaga a temperaturas más bajas, con un aumento en el número de disparos en cada ráfaga a medida que la temperatura es menor (Fig. 5).

El comportamiento estático puede verse claramente en el gráfico de ISIs en función de la temperatura, en donde el cambio de disparos regulares a disparos en ráfaga se aprecia cuando aparece un nuevo grupo de ISIs de menor valor y que representan los intervalos entre disparos sucesivos dentro de un ráfaga.

Es interesante que en nuestro modelo no aparece el fenómeno de patrones caóticos en la distribución de ISIs que sí presenta el modelo de Huber y Braun a bajas temperaturas. En nuestros modelos se observa un aumento sostenido en la frecuencia de disparos a medida que la temperatura desciende, asociado a un patrón de disparos regular con ISI's cada vez más cortos. La presencia de la conductancia de TRPM8 podría ser la causante de este comportamiento, al aumentar esta corriente despolarizante a temperaturas bajas.

El comportamiento de la respuesta estática varía entre las distintas soluciones obtenidas. Si bien los patrones de disparos regulares y en ráfaga se mantienen, la temperatura a la cual el modelo comienza a mostrar disparos en ráfaga, así como la presencia del patrón de disparo tónico irregular varía entre las distintas soluciones. Esta diversidad de respuestas

existe en los TNSF, probablemente debido a las distintas expresiones de canales de iones en ellos. En nuestro modelo las variaciones en la respuesta estática se explica por distintos valores para los parámetros libres de conductancia máxima.

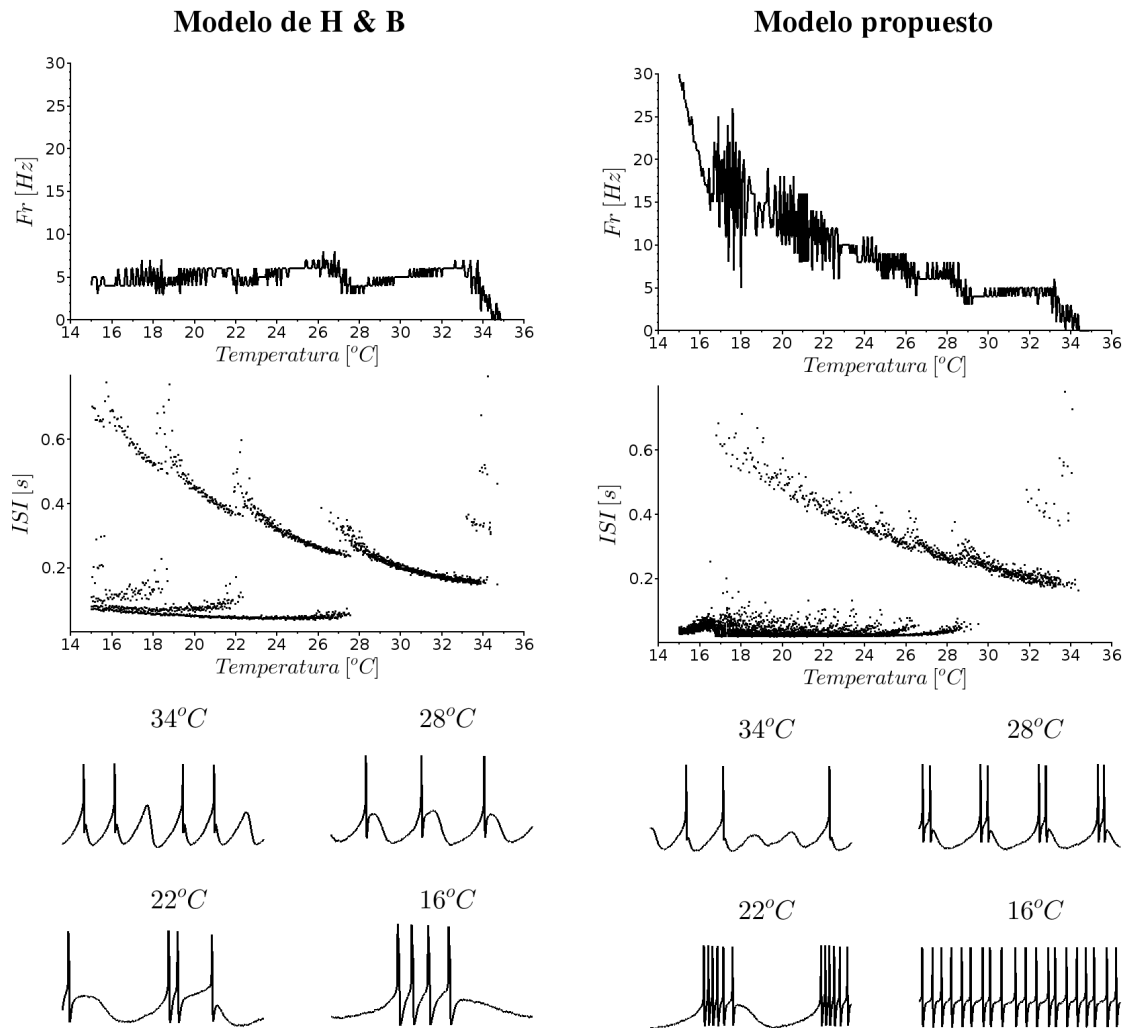


Figura 5: Reproducción del comportamiento estático en TNSF.

Frecuencia de disparo, ISIs y un segundo de registro a distintas temperaturas para el modelo de Huber y Braun (izquierda) y el modelo propuesto (derecha) sometidos a una rampa lenta de temperatura. Se observan los patrones de disparos característicos de los TNSF. Pasando de disparos tónico regular e irregular a temperaturas cercanas a 34°C a disparos en ráfaga a temperaturas menores de 30°C con un aumento en el número de disparos por ráfaga a medida que la temperatura es menor.

4.2 Los modelos propuestos reproducen la respuesta dinámica de los TNSF

Para observar la respuesta dinámica que entregan las soluciones obtenidas, se simularon los modelos sometidos al protocolo de temperatura utilizado en el algoritmo de optimización (Fig. 6). Este pulso corresponde a un cambio de temperatura que va desde los 33°C hasta los 20°C en uaproximadamente 15 segundos, seguido de un aumento brusco en la temperatura hasta los 29°C y finalmente una rampa lente hasta los 33°C. El protocolo completo tiene una duración de 110 segundos.

Los TNSF sometidos a ese protocolo de temperatura muestran un significativo aumento en la frecuencia de disparos mientras la temperatura desciende, en cambio, cuando la temperatura aumenta, el terminal se silencia. Sobre la base de esas características de los TNSF utilizamos un criterio para considerar que el modelo está reproduciendo la respuesta dinámica que consiste en que la frecuencia de disparo presente un aumento de más del 100% durante el periodo de descenso de la temperatura con respecto a la frecuencia de disparo anterior al comienzo del descenso de la temperatura, además la simulación debe presentar un período de ausencia de disparos durante el aumento de la temperatura (Fig. 6).

El modelo de Huber y Braun no cumple con el criterio de respuesta dinámica. Como se observa en la figura 6, el modelo de Huber y Braun cambia su patrón de disparos al tipo ráfaga sin modificar la frecuencia de disparo ante el descenso en la temperatura. El modelo propuesto, en los casos en que presenta respuesta dinámica, también cambia a un patrón de disparo en ráfaga pero aumentando significativamente la frecuencia de disparo.

La dinámica de voltaje del modelo de Huber y Braun presenta la misma dinámica a 28°C mientras la temperatura desciende o aumenta (Fig. 6), nuestro modelo en cambio, a la misma temperatura de 28°C, presenta disparos en ráfaga mientras la temperatura desciende y muestra una hiperpolarización durante el aumento de temperatura, lo que se asocia a la ausencia de diapasos. Esta histéresis es una característica principal en la codificación del estímulo térmico en TNSF pues le permitiría codificar magnitud y sentido de cambios en la temperatura además de valores absolutos de temperatura.

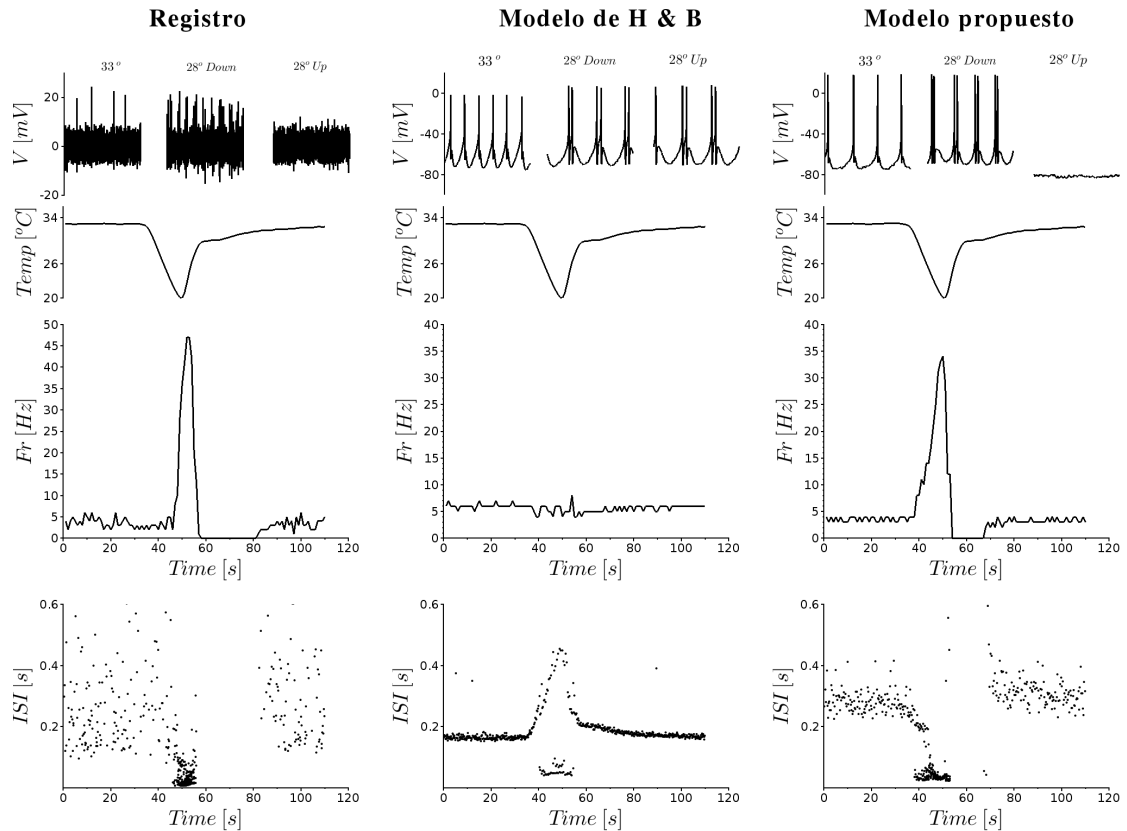


Figura 6: Reproducción del comportamiento dinámico en TNSF.

Frecuencia de disparo e ISIs ocurridos durante un registro extracelular obtenido de un terminal nervioso sensible a frío de córneas de ratón (izquierda). Modelo de Huber y Braun (centro) y modelo propuesto (derecha) frente a el mismo pulso de temperatura.

Se observa que la frecuencia de disparo en el registro y el modelo propuesto muestran un aumento al inicio del descenso en la temperatura seguido de un silenciamiento relacionado al aumento de la temperatura.

4.3 Las soluciones del ajuste del modelo producen comportamientos disímiles.

Se analizó la mejor combinación de parámetros de cada una de las 160 búsquedas independientes realizadas. Por lo tanto contamos con 160 combinaciones de parámetros que minimiza la función de distancia utilizada, tanto para el modelo de 1 como de 2 compartimentos.

Al evaluar visualmente el resultado de estas simulaciones, se encontraron para ambos modelos soluciones que permiten reproducir tanto la respuesta estática como la dinámica de los TNSF. Sin embargo, una proporción no menor de soluciones no son capaces de reproducir la respuesta estática, la dinámica o ambas.

Tanto en el modelo de 1 como de 2 compartimentos, la proporción de soluciones que satisfacen visualmente la reproducción de los comportamientos dinámicos y estáticos de TNSF bordea del 40%, una proporción similar de soluciones no reproduce ninguna de estas respuestas (Fig. 7). También fue posible encontrar en ambos modelos soluciones que reproducen la respuesta estática o la respuesta dinámica, pero no ambas.

En el modelo de un compartimento, de las 160 soluciones obtenidas mediante algoritmo de optimización evolutiva, 73 confieren al modelo la capacidad de reproducir tanto la respuesta dinámica y estática de los TNSF, 14 solo reproducen la respuesta estática, 13 solo la respuesta dinámica y 70 soluciones no satisfacen la reproducción de ninguno de los dos comportamientos analizados. (Figs. de la 8 a la 11).

Dentro de cada categoría de respuestas, los comportamientos son bastante similares, modificándose principalmente el rango de temperatura en que aparecen los disparos en ráfaga en el caso de las soluciones con respuesta estática, y el grado de variación en la frecuencia de disparo para aquellas que presentan comportamiento dinámico. Aquellas soluciones que no presentan ninguna de las respuestas buscadas, se caracterizan por presentar un periodo estable de despolarización después de cada potencial de acción (Fig. 11).

En el modelo de dos compartimentos, 56 de las 160 soluciones confieren al modelo la capacidad de reproducir tanto la respuesta dinámica y estática de los TNSF, 20 reproducen solo la respuesta estática, 37 solo la respuesta dinámica y 47 soluciones no satisfacen la reproducción de ninguno de los dos comportamientos analizados. Estas últimas, al igual que las del modelo de un compartimento, muestran dinámicas de voltaje anómalas, sin embargo se observaron una mayor diversidad de conductas no fisiológicas en el trazo de voltaje (Datos no mostrados). Cabe recordar que el modelo de dos compartimentos fue optimizado en un espacio

de búsqueda de mayor dimensionalidad que el modelo de un compartimento, y además, es de mayor complejidad en términos de las ecuaciones que lo describen. Con esto en mente es esperable que las soluciones que entrega el algoritmo de optimización puedan presentar cualitativamente una mayor cantidad de conductas. (Figs. de la 12 a la 15)

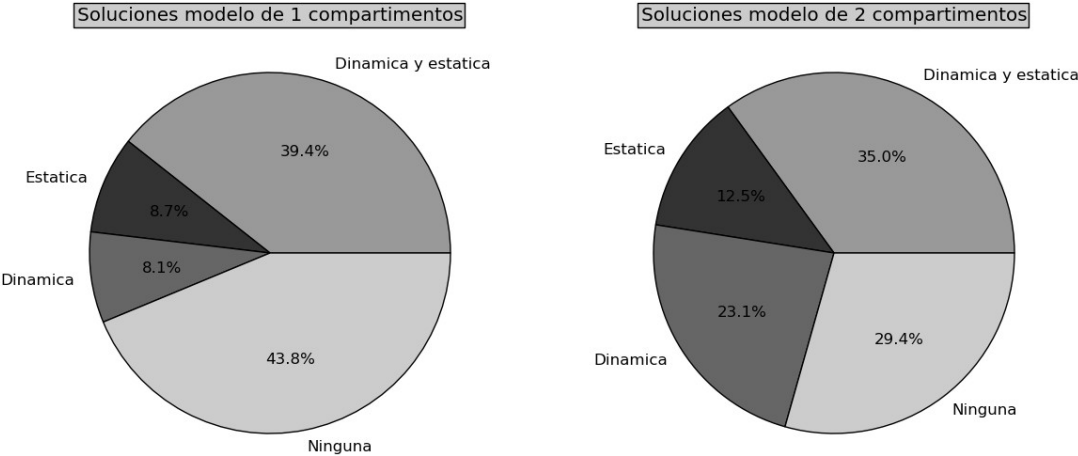


Figura 7: Comportamiento de las soluciones obtenidas mediante algoritmo evolutivo de optimización

Los comportamientos de las soluciones obtenidas se agruparon de acuerdo a su capacidad de reproducir las respuestas dinámicas y estáticas de TNSF (Dinámica y estática), aquellas que sólo reproducen la respuesta estática (Estática), sólo la respuesta dinámica (Dinámica) y aquellas que no reproducen ninguna de estas respuestas (Ninguna). Los porcentajes son calculados para el universo de 160 soluciones tanto para el modelo de 1 compartimento (izquierda), como para el modelo de 2 compartimentos (derecha).

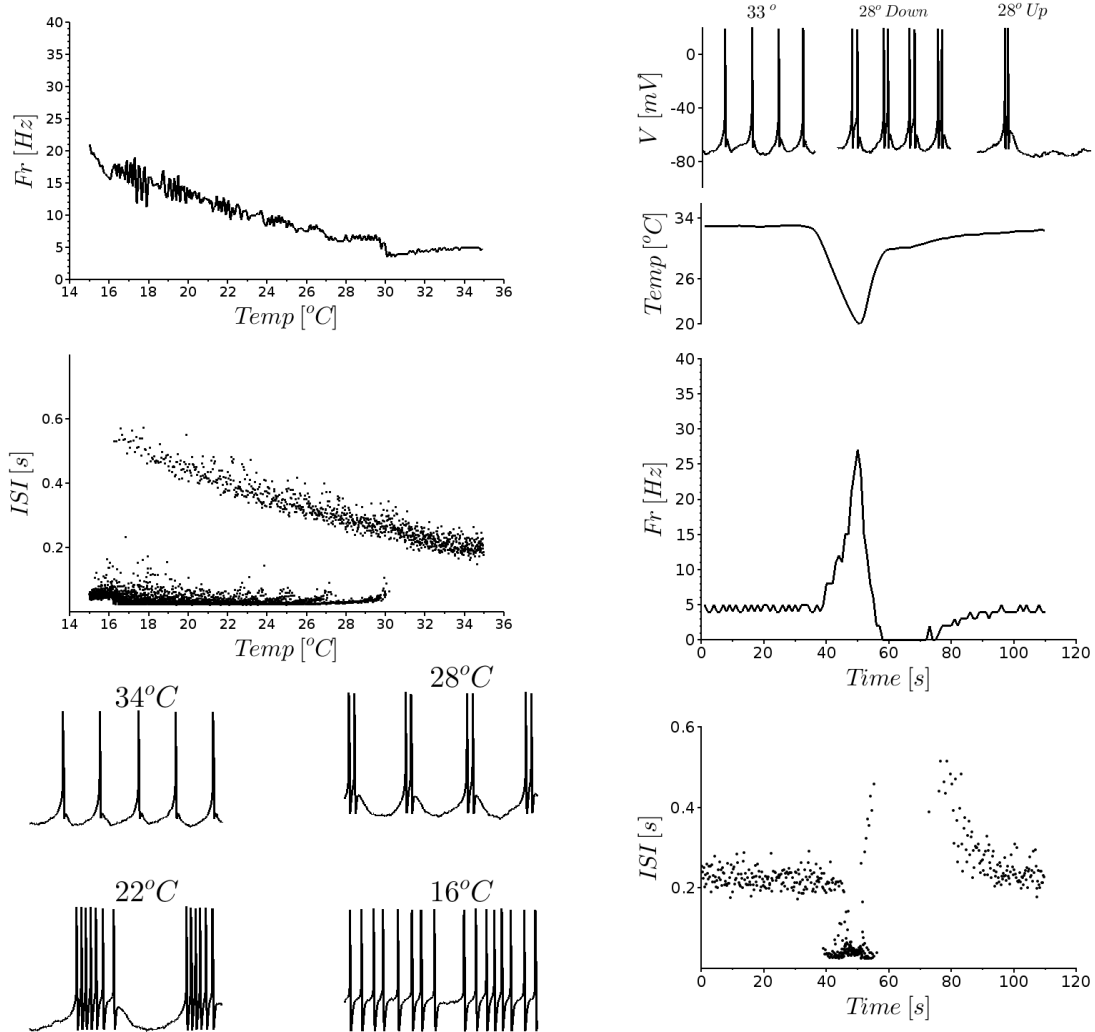


Figura 8: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce los comportamientos dinámico y estático de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (Down) y aumento de la temperatura (Up). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 0.4$ [S/cm²]; $g_{leak} = 0.05$ [S/cm²]; $g_{sd} = 0.15$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.43$ [S/cm²]; $g_d = 3.4$ [S/cm²]; $E_{leak} = -90$ [mV]; $\tau_{dV} = 18,2$ [s]; $\tau_{calcio} = 9.5$ [s].

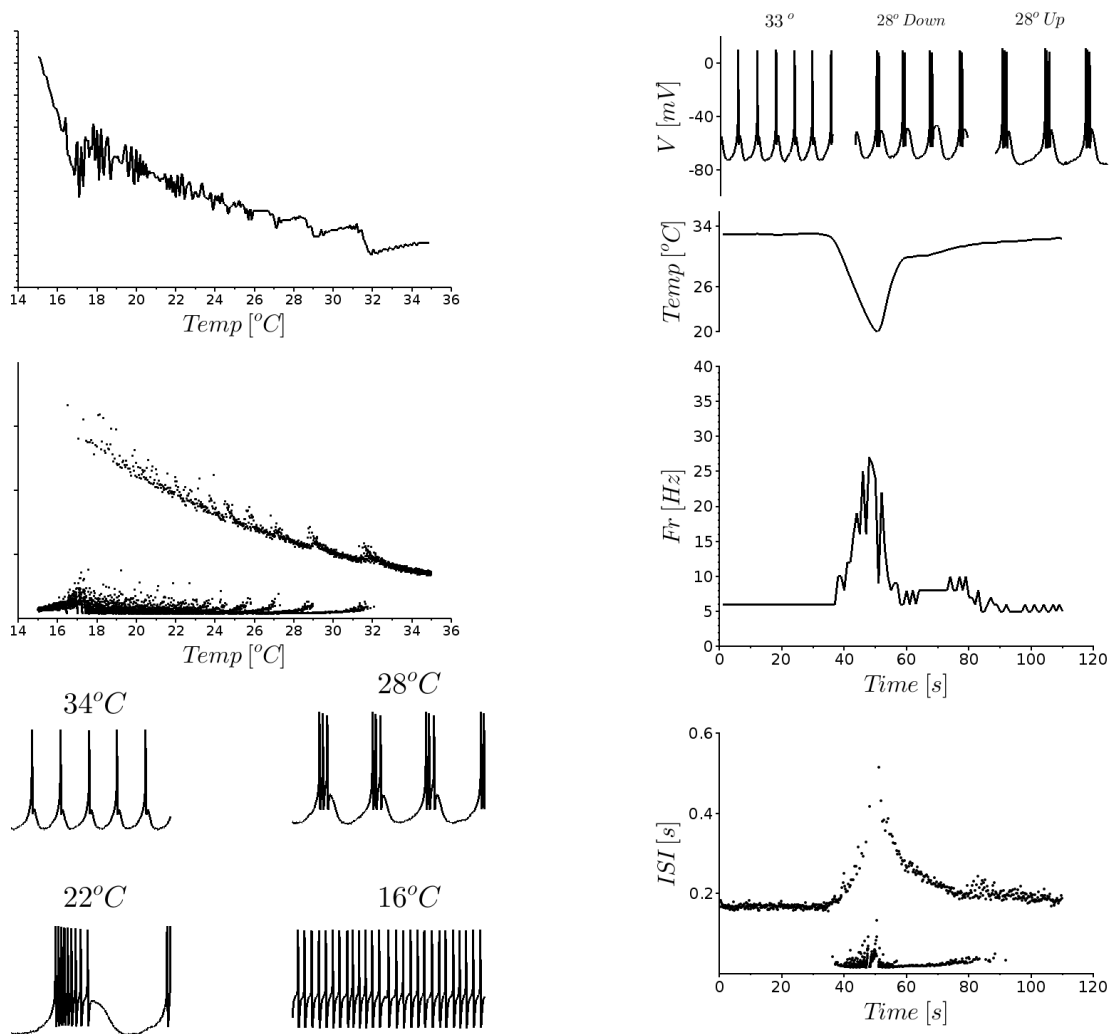


Figura 9: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce el comportamiento estático pero no el dinámico de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (*Down*) y aumento de la temperatura (*Up*). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 7.5$ [S/cm²]; $g_{leak} = 0.75$ [S/cm²]; $g_{sd} = 0.28$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.43$ [S/cm²]; $g_d = 2.2$ [S/cm²]; $E_{leak} = -90$ [mV]; $\tau_{dV} = 3$ [s]; $\tau_{calcio} = 17.8$ [s].

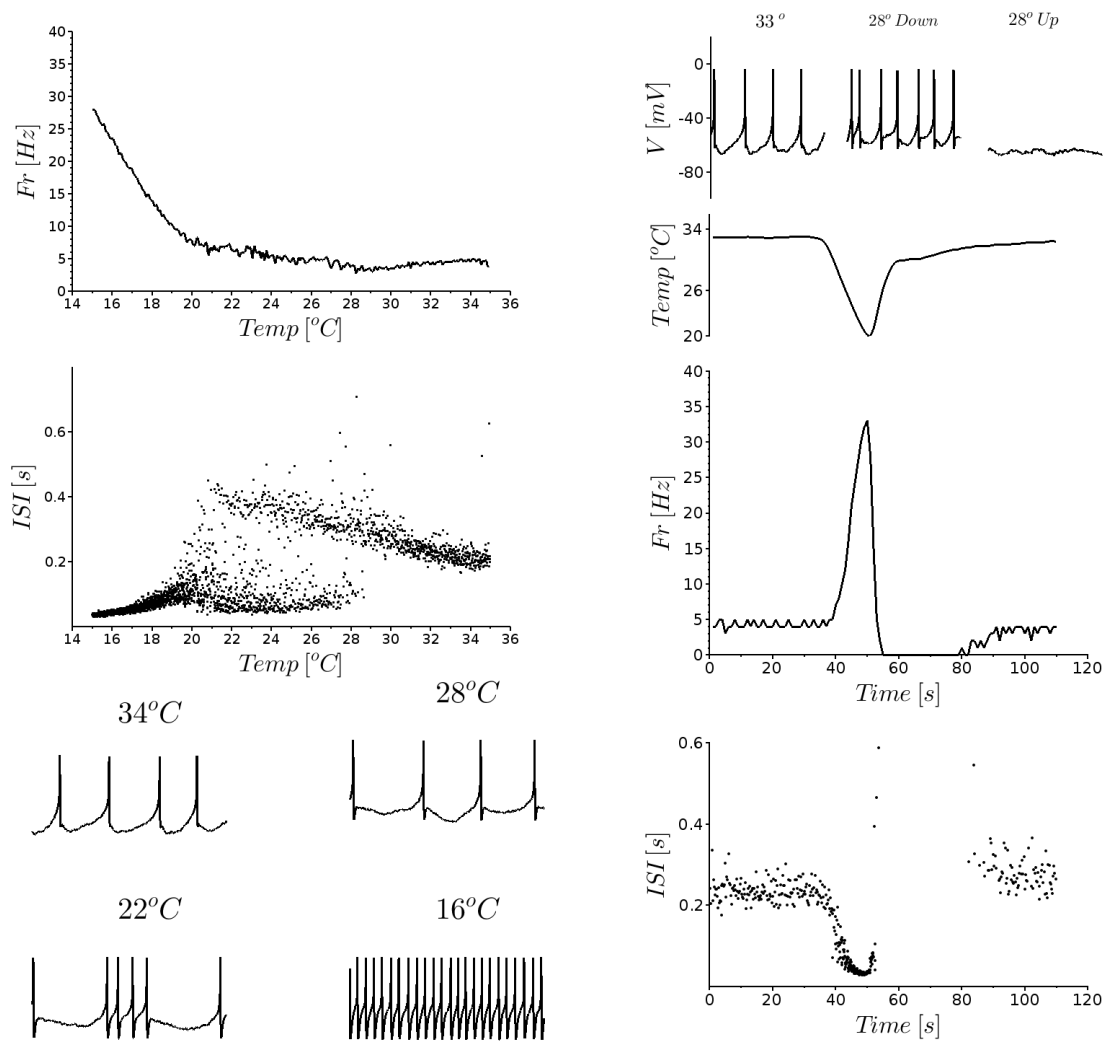


Figura 10: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce el comportamiento dinámico pero no el estático de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (Down) y aumento de la temperatura (Up). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 4.5$ [S/cm²]; $g_{leak} = 0.09$ [S/cm²]; $g_{sd} = 0.10$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.22$ [S/cm²]; $g_d = 1.1$ [S/cm²]; $E_{leak} = -77$ [mV]; $\tau_{gV} = 3$ [s]; $\tau_{calcio} = 27.5$ [s].

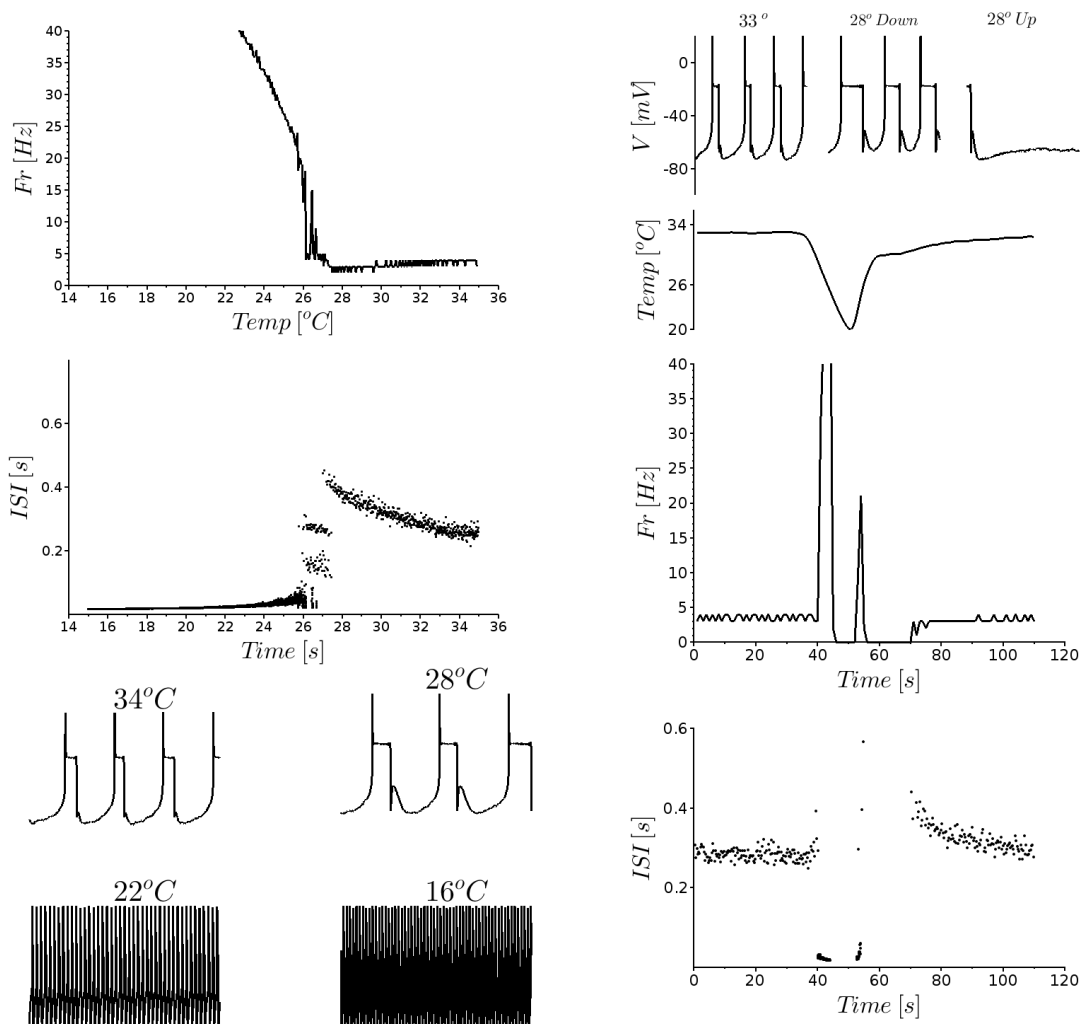


Figura 11: Modelo de un compartimento con una combinación de parámetros con la que no muestra ni el comportamiento dinámico ni el estático de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (*Down*) y aumento de la temperatura (*Up*). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 7.2$ [S/cm²]; $g_{leak} = 0.17$ [S/cm²]; $g_{sd} = 0.24$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.22$ [S/cm²]; $g_d = 4.4$ [S/cm²]; $E_{leak} = -82$ [mV]; $\tau_{dV} = 25,1$ [s]; $\tau_{calcio} = 3.14$ [s].

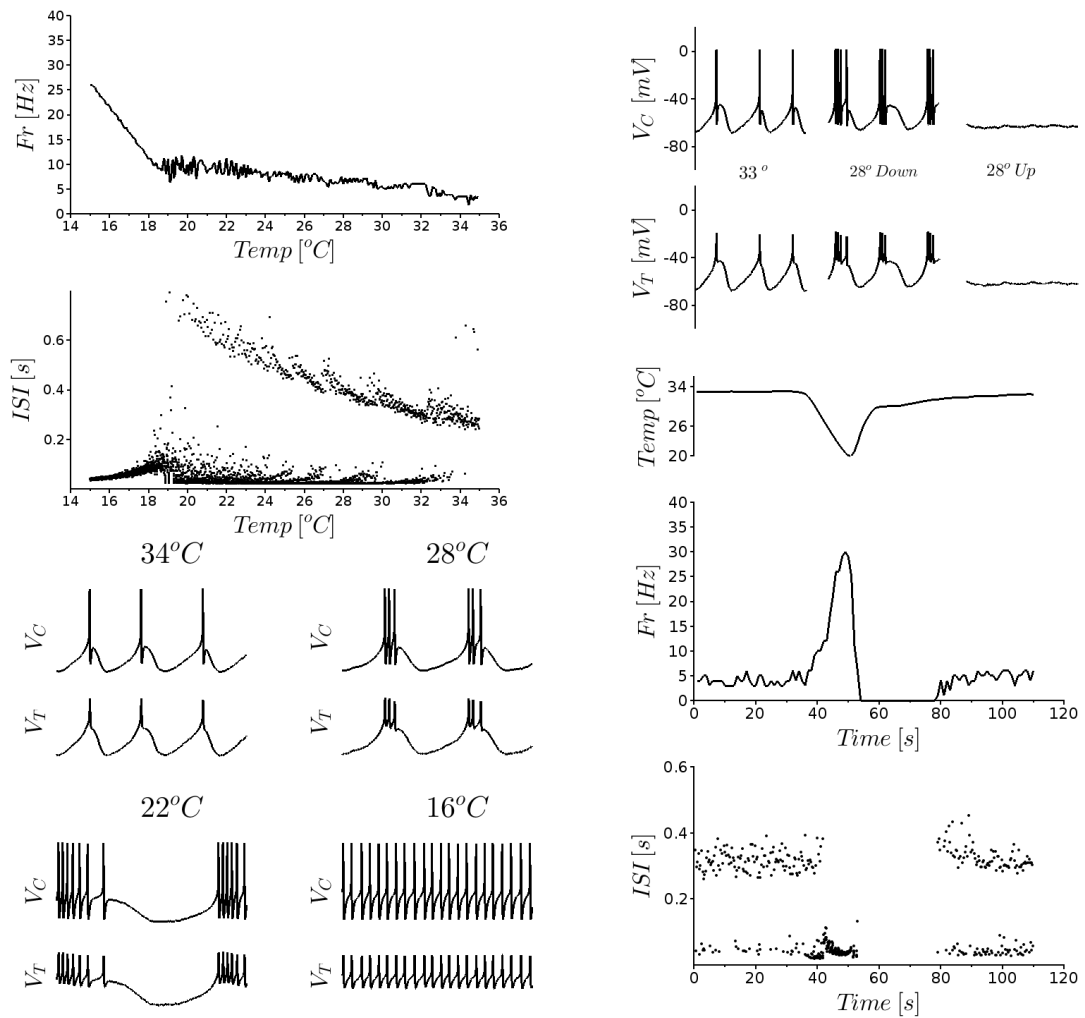


Figura 12: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce los comportamientos dinámico y estático de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación en los compartimentos de transducción y codificación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje en los compartimentos de transducción y codificación a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (*Down*) y aumento de la temperatura (*Up*). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 6.9$ [S/cm²]; $g_{leak T} = 0.12$ [S/cm²]; $g_{leak C} = 0.05$ [S/cm²]; $g_{sd} = 0.20$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.19$ [S/cm²]; $g_d = 1.7$ [S/cm²]; $g_{axial} = 0.42$ [S/cm²]; $E_{leak} = -75$ [mV]; $\tau_{\delta V} = 3$ [s]; $\tau_{calcio} = 19.5$ [s].

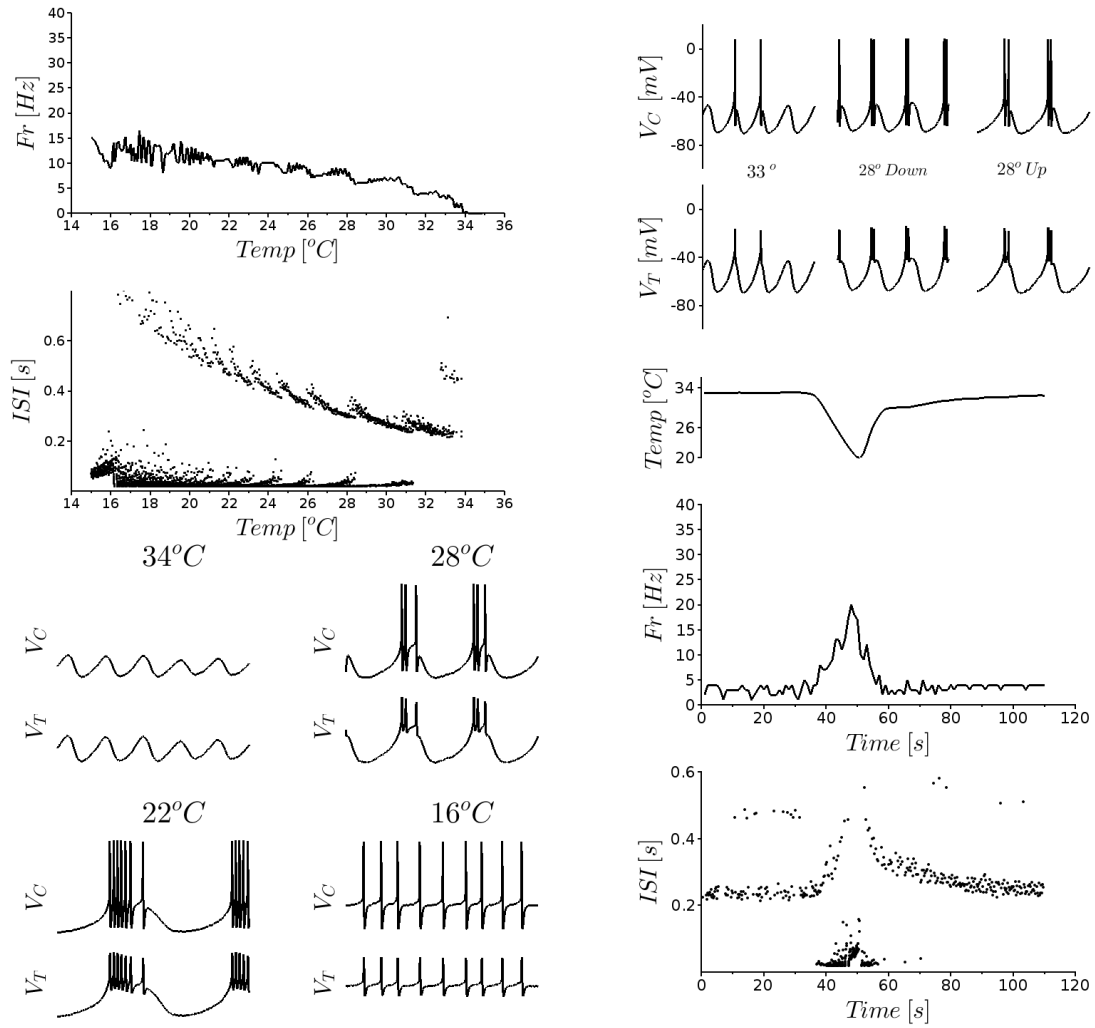


Figura 13: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce el comportamiento estático pero no el dinámico de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación en los compartimentos de transducción y codificación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje en los compartimentos de transducción y codificación a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (*Down*) y aumento de la temperatura (*Up*). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 5.6$ [S/cm²]; $g_{leak T} = 0.07$ [S/cm²]; $g_{leak C} = 0.1$ [S/cm²]; $g_{sd} = 0.26$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.32$ [S/cm²]; $g_{d} = 2.5$ [S/cm²]; $g_{axial} = 0.52$ [S/cm²]; $E_{leak} = -74$ [mV]; $\tau_{dV} = 3.6$ [s]; $\tau_{calcio} = 20.4$ [s].

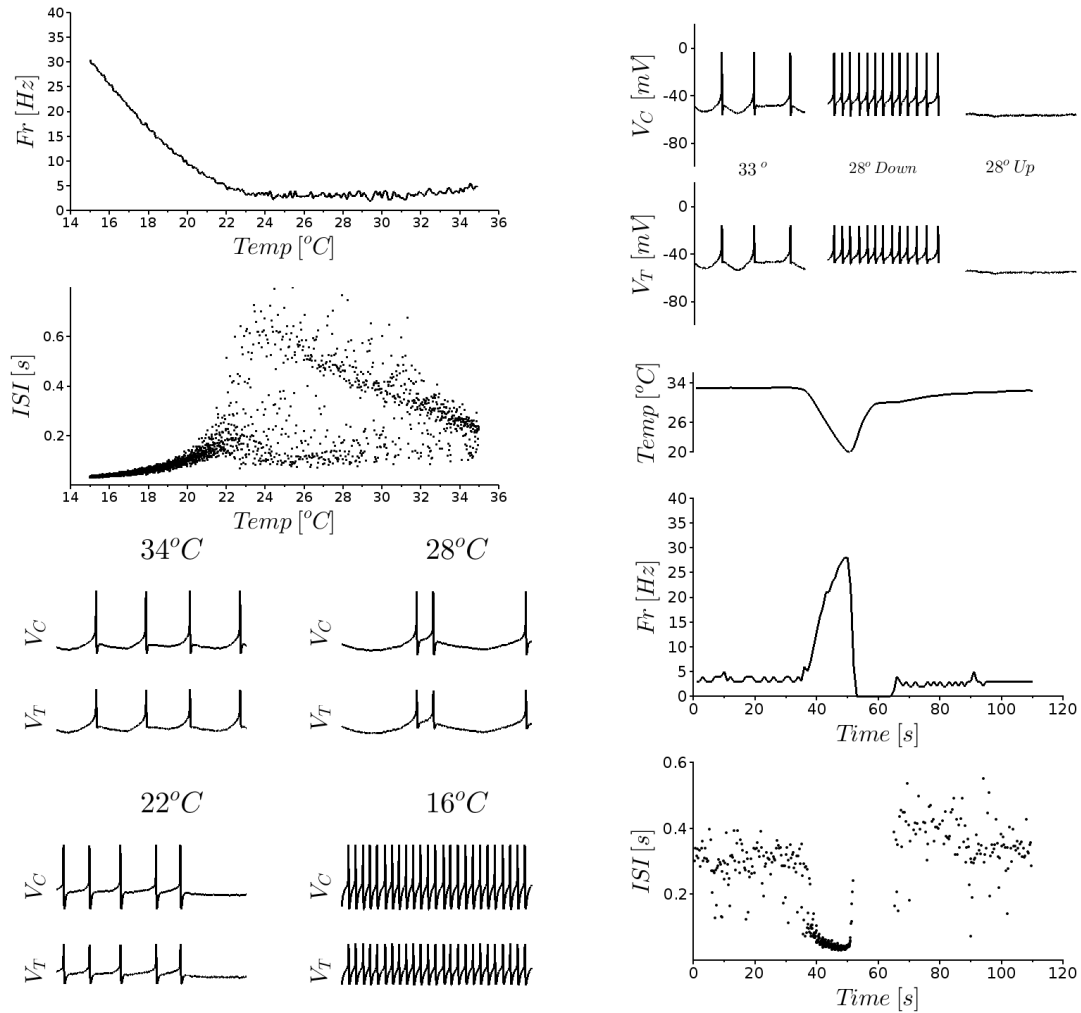


Figura 14: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que reproduce el comportamiento dinámico pero no el estático de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación en los compartimentos de transducción y codificación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje en los compartimentos de transducción y codificación a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (*Down*) y aumento de la temperatura (*Up*). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 5.4$ [S/cm²]; $g_{leak T} = 0.16$ [S/cm²]; $g_{leak C} = 0.09$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.17$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.1$ [S/cm²]; $g_{\sigma} = 1.6$ [S/cm²]; $g_{axial} = 0.5$ [S/cm²]; $E_{leak} = -75$ [mV]; $\tau_{\delta V} = 3$ [s]; $\tau_{calcio} = 12.8$ [s].

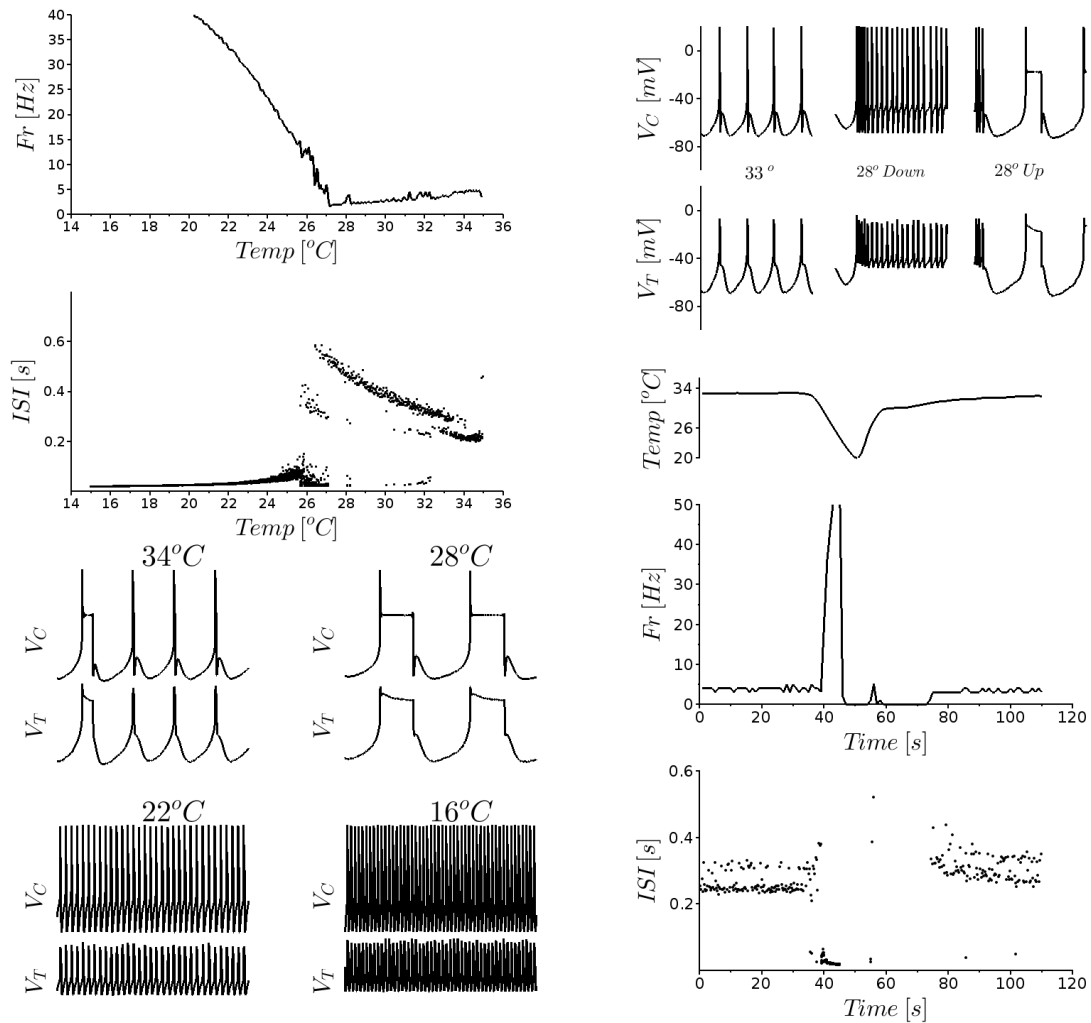


Figura 15: Modelo de dos compartimento con una combinación de parámetros en la que no muestra ni el comportamiento dinámico ni el estático de TNSF.

A la izquierda, frecuencia de disparo e ISIs obtenidos durante una rampa lenta de cambio de temperatura (0.05 °C/s), izquierda abajo, trazos de voltaje de la simulación en los compartimentos de transducción y codificación para distintas temperaturas.

A la derecha, trazos de voltaje en los compartimentos de transducción y codificación a 33°C anterior al pulso y a 28°C durante el descenso (*Down*) y aumento de la temperatura (*Up*). Abajo, protocolo de temperatura, frecuencia de disparos e ISIs para un pulso de cambio brusco de temperatura.

Parámetros: $g_{TRPM8} = 8.2$ [S/cm²]; $g_{leak T} = 0.16$ [S/cm²]; $g_{leak C} = 0.13$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.23$ [S/cm²]; $g_{sr} = 0.25$ [S/cm²]; $g_d = 4.7$ [S/cm²]; $g_{axial} = 0.64$ [S/cm²]; $E_{leak} = -81$ [mV]; $\tau_{\delta V} = 33.4$ [s]; $\tau_{calcio} = 2.6$ [s].

4.4 La función de distancia utilizada no asegura un buen comportamiento del modelo.

El ajuste automático que utilizamos no considera la respuesta estática como una característica a considerar al momento de asignar una aptitud a cada combinación de parámetros evaluada. En este sentido se podría decir que el algoritmo es “ciego” con respecto a los criterios usados en la evaluación visual de la respuesta estática. No es de extrañar entonces que la mayor distancia la presenta la categoría de soluciones que presenta sólo la respuesta estática. Las restantes categorías de soluciones (Dinámica y estática, Dinámica y Ninguna) se distribuyen en el mismo rango de valores, sin mostrar una clara minimización de la función de distancia en ninguna de las categorías (Fig. 16).

Sin embargo, se observa que tanto para el modelo de 1 como de 2 compartimentos, la menor distancia es alcanzada por soluciones que no reproducen ninguna de las respuestas buscadas, lo que sugiere que las soluciones que sí reproducen el comportamiento de los TNSF se encuentran en mínimos locales de la función de evaluación. Por lo tanto, una optimización más exhaustiva (al menos con el criterio utilizado) muy probablemente entregue soluciones que no permitan al modelo reproducir las observaciones experimentales.

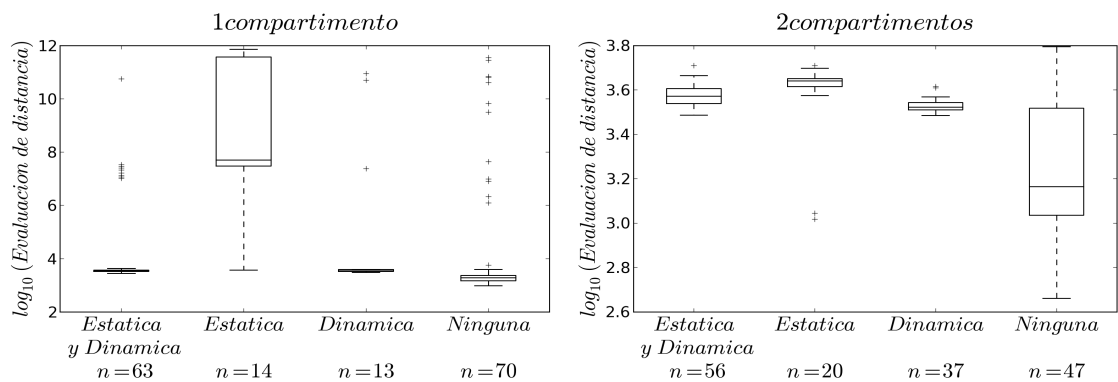


Figura 16: Resultados de la función de distancia utilizada en el algoritmo de optimización

Diagrama de caja, mostrando la distribución de las mínimas distancias obtenidas en el algoritmo de optimización. Los grupos corresponden a la clasificación de acuerdo al comportamiento que presentan las soluciones obtenidas. A la izquierda los resultados obtenidos en el modelo de 1 compartimento y a la derecha el de dos compartimentos.

4.5 Distribución de parámetros del conjunto de soluciones obtenido mediante algoritmo evolutivo.

4.5.1 Modelo de un compartimento

Al observar la distribución de parámetros libres en las distintas categorías de respuesta, es posible notar que los parámetros relacionados a la conductancia de fuga (Fig. 17) y los parámetros de la dinámica de calcio y TRPM8 (Fig. 18) no presentan agrupaciones evidentes que permitan explicar las diferencias de comportamiento. Por ejemplo, la conductancia máxima de TRPM8 (Fig. 18) se distribuye en todo el rango de búsqueda para las 4 categorías de respuesta, lo que podría significar que el comportamiento del modelo es indiferente a este parámetro, o con mayor seguridad, que este parámetro presenta interacciones no evidentes con otros parámetros.

Las soluciones que presentan respuesta dinámica (“Dinámica y estática” y “Estática”) no presentan diferencias notables en la distribución de ningún parámetro (Figs. 17, 18 y 19) sugiriendo que ambos comportamientos cohabitan en el espacio de parámetros y pequeños cambios en la distribución pueden llevar de uno a otro comportamiento.

Las 13 soluciones que presentaron respuesta dinámica sin mostrar respuesta estática (Dinámica) presentan bajos valores de en la conductancia máxima de la corriente despolarizante lenta g_{sd} (Fig. 19). Esta conductancias junto con la conductancia repolarizante lenta g_{sr} son claves en la aparición de la oscilación subumbral responsable de la respuesta estática del modelo de Huber y Braun. Igualmente en nuestro modelo, las soluciones con respuesta estática presentan valores g_{sd} y g_{sr} más altos o de rangos más acotados al compararlos con las soluciones sin respuesta dinámica.

Por otro lado, las soluciones que no mostraron ninguna de las respuestas buscadas presentan en general valores de los parámetros libres ampliamente distribuidos en el rango de búsqueda a excepción del parámetro de conductancia máxima de la corriente despolarizante rápida g_d (Fig. 19). También se observa que en promedio, estas soluciones presentan mayores conductancias de TRPM8, lo que junto al alto nivel de conductancias rápidas permitiría un

aumento transitorio de la frecuencia promedio ante descensos de temperatura y el consecuente buen ajuste de la función de distancia que estas soluciones presentan. Al observar en detalle la dinámica de estas soluciones se observan trazos de voltaje anómalos, en que el voltaje transmembrana tiende a equilibrarse en valores cercanos a 0 mV (Figs. 11 y 15), lo que fisiológicamente significaría un cambio en las concentraciones de las distintas especies iónicas incompatible con el normal funcionamiento celular.

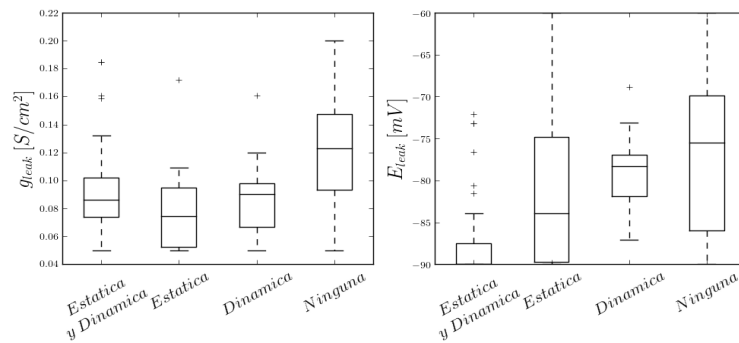


Figura 17: Parámetros de la conductancia de la corriente de fuga obtenidos para el modelo de un compartimento

Diagrama de caja, mostrando la distribución de la conductancia máxima de leak (izquierda) y el potencial de reversión (derecha). Se clasificaron las soluciones del algoritmo de optimización de acuerdo a su capacidad de reproducir la respuesta estática, dinámica, ambas o ninguna de ellas.

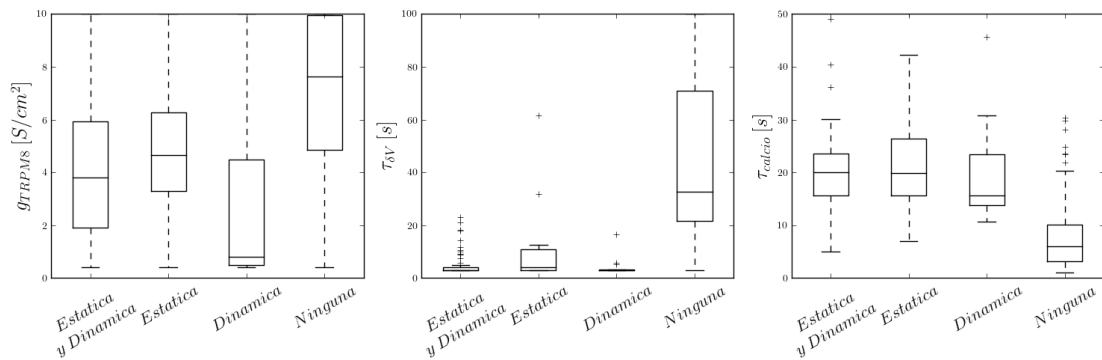


Figura 18: Parámetros de la conductancia de TRPM8 y dinámica de calcio obtenidos para el modelo de dos compartimentos.

Diagrama de caja, mostrando la distribución de la conductancia máxima de TRPM8 (izquierda) y las tasas de adaptación del desfase en $V_{1/2}$ calcio dependiente de TRPM8 (centro) y extrusión de calcio (derecha). Se clasificaron las soluciones del algoritmo de optimización de acuerdo a su capacidad de reproducir la respuesta estática, dinámica, ambas o ninguna de ellas.

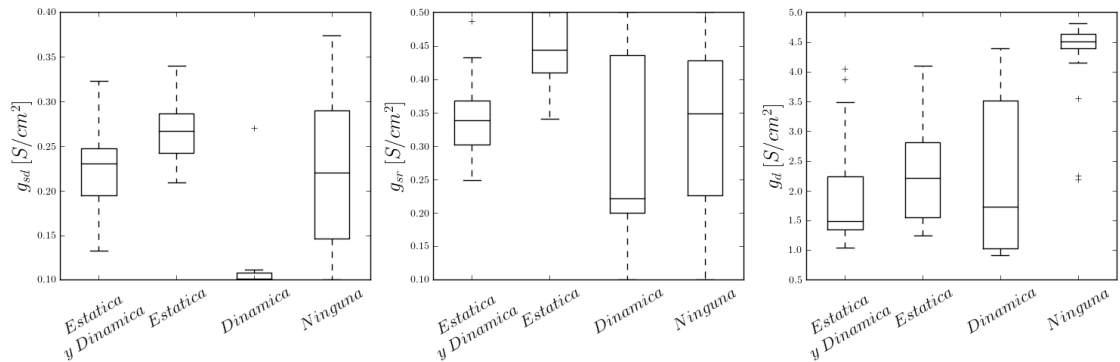


Figura 19: Parámetros de las conductancias tipo Huber y Braun obtenidos para el modelo de un compartimento.

Diagrama de caja, mostrando la distribución de la conductancia máxima de las conductancias depolarizante lenta (izquierda) repolarizante lenta (centro) y depolarizante rápida (derecha). Se clasificaron las soluciones del algoritmo de optimización de acuerdo a su capacidad de reproducir la respuesta estática, dinámica, ambas o ninguna de ellas.

4.5.2 Modelo de dos compartimentos

Al observar la distribución de parámetros de las soluciones obtenidas para el modelo de dos compartimentos, llama la atención que la conductancia axial (Fig. 20) que une ambos compartimentos y por tanto podría aparecer como un parámetro clave, resultó estar ampliamente distribuida dentro del rango de búsqueda para todos los tipos de comportamiento. Al mirar las dinámicas de voltaje de las distintas soluciones (Figs. 12-15) se aprecia que los voltajes de ambos compartimentos se encuentran acoplados, por lo que el rango de búsqueda para este parámetro por lo menos está asegurando que las oscilaciones se transmitan de un compartimento a otro.

También se distribuyeron ampliamente los parámetros libres correspondientes a las conductancias máximas de fuga (Fig. 21), tanto para el compartimento de transducción (soma), como para el compartimento de codificación (axón).

Al igual que en las soluciones encontradas para el modelo de un compartimento, aquellas que muestran respuesta dinámica sin mostrar respuesta estática se caracterizan por tener bajas conductancias máximas de las corrientes lentas (Fig. 23) confirmando la

importancia de estas conductancias para el fenómeno oscilatorio subumbral en la respuesta estática del modelo. Igualmente, las soluciones que no muestran ninguna de las respuestas buscadas se caracterizan por presentar altas conductancias máximas de TRPM8 y repolarizante rápida, lo cual garantiza una alta frecuencia de disparo a bajas temperaturas y por tanto la minimización de la función de distancia.

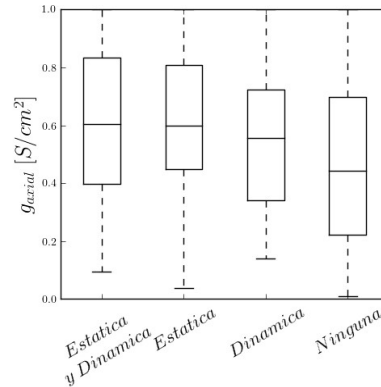


Figura 20: Parámetros de la conductancia axial obtenidos para el modelo de dos compartimentos.

Diagrama de caja, mostrando la distribución de la conductancia axial obtenidos en el ajuste del modelo de dos compartimentos. Se clasificaron las soluciones del algoritmo de acuerdo a su capacidad de reproducir la respuesta estática, dinámica, ambas o ninguna de ellas.

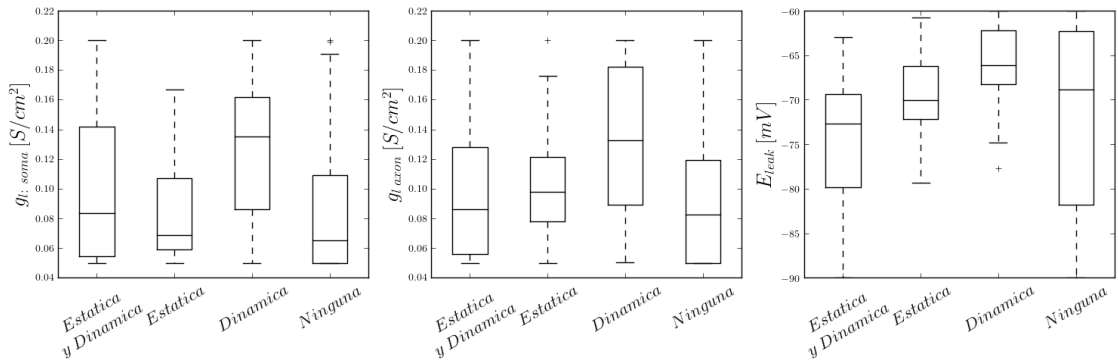


Figura 21: Parámetros de la conductancia de la corriente de fuga obtenidos para el modelo de dos compartimentos.

Diagrama de caja, mostrando la distribución de la conductancia máxima de leak en el compartimento de transducción o soma (izquierda), en el compartimento de codificación o axón (centro) y el potencial de reversión (derecha). Se clasificaron las soluciones del algoritmo de optimización de acuerdo a su capacidad de reproducir la respuesta estática, dinámica, ambas o ninguna de ellas.

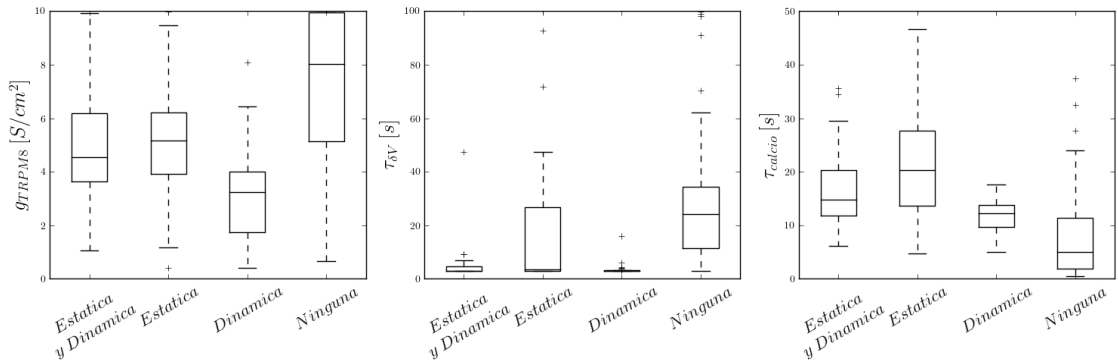


Figura 22: Parámetros de la conductancia de TRPM8 y dinámica de calcio obtenidos para el modelo de dos compartimentos.

Diagrama de caja, mostrando la distribución de la conductancia máxima de TRPM8 (izquierda) y las tasas de adaptación del desfase en $V_{1/2}$ calcio dependiente de TRPM8 (centro) y extrusión de calcio (derecha). Se clasificaron las soluciones del algoritmo de optimización de acuerdo a su capacidad de reproducir la respuesta estática, dinámica, ambas o ninguna de ellas.

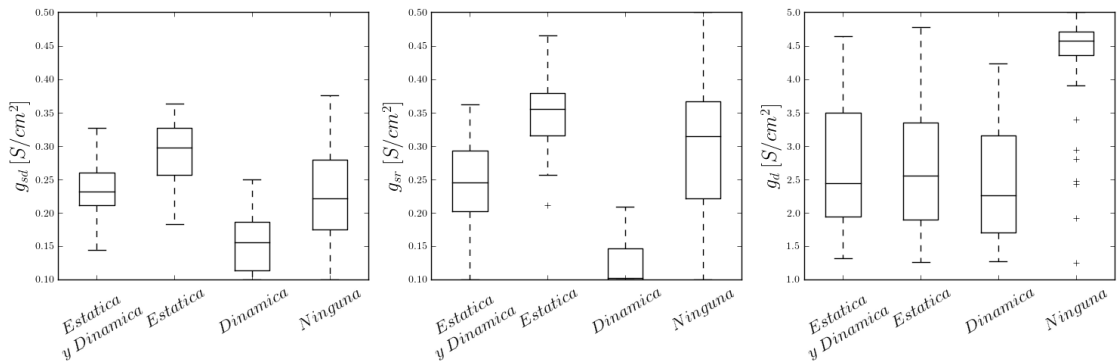


Figura 23: Parámetros de las conductancias tipo Huber y Braun obtenidos para el modelo de dos compartimentos.

Diagrama de caja, mostrando la distribución de la conductancia máxima de las conductancias depolarizante lenta (izquierda) repolarizante lenta (centro) y depolarizante rápida (derecha). Se clasificaron las soluciones del algoritmo de optimización de acuerdo a su capacidad de reproducir la respuesta estática, dinámica, ambas o ninguna de ellas.

4.6 Dinámica de las variables de adaptación dependiente de calcio del canal

TRPM8

En nuestro modelo de activación del canal TRPM8 la apertura del canal depende de la temperatura, el voltaje y la concentración interna de calcio. Las dependencias de voltaje y temperatura se describen de acuerdo al modelo de Voets y cols., (2004) (Ecuación 15). Estas dependencias son modeladas de manera instantánea, puesto que las tasas de adaptación están en el orden de la discretización temporal de la simulación.

La dependencia de calcio presenta una dinámica de adaptación más lenta, cuyos valores fueron ajustados mediante el algoritmo de optimización evolutivo. Para observar la influencia de esta adaptación en cambios bruscos de temperatura, se sometió el modelo de uno y dos compartimentos a un pulso cuadrado de cambio de temperatura (Fig. 24), en que al terminal adaptado a 35°C se le cambia la temperatura a 25°C durante 40 segundos, para luego volver a 35°C. Se evaluaron los modelos para cada una de las soluciones que permiten reproducir tanto la respuesta estática como la dinámica.

En estas condiciones se observa un rápido incremento en la apertura del canal TRPM8 (a_{TRPM8}) cuando el modelo es sometido a 25°C. Con el aumento inicial de a_{TRPM8} se produce un aumento del calcio intracelular desde su valor basal ($\approx 3\mu\text{M}$) a un valor máximo de $\approx 7\mu\text{M}$. A medida que este aumento de calcio influye en el aumento de δV y consecuentemente en la disminución de a_{TRPM8} , la concentración de calcio alcanza un estado estacionario ($\approx 6\mu\text{M}$).

De manera análoga, frente al un aumento brusco en la temperatura, se produce un rápido cierre en los canales TRPM8, se observa una disminución en la desviación estándar de la apertura en este período, indicando que para todas las soluciones el aumento brusco en la temperatura produce el cierre de canales TRPM8. Posterior a este cierre se alcanza paulatinamente un equilibrio en la concentración de calcio y desplazamiento del $V_{1/2}$ del canal TRPM8 (δV).

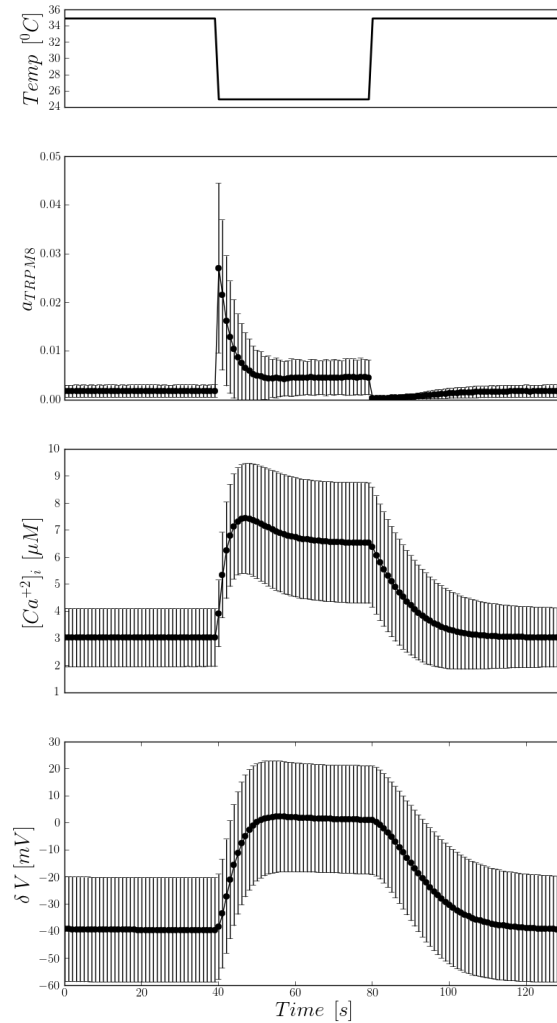


Figura 24: Dinámicas de las variables dependientes de calcio del canal TRPM8.

Protocolo de temperatura, activación del canal (a_{TRPM8}), concentración intracelular de calcio ($[Ca^{+2}]_i$) y desplazamiento del voltaje de apertura media (δV). Valores corresponden al promedio y desviación estándar obtenidos en la simulación de los 63 individuos del modelo de un compartimento que muestran comportamiento dinámico y estático.

Cada punto corresponde al promedio de la variable durante un segundo de la simulación. El modelo de dos compartimentos muestra dinámicas y rangos similares para todas las variables mostradas (datos no mostrados).

4.7 Respuesta dependiente de TRPM8 en los modelos propuestos

La presencia del canal TRPM8 es necesaria para la correcta detección del frío inocuo en ratones (Bautista y cols., 2007; Colburn y cols., 2007; Dhaka y cols., 2007). Por otra parte Parra y cols., 2010 mostraron que la frecuencia de disparos en TNSF es dependiente de la presencia del gen codificante del canal TRPM8 en ratones. En este trabajo se observa que en animales con la dotación completa del gen codificante (TRPM8^{+/+}) la frecuencia de disparo esta aumentada con respecto a ratones con la mitad de la dotación genética para el canal (TRPM8^{+/-}). En ratones *Knockout* para el canal (TRPM8^{-/-}) los TNSF no presentan actividad espontáneas ni respuesta a frío.

Analizamos la dependencia de la conductancia de TRPM8 en las frecuencias de disparo producidos por nuestro modelo. Se utilizaron aquellas combinaciones de parámetros que confieren al modelo la capacidad de reproducir las respuestas dinámica y estática tanto para el modelo de uno como de dos compartimentos.

Se utilizó además el mismo protocolo de temperatura utilizado en Parra y cols.,(2010), el cual consiste en un período de adaptación a 35°C seguido de un período de enfriamiento hasta 19°C en un tiempo de 20s (-0.8 °C/s). Se consideraron TNSF con la dotación genética completa (TRPM8^{+/+}) al modelo alimentado con las combinaciones de parámetros obtenidos mediante el algoritmo de optimización evolutivo. Para simular los terminales TRPM8^{+/-} se utilizó la mitad de la conductancia máxima del canal TRPM8 (g_{TRPM8}) obtenida durante la optimización, esto es, suponiendo que la expresión del canal es proporcional a la presencia del gen codificante. Bajo este mismo criterio, los TNSF TRPM8^{-/-} fueron simulados anulando la conductancia del canal TRPM8 durante la simulación ($g_{TRPM8} = 0$), manteniendo el valor obtenido de todos los demás parámetros libres del modelo. Se analizó además el modelo portando sólo un 10% de la conductancia de TRM8 encontrada en la optimización del modelo.

La dependencia de g_{TRPM8} en la frecuencia de disparo de nuestro modelo reproduce los resultados de Parra y cols, 2010 en cuanto a la disminución de la frecuencia en TNSF con menor expresión del canal TRPM8 (Fig. 25). Tanto para el modelo de uno como de dos

compartimentos, la frecuencia de disparos en terminales TRPM8^{+/-} cae en cerca de 4 disparos por segundos para todas las temperaturas simuladas con respecto a los canales TRPM8^{+/+}. La frecuencia de disparo se hace aún menor al colocar sólo un 10% de la conductancia de TRPM8 mostrando resultados más cercanos a los encontrados experimentalmente para ratones TRPM8^{+/-}. Por otra parte los terminales TRPM8^{-/-} muestran una ausencia casi completa de disparos, tal cual fue descrito en Parra y cols., (2010).

La frecuencia de disparo mostrada por el modelo aumenta sostenidamente a medida que la temperatura es menor (Fig. 25). En los datos presentados por Parra y cols., (2010) los TNSF también muestran un aumento en la frecuencia de disparo con el descenso de la temperatura, pero solo hasta cerca de los 24°C, temperatura a la cual la frecuencia desciende, haciéndose casi 0 a 20°C. Nuestro modelo aumenta la frecuencia de disparo a temperatura estable a medida que esta es menor, probablemente debido a la mayor despolarización producida por la apertura del canal TRPM8. Es incierto si el modelo propuesto puede reproducir este descenso en la frecuencia de disparo en la respuesta estática a temperaturas bajas, para lo cual es posible realizar una nueva optimización incluyendo en el criterio de semejanza esta característica de los TNSF. Eventualmente la formalización matemática de nuestro modelo no considera algún proceso fisiológico responsable del descenso en la frecuencia de disparo estática a bajas temperaturas, en cuyo caso sería necesario incluirlo a la estructura del modelo.

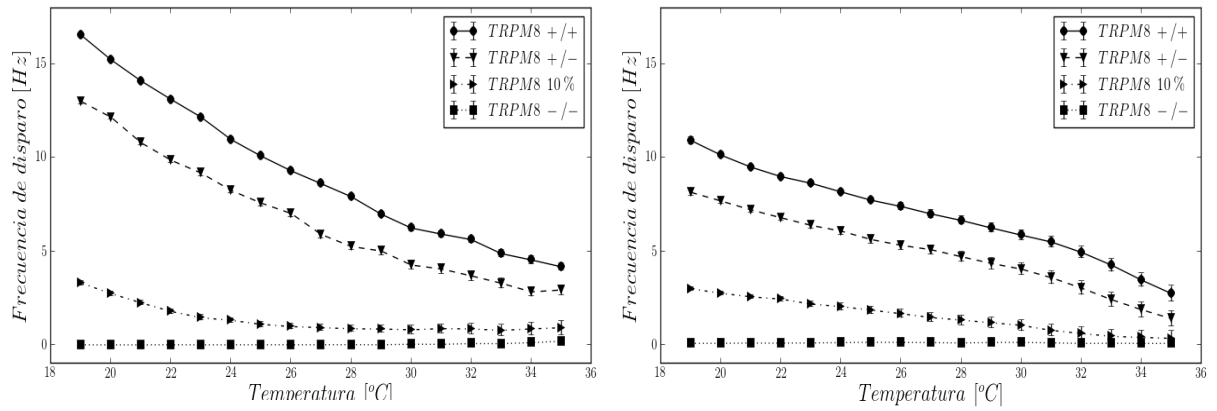


Figura 25: Dependencia de la conductancia de TRPM8 en la frecuencia de disparo producidos por el modelo propuesto

Promedio y desviación estándar de la frecuencia de disparo en función de la temperatura para distintos valores de g_{TRPM8} . Los datos corresponden a simulaciones del modelo de un compartimento $n = 63$ (izquierda) y el modelo de dos compartimentos $n = 56$ (derecha)

5 DISCUSIÓN

5.1 El canal TRPM8 puede ser el responsable de la respuesta dinámica de los TNSF

Nuestros resultados muestran que la respuesta dinámica de los TNSF es reproducible mediante la incorporación de la conductancia de TRPM8 al modelo de Huber y Braun (Figs. 8 y 12). En nuestro modelo la respuesta transitoria a un descenso brusco de temperatura se explica por un rápido aumento de la apertura del canal TRPM8 debido a temperatura. El estado estacionario se alcanza una vez que la concentración de calcio y la adaptación de TRPM8 dependiente de calcio alcanzan su equilibrio (Fig. 24). De manera análoga, la respuesta dinámica a aumentos bruscos en la temperatura ocurre entre la rápida inactivación de TRPM8 (dependiente de temperatura) y la más lenta activación (dependiente de calcio).

Bajo estas condiciones, la respuesta dinámica a enfriamientos y a calentamientos en TNSF reproducidos por nuestro modelo, son respuestas que dependen de la misma inactivación calcio dependiente del canal TRPM8. Sin embargo Brock y cols.,(2006) proponen que las respuestas dinámicas a enfriamientos y a calentamientos son procesos que responden a distintas especies iónicas en juego. Esta conclusión se desprende de la inhibición selectiva de la respuesta dinámica a calentamientos, sin modificar significativamente la respuesta dinámica a enfriamientos producida por el ion bario, el cual es conocido por bloquear distintos

canales de potasio.

Si bien estos autores proponen a los canales de potasio de la familia de doble poro (TREK-1, TREK-2 y TRAAK) como posibles responsables de la inhibición de la respuesta dinámica a calentamientos, no se descarta la posibilidad de que Ba^{+2} esté modificando la apertura del canal TRPM8 (Hui y cols., 2005; Brock y cols., 2006). Cabe aún preguntarse bajo qué mecanismos esta modificación podría inhibir la respuesta dinámica a calentamientos sin alterar la respuesta dinámica a enfriamientos.

5.2 La diversidad natural de los TNSF y la diversidad de modelos.

La dinámica neuronal es fuertemente dependiente de la naturaleza y densidad de los canales de iones presentes en su membrana. Debido a esto, pequeños cambios en las dinámicas de apertura o conductancia máxima de estos canales pueden modificar fuertemente el comportamiento de la neurona (Achard y Shutter, 2006). Sin embargo, en distintas neuronas que presentan cualitativamente el mismo comportamiento neuronal, pueden encontrarse conductancias máximas distintas para cada especie de canal de iones.

Si la dinámica neuronal mantiene sus propiedades a pesar de cambios en la densidad de sus canales de iones, entonces se está en presencia de un sistema robusto. Por el contrario, si pequeñas perturbaciones en la densidad de canales de una neurona provoca cambios significativos en su dinámica, entonces el mecanismo por el cual puede mantener sus propiedades cualitativas requiere de mecanismos compensatorios de tipo homeostáticos, los cuales encuentran una nueva proporción de canales de iones que generan la dinámica neuronal característica de la neurona (Marder y Goaillard, 2006; Davis, 2007; Lepora y cols. 2011).

En nuestro caso, fue posible encontrar un amplio conjunto de combinaciones de parámetros que otorgan al modelo la capacidad de reproducir la respuesta estática y dinámica de los TNSF (Fig. 7). Estas soluciones se encuentran ampliamente distribuidas en el espacio de parámetros y además se encuentran en rangos similares con aquellas soluciones que no

permiten la reproducción de los comportamientos fisiológicos de las TNSF. Estas características del conjunto de parámetros aceptables para el comportamiento del modelo dentro de los rangos fisiológicamente aceptables, hacen suponer que las propiedades cualitativas de la respuesta en TNSF se deben a procesos homeostáticos de compensación en las TNSF que garantizan la correcta codificación del frío inocuo.

5.3 Modelo de un compartimento v/s modelo de dos compartimentos, nivel de complejidad del modelo.

En los análisis realizados no fue posible encontrar diferencias cualitativas entre el modelo de uno y dos compartimentos. Ambos modelos fueron capaces de reproducir las respuestas dinámicas y estáticas de los TNSF (Figs. 8 y 12) y la densidad de soluciones aceptables dentro del conjunto de soluciones encontradas no presentan grandes diferencias (Fig. 7). Una vez ajustados ambos modelos también logran reproducir la frecuencia de disparos en función de la temperatura en TNSF con una menor expresión del canal TRPM8 (Fig 24) tal como fue observado por Parra y cols., (2010).

El hecho de que el modelo de dos compartimentos presente una mayor complejidad en términos de formulación matemática y tiempo de cómputo, sin entregar mejoras cualitativas en la reproducción del comportamiento de los TNSF, sugiere que no es necesario considerar la separación geométrica para el nivel de descripción de los TNSF alcanzado en esta tesis.

El nivel de detalle de las características fisiológicas que se desean reproducir es un punto central en la formulación de un modelo matemático. Nuestro modelo se ha ocupado de reproducir las respuestas estáticas y dinámicas de los TNSF, para ello se han utilizado una serie de simplificaciones orientadas a mantener el modelo relativamente simple. A continuación detallamos algunas de estas simplificaciones:

Nuestro modelo, así como el modelo de Huber y Braun, considera las conductancias de potasio y sodio rápidas como una simplificación de las conductancias planteadas en Hodgkin y Huxley, (1952), reduciendo éstas a un modelo de dos estados. Bajo esta simplificación, la

generación de potenciales de acción se mantiene, no así su forma. Para efectos de la respuesta dinámica puede tener relevancia la ausencia de la partícula de inactivación de los canales de sodio, lo cual puede tener relación con el aumento sostenido de la frecuencia de disparo que presenta nuestro modelo a medida que la temperatura es menor y por lo cual se sugiere tener en cuenta para futuros trabajos con este modelo.

Otra simplificación corresponde al modelo planteado por Voets y cols., (2004) del canal TRPM8 que utilizamos. Este modelo representa de buena manera su dinámica dentro de rangos de temperatura fisiológicos, sin embargo no da cuenta de los cambios en la dependencia de voltaje que muestra el canal a temperaturas o demasiado bajas ($<10^{\circ}\text{C}$) o demasiado altas ($>40^{\circ}\text{C}$) y que si reproduce de buena manera el modelo alostérico planteado por Brauchi y cols., (2004). En nuestro trabajo esta simplificación no afecta mayormente las simulaciones, pues estas se desarrollan dentro de los rangos de temperatura en que el modelo de Voets, y cols., (2004) reproduce la dinámica de TRPM8.

Por otra parte, se ha observado que la regulación fina de la oscilación subumbral en TNSF es influenciada por una corriente activada por hiperpolarización (I_h), (Orio y cols., 2012). Ésta y otras corrientes también presentes en los TNSF, así como la influencia de temperatura en la actividad de la bomba Na^+/K^+ , no fueron consideradas en el modelo presentado en esta tesis con el afán de no aumentar significativamente la complejidad del modelo.

5.4 Ventajas y desventajas de la aplicación del algoritmo evolutivo.

En ajustes manuales previos de nuestro modelo no nos fue posible encontrar parámetros que permitan al modelo reproducir las respuestas dinámica y estática. Al contrario, el uso de algoritmos evolutivos nos permitió encontrar set de parámetros aceptables con un porcentaje de efectividad cercano al 40% (Fig. 7). En este sentido el uso de algoritmos evolutivos de optimización parece ser una estrategia más efectiva que el ajuste manual, a pesar de que este último depende fuertemente del azar y la pericia del investigador (Marder y cols., 2007), por lo que el caso particular de este trabajo no representa un caso concluyente al

respecto.

Un punto clave en el éxito de la optimización fue la correcta elección de la función de semejanza entre el resultado de la simulación y los datos experimentales. Se realizaron distintos ajustes con otras funciones de semejanza (tasa de disparos, *ISI-distance* (Kreutz y cols., 2007), los cuales no lograron entregar combinaciones de parámetros aceptables (datos no mostrados). Sin embargo, la función utilizada está lejos de ser óptima, ya que muchas de las soluciones encontradas no reproducen las respuestas buscadas, y es más, las mejores evaluaciones de esta función corresponden a soluciones no aceptables.

En este punto, cabe mencionar que las soluciones que no reproducen ninguna de las respuestas, presentan períodos de tiempo en que el voltaje se equilibra a potenciales sobre el umbral de disparo. Una solución para descartar estos comportamientos no fisiológicos es incluir en la función de distancia utilizada un criterio que penalice la combinación de parámetros que produzca tal situación, otro forma de incluir este criterio es formulando una segunda función de distancia que de cuenta de la semejanza del trazo de voltaje de la simulación a un trazo de voltaje fisiológico, en este caso la estrategia de optimización se transforma en algoritmos evolutivos multiobjetivos en la cual se minimizan en conjunto más de un criterio de optimización (Bahl y cols., 2012).

Es importante hacer notar que la función de distancia utilizada considera sólo la ocurrencia de disparos de un terminal durante un breve pulso de cambio de temperatura (Fig. 6). Por lo tanto, el comportamiento estático (patrón de disparo en ráfagas) no es un criterio que se considere durante la optimización y surge espontáneamente en el modelo, al menos en el rango de búsqueda utilizado para los parámetros libres.

5.5 Conclusión general.

Esta tesis permite concluir que la inclusión de la conductancia del canal TRPM8 en el modelo de Huber y Braun confiere la capacidad de reproducir la respuesta dinámica de los TNSF sin perder la capacidad de reproducir la respuesta estática. Para los modelos propuestos

se encontraron un conjunto de combinaciones de parámetros que permiten al modelo reproducir ambas respuestas. Sin embargo, la estrategia de ajuste encuentra combinaciones de parámetros que o bien, no reproducen las respuestas buscadas, o bien, presentan anomalías en la dinámica de voltaje incompatibles con la fisiología celular.

La diversidad de soluciones sugiere la presencia de mecanismos compensatorios en los TNSF que le permiten mantener las características cualitativas de la codificación del frío inocuo, más allá de las densidades de las distintas especies de canales de iones presentes en su membrana. En este sentido, la utilización de algoritmos evolutivos de optimización demostró ser un método efectivo en la exploración del espacio de parámetros en la medida de que esté dirigida por una función de distancia que represente de buena manera las características buscadas para el modelo.

En la medida que los modelos matemáticos logren una mejor representación de las dinámicas neuronales, se espera que pasen a ser una herramienta cada vez más útil y común en neurociencias. En particular, esta tesis espera ser un aporte en la representación matemática de los TNSF que en un futuro pueda ser utilizada para comprender de mejor manera como se logra la codificación del frío inocuo en mamíferos.

6 REFERENCIAS

- Achard, P., & De Schutter, E. (2006). Complex parameter landscape for a complex neuron model. *PLoS Computational Biology*, 2(7), e94.
- Amini, B., Clark, J. W., & Canavier, C. C. (1999). Calcium dynamics underlying pacemaker-like and ráfaga firing oscillations in midbrain dopaminergic neurons: a computational study. *Journal of Neurophysiology*, 82(5), 2249-2261.
- Armstrong, C. M., Bezanilla, F., & Rojas, E. (1973). Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *The Journal of General Physiology*, 62(4), 375-391.
- Bade, H., Braun, H. A., & Hensel, H. (1979). Parameters of the static ráfaga discharge of lingual cold receptors in the cat. *Pflügers Archiv*, 382(1), 1-5.
- Bahl, A., Stemmler, M. B., Herz, A. V., & Roth, A. (2012). Automated optimization of a reduced layer 5 pyramidal cell model based on experimental data. *Journal of neuroscience methods*, 210(1), 22-34.
- Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., & Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150), 204-208.
- Belmonte, C., Brock, J. A., & Viana, F. (2009). Converting cold into pain. *Experimental brain research*, 196(1), 13-30.
- Belmonte, C., & Viana, F. (2008). Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain*, 4, 14.
- Brauchi, S., Orio, P., & Latorre, R. (2004). Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), 15494-15499.

- Braun, H. A., Bade, H., & Hensel, H. (1980). Static and dynamic discharge patterns of ráfagaing cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms. *Pflügers Archiv*, 386(1), 1-9.
- Braun, H. A., Huber, M. T., Dewald, M., Schäfer, K., & Voigt, K. (1998). Computer simulations of neuronal signal transduction: the role of nonlinear dynamics and noise. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 8(05), 881-889.
- Braun, H. A., Voigt, K., & Huber, M. T. (2003). Oscillations, resonances and noise: basis of flexible neuronal pattern generation. *Biosystems*, 71(1), 39-50.
- Brock, J. A., McLachlan, E. M., & Belmonte, C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig córnea. *The Journal of physiology*, 512(1), 211-217.
- Brock, J., Acosta, M. C., Al Abed, A., Pianova, S., & Belmonte, C. (2006). Barium ions inhibit the dynamic response of guinea-pig córneal cold receptors to heating but not to cooling. *The Journal of physiology*, 575(2), 573-581.
- Carr, R. W., Pianova, S., & Brock, J. A. (2002). The effects of polarizing current on nerve terminal impulses recorded from polymodal and cold receptors in the guinea-pig córnea. *The Journal of general physiology*, 120(3), 395-405.
- Carr, R. W., Pianova, S., Fernandez, J., Fallon, J. B., Belmonte, C., & Brock, J. A. (2003). Effects of heating and cooling on nerve terminal impulses recorded from cold-sensitive receptors in the guinea-pig córnea. *The Journal of general physiology*, 121(5), 427-439.
- Carr, R. W., Pianova, S., McKemy, D. D., & Brock, J. A. (2009). Action potential initiation in the peripheral terminals of cold-sensitive neurones innervating the guinea-pig córnea. *The Journal of physiology*, 587(6), 1249-1264.
- Colburn, R. W., Lubin, M. L., Stone Jr, D. J., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M. R., & Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*, 54(3), 379-386.
- D'Angelo, E., Solinas, S., Garrido, J., Casellato, C., Pedrocchi, A., Mapelli, J., & Prestori, F. (2012). Realistic modeling of neurons and networks: towards brain simulation. *Functional neurology*, 28(3), 153-166.
- Daniels, R. L., Takashima, Y., & McKemy, D. D. (2009). Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4, 5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(3), 1570-1582.
- Davis, G. W. (2006). Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 307-323.
- Deb, K., & Agrawal, R. B. (1994). Simulated binary crossover for continuous search space. *Complex Systems*, 9, 1-34.
- Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J., & Patapoutian, A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*, 54(3), 371-378.

- Druckmann, S., Banitt, Y., Gidon, A., Schürmann, F., Markram, H., & Segev, I. (2007). A novel multiple objective optimization framework for constraining conductance-based neuron models by experimental data. *Frontiers in neuroscience*, *1*(1), 7.
- Du, Y., Lu, Q., Wang, S., & Wiercigroch, M. (2009). A new method for characterizing patterns of neural spike trains and its application. *International Journal of Non-Linear Mechanics*, *44*(4), 432-440.
- Dubner, R., Sumino, R., & Wood, W. I. (1975). A peripheral "cold" fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey's face. *Journal of neurophysiology*, *38*(6), 1373-1389.
- Feudel, U., Neiman, A., Pei, X., Wojtenek, W., Braun, H., Huber, M., & Moss, F. (2000). Homoclinic bifurcation in a Hodgkin–Huxley model of thermally sensitive neurons. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, *10*(1), 231-239.
- Gallar, J., Acosta, M. C., & Belmonte, C. (2003). Activation of scleral cold thermoreceptors by temperature and blood flow changes. *Investigative ophthalmology & visual science*, *44*(2), 697-705.
- Hensel, H., & Iggo, A. (1971). Analysis of cutaneous warm and cold fibres in primates. *Pflügers Archiv*, *329*(1), 1-8.
- Herzog, R. I., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2001). Persistent TTX-resistant Na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *Journal of neurophysiology*, *86*(3), 1351-1364.
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (Vol. 507). Sunderland, MA: Sinauer.
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, *117*(4), 500.
- Huber, M. T., Krieg, J. C., Dewald, M., Voigt, K., & Braun, H. A. (2000). Stochastic encoding in sensory neurons: impulse patterns of mammalian cold receptors. *Chaos, Solitons & Fractals*, *11*(12), 1895-1903.
- Hui, K., Guo, Y., & Feng, Z. P. (2005). Biophysical properties of menthol-activated cold receptor TRPM8 channels. *Biochemical and biophysical research communications*, *333*(2), 374-382.
- Jolivet, R., Kobayashi, R., Rauch, A., Naud, R., Shinomoto, S., & Gerstner, W. (2008). A benchmark test for a quantitative assessment of simple neuron models. *Journal of neuroscience methods*, *169*(2), 417-424.
- Kang, D., & Kim, D. (2006). TREK-2 (K2P10. 1) and TRESK (K2P18. 1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *291*(1), C138-C146.
- Kenshalo, D. R., & Duclaux, R. (1977). Response characteristics of cutaneous cold receptors in the monkey. *Journal of neurophysiology*, *40*(2), 319-332.

- Kress, M., Koltzenburg, M., Reeh, P. W., & Handwerker, H. O. (1992). Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro. *Journal of neurophysiology*, 68(2), 581-595.
- Kreuz, T., Haas, J. S., Morelli, A., Abarbanel, H. D., & Politi, A. (2007). Measuring spike train synchrony. *Journal of neuroscience methods*, 165(1), 151-161.
- Lepora, N. F., Overton, P. G., & Gurney, K. (2012). Efficient fitting of conductance-based model neurons from somatic current clamp. *Journal of computational neuroscience*, 32(1), 1-24.
- Longtin, A., & Hinzer, K. (1996). Encoding with ráfagaing, subthreshold oscillations, and noise in mammalian cold receptors. *Neural Computation*, 8(2), 215-255.
- Lyttle, D., & Fellous, J. M. (2011). A new similarity measure for spike trains: Sensitivity to ráfagas and periods of inhibition. *Journal of neuroscience methods*, 199(2), 296-309.
- MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., & Chait, B. T. (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, 280(5360), 106-109.
- Madrid, R., Donovan-Rodríguez, T., Meseguer, V., Acosta, M. C., Belmonte, C., & Viana, F. (2006). Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *The Journal of neuroscience*, 26(48), 12512-12525.
- Madrid, R., de la Pena, E., Donovan-Rodríguez, T., Belmonte, C., & Viana, F. (2009). Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *The Journal of Neuroscience*, 29(10), 3120-3131.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., & Honoré, E. (2000). TREK-1 is a heat-activated background K⁺ channel. *The EMBO journal*, 19(11), 2483-2491.
- Marder, E., & Goaillard, J. M. (2006). Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7), 563-574.
- Marder, E., Tobin, A. E., & Grashow, R. (2007). How tightly tuned are network parameters? Insight from computational and experimental studies in small rhythmic motor networks. *Progress in brain research*, 165, 193-200.
- Matta, J. A., & Ahern, G. P. (2007). Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *The Journal of physiology*, 585(2), 469-482.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52-58.
- Möller, A. R. (2003). *Sensory systems: anatomy and physiology*. Gulf Professional Publishing.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., & Lazdunski, M. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *The EMBO journal*, 28(9), 1308-1318.

- Orio, P., Madrid, R., De La Peña, E., Parra, A., Meseguer, V., Bayliss, D. A., & Viana, F. (2009). Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *The Journal of physiology*, *587*(9), 1961-1976.
- Orio, P., Parra, A., Madrid, R., González, O., Belmonte, C., & Viana, F. (2012). Role of Ih in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings. *Journal of Neurophysiology*, *108*(11), 3009-3023.
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M. C., & Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the córnea. *Nature medicine*, *16*(12), 1396-1399.
- Patel, A., & Honoré, E. (2002). The TREK two P domain K⁺ channels. *The Journal of physiology*, *539*(3), 647-647.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell calcium*, *38*(3), 233-252.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., ... & Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, *108*(5), 705-715.
- Plant, R. E. (1981). Bifurcation and resonance in a model for ráfagaing nerve cells. *Journal of mathematical biology*, *11*(1), 15-32.
- Reid, G. (2005). ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to?. *Pflügers Archiv*, *451*(1), 250-263.
- Reid, G., & Flonta, M. L. (2001). Physiology: Cold current in thermoreceptive neurons. *Nature*, *413*(6855), 480-480.
- Rohács, T., Lopes, C. M., Michailidis, I., & Logothetis, D. E. (2005). PI (4, 5) P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nature neuroscience*, *8*(5), 626-634.
- Rossant, C., Goodman, D. F., Fontaine, B., Platkiewicz, J., Magnusson, A. K., & Brette, R. (2011). Fitting neuron models to spike trains. *Frontiers in neuroscience*, *5*.
- Schäfer, K., Braun, H. A., & Rempe, L. (1991). Discharge pattern analysis suggests existence of a low-threshold calcium channel in cold receptors. *Experientia*, *47*(1), 47-50.
- Schutter, E. D. (2009). *Computational modeling methods for neuroscientists*. The MIT Press.
- Sosnovtseva, O. V., Postnova, S. D., Mosekilde, E., & Braun, H. A. (2004). Inter-pattern transitions in a noisy ráfagaing cell. *Fluctuation and Noise Letters*, *4*(03), L521-L533.
- Spray, D. C. (1986). Cutaneous temperature receptors. *Annual review of physiology*, *48*(1), 625-638.
- Svensson, C. M., Coombes, S., & Peirce, J. W. (2012). Using Evolutionary Algorithms for Fitting High-Dimensional Models to Neuronal Data. *Neuroinformatics*, *10*(2), 199-218.

- Thut, P. D., Wrigley, D., & Gold, M. S. (2003). Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons *in vitro*. *Neuroscience*, *119*(4), 1071-1083.
- Van Geit, W., De Schutter, E., & Achard, P. (2008). Automated neuron model optimization techniques: a review. *Biological cybernetics*, *99*(4-5), 241-251.
- Viana, F., de la Peña, E., & Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nature neuroscience*, *5*(3), 254-260.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., & Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold-and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, *430*(7001), 748-754.
- Voets, T., Owsianik, G., Janssens, A., Talavera, K., & Nilius, B. (2007). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nature chemical biology*, *3*(3), 174-182.
- Wang X-J, Rinzel J. (1999) Oscillatory and rafagaing properties of neurons. in The handbook of brain theory and neuronal networks, ed Arbib MA (MIT Press, London), pp 686–691
- White, J. A., Budde, T., & Kay, A. R. (1995). A bifurcation analysis of neuronal subthreshold oscillations. *Biophysical journal*, *69*(4), 1203-1217.