

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

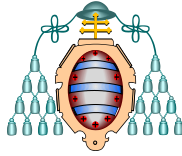
PROGRAMA DOCTORADO

**Ciencias de la salud**

TÍTULO

**Cambios funcionales y morfológicos en las fibras  
sensoriales de la córnea tras su lesión quirúrgica y su  
relación con la edad**

AUTOR: **FEDERICO BECH DIAZ**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

PROGRAMA DOCTORADO

**Ciencias de la salud**

TÍTULO

**Cambios funcionales y morfológicos en las fibras  
sensoriales de la córnea tras su lesión quirúrgica y su  
relación con la edad**

AUTOR: **FEDERICO BECH DIAZ**



Universidad de Oviedo  
Universidá d'Uviéu  
University of Oviedo

## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: Cambios funcionales y morfológicos en las fibras sensoriales de la córnea tras su lesión quirúrgica y su relación con la edad	Inglés: Functional and morphological changes in the sensory fibers of the cornea after its surgical injury and its relationship with age
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: FEDERICO BECH DIAZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

### RESUMEN (en español)

La córnea es la superficie tisular con mayor inervación del organismo. Sus terminaciones nerviosas sensoriales proceden de neuronas del ganglio trigémino y están especializadas en la detección de diferentes modalidades de estímulos ambientales. La PRK es una técnica quirúrgica frecuentemente empleada para la corrección de los defectos de refracción en la que se produce una lesión de los nervios corneales, que puede ir acompañada por una disminución de la sensibilidad corneal, alteraciones en la lagrimación y sintomatología de la enfermedad de ojo seco. Sin embargo, el grado y evolución del daño causado a las terminaciones corneales con la PRK no ha sido bien estudiados. Esta tesis describe, en ratones jóvenes y viejos, los cambios funcionales y morfológicos que tienen lugar tras la PRK en las terminaciones nerviosas corneales y las alteraciones paralelas de la lagrimación, así como los efectos resultantes de la eliminación del canal termorreceptor de frío TRPM8.

Tras realizar en córneas de ratones jóvenes y viejos *wild type* (WT) una lesión que eliminó el epitelio y parte del estroma corneal mediante un láser excímer se estudió los cambios en la morfología y las propiedades funcionales de terminaciones periféricas de las diferentes poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal, así como la secreción lagrimal a distintos tiempos de la lesión. El mismo análisis morfo-funcional se repitió en ratones jóvenes y viejos, que carecen del canal TRPM8 (TRPM8 KO).

Los resultados obtenidos muestran que, en ratones jóvenes inmediatamente después de la lesión la inervación en la zona lesionada había desaparecido. La densidad de fibras nerviosas se recuperó progresivamente, aunque 60 días tras la PRK seguía siendo incompleta. Los termorreceptores de frío fueron los primeros en recuperar actividad nerviosa, 7 días después de la lesión. Sin embargo, los nociceptores polimodales del área lesionada no lo hicieron hasta 30 días después de la PRK. Los efectos sobre los nervios de la lesión no se restringían al área dañada, sino que alteraban también las características funcionales de las terminaciones fuera de ésta, especialmente las



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

termorreceptoras de frío. Tras la lesión, la lagrimación disminuyó, empezando a recuperarse 7 días después y alcanzando a los 60 días, valores similares a los controles.

Los ratones viejos WT sin lesionar tienen alteraciones espontáneas del epitelio corneal. La densidad de fibras sensoriales corneales en ellos fue inferior a la de los jóvenes. La lesión alteró las características funcionales tanto de los termorreceptores de frío, como de los nociceptores polimodales y los mecano-nociceptores. Tras la PRK, la recuperación de la densidad de fibras sensoriales corneales en los ratones viejos es más lenta que en los jóvenes. Al igual que en estos, los efectos de la PRK no se restringen al área lesionada y afectan también a las características funcionales de las terminaciones nerviosas de la periferia. La lagrimación basal solo se redujo con la PRK en los ratones viejos y no en los jóvenes.

En los ratones TRPM8 KO, las fibras termorreceptoras de frío privadas del canal TRPM8 son finas y sin varicosidades, tanto en los jóvenes como en los viejos. En ellos no se pudo registrar la actividad típica de los termorreceptores de frío canónicos, pero sí de terminaciones nociceptoras polimodales y mecano-nociceptoras. Además, se encontraron terminaciones nerviosas que incrementaban su actividad o cambiaban su patrón de disparo con el enfriamiento. La lagrimación basal de los ratones jóvenes TRPM8 KO está reducida en comparación con los WT. Sin embargo, los ratones viejos sí presentan una secreción lagrimal aumentada. El bloqueo farmacológico del canal TRPV1, redujo la tasa de lagrimación al 50%.

Este trabajo describe, en ratones jóvenes y viejos, los cambios que produce la PRK sobre la morfología y la función de los diferentes tipos de terminaciones sensoriales corneales y la secreción lagrimal, así como su curso temporal en el periodo post-quirúrgico. Además, amplía el conocimiento de las características morfológicas y funcionales de los nervios corneales, al analizar la influencia sobre morfología y función de las terminaciones corneales y sobre la secreción lagrimal, del envejecimiento y de la eliminación genética del canal TRPM8, el principal transductor de los termorreceptores de frío.

#### **RESUMEN (en Inglés)**

The cornea is the most innervated surface of the body. Its nerve supply is provided by trigeminal ganglion neurons specialized in the detection of different modalities of environmental stimuli and classified as mechano-nociceptor, polymodal nociceptor and cold thermoreceptor neurons. PRK, a frequently used surgical technique for the correction of refractive errors that involves partial destruction of corneal superficial nerves and is accompanied by a decrease of corneal sensitivity, transient tearing alterations and in some patients, dysesthesias and dry eye disease symptoms. The correspondence between these symptoms and the level, time course and functional changes in corneal nerves following PRK has not been studied in detail. The aim of this doctoral thesis was to analyze the morphological and electrophysiological characteristics



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

of the different functional classes of corneal nerve in young and old mice, and in mice where the expression of the TRPM8 in cold thermoreceptor neurons was deleted by genetic manipulation. Changes in the architecture and function of the different classes of corneal nerve terminals and tear production disturbances were studied at different times after performing an excimer laser corneal ablation that removed the epithelium and a fraction of the corneal stroma, mimicking human PRK.

Immediately after injury in young mice, innervation in the injured area in the central cornea disappeared. Axonal regeneration in this damaged area progressively restored corneal nerve density, although 60 days after PRK it remained incomplete in comparison. Cold thermoreceptors were the first nerve terminal functional type to recover nerve impulse activity in the injured area, 7 days after the injury. In contrast, functional polymodal nociceptor terminals did not reappear in the injured area until 30 days after PRK. The morphological and functional disturbances were not restricted to the damaged area, but extended to the surrounding, intact cornea, affecting in particular cold thermoreceptors. After injury, tearing rate decreased beginning to recover 7 days later and reaching values similar to the controls 60 days after injury.

In aged (24 months) spontaneous alterations of the corneal epithelium were often observed. Their density of corneal sensory fibers was lower than in young mice. After PRK injury, recovery of corneal nerve density was also slower. Disturbances of cold thermoreceptor, polymodal nociceptor and mechanonociceptor activity were more pronounced than in young mice and PRK were not restricted to nerve terminals of the injured area but also affected the functional characteristics of corneal nerve endings outside the injured area. Their tearing rate in old mice was high before surgery and was not reduced as in young mice by PRK aged mice.

In TRPM8 KO young and aged mice, immunocytochemically identified cold thermoreceptor axons were thin and without beads. They were electrophysiologically silent and not recruited by cooling. Still, a few nerve terminals exhibiting spontaneous activity responded to cooling, either increasing their background frequency or changing their bursting firing pattern. Identified mechano- and polymodal nociceptor terminals responded as those of WT mice. Tearing rate of young TRPM8 KO mice was low compared to WT mice. However, TRPM8 KO old mice exhibited high tearing rate, similar to the WT animals of the same age. Blocking of the TRPV1 channel with an antagonist reduced 50% the tear rate of TRPM8 KO old mice, suggesting that the augmented tearing was mediated by nociceptor fibers.

Altogether, this work provides new information regarding the consequences of nerve injury produced by PRK on the morphology and functional properties of the different types of corneal sensory nerve terminals and basal tearing rate, as



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

well as the evolution with time of these disturbances in young and aged mice. Moreover, it expands the knowledge of the morphological and functional characteristics of the corneal nerves by analyzing the influence of aging and of genetic deletion of TRPM8 channels the main transducer channel of cold thermoreceptors, on the structure and function of the different classes of corneal nerve fibers.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN CIENCIAS DE LA SALUD**

## **Agradecimientos**

Quiero empezar agradeciendo este trabajo a mis padres, sin vuestros consejos, vuestra paciencia y vuestro apoyo, nada de esto habría sido posible.

Un agradecimiento especial para mis directores de tesis, sin vosotros esta tesis doctoral no habría prosperado. Al Profesor Jesús Merayo, por iniciarme en el mundo de la ciencia y darme su confianza para trabajar en ella. Y al Profesor Carlos Belmonte, por ser un excelente científico y excelente mentor. Ambos, habéis conseguido moldearme y hacerme crecer como científico y persona.

A mis compañeras y compañeros de la Fundación de Investigación Oftalmológica (Héctor, Joana, Montse, Lidia, Mairobi, Claudia, Paola) y del Instituto de Neurociencias de Alicante (Quique, Deli, Laura, Fernando, Ari, Víctor, Susana, Carolina, M<sup>a</sup> Carmen y Juana), por enseñarme, por ayudarme, por compartir las penas y las glorias, por aguantarme y por acompañarme en este viaje.

A mis amigos, Bernat, Mariano, Borja, Fran, Josu, Patricks, Almudena y Enol, por compartir las cervezas, las penas, hacerme reír, disfrutar y hacer que este trabajo se hiciera más llevadero. A Deya, por aguantarme, por seguirme, por apoyarme, por hacerme mejor, y sobre todo por quererme.

Y por último y no menos importante a Omar, por meterme en el mundo de la electrofisiología, por todas las horas de trabajo juntos, por pelear las mismas batallas y por convertirte en un gran amigo.

## Listado de Abreviaturas

ABC: avidina-biotina-peroxidasa

Ag: plata

AgCl: cloruro de plata

AITC: isotiocianato de alilo

BCTC: 4-(3-cloro-2-piridinil)-N-[4-(1,1-dimetiletil) fenil]-1piperazincarboxamida

BSA: albumina bovina fetal

Ca<sup>2+</sup>: calcio

CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CMR1: receptor de mentol 1

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

DAPI: 4', 6'-diamidino-2-phenylidole

DMSO: dimetil-sulfóxido

DRG: ganglios raquídeos

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGFP: proteína fluorescente verde aumentada

GFP: proteína verde fluorescente

HB-HT: high background-high threshold

HB-LT: high background-low threshold

HB: high background

HCN: hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide-modulated

Ig: inmunoglobulina

Ins: coteza insular

K<sup>+</sup>: potasio

K<sub>2P</sub>: canales de potasio de dominio de dos poros

Kir: canales de potasio rectificadores

KO: knock-out

Kv: canales de potasio dependientes de voltaje



LB-HT: low background-high threshold  
LB-LT: low background-low threshold  
LB: low background  
LH: hipotálamo lateral  
MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio  
Na<sup>+</sup>: sodio  
NaCl: cloruro de Sodio  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: sodio di-hidrógeno fosfato  
NaHCO<sub>3</sub>: sodio hidrógeno carbonato  
NTIs: impulsos nerviosos en terminaciones  
NTS: núcleo del tracto solitarius  
O<sub>2</sub>: oxígeno  
PAG: substancia gris periaqueductal  
PBS: tampón fosfato salino  
PO: grupo nuclear posterior del tálamo  
PRK: queratectomía fotorrefractiva  
TBNC: complejo nuclear trigeminal espinal  
TG: ganglio trigémino  
TRP: transient receptor potential  
TRPA1: transient receptor potential ankyrin 1  
TRPM8: transient receptor potential melastatin 8  
TRPV1: transient receptor potential vanilloid 1  
TRPV4: transient receptor potential vanilloid 4  
Vi/C1: subnúcleos caudales y alta médula espinal cervical  
Vi/Vc: subnúcleos caudales e interpolaris  
Vm: potencial de membrana plasmática  
VPM: núcleos talámicos ventrales posteromediales  
WT: silvestre (wild type)

## Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>La córnea de ratón como modelo experimental para el estudio de los receptores somatosensoriales</b> .....	<b>4</b>
1.1. Anatomía corneal.....	4
1.2. Arquitectura de los nervios sensoriales corneales.....	7
1.3. Las vías centrales sensoriales de la inervación corneal.....	10
1.4. Características funcionales de la inervación sensorial ocular.....	12
1.5. Contribución de las neuronas sensoriales oculares a la percepción de la humedad ocular.....	30
1.6. Lesión de los nervios oculares.....	32
<b>II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	<b>36</b>
<b>Animales</b> .....	<b>36</b>
<b>Lesión nerviosa corneal a partir de la keratectomía fotorrefractiva (“Photorefractive Keratectomy”, PRK)</b> .....	<b>36</b>
<b>Evaluación de la cicatrización epitelial <i>in vivo</i></b> .....	<b>37</b>
<b>Tasa de lagrimación</b> .....	<b>38</b>
<b>Inmunohistoquímica de córnea entera</b> .....	<b>39</b>
Inmunofluorescencia.....	39
Método de ABC peroxidasa.....	39
<b>Adquisición de imágenes</b> .....	<b>40</b>
<b>Análisis morfológico</b> .....	<b>41</b>
Análisis morfológico de los ratones jóvenes y viejos WT C57BL/6 tras la cirugía PRK.....	41
Análisis morfológico de los ratones jóvenes y viejos TRPM8 KO.....	42
<b>Electrofisiología</b> .....	<b>44</b>
Protocolo experimental.....	45
Soluciones.....	46
Análisis de actividad de NTI.....	46
<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>48</b>
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>

<b>A) EFECTO DE LA LESIÓN QUIRÚRGICA (QUERATECTOMÍA FOTORREFRACTIVA, PRK) SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA FUNCIÓN DE LOS NERVIOS CORNEALES .....</b>	<b>49</b>
<b>A1) RATONES JÓVENES .....</b>	<b>49</b>
<b>A1.1 Densidad de la inervación y proporción de los diferentes tipos funcionales de receptores en la córnea de ratones intactos. ....</b>	<b>49</b>
<b>A1.2. Cambios en la densidad de inervación e incidencia porcentual de los diferentes tipos funcionales de receptores en ratones operados, a distintos tiempos tras la cirugía PRK .....</b>	<b>54</b>
A1.2.1 Evolución macroscópica de la lesión corneal.....	54
A1.2.2. Modificaciones morfo-funcionales de la inervación corneal.....	55
A1.2.2.1 <i>Inmediatamente post-Lesión (T0)</i> .....	55
A1.2.2.2. <i>3 días post-Lesión (T3)</i> .....	58
A1.2.2.3. <i>7 días post-Lesión (T7)</i> .....	61
A1.2.2.4. <i>15 días post-Lesión (T15)</i> .....	63
A1.2.2.5. <i>30 días post-Lesión (T30)</i> .....	66
A1.2.2.6. <i>60 días post-Lesión (T60)</i> .....	68
<b>A1.3. Cambios en las características funcionales de los distintos tipos de terminaciones sensoriales de la córnea evocados por la PRK.....</b>	<b>72</b>
A1.3.1 Termorreceptores de frío .....	72
A1.3.2. Mecano-nociceptores y nociceptores polimodales.....	77
<b>A1.4. Efecto de la PRK sobre la tasa de lagrimación .....</b>	<b>79</b>
<b>A2) RATONES VIEJOS .....</b>	<b>81</b>
<b>A2.1 Densidad de la inervación y la proporción de los diferentes tipos funcionales de receptores en la córnea de ratones viejos intactos .....</b>	<b>81</b>
<b>A2.2. Cambios en la densidad de inervación e incidencia de los diferentes tipos funcionales de receptores en ratones viejos operados, a los distintos tiempos tras la cirugía PRK .....</b>	<b>84</b>
A2.2.1. Evolución macroscópica de la lesión corneal.....	84
A2.2.2. Modificaciones morfo-funcionales de la inervación corneal.....	85
A2.2.2.1. <i>15 días post-Lesión (T15)</i> .....	85
A2.2.2.2. <i>30 días post-Lesión (T30)</i> .....	88
A2.2.2.3. <i>60 días post- Lesión (T60)</i> .....	93

<b>A2.3 Cambios en las características funcionales de los distintos tipos de terminaciones sensoriales de la córnea evocados por la PRK.....</b>	<b>97</b>
A2.3.1 Termorreceptores de frío .....	97
A2.3.2 Mecano-nociceptores y Nociceptores polimodales .....	101
<b>A2.4. Tasa de lagrimación.....</b>	<b>103</b>
<b>B) EFECTO DE LA ELIMINACIÓN GENÉTICA DEL CANAL TRPM8 SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA FUNCIÓN DE LAS FIBRAS SENSORIALES CORNEALES.....</b>	<b>106</b>
<b>B1) Morfología de la inervación corneal en los ratones TRPM8 KO .....</b>	<b>106</b>
B1.1. Ratones jóvenes.....	106
B1.2. Ratones viejos.....	107
<b>B2) Características funcionales de los axones TRPM8 KO.....</b>	<b>111</b>
B2.1. Ratones jóvenes.....	111
B2.2. Ratones viejos.....	112
<b>B3) Tasa de lagrimación en los ratones TRPM8 KO .....</b>	<b>116</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>119</b>
<b>Características de las terminaciones sensoriales corneales de los ratones jóvenes .....</b>	<b>119</b>
Termorreceptores de frío.....	120
Nociceptores polimodales y mecano-nociceptores.....	122
<b>Características de las terminaciones sensoriales corneales de los ratones viejos</b>	<b>123</b>
<b>Efecto de la queratectomía fotorrefractiva sobre la morfología y función de los nervios corneales.....</b>	<b>125</b>
Ratones jóvenes.....	125
Ratones viejos.....	129
<b>Relación entre secreción lagrimal e inervación corneal .....</b>	<b>130</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>134</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>136</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>160</b>



## I. INTRODUCCIÓN

El sistema somatosensorial es el responsable de generar las percepciones conscientes de tacto, presión, sentido de posición, movimiento, dolor y temperatura, así como, de un gran número de respuestas no conscientes motoras y autonómicas, con el objetivo de mantener el equilibrio del medio interno (homeostasis) frente a las continuas oscilaciones del ambiente (Revisión Mountcastle 1968).

Las estructuras encargadas de detectar los cambios de energía que ocurren en el medio ambiente, tanto interno como externo, son los receptores sensoriales periféricos. Estos transforman los estímulos en una descarga de señales eléctricas que conducen al cerebro la información sobre la naturaleza, intensidad, curso del tiempo y localización del estímulo (Adrian 1926). Esta información es procesada por una compleja red de neuronas sensoriales especializadas, circuitos y vías que constituyen, todas juntas, la división somatosensorial del sistema nervioso.

Los receptores somatosensoriales son aquellos que inervan la superficie de los tejidos corporales, las estructuras musculares y óseas, incluyendo los exteroceptores, que se distribuyen por la superficie del cuerpo y aportan información en relación a los cambios del ambiente inmediato y los propioceptores que se encuentran en los músculos, tendones, fascias y articulaciones, y que aportan la información relacionada con los movimientos en tres dimensiones y la posición del cuerpo en el espacio.

Las diferentes modalidades de estímulo son traducidas a señales eléctricas por receptores específicos somatosensoriales, donde producen una despolarización local de la membrana plasmática, que se denomina "potencial de receptor". Este a su vez genera una descarga de potenciales de acción conducidos, cuya frecuencia codifica las características espaciales y temporales del estímulo. Este proceso se denomina "transducción sensorial" (Belmonte & Cervero 1996). En los mamíferos, cada tipo funcional de receptor responde preferentemente a una o pocas formas de energía (mecánica, térmica o química) lo que constituye la base de la especificidad sensorial (Block 1992).

Los termorreceptores responden a cambios en la temperatura, ya sea calor o frío; los mecanorreceptores son activados por fuerzas mecánicas (presión, tracción, vibración), de intensidad variable y los nociceptores responden a estímulos dañinos. Las fibras nerviosas que forman los receptores sensoriales son normalmente clasificadas basándose en su velocidad de conducción de los potenciales de acción, determinada por su grosor y la presencia de mielina.

Los procesos de transducción implican la producción por el estímulo de cambios conformacionales de las proteínas de membrana (proteína receptora o canal iónico) que conducen, directamente o indirectamente a través de vías intracelulares de señalización, a la apertura y/o cierre de los canales iónicos localizados en la membrana receptora dando lugar de ese modo al potencial de receptor (Widmaier et al. 2006).

El punto en el cual se inicia el potencial de acción no se localiza físicamente en la misma área de la membrana del axón en donde se genera el potencial de receptor, sino en una zona del axón específica, conocida como el "sitio de inicio del potencial de acción". Una de las características especiales de esta región es su alta expresión de canales de sodio dependientes de voltaje. Una vez que el potencial de receptor alcanza el sitio de iniciación, el potencial de acción se genera como una respuesta de "todo o nada" (Gray & Sato 1953).

La codificación del estímulo específico en una descarga de impulsos nerviosos por los diferentes tipos funcionales de receptores sensoriales (mecanorreceptores de alto o bajo umbral, receptores térmicos, nociceptores, fotorreceptores, electrorreceptores o quimiorreceptores) fueron esencialmente definidos en la segunda mitad del siglo XX (Adrian 1926; Zotterman 1936; Hunt & McIntyre 1960; Mountcastle 1968). Recientemente, se han conseguido grandes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la transducción de estímulos, inicialmente por los fotorreceptores y por los quimiorreceptores (en particular gustativos y olfativos) (Lamb 2013) y más recientemente por los mecanorreceptores, nociceptores y, termorreceptores somatosensoriales (Belmonte & Cervero 1996). La mayor dificultad en el estudio de estos últimos se debe principalmente al pequeño tamaño de sus terminaciones nerviosas periféricas (donde, en condiciones normales, ocurren los procesos de transducción) lo que impide la aplicación, a dichas terminaciones

nerviosas sensoriales de los métodos de registro biofísicos convencionales en neuronas. Parte de esta dificultad técnica se ha superado utilizando los cuerpos celulares de las neuronas procedentes de los ganglios sensoriales, raquídeos o cefálicos. Además, la identificación y clonación de las proteínas de los canales iónicos de receptores somatosensoriales asociados a la transducción de fuerzas diferentes, como es el caso de algunos miembros de la superfamilia de canales iónicos TRP, está ayudando mucho a la comprensión de los mecanismos de transducción por los receptores somatosensoriales de cambios de temperatura, agentes químicos o fuerzas mecánicas (Montell 2003; Dhaka et al. 2006; Bandell et al. 2007; Belmonte & Viana 2008; Basbaum et al. 2009; Gees et al. 2012).

El desarrollo de ratones modificados genéticamente, en los que es posible eliminar selectivamente los genes asociados a los diferentes eventos implicados en la transducción ha representado un avance importante para la comprensión de las bases moleculares de la transducción sensorial (Julius & Nathans 2012). El análisis de los cambios en la transducción y en la codificación del estímulo, resultantes de la manipulación genética de proteínas asociadas a la transducción de estímulos mecánicos inocuos o dolorosos, térmicos y químicos ha sido llevado a cabo mediante el uso de técnicas morfológicas, biofísicas, bioquímicas y de comportamiento. Sin embargo, mientras que los estudios de los procesos que sustentan la transducción sensorial en animales manipulados genéticamente con técnicas inmunocitoquímicas, imagen de calcio, registros intracelulares en neuronas sensoriales o respuestas conductuales en animales a estimulaciones sensoriales específicas son abundantes, los registros electrofisiológicos de los axones sensoriales en animal entero o en preparaciones de órganos de ratones manipulados genéticamente, son comparativamente escasos.

Por ello, en los sistemas sensoriales, quedan todavía por definir en detalle muchos de los mecanismos moleculares implicados en la transducción y codificación de los estímulos de cada modalidad sensorial. Esto es particularmente cierto para las neuronas somatosensoriales primarias implicadas en la detección de estímulos inocuos o nocivos, térmicos, químicos que evocan finalmente sensaciones de temperatura y dolor. La córnea del ojo constituye un modelo simple y accesible para el análisis de estas preguntas científicas.



## **La córnea de ratón como modelo experimental para el estudio de los receptores somatosensoriales**

La córnea del ojo es la estructura del organismo más ricamente inervada por fibras nerviosas sensoriales. Es un órgano transparente y avascular que juega un papel fundamental en el proceso de la visión, al ser la estructura de mayor poder refractivo en el sistema de refracción del ojo. La córnea cumple otros papeles además de conducir la luz hasta la retina (Nishida 2008), ya que actúa como una barrera física protectora entre las delicadas estructuras intraoculares y el ambiente externo (Nichols et al. 1983); de ahí su abundante inervación sensorial. Está cubierta, además, por una película de lágrima que ayuda a mantener el epitelio corneal húmedo y transparente, permitiendo el intercambio de gases, la limpieza de detritus. La córnea protege al ojo de la invasión por bacterias y virus (Walcott 1998) al constituir un tejido inmunogénico para la lucha contra microorganismos invasores y sustancias foráneas.

### **1.1. Anatomía corneal**

Aunque se han descrito diferencias morfo-funcionales ligeras entre las córneas analizadas en un gran número de especies animales, en particular en mamíferos, la estructura, inervación y papel fisiológico de la córnea son comunes a todas ellas (Whitear 1960; Payrau et al. 1967; Nichols et al. 1983). De manera esquemática, la córnea está formada por las siguientes capas:

- **Epitelio anterior:** es un epitelio pluriestratificado plano, no queratinizado, situado sobre una membrana basal acelular y relativamente gruesa (presente únicamente en humanos, primates, aves y reptiles, denominándose capa o membrana de Bowman,)
- **Estroma:** formado fundamentalmente por una matriz de colágeno y proteoglicanos, en la que se encuentran inmersos los queratocitos, células muy poco activas con citoplasma reducido y hialinos y largas prolongaciones citoplasmáticas.
- Epitelio posterior o **endotelio** corneal: compuesto por un epitelio monoestratificado, plano dotado de una gruesa membrana basal (Membrana de Descemet).

El grosor de la córnea no es homogéneo. En humanos, es más delgado en el ápex (alrededor de 0.52 mm) y más grueso cerca del limbo (alrededor de 0.67 mm). Cuando se compara con otros mamíferos más pequeños, la córnea de ratón es de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de grosor, de los cuales 30  $\mu\text{m}$  corresponden al epitelio y 65  $\mu\text{m}$  al estroma (Whitear 1960) y aunque el grosor de la córnea aumenta en mamíferos mayores, la proporción entre el espesor de estas regiones se mantiene (Reichard et al. 2010).

Como ya se ha mencionado previamente, la característica más relevante de la córnea es su transparencia. Para conseguirla, el estroma corneal carece de vasos sanguíneos. El hecho de que sea una estructura avascular no implica el desabastecimiento de nutrientes y factores tróficos. Estos llegan al tejido desde la película lagrimal que recubre de forma continua el epitelio, mediante el transporte activo de sustancias del humor acuoso por parte de las células endoteliales, o a través de las fibras nerviosas que recorren la córnea (la córnea es el órgano con mayor densidad de terminaciones nerviosas por unidad de superficie). Además, las fibras nerviosas presentes en la córnea no tienen recubrimiento de mielina para facilitar la transparencia (Ross et al. 2006; Marfurt et al. 2010).

La inervación sensorial del globo ocular proviene principalmente de las neuronas sensoriales primarias de pequeño y mediano tamaño, agrupadas en la región oftálmica medial del ganglio trigémino ipsilateral (TG). Estimaciones en ratones, ratas, gatos y monos indican que alrededor del 2% del total de las neuronas del TG inervan la superficie ocular (Zander & Wedell 1951; Riley et al. 2001; Nagasaki & Zhao 2003; Marfurt et al. 2010). Los axones pseudounipolares de las neuronas trigeminales se dividen en una rama periférica, que proyecta a los tejidos periféricos y una central que entra en el tronco cerebral para terminar en el complejo nuclear trigeminal espinal. De acuerdo con la presencia y espesor de la vaina de mielina de sus axones periféricos, las neuronas se clasifican en mielínicas (20% en el ratón) y amielínicas (80% en el ratón) (Belmonte et al. 1997; De Felipe & Belmonte 1999).

Las ramas periféricas de las neuronas sensoriales oculares del TG viajan por su división oftálmica, que atraviesa la fisura superior orbital y luego se ramifica en los nervios nasociliares, frontales y lagrimales (**Figura 1**). Los nervios

nasociliares se dividen a su vez en varias ramas; 1) los nervios ciliares largos que alcanzan el globo ocular por la esclera; 2) el nervio infratroclear que inerva la parte medial del párpado, la nariz, y el saco lagrimal; 3) los nervios nasales externos; 4) una rama comunicante con el ganglio ciliar. El ganglio ciliar es un ganglio parasimpático localizado dentro de la órbita que envía 5-10 nervios ciliares cortos llevando fibras parasimpáticas postganglionares, simpáticas y sensitivas. Estos nervios ciliares cortos mixtos entran en el globo ocular alrededor del nervio óptico. La segunda rama del nervio oftálmico es el nervio frontal, que se bifurca en el nervio supraorbital que inerva el párpado superior, el seno frontal y el nervio supratroclear que proporciona inervación a la frente y al párpado superior. Finalmente, la tercera rama del nervio oftálmico, el nervio lagrimal, inerva la glándula lagrimal y algunas áreas de la conjuntiva y de la piel del párpado superior (Zander & Wedell 1951; ten Tusscher et al. 1989; Oduntan & Ruskell 1992; May 1997; Oduntan 2005).

Una parte minoritaria de las fibras sensoriales del ojo llega, junto con la inervación de la conjuntiva y la piel del párpado inferior, por el nervio infraorbital, una rama del nervio maxilar (que constituye la segunda mayor rama del TG).

Las fibras del TG terminan en el epitelio, el tejido conectivo y vasos sanguíneos de los párpados, órbita, músculos extraoculares, cuerpo ciliar, coroides, esclera, córnea y conjuntiva. Solo el cristalino carece de inervación.

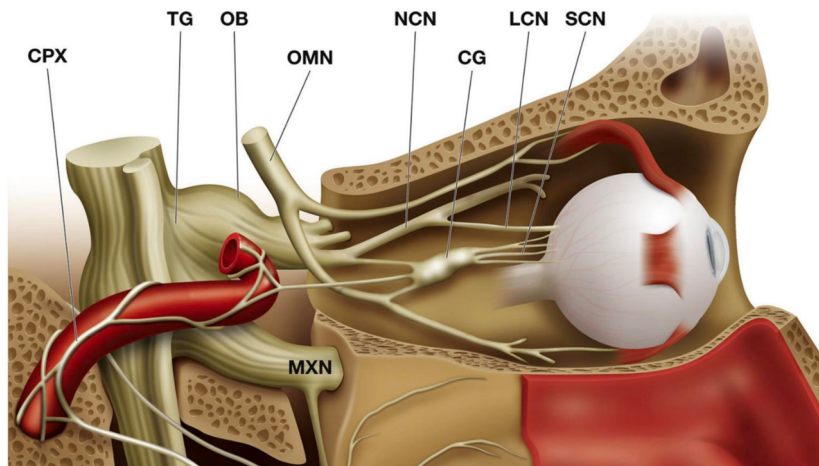


Figura 1. Representación gráfica medial de la órbita, mostrando la inervación ocular sensorial y autonómica. Se ha eliminado la glándula lacrimal para tener una visión más clara. La rama oftálmica (OB) del ganglio trigémino (TG) da el nervio nasociliar (NCN) que se proyecta los nervios ciliares largos (LCN) y cortos (SCN) hacia el globo ocular. Las fibras simpáticas del ganglio cervical superior, viajan en el plexo carotídeo (CPX) y las ramas parasimpáticas del ganglio ciliar (CG) y del ganglio pterigopalatino (PPG) se unen a los nervios ciliares cortos. OMN: Nervio oculomotor; MXN: Nervio maxilar. (Belmonte et al. 2017)

## 1.2. Arquitectura de los nervios sensoriales corneales

En animales, aproximadamente el 20-30% de los axones que abastecen la córnea son escasamente mielinizados (A $\delta$ ) y el resto son no mielinizados (fibras C) (De Felipe & Belmonte 1999; Bron et al. 2014). La inervación corneal se organiza en cuatro niveles que van desde los haces nerviosos que penetran el estroma hasta las terminaciones nerviosas intraepiteliales (**Figura 2**).

Los nervios estromales corneales, entran en haces nerviosos radialmente por el estroma corneal. Estos se ramifican inmediatamente después de entrar en la córnea y se dirigen por el estroma como fascículos encapsulados por una lámina basal y células de Schwann. Los axones mielinizados incluidos en los nervios estromales (20%) pierden la vaina de mielina aproximadamente un milímetro

después de entrar en el estroma (Belmonte et al. 2017). Las ramas distales de su arborización anastomosan extensivamente, formando el plexo nervioso estromal anterior, una compleja y densa red de intersecciones de haces nerviosos de pequeño y medio tamaño y axones individuales sin una orientación preferente que permanecen en el 25-50% del estroma corneal, dependiendo de las especies. Contrariamente, la parte posterior del estroma y el endotelio corneal quedan desprovistos de fibras nerviosas sensoriales (Belmonte et al. 2017).

En humanos y mamíferos, se denomina plexo nervioso subepitelial a una capa más superficial del plexo nervioso estromal anterior, localizada en una banda estrecha del estroma, inmediatamente por debajo de la lámina basal (Membrana de Bowman, en los organismos que la tienen), que es especialmente tupida, con densidad generalmente superior en la periferia respecto al centro de la córnea. Se distinguen anatómicamente dos tipos de haces nerviosos. Unos forman mallas con una alta anastomosis entre axones únicos o pequeños fascículos localizados inmediatamente por debajo de la lámina basal, sin penetrar en el epitelio corneal. El segundo tipo lo forman haces de mediano tamaño, curvilíneos que penetran la lámina basal en los ratones (o membrana de Bowman), principalmente en la periferia y en la córnea intermedia, cubiertos por una capa de células de Schwann, formando un ángulo de 90° y dividiéndose después, cada uno de ellos, en 2-20 fascículos nerviosos delgados que continúan hacia el epitelio corneal formando el plexo nervioso subbasal (Marfurt et al. 2010; Belmonte et al. 2017).

Los haces nerviosos subbasales dan varias ramas, conteniendo 3-7 axones individuales cada una. Estos nervios subbasales viajan entre las células epiteliales basales y sobre su lámina basal formando largos fascículos nerviosos "hijos", paralelos y múltiples y constituyendo estructuras neuroanatómicas características de la córnea, denominadas "*leashes*" (cintas o correas en español). Las fibras nerviosas en cinta adyacentes se interconectan repetidamente, formando un plexo nervioso relativamente homogéneo. El plexo nervioso subbasal forma en la porción más apical de la córnea un remolino con un patrón en espiral denominando "vórtex" (May & Porter 1998; De Felipe & Belmonte 1999; Marfurt et al. 2010).

Las terminaciones nerviosas intraepiteliales proceden de los nervios subbasales que viajan horizontalmente a través del epitelio basal, y son fibras únicas que viran 90° verticalmente entre las células epiteliales como axones terminales, delgados, cortos y arrosariados, normalmente ramificándose poco, hasta alcanzar las capas más superficiales de la córnea (Belmonte et al. 2017). Las fibras intraepiteliales acaban como terminaciones nerviosas libres, como expansiones prominentes, bulbosas y morfológicamente homogéneas cuando se observan con microscopía electrónica. Las tinciones inmunohistoquímicas revelan, sin embargo, diferencias en la expresión de neuropéptidos y otros neurotransmisores en ellas, lo que sugiere una heterogeneidad funcional (Belmonte et al. 2017).

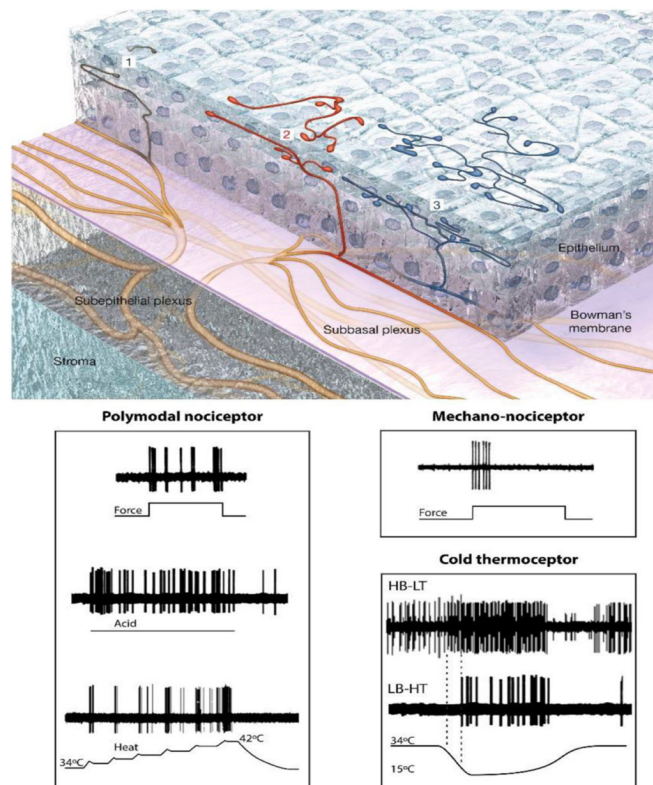


Figura 2. Reconstrucción de las terminaciones superficiales corneales de ratón, mostrando ejemplos terminaciones nerviosas simples (1, negro), ramificados (2,

*rojos) y complejos (3, azul) y de la actividad de impulsos nerviosos registrada de los distintos tipos funcionales de terminaciones corneales en respuesta a sus estímulos específicos (Belmonte et al. 2017)*

### **1.3. Las vías centrales sensoriales de la inervación corneal**

La información sensorial de los ojos (**Figura 3**) es llevada por las neuronas trigeminales hacia la porción ventral del complejo nuclear trigeminal espinal (TBNC), para activar las neuronas sensoriales oculares de segundo orden localizadas principalmente en la zona intermedia entre los subnúcleos *interpolaris* y *caudalis* (Vi/Vc), en la lámina I-II de los subnúcleos caudalis/y alta médula espinal cervical (Vc/C1) y en la formación adyacente bulbar lateral reticular (Zander & Wedell 1951; ten Tusscher et al. 1989; Oduntan & Ruskell 1992). Adicionalmente, unas pocas neuronas trigeminales inervando los tejidos oculares y perioculares, proyectan hacia el núcleo principal del TBNC, y un número también muy reducido está confinado a unas pocas localizaciones a lo largo del borde ventral de las *pars oralis* e *interpolaris* de los núcleos trigeminales bulbares. Las neuronas oculares de segundo orden localizadas en el área Vi/Vc proyectan a diferentes regiones del sistema nervioso central incluyendo tronco cerebral, como los núcleos superiores motores facial/salivatorio y el tálamo contralateral (Oduntan 2005; Callejo et al. 2015), donde las neuronas que reciben la información corneal han sido identificadas en los núcleos talámicos posteriores y en la zona incierta. Estas neuronas talámicas proyectan a su vez en las áreas somatosensoriales corticales primarias (S1) y secundarias (S2), responsables de las sensaciones de dolor y las respuestas emocionales y autonómicas

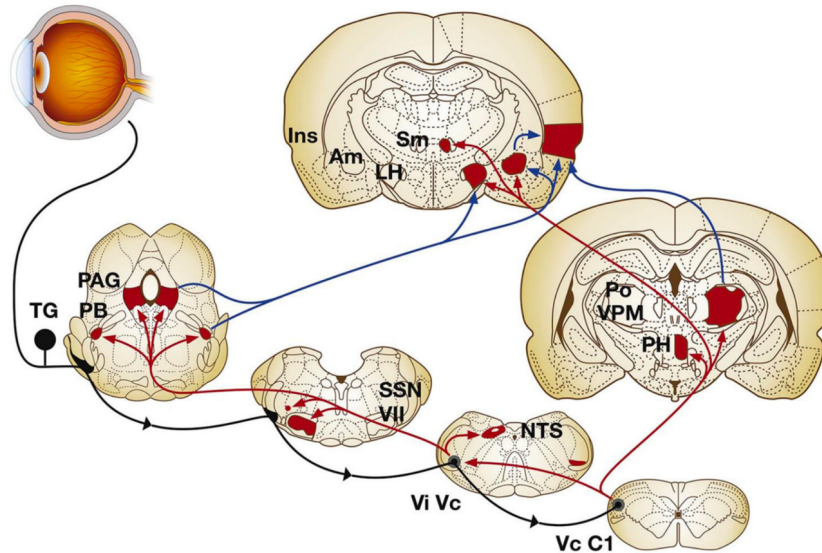


Figura 3. Vías ascendentes de las fibras sensoriales trigeminales. El soma celular de las fibras sensoriales se encuentra en el ganglio trigeminal y proyectan centralmente para terminar espacialmente en dos regiones discretas complejo nuclear trigeminal espinal, la región de transición de los subnucleos trigeminales interpolaris/caudalis (Vi/Vc) y la unión caudalis/ en la alta médula espinal cervical (Vc/C1). Las neuronas oculares de segundo orden en Vi/Vc y en Vc/C1 proyectan a las regiones cerebrales que median el parpadeo (núcleos motores faciales, VII), la lagrimación (núcleos salivales superiores, SSN) y los reflejos cardiovasculares (núcleos del tracto solitario, NTS). Las proyecciones a centros superiores como la sustancia gris periaqueductal (PAG), PBA (PB), el hipotálamo lateral (LH) y la amígdala (Am) contribuyen a la afectación y modulación de aspectos del dolor ocular, mientras que las proyecciones al tálamo posterior (grupo nuclear posterior, PO; núcleos ventrales posteromediales, VPM) y la corteza insular (Ins) median los aspectos sensoriales discriminativos. Existe un pequeño grupo de neuronas oculares que se encuentran en la región Vi/Vc contralateral; la fuente de input sensorial de este grupo no está bien definido. Las fibras aferentes están pintadas en negro, las proyecciones de segundo orden en rojo y las proyecciones de tercer orden en azul (Belmonte et al. 2017)



#### **1.4. Características funcionales de la inervación sensorial ocular**

La capacidad de respuesta de las terminaciones periféricas de los axones sensoriales de los tejidos somáticos a las diferentes modalidades de estímulo físico y químico, ha sido usadas también para distinguir las diferentes clases funcionales de fibras nerviosas sensoriales que inervan los tejidos oculares.

##### **1.4.1. Nociceptores polimodales**

Los nociceptores son neuronas sensitivas primarias especializadas en detectar estímulos intensos; forman una población de receptores que responden únicamente cuando los estímulos alcanzan niveles nocivos y/o casi nocivos, sirviendo para alertar al cuerpo de amenazas o de agentes ambientales potencialmente dañinos (Kumazawa 1996; Perl 1996; Belmonte & Cervero 1996).

El término nociceptor (Sherrington 1903) fue acuñado para enfatizar el hecho de que los estímulos específicos para estos tipos de receptores sensoriales son el daño tisular, causado por diferentes formas de energía actuando a intensidades lesivas.

Aproximadamente dos tercios de las fibras sensoriales que inervan la córnea y la conjuntiva bulbar se activan por estímulos químicos y físicos de una intensidad nociva o cercano al rango nocivo, incluyendo fuerzas mecánicas, calor, frío intenso, irritantes químicos exógenos y una gran variedad de moléculas endógenas que se liberan por los tejidos dañados, por células inflamatorias locales o migradas o que son liberadas desde los vasos sanguíneos limbales (Belmonte & Giraldez 1981; Belmonte et al. 1991, 2015; Gallar et al. 1993; MacIver & Tanelian 1993; Belmonte & Cervero 1996; Cillà et al. 2009; Kurbanyan et al. 2012; Hamrah et al. 2013; Alamri et al. 2015). Es por eso, que se denominan nociceptores polimodales. La mayoría son fibras sin mielinizar (C), mientras que una pequeña porción, dependiendo de las especies, pertenece al grupo de las fibras nerviosas escasamente mielinizadas, A $\delta$ . Sus campos receptores son redondos u ovalados y normalmente grandes, cubriendo hasta un cuarto o más de la córnea, pudiendo extenderse varios milímetros por debajo de la córnea hacia el limbo adyacente y la conjuntiva bulbar. El gran tamaño de los campos

receptores de los nociceptores polimodales y su solapamiento extenso, acoplado a los mecanismos de convergencia neuronal en el sistema nervioso central, explican la escasa capacidad de discriminación espacial consciente de los estímulos aplicados a la córnea (Belmonte et al. 2017).

Los nociceptores polimodales responden a sus estímulos naturales con una descarga de impulsos nerviosos (NTI) continúa e irregular, a una frecuencia groseramente proporcional a la magnitud de su estímulo, que persiste mientras se mantiene el estímulo, codificando por tanto su intensidad y duración. Una gran mayoría de los nociceptores polimodales responden a temperaturas superiores a 39-40°C y a estímulos mecánicos. Los nociceptores polimodales corneales pueden sensibilizarse por la repetición de estímulos de calor nocivos y por mediadores inflamatorios (Belmonte & Giraldez 1981; Belmonte et al. 1991; Gallar et al. 1993; González-González et al. 2017).

El descubrimiento de los mecanismos de transducción para los diferentes estímulos por los nociceptores polimodales empezó con la identificación del canal iónico TRPV1 (*transient receptor potential vailloid 1*) (Caterina et al. 1997). Este canal ha sido utilizado extensamente desde entonces como marcador molecular para los nociceptores polimodales. Se activa con capsaicina, pH bajo (pH 6), calor nocivo (>42°C) (Tominaga et al. 1998; Caterina et al. 1999; Davis et al. 2000), hiperosmolaridad (Straub 2014), 2014] muchos mediadores endógenos de la inflamación (Immke & Gavva 2006). Una característica funcional destacada de los nociceptores polimodales es la sensibilización, desarrollada cuando se produce inflamación después de una lesión tisular y se caracteriza por una reducción del umbral y una mayor capacidad de respuesta a la estimulación nociva, post-descarga y el desarrollo de la actividad espontánea (Perl 1996). Los ratones TRPV1 knock-out muestran respuestas alteradas a estos estímulos y una hipersensibilidad termal reducida en el contexto de la inflamación (Caterina et al. 1997). La capsaicina activa los polimodales nociceptores en la córnea (Belmonte et al. 1991; Chen et al. 1997; Gover et al. 2003) y su aplicación en humanos produce dolor ocular (Zollman et al. 2000). La activación de TRPV1 por calor, protones y mediadores inflamatorios aumenta la excitabilidad de los nociceptores polimodales (Immke & Gavva 2006).

Las fibras nociceptoras de frío responden únicamente cuando se alcanzan temperaturas bajas nocivas y se conocen como nociceptores de frío (Georgopoulos 1976, 1977; LaMotte & Thalhammer 1982). La existencia de esta población específica de nociceptores de frío se discute (Belmonte et al. 2009). El TRPV1 se expresa además de en los nociceptores, en otras terminaciones intraepiteliales del epitelio corneal (Guo et al. 1999; Murata & Masuko 2006; Alamri et al. 2015). Hay que destacar, además, que la expresión de TRPV1 no está restringida a los elementos neurales en el ojo, ya que se ha encontrado también en células de soporte de las diferentes capas de la córnea (Mergler et al. 2014).

Otros canales iónicos que confieren a los nociceptores polimodales su sensibilidad a los estímulos nocivos incluyen TRPA1, TRPV4 y ASICS (Belmonte & Viana 2008). En una fracción de ellos, la sensibilidad a la estimulación ácida permanece después del bloqueo completo del canal TRPV1 con capsacepina (Chen et al. 1997; Acosta et al. 2013), lo que es debido a la expresión de canales sensibles al ácido (ASICS), ya que las respuestas de los nociceptores polimodales corneales a soluciones de pH 6.6 son eliminadas mediante los bloqueantes de los canales ASICS (Callejo et al. 2015). El canal TRPA1 es un quimio-sensor extremadamente amplio (Bandell et al. 2004; Bautista et al. 2013). El TRPA1 se expresa en el TG y la instilación ocular del agonista del TRPV1, el aceite de mostaza, produce una activación de las neuronas del tronco encefálico trigeminal que se potencia en un modelo de ojo seco (Katagiri et al. 2015). La contribución de la activación de TRPA1 a la excitabilidad aumentada en los nociceptores polimodales por los mediadores inflamatorios parecen ser mucho más modestos que con el TRPV1 (Acosta et al. 2013).

#### **1.4.2. Mecanorreceptores**

Los mecanorreceptores se caracterizan por su sensibilidad preferencial a la fuerza mecánica. Han sido clasificados comúnmente basándose en su adaptación y umbral. Las fibras de rápida adaptación muestran una descarga fásica de impulsos nerviosos repentina al inicio y a veces al final de la estimulación durante la estimulación sostenida, mientras que los mecanorreceptores de adaptación lenta disparan mientras se mantenga el

estímulo (Mountcastle 1968). En el sistema sensorial, los mecanorreceptores responden a estímulos mecánicos suaves, como la presión moderada o la vibración. La mayoría de las fibras nerviosas mecanorreceptoras de bajo umbral tienen axones gruesos con terminaciones complejas encapsuladas. Aquí se incluyen los mecanorreceptores cutáneos de adaptación rápida como los corpúsculos de Meissner y Pacini, y los mecanorreceptores de adaptación lenta como los corpúsculos de Merkel y Ruffini (Widmaier et al. 2006). Estos mecanorreceptores de bajo umbral dan lugar a las sensaciones de tacto, presión, movimiento y vibración (Mountcastle 1968; Cain et al. 2001; Widmaier et al. 2006). Se ha observado que una fracción de ellos responden a descensos de temperatura, pero con frecuencias más bajas con los receptores de frío (Burton et al. 1972). La córnea carece de terminaciones mecanorreceptoras encapsuladas de bajo umbral, si bien algunas de éstas han sido descritas en la conjuntiva bulbar (Lawrenson & Ruskell 1991).

Alrededor del 15-20% de las fibras nerviosas que inervan la córnea responden únicamente a las fuerzas mecánicas de intensidades cercanas a valores nocivos (Belmonte et al. 1991, 2015; MacIver & Tanelian 1993). Estas fibras se clasifican como mecano-nociceptoras. Todos los axones de esta clase de receptor son escasamente mielinizados ( $A\delta$ ) en su trayecto extracorneal. Los campos receptivos son generalmente redondos y de tamaño medio, cubriendo el 10% de la superficie corneal. La fuerza requerida para activar los nociceptores polimodales y los mecano-nociceptores es alrededor de 0,6 mN (unas diez veces menos fuerzas que sus fibras equivalentes en la piel) (Belmonte et al. 2015). Esto se debe a la proximidad de las terminaciones a la superficie y la ausencia de un epitelio queratinizado. Los mecano-nociceptores disparan uno o varios NTIs en respuesta a una estimulación breve o mantenida. Es por ello, que los mecano-nociceptores tienen una limitada capacidad para codificar la intensidad y la duración del estímulo y probablemente sirvan como señal de llegada de un estímulo mecánico potencialmente lesivo siendo responsables de la sensación de dolor aguda y punzante producida por insultos mecánicos (Belmonte & Giraldez 1981; Belmonte et al. 1991; Gallar et al. 1993).

Se ha sugerido que el canal responsable de esta mecanosensibilidad nociceptora en la córnea sea el Piezo2 (Murthy et al. 2018), un canal expresado

aproximadamente en un 30% de las neuronas trigeminales (Bron et al. 2014; Alamri et al. 2015). En un primer momento se excluyó la expresión del canal Piezo2 en las terminaciones nociceptoras polimodales o en los termorreceptores de frío, debido a la no coexpresión de Piezo2 con CGRP o con el canal TRPM8, lo que señalaría al Piezo2 corneal como un canal exclusivo de las terminaciones corneales mecano-nociceptoras puras. No obstante, han sido descritas subpoblaciones de terminaciones nociceptoras polimodales que expresan TRPV1 pero no CGRP (Alamri et al. 2015). Además, en registros extracelulares corneales de ratón se ha observado respuestas a la estimulación mecánica en más del 80 % de las terminaciones nociceptoras polimodales y otros estudios funcionales recientes han verificado la expresión del canal Piezo2 en neuronas nociceptoras polimodales TRPV1. Además, estudios en ratones con el canal Piezo2 eliminado genéticamente evidencian una disminución de la mecanosensibilidad en terminaciones nociceptoras polimodales de la córnea (Fernández-Trillo et al. 2019). Sin embargo, no se puede descartar la presencia en los nervios corneales de otros canales implicados en mecanorrecepción, como el Nav 1.1 (Osteen et al. 2016), expresado selectivamente en fibras mecano-sensoras de alto umbral de la piel, el TRPA1 (Gallar et al. 2017), o la implicación de otras estructuras del epitelio corneal activadas por el estímulo mecánico.

#### **1.4.3. Nociceptores “silentes”**

La existencia en la córnea de fibras nociceptoras que son insensibles a todos los estímulos convencionales cuando el tejido está intacto, pero que se vuelven excitables a estímulos mecánicos, químicos o térmicos tras el desarrollo de un proceso inflamatorio se sugirió por McIver & Tanelian (Maclver & Tanelian 1993). Aunque las evidencias experimentales de su presencia en la córnea son indirectas, los nociceptores silentes han sido identificados en muchos tejidos somáticos, particularmente en humanos, donde parecen jugar un papel muy importante en el dolor inflamatorio. Por ello, se presume que puedan existir en la córnea (Belmonte et al. 2017).

#### **1.4.4. Termorreceptores de frío**

Existen terminaciones nerviosas en la piel sensibles a un amplio rango de temperaturas, desde 35°C hasta casi 0°C. Los termorreceptores de frío canónicos se caracterizan por mostrar una descarga continua y regular de impulsos a temperaturas basales, que aumenta su frecuencia de disparo, generalmente en ráfagas (*bursts*), con enfriamiento; una disminución o inhibición de la actividad con calor, y ausencia de respuesta a estímulos mecánicos (Hensel et al. 1960). La estimulación de frío se considera mediada por las fibras aferentes primarias no mielinizadas C y las escasamente mielinizadas A $\delta$  (Hensel & Zotterman 1951) cuyas terminaciones se localizan en la dermis o inmediatamente debajo de esta. Las fibras sensibles a frío presentan diferentes umbrales y han sido divididas en grupos de bajo y alto umbral (Belmonte et al. 2009).

Alrededor del 10-15% de las fibras nerviosas corneales disparan espontáneamente a la temperatura basal de la superficie corneal (34-35°C) (Carr et al. 2003; Belmonte et al. 2004), y aumentan su frecuencia de disparo cuando la temperatura disminuye, mientras que se silencian cuando su temperatura aumenta (Rózsa et al. 1983; Dvorscak & Marfurt 2008; Shaheen et al. 2014) o (Tanelian & Beuerman 1984; Belmonte et al. 1991; Gallar et al. 1993; Carr et al. 2003; Brock et al. 2006). Estas fibras corneales termosensibles son similares a los termorreceptores de frío canónicos descritos en otros tejidos corporales (Hensel & Zotterman 1951; Hensel et al. 1960) habiéndoseles denominado en la córnea, termorreceptores de frío "high background" (HB, del inglés alta actividad espontánea), "low threshold" (LT, del inglés bajo umbral) (HB-LT) (González-González et al. 2017). Estos termorreceptores de frío HB-LT cambian su actividad a distintas temperaturas estáticas y responden enérgicamente a los cambios dinámicos en la temperatura (Gallar et al. 1993; Kovács et al. 2016). Tanto con enfriamiento como con el calor, la magnitud en el cambio de frecuencia de disparo de potenciales de acción es muy dependiente de la ratio de cambio de temperatura (Carr et al. 2003; Brock et al. 2006). Los termorreceptores de frío HB-LT detectan y codifican muy precisamente la intensidad en la variación de temperatura mediante su frecuencia de disparo, respondiendo a cambios de 0.5°C o menos, lo que explica la capacidad de percibir enfriamientos de 1-2°C

en la temperatura de la superficie corneal. Los termorreceptores de frío tienen campos receptivos pequeños (aprox. 1 mm de diámetro) y se localizan por toda la superficie corneal, aunque son más abundantes en las áreas periféricas. Estos aumentan su frecuencia de disparo cuando disminuye la temperatura de la córnea, fenómeno que ocurre cuando se evapora la película lagrimal de la superficie corneal, o se aplican soluciones frías o pulsos de aire frío sobre la córnea. Las pequeñas caídas de temperatura en la córnea se perciben como sensaciones de frío inocuo (Acosta et al. 2004) con un componente variable irritativo.

Además de detectar cambios de temperatura los termorreceptores de frío corneales HB-LT detectan cambios, de medios a moderados en la osmolaridad (Gallar et al. 1993; Hirata & Meng 2010; Kurose & Meng 2013; Parra et al. 2014; Quallo et al. 2015). A temperatura constante, el aumento en la osmolaridad acelera la generación de potenciales de acción en esos receptores. En la córnea de ratón, cuando la osmolaridad pasa de 310 mOsm/L (control) a valores superiores a 340 mOsm/L (Parra et al. 2014) se produce un aumento significativo en la actividad de los termorreceptores de frío. Esta modulación de la actividad nerviosa se observa en soluciones que se vuelven hiperosmóticas mediante la adición de NaCl (Hirata & Meng 2010; Hirata & Oshinsky 2012; Parra et al. 2014; Hirata & Rosenblatt 2014) o mediante la adición de manitol o sacarosa (Hirata & Meng 2010; Hirata & Oshinsky 2012; Quallo et al. 2015; Hirata et al. 2015). Así pues, es el cambio en la osmolaridad y no tanto el cambio de la composición iónica de la disolución lo que modula la actividad nerviosa, aunque no puede descartarse un efecto adicional directo sobre la carga de la superficie producido por la alta concentración de sodio. La actividad de los termorreceptores de frío HB-LT es inhibida por las soluciones hipoosmóticas (Quallo et al. 2015). Estos resultados sugieren que bajo condiciones basales la osmolaridad de la película lagrimal proporciona un estímulo adicional a los termorreceptores de frío que contribuyen al mantenimiento de su actividad nerviosa espontánea (Parra et al. 2014; Olivares et al. 2015).

Es posible que los termorreceptores de frío contribuyan a las sensaciones de sequedad ocular cuando la evaporación excesiva reduce la temperatura corneal. La sensibilidad a frío de las neuronas del TG oculares depende críticamente de

la expresión del canal TRPM8. Se ha observado, que los ratones genéticamente privados de TRPM8 permanecen silentes y no responden al enfriamiento. En ellos, flujo lacrimal está reducido a la mitad, mientras que la lagrimación evocada por la irritación ocular, mediada por los nociceptores polimodales, permanece normal (Cillà et al. 2009).

El TRPM8 es un canal iónico activado por el enfriamiento y el mentol, y es importante para la sensación de frío (Peier et al. 2002; McKemy et al. 2002; Parra et al. 2010), incluyendo el frío doloroso. Un estudio reciente ha mostrado que el TRPM8 también se activa por el aumento en la osmolaridad de unos 200 mOsmol/L (Quallo et al. 2015). Esta subpoblación de termorreceptores de frío muestra también una expresión prominente de canales HCN (hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide-modulated), que modulan las corrientes despolarizantes, contribuyendo con ello a controlar el patrón de disparo regular de los termorreceptores HB-LT (Orio et al. 2012).

Mientras que la mayoría de los termorreceptores de frío corneales son HB-LT (aprox 70%), existe una subpoblación de fibras nerviosas sensibles al frío (aprox. 30%) con una actividad espontánea a temperatura basal muy baja, un alto umbral de frío (requiriendo caídas de temperatura  $>4^{\circ}\text{C}$  para su activación) y una respuesta más débil al enfriamiento (Hirata & Oshinsky 2012; González-González et al. 2017) que han sido denominados "termorreceptores de frío "low background" (LB, del inglés baja actividad espontánea) "high threshold" (LT, del inglés alto umbral) (LB-HT) (González-González et al. 2017).

En el TG, aproximadamente el 10-20% de las neuronas corneales aferentes expresan TRPM8 (Ivanusic et al. 2013; Bron et al. 2014; Alamri et al. 2015). Las neuronas TG con fenotipo de termorreceptores de frío presentan amplios rangos de umbral térmico y respuesta a mentol (Madrid et al. 2009). Las diferencias de umbral entre neuronas termorreceptoras se han atribuido en parte a la expresión variable del TRPM8 y también de los canales de  $\text{K}^{+}$  sensibles a frío de inactivación lenta, cuya actividad se opone a la despolarización rápida inducida por el frío (Viana et al. 2002; Madrid et al. 2009).



Morfológicamente, las terminaciones nerviosas que expresan TRPM8 en la córnea son, casi exclusivamente de tipo complejo y llegan hasta las células aladas y las escamosas del epitelio (Ivanusic et al. 2013).

#### **1.4.5. Mecanismos moleculares de la transducción sensorial**

La transducción es el proceso por el cual los cambios ambientales físicos y químicos, actuando sobre las terminaciones sensoriales periféricas se codifican en una descarga de potenciales de acción, que viajan a lo largo del axón hasta alcanzar el cerebro. Los canales iónicos en la membrana de las terminaciones nerviosas sensoriales tienen importantes y distintas funciones para la transducción y la codificación del estímulo.

Los canales iónicos son proteínas de membrana que forman un poro que actúa como puerta selectiva, facilitando la difusión de iones a través de la membrana biológica. Centenares de canales iónicos que regulan el paso de los iones a través de la bicapa lipídica se codifican en el genoma humano (Hille 2001). La activación de los canales iónicos se controla por moduladores externos y el flujo de iones genera señales eléctricas en las células excitables. Además, estas señales se acoplan a un aumento transitorio de calcio intracelular, controlando distintos procesos fisiológicos. Los canales iónicos son clasificados basándose en su selectividad iónica y su apertura. Los grupos incluyen canales de voltaje, de ligando, de segundos mensajeros, y canales de apertura por fuerzas físicas (estimulación mecánica y temperatura). Como comentaremos, la transducción térmica, particularmente de frío, en termorreceptores es un proceso complejo que implica la participación de varios canales iónicos distintos (Belmonte & Viana 2008).

##### **1.4.5.1. Canales iónicos TRP**

Los canales llamados de potencial de receptor transitorio (*transient receptor potential*) abreviadamente canales TRP, son miembros de una superfamilia de proteínas iónicas (**Figura 4**) con seis dominios transmembrana y con dominios N-citoplasmáticos y C-terminales, los cuales se ensamblan para formar canales iónicos permeables a cationes (Stucky et al. 2009). Cuando se abren, las células

sensoriales se despolarizan mediante el aumento de las concentraciones intracelulares de sodio y calcio y la liberación de potasio (Ramsey et al. 2006).

El descubrimiento de la superfamilia de proteínas de canales catiónicos de potencial de receptor transitorio (TRP) se hizo en 1969 (Cosens & Manning 1969), pero no fue hasta 1989 cuando el defecto genético que subyacía a este fenotipo se caracterizó y se pudo clonar el gen *trp* (Montell & Rubin 1989). Finalmente, en 1992 las proteínas TRP se identificaron como canales iónicos (Hardie & Minke 1992) y desde entonces se han identificado muchos otros canales iónicos que pertenecen a la familia de canales TRP, convirtiendo a esta en una de las familias más grandes de canales iónicos. Posteriormente se han logrado muchos descubrimientos en el campo, incluyendo la identificación de los canales TRP humanos (Wes et al. 1995; Zhu et al. 1995) o el descubrimiento de los “TRP-térmicos” (Caterina et al. 1997).

Los canales TRPs han sido conservados desde los gusanos hasta los humanos (Wes et al. 1995), cuyos sentidos dependen críticamente de los canales TRP. Su presencia en células especializadas permite la existencia de procesos sensoriales complejos, incluyendo la visión, el olor, el tacto, el sabor, la audición, la detección de temperatura y el dolor. Todos los canales TRP son permeables a cationes. Median el paso de los cationes a través de la membrana plasmática, por lo que  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  pasan al interior de la célula mediante un gradiente electroquímico, que aumenta el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y el sodio ( $\text{Na}^+$ ) intracelular mientras que los iones de potasio ( $\text{K}^+$ ) fluyen hacia fuera. Esto causa un cambio en el potencial de membrana plasmática ( $V_m$ ) a valores más positivos, y en células excitables, como las neuronas, tal despolarización determina la generación de potenciales de acción propagados.

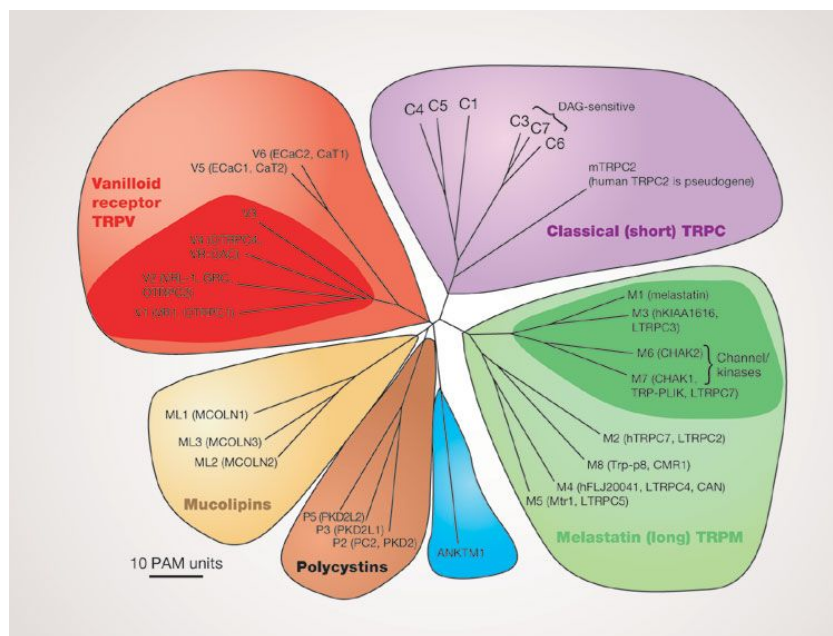


Figura 4 Clasificación de las distintas familias de los canales TRPs. (Clapham 2003)

#### 1.4.5.2. TRPM8

La subfamilia TRPM (melastatina) consta de ocho miembros, uno de los cuales es TRPM8. El canal TRPM8 se identificó por primera vez en la próstata humana cuando se secuenció un gen desconocido que tenía una alta homología de su secuencia con otros canales iónicos de TRP. Entonces se le llamó TRP-p8 (Tsavaler et al. 2001). Poco después, se identificó el mismo gen a partir de una biblioteca de ADN de ganglios trigeminales de rata, como un receptor de mentol, también activado por frío (McKemy et al. 2002) y llamado CMR1 (receptor de mentol frío 1). Este nuevo canal iónico demostró ser el ortólogo de rata de TRP-p8. En paralelo, el grupo encabezado por A. Patapoutian, utilizando un enfoque bioinformático, pudo identificar la misma secuencia y clonarla en el ganglio raquídeo del ratón, identificando su actividad como un canal iónico sensible al frío y a compuestos químicos como el mentol y eucaliptol (Peier et al. 2002). En 2002 se incluyó en la subfamilia TRPM como TRPM8 (Montell 2003).

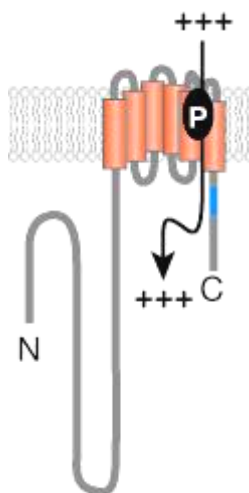


Figura 5. Estructura general de la subunidad TRPM8. Seis dominios transmembrana están representados por cilindros naranjas, mientras que N y C indican las regiones amino y carboxilo intracelulares. El segmento azul muestra el dominio TRP. El dominio de poros, marcado con la letra P, permite el paso de cationes, marcado con el signo +. (Figura adaptada de Venkatachalam & Montell 2007).

El canal TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales de diámetro pequeño y mediano en los ganglios raquídeos (DRG) y ganglio trigémino (TG) (Clapham 2003; Stucky et al. 2009), pero también hay evidencia de su expresión en los ganglios viscerales (Zhang et al. 2004; Abe et al. 2005; Fajardo et al. 2008) el ganglio geniculado (Katsura 2006). En neuronas sensoriales, se ha demostrado mediante el desarrollo de ratones modificados genéticamente que expresan una proteína verde fluorescente (GFP) controlada por el promotor del TRPM8, que el canal se expresa en terminaciones nerviosas libres en los receptores de frío de la piel (Takashima et al. 2007; Dhaka et al. 2008; Parra et al. 2010). El TRPM8 también se expresa en una gran variedad de tejidos que incluyen las papilas gustativas (Abe et al. 2005), córnea (Parra et al. 2010), hígado (Fonfria et al. 2006), testículos y vejiga (Stein et al. 2004). A nivel celular, TRPM8 co-localiza parcialmente con TRPV1, CGRP y sustancia P (Viana et al. 2002; Babes et al.

2004; Xing et al. 2006; Takashima et al. 2007; Dhaka et al. 2008; Axelsson et al. 2009), promoviendo la hipótesis de que TRPM8 podría estar involucrado en funciones nociceptoras.

La activación del TRPM8 en las neuronas sensoriales que expresan el canal provoca una despolarización inicial, el potencial de receptor, que a su vez genera potenciales de acción. Además, su activación permite la entrada de calcio en la neurona. En sistemas recombinantes, el TRPM8 puede estimularse cuando la temperatura desciende por debajo de 25-28°C (McKemy et al. 2002), sin embargo, los valores de umbral *in vivo* de las neuronas sensibles al frío que expresan TRPM8 presentan respuestas con descensos de temperatura por debajo de 34°C (de la Peña et al. 2005; Madrid et al. 2006; Mälkiä et al. 2007). El papel del TRPM8 en la detección de frío se ha demostrado *in vivo* con el uso de ratones knock-out (Colburn et al. 2007; Dhaka et al. 2007; Bautista et al. 2007). Las pruebas de comportamiento sobre preferencias de temperatura mostraron la indiferencia de los ratones knock-out de TRPM8 para elegir temperaturas cálidas frente las frías (Daniels & McKemy 2007), mientras que otros experimentos mostraron claros déficits sensoriales hasta temperaturas cercanas a 10°C (Bautista et al. 2007). Sin embargo, en experimentos de selección de temperatura, en ratones knock-out TRPM8 no se observaron comportamientos para evitar el frío nocivo (Knowlton et al. 2010).

Además del efecto temperatura, se han identificado varios agonistas y antagonistas que actúan sobre TRPM8. El efecto del mentol sobre la excitación neuronal provocada por el frío es el más estudiado y se remonta a la década de 1950, cuando sus efectos estaban vinculados a las fibras sensibles al frío, demostrando cómo el mentol afecta el potencial de acción al disparar, cambiando hacia temperaturas más cálidas (Hensel & Zotterman 1951). Varias décadas después, tras la clonación de TRPM8, se confirmó que era el canal que mediaba la actividad producida por el mentol, el eucaliptol y la icilina (Peier et al. 2002; McKemy et al. 2002). Otros agonistas incluyen los odorantes naturales linalool, geraniol e hidroxicitronellal (Behrendt et al. 2004; Almaraz et al. 2014). Los compuestos que tienen un efecto antagónico sobre TRPM8 incluyen 4-(3-cloro-2-piridinil)-N-[4-(1,1-dimetiletil) fenil]-1piperazincarboxamida (BCTC) y capsazepina (Behrendt et al. 2004; Weil 2005; Madrid et al. 2006; Mälkiä et al.

2007). Otros antagonistas incluyen el agente antifúngico clotrimazol (Meseguer et al. 2008) y el agente antimicótico 1,10-fenantrolina (Mätkiä et al. 2007). Sin embargo, uno de los principales problemas con la farmacología de estos compuestos es la falta de selectividad de muchos agentes. El clotrimazol, por ejemplo, también puede activar TRPA1 y TRPV1 (Meseguer et al. 2008), y cinnamaldehído, un agonista de TRPA1, también inhibe TRPM8 (Macpherson et al. 2006).

#### **1.4.5.3. TRPA1**

Otro canal de la familia TRP, que también parece involucrado en la transducción del frío es el TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1), el cual tiene diversas funciones como sensor para señales irritantes y nocivas. El gen TRPA1 se clonó por primera vez a partir de cultivos de fibroblastos de pulmón humano (Jaquemar et al. 1999) y más tarde a partir del ganglio raquídeo del ratón, donde se denominó ANKTM1 y se identificó como el receptor del frío nocivo (Story et al. 2003) Poco después, se estableció que el TRPA1 es sensible al aceite de mostaza (Jordt et al. 2004). El TRPA1 es el único miembro en los mamíferos de la familia TRPA y consta de seis dominios transmembrana con los extremos N y C citoplasmáticos (**Figura 6**). El TRPA1 se encuentra principalmente en las neuronas del trigémino, de los ganglios raquídeos y los ganglios viscerales (Story et al. 2003; Jordt et al. 2004; Fajardo et al. 2008) lo que sugiere funciones sensoriales específicas. Sin embargo, también se ha encontrado en la piel, el cabello, el cerebro y la mucosa gastrointestinal (Corey et al. 2004; Kwan et al. 2009; Atoyan et al. 2009). En las neuronas sensoriales, el TRPA1 es altamente co-expresado en neuronas que contienen el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la sustancia P, y también con TRPV1 (Story et al. 2003; Kobayashi et al. 2005), lo que sugiere además de un papel para él en las funciones nociceptoras.

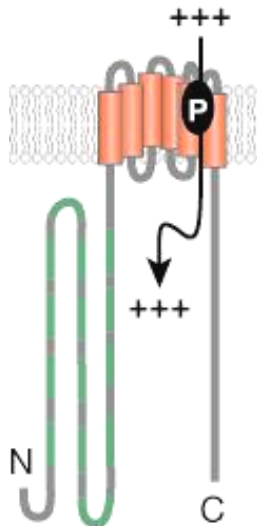


Figura 6. Estructura general de la subunidad TRPA1. Seis dominios transmembrana están representados por cilindros naranjas. N y C indican respectivamente las regiones amino y carboxilo intracelulares. Los segmentos verdes representan dominios de anquirina. El dominio de poros, marcado con la letra P, permite el paso de cationes, marcado con el signo +. (Figura adaptada de Venkatachalam & Montell 2007).

La apertura del TRPA1 dependiente de temperatura se atribuye a un cambio en la dependencia de voltaje de la activación del canal, similar a lo que se ha mencionado anteriormente para TRPM8 (Voets et al. 2004). Aunque originalmente se identificó como un sensor de frío nocivo con activación a temperaturas inferiores a TRPM8, la sensibilidad al frío del TRPA1 ha sido un tema controvertido (Jordt et al. 2004; Bautista et al. 2006; Kwan et al. 2006). La principal población sensible al frío de las neuronas sensoriales es sensible al mentol, lo que indica la participación del TRPM8. Sin embargo, un pequeño porcentaje responde al frío, pero no al mentol, lo que demuestra que otros mecanismos, como el TRPA1, podrían estar involucrados (Kobayashi et al. 2005). El TRPA1 se expresa en 20-36.5% de las neuronas del trigémino (Nagata 2005; Bautista et al. 2005), pero no se ha encontrado correlación entre la sensibilidad al frío y las respuestas del aceite de mostaza en neuronas cultivadas

(Babes et al. 2004; Madrid et al. 2009). Al alterar el protocolo de enfriamiento y usar un estímulo más intenso y prolongado, se observó que una población de neuronas trigeminales que son sensibles al frío y al aceite de mostaza también estaban ausentes en ratones knock-out para TRPA1, lo que evidencia una alteración de la sensación de frío nocivo (Karashima et al. 2009). El TRPA1 también parece ser el principal mecanismo para la sensibilidad al frío en las neuronas del ganglio nodoso que inervan los tractos respiratorio y gastrointestinal (Fajardo et al. 2008).

El papel que juega el TRPA1 como un quimiosensor parece ser bastante claro. Desde que se describió por primera vez que se activa con el aceite de mostaza, se ha descrito que también que puede activarse por una amplia variedad de compuestos naturales, incluido el isotiocianato de alilo (AITC, el compuesto picante que se encuentra en el aceite de mostaza), rábano picante y wasabi (Jordt et al. 2004; Bandell et al. 2004). Además, puede activarse con cinnamaldehído (Macpherson et al. 2006), alicina (encontrada en el ajo) (Macpherson et al. 2005), tetrahidrocannabinol (encontrada en la planta de marihuana) (Jordt et al. 2004) y nicotina (Talavera et al. 2009). Otras sustancias químicas no naturales también pueden activarlo, como los isocianatos y la acroleína, contaminantes tóxicos para el medio ambiente. (Bandell et al. 2004; Bautista et al. 2006; Bessac et al. 2009). El mentol, además de activar TRPM8, tiene un efecto bimodal en TRPA1. El mentol puede actuar como un agonista de TRPA1 a niveles micromolares, de 100 a 300  $\mu\text{M}$ , mientras que puede bloquearlo a concentraciones submilimolares mucho más altas (Macpherson et al. 2006; Karashima et al. 2007).

#### **1.4.5.4. Canales de Potasio**

Los canales de potasio son muy diversos estructuralmente y se encuentran en casi todos los tipos de organismos, en los que participan en muchas funciones biológicas. Tienen en común un poro transmembrana acuoso selectivo para los iones de  $\text{K}^+$ . Existen dos clases principales de canales de  $\text{K}^+$ , definidas por estas proteínas transmembrana: los canales transmembrana de seis hélices dependientes de voltaje ( $\text{Kv}$ ) y los canales de dos hélices rectificadores de  $\text{K}^+$  ( $\text{Kir}$ ) (Papazian et al. 1987; Pongs et al. 1988; Ho et al. 1993). Dos subfamilias



de canales incluyen los canales de  $K^+$  activados por calcio y los canales de  $K^+$  de dominio de dos poros ( $K_{2P}$ ). Los canales TREK-1 y TRAAK se encuentran dentro de una de las seis subfamilias de canales  $K_{2P}$  de mamíferos.

#### **1.4.5.5. TREK-1 y TRAAK**

Las subunidades del canal  $K_{2P}$  contienen cuatro segmentos transmembrana y dos secuencias de poros con los extremos N y C intracelulares. En la subfamilia TREK de los canales  $K_{2P}$ , el TREK 1 (también conocido como KCNK2 o  $K_{2P2}$ ) fue el primer miembro descrito (Fink et al. 1996), seguido del TRAAK (KCNK4,  $K_{2P4}$ ) (Fink 1998). Los canales  $K_{2P}$  median las corrientes basales, estabilizan el potencial de reposo de la membrana y ayudan a controlar la excitabilidad celular (Enyedi & Czirjak 2010). Tanto TREK-1 como TRAAK se expresan en el sistema nervioso, donde el TRAAK parece tener una expresión específica (Fink 1998) mientras que el TREK-1 se expresa altamente en el cerebro y DRG (Maingret et al. 2000), así como en otros tejidos, como el corazón, los pulmones y los riñones (Fink et al. 1996).

También conocidos como los canales de "fuga" que se abren en reposo, primero se identificaron como canales de  $K^+$  mecanosensibles, abiertos por el estiramiento de la membrana, el hinchamiento celular y la fuerza en cizalla (Patel et al. 1998; Maingret et al. 1999). A posteriori, se demostró que el TREK-1 y el TRAAK también eran canales dependientes de la temperatura. En primer lugar, se encontró que el TREK-1 se abría gradualmente por calor de manera reversible. Cuando se calienta a  $42^{\circ}\text{C}$ , la apertura del canal hiperpolariza las células, reduciendo la descarga de potenciales de acción. Se encontró que el enfriamiento cerraba TREK-1, causando la despolarización celular y el disparo de potenciales de acción, lo que llevó a la especulación de su participación como sensor de temperatura en fibras sensibles al frío (Maingret et al. 2000). Otros trabajos han descrito neuronas sensibles al frío que responden al enfriamiento mediante el cierre de los canales de  $K^+$  de la misma manera (Reid & Flonta 2001; Viana et al. 2002). Más tarde, se observó una sensibilidad a la temperatura similar en TRAAK, que es activa a valores cercanos a las temperaturas corporales fisiológicas y su sensibilidad varía entre  $24^{\circ}\text{C}$  y  $>42^{\circ}\text{C}$ . La actividad

máxima se alcanza entre 37-42°C y disminuye acusadamente a temperaturas más altas (Kang et al. 2005).

En estudios realizados en las neuronas DRG, se encontró que, en ratones con TREK 1 y TRAAK inactivados, la población de neuronas que respondían al frío y mentol o frío y AITC aumentaba significativamente, junto con la población de sensibles al frío e insensibles a mentol y AITC, que aumentaron 2.5 veces. Esto representa una clara evidencia del papel de ambos canales juntos, si no individualmente para la detección de frío (Noël et al. 2009).

#### **1.4.5.6. Canales de Potasio dependientes de Voltaje (Kv)**

Los canales Kv representan la familia de genes más grande y diversa de la familia de canales K<sup>+</sup>. Están codificados por 40 genes y representados por 12 familias (Kv1 – Kv12). Kv1 – Kv4 son los más claramente asociados con el sistema nervioso. Los canales Kv1, ensamblados en el retículo endoplásmico, se transportan selectivamente a sus ubicaciones subcelulares y se anclan en la membrana plasmática mediante moléculas de andamiaje (Rhodes et al. 1996; PONGS et al. 1999). La expresión en la superficie celular de Kv1.1 y Kv1.2 se concentra típicamente a lo largo de los axones y terminaciones de las neuronas. Los canales que contienen Kv1.1 y Kv1.2 modulan la propagación del potencial de acción y amortiguar los disparos repetitivos normales o anormales (Jan & Jan 2012).

Los canales Kv son una subfamilia muy grande de canales de potasio. Desempeñan un papel vital en la iniciación y propagación del potencial de acción, al que dan forma, regulando también su patrón de disparo (Bean 2007). La distribución en la membrana de los canales Kv permite que los iones cargados fluyan rápidamente hacia o desde la célula en respuesta a los cambios de potencial de la membrana, lo que determina la excitabilidad intrínseca de las neuronas (Llinas 1988). Se ha demostrado que esta excitabilidad se regula de manera dinámica a través de la composición y expresión del canal, su distribución diferencial y la localización, así como mecanismos adicionales, como la fosforilación, que modifica los canales influyendo en el output neuronal de impulsos nerviosos (Schulz et al. 2008).

Este papel modulador de los canales Kv en la actividad eléctrica neuronal tiene un significado importante en la determinación del umbral de sensibilidad de las neuronas sensoriales. Por ejemplo, Madrid y colaboradores (Madrid et al. 2009) han demostrado que una corriente sensible al frío denominada  $I_{K_D}$  y dependiente de los canales Kv1, se expresa en una subpoblación de neuronas termosensibles a frío, donde actúa como un freno que reduce la capacidad de respuesta al enfriamiento. En la misma línea, se ha descrito recientemente una corriente de  $K^+$  mecanosensible en las neuronas DRG ( $I_{K_{mech}}$ ) mediada por Kv1.1-Kv1.2, con mecano-sensibilidad incorporada dentro de la subunidad Kv1.1  $\alpha$ . Se ha propuesto la hipótesis de que las distorsiones de la membrana local inducidas por las fuerzas aplicadas, alteran la interacción entre los fosfolípidos y los residuos de arginina cargados positivamente ubicados en el sensor de voltaje de Kv1.1, es decir, la mecano-sensibilidad estaría determinada por las propiedades sensibles al estiramiento inherentes al sensor de voltaje (Hao et al. 2013).

En resumen, la capacidad de respuesta al enfriamiento parece estar presente en un grado variable en las diferentes clases funcionales de receptores sensoriales periféricos que inervan la superficie corporal, dependiendo en cada caso de la expresión particular de varios tipos de canales iónicos termosensibles. Sin embargo, se desconoce la contribución de cada clase de fibra y canal termosensible al mensaje sensorial final en condiciones fisiológicas y patológicas.

#### **1.5. Contribución de las neuronas sensoriales oculares a la percepción de la humedad ocular**

La superficie ocular de los animales terrestres está expuesta a continuas oscilaciones en la humedad ambiental y la temperatura, la cual puede alcanzar valores extremos (Belmonte & de la Peña 2013). Bajo condiciones normales, estos cambios permanecen inadvertidos, aun así, pueden causar cambios sutiles en la película lagrimal y en las células epiteliales más externas de la córnea y la conjuntiva (Xiao et al. 2015) y son estímulos potenciales para las terminaciones nerviosas de la superficie ocular.

Existen evidencias de que las dos clases de termorreceptores de frío (HB-LT y LB-HT), regulan la formación de la lágrima que mantiene la humedad de la superficie ocular y generan la sensación de irritación producida precisamente por la sequedad de dicha superficie ocular (Belmonte & Gallar 2011). La capacidad de los termorreceptores de frío HB-LT de detectar pequeños cambios de temperatura y de osmolaridad sugiere que su papel principal es detectar cambios en la película lagrimal producidos por la evaporación, el principal contribuidor al adelgazamiento de la película lagrimal (Kimball et al. 2010). Durante el parpadeo, se producen cambios de temperatura en la superficie de la córnea que modifican la actividad espontánea de los termorreceptores de frío. Durante estos ciclos de calentamiento y enfriamiento, la actividad de los termorreceptores de frío aumenta rápidamente cuando empieza el enfriamiento (Brock et al. 2006). Además, el aumento en la osmolaridad de la película lagrimal producido por la evaporación incrementa la actividad de los termorreceptores de frío (Parra et al. 2014). Es por ello que se ha postulado que la actividad de las HB-LT modula la producción de lágrima y el parpadeo basal (Belmonte et al. 2015). Apoya esta hipótesis la observación de que los ratones TRPM8 KO, en comparación con los ratones WT tienen la lagrimación y el parpadeo reducidos (Parra et al. 2010; Quallo et al. 2015) y las concentraciones bajas de mentol, que aumentan la lagrimación en los ratones WT, no tiene efecto en los TRPM KO (Parra et al. 2010).

Se ha descrito que la activación moderada de los termorreceptores de frío causa una sensación de enfriamiento mientras que una estimulación intensa evoca una sensación de irritación que podría ser explicada por el reclutamiento de los termorreceptores de frío LB-HT. Esta evidencia sugiere que una activación intensa de los termorreceptores de frío durante una sequedad excesiva en la superficie ocular es la responsable de las sensaciones de irritación (Belmonte et al. 2015).

Los nociceptores polimodales corneales son insensibles al frío inocuo, aunque se pueden activar por soluciones hiperosmóticas (Gallar et al. 1993; Parra et al. 2014). Sin embargo, en comparación con los termorreceptores de frío, su sensibilidad al aumento de la osmolaridad es muy inferior, con un umbral de activación cercano a 600 mOsm/L (Parra et al. 2014). Por ello, es improbable

que sean activados en condiciones normales. El estrés mecánico sobre la córnea produce una rotura de la película lagrimal y la sequedad podría potencialmente ser detectada tanto por los nociceptores polimodales como por los mecanonociceptores (Begley et al. 2013). Además, el aumento acusado en la osmolaridad de la película lagrimal que se sugiere que ocurre cuando se produce una rotura de la película lagrimal (Liu et al. 2009) podría también ser suficiente para activar los receptores polimodales y contribuir al malestar ocular que se sufre con una sequedad excesiva y aguda de la superficie ocular.

### **1.6. Lesión de los nervios oculares**

Diversas circunstancias, como la cirugía ocular, los traumatismos y algunas enfermedades sistémicas, causan daños en los nervios sensitivos oculares en diferentes puntos de su recorrido.

La magnitud del daño neural tras una lesión es un componente crítico que definirá las características finales de la actividad eléctrica en las fibras nerviosas y las sensaciones perceptuales de dolor y malestar experimentadas (Belmonte et al. 2017).

En casos en los que se provoca experimentalmente una lesión extensa del tejido corneal, las terminaciones nerviosas que contienen los canales de transducción desaparecen en cuestión de horas mediante la degeneración Walleriana de las ramas axonales distales al punto de lesión (Beuerman & Schimmelpfennig 1980). En estas condiciones, las respuestas naturales a estímulos en las áreas denervadas se alteran o se suprimen. La pérdida o la reducción de la sensibilidad a estímulos naturales es un síntoma inmediato típico del daño periférico de los nervios sensoriales.

Ello es debido a que la lesión de los axones periféricos de las neuronas oculares cambia sus propiedades morfológicas y funcionales, en particular en los de la córnea, donde las áreas denervadas son invadidas por extensiones adyacentes de los nervios no lesionados y por brotes de los axones lesionados, alguno de los cuales son a veces atrapados por el tejido cicatricial formando microneuromas (Acosta et al. 2014).

Las alteraciones morfológicas en los axones periféricos normalmente van acompañadas por perturbaciones en el soma de sus neuronas sensoriales primarias. La expresión de factores de transcripción, de neuropéptidos y de genes que codifican canales iónicos y proteínas receptoras se altera en grado variable, dependiendo de la localización y de la extensión del daño nervioso (Tashiro et al. 2010). En particular, los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> se sobre-expresan (Bishop et al. 2010; Craig et al. 2017). Como consecuencia, durante la regeneración axonal la excitabilidad nerviosa de las terminaciones de los neuomas formados por las neuronas dañadas se altera, dando lugar a descargar ectópicas (Dana et al. 2019) y respuestas anormales a los estímulos naturales (Saldanha et al. 2018). Esta actividad dañada es el origen del dolor neuropático periférico (Bishop et al. 2010; Chao et al. 2015). Tales alteraciones funcionales se han observado en neuronas de córneas axotomizadas en diferentes tiempos de estudio tras la lesión. Los nociceptores polimodales y receptores nerviosos sensibles a frío muestran un aumento en la actividad espontánea y en la respuesta a estímulos semanas después de la lesión, presumiblemente al potenciamiento de los canales de Na<sup>+</sup> resistentes a la tetrodotoxina. (Toshida et al. 2007)

## II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

### Justificación

La córnea humana está innervada por neuronas del ganglio trigémino especializadas en la detección de las diferentes modalidades de estímulos ambientales. Estas neuronas sensitivas son funcionalmente heterogéneas y han sido clasificadas como nociceptoras polimodales, mecano-nociceptoras y termorreceptoras de frío, en base a la forma de energía (mecánica, térmica o química) que preferencialmente activa sus terminaciones corneales periféricas. (Belmonte et al. 2004, 2017; González-González et al. 2017). Cada clase funcional de neurona corneal evoca sensaciones conscientes cualitativamente distintas y contribuye también, de manera diferente, a la modulación de la lagrimación y el parpadeo. (Parra et al. 2010; Belmonte et al. 2017).

La innervación corneal resulta inevitablemente afectada por la cirugía corneal, que lesiona directamente los axones sensoriales de las neuronas mencionadas que innervan su superficie. Este problema tiene especial significación en la cirugía corneal dirigida a la corrección de trastornos de la refracción. La queratectomía fotorrefractiva (PRK) es la técnica más frecuentemente empleada para este fin y va acompañada por una disminución transitoria de la sensibilidad corneal y la lagrimación, con posible aparición de la sintomatología que aparece en la enfermedad de ojo seco (DED). (Tuunanen & Tervo 1996; Ang et al. 2001).

Por ello, resulta importante caracterizar el grado de disfunción en las fibras mecano-nociceptoras, polimodales y termorreceptoras de frío que tiene lugar tras la cirugía de ablación láser corneal (PRK), el curso temporal de su recuperación y los mecanismos celulares que subyacen a estas alteraciones post-quirúrgicas ya que tales procesos no han sido todavía suficientemente estudiados. Tampoco se conoce en qué medida las alteraciones morfológicas y funcionales de las neuronas somatosensoriales periféricas, y en la lagrimación que acompañan al envejecimiento afectan la respuesta de los nervios del ojo a la lesión quirúrgica.

### **Hipótesis de trabajo**

Mediante el estudio de los cambios morfológicos y electrofisiológicos en los nervios sensoriales de la córnea y en la tasa basal de lagrimación provocados por una ablación corneal controlada con un láser excímer en ratones jóvenes y viejos, similar a la que se lleva a cabo en la cirugía fotorrefractiva (PRK) en humanos, pueden obtenerse nuevos datos sobre los cambios moleculares y celulares que subyacen a los síntomas cognitivos de molestia, dolor y sequedad ocular que aparecen en los pacientes humanos tras la cirugía ocular.

### **Objetivos**

Para obtener esta información proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de los cambios electrofisiológicos y morfológicos en las terminaciones nerviosas corneales tras la lesión corneal causada por la PRK en ratones jóvenes y su relación con la tasa de lagrimación basal.
2. Caracterización de los cambios electrofisiológicos y morfológicos en las terminaciones nerviosas corneales tras la lesión corneal causada por la PRK en ratones viejos y su relación con la tasa de lagrimación basal.
3. Definición de la participación de los diferentes canales iónicos presentes en los distintos terminales nerviosos mediante el uso de fármacos y de ratones en los que se eliminó genéticamente el canal TRPM8, presente en las neuronas termorreceptoras de frío implicadas en la modulación de la lagrimación.



### III. MATERIALES Y MÉTODO

#### Animales

Para este estudio se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa wild type (WT) C57BL/6, 70 jóvenes adultos de entre 3 y 6 meses de edad y 27 ratones viejos de entre 22 a 26 meses de edad, comprados a Charles River Laboratory (L'Arbresle Cedex, France) y estabulados en el animalario de la Universidad de Oviedo.

También se utilizaron 23 ratones jóvenes adultos (3-6 meses) y 11 ratones viejos (de 22-24 meses) de una cepa transgénica knock-in de ratones TRPM8, a la cual se interrumpió el locus del TRPM8 y se insertó la proteína EGFP en la sección del codón de iniciación del TRPM8 (Dhaka et al. 2007). Los ratones homocigotos (TRPM8<sup>EGFP/EGFP</sup>) carecen del canal iónico TRPM8 (TRPM8 KO).

Todos los animales utilizados fueron manipulados y estabulados según las normas para el uso y manejo de animales en investigación en ciencias de la visión de la Unión Europea (2003/65/EC) y del Gobierno de España (RD 53/2013). Todos los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Oviedo.

#### **Lesión nerviosa corneal a partir de la keratectomía fotorrefractiva (“*Photorefractive Keratectomy*”, PRK)**

Las lesiones se llevaron a cabo utilizando un láser excímer VISX Star S2 (VISX Inc., CA, USA). Se llevó a cabo una lesión unilateral, lesionando únicamente los ojos derechos, determinando los siguientes parámetros: 1.5 mm<sup>2</sup> de área circular y 45 µm de profundidad. El procedimiento quirúrgico incluye la ablación simultánea del epitelio (definiendo el espesor epitelial central en 25 µm) y 20 µm del estroma anterior (que representa el 20% del espesor total del estroma), que elimina todas las fibras nerviosas subbasales y las terminaciones intraepiteliales de la zona lesionada.

Antes de realizar la cirugía, los animales se anestesiaron profundamente mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (80 mg/kg;

Imalgene 1000, Merial Laboratios S.A., Spain) y xilacina (5 mg/kg; Rompun, Bayer Hispania S.L, Barcelona, Spain), seguida de la aplicación tópica de un 0,5% de clorohidratado de tetracaina y 1 mg de oxibuprocaina (Colircusí Anestésico Doble, Alcon S.A, Barcelona, Spain).

La cirugía PRK se llevó a cabo tanto en los ratones jóvenes adultos como en los ratones viejos de la cepa WT C57BL/6.



Figura 7. Láser excímer VISX Star S2, adaptado para para la cirugía PRK en ratones.

### **Evaluación de la cicatrización epitelial *in vivo***

Para determinar el área ( $\text{mm}^2$ ) de lesión epitelial corneal se utilizó la tinción con fluoresceína (Colircusí, Alcon S.A, Barcelona, Spain) en los ratones C57BL/6 jóvenes anestesiados, utilizando un microscopio estereoscópico Leica S6D equipado con una cámara digital EC3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) a 12.5X aumentos de magnificación. Se realizaron observaciones inmediatamente después de la cirugía (T0) y 24, 48 y 72 horas después de la PRK. Para medir el área teñida con fluoresceína se utilizó el software de análisis de imágenes Fiji (ImageJ 1.48d; National Institutes of Health, Bethesda, MD,

USA). El área se delimitó con la herramienta de selección “freehand”, seleccionando el área teñida, y calculando su superficie.

### **Tasa de lagrimación**

La tasa de lagrimación se midió en los ratones, tanto jóvenes y viejos de la cepa WT C57BL/6 como en los de la línea transgénica TRPM8 KO, usando unos hilos de rojo fenol (Zone-Quick, Menicon Pharma S.A., Graffenstaden, Francia) que se colocaron cuidadosamente entre el párpado inferior y la conjuntiva bulbar en el ángulo nasal durante 1 minuto (Parra et al. 2010) en los ratones anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (80 mg/kg; Imalgene 1000) y xilacina (5 mg/kg; Rompun).

En los ratones C57BL/6 sin lesionar, tanto jóvenes como viejos, las medidas se llevaron a cabo bilateralmente. En los ratones jóvenes C57BL/6 lesionados se llevaron a cabo las medidas unilateralmente en el ojo lesionado a 3, 7, 15, 30 y 60 días después de la PRK (T3, T7, T15, T30 y T60, respectivamente). En los ratones viejos C57BL/6 lesionados también se llevaron a cabo las medidas unilateralmente en el ojo lesionado, 15, 30 y 60 días después de la PRK (T15, T30 y T60, respectivamente).

En los ratones TRPM8 KO las medidas de la tasa de lagrimación se realizaron bilateralmente, tanto en los jóvenes (3-6 meses) como en los viejos (22-24 meses).

En los ratones TRPM8 KO viejos, se llevó también a cabo una medida de la tasa de lagrimación después de bloquear el canal TRPV1 con el antagonista SB 366791 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en una solución al 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO) en H<sub>2</sub>O. El protocolo que se siguió para estudiar el efecto del antagonista en la tasa de lagrimación fue el siguiente: tras anestesiarse al ratón, como se ha mencionado previamente, se retiró la película lagrimal con una hemosteta (Sugí® Eyespear pointed tip, Kettencach GmbH & Co., Germany); se esperaron 10 minutos y se midió con la tira de rojo fenol (Zone-Quick); a continuación, se volvió a retirar cuidadosamente la película lagrimal y se aplicó con una pipeta graduada (Gilson Pipetman P2) una gota de 2.5 µL de vehículo (DMSO al 5% en H<sub>2</sub>O) o del antagonista del TRPV1 a 1 mM (SB 366791) y se

dejó incubar durante 10 minutos, transcurridos este tiempo se retiró la gota con la hemosteta y se esperó 10 minutos hasta volver a medir con la tira de rojo fenol (Zone-Quick).

### **Inmunohistoquímica de córnea entera**

Para enuclear los ojos, los animales se anestesiaron profundamente mediante la inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y se sacrificaron por dislocación cervical tras la enucleación.

### **Inmunofluorescencia**

Los ojos recién enucleados se diseccionaron, para obtener la córnea en forma de pétalo, y se fijaron durante una hora a temperatura ambiente (RT) en metanol con dimetil sulfóxido (4:1); seguidamente se post-fijaron durante 5 minutos en metanol absoluto a -21°C. A continuación, las córneas se rehidrataron en una batería de alcoholes decrecientes terminando en PBS 0.1 M pH 7.4 (PBS). Después se incubaron durante 1 hora con BSA al 5%, suero de cabra al 5%, azida sódica al 0.2% y Triton X-100 al 0.3% (solución de bloqueo). Seguidamente, se incubaron las córneas durante 24 horas a RT en la solución de bloqueo junto con el anticuerpo anti-neuronal  $\beta$ -Tubulina III (1:250, Cell Signaling technology, Massachusetts, USA). Tras la incubación, se realizaron tres lavados con BSA al 0.2%, suero de cabra al 0.2%, azida sódica al 0.2% y Triton X-100 al 0.3% (solución de lavado) y seguidamente se incubaron las córneas durante 2 horas con el anticuerpo secundario de ratón contra IgG de Alexa Fluor 594 (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Posteriormente, se llevaron a cabo tres lavados con la solución de lavado y se incubaron durante 10 minutos a RT con 4', 6'-diamidino-2-phenylidole (DAPI; 2  $\mu$ g/mL, Molecular Probes). Finalmente, se montaron las córneas en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (DAKO, Glostrup, Denmark).

### **Método de ABC peroxidasa**

Para los ratones TRPM8 KO se llevó a cabo la ABC peroxidasa. Los globos oculares fueron fijados durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución al 4% de paraformaldehído y ácido pícrico a 0.1M en tampón fosfato salino (PBS,

pH 7.4). Las córneas se diseccionaron y lavaron con PBS. Para aumentar la permeabilidad, se incubaron toda la noche a 37°C en hialuronidasa tipo IV al 0.01% (Sigma-Aldrich) y en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma-Aldrich) (Marfurt et al. 2010) en un buffer de acetato 0.1M (pH 6.0). Después, se lavaron las córneas en PBS con Triton X-100 al 0.1% (PBS-Tx) y se incubaron durante 2 horas en una solución de bloqueo con suero de albúmina bovina al 1% (BSA; Vector Laboratories, Burlingame, CA) y suero de cabra normal al 10% (Vector Laboratories) en PBS-Tx y a temperatura ambiente.

Las córneas se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo de conejo contra GFP policlonal (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR). Tras lavar las córneas con PBS-Tx, se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra contra Ig de conejo (1:200, Vector Laboratories). A continuación, se volvieron a lavar con PBS-Tx las córneas, y seguidamente se incubaron durante 2 horas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (compuesto ABC, Vector Laboratories). Después se volvieron a lavar con PBS Tx y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente con diaminobenzidina al 0.1% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.03%. Después de lavar con PBS, las córneas se deshidrataron en una batería de alcoholes crecientes, terminando en xilol y montando las córneas en portaobjetos con el medio de montaje Entellan (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

### **Adquisición de imágenes**

La obtención de imágenes de fluorescencia y de campo claro se llevó a cabo con un microscopio Leica DM 6000B, equipado con un set de filtros de fluorescencia Leica CTR 6000 y una cámara Leica DFC310 FX y con un microscopio láser confocal espectral Leica TCS SP8X (Leica, Microsystems, Walldroff, Germany). Para las imágenes de fluorescencia de las córneas enteras se realizó una composición en mosaico de la córnea completa a una magnitud de 200X, utilizando el software LASX y configurando una distancia de 3.5 µm de espacio en el eje- Z.

## **Análisis morfológico**

### **Análisis morfológico de los ratones jóvenes y viejos WT C57BL/6 tras la cirugía PRK**

Las imágenes se analizaron utilizando el software de análisis de imágenes Fiji. Las córneas enteras se dividieron en 5 áreas de estudio (Figura 8). Cuatro zonas periféricas, donde se delimitaron dos cuadrados cada uno de  $0.25 \text{ mm}^2$  ( $500 \times 500 \mu\text{m}$ ), cuyos bordes estaban, al menos a  $200 \mu\text{m}$  de distancia del limbo y a  $500 \mu\text{m}$  de distancia entre ellos y una quinta área que se delimitó como el área de la lesión en el centro de la córnea y se determinó por la ausencia de la tinción nuclear DAPI en las córneas lesionadas (promedio de lesión  $1.46 \pm 0.13 \text{ mm}^2$ ). Para la comparación, en las córneas no lesionadas, la zona central equivalente se determinó como un área circular de  $1.5 \text{ mm}^2$  en el centro de la córnea. Esta área circular se dividió en 3 círculos concéntricos, siendo el primero el más grande y el borde de la lesión en las córneas lesionadas. En estas áreas, la densidad nerviosa se calculó como el número de fibras nerviosas subbasales por  $\text{mm}^2$ .

Los nervios subbasales en la periferia se cuantificaron como el número de fibras que interseccionan por una línea trazada en los cuadrados y en el centro de la córnea (tanto de las lesionadas como de las sanas) como el número total de nervios que intersectan en cada círculo concéntrico, y se expresaron como número de fibras del plexo subbasal por  $\text{mm}^2$ .

Los sitios de penetración a través de la lámina basal de los haces subbasales se contaron en el total de la córnea, diferenciando entre la periferia y el área lesionada (o el área central correspondiente en las córneas no lesionadas), y se expresaron en penetraciones por  $\text{mm}^2$ .

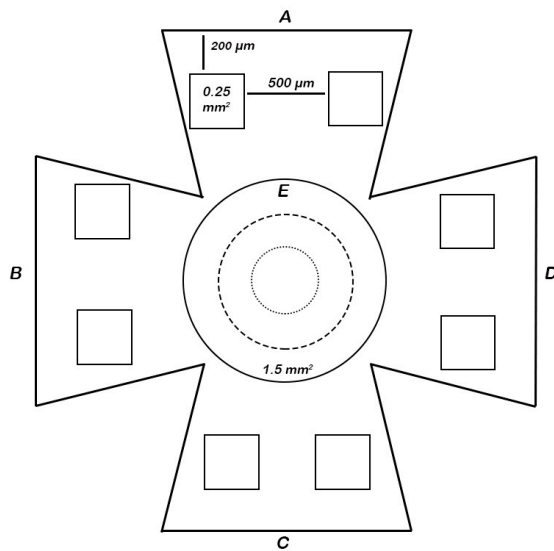


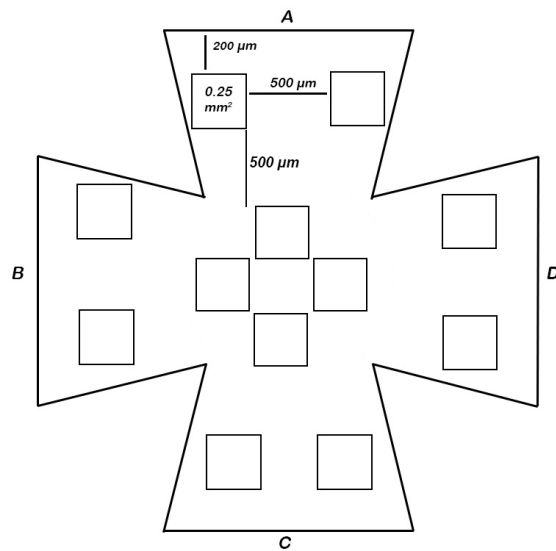
Figura 8. Representación esquemática de las áreas corneales de estudio en los ratones jóvenes y viejos lesionados. Se definieron cuatro zonas periféricas (A-D). El área correspondiente a la lesión por PRK se delimitó con un círculo (E). Esta área circular se subdividió en tres áreas concéntricas (aproximadamente 1.5, 1 y 0.5 mm de diámetro), correspondiendo con el círculo más externo con el borde de la lesión. En las córneas no lesionadas, el círculo E se delimitó por un área equivalente en el centro de la córnea.

#### **Análisis morfológico de los ratones jóvenes y viejos TRPM8 KO**

En los ratones TRPM8 KO, las córneas enteras se dividieron en 4 cuadrantes. Las densidades epiteliales se determinaron en una zona central y 2 zonas periféricas por cada cuadrante. Las zonas periféricas se definieron como dos cuadrantes de 0.25 mm<sup>2</sup> (500x500 μm), cuyos bordes periféricos estaban, al menos a 200 μm de distancia del limbo interno. Además, estos cuadrantes estaban separados al menos a 500 μm de cada una. La zona central se definió como un cuadrado de 0.25 mm<sup>2</sup> a 500 μm de distancia de los cuadrados periféricos y a una distancia aproximada de 1.2 mm del limbo.

Las densidades de nervios corneales en los  $0.25 \text{ mm}^2$  se determinaron mediante micrografías obtenidas con el microscopio de campo claro Leica DM6000B. Se obtuvieron dos imágenes independientes de cada zona de  $0.25 \text{ mm}^2$ : una imagen se tomó a nivel de fibras subbasales y la otra al de las capas epiteliales, incluyendo los nervios intraepiteliales que derivan de los axones subbasales.

Las imágenes se analizaron utilizando el software de análisis FIJI (ImageJ 1.4, NIH, Bethesda, MD). La densidad nerviosa se calculó como el número de axones subbasales o el número de terminaciones nerviosas por  $\text{mm}^2$ . Los nervios subbasales se cuantificaron como el número de ellos que intersectan una línea dibujada dentro del cuadrado. El número total de terminaciones intraepiteliales se cuantificó dentro de cada área, definiendo el tipo de terminación nerviosa (simple, ramificado, o complejo) (Ivanusic et al. 2013). Los puntos de penetración de los haces subbasales a través de la lámina basal se cuantificaron en toda el área de la córnea y se expresaron como penetraciones por  $\text{mm}^2$ .





*Figura 9. Representación esquemática de las áreas corneales de estudio en ratones TRPM8 KO, jóvenes y viejos. Se definieron cuatro cuadrantes (A-D), compuestos cada cuadrante por: dos cuadrados en la periferia y uno en el centro corneal de una superficie de 0.25 mm<sup>2</sup> cada cuadrado de muestreo.*

### **Electrofisiología**

Para los estudios electrofisiológicos, se realizaron registros de las terminaciones nerviosas corneales únicas *in vitro*, como se describió en trabajos previos. Resumidamente, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se enuclearon los globos oculares para sumergirlos en una solución salina fisiológica, similar a la lágrima (en mM: NaCl [128], KCl [5], NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [1], NaHCO<sub>3</sub> [26], CaCl<sub>2</sub> [2.4], MgCl<sub>2</sub> [1.3] y glucosa [10]) donde se burbujearon con carbógeno (5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>). Después se colocó el ojo en una cámara de registro, donde era perfundido continuamente con la misma solución salina fisiológica. La temperatura durante el experimento se controlaba usando un peltier.

La actividad eléctrica extracelular de las terminaciones nerviosas sensoriales únicas de la superficie corneal se registró con un filamento de Ag/AgCl ubicado dentro de una micropipeta de vidrio de borosilicato de aproximadamente 50 µm de diámetro, llena con solución salina fisiológica. Con la ayuda del micromanipulador, la pipeta de registro se colocaba en la superficie corneal bajo ligera succión, sucesivamente en distintos puntos, tanto en el área lesionada como en la periferia (promedio de 15 sellos por córnea, 10 en el área lesionada y 5 en la periferia), buscando la observación de impulsos eléctricos originados en las terminaciones nerviosas (NTIs). Los NTIs se amplificaron con un amplificador AC (Neurolog NL104, Digitimer, Welwyn, Reino Unido) y se almacenaron a 10 kHz en un ordenador, utilizando la interfaz CED micro 1401 y el software Spike 2 (ambos de Cambridge Electronic Design, Cambridge).

Únicamente se analizaron los registros que contenían NTIs de terminaciones nerviosas únicas, bien definidos. Estos registros de NTIs, se distinguían claramente del ruido (~10 µV pico a pico) y tenían amplitudes y formas de onda similares, indicando que procedían de la misma terminación nerviosa sensorial.

Para prevenir el deterioro de la preparación con el tiempo, la duración total del experimento se limitó a un máximo de 120 min (30 min de preparación y 90 min de registro). El porcentaje de puestas exitosas, o tasa de éxito de registro, refiere el número de sellos hechos en la córnea en los que se registró actividad nerviosa, en relación al total de intentos.

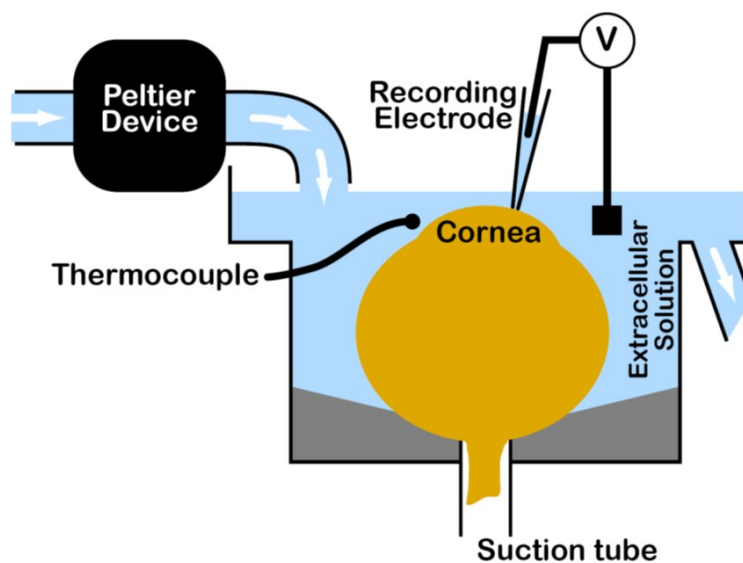


Figura 10. Representación esquemática del registro extracelular corneal. El globo ocular se coloca en la cámara de registro y se sujeta mediante la succión de la parte posterior de este. La cámara se llena con la solución de registro, regulando la temperatura con un Peltier. La pipeta de registro se introduce en el baño y se coloca en la superficie corneal para llevar a cabo el registro de la actividad nerviosa.

#### Protocolo experimental

La pipeta de registro se colocó en puntos distribuidos regularmente por toda la superficie corneal, separados por una distancia aproximada de 0.2 mm. Primero, se exploró la mitad de la córnea, comenzando por el centro y descendiendo hacia la periferia; luego, se rotó el ojo y se exploró el lado opuesto de la córnea.

Después de 90 minutos de registro, se introdujo el ojo en el líquido de fijación y se preparó para estudios morfológicos.

La estimulación de frío se llevó a cabo disminuyendo la temperatura de la solución de perfusión (de ~ 34 °C a ~ 14 °C o 5°C, en terminaciones de frío o polimodales o mecano-nociceptores, respectivamente), generando una rampa de frío con una velocidad de enfriamiento promedio de 0.6 °C·s<sup>-1</sup>; cuando se alcanzaba el pico de temperatura de ~ 14 °C o 5°C, el calentamiento se aplicaba a una velocidad similar para volver a la temperatura basal. Después de un período de reposo de 120s, se realizaba la estimulación mecánica moviendo hacia adelante la pipeta con un movimiento controlado con el micromanipulador. La presión con la pipeta se mantuvo durante 10s. Dos minutos después, se aplicaba una rampa de calor (de 34°C a ~ 52°C a 0.5°C·s<sup>-1</sup>, ~ 30s de duración), volviendo al valor inicial de temperatura de 34°C cuando se alcanzaba el máximo de temperatura buscado.

### **Soluciones**

**Mentol** (20 μM): preparado de una disolución stock de 20 mM en etanol, diluida a su concentración final con la solución salina extracelular control (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA).

**Capsaicina** (1 μM): preparado de una disolución stock de 1 mM en etanol disuelta a su concentración final con la solución salina extracelular (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA).

### **Análisis de actividad de NTI**

Tasa de éxito de registro: Indica el porcentaje de intentos exitosos registrando una terminación en relación al número total de intentos.

Actividad espontánea: Definida como el promedio de la frecuencia basal en impulsos nerviosos por segundo (imp·s<sup>-1</sup>) a la temperatura basal (33.9 ± 0,07 °C) medida durante los 60 s previos al inicio de un estímulo.

Los siguientes parámetros de la actividad de NTI se analizaron en los diferentes tipos de terminaciones:

Terminaciones termorreceptoras de frío:

*Umbral de frío:* temperatura (°C) durante la rampa a la cual la frecuencia de NTI aumenta al valor del promedio de frecuencia de NTI medida durante los 10 s previos al periodo que precede el inicio de la rampa de frío, más 3 veces su desviación estándar.

*Respuesta a frío:* expresada como el promedio de la frecuencia de NTI entre el *umbral de frío* y los valores máximos de frecuencia durante la rampa de frío.

*Frecuencia máxima en frío:* frecuencia ( $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) máxima de disparo de NTIs alcanzada durante la rampa de frío.

*Silenciamiento:* temperatura (°C) en la que se registra el último disparo durante la rampa de frío.

*Respuesta mecánica:* número total de NTIs durante 10 s siguientes al inicio de la estimulación mecánica. Se comparó con el número total de NTIs medidos durante los 10 s inmediatamente antes de la aplicación del estímulo mecánico.

Terminaciones nociceptoras polimodales y mecano-nociceptoras:

*Respuesta a frío:* número total de NTIs durante los 30 s siguientes al inicio de la rampa de frío. Se comparó con el número total de NTIs durante los 30 s inmediatamente antes de la rampa de frío. Se expresó también la respuesta a frío como la variación de la frecuencia ( $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante la rampa de frío con respecto al valor de dicha frecuencia en los 30 s previos.

*Respuesta mecánica:* número total de NTIs durante los 10 s siguientes al inicio del estímulo mecánico. Se comparó con el número total de NTIs durante los 10 s inmediatamente antes al estímulo mecánico. Se expresó también la respuesta mecánica como la variación de la frecuencia ( $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante el estímulo mecánico con respecto al valor de dicha frecuencia en los 10 s previos.

*Respuesta a calor:* número total de NTIs durante los 30 s siguientes al inicio de la rampa de calor. Se comparó con el número total de NTIs durante los 30 s inmediatamente antes de la rampa de calor. Se expresó también la respuesta a

frío como la variación de la frecuencia ( $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante la rampa de calor con respecto al valor de dicha frecuencia en los 30 s previos.

*Umbral de calor:* temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante la rampa de calor a la cual la frecuencia de NTIs aumenta al valor del promedio de frecuencia de NTI medida durante los 30 s previos al periodo que precede el inicio de la rampa de calor más 3 veces su desviación estándar.

*Duración de respuesta a calor:* tiempo transcurrido desde el que se alcanza el umbral de calor hasta el último impulso nervioso previo a alcanzar la temperatura máxima de la rampa.

### **Análisis estadístico**

Las comparaciones estadísticas se realizaron usando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, CA), Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) e InStat 3 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. Para los datos de electrofisiología, se utilizó la prueba t de Student no emparejada, con la corrección de Welch para pruebas paramétricas y el test de Mann-Whitney para las no paramétricas, y el test-z. Para el análisis de las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal se llevó a cabo el test-z con el software SigmaPlot (Systat Software Inc, San José, CA). Las medidas morfológicas se compararon utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de comparaciones múltiples, para las medidas paramétricas se llevó a cabo el test de Tukey-Kramer con la corrección de Bonferroni y para las no paramétricas se llevó a cabo el test Kruskal-Wallis Test, utilizando el test Dunn de comparaciones múltiples. \*\*\* Pvalor <0.001, \*\* Pvalor <0.01, \* Pvalor <0.05, ns Pvalor > 0.05.

## IV. RESULTADOS

### A) EFECTO DE LA LESIÓN QUIRÚRGICA (QUERATECTOMÍA FOTORREFRACTIVA, PRK) SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA FUNCIÓN DE LOS NERVIOS CORNEALES

#### A1) RATONES JÓVENES

##### A1.1 Densidad de la inervación y proporción de los diferentes tipos funcionales de receptores en la córnea de ratones intactos.

A fin de establecer las características generales morfológicas y funcionales de la inervación corneal, previas a la PRK, en 7 ratones intactos de la misma edad que los operados, se analizó la arquitectura de los nervios corneales en un área circular central de la córnea, de dimensiones iguales a la dañada en los ratones operados, así como en la periferia de ese círculo central. De igual modo, se registró en ambas áreas la actividad eléctrica de sus terminaciones.

##### *Área equivalente a la de lesión*

En los ratones intactos, en el área equivalente a la de lesión en los ratones operados, se observó una elevada densidad de fibras nerviosas del plexo subbasal ( $574.5 \pm 66.5$  axones/mm<sup>2</sup>, n=6, **Tabla 1**). Estas llegaban desde la periferia y desde las ramificaciones subbasales (leashes) originadas en los fascículos nerviosos que entran en el epitelio a través de los puntos de penetración de la lámina basal presentes en el área central de la córnea ( $9.9 \pm 1.0$  penetraciones/mm<sup>2</sup>, **Tabla 1**). Las fibras nerviosas se organizaban de forma paralela y concéntrica, formando en el ápex corneal la estructura denominada vórtex (**Figura 12**). (Marfurt et al. 2010)

Para obtener los valores control de los diferentes parámetros de actividad eléctrica en la superficie corneal intacta, en 7 córneas sin lesionar se llevó a cabo

un mapeo sistemático de esta área central con un electrodo de registro, a fin de identificar impulsos nerviosos en las terminaciones (NTIs) durante un tiempo máximo de 90 minutos por córnea. A partir de dicho mapeo, se calculó la tasa de éxito de registro, es decir, el promedio de unidades activas funcionales encontradas dentro del número de intentos de registro electrofisiológico efectuados (González-González et al. 2017).

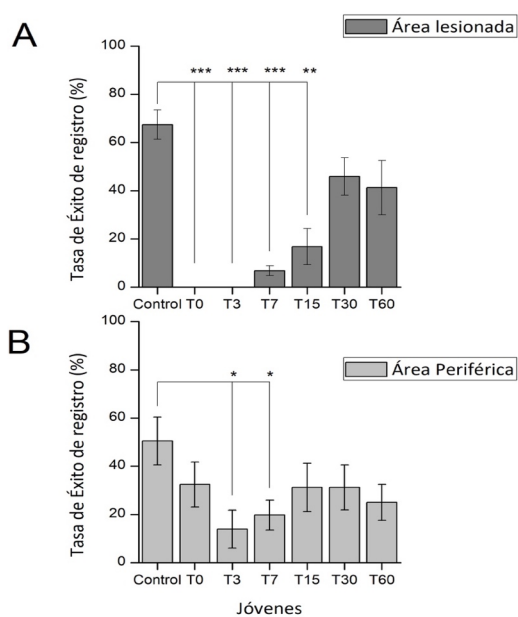
En la córnea de esos ratones jóvenes sin lesionar ( $n=7$ ), la tasa de éxito de registro en el área equivalente a la de lesión fue de  $67.4\pm 6.1\%$  (**Figura 11-A**). Atendiendo a la presencia espontánea de NTIs y al cambio de actividad obtenido en respuesta a los distintos estímulos naturales, se calculó la proporción de terminaciones nerviosas de las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal, clasificándolas de acuerdo a trabajos previos (González-González et al. 2017), en **mecano-nociceptores**, si respondían únicamente a estímulos mecánicos; **nociceptores polimodales**, si respondían a estímulos mecánicos y/o calor y **termorreceptores de frío**, cuando respondían a estímulos de frío.

Siguiendo el criterio establecido en trabajos previos (González-González et al. 2017) los termorreceptores de frío se subdividieron a su vez en, termorreceptores de frío de alta actividad espontánea y bajo umbral (HB-LT, del inglés "High Background, Low Threshold") y en termorreceptores de frío de baja actividad espontánea y alto umbral (LB-HT, del inglés "Low Background, High Threshold"). De aquí en adelante, emplearemos sólo la presencia de actividad espontánea alta ( $>1.5 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) o baja ( $<1.5 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ), para referirnos a las dos poblaciones de termorreceptores (HB y LB, respectivamente), que son claramente distinguibles en las córneas intactas del ratón joven. Las terminaciones que mostraban actividad eléctrica, pero que no pudieron ser clasificadas con precisión suficiente se denominaron "indefinidas". En el área equivalente a la de lesión en los ratones jóvenes sin lesionar (**Figura 12-C**) los termorreceptores de frío fueron identificados en el 32.4% (11/34) de los intentos; de ellos, un 26.5% fueron HB (9/34) y un 5.9% LB (2/34). Los nociceptores polimodales representaron un 11.8% (4/34), los mecano-nociceptores un 2.9% (1/34); y un 17.6% (6/34) correspondió a terminaciones indefinidas.

### Área periférica a la de lesión

En el área periférica que rodea a la de lesión en los ratones operados, la totalidad de las fibras subbasales proviene de las ramas estromales que entran en el epitelio a través de puntos de penetración de la lámina basal ( $8.4 \pm 0.4$  penetraciones/ $\text{mm}^2$ ,  $n=6$ , **Tabla 1**). Estas fibras se ramificaban en “leashes” de fibras lisas y rectilíneas paralelas entre sí, dirigiéndose al centro de la córnea. La densidad de fibras del plexo subbasal en esta zona periférica era un 60% inferior a la del área central en la que se practica la lesión ( $233.1 \pm 6.3$  axones/ $\text{mm}^2$ ,  $n=6$ , **Tabla 1**).

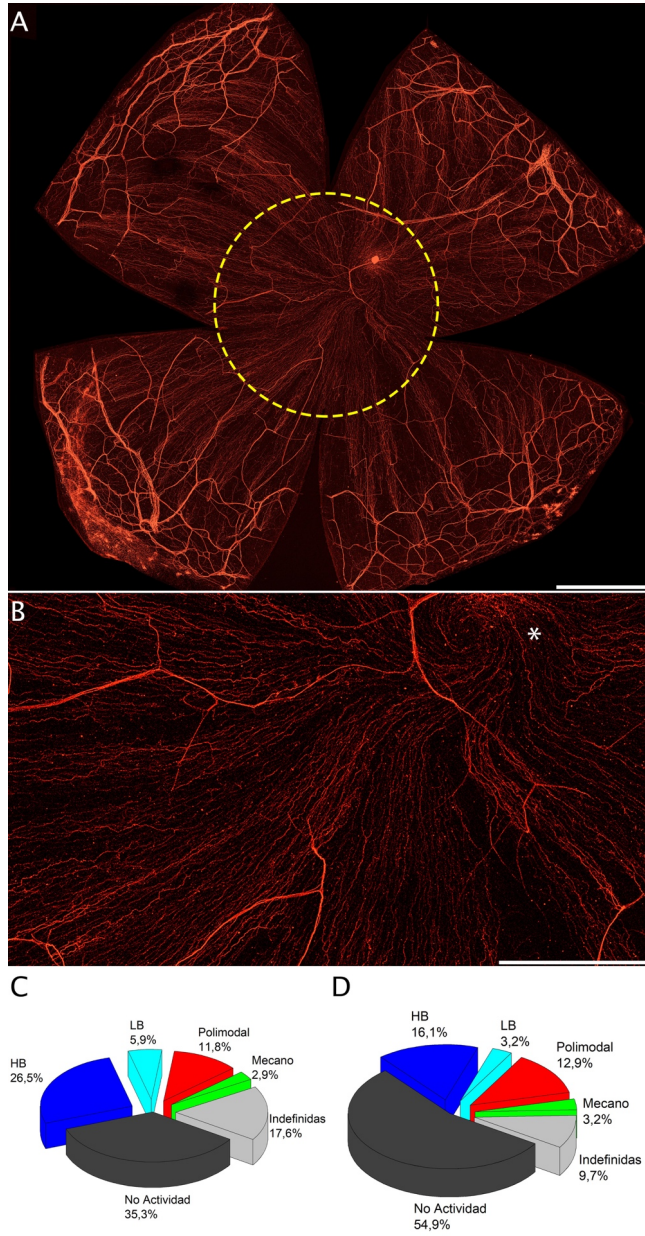
La tasa de éxito de registro en la periferia de los ratones sin lesionar fue del  $50.5 \pm 9.9\%$  ( $n=7$ , **Figura 11-B**). La incidencia de los distintos tipos funcionales de terminaciones en el área periférica de la córnea (**Figura 12-D**) fue de un 19.4% de termorreceptores de frío (6/31), de los cuales un 16.1% fueron HB (5/31) y un 3,2% LB (1/31). Un 12.9% nociceptores polimodales (4/31) y un 3.2% (1/31) mecano-nociceptores. Las indefinidas representaron el 9.7% (3/31).



**Figura 11.** Tasa de éxito de registro, expresada como el porcentaje de unidades activas obtenidas entre el número de intentos de registro, en el área lesionada (A) y en el área



*periférica (B) de ratones jóvenes adultos WT. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001*



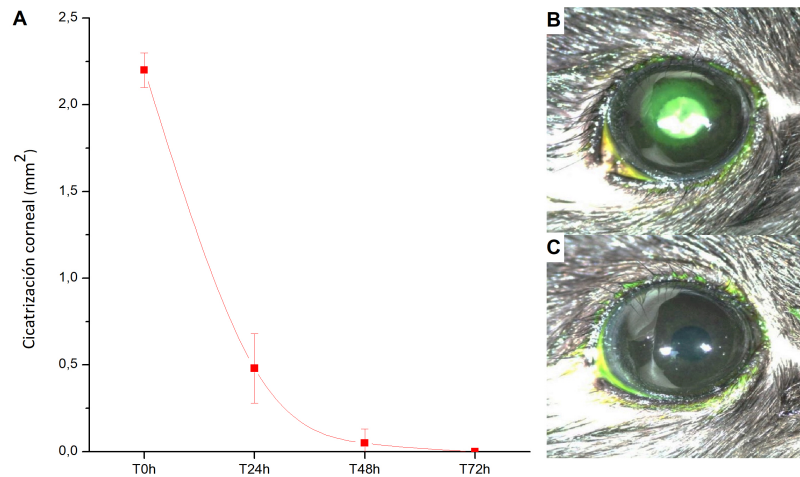
**Figura 12.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) en una córnea completa intacta, a baja magnificación (200X), en la que se marca el área equivalente a la lesión

(A, círculo). B) ampliación del área central de la córnea, el asterisco señala la formación del vórtex. En C) y D) se representa la probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en el área equivalente a la de la lesión y en el área periférica, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$

## **A1.2. Cambios en la densidad de inervación e incidencia porcentual de los diferentes tipos funcionales de receptores en ratones operados, a distintos tiempos tras la cirugía PRK**

### **A1.2.1 Evolución macroscópica de la lesión corneal**

Inmediatamente después de la lesión, se llevó a cabo una tinción con fluoresceína *in vivo* en siete ratones a fin de delimitar en la córnea el área circular de daño epitelial (**Figura 13**) cuya extensión fue de  $2.2 \pm 0.1 \text{ mm}^2$ . Veinticuatro horas después, el tamaño de la lesión en los mismos animales había disminuido a  $0.46 \pm 0.22 \text{ mm}^2$ . Dos días más tarde, no se apreciaba lesión alguna en 4 de los ratones lesionados y fue muy pequeña ( $0.05 \pm 0.08 \text{ mm}^2$ ) en los tres restantes. Al tercer día, la fluoresceína no marcaba lesión en ninguno de los ojos (**Figura 13**). La lesión corneal con PRK causó inicialmente una marcada opacidad corneal, que fue revirtiendo progresivamente con el tiempo, aunque afectaba todavía a un 28% de las córneas treinta días después de la lesión. A los 60 días de la lesión había desaparecido en todos los animales.



**Figura 13.** A) Curso temporal de la cicatrización de la lesión tras la PRK, medida como área de la superficie corneal con daño epitelial, teñida con fluoresceína a distintos tiempos de la cirugía. B) Ejemplo de lesión inmediatamente tras la cirugía y 72 horas después de la lesión en la misma córnea (C).

### A1.2.2. Modificaciones morfo-funcionales de la inervación corneal

#### A1.2.2.1 Inmediatamente post-Lesión (T0)

##### Área lesionada

En T0, el epitelio y los nervios del área central de la córnea habían desaparecido por completo (n=5, **Figura 14-A**). Lo mismo ocurría con el plexo subbasal y los puntos de penetración de la lámina basal de esa área, perdurando únicamente algunas ramas estromales medias, que a menudo terminaban abruptamente en el propio estroma (**Figura 14-B**).

En concordancia con la ausencia de fibras nerviosas, la tasa de éxito de registro en la zona lesionada, inmediatamente después de la lesión fue nula (**Figura 11-A**).

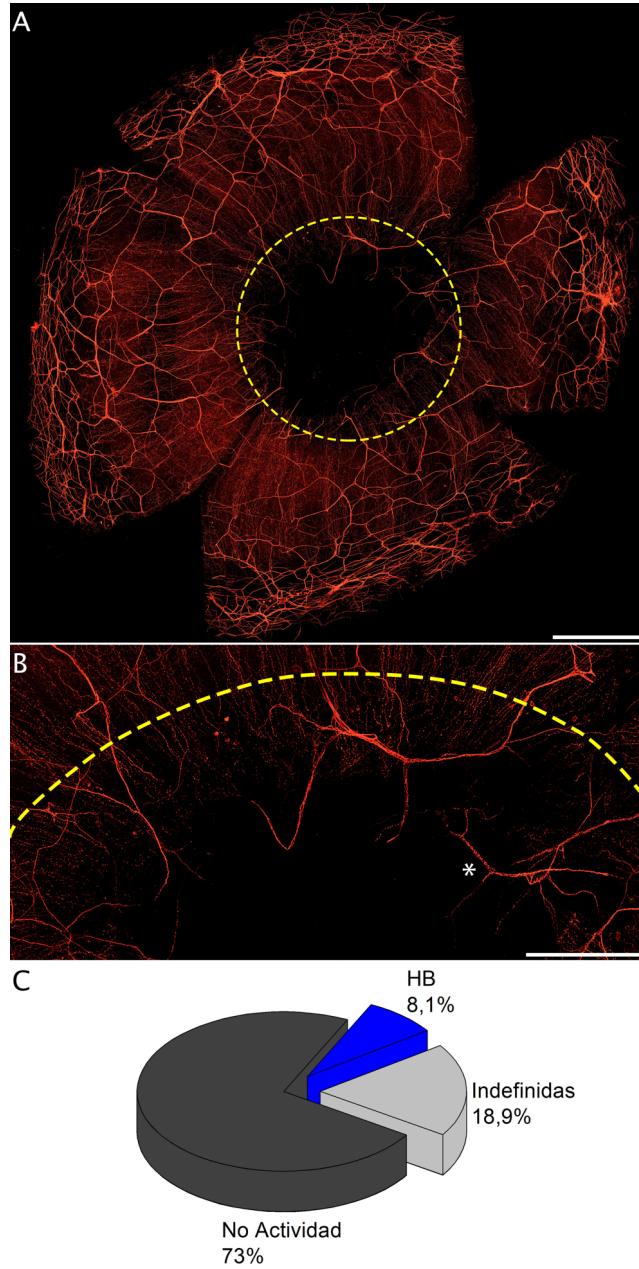
### Área periférica

En la periferia, la densidad de fibras nerviosas y de puntos de penetración medidos después de la cirugía fueron ligeramente más bajos que en la misma área de las córneas control (**Figura 14-A**, Tabla 1). La tasa de éxito de registro, inmediatamente después de la lesión (T0), en esta área disminuyó respecto a la obtenida en los ratones jóvenes sin lesionar (n=5; 32.4±9.3%, **Figura 11-C**).

En general, en la periferia de la córnea de los ratones lesionados, la proporción relativa de las distintas poblaciones funcionales de terminaciones nerviosas que la inervan osciló a lo largo de los distintos tiempos de estudio (**Figura 14-C**). Inmediatamente después de la lesión, los termorreceptores de frío HB habían disminuido ligeramente (3/37), mientras que habían desaparecido los termorreceptores de frío LB (0/37), los nociceptores polimodales y los mecanociceptores. Además, se observó un aumento ligero de las terminaciones indefinidas (7/37).

**Tabla 1.** Valores de las densidades de nervios subbasales y los puntos de penetración nerviosos en las distintas áreas y en los distintos tiempos de estudios tras la PRK y en córneas intactas de ratones jóvenes sin lesionar. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001

Grupos Experimentales	Densidad Nerviosa		Densidad de Penetraciones	
	Área lesionada (axones/mm <sup>2</sup> )	Área Periférica	Área lesionada (penetraciones/mm <sup>2</sup> )	Área Periférica
<b>Control</b> (n=6)	574.5±66.5	233.1±6.3	9.9±1.0	8.4±0.4
<b>T0</b> (n=5)	0±0	200±7.2 *	0±0 ***	8.1±0.4
<b>T3</b> (n=4)	42.9±11 ***	166.1±8.2 ***	0.8±0.5 *	7.3±0.3 **
<b>T7</b> (n=6)	143.0±16.3 ***	185.4±5.9 ***	7.9±1.5	9.1±0.6
<b>T15</b> (n=5)	226.5±12.5 ***	190±6.2 ***	10.0±0.9	8.1±0.4
<b>T30</b> (n=6)	351.6±36.1 **	208.5±5.4	9.4±0.4	9.0±0.4
<b>T60</b> (n=5)	349.7±31.1 **	236.14±7.9	10.9±1.1	11.8±0.4 ***



**Figura 14.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) de la córnea completa a baja magnificación (200X) inmediatamente después de la lesión, que está delimitada

por un círculo (A, T0). (B) Ampliación incluyendo el área lesionada y el borde de la lesión, el asterisco marca troncos estromales profundos. C) probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en la periferia. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). No se encontraron el resto de poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal. Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$

### **A1.2.2.2. 3 días post-Lesión (T3)**

#### **Área lesionada**

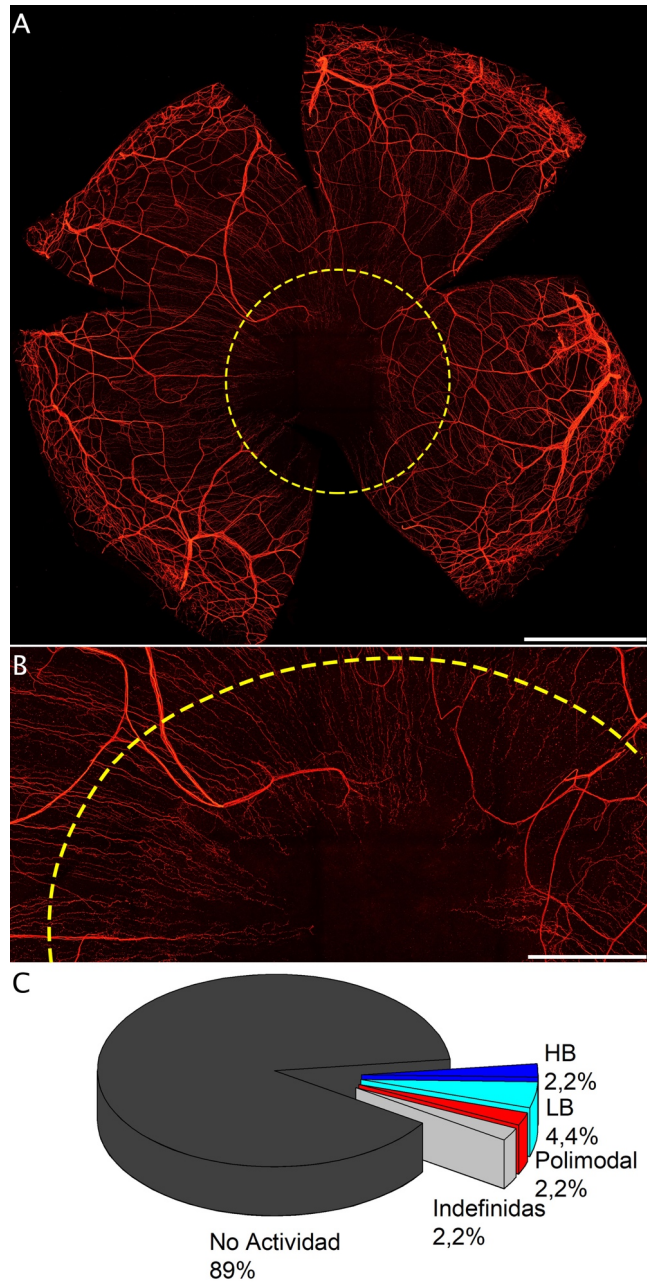
En T3, se empezaron a observar axones individuales y rectilíneos, que nacían de nervios subbasales dañados y entraban en el área lesionada, aunque la mayoría se detenían abruptamente en el borde de la lesión (**Figura 15**). La densidad global de estas fibras en regeneración presentes en la zona lesionada era baja, un  $7.5 \pm 1.9\%$  del valor de densidad medido en la misma área en los ratones intactos (**Figura 16-A; Tabla 1**). Se observaban también pocos puntos de penetración en el área lesionada, principalmente localizados en las zonas cercanas al borde de la lesión, aunque con una densidad significativamente inferior a la de los ratones sin lesionar ( $n=5$ ,  $3.3 \pm 2.5$  penetraciones/ $\text{mm}^2$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA, **Figura 18-A**).

La actividad NTI en este tiempo continuó siendo indetectable.

#### **Área periférica**

En el área alrededor de la lesión, la densidad de fibras del plexo subbasal había disminuido significativamente respecto la misma área en las córneas control (**Figura 16-B; Tabla 1**). La tasa de éxito de registro continuó disminuyendo, alcanzando en T3 el valor mínimo ( $n=5$ ,  $13.9 \pm 7.9\%$ ,  $p < 0.05$ , Unpaired t Test, **Figura 11-B**).

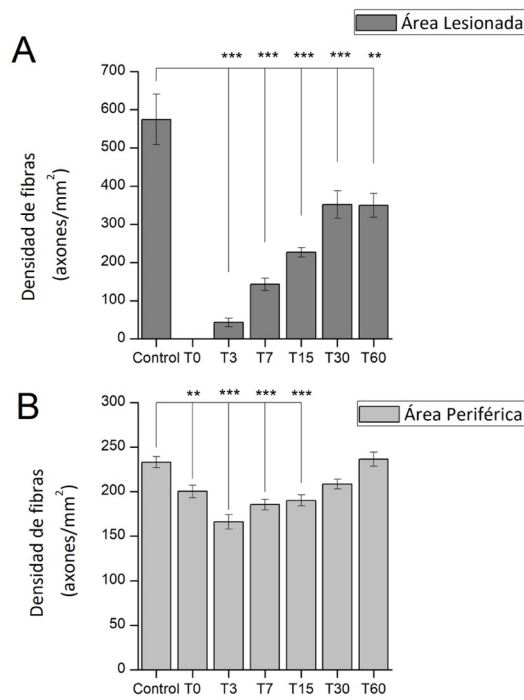
Tres días después de la lesión (**Figura 15-C**), se observó una gran disminución de los termorreceptores de frío HB (1/45) y de las terminaciones indefinidas (1/45), aunque reaparecieron los termorreceptores de frío LB (2/45) y los nociceptores polimodales (1/45).



**Figura 15.** A, B Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) en córnea completa a baja magnificación (200X), tres días después de la lesión (T3). B) Ampliación del borde



y área lesionada. C, probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en la periferia. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos. Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$



**Figura 16.** Densidad media de los axones del plexo subbasal en el área lesionada (A; gris oscuro) y en la periferia (B; gris claro) en los ratones jóvenes intactos (control) e inmediatamente después de la lesión y a 3, 7, 15, 30 y 60 días después de la PRK (T0, T3, T7, T15, T30 y T60, respectivamente). El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001

### **A1.2.2.3. 7 días post-Lesión (T7)**

#### **Área lesionada**

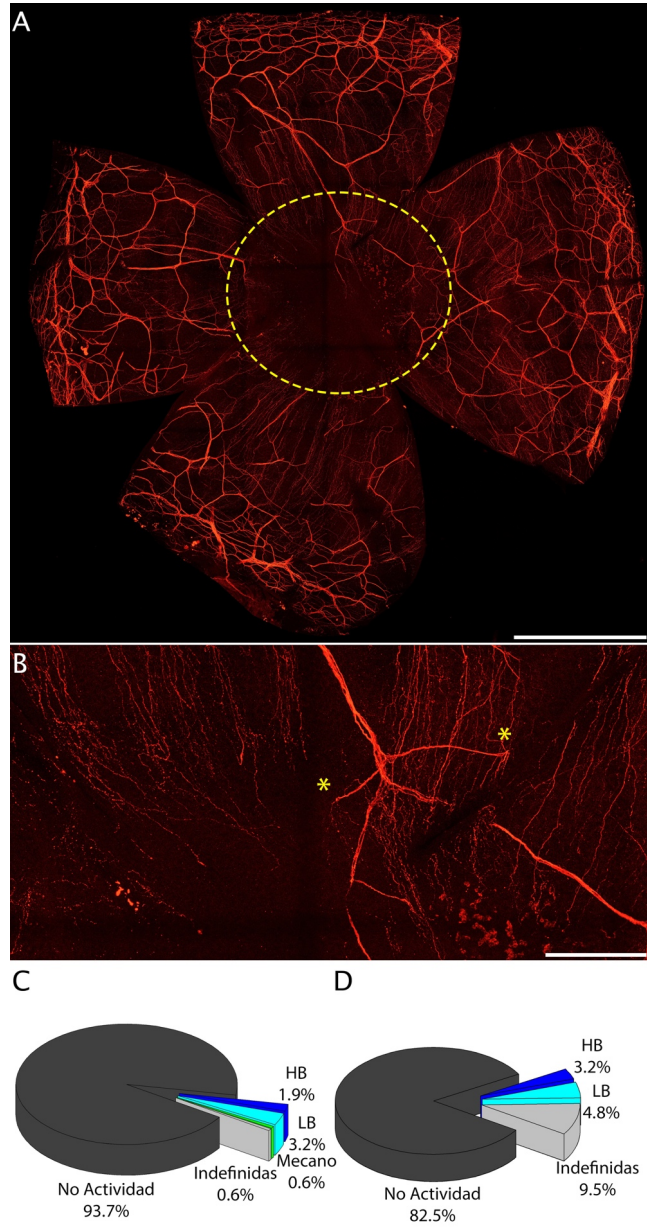
En T7, se observó un incipiente proceso de remodelado de los nervios estromales que se encuentran debajo del área lesionada, dando lugar a la presencia de nuevos puntos de penetración nerviosa a través de la lámina basal (**Figura 17**) con valores de densidad similares a los normales (**Tabla 1**). Los axones procedentes del plexo estromal subepitelial que comenzaban a entrar en la zona lesionada eran cortos, tortuosos y ramificados. Sin embargo, la mayoría de los axones que penetraban en el área lesionada procedían de los “leashes” subbasales que crecían en dirección central (**Figura 17**). Aun así, la densidad nerviosa en la zona lesionada seguía siendo significativamente más baja que en las córneas controles, con una densidad del  $24.9 \pm 2.8\%$  ( $n=6$ ,  $p < 0.001$ , ANOVA) respecto a la misma área de las córneas intactas.

A los 7 días de la PRK comenzó a registrarse actividad NTI en la zona lesionada, aunque con una tasa de éxito de registro muy inferior al control ( $n=13$ ,  $6.8 \pm 7.7\%$ ,  $p < 0.0001$ , Unpaired t test, **Figura 11-A**). Además, la presencia de los diferentes tipos de receptores era distinta en comparación con las córneas normales (**Figura 17-C**), con un número muy bajo de termorreceptores de frío HB (3/155,  $p < 0.001$ , z-test), de terminaciones indefinidas (1/155,  $p < 0.001$ , z-test) y de mecano-nociceptores (1/155). No se encontraron terminaciones nociceptoras polimodales (0/155,  $p < 0.001$ , z-test)

#### **Área periférica**

En la periferia, la densidad de fibras nerviosas continuó aumentando ligeramente (**Figura 16-B**; **Tabla 1**), y la tasa de éxito empezó a incrementarse, aunque fue significativamente inferior a la obtenida en los ratones sin lesionar ( $n=13$ ,  $19.7 \pm 6.2\%$ ,  $p < 0.05$ , Unpaired t Test, **Figura 11-B**).

En T7 (**Figura 17-D**) se observó un ligero aumento de los termorreceptores de frío HB y LB (2/63 y 3/63, respectivamente), mientras que los nociceptores polimodales (0/63,  $p < 0.05$ , z-test) y los mecano-nociceptores (0/63) estaban ausentes,



**Figura 17.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) de córnea completa a baja magnificación (200X), siete días después de la lesión (T7). B) Área correspondiente al

borde de la lesión, los asteriscos marcan nuevos puntos de penetración en el área lesionada. C y D) probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en el área lesionada y en la periferia, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los mecano-nociceptores (verde) y las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu$ m; B: 200  $\mu$ m

#### **A1.2.2.4. 15 días post-Lesión (T15)**

##### **Área lesionada**

En T15, la recuperación de la inervación del plexo subbasal en el área lesionada superó la densidad global de las fibras nerviosas de la periferia ( $190 \pm 6.2$  axones/ $\text{mm}^2$ ,  $n=5$ , **Tabla 1**) por primera vez desde que se llevó a cabo la lesión. Esto se debió al aumento del número de penetraciones nerviosas estromales ( $10.0 \pm 0.9$ ,  $n=5$ , **Tabla 1**) y a la incorporación de fibras nerviosas procedentes de la periferia, que formaban arborizaciones ramificadas y tortuosas (**Figura 19**). Aun así, la densidad nerviosa siguió siendo inferior a la de los controles ( $n=5$ ,  $39.4 \pm 2.1\%$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA, **Figura 16-A**).

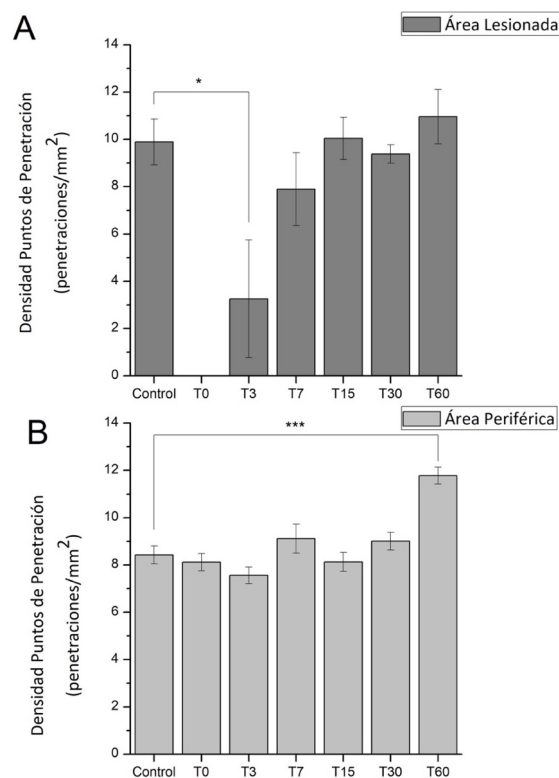
La tasa de éxito del registro se incrementó respecto a la obtenida en T7, aunque continuó siendo significativamente inferior a la del valor promedio del control ( $n=10$ ,  $16.5 \pm 7.5\%$ ,  $p < 0.001$ , Unpaired t test, **Figura 11-A**). No obstante, no se pudieron registrar unidades activas de terminaciones nerviosas nociceptoras polimodales en la zona lesionada ( $0/94$ ,  $p < 0.005$ , z-test) y se observó una leve recuperación en la proporción termorreceptores de frío HB ( $2/94$ ) y en los mecano-nociceptores ( $1/94$ ), mientras que los termorreceptores de frío LB disminuyeron ligeramente ( $2/94$ , **Figura 19-C**).

##### **Área periférica**

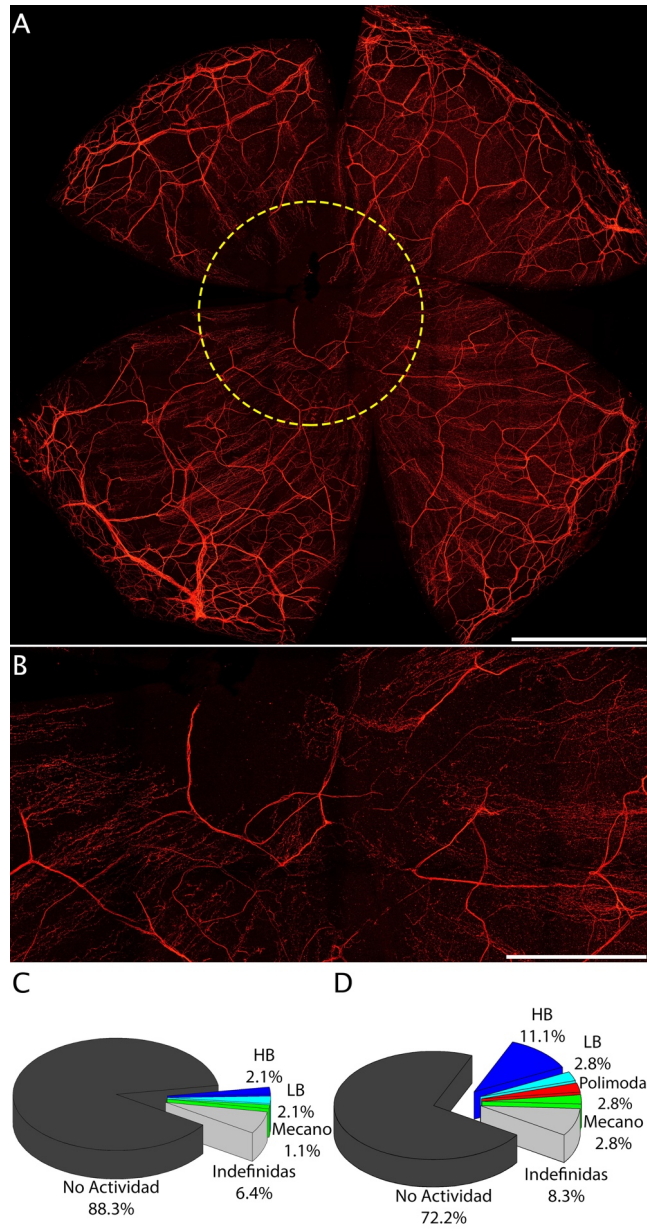
La periferia aumentó su densidad nerviosa respecto a los valores obtenidos en los tiempos previos (**Figura 16-B**). A su vez, la tasa de éxito de registro aumentó en T15, alcanzando el valor máximo ( $31.2 \pm 10\%$ ,  $n=10$ , **Figura 11-B**).

En T15 se registró por primera vez en la periferia, desde la realización de la PRK, actividad en las terminaciones de todas las poblaciones neuronales (**Figura 19-**

**D).** Los termorreceptores de frío HB y LB, y los mecano-nociceptores alcanzaron unas proporciones similares a las obtenidas en las córneas control (4/36, 1/36, 1/36, respectivamente). Se registraron proporciones inferiores a los controles en los nociceptores polimodales y las terminaciones indefinidas (1/36 y 3/36, respectivamente).



**Figura 18.** Densidad media de los puntos de penetración de la lámina basal en el área lesionada (A, gris oscuro) y en la periferia (B, gris claro) en ratones jóvenes intactos (control) e inmediatamente después de la lesión y a 3, 7, 15, 30 y 60 días post-PRK (T0, T3, T7, T15, T30 y T60, respectivamente). El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001



**Figura 19.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) de córnea completa a baja magnificación (200X) quince días después de la lesión (T15). B) Ampliación del borde y

del área de la lesión. En C) y D) probabilidad de encontrar NTIs por las distintas clases de estímulos en el área lesionada y en la periferia. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu$ m; B: 200  $\mu$ m

#### **A1.2.2.5. 30 días post-Lesión (T30)**

##### **Área lesionada**

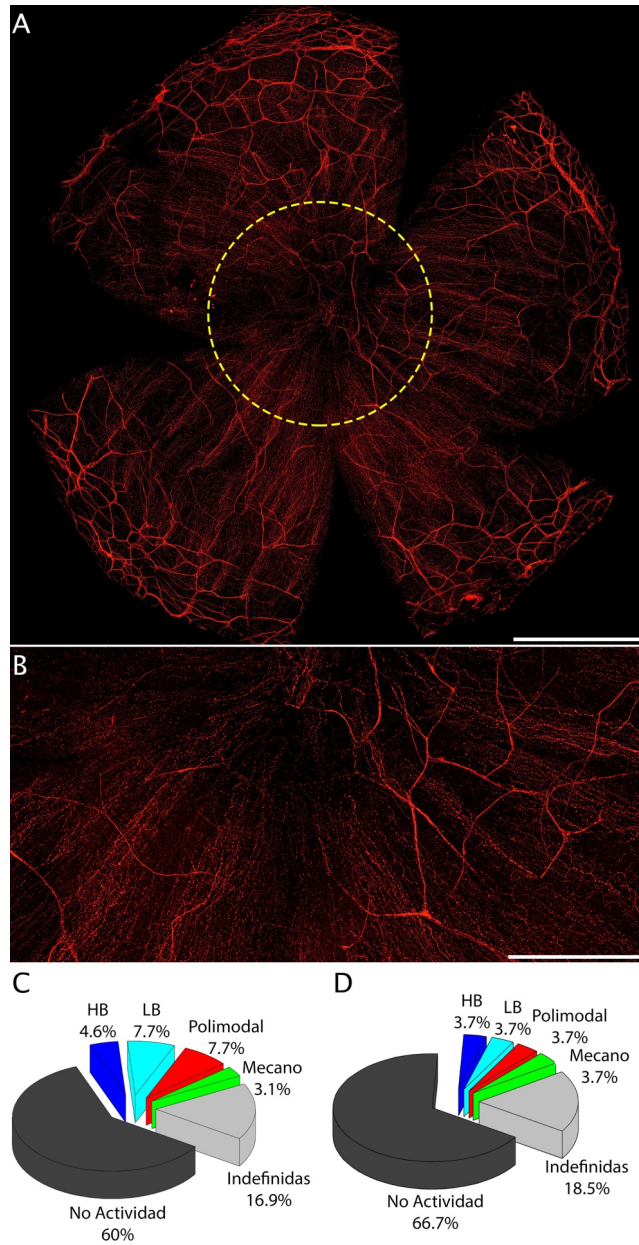
En T30, la densidad global de fibras nerviosas aumentó hasta el  $61.2 \pm 6.2\%$  aunque todavía era inferior a la de esa área en las córneas intactas ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA, **Tabla 1**). En T30 se apreció como la mayoría de las fibras nerviosas se empezaban a organizar, llegando a formar en algunos casos el vórtex en el ápex de la córnea. No obstante, algunos axones todavía mostraban una distribución errática (**Figura 20**).

El valor máximo de la tasa de éxito de registro en el área lesionada se alcanzó a los 30 días post-lesión ( $n=8$ ,  $45.8 \pm 7.8\%$ , **Figura 11-A**). Este aumento se reflejó en una mayor proporción de registro de todos los tipos de receptores (**Figura 20-C**) y la primera vez, desde la lesión, en la que se identificaron terminaciones nociceptoras polimodales en el área lesionada (5/75). Los termorreceptores de frío LB en T30 incrementaron su incidencia sobrepasando los valores obtenidos en las córneas controles (5/65 vs 2/34, respectivamente).

##### **Área periférica**

En la periferia, la densidad de fibras y de puntos de penetración de la lámina basal fue ya similar a la de las córneas intactas (**Figura 16-B**, **Tabla 1**).

La tasa de éxito del registro pareció haberse estabilizado ya que su valor ( $31.2 \pm 10\%$ ,  $n=8$ ) fue muy similar al de T15 (**Figura 11-B**). Sin embargo, la incidencia de los termorreceptores de frío HB (1/27) fue baja, aumentando la proporción de las terminaciones indefinidas (5/27). Los termorreceptores de frío LB, los mecano-nociceptores y los nociceptores polimodales se encontraron en la misma proporción (1/27), con valores similares a los tiempos previos.



**Figura 20.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) de córnea completa a baja magnificación (200X) treinta días después de la lesión (T30). B) ampliación del área



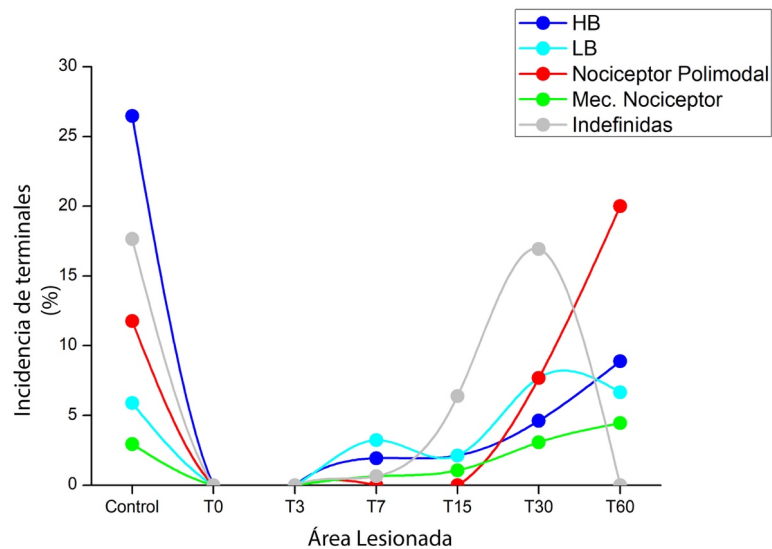
lesionada y del borde de la lesión. C) y D) probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en el área de la lesión y en la periferia, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$

#### **A1.2.2.6. 60 días post-Lesión (T60)**

##### **Área lesionada**

En el último tiempo de estudio, se observó que las fibras continúan organizándose intentando formar el vórtex en el ápex. No obstante, esta reorganización fue todavía incompleta, observándose algunas trayectorias y patrones erráticos en las fibras nerviosas del plexo subbasal (**Figura 23**). La densidad total de fibras nerviosas en el área lesionada se mantenía estabilizada ( $n=5$ ,  $60.9\pm 5.4\%$ , **Figura 16-A**, Tabla 1) en un valor muy próximo al de T30, que era todavía significativamente inferior a la misma área en los ratones controles ( $p<0.01$ , ANOVA).

La tasa de éxito de registro en T60 fue muy similar a la del tiempo previo ( $41.3\pm 11.3\%$ ,  $n=5$ , **Figura 11-A**) y no se registraron terminaciones indefinidas (0/45). Se observó un aumento de la incidencia de las distintas poblaciones de terminaciones (**Figura 23-C**). Aunque los termorreceptores de frío se mantuvieron en una proporción algo inferior (4/45), la diferencia con la proporción obtenida en la misma área de los ratones sin lesionar no fue estadísticamente significativa.



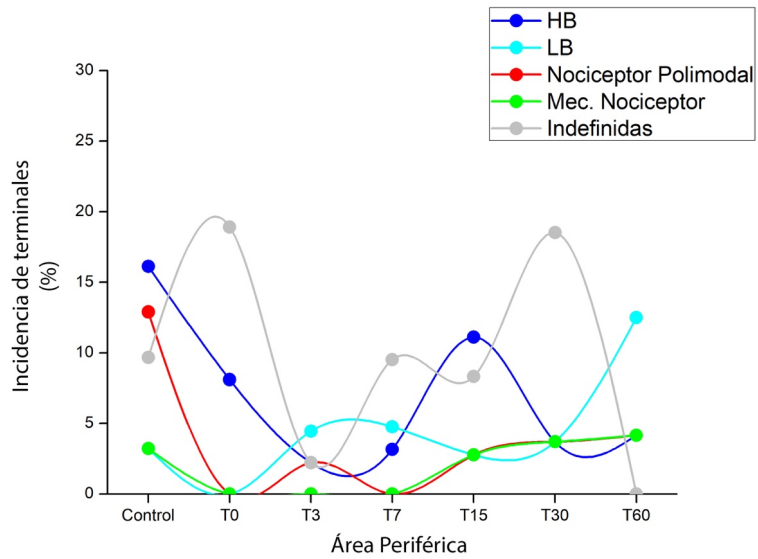
**Figura 21.** Evolución temporal en el área lesionada de la incidencia de terminaciones activas, expresada como la probabilidad de encontrar actividad NTI de las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal en ratones jóvenes frente a las distintas clases de estímulos. Se representan la incidencia de los termorreceptores de frío HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde) y las indefinidas (gris claro).

### Área periférica

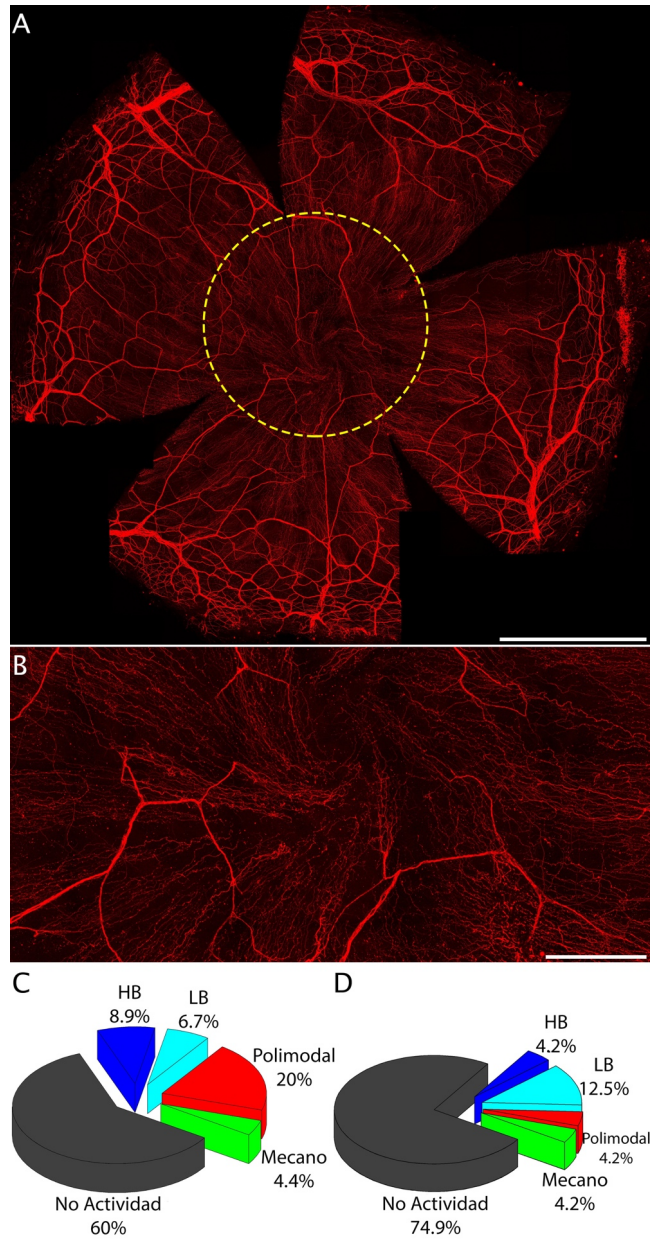
Como ya se había observado en tiempos previos, la densidad de fibras en la periferia tenía en T60 un valor similar al pre-operatorio (**Figura 16-B, Tabla 1**), con un incremento significativo en el número de puntos de penetración en la lámina basal respecto a los ratones jóvenes intactos ( $n=5$ ,  $11 \pm 1.1$  penetraciones/ $\text{mm}^2$ ,  $p < 0.001$ , ANOVA, **Figura 18-B**).

En T60 la tasa de éxito de registro fue algo más baja que en las etapas anteriores, pero las diferencias no fueron significativas ( $25 \pm 7.4\%$ , **Figura 11-B**). Finalmente, como ocurría en el área lesionada, no se registraron terminaciones indefinidas. Los termorreceptores de frío HB y los nociceptores polimodales se encontraron en un porcentaje inferior a los controles (1/24) mientras que los

termorreceptores de frío LB se encontraron en una proporción mayor respecto a éstos (3/24, **Figura**).



**Figura 22.** Evolución temporal en el área periférica de la incidencia de terminaciones activas, expresada como la probabilidad de encontrar actividad NTI de las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal en ratones jóvenes frente a las distintas clases de estímulos. Se representan la incidencia de los termorreceptores de frío HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde) y las indefinidas (gris claro).



**Figura 23.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) de córnea completa a baja magnificación (200X) sesenta días después de la lesión (T60). B) Ampliación del área

lesionada y del borde de la lesión. C) y D) probabilidad de encontrar NTIs por las distintas clases de estímulos en el área lesionada y en la periferia, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$

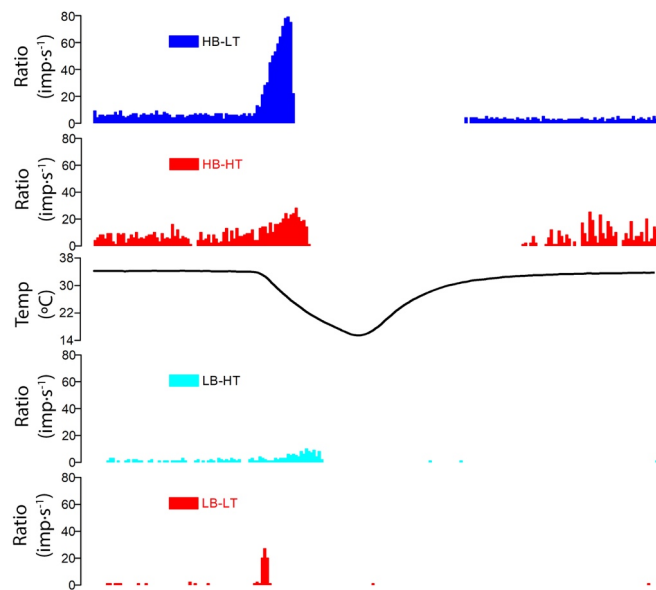
### **A1.3. Cambios en las características funcionales de los distintos tipos de terminaciones sensoriales de la córnea evocados por la PRK.**

#### **A1.3.1 Termorreceptores de frío**

Las terminaciones nerviosas termorreceptoras de frío presentes en las córneas lesionadas se subdividieron en función de su actividad espontánea por encima, igual o por debajo de  $1.5 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$  en HB y LB, respectivamente (**Figura 24**). En base al valor de temperatura requerido para alcanzar un valor de frecuencia superior a tres veces el de la desviación estándar de la actividad espontánea basal, estos termorreceptores se consideraron de bajo umbral (mayor o igual a  $30.5^\circ\text{C}$ , LT), o de alto umbral cuando era menor a este valor (HT). En los ratones jóvenes sin lesionar, confirmando el estudio de González-González et al. (González-González et al. 2017), todas las terminaciones termorreceptoras de frío del grupo con alta actividad espontánea eran de bajo umbral, de ahí su denominación de termorreceptores HB-LT (**Figura 25**), mientras que las terminaciones con baja actividad espontánea pertenecían en todos los casos al grupo de alto umbral (termorreceptores LB-HT, **Figura 25**).

Sin embargo, cuando se agruparon todas las terminaciones termorreceptoras de frío HB ( $>1.5 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) registrados en los ratones lesionados, se observó que presentaban diferencias en los valores algunas de sus características electrofisiológicas, en comparación con los obtenidos en los ratones jóvenes sin lesionar (**Tabla 2**). Una de las alteraciones observadas fue que la frecuencia media de su actividad espontánea es más baja ( $3.5\pm 0.4 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $p<0.01$ , Unpaired t test). Además, alcanzaban el umbral de respuesta al frío con

temperaturas más altas ( $32.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$   $p < 0.05$ , Unpaired t test), y tanto su frecuencia máxima de descarga durante el estímulo de frío ( $38.6 \pm 4.6 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $p < 0.01$ , Unpaired t test) como la media de respuesta a la rampa de frío ( $25 \pm 2.3 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ , Unpaired t test) eran inferiores. También, la temperatura media a la que se silencian los termorreceptores de frío HB en los ratones lesionados durante la vuelta a la temperatura basal, fue superior a la medida en los ratones controles ( $25.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ ,  $p < 0.05$ , Unpaired t test, **Tabla 2**). Entre T7 y T30, en las terminaciones de frío de los ratones operados, clasificados como HB por su valor de frecuencia basal se registraron cuatro que sin embargo mostraban un valor de temperatura umbral para evocar la respuesta al frío anormalmente bajo ( $29.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , **Tabla 2**), es decir, dentro del que tienen normalmente los termorreceptores LB-HT. Estas terminaciones anómalas se han clasificado como HB-HT (**Figura 26**).

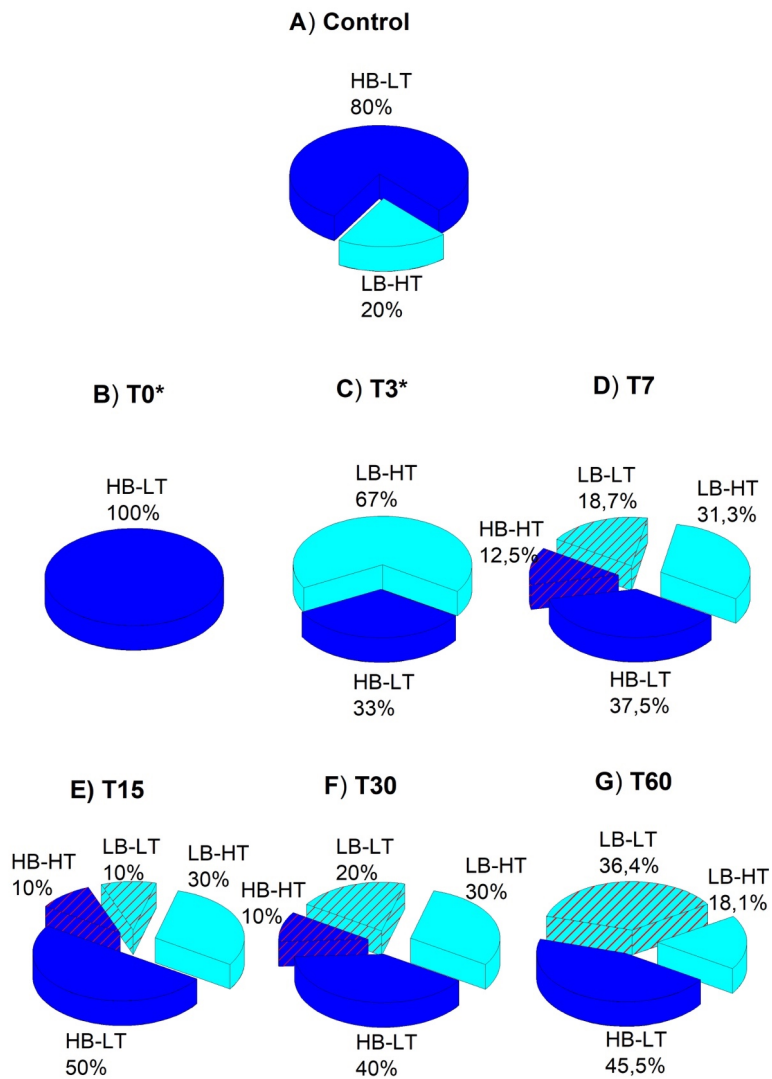


**Figura 24.** Ejemplo de la frecuencia de disparo de las distintas subclases de terminaciones nerviosas termorreceptoras de frío a  $34^\circ\text{C}$  y durante una rampa de frío hasta  $15^\circ\text{C}$ . Los termorreceptores de frío HB-LT (azul oscuro) y LB-HT (azul claro) se obtuvieron en ratones jóvenes sin lesionar (controles). Los registros de los

*termorreceptores que presentan propiedades alteradas (HB-HT y LB-LT, rojo) se obtuvieron en ratones operados a T30.*

En los animales operados se registró también un grupo de 15 termorreceptores de frío LB-HT, que presentaban valores muy similares a los obtenidos en los ratones jóvenes sin lesionar (**Tabla 2**). Sin embargo, en otras 11 terminaciones LB también con una baja actividad espontánea ( $0.6 \pm 0.14 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ) a  $34^\circ\text{C}$ , la temperatura a la que aumentaban su descarga con el enfriamiento fue anormalmente alta ( $>30.5^\circ\text{C}$ ), en comparación a la temperatura a la que aumentan la frecuencia de disparo los termorreceptores LB-HT, es decir, tenían un umbral de frío muy bajo ( $32.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ,  $n=11$ ;  $p < 0.001$ , ANOVA) similar al que presentan los termorreceptores de frío HB-LT (Tabla 2), por lo que los clasificamos como LB-LT (**Figura 26**). Estos termorreceptores de frío LB-LT tienen algunas características significativamente diferentes de los LB-HT (**Tabla 2**), como su frecuencia máxima ( $20.3 \pm 3.1 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA) y una mayor frecuencia media de respuesta al frío ( $12.4 \pm 1.5 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $p < 0.01$ , ANOVA). Además, este grupo anómalo de termorreceptores de frío LB-LT se silenciaron con el recalentamiento a temperaturas más altas que los LB-HT ( $25.8 \pm 1.6^\circ\text{C}$ ,  $p < 0.001$ , ANOVA).

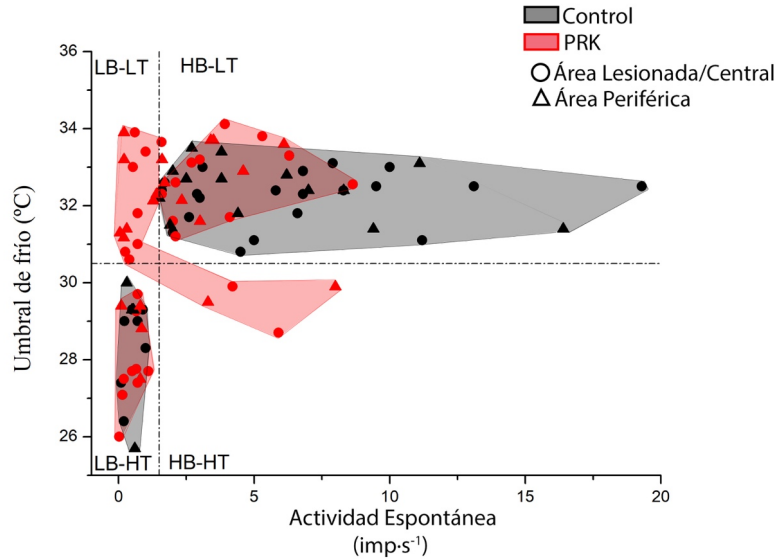
El estudio de las características de las terminaciones de frío registradas a los distintos tiempos post-lesión evidencia que, a partir de T7 empiezan a aparecer las subpoblaciones de termorreceptores de frío alteradas, tanto HB-HT como LB-LT (**Figura 25**). Estas subpoblaciones, se registraron tanto en la periferia como en el área lesionada (**Figura 26**). Cabe resaltar que la población de termorreceptores LB-LT sigue presente, como la más prevalente (36.4%), 60 días después de la PRK (**Figura 25**)



**Figura 25.** Cambios en la proporción de termorreceptores de frío registrados a los distintos tiempos de estudio (A: Control; B-G: T3-T60). En azul oscuro se representan los termorreceptores de frío HB-LT, en azul oscuro con rayas rojas se representan los termorreceptores de frío HB-HT, en azul claro se representan los termorreceptores de frío LB-HT y, finalmente, en azul claro con rayas rojas se representan los



termorreceptores de frío LB-LT. \* Los termorreceptores de frío registrados provienen exclusivamente del área periférica.



**Figura 26.** Distribución de las terminaciones corneales termorreceptoras de frío atendiendo a su umbral térmico y a su frecuencia de disparo espontánea a 34°C. Las terminaciones de las córneas intactas (control) se representan con símbolos negros (círculos para las terminaciones registradas en el área central y triángulos para las terminaciones registradas en el área periférica). Las terminaciones registradas en las córneas de ratones jóvenes lesionados (3 a 60 días después de la cirugía) se representan con símbolos rojos (círculos para las terminaciones registradas en el área lesionada, y triángulos para las terminaciones registradas en el área periférica). Las líneas punteadas horizontales y verticales delimitan los valores respectivos de umbral de frío y de actividad espontánea usados para definir las terminaciones termorreceptoras de frío como HB-LT y LB-HT. Algunos de las terminaciones de córneas operadas se localizan fuera de los cuadrantes, mostrando que tienen características de disparo mixtas (alta actividad espontánea y alto umbral [HB-HT] y baja actividad espontánea y bajo umbral [LB-LT]).

**Tabla 2.** Características funcionales de las terminaciones nerviosas termorreceptoras de frío de ratones jóvenes sin lesionar (controles) y registrados a distintos tiempos tras la ablación láser (PRK). Se han separado los datos de los distintos subtipos de termorreceptores de frío registrados. El análisis estadístico se hace comparando los valores con los del grupo control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

	Actividad Espontánea (imp·s <sup>-1</sup> )	Umbral Frío (°C)	Frecuencia máxima en frío (imp·s <sup>-1</sup> )	Respuesta a frío (imp·s) <sup>1</sup>	Temperatura de silenciamiento (°C)	Respuesta Mecánica (imp/10s)	
						Antes	Después
HB-LT Control (n=34)	6.4±0.8	32.2±0.1	54.7±3.3	32.4±2	22.8±0.8	39±16	74.2±17
HB-LT PRK (n=26)	3.5±0.4**	32.8±0.2*	38.6±4.6**	25±2.3*	25.5±0.7*	34.3±5.8	82.4±16.9
HB-HT PRK (n=4)	5.4±1	29.4±0.3	26.8±11	20.6±5.4	23.1±1.7	35.7±20.2	54.3±28.7
LB-LT PRK (n=11)	0.6±0.1	32.2±0.3***	20.3±3.1*	12.4±1.5**	25.8±1.6***	2.9±0.5	10±5.1
LB-HT Control (n=10)	0.5±0.1	28.3±0.4	11.3±1.6	6.4±1	17.7±1.1	4.4±1.5	16±6.6
LB-HT PRK (n=15)	0.5±0.1	28.4±0.3	8.3±1.3	5.8±0.7	19.3±0.8	4.7±1.3	22±5

### A1.3.2. Mecano-nociceptores y nociceptores polimodales

Las propiedades de las terminaciones mecano-nociceptoras y nociceptoras polimodales medidas en los ojos lesionados en cada tiempo del estudio se agruparon, comparando sus valores con los obtenidos en las terminaciones nerviosas de ratones jóvenes no lesionados (González-González et al. 2017).

Las terminaciones nerviosas mecano-nociceptoras registradas se caracterizaron por tener una actividad espontánea baja y por responder vigorosamente a la estimulación mecánica ejercida sobre la superficie corneal. La única diferencia observada con los mecano-nociceptores de los ratones sin lesionar, es que mientras en éstos los estímulos de frío disminuían la actividad espontánea, en los lesionados aumentaba significativamente durante la rampa de frío ( $0.05 \pm 0.02$

imp·s<sup>-1</sup>, p<0.01, Unpaired t test). El resto de características de los mecanociceptores de ambos grupos fueron similares (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características funcionales de las terminaciones nerviosas mecanociceptores de ratones jóvenes intactos y tras la PRK. Los valores obtenidos a los distintos tiempos tras la lesión se han promediado. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

	Control n=18		PRK n=9	
<b>Actividad espontánea</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	0.13±0.04		0.12±0.06	
<b>Respuesta a frío</b> (imp/30s)	Antes 7.6±2.3	Después 4.4±1.5	Antes 4.7±2.3	Después 6.7±2.6
<b>Δ Frecuencia en estímulo de frío</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	-0.06±0.02		0.05±0.02**	
<b>Respuesta a calor</b> (imp/30s)	Antes 5.4±3	Después 2.3±0.7	Antes 9.4±8.3	Después 6.9±5.7
<b>Δ Frecuencia en estímulo de calor</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	-0.09±0.09		-0.11±0.11	
<b>Respuesta mecánica</b> (imp/10s)	Antes 0.83±0.5	Después 19.4±4	Antes 2.8±2.1	Después 24.8±9.4
<b>Δ Frecuencia estímulo mecánico</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	17.9±2.8		14.1±3.8	

Las terminaciones nerviosas nociceptoras polimodales intactas se caracterizaron por su actividad espontánea baja, que disminuía con el frío, la respuesta al estímulo de calor y en una parte de ellas, por su respuesta a la estimulación mecánica. En los ratones lesionados, los valores de estos parámetros de los nociceptores polimodales agrupando los datos a los diferentes tiempos post-lesión, muestran dos alteraciones de sus características (**Tabla 4**): La duración de la respuesta durante la rampa de calor era mucho más corta (10.6±1.8s, p<0.05, Unpaired t test) que la de los ratones jóvenes sin lesionar y el

decremento de actividad medio durante el estímulo de frío, fue significativamente menor ( $-0.06 \pm 0.07 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ , Unpaired t test).

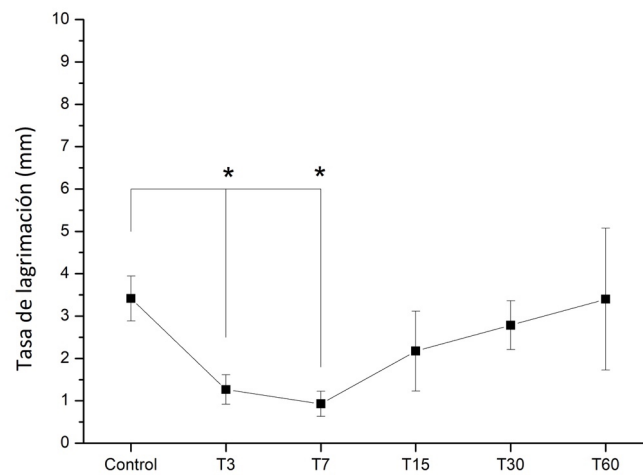
**Tabla 4.** Características funcionales de las terminaciones nerviosas nociceptores polimodales de ratones jóvenes sin lesionar (controles) y de los registrados a los distintos tiempos de estudio, tras la ablación láser (PRK). El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

	Control <i>n</i> =40		PRK <i>n</i> =18	
<b>Actividad espontánea</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	0.33±0.05		0.43±0.09	
<b>Respuesta a frío</b> ( <i>imp</i> ./30s)	<i>Antes</i> 16.6±3.8	<i>Después</i> 4.3±1.3	<i>Antes</i> 22.8±5.7	<i>Después</i> 16.1±2.1
<b>Δ Frecuencia estímulo de frío</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	-0.2±0.04		-0.06±0.07*	
<b>Respuesta mecánica</b> ( <i>imp</i> /10s)	<i>Antes</i> 1.3±0.3	<i>Después</i> 11.4±1.7	<i>Antes</i> 3±0.5	<i>Después</i> 18.8±4.3
<b>Δ Frecuencia estímulo mecánico</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	8.2±1.8		10.4±2.2	
<b>Respuesta a calor</b> ( <i>imp</i> /30s)	<i>Antes</i> 5.3±0.9	<i>Después</i> 26.7±3.2	<i>Antes</i> 9.2±1.3	<i>Después</i> 28.5±3.3
<b>Δ Frecuencia estímulo de calor</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	1.1±0.3		0.82±0.16	
<b>Duración respuesta Calor</b> (s)	20.1±2.6		10.6±1.8*	
<b>Umbral de respuesta a Calor</b> (°C)	42.3±0.6		44.1±1	

#### A1.4. Efecto de la PRK sobre la tasa de lagrimación

En los ratones jóvenes sin lesionar la tasa de lagrimación fue de  $3.4 \pm 0.5 \text{ mm}$  ( $n=44$ , **Figura 27**). Transcurridos 3 días post-PRK, la tasa de lagrimación se había reducido a  $1.3 \pm 0.3 \text{ mm}$  ( $n=15$ ,  $p < 0.05$ , Unpaired t test) y continuó disminuyendo después, alcanzando su mínimo en T7 ( $n=7$ ,  $0.9 \pm 0.3 \text{ mm}$ ,  $p < 0.05$ ,

Unpaired t test). A partir de los 15 días tras la PRK, la tasa de lagrimación aumentó progresivamente, alcanzando el valor medio normal en T60 (T15; n=12,  $2.2\pm 0.9$  mm; T30; n=7,  $2.8\pm 0.6$  mm; T6; n=5,  $3.4\pm 1.7$  mm, **Figura 27**)



**Figura 27.** Medida de la longitud teñida por la lágrima en un hilo con rojo fenol, colocado durante 1 minuto entre el párpado inferior y la conjuntiva bulbar en el ángulo nasal, en ratones jóvenes sin lesionar (control) y a diferentes tiempos tras la PRK (T3 a T60). El análisis estadístico se hizo comparando los valores obtenidos a estos tiempos con los del grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001

## A2) RATONES VIEJOS

### A2.1 Densidad de la inervación y la proporción de los diferentes tipos funcionales de receptores en la córnea de ratones viejos intactos

#### *Área equivalente a la de lesión*

La morfología general de los nervios corneales en ratones viejos sin lesionar es similar a la de los ratones jóvenes, con fibras subbasales que se distribuyen formando el vórtex en el ápex corneal. En el área equivalente a la de la lesión, la densidad global de las fibras nerviosas del plexo subbasal fue un 57% menor que la de los ratones jóvenes sin lesionar ( $246.7 \pm 20.5$  axones/mm<sup>2</sup>, n=6, p<0.01, ANOVA, **Tabla 5, Figura 32**). La densidad de puntos de penetración de la lámina basal en esta área fue ligeramente inferior a la de los ratones jóvenes en la misma área (n=16,  $7.8 \pm 0.5$  penetraciones/mm<sup>2</sup>).

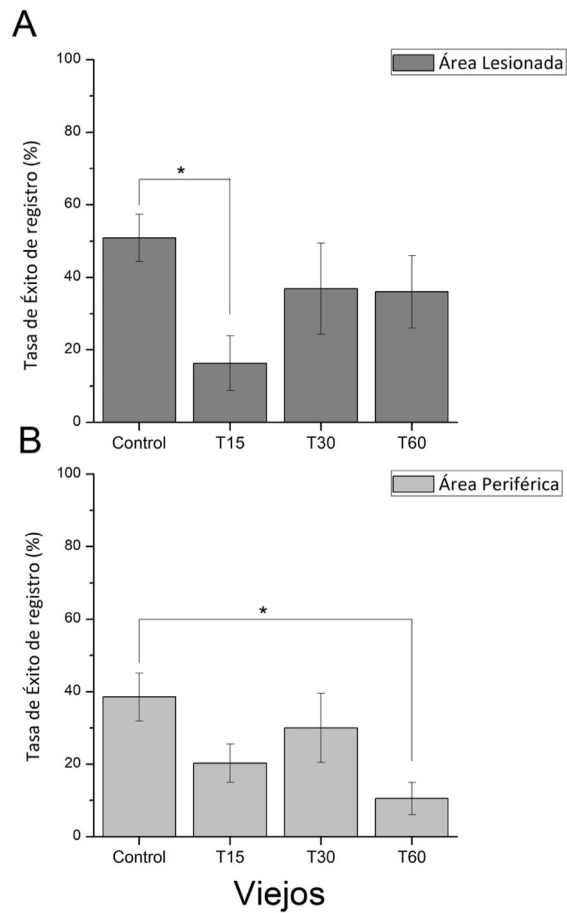
La tasa de éxito de registro en los ratones viejos sin lesionar en el área equivalente a la lesión fue del  $50.8 \pm 6.5\%$  (n=16, **Figura 28**), un valor inferior al de los ratones jóvenes intactos ( $67.4 \pm 6.1\%$ ), con la siguiente distribución entre los diferentes tipos de terminaciones (**Figura 29-C**): 15.8% termorreceptores de frío HB (15/95) y 10.5% LB (10/95); 6.3% nociceptores polimodales (6/95); 5.3% mecano-nociceptores (5/95) y 7.4% terminaciones indefinidas (7/95).

#### *Área periférica*

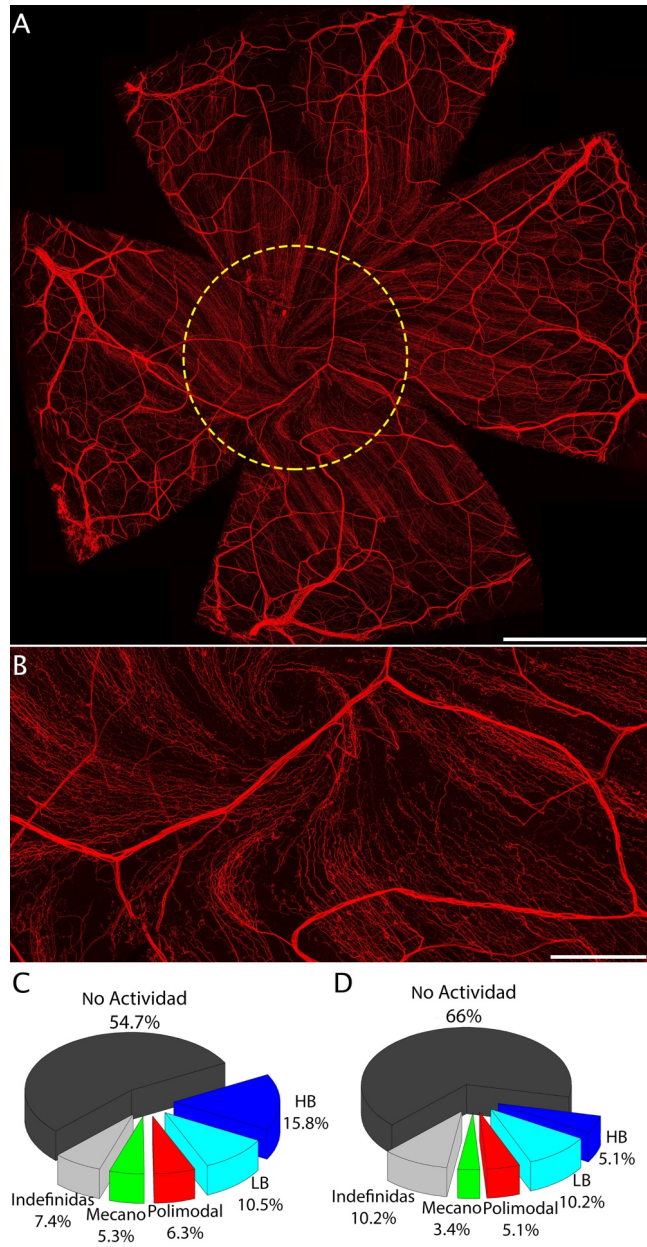
En los ratones viejos sin lesionar, la densidad global de fibras nerviosas del plexo subbasal era ligeramente inferior ( $208.2 \pm 6.9$  axones/mm<sup>2</sup>, **Figura 32**), con respecto a la misma área en los ratones jóvenes sin lesionar, pero la diferencia no era significativa. Sin embargo, en los ratones viejos a diferencia de lo observado en los jóvenes, el número de penetraciones es mayor en la periferia que en el área equivalente a la lesión (n=16,  $11.6 \pm 0.7$ , **Tabla 5**).

La tasa de éxito en los registros del área periférica de los ratones viejos intactos fue del  $38.5 \pm 6.6\%$ , (n=16, **Figura 28**). La distribución entre los diferentes tipos

funcionales de terminaciones en el área periférica de los ratones viejos sin lesionar fue la siguiente (**Figura29-D**); 5.1% termorreceptores de frío HB (3/59) y 10.2% LB (6/59); 5.1% nociceptores polimodales (3/59); 3.4% mecanonociceptores (2/59) y 10.2% terminaciones indefinidas (6/59).



**Figura 28.** Tasa de éxito de registro, expresada como el porcentaje de unidades activas funcionales respecto al número de intentos de registro, en el área lesionada (A, gris oscuro) y en la periferia (B, gris claro) de ratones viejos. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001



**Figura 29.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) en la córnea completa a baja magnificación (200X), en la que se marca el área equivalente a la lesión (A, círculo).

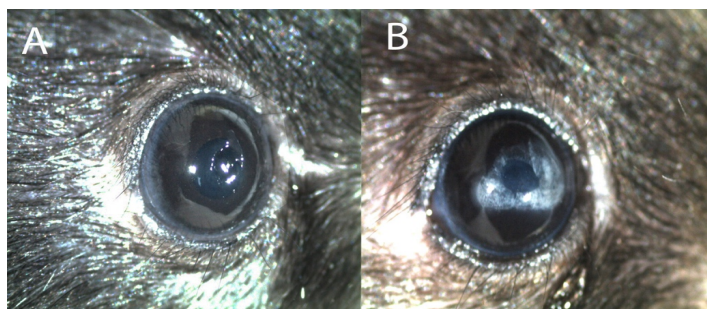


B) Ampliación en más detalle la distribución de los nervios subbasales y estromales. C y D) probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en el área equivalente a la de lesión y en la periferia, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu$ m; B: 200  $\mu$ m

## **A2.2. Cambios en la densidad de inervación e incidencia de los diferentes tipos funcionales de receptores en ratones viejos operados, a los distintos tiempos tras la cirugía PRK**

### **A2.2.1. Evolución macroscópica de la lesión corneal**

Un 19% de los ratones viejos sin operar (n=16, **Figura 30**) mostraban alteraciones corneales tales como opacidades (66.7%) y descamaciones epiteliales (33.3%). En T15 post-PRK, el porcentaje de alteraciones y daño corneal había aumentado al 66.7%, un 75% de las cuales eran opacidades y el 25% restante, descamaciones corneales. Transcurrido un mes de la PRK (T60), el porcentaje de alteraciones corneales había disminuido al 37.5% (66.7% opacidades y 33.3% descamaciones corneales) y 60 días después de la lesión al 25%, en todos los casos consistentes en descamaciones epiteliales.



**Figura 30.** Imagen estereoscópica que muestra los dos tipos de alteraciones corneales observadas en los ratones envejecidos WT, que son A) descamaciones corneales y B) opacidades corneales.

## **A2.2.2. Modificaciones morfo-funcionales de la inervación corneal**

### **A2.2.2.1. 15 días post-Lesión (T15)**

#### **Área lesionada**

En T15, la recuperación de la inervación sensorial en el área lesionada era incompleta correspondiendo a un  $67\pm 9\%$ , de la densidad de fibras de los ratones viejos sin lesionar ( $n=6$ ,  $p<0.05$ , ANOVA, **Tabla 5**). Esta inervación estaba compuesta por axones cortos, ramificados y tortuosos (**Figura 31**). Comparando con sus respectivos controles, en los ratones viejos el porcentaje de recuperación para el mismo tiempo es mayor que en los ratones jóvenes, sin embargo, la densidad de fibras nerviosas del plexo subbasal es inferior a la de los ratones jóvenes ( $p<0.05$ , **Figura 32**).

La tasa de éxito de registro en T15 fue significativamente menor que la obtenida en los ratones viejos controles, pero similar a la de los ratones jóvenes lesionados en T15 ( $n=6$ ,  $16.3\pm 7.5\%$ ,  $p<0.05$ , ANOVA, **Figura 28-A**).

En el área lesionada de los ratones de T15 (**Figura 31-C**), la población más afectada fue la de los termorreceptores de frío, ya que no se localizó ningún HB (0/44,  $p<0.05$ , z-Test) y las terminaciones LB disminuyeron respecto a las córneas intactas (1/44). La proporción de los mecano-nociceptores aumentó (3/44) y los nociceptores polimodales disminuyeron (2/44).

#### **Área Periférica**

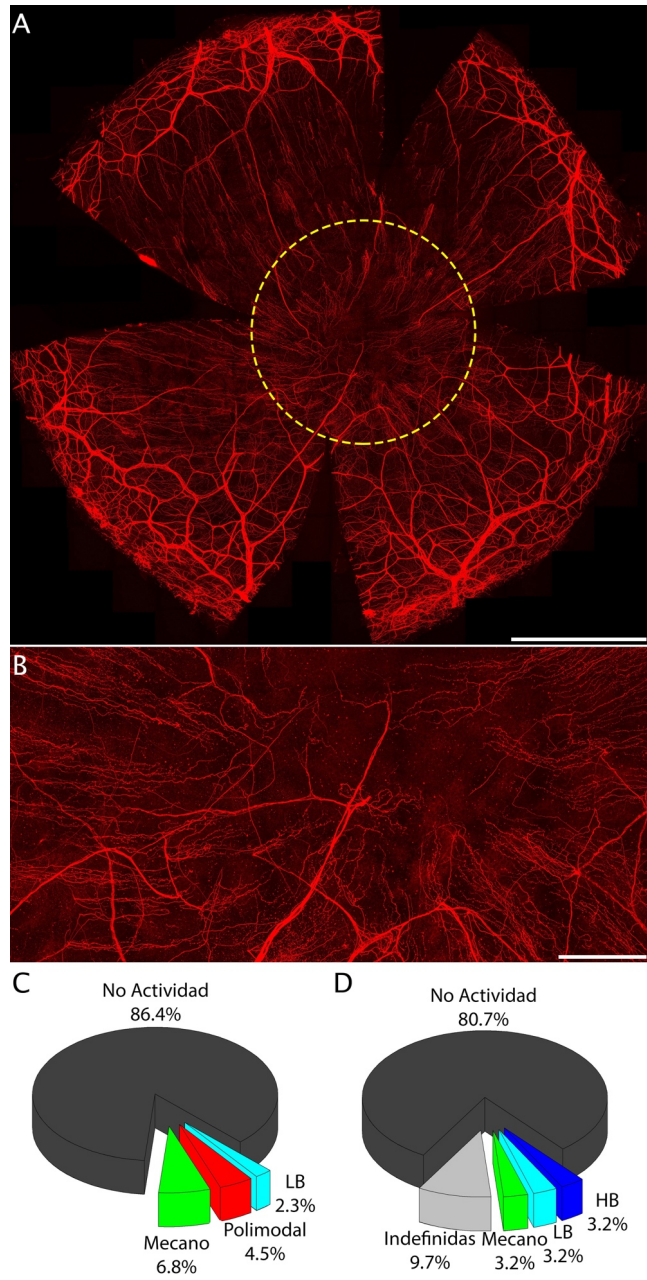
En T15, la densidad de fibras del plexo subbasal disminuyó significativamente al  $37.8\pm 1.4\%$  del total de fibras de los ratones viejos sin lesionar ( $n=6$ ,  $p<0.001$ , ANOVA, **Figura 33**). Comparando la recuperación de fibras nerviosas entre ratones jóvenes y viejos al mismo tiempo de lesión (T15), la recuperación fue significativamente más lenta en los ratones viejos ( $p<0.001$ , ANOVA, **Figura 32**).

La tasa de éxito en la periferia disminuyó al  $20\pm 5.3\%$  (NS, **Figura 28**) en este tiempo de estudio. En T15, el número de termorreceptores de frío HB y LB identificado fue muy bajo (1/31 en ambos casos). Los nociceptores polimodales desaparecieron y no se pudieron volver a registrar en la periferia, en contraste

con lo que ocurría con los ratones lesionados jóvenes a T15, en los que reaparecía la actividad de los nociceptores polimodales, para seguir siendo observada durante los restantes tiempos de estudio. La proporción de terminaciones mecano-nociceptoras (1/31) e indefinidas (3/31) fue más baja en comparación con los valores control.

**Tabla 5.** Densidad en ratones viejos de nervios subbasales y de puntos de penetración en las distintas áreas, a los distintos tiempos de estudio tras la PRK y en las córneas intactas. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001

Grupos Experimentales	Densidad Nerviosa		Densidad de Penetraciones	
	Área lesionada	Área Periférica	Área lesionada	Área Periférica
	(axones/mm <sup>2</sup> )		(penetraciones/mm <sup>2</sup> )	
<b>Control</b> (n=6)	246.7±20.5	208.2±6.9	7.8±0.5	11.6±0.7
<b>T15</b> (n=5)	153.4±20.7 *	74.5±2.8 ***	6.3±0.5	9.6±0.9
<b>T30</b> (n=6)	265.6±30.2	162.9±7.5 *	7±0.2	9.4±0.7
<b>T60</b> (n=5)	230.5±21.5	210.1±6.3	7.7±0.4	9.1±0.8



**Figura 31.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) en la córnea completa a baja magnificación (200X), quince días después de la lesión (T15). B) Ampliación del

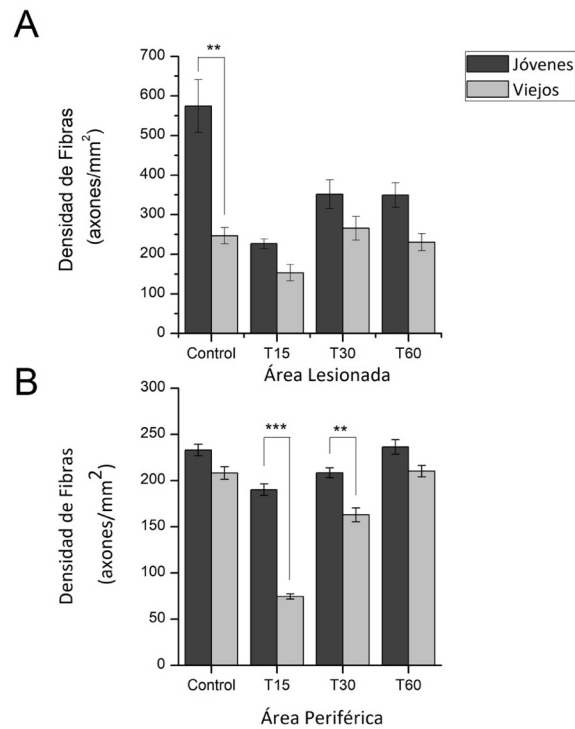
borde de la lesión y del área lesionada. C y D) probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en el área equivalente a la lesión y en la periferia, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro) en los distintos tiempos de estudio. Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$

#### **A2.2.2.2. 30 días post-Lesión (T30)**

##### **Área lesionada**

La densidad de fibras nerviosas en el área lesionada de los ratones viejos en T30 alcanzó un valor superior al de los ratones viejos intactos (Tabla 5): esto se debió a la incorporación de fibras regeneradas procedentes de la periferia, así como a las fibras del plexo subepitelial que penetraban en la zona lesionada formando arborizaciones muy ramificadas y tortuosas (**Figura 35**).

La tasa de éxito de registro se incrementó hasta alcanzar el máximo en T30 (n=8,  $36.9 \pm 12.6\%$ , **Figura 28**). La incidencia de las terminaciones termorreceptoras de frío fue más alta en los HB, que alcanzaron su valor máximo de recuperación (6/46), que en los LB (2/46). También, los nociceptores polimodales se encontraron con más frecuencia que en los ratones controles (5/46), mientras que los mecano-nociceptores se mantuvieron en la misma proporción (2/46).



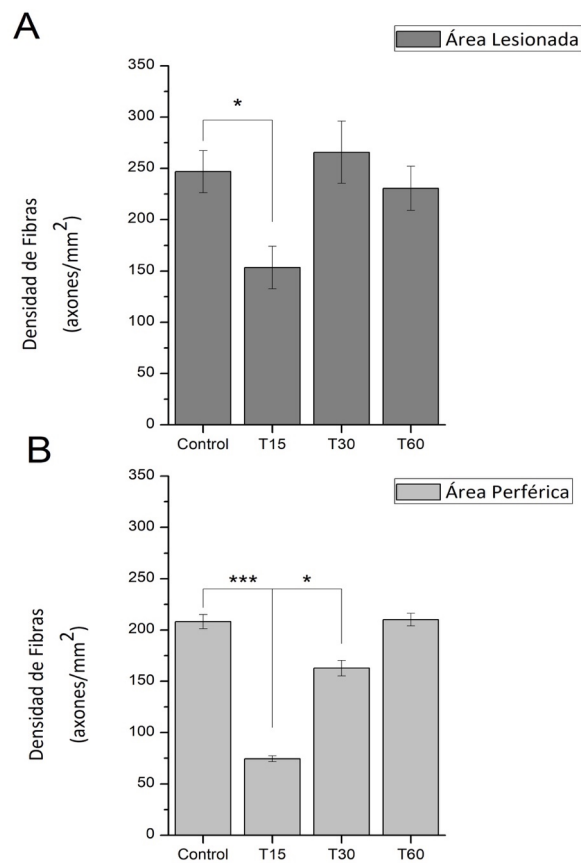
**Figura 32.** Gráfico de barras comparando las densidades de fibras del plexo subbasal en el área lesionada (A) y en el área periférica (B,) entre ratones jóvenes (gris oscuro) y ratones viejos (gris claro). El análisis estadístico se llevó a cabo comparando con la densidad obtenida en el mismo tiempo de estudio. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001

### Área Periférica

A diferencia del área lesionada, en la periferia la recuperación de la densidad de fibras nerviosas del plexo subbasal en los ratones viejos a T30 se mantuvo por debajo del valor control, alcanzando una densidad del  $78.2 \pm 3.6\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.05$ , ANOVA, **Figura 33**) respecto a la misma área en ratones viejos intactos. La recuperación de la densidad de fibras del plexo subbasal de la periferia de los ratones viejos, respecto al mismo tiempo de estudio en los ratones jóvenes fue significativamente más lenta en los primeros ( $p<0.01$ , ANOVA, **Figura 32**).

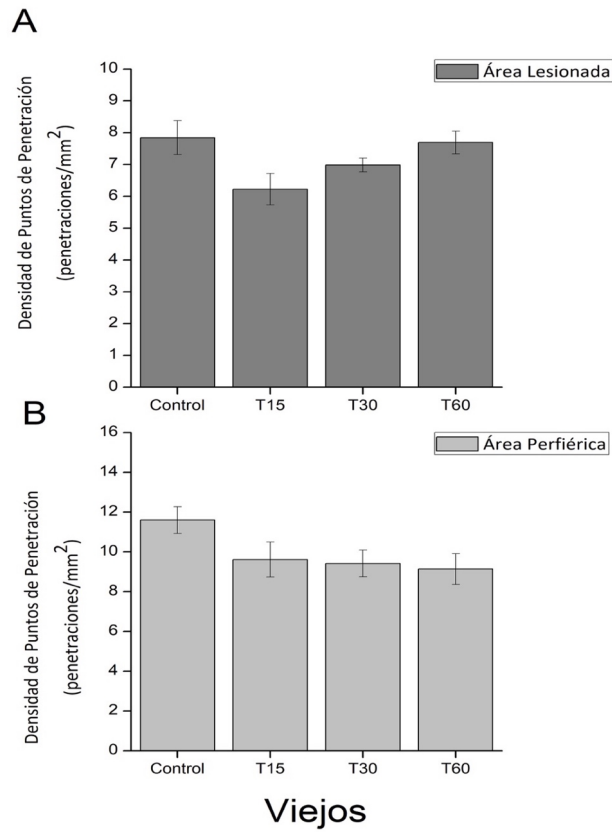
La tasa de éxito de registro se incrementó alcanzando un  $30 \pm 9.5\%$  ( $n=8$ ), hasta situarse en un punto intermedio entre la de los ratones viejos intactos y la obtenida en T15 (**Figura 28-B**).

En T30, la proporción de termorreceptores de frío alcanzó valores similares a los observados antes de lesionar la córnea (HB 3/47 y LB 5/47). Sin embargo, la incidencia de las terminaciones indefinidas continuó siendo baja (2/47), mientras, que las terminaciones mecano-nociceptoras aumentaron ligeramente (2/47).



**Figura 33.** Densidad media de las fibras del plexo subbasal en el área lesionada (A, gris oscuro) y en la periferia (B, gris claro) en ratones viejos intactos (control) y a 15, 30 y 60

días post-PRK (T15, T30 y T60, respectivamente). El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001



**Figura 34.** Densidad media de los puntos de penetración de la lámina basal en el área lesionada (A, gris oscuro) y en la periferia (B, gris claro) en ratones viejos intactos (control) y a 15, 30 y 60 días post-PRK (T15, T30 y T60, respectivamente). El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001





**Figura 35.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) en córnea completa a baja magnificación (200X), treinta días después de la lesión (T30). B) Ampliación del borde y

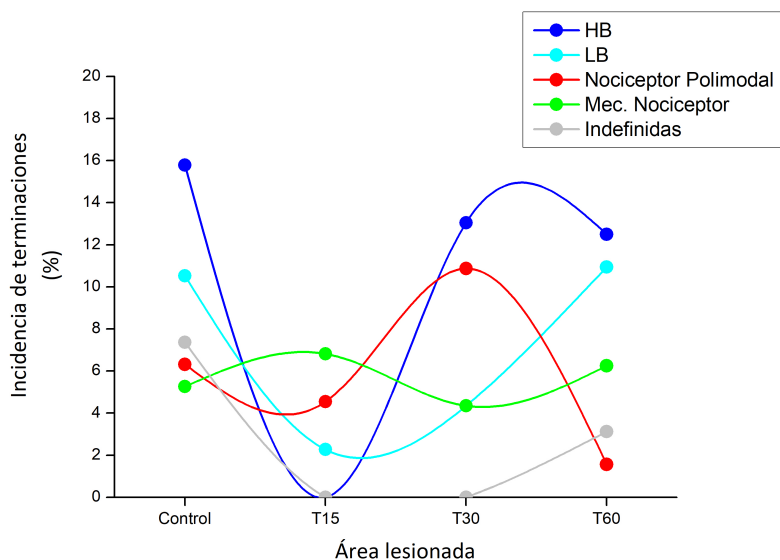
área de la lesión. C y D) Probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en el área lesionada y en la periferia, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$

### **A2.2.2.3. 60 días post- Lesión (T60)**

#### **Área lesionada**

Finalmente, 60 días tras la lesión se observaron estructuras similares a la de las córneas sin lesionar, como la formación del vórtex en el ápex corneal y una distribución más organizada de las fibras, aunque todavía se encontraban axones organizados de forma errática en la zona lesionada (**Figura 38**). La densidad de fibras nerviosas en este tiempo fue muy similar al de las córneas intactas, alcanzando un valor del  $93.4 \pm 8.7\%$  ( $n=6$ , **Figura 33**, Tabla 5), respecto a las córneas de ratones viejos intactos.

La tasa de éxito de registro presentó un valor muy similar al tiempo de estudio previo ( $n=8$ ,  $36 \pm 10\%$ , **Figura 28**). Las terminaciones termorreceptoras de frío HB y LB se encontraron en unas proporciones muy similares a las encontradas en los ratones sin lesionar (8/64 y 7/64, respectivamente). Además, reaparecieron las terminaciones indefinidas (2/64), mientras que las terminaciones mecano-nociceptoras se mantuvieron (4/64). Los nociceptores polimodales disminuyeron su proporción, alcanzando el valor mínimo (1/64), a diferencia de lo observado en los ratones jóvenes lesionados, en los que se observó un aumento en su incidencia.



**Figura 36.** Evolución temporal en el área lesionada de ratones viejos, de la incidencia de terminaciones, expresada como la probabilidad de encontrar tras la aplicación de las distintas modalidades de estímulo, de actividad NTI correspondiente a las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal. Se representa la incidencia de los termorreceptores de frío HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), de los nociceptores polimodales (rojo), de los mecano-nociceptores (verde) y de las indefinidas (gris claro).

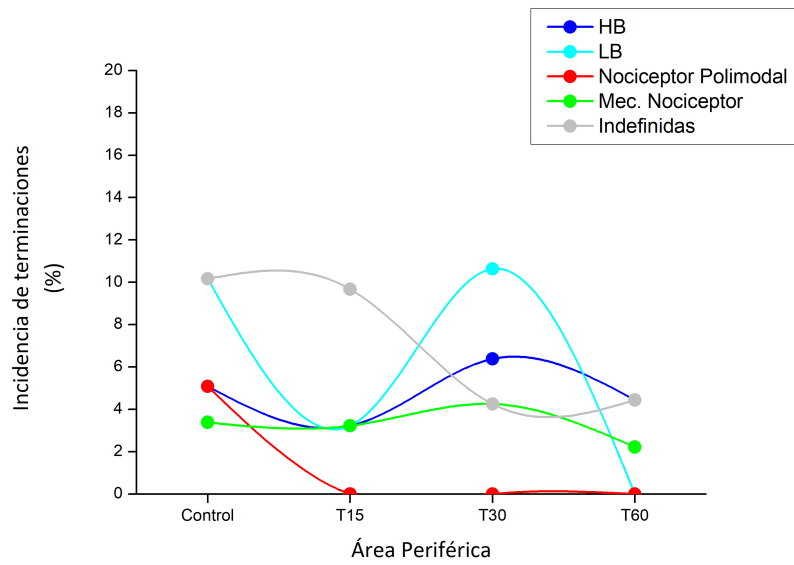
### Área Periférica

En el área alrededor de la lesión, la densidad global de fibras del plexo subbasal era prácticamente igual en las córneas de ratones viejos intactos (n=6,  $100.9 \pm 3\%$ , **Figura 33, Tabla 5**).

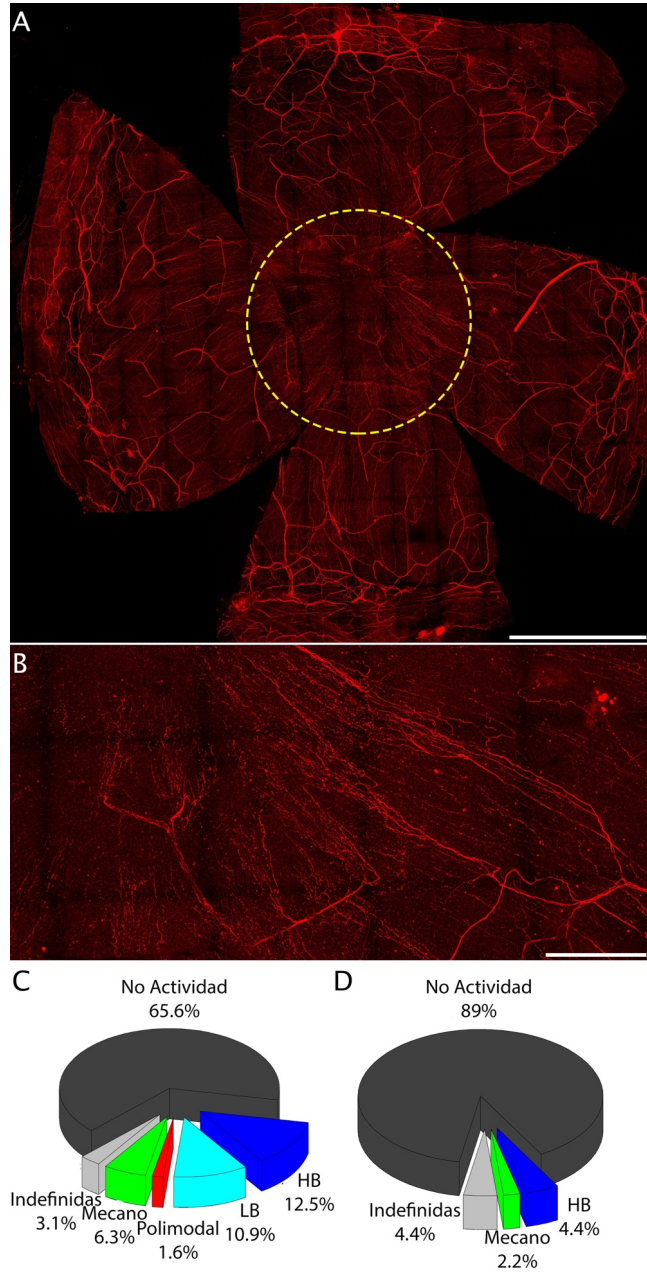
Pese a este aumento en densidad, la tasa de éxito de registro de terminaciones activas disminuyó significativamente respecto a los ratones viejos controles ( $10.5 \pm 4.4\%$  vs  $38.5 \pm 6.6\%$ , respectivamente,  $p < 0.05$ , ANOVA, **Figura 28**).

Esta disminución, se tradujo en que no se registraron terminaciones termorreceptoras de frío LB (0/45), y la incidencia de los termorreceptores de frío HB disminuyó (2/45) respecto al tiempo previo, aunque mantuvo un valor similar

al de las córneas intactas. Esto contrasta con lo observado en ratones jóvenes, donde a T60 la incidencia de termorreceptores de frío LB aumentaba. Las terminaciones mecano-nociceptoras disminuyeron (1/45), mientras que las terminaciones indefinidas mantuvieron una proporción similar (2/45).



**Figura 37.** Evolución temporal en el área periférica de ratones viejos, de la incidencia de terminaciones, expresada como la probabilidad de encontrar tras la aplicación de las distintas modalidades de estímulo, de actividad NTI correspondiente a las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal. Se representa la incidencia de los termorreceptores de frío HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), de los nociceptores polimodales (rojo), de los mecano-nociceptores (verde) y de las indefinidas (gris claro).



**Figura 38.** A) Inmunofluorescencia contra  $\beta$ -Tubulina III (rojo) de córnea completa a baja magnificación (200X) sesenta días después de la lesión (T60). B) Ampliación del borde

y área lesionada. C) y D) representa la probabilidad de encontrar NTIs evocados por las distintas clases de estímulos en el área lesionada y en la periferia, respectivamente. Se representan los termorreceptores de frío, HB (en azul oscuro) y LB (azul claro), los nociceptores polimodales (rojo), los mecano-nociceptores (verde), las terminaciones indefinidas (gris claro) y la proporción de fracasos (no registro). Barra de escala; A:500  $\mu\text{m}$ ; B: 200  $\mu\text{m}$

### **A2.3 Cambios en las características funcionales de los distintos tipos de terminaciones sensoriales de la córnea evocados por la PRK.**

#### **A2.3.1 Termorreceptores de frío**

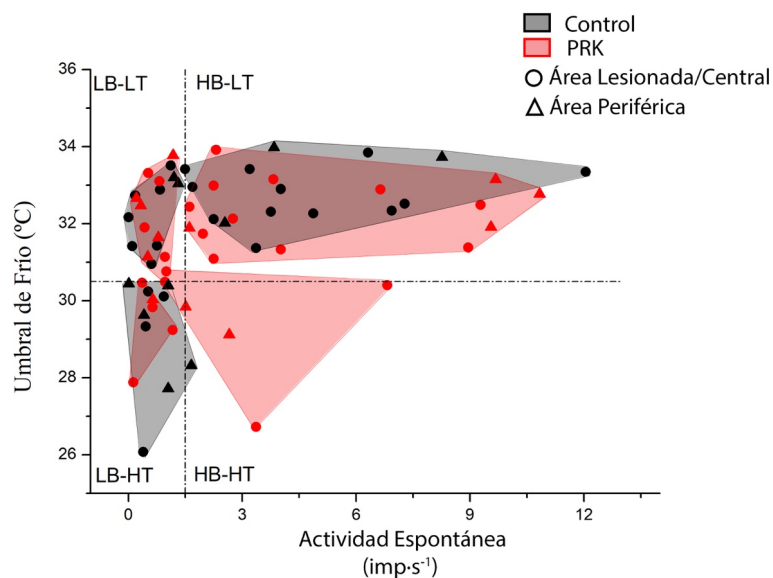
En ratones viejos en condiciones control (sin lesionar), además, de las poblaciones de terminaciones nerviosas termorreceptoras de frío descritas como HB-LT ( $>1.5 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$  y  $>30.5^\circ\text{C}$ ; 14/33) y LB-HT ( $<1.5 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$  y  $<30.5^\circ\text{C}$ ; 8/33), se registraron terminaciones de frío alteradas, similares a las descritas en ratones jóvenes lesionados, tanto HB-HT como LB-LT (**Figura 39**), coincidiendo con los datos publicados por Alcalde *et al* 2018 (Alcalde, Íñigo-Portugués, González-González et al. 2018).

En los ratones viejos sin lesionar, se obtuvo un total de 33 termorreceptores de frío. 14 de esos termorreceptores de frío fueron HB-LT, con características muy similares a la de los ratones jóvenes sin lesionar (Tabla 6). Además, se registró 1 termorreceptor de frío HB ( $1.7 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) con un umbral de frío alto ( $28.3^\circ\text{C}$ ), clasificado como HB-HT (1/33, **Tabla 6**). las terminaciones nerviosas termorreceptoras de frío LB-HT de los ratones viejos, presentan unas características similares a las de los ratones jóvenes (ver **Tabla 4 y 6**). No obstante, tienen una frecuencia máxima de disparo en frío significativamente menor ( $p<0.05$ , Unpaired t test). En el caso de los termorreceptores de frío LB, se registraron 10 terminaciones con una baja actividad espontánea ( $0.8\pm 0.2 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y un umbral bajo de enfriamiento ( $32.5\pm 0.3^\circ\text{C}$ ) y se clasificaron como LB-LT (10/33). Los termorreceptores de frío LB-LT de los ratones viejos, se

diferencian estadísticamente de los LB-HT en el umbral de frío, en su frecuencia máxima, en la frecuencia media en la respuesta a frío y en silenciarse a temperaturas más altas (**Tabla 6**).

En los ratones lesionados se registró un total de 35 termorreceptores de frío, si se agrupan todos los termorreceptores de frío obtenidos a los distintos tiempos de estudio, 15 terminaciones eran HB-LT (15/35), con propiedades no diferentes significativamente de las encontradas en ratones controles (**Tabla 6**). Además, se registraron 4 termorreceptores de frío HB-HT (4/35, **Tabla 6**).

En las LB-HT (7/35), la frecuencia máxima y la respuesta al estímulo de frío se incrementó significativamente en los ratones lesionados respecto a los controles ( $11.71 \pm 2.29$ ,  $p < 0.05$ ;  $9.62 \pm 1.65$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente). 9 de las 35 terminaciones registradas eran LB-LT. Las terminaciones de frío LB-LT registradas, tanto en ratones controles como en ratones lesionados, presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las LB-HT de los ratones sin lesionar (**Tabla 6**) en el umbral a frío ( $p < 0.001$ , Unpaired t test), la frecuencia máxima, la respuesta a frío ( $p < 0.05$ , Unpaired t test) y la temperatura de silenciamiento, que fue más alta ( $p < 0.05$ , Unpaired t test).

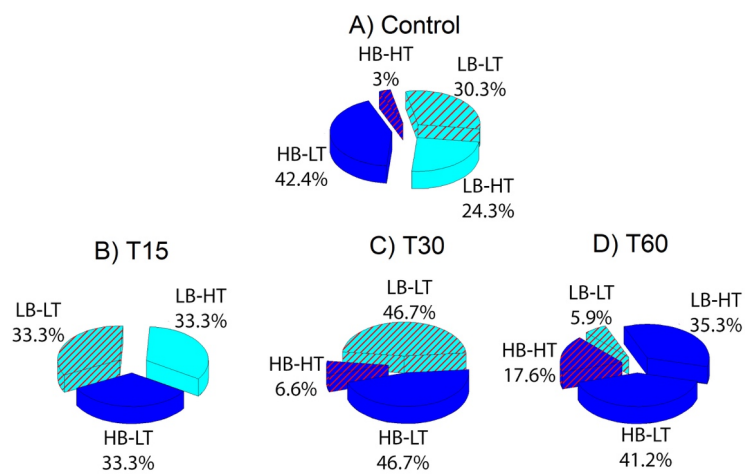


**Figura 39.** Distribución de las terminaciones corneales termorreceptores de frío atendiendo a su umbral térmico y a su frecuencia de disparo espontánea a 34°C. Las terminaciones de las córneas intactas (control) se representan con símbolos negros (círculos para las terminaciones registradas en el área central y triángulos para las terminaciones registradas en el área periférica). Las terminaciones registradas en las córneas de ratones viejos lesionados (15 a 60 días después de la cirugía) se representan con símbolos rojos (círculos para las terminaciones registradas en el área lesionada, y triángulos para las terminaciones registradas en el área periférica). Las líneas punteadas horizontales y verticales delimitan los valores respectivos de umbral de frío y de actividad espontánea usados para definir las terminaciones termorreceptoras de frío como HB-LT y LB-HT. Algunas de las terminaciones, tanto de ratones envejecidos sin lesionar como de ratones envejecidos lesionados, se localizan fuera de los cuadrantes, mostrando que tienen características de disparo mixtas (alta actividad espontánea y alto umbral [HB-HT] y baja actividad espontánea y bajo umbral [LB-LT]).

Las proporciones de las subpoblaciones de termorreceptores de frío de los ratones viejos son bastante distintas a las observadas en los ratones jóvenes. Los ratones viejos intactos, tenían como se ha mencionado previamente,



poblaciones de termorreceptores de frío alterados, de modo que los termorreceptores de frío LB-LT tienen una incidencia mayor que las LB-HT (**Figura 40**). Esta situación, es muy similar a la observada en los ratones jóvenes lesionados en T60 (**Figura 25**). La lesión en los ratones viejos alteró aun más la proporción de terminaciones LB-LT, que se redujo considerablemente en T60, pasando a representar menos del 6%.



**Figura 40.** Cambios en las proporciones de los termorreceptores de frío registrados durante los distintos tiempos de estudio (A: Control; B-D: T15-T60). En azul oscuro se representan los termorreceptores de frío HB-LT, en azul oscuro con rayas rojas se representan los termorreceptores de frío HB-HT, en azul claro se representan los termorreceptores de frío LB-HT y, finalmente, en azul claro con rayas rojas se representan los termorreceptores de frío LB-LT.

**Tabla 6.** Características funcionales de las terminaciones termorreceptoras de frío de ratones viejos intactos (controles) y de las terminaciones termorreceptoras de frío registrados en los distintos tiempos de estudios tras la ablación láser (PRK). Se ha subdividido en las distintas clases de termorreceptores de frío registrados. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001

	Actividad Espontánea	Umbral Frío	Frecuencia Máxima	Respuesta frío	Silenciamiento	Estímulo Mecánico		Respuesta Mecánica
	imp·s <sup>-1</sup>	°C	imp·s <sup>-1</sup>	imp·s <sup>-1</sup>	°C	Antes	Después	imp·s <sup>-1</sup>
HB-LT Control (n=14)	5.±0.8	32.8±0.2	40.7±4.9	32.4±4.3	25.4±0.7	56.8±8.4	77.6±11.5	2.1±0.7
HB-LT PRK (n=15)	5.1±0.9	32.4±0.2	34.9±4.9	24.7±2.6	24.6±1.2	44.6±9.2	52.6±7.7	0.65±0.6
HB-HT Control (n=1)	1.70	28.30	7.00	6.6	17.30	21.00	76.00	5.50
HB-HT PRK (n=4)	3.6±1.1	29±0.8	14.5±2.5	12.±3.2	20.2±1.4	33±21.4	34±22.3	0.08±0.25
LB-LT Control (n=10)	0.8±0.2	32.5±0.3***	17.1±5.9*	12.9±3.1*	27±1.4**	6.9±3.2	19.5±7	1.3±0.4
LB-LT PRK (n=9)	0.6±0.1	32.3±0.3***	19.2±4.2*	14.8±3.3*	25.2±1.6*	8.6±2.2	21.1±7.8	1.6±0.8
LB-HT Control (n=8)	0.6±0.1	29.3±0.6	6.4±1	5.7±0.9	20.5±1.1	3.4±1.7	18.5±6.2	1.5±0.6
LB-HT PRK (n=7)	0.7±0.1	29.8±0.4	11.7±2.3*	9.6±1.7*	20.6±1.7	9.2±1	25.2±7.3	1.6±0.7

### A2.3.2 Mecano-nociceptores y Nociceptores polimodales

En total, en los ratones viejos se registraron 22 terminaciones mecano-nociceptoras, 7 en los ratones sin lesionar y 15 en los ratones lesionados. Agrupando las terminaciones nerviosas de los ratones lesionados (PRK), y comparándolos con los ratones viejos sin lesionar (control), se observó que la mayoría de características funcionales evaluadas son similares (Tabla 7), salvo

en que las terminaciones mecano-nociceptoras presentan un aumento en la actividad espontánea a 34°C respecto a la de los ratones controles ( $1.22 \pm 0.4 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$  vs  $0.13 \pm 0.03 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ , Unpaired t test), un efecto que no se había observado en los ratones jóvenes lesionados (**Tabla 3**).

**Tabla 7.** Características funcionales de las terminaciones nerviosas mecano-nociceptoras de ratones viejos sin lesionar (controles) y registrados a distintos tiempos tras la ablación láser (PRK). El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

	Control <i>n</i> =7		PRK <i>n</i> =15	
<b>Actividad espontánea</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	0.13±0.03		1.22±0.44*	
<b>Respuesta a frío</b> ( <i>imp</i> /30s)	<i>Antes</i> 3±0.8	<i>Después</i> 4.9±2.1	<i>Antes</i> 37.3±13.5	<i>Después</i> 24.3±6.7
<b>Δ Frecuencia en estímulo de frío</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	0.12±0.06		-0.4±0.3	
<b>Estímulo de calor</b> ( <i>imp</i> /30s)	<i>Antes</i> 4.1±1.8	<i>Después</i> 4.4±1	<i>Antes</i> 42.9±17.9	<i>Después</i> 28.3±14.2
<b>Δ Frecuencia en estímulo de calor</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	0.02±0.01		-0.3±0.3	
<b>Respuesta mecánica</b> ( <i>imp</i> /10s)	<i>Antes</i> 1.4±0.8	<i>Después</i> 30.9±9.5	<i>Antes</i> 11.5±4.7	<i>Después</i> 23±5.2
<b>Δ Frecuencia en Respuesta Mecánica</b> ( <i>imp</i> · <i>s</i> <sup>-1</sup> )	7.8±3.3		6.4±1.4	

Se registraron, además, 19 terminaciones nerviosas nociceptoras polimodales en total, 10 en los ratones viejos sin lesionar (control) y 9 en el conjunto de los ratones viejos lesionados (PRK) en todos los tiempos. Al comparar las terminaciones nociceptoras polimodales dañadas con los de los ratones envejecidos sin lesionar, se observó un incremento significativamente mayor de actividad durante el estímulo de calor ( $p < 0.05$ , Unpaired t test, **Tabla 8**). Este

incremento no se había observado en los nociceptores polimodales de los ratones jóvenes lesionados (**Tabla 4**).

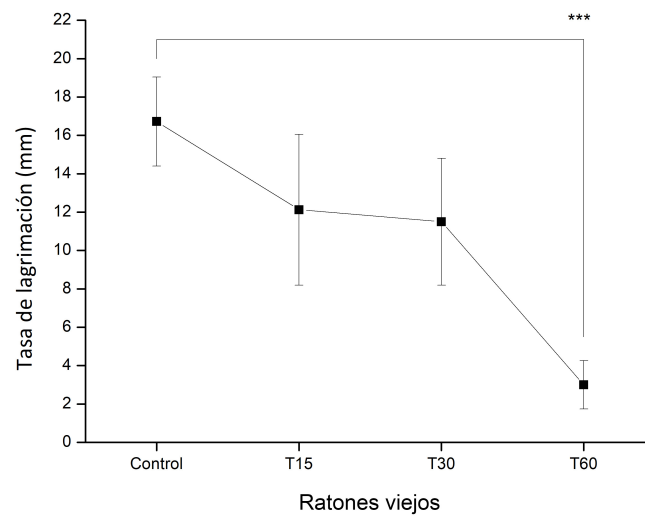
**Tabla 8.** Características funcionales de las terminaciones nerviosas nociceptoras polimodales de ratones envejecidos sin lesionar (controles) y de las terminaciones nerviosas nociceptoras polimodales registrados en los distintos tiempos de estudios tras la ablación láser (PRK). El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

	Control n=10		PRK n=9	
<b>Actividad espontánea</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	0.43±0.17		0.16±0.03	
<b>Respuesta a frío</b> (imp/30s)	Antes 10.8±3.7	Después 9.5±3.4	Antes 5.5±1.2	Después 5.3±1.2
<b>Δ Frecuencia en estímulo de frío</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	-0.04±0.1		0±0.05	
<b>Respuesta mecánica</b> (imp/10s)	Antes 3.6±2.1	Después 17.5±5.1	Antes 3.6±2.1	Después 12.5±4
<b>Δ Frecuencia a estímulo mecánico</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	2±1.2		4.1±0.6	
<b>Respuesta a calor</b> (imp/30s)	Antes 5.5±2.3	Después 20.6±3.6	Antes 14.7±6.4	Después 51.4±15
<b>Δ Frecuencia en estímulo de calor</b> (imp·s <sup>-1</sup> )	0.5±0.1		1.2±0.3*	
<b>Duración respuesta Calor</b> (s)	18.6±4.9		27.5±8.9	
<b>Umbral Respuesta Calor</b> (°C)	41.1±1		41.3±1.4	

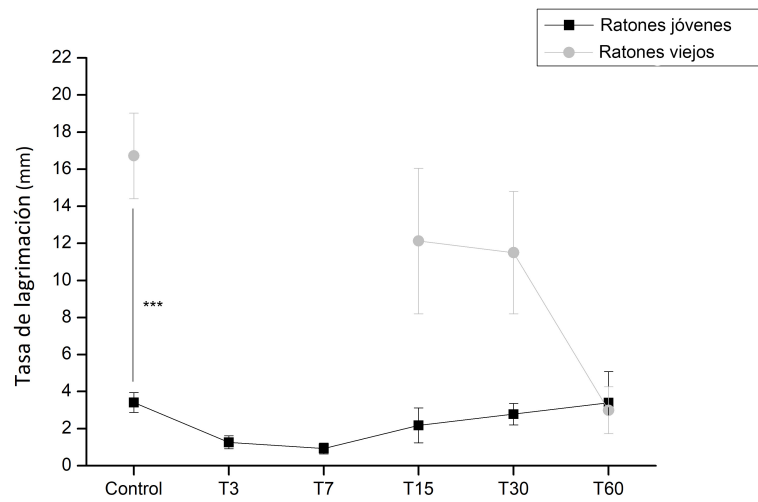
#### A2.4. Tasa de lagrimación

Los ratones viejos sin lesionar tenían una tasa de lagrimación muy superior a la de los ratones jóvenes (**Figura 42**), con un valor promedio de 16.7±2.3 mm (n=38). Tras la lesión, la tasa de lagrimación disminuye leve y progresivamente

en T15 (n=4, 12.1±3.9 mm) y en T30 (n=4, 11.5±3.3 mm). Finalmente, 60 días tras la lesión se produce una disminución drástica de la tasa de lagrimación alcanzando un valor de 3±1.3 mm (n=5, p<0.0001, Unpaired t test, **Figura 41**). Este comportamiento es diferente del de los ratones jóvenes lesionados, que disminuían su tasa de lagrimación hasta T7 y en T15 empezaban a aumentarla hasta alcanzar un valor similar al de los ratones jóvenes sin lesionar (**Figura 42**).



**Figura 41.** Medida de la longitud teñida por la lágrima en un hilo con rojo fenol, colocado durante 1 minuto entre el párpado inferior y la conjuntiva bulbar en el ángulo nasal, en ratones viejos sin lesionar (control) y a diferentes tiempos tras la PRK (T15 a T60). El análisis estadístico se hizo comparando los valores obtenidos a estos tiempos con los del grupo control. \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001



**Figura 42.** Comparación de la tasa de lagrimación en los ratones jóvenes (negro) y en los ratones viejos (gris claro), tanto en ratones sin lesionar (control) como a 3, 7, 15, 30 y 60 días tras la PRK (T3, T7, T15, T30, T60, respectivamente) en los ratones jóvenes y a 15, 30 y 60 días después de la PRK (T15, T30, T60, respectivamente) en los ratones viejos. \*\*\*Pvalor<0.001

## **B) EFECTO DE LA ELIMINACIÓN GENÉTICA DEL CANAL TRPM8 SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA FUNCIÓN DE LAS FIBRAS SENSORIALES CORNEALES**

### **B1) Morfología de la inervación corneal en los ratones TRPM8 KO**

Para estudiar la morfología de la inervación corneal de los ratones TRPM8 KO se utilizó una cepa transgénica de ratones “knock-in” en la cual se interrumpió el locus TRPM8 insertándole la proteína EGFP en la sección del codón de iniciación del TRPM8, por lo que los ratones homocigotos carecían de un canal iónico TRPM8 funcional (Dhaka et al. 2007), pero presentaban la proteína fluorescente EGFP, lo que permitía visualizar las fibras nerviosas corneales de frío carentes de TRPM8.

#### **B1.1. Ratones jóvenes**

En ratones los jóvenes TRPM8 KO los axones subbasales TRPM8<sup>EGFP</sup> presentaban una morfología homogénea, siendo delgados, lisos y carentes de varicosidades (**Figura 43**). La densidad de perforaciones en la lámina basal, por las que penetran los paquetes de axones TRPM8<sup>EGFP</sup>, fue de  $15.1 \pm 1.7$  penetraciones/mm<sup>2</sup> (n=4, **Figura 45-C**). Los “leashes” que presentan axones TRPM8<sup>EGFP</sup> positivos se originaban en su mayoría en la periferia de la córnea y se extendían sin interrupciones hacia el centro corneal, con un promedio de  $3.2 \pm 0.5$  axones TRPM8<sup>EGFP</sup>/ “leash”.

La densidad de fibras nerviosas subbasales TRPM8<sup>EGFP</sup> en los ratones TRPM8 KO fue de  $145 \pm 8.3$  fibras/mm<sup>2</sup> (n=4, **Figura 45-A**). Estos axones TRPM8<sup>EGFP</sup> se doblan perpendicularmente al final de su trayectoria y forman terminaciones generalmente en el centro de la córnea (**Figura 44**). En algunas ocasiones, la desviación perpendicular que forma la rama terminal se producía antes de llegar al centro de la córnea y en esos pocos casos, el axón principal terminaba en el nivel subbasal (terminaciones colapsadas, 0.6% del total). La mayoría (65,7%) de las ramas terminales TRPM8<sup>EGFP</sup> en las capas epiteliales superiores

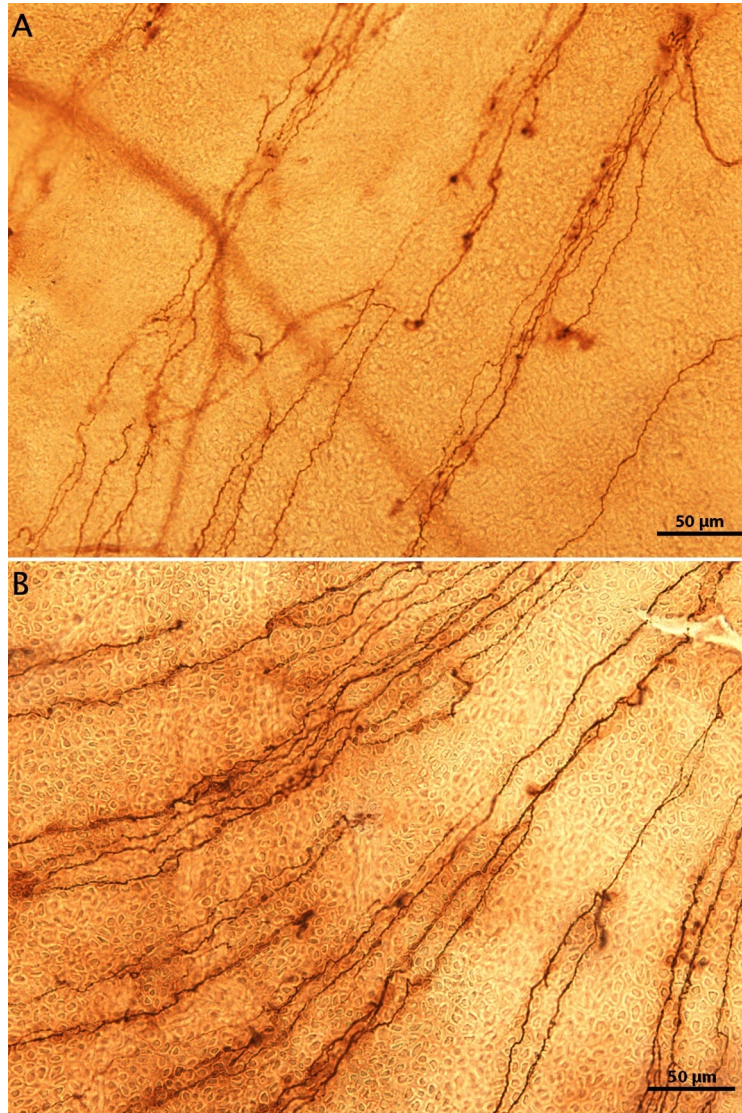
generaron “terminaciones simples” en la proximidad de la capa de células escamosas. Un 27.8% fueron “terminaciones ramificadas”, mientras que sólo el 5.9% formaron “terminaciones complejas”. La densidad media de terminaciones corneales intraepiteliales fue de  $158.1 \pm 9.4$  terminaciones/mm<sup>2</sup> (n=4, **Figura 45-B**).

### **B1.2. Ratones viejos**

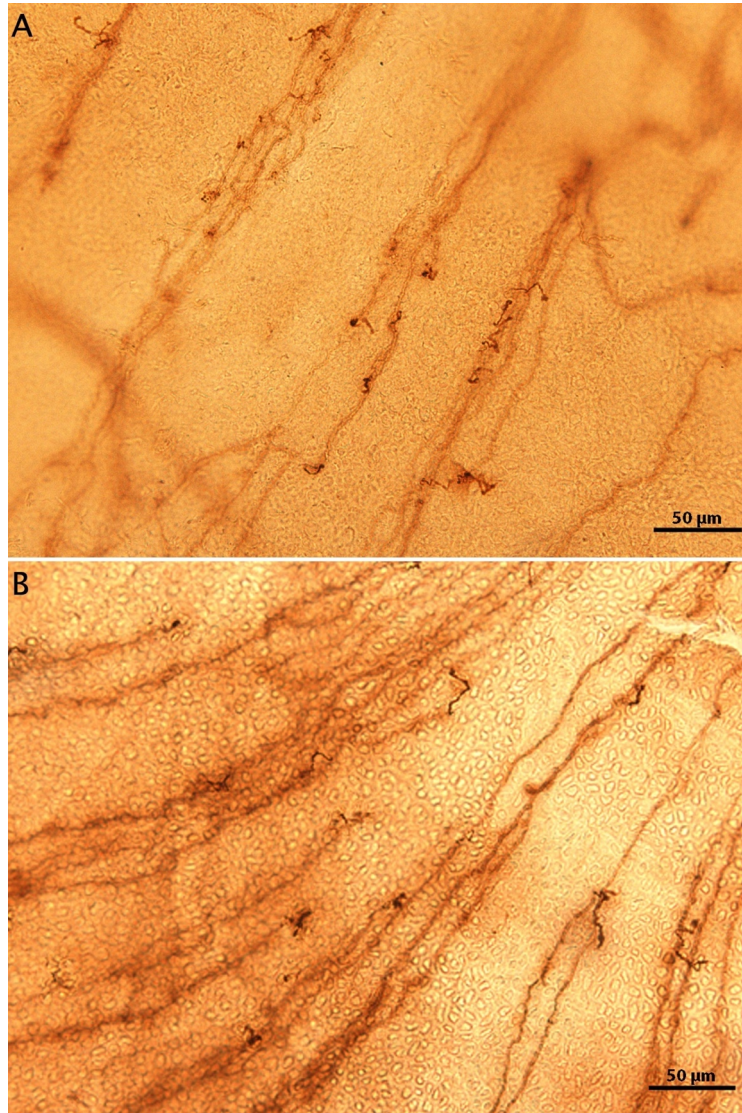
En ratones TRPM8 KO de 24 meses, la densidad de axones subbasales TRPM8<sup>EGFP</sup> ( $172.2 \pm 12.9$  axones/mm<sup>2</sup>, n=4, **Figura 45-A**) no difiere significativamente de la observada en los ratones KO jóvenes. En contraste, la densidad de penetraciones de los nervios estromales a través de la lámina basal fue significativamente más baja ( $9.3 \pm 0.7$  penetraciones/mm<sup>2</sup>, n=4, **Figura 45-C**) que en los ratones TRPM8 KO jóvenes (p<0.01, ANOVA). Sin embargo, éstas presentaban un promedio superior de axones individuales por leash (n=4,  $4.3 \pm 0.3$  axones TRPM8<sup>EGFP</sup>/ “leash”) lo que compensaba su menor número de puntos de penetración. En las córneas de los ratones viejos TRPM8 KO, los axones TRPM8<sup>EGFP</sup> eran no ramificados; cada axón daba lugar a una única y corta rama terminal ascendente, que acababa como una terminación simple en las capas más apicales del epitelio (**Figura 44**). Además, se encontró un alto número de axones subbasales que terminaban abruptamente sin emitir ninguna rama terminal.

Comparado con los ratones jóvenes TRPM8 KO la densidad de nervios intraepiteliales en los viejos fue significativamente más baja ( $100 \pm 7.5$  terminaciones/mm<sup>2</sup>, p<0.01, **Figura 45-B**). Debido a la escasa ramificación de los axones subbasales. Así la relación entre los axones subbasales TRPM8<sup>EGFP</sup> y las terminaciones en ratones KO de 24 meses, se redujo a 0.58 terminaciones por axón, indicando que más del 40% de los axones finalizaban sin emitir ninguna rama terminal.

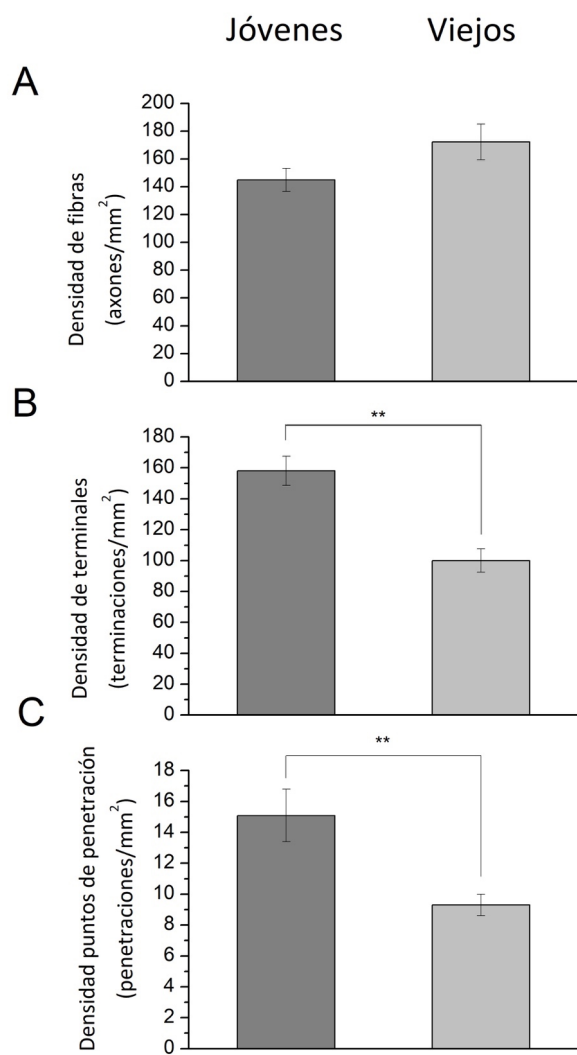




**Figura 43.** Morfología de las fibras TRPM8 del plexo subbasal en ratones jóvenes TRPM8-KO<sup>EGFP</sup> (A) y en ratones viejos TRPM8-KO<sup>EGFP</sup> (B). Barra de escala: 50 μm



**Figura 44.** Morfología de las terminaciones nerviosas epiteliales TRPM8 en (A) ratones jóvenes TRPM8-KO<sup>EGFP</sup> y (B) ratones viejos TRPM8-KO<sup>EGFP</sup>. Barra de escala: 50 µm



**Figura 45.** Comparación de la densidad global de fibras del plexo subbasal (A), la densidad de terminaciones nerviosas epiteliales (B) y la densidad de puntos de penetración por la lámina basal entre ratones TRPM8-KO<sup>EGFP</sup> jóvenes (gris oscuro) y viejos TRPM8-KO<sup>EGFP</sup> (gris claro). \*Pvalor<0.05, \*\*Pvalor<0.01, \*\*\*Pvalor<0.001

## **B2) Características funcionales de los axones TRPM8 KO**

Se registraron un total de 19 ratones transgénicos con el canal iónico TRPM8 funcionalmente inhabilitado, 12 ratones de edades comprendidas entre 3 y 6 meses (jóvenes), y 7 ratones viejos de edades comprendidas entre 22 y 24 meses (viejos).

### **B2.1. Ratones jóvenes**

El porcentaje de unidades activas funcionalmente en los ratones TRPM8 KO fue del  $19.8 \pm 3.7\%$  ( $n=24$ ), un valor significativamente inferior al obtenido en los ratones jóvenes WT ( $55.8 \pm 4.8\%$ ,  $n=7$ ,  $p < 0.0001$ , Unpaired t test). En los ratones jóvenes WT, del total de terminaciones registradas, los termorreceptores de frío representan 52%, los nociceptores polimodales el 24%, los mecano-nociceptores el 6% y las terminaciones indefinidas un 18%. En los ratones jóvenes TRPM8 KO se registraron un total de 44 terminaciones corneales, de estas un 37% eran nociceptoras polimodales, 5% mecano-nociceptores, 30% indefinidas (13/311) y 28% con respuesta a estímulos de frío (12/311).

Las terminaciones nociceptoras polimodales fueron definidas, como en los ratones intactos, en base a su baja actividad espontánea a  $34^\circ\text{C}$  ( $0.2 \pm 0.06 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ), su incremento de actividad durante estímulo de calor ( $1.1 \pm 0.2 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y la ausencia de respuesta durante el estímulo de frío ( $-0.1 \pm 0.05 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ). En el 50% (8/16) de las terminaciones nociceptoras polimodales registradas se observó respuesta a la estimulación mecánica ( $5.9 \pm 1.2 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ). En una terminación se probó el agonista del TRPV1, capsaicina ( $1 \mu\text{M}$ ), que evocó un incremento de la actividad espontánea a  $34^\circ\text{C}$  (de  $0.03$  a  $0.3 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$  medidos durante los 30 segundos previos y 30 segundos durante la perfusión con capsaicina), y sensibilizó la respuesta al estímulo de calor, incrementando el número de impulsos durante la rampa (de  $0.17 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$  a  $0.95 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ), acompañado de una disminución del umbral térmico (de  $50^\circ\text{C}$  a  $34^\circ\text{C}$ ).

De los 311 intentos de registros llevados a cabo en los ratones jóvenes TRPM8 KO, únicamente se pudieron registrar dos terminaciones nerviosas que presentaban una actividad espontánea muy baja ( $0.06 \pm 0.02 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y respondían solo a la estimulación mecánica ( $11.5 \pm 4.8 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ), siendo pues clasificadas como terminaciones mecano-nociceptoras.

Además de las poblaciones funcionales antedichas de nociceptores polimodales y mecano-nociceptores, en los ratones TRPM8 KO jóvenes se registraron 9 terminaciones en las que el estímulo de frío, en lugar de disminuir la actividad espontánea como ocurre en las antes citadas, aumentaba ligeramente, pero sin llegar a alcanzar un incremento de frecuencia de disparo significativamente superior a la actividad espontánea a 34°C más tres veces la desviación estándar. Sin embargo, sí se producía un cambio en su patrón de disparo, que con el enfriamiento pasaba a ser en ráfagas (burst) y/o incrementaba el número de impulsos por ráfagas (**Figura 47**). Este efecto se observó al alcanzar una temperatura media de  $26.4 \pm 1$  °C (n=9). Siete de esas terminaciones no se silenciaron en ningún momento durante la rampa de frío que terminaba al alcanzar una temperatura de  $10.6 \pm 0.6$  °C de media. En 5 de estas terminaciones, la estimulación mecánica evocó una respuesta en ráfagas y en todas ellas provocó un incremento de la frecuencia de disparo (de  $11 \pm 5.3$  imp/10s a  $49.6 \pm 33.3$  imp/10s). En todas las terminaciones nerviosas de este tipo en las que se llevó a cabo el estímulo de calor (n=6), aumentó el número total de impulsos durante el calentamiento, respecto a los 30 segundos previos (de  $40.3 \pm 15.9$  imp/30s a  $149.2 \pm 50.6$  imp/30s) con un umbral de respuestas de  $41.1 \pm 1.6$  °C. En 4 de estas terminaciones nerviosas corneales se perfundió mentol 20  $\mu$ M, un agonista del TRPM8. Solo en una el mentol aumentó su actividad espontánea a 34°C (de  $0.3$  imp·s<sup>-1</sup> a  $0.8$  imp·s<sup>-1</sup>), mientras que no la modificó en las 3 terminaciones restantes (de  $1.3 \pm 0.2$  imp·s<sup>-1</sup> a  $1.2 \pm 0.3$  imp·s<sup>-1</sup>).

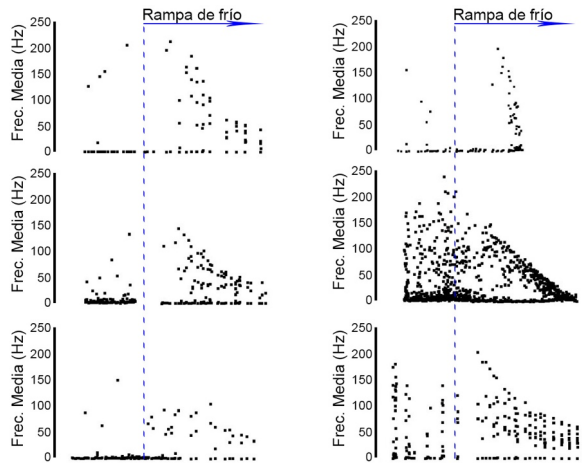
Adicionalmente, en los ratones jóvenes carentes del canal TRPM8, se identificaron 3 terminaciones nerviosas que respondían con un aumento significativo de frecuencia al estímulo de frío. Las 3 terminaciones presentaban una actividad espontánea baja a 34°C ( $0.6 \pm 0.2$  imp·s<sup>-1</sup>). Dos de ellas tenían un umbral de frío bajo (31.5°C y 31.4°C) y la restante un umbral de frío más alto (15.1 °C).

## **B2.2. Ratones viejos**

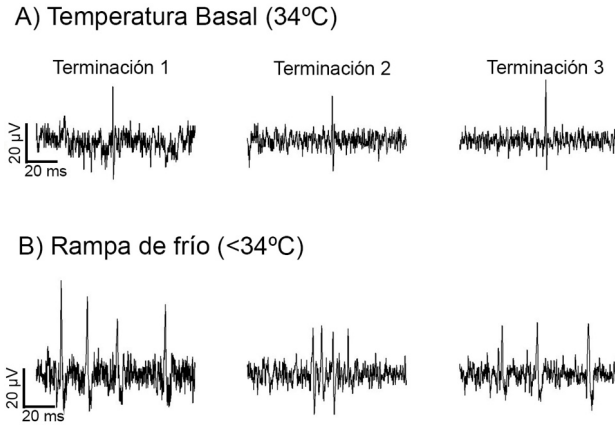
La tasa de éxito de registro en ratones TRPM8 KO viejos fue ligeramente inferior ( $11.8 \pm 3.6\%$ , n=14) a la obtenida en los ratones jóvenes TRPM8 KO, y muy inferior a los ratones viejos WT ( $44.6 \pm 5\%$ , n=16,  $p < 0.0001$ , Unpaired t test). En

estos últimos, del total de terminaciones registradas, los termorreceptores de frío representan el 54%, los nociceptores polimodales el 14%, los mecanonociceptores el 11% y las terminaciones indefinidas el 21%. Mientras que en los ratones de 24 meses TRPM8 KO (n=7), se registraron un total de 19 terminaciones corneales; un 26% eran nociceptores polimodales, 63% indefinidas y 11% respondían al estímulo de frío.

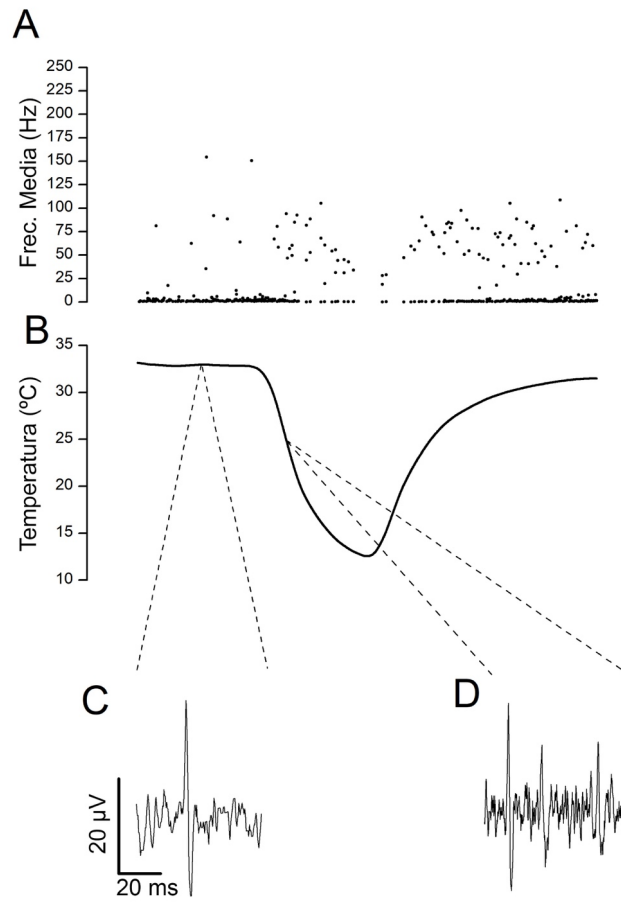
En los ratones viejos TRPM8 KO cinco terminaciones fueron clasificadas como nociceptoras polimodales debido a que tenían una actividad espontánea a 34°C baja ( $0.5 \pm 0.2 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e incrementaron su actividad con el estímulo de calor ( $0.5 \pm 0.07 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Este incremento de descarga fue significativamente inferior a la registrada en los nociceptores polimodales de los ratones jóvenes TRPM8 KO ( $p < 0.01$ , Unpaired t test). Las terminaciones polimodales nociceptoras redujeron también su actividad durante el estímulo de frío ( $-0.3 \pm 0.2 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ), y 3 de ellas respondieron a la estimulación mecánica ( $2.7 \pm 0.3 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ). En la población de ratones viejos TRPM8 KO solo se registraron 2 terminaciones con una baja actividad espontánea ( $0.03 \pm 0.02 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ) que aumentó su actividad con la rampa de frío a un umbral bajo ( $33.4 \pm 0.02 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



**Figura 46.** Frecuencia media (Hz) de 6 terminaciones registradas en ratones TRPM8 KO, que respondieron la rampa de frío mediante un cambio en el patrón de disparo. La línea azul vertical corresponde el inicio del descenso de temperatura.

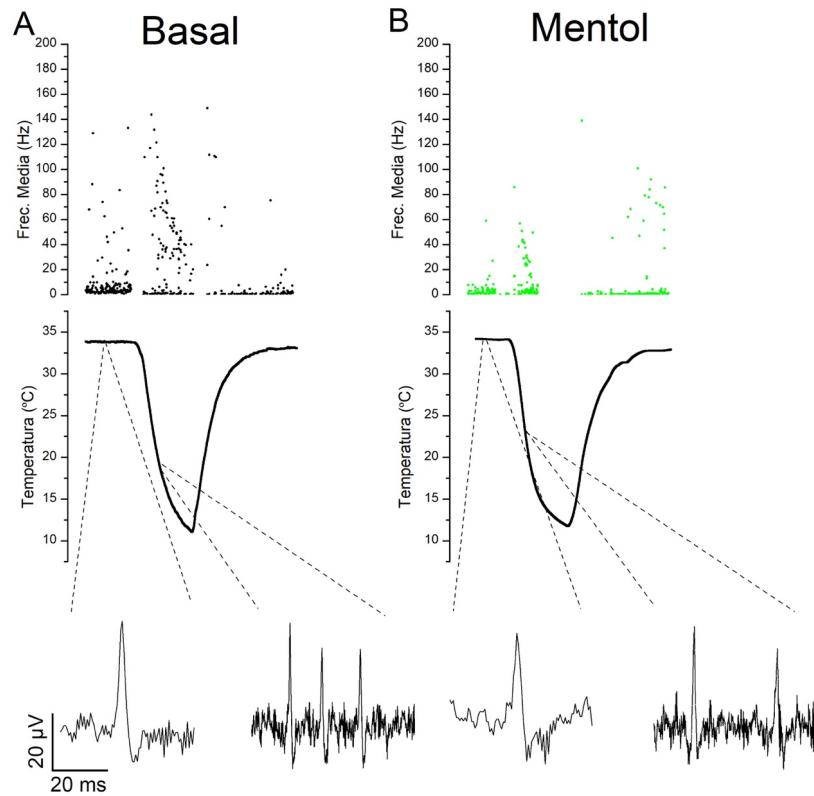


**Figura 47.** Ejemplos de impulsos nerviosos de tres terminaciones distintas (Terminación 1-3) a 34°C (A) que la aplicar una rampa de frío (B) cambiaron su patrón de disparo a ráfagas, en ratones TRPM8 KO.



**Figura 48.** Ejemplo de actividad nerviosa registrada en una terminación comeal de un ratón TRPM8 KO, en la que se observa un aumento en la frecuencia de disparo durante la rampa de frío con un cambio en el patrón de disparo a ráfagas. A) Frecuencia media de NTIs; B) Temperatura de la solución en la cámara de registro; C) Impulso nervioso a temperatura basal (34°C); y D) Impulsos nerviosos durante la rampa de frío.





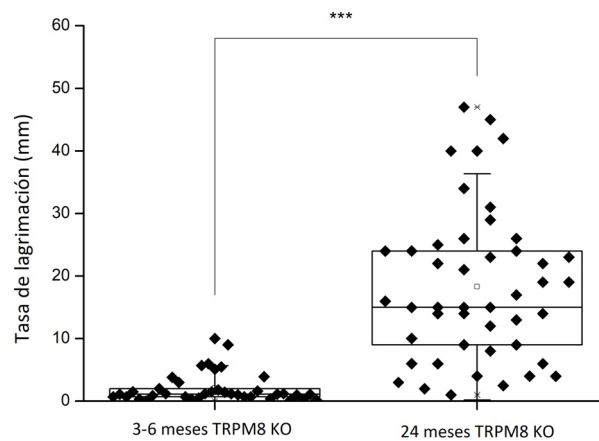
**Figura 49.** Ejemplo de actividad nerviosa de en una terminación registrada en un ratón TRPM8 KO, en la que se observa un aumento de actividad durante la rampa de frío acompañada de un cambio en el patrón de disparo a ráfagas de 3 impulsos nerviosos (A), en la misma terminación se aplicó mentol 20 µm, agonista del TRPM8, y se observó que la actividad no se ve aumentada, sino que en este caso disminuye (B).

### B3) Tasa de lagrimación en los ratones TRPM8 KO

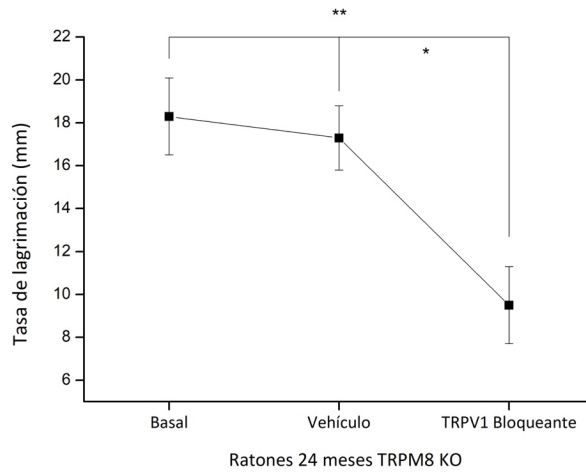
La tasa de lagrimación en los ratones jóvenes TRPM8 KO es significativamente menor a la registrada en los ratones jóvenes WT (n=38,  $2.1 \pm 0.4$  mm,  $p < 0.05$ , Unpaired t test), resultado que confirma trabajos previos a este (Parra et al.

2010). En los ratones viejos TRPM8 KO, la tasa de lagrimación experimenta un incremento muy significativo respecto a la registrada en los ratones TRPM8 KO jóvenes ( $n=30$ ,  $18.3\pm 1.8$  mm,  $p<0.0001$ , Unpaired t test, **Figura 50**). Los ratones viejos WT y TRPM8 KO presentan ambas tasas de lagrimación elevadas, no significativamente diferentes entre sí.

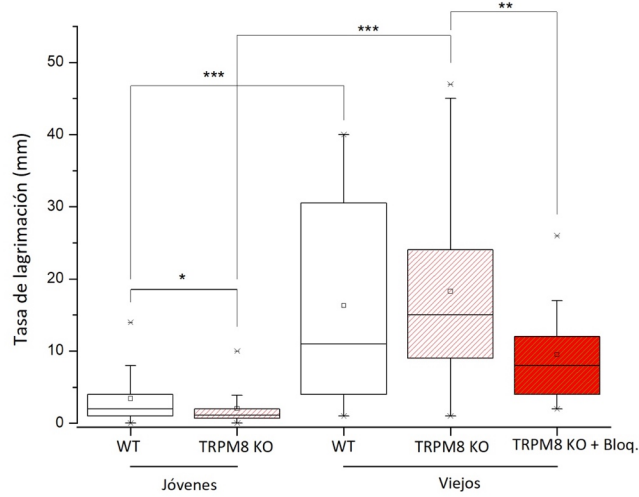
En los ratones viejos TRPM8 KO, se probó un antagonista del TRPV1 (SB366791), este se incubó durante 10 minutos en el ojo aplicando una gota del antagonista o del vehículo (ver métodos). Este protocolo mostró que el antagonista de TRPV1 reduce significativamente la producción de la tasa de lagrimación en un 51.9% ( $n=16$ ,  $9.5\pm 1.6$  mm,  $p<0.01$ , ANOVA, **Figura 51**).



**Figura 50.** Medida de la longitud teñida por la lágrima en un hilo con rojo fenol, colocado durante 1 minuto entre el párpado inferior y la conjuntiva bulbar en el ángulo nasal, en ratones jóvenes (de 3 a 6 meses) y en ratones viejos (24 meses) TRPM8 KO. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \*\*\* $P<0.001$



**Figura 51.** Evolución de la tasa de lagrimación en ratones TRPM8 KO viejos (24 meses), tras añadir un bloqueante TRPV1. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$



**Figura 52.** Evolución de la tasa de lagrimación en ratones jóvenes WT; jóvenes TRPM8 KO; viejos WT, viejos TRPM8 KO; y viejos TRPM8 KO tratados con el antagonista de TRPV1 SB366791. El análisis estadístico se hace comparando los valores con el grupo control. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

## V. DISCUSIÓN

El presente estudio proporciona nueva información respecto a las consecuencias de la lesión nerviosa causada por la cirugía fotorrefractiva (PRK) sobre las morfología y función de los diferentes tipos de terminaciones sensoriales de la córnea, la tasa de secreción lagrimal y el curso temporal post-quirúrgico de dichos cambios, en ratones jóvenes y viejos.

También confirma y amplía el conocimiento de las características morfológicas y funcionales de los nervios corneales, obtenido durante las últimas décadas (Belmonte & Giraldez 1981; Belmonte et al. 1991; Brock et al. 1998; Hirata & Meng 2010; Parra et al. 2010; Kovács et al. 2016b; González-González et al. 2017; Alcalde, Íñigo-Portugués, González-González et al. 2018), al analizar la influencia del envejecimiento y de la eliminación genética del TRPM8, principal canal transductor en los termorreceptores de frío, sobre la morfología y función de los diferentes tipos de terminaciones sensoriales corneales.

### **Características de las terminaciones sensoriales corneales de los ratones jóvenes**

Nuestro trabajo confirma que las neuronas trigeminales que inervan la córnea del ratón responden a las mismas modalidades de estímulo que las trigeminales de otras especies de mamíferos, en los que las terminaciones nerviosas sensoriales fueron definidas como mecano-nociceptoras, nociceptoras polimodales y termorreceptoras de frío (Belmonte et al. 2017). El registro extracelular de terminaciones corneales individuales del ratón nos ha permitido categorizarlas funcionalmente con mayor precisión, empleando como criterio general la presencia de actividad espontánea o de respuesta a la estimulación mecánica, que cuando era detectada, iba seguida de estimulación térmica para determinar su polimodalidad.

El método de tinción inmunohistoquímica de tubulina resulta muy útil para estudiar la arquitectura, la morfología y la densidad de las fibras nerviosas corneales. Las preparaciones de córneas completas permiten la visualización en

tres dimensiones de la red nerviosa epitelial, desde los puntos de penetración de la lámina basal hasta las terminaciones epiteliales más superficiales (Dvorscak & Marfurt 2008) y la obtención de estimaciones de densidad y descripciones morfológicas precisas, tanto del área central como de la periferia de la córnea. Al utilizar la neurotubulina como marcador “pan-neuronal” que tiñe todos los nervios corneales sin tener en cuenta su origen o fenotipo (Dvorscak & Marfurt 2008) hemos podido cuantificar la densidad de fibras totales del plexo subbasal en el área central, que es un 60% más densa que en la periferia, en concordancia con la densidad de fibras del plexo subbasal medida tanto en rata como en humanos (Dvorscak & Marfurt 2008; Marfurt et al. 2010).

La superficie ocular está siempre expuesta a oscilaciones en la humedad ambiental y la temperatura, que en algunos ambientes hostiles puede llegar a alcanzar valores extremos (Belmonte & de la Peña 2013). Bajo condiciones normales, tales cambios son imperceptibles conscientemente. Pero incluso así, traen consigo modificaciones en la película lagrimal y en las células más apicales de la conjuntiva y la córnea (Xiao et al. 2015) y constituyen potenciales estímulos para las terminaciones nerviosas de la superficie ocular. Además de la desecación o las oscilaciones térmicas, otros agentes externos como cuerpos extraños, traumatismos, substancias químicas irritantes, agentes patógenos, etc., amenazan continuamente la superficie ocular y su detección inmediata es necesaria para reducir al máximo el daño tisular. Los diferentes tipos funcionales de receptores sensoriales de la superficie del ojo se han especializado en la detección preferente de estas diferentes modalidades de estímulo.

#### **Termorreceptores de frío.**

Nuestro trabajo confirma las observaciones previas que definen en la superficie corneal de los ratones jóvenes dos subpoblaciones de termorreceptores de frío (González-González et al. 2017). La primera la forman las terminaciones termorreceptoras de frío de bajo umbral (“HB-LT”), caracterizadas por su descarga regular de impulsos nerviosos a la temperatura normal de la córnea y cuya actividad se modifica con cambios de temperatura de menos de 1°C (Hensel 1973; Belmonte et al. 1991; Gallar et al. 1993; Carr et al. 2003). Estas terminaciones HB-LT son las más abundantes en la córnea de ratón joven y responden a cambios estáticos y dinámicos de temperatura, siendo activadas

por agonistas como mentol y por soluciones hiperosmolares (Parra et al. 2014; González-González et al. 2017), como se ha descrito en la córnea y otros tejidos de varias especies (Hensel & Zotterman 1951; Orio et al. 2012; Kurose & Meng 2013; Olivares et al. 2015; Quallo et al. 2015). En el ojo se ha postulado que estos termorreceptores de frío de bajo umbral detectan cambios de temperaturas pequeños y se han relacionado con la evaporación de la película lacrimal, habiéndose sugerido que proporcionan un input sensorial tónico al cerebro que codifica la regulación de la humedad de la superficie ocular (Hirata & Meng 2010; Parra et al. 2010; Belmonte & Gallar 2011; Belmonte et al. 2015; 2017). La otra subpoblación de termorreceptores de frío se caracteriza por una casi total ausencia de actividad nerviosa a la temperatura normal de la córnea y una respuesta al frío a descensos pronunciados de temperatura (“LB-HT”) (González-González et al. 2017). Estos termorreceptores de frío se describieron por primera vez en gatos por Gallar et al (Gallar et al. 1993), que los consideraron “nociceptores de frío”.

Los canales TRPM8 son los principales transductores moleculares de los descensos de temperatura en los mamíferos (Peier et al. 2002; McKemy et al. 2002); su eliminación genética silencia a termorreceptores de frío y elimina su activación por los estímulos de frío en diversos tejidos, entre los que se cuenta la córnea (Parra et al. 2010; Quallo et al. 2015; Reimúndez et al. 2018; Arcas et al. 2019). Además, las neuronas sensoriales, incluyendo las termorreceptoras, poseen canales de potasio que se mantienen abiertos a temperaturas basales y se cierran al enfriarse (canales de fuga “leak”  $K_{2p}$ , TASK-3), contribuyendo de esta manera a la despolarización y al disparo de impulsos nerviosos en los termorreceptores de frío (Reid & Flonta 2001; Viana et al. 2002). Como regla general, las neuronas de otras modalidades sensoriales contrarrestan el efecto despolarizante inespecífico de la exposición a bajas temperaturas mediante la expresión de otro tipo particular de canal de potasio (Kv1), cuya corriente, denominada  $I_{KD}$ , se opone a la despolarización, haciéndolas por ello insensibles a las reducciones de temperatura (Viana et al. 2002; Madrid et al. 2006; Morenilla-Palao et al. 2014). La expresión variable de este canal “de freno” sirve en las neuronas de los termorreceptores de frío canónicos para ajustar su sensibilidad; los termorreceptores de frío de bajo umbral tienen una alta

expresión de TRPM8 y una expresión baja de canales Kv1, mientras que los de alto umbral presentan más bajos niveles de TRPM8 y una expresión alta de los canales “freno” Kv1, requiriendo mayor enfriamiento para su activación (Belmonte & Viana 2008; Madrid et al. 2009; Belmonte et al. 2009; Morenilla-Palao et al. 2014).

En el presente estudio, hemos analizado por vez primera en ratones TRPM8 KO las consecuencias de la carencia a largo plazo del canal TRPM8, sobre las características morfológicas y funcionales de los axones termorreceptores corneales. Nuestros registros electrofisiológicos en ratones jóvenes TRPM8 KO, confirman que los termorreceptores de frío canónicos, HB-LT, están silentes (Parra et al. 2010) pero evidencian también la persistencia de un grupo pequeño de terminaciones nerviosas con sensibilidad al enfriamiento, reflejada en un cambio en su patrón de disparo con la aplicación de frío, ya sea porque pasa a ser en ráfagas o porque aumenta el número de disparos por ráfaga. Resulta tentador especular que se tratarían de terminaciones de frío deprivadas genéticamente de TRPM8, pero que expresan los canales de potasio sensibles al frío descritos anteriormente y que determinan todavía su despolarización por los descensos de temperatura (Viana et al. 2002; Belmonte & Viana 2008; Madrid et al. 2009; Belmonte et al. 2009). Morfológicamente, los nervios termorreceptores de los animales TRPM8 KO son finos, sin varicosidades y presentan una arquitectura muy diferente de la observada en los animales WT, lo que sugiere que este canal, además de su papel transductor, participa de un modo aún por definir en el trofismo neuronal. Igualmente, nuestro estudio corrobora la marcada reducción de secreción lagrimal que se produce en los ratones TRPM8 KO como resultado de el silenciamiento de los termorreceptores de frío (Parra et al. 2010)

#### **Nociceptores polimodales y mecano-nociceptores.**

Los nociceptores polimodales son las unidades funcionales corneales que se encuentran con mayor frecuencia en los registros de axones sensoriales en gato y cobaya, donde representan aproximadamente el 65% del número total de fibras sensoriales activas (Giraldez et al. 1979; Belmonte & Giraldez 1981; Belmonte et al. 1991; Gallar et al. 1993; Brock et al. 1998). Las terminaciones mecano-nociceptoras son el tercer tipo de fibra corneal, especializada en la detección

exclusiva de fuerza mecánica e identificada regularmente en la córnea del ratón. Su proporción en este animal es aparentemente más baja que en otras especies (Belmonte et al. 1991; Gallar et al. 1993; Brock et al. 1998; Acosta et al. 2013, 2014).

Nuestros registros de terminaciones sensoriales aisladas en el ratón confirman también que los nociceptores polimodales corneales parecen ser, comparativamente, menos abundantes en esta especie (aproximadamente el 40%) (González-González et al. 2017). Tal diferencia podría deberse a diferencias entre especies o a un posible sesgo en la técnica empleada para registrar las distintas modalidades de receptores sensoriales. El porcentaje de receptores sensoriales en gatos y cobayas se obtuvo en registros de fibras nerviosas únicas diseccionadas de los nervios ciliares en la parte posterior del globo ocular (Gallar et al. 1993; Acosta et al. 2014; Kovács et al. 2016a). Sin embargo, cuando se registran las terminaciones nerviosas corneales *ex vivo* como se ha hecho en cobaya o ratón, se favorece la selección de terminaciones termorreceptoras de frío, ya que éstas tienen actividad espontánea, se localizan superficialmente y ramifican muy extensamente, generando NTIs de mayor amplitud que los de las terminaciones polimodales o mecano-nociceptores (Gallar et al. 1993; Carr et al. 2003, 2009; Parra et al. 2010; Ivanusic et al. 2013; Acosta et al. 2013, 2014).

Las características funcionales de los nociceptores polimodales y los mecano-nociceptores que encontramos en los ratones TRPM8 KO en el presente estudio, no difieren en su incidencia o características de respuesta de los observados en ratones WT. Esto confirma la selectividad funcional de la eliminación del canal TRPM8 en los ratones TRPM8 KO y prueba que los efectos de la misma sobre la lagrimación y el parpadeo en estos animales, son atribuibles exclusivamente al silenciamiento de los termorreceptores de frío.

### **Características de las terminaciones sensoriales corneales de los ratones viejos**

A pesar de las diferencias en la extensión de la vida entre ratones y humanos, las curvas de supervivencia de los ratones se asemejan notablemente a las



observadas en los humanos (Shock 1964). De hecho, los ratones han sido utilizados ampliamente como modelo animal para el estudio de los efectos biológicos del envejecimiento humano (Wang & Albers 2009). Esto justifica nuestro uso de ratones viejos para analizar los cambios funcionales y morfológicos de la inervación de la superficie corneal tras su lesión quirúrgica, pues sin duda ayuda a definir la influencia del proceso de senescencia sobre la evolución de la lesión de los nervios corneales que se acompaña a la cirugía ocular en humanos de edad avanzada.

El envejecimiento es un proceso caracterizado por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica y conduce a una funcionalidad alterada, incrementando la vulnerabilidad a la muerte (López-Otín et al. 2013). La senescencia celular es un proceso que se ha asociado con el daño del ADN. Este proceso no es un fenómeno desconocido en el sistema nervioso periférico. (Fundin et al. 1997; Namer et al. 2009). La senescencia celular junto con un sistema de renovación molecular ineficiente o exhausto puede agravar o contribuir al envejecimiento del tejido (López-Otín et al. 2013).

Nuestros resultados sobre el envejecimiento de la inervación corneal apoyan a estudios previos que sugieren que la densidad de fibras subbasales corneales disminuye considerablemente con la edad, llegando a reducirse en un 50% en el área central de la córnea, la más ricamente inervada en animales jóvenes (Reichard et al. 2016). En los ratones viejos, la tasa de éxito de registro de terminaciones sensoriales corneales funcionalmente activos, fue más baja que en los ratones jóvenes. También lo fue la proporción de las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal, si bien se mantiene la diferencia relativa entre termorreceptores de frío del área central y de la periferia. Confirmando la reciente descripción de las poblaciones neuronales que inervan la superficie corneal de los ratones viejos (Alcalde, Íñigo-Portugués, González-González et al. 2018), hemos observado una subpoblación de termorreceptores de frío con propiedades alteradas. Esta subpoblación presenta alteraciones en el umbral de respuesta térmica y en la actividad espontánea a temperaturas normales a la que clasificamos, siguiendo el criterio de Alcalde *et al*, 2018 (Alcalde, Íñigo-Portugués, González-González et al. 2018), como “HB-HT” para los termorreceptores que presentan alta actividad espontánea y un umbral de

respuesta a frío situado a temperaturas más bajas y como “LB-LT” si presentan una baja actividad espontánea y una respuesta umbral a frío con cambios de temperatura más pequeños. Las fibras corneales nociceptoras polimodales de los ratones viejos TRPM8 KO presentaron anomalías funcionales semejantes a las de los ratones WT, corroborando la aparente falta de influencia que tiene la eliminación genética del TRPM8 sobre la función de estos receptores.

### **Efecto de la queratectomía fotorrefractiva sobre la morfología y función de los nervios corneales.**

#### **Ratones jóvenes**

El presente trabajo confirma que tras la queratectomía fotorrefractiva (PRK) se produce un daño extenso de los nervios corneales, tanto a nivel morfológico como funcional. Demuestra también por vez primera, que las fibras nerviosas sensoriales corneales de las distintas modalidades (nociceptores polimodales, mecano-nociceptores y termorreceptores de frío) siguen un curso temporal muy diferente en su regeneración y en el grado de recuperación de sus respuestas normales a los estímulos naturales. Las perturbaciones funcionales causadas por la lesión afectaron no solo a los nervios directamente dañados sino también a las terminaciones nerviosas que rodean el área lesionada, especialmente los termorreceptores de frío. Esto posiblemente refleja el daño producido por la PRK en axones parentales con ramas en la zona directamente lesionada pero que dan también terminaciones que alcanzan las partes no directamente lesionadas de la córnea.

La cirugía fotorrefractiva (PRK) es un procedimiento que elimina completamente el epitelio y aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  del estroma anterior de la córnea; así pues, afecta a los paquetes nerviosos de tamaño medio-pequeño, principalmente de la parte anterior y más densa, donde forman el plexo subepitelial (Marfurt et al. 2010). El haz del láser destruye directamente las ramas nerviosas más superficiales en la zona tratada, mientras que los segmentos axonales distales situados lejos de la lesión, pero afectados por el haz del láser, también degeneran rápidamente. Nuestro trabajo confirma estudios previos que evidenciaban como, en un plazo de horas tras la PRK, los nervios desaparecían

totalmente en la zona lesionada y se reducía el número de los que se localizan en el área periférica de la lesión (Tervo 1994).

En los pacientes humanos, la regeneración nerviosa es lenta. Los paquetes de fibras nerviosas subbasales, visualizados con microscopía confocal están presentes únicamente en el 17% de las córneas un mes después de la lesión, y la densidad de estas fibras nerviosas es 98% menor que antes de llevar a cabo la operación. Después de los 3 primeros meses, no se pueden observar fibras nerviosas ramificadas en el centro de la zona de ablación; la densidad media nerviosa continúa reducida al 59% un año después, en comparación con los valores preoperatorios (Erie et al. 2005, 2008). A los dos años de la PRK, la densidad de fibras nerviosas subbasales es similar a la medida preoperatoriamente, pero continúan observándose alteraciones morfológicas hasta 5 años después de la cirugía. A pesar de las diferencias de escala temporal en la velocidad de regeneración entre ratones y humanos, nuestro estudio muestra que la recuperación de la densidad de fibras nerviosas en la córnea de los ratones tras la PRK es también lenta y que dos meses después, todavía no se han restablecido ni la arquitectura ni la densidad de la inervación corneal. Además, nuestros datos sugieren que la recuperación es un proceso dinámico, inicialmente rápido, estabilizado a un mes de la lesión y que se mantiene con valores similares a los dos meses.

La estabilidad y la remodelación los axones intactos depende, bajo circunstancias normales, de señales extrínsecas del entorno, que activan la maquinaria de señalización celular, induciendo la síntesis de las proteínas involucradas en la regulación del citoesqueleto (Michaelevski et al. 2010). Las lesiones nerviosas locales generan una cascada de eventos de señalización retrograda que, en última instancia activa la transcripción de genes requeridos para la supervivencia del axón y su recuperación tras la axotomía (Vogelaar et al. 2009; Gummy et al. 2010; Jung et al. 2012). Las señales extrínsecas que actúan en los conos de crecimiento de los axones dañados modulan la síntesis local de reguladores, tanto positivos como negativos de la dinámica del citoesqueleto, definiendo así la trayectoria y la longitud de las fibras en crecimiento (Jung et al. 2012). Además de las señales quimiotrópicas, las fuerzas mecánicas ejercidas por la extrusión de las células basales durante la proliferación de células

epiteliales que acompañan a la cicatrización de la herida corneal, también podrían influenciar en el crecimiento axonal. Estas fuerzas se transmiten a los axones subbasales y al re-ensamblaje de la membrana basal epitelial, lo que probablemente afecta a la adhesión entre las células epiteliales, la membrana basal y los axones subbasales y, por lo tanto, a la navegación de los axones regenerados (Pal-Ghosh et al. 2016). Considerando los numerosos reguladores positivos y negativos que influyen en la trayectoria final de la elongación axonal tras la lesión, no es sorprendente la lenta e incompleta recuperación de la arquitectura de la inervación pre-lesión tras la PRK (Namavari et al. 2011).

Nuestro estudio revela que la aparición de axones nuevos dentro del área lesionada no implica una recuperación paralela e inmediata de su función. De hecho, hemos observado que las terminaciones sensitivas corneales de distintas modalidades requieren distintos tiempos para recuperar la respuesta natural a sus estímulos. En los ratones jóvenes los termorreceptores de frío empiezan a responder una semana después de la cirugía, mientras que no se pudieron registrar nociceptores polimodales en el área lesionada, hasta 4 semanas más tarde.

Está bien establecido que las neuronas ganglionares sensitivas que sustentan las diversas modalidades somatosensoriales poseen firma genética, características inmunocitoquímicas y propiedades funcionales propias y diferentes entre sí (Lallemend & Ernfors 2012; Usoskin et al. 2015). En los ratones jóvenes, el tiempo más largo requerido por los nociceptores polimodales para restablecer la excitabilidad de su membrana periférica y sus propiedades de transducción tras la PRK, podría reflejar una respuesta diferente de estos nociceptores a las señales moleculares activadas por la lesión y responsables de la reconstrucción de los mecanismos iónicos necesarios para la transducción y la codificación de los estímulos específicos, durante el proceso de regeneración (Hu et al. 2016). Además, los axones nociceptores polimodales corneales son generalmente poco ramificados y acaban como terminaciones simples o ramificadas (Ivanusic et al. 2013; Alamri et al. 2015). Por lo tanto, es posible que, en la mayoría de los casos, la destrucción de los axones polimodales con la PRK afecte a la mayoría, si no a todas, las ramas progenitoras de axones del epitelio y del subepitelio, lo que les requeriría un tiempo más largo para regenerarse. En

contraposición, los axones corneales de los termorreceptores de frío se ramifican ampliamente y forman terminaciones predominantemente complejas (Parra et al. 2010; Ivanusic et al. 2013), y eso permitiría que una parte de ellas pudiera salvarse de la lesión, facilitando así su regeneración.

En los termorreceptores de frío de las córneas lesionadas se observan cambios tanto en la actividad espontánea como en la respuesta a los descensos de temperatura. La tasa de disparo basal y la sensibilidad dinámica al frío de los termorreceptores de frío intactos depende del nivel de expresión de los canales de frío TRPM8 y de la modulación de la excitabilidad de su membrana por los canales Kv y HCN (Viana et al. 2002; Madrid et al. 2009; Orio et al. 2012). Se ha postulado que el potencial de acción de los termorreceptores de frío se origina en una única región espacial restringida de la terminación nerviosa principal del axón, donde cada rama separada codifica los potenciales de acción individuales de forma autónoma (Brock et al. 2001; Carr et al. 2003, 2009). La arquitectura alterada de las terminaciones de frío y la expresión anormal de los canales iónicos implicados en la transducción y la codificación tras la lesión, probablemente disminuya tanto la superficie de la membrana transductora como el número de los puntos de membrana por los que los impulsos generados se propagan. Es esperable que ambas circunstancias contribuyan a la baja frecuencia basal espontánea y a la alteración del umbral de disparo observado en las terminaciones termorreceptoras de frío de las córneas lesionadas. Estas alteraciones se asemejan a las observadas en las terminaciones termorreceptoras de frío de los ratones viejos, en los cuales se ha visto que el proceso de envejecimiento provoca cambios en la expresión de los canales iónicos y la arquitectura de las terminaciones periféricas (Alcalde, Íñigo-Portugués, González-González et al. 2018).

Estudios muy recientes han descrito un aumento de la actividad espontánea en los termorreceptores corneales tras la axotomía quirúrgica de los nervios de la córnea de ratones (Piña et al., 2019). Sin embargo, el daño quirúrgico producido en ese trabajo es más severo y extenso que en la PRK, produciendo una lesión mayor en el tejido, que alcanzaría también a los troncos estromales más profundos, induciendo una sobreexpresión del canal TRPM8 durante la regeneración de estas fibras. En conjunto, las diferencias observadas en ambos

estudios sugieren que el nivel de profundidad y la extensión de la axotomía condiciona la activación de los diferentes mecanismos de expresión génica que regulan la reparación y la regeneración de los axones dañados.

### **Ratones viejos**

La cirugía PRK llevada a cabo en los ratones viejos, ratifica el resultado obtenido en los ratones jóvenes, en el sentido de que la lesión realizada en un área limitada se extiende sus efectos hacia los nervios de las zonas adyacentes, generando en los viejos un daño más severo que el observado en los ratones jóvenes. Estos resultados sugieren que la combinación de lesión traumática con los distintos procesos degenerativos asociados a la edad, determina que los mecanismos de reparación y remodelación en los ratones envejecidos estén dañados o sean defectuosos, traduciéndose en que se requieran tiempos más largos para la recuperación de la densidad previa de fibras del plexo subbasal, especialmente en el área no lesionada.

Los ratones viejos exhiben lesiones del epitelio corneal tanto antes como durante el proceso de recuperación tras la cirugía PRK, confirmando que los mecanismos celulares que mantienen la integridad del tejido corneal en estos animales están afectados por los procesos degenerativos consecuencia al envejecimiento y pueden verse agravados por la lesión. También evidencian que, como ocurre en los animales jóvenes, el daño afecta diferencialmente a las distintas poblaciones neuronales que inervan la superficie ocular y que, como en aquellos, son los nociceptores polimodales la población más vulnerable frente al procedimiento quirúrgico. La población vieja, a diferencia de la joven, se vio más afectada en el área alrededor de la lesión, en la que no se pudo volver a registrar terminaciones nerviosas nociceptoras polimodales. Sin embargo, éstas si se recuperaron en el área lesionada en todos los tiempos de estudio, en contraste con los ratones jóvenes, pero con una incidencia de registro a los 60 días tras la lesión, inferior a la de los ratones viejos sin lesionar y muy inferior a la de los ratones jóvenes. En los ratones viejos, los termorreceptores de frío se ven muy afectados por la lesión con la PRK, aunque nuestros resultados confirman que una parte de estas terminaciones ya presentaban alteraciones similares en condiciones control, corroborando las observaciones de Alcalde *et al* en 2018 (Alcalde, Íñigo-Portugués, González-González et al. 2018). Sin embargo, en los ratones viejos

la presencia de termorreceptores de frío LB-LT tras la PRK es mucho más baja que en los jóvenes (6% en los viejos frente al 36% en los jóvenes, 60 días después la operación) mientras que la población de los termorreceptores de frío HB-HT aumentó un 18%.

En conjunto estos resultados evidencian que la combinación de la degeneración progresiva de las ramas periféricas distales de las neuronas sensoriales por el envejecimiento, con los causados por la lesión de la PRK dan lugar a profundas alteraciones en las características de la actividad nerviosa corneal, que sin duda son la base de las disestesias observadas tras la PRK (Belmonte et al. 2009). Está bien establecido que, tras el daño axonal, las fibras C nociceptoras desarrollan actividad espontánea y además muestran patrones alterados de descarga (Tal & Eliav 1996; Michaelis et al. 2000; Bernal et al. 2016). La hiperexcitabilidad mostrada tras la lesión por las terminaciones mecanonociceptoras, el aumento de actividad nerviosa durante los estímulos nocivos de los nociceptores polimodales y la alteración de los termorreceptores de frío tras la PRK en los ratones, presumiblemente corresponde a un sustrato neural análogo al de las disestesias experimentadas por pacientes maduros sometidos a cirugía corneal.

### **Relación entre secreción lagrimal e inervación corneal**

La superficie ocular se encuentra permanentemente recubierta por la película lagrimal. La información sensorial sobre el nivel de humedad de la superficie ocular la proporciona la inervación de la conjuntiva y la córnea (Hirata & Meng 2010; Parra et al. 2010; Belmonte et al. 2015) en la que se generan los impulsos nerviosos que finalmente excitan a las neuronas parasimpáticas que inervan las glándulas lacrimales.

Existen numerosos estudios que sugieren que las dos clases de termorreceptores de frío (HB-LT y LB-HT) participan en la producción de lágrimas para el mantenimiento de una humedad constante de la superficie ocular (Parra et al. 2010; Quallo et al. 2015; Belmonte 2011; Belmonte et al. 2015) y que el canal iónico TRPM8 es el detector molecular más importante para la medida de la humedad del ojo y la regulación de la lagrimación basal por esas terminaciones

nerviosas. En la misma dirección apuntan los resultados obtenidos en ratones TRPM8 KO. Parra et al (2010) ya habían descrito que la eliminación del canal iónico TRPM8 produce en los ratones jóvenes una secreción lagrimal baja en comparación con los ratones WT de la misma edad. Las alteraciones observadas tras la PRK, tanto en la actividad de los termorreceptores de frío como en la secreción lagrimal en ratones jóvenes aporta nuevos argumentos en favor de esta hipótesis.

Tras la PRK en humanos, aparecen frecuentemente alteraciones en la lagrimación y sensaciones de sequedad ocular (Tuunanen & Tervo 1996; Ang et al. 2001). El dolor inicial, de agudeza e intensidad variables, normalmente desaparece unos pocos días después de la cirugía, coincidiendo con la reepitelización corneal, que protege a las terminaciones intactas y las dañadas de los efectos de su exposición directa a los cambios ambientales. Sin embargo, 6 o más meses después de la cirugía el 50% de los pacientes reporta sensaciones de "sequedad" mientras que otras sensaciones descritas como dolor o párpados pegados al globo ocular, aparecen todavía en el 5-25% de aquellos (Hovanesian et al. 2001). Nuestros datos sugieren que la reaparición funcional de los termorreceptores de frío HB-LT, va en paralelo a la recuperación de la lagrimación basal, lo que refuerza la interpretación de que ésta disminuye cuando falta la población de terminaciones nerviosas termorreceptoras de frío canónicas, y se revierte conforme ésta se va recuperando. Es posible que la presencia de sensaciones dolorosas o molestas que reportan algunos pacientes operados se deba a la aparición, tras la lesión en la PRK, de termorreceptores de frío alterados LB-LT. Estos se postulan como responsables, al menos en parte, de la sensación de sequedad molesta, incluso con tasas normales de secreción lagrimal asociada a la enfermedad de ojo seco (Belmonte et al. 2015, 2017; Kovács et al. 2016) una interpretación también corroborada en esta Tesis.

La contribución de los nociceptores polimodales corneales a los cambios en la secreción lagrimal que se producen tras la lesión quirúrgica de los nervios o como resultado del envejecimiento, sigue siendo todavía tema de debate. En los ratones TRPM8 KO viejos se ha observado un aumento de la secreción lagrimal, con valores muy similares a los observados en los ratones WT de la misma edad. Por tanto, dado que los termorreceptores de frío canónicos en estos animales



están en silencio, es razonable pensar que las terminaciones nociceptoras corneales juegan también un papel relevante en la epifora del envejecimiento.

El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo, clave para la transducción molecular, de ácido, calor y sustancias químicas potencialmente lesivas (Caterina et al. 1997, 1999). En los nociceptores polimodales, este canal actúa como un integrador molecular de tales estímulos, incluyendo agonistas específicos exógenos como la capsaicina y otros vaniloides, y muchos mediadores de la inflamación que son producidos endógenamente y liberados tras una lesión.

El reciente estudio de Alcalde, Íñigo-Portugués, González-González et al (2018) en ratones viejos demostró que funcionalmente, alrededor de 2/3 de las terminaciones de frío de los ratones viejos respondían como las de los jóvenes, pero el resto exhibía una actividad basal muy baja y una respuesta anormal a las rampas de frío. Los cambios morfológicos y funcionales en estos animales aparecían en paralelo con un aumento del flujo basal y la osmolaridad lagrimales, lo que inicialmente sugería que la epifora y el malestar ocular experimentado por los humanos de edad avanzada se debe al menos en parte, a la alteración estructural y funcional de las terminaciones corneales de frío causada por el proceso de senescencia. Sin embargo, la persistencia en los ratones viejos TRPM8 de una secreción lagrimal alta indica que ésta puede ser también atribuible a la activación de los nociceptores polimodales. En nuestros experimentos con ratones viejos TRPM8 KO hemos podido registrar solamente un número pequeño de nociceptores polimodales, sin observar en ellos una actividad tónica aumentada que justifique su contribución a la epifora en los viejos. No obstante, en estos animales, el bloqueo selectivo del canal TRPV1 disminuye un 50% la secreción lagrimal excesiva, lo que es prueba indirecta de que la excitación de los nociceptores polimodales, que normalmente median solo el lagrimeo reflejo evocado por los estímulos irritativos (Parra et al. 2010), también contribuyen a la secreción lagrimal aumentada en los ratones viejos. En éstos, tanto WT como TRPM8 KO, hemos observado frecuentes lesiones corneales de posible origen trófico que actúan seguramente como un estímulo inflamatorio de los nociceptores corneales. Es posible que esa actividad este presente en el ojo del animal entero, pero se silencie en los registros corneales

de ojos enucleados, sumergidos y perfundidos con solución salina que lava los mediadores de la inflamación. A medida que en estos ratones viejos lesionados progresa el daño tisular y la destrucción nerviosa, se desarrolla también una disminución lenta y progresiva de la tasa de lagrimación, reforzando la interpretación de que la presencia de terminaciones sensoriales, normal o anormalmente funcionales, tanto termorreceptoras como polimodales, juega un papel crítico en el mantenimiento de la lagrimación y la regulación de la humedad de la superficie corneal.

En conclusión, los resultados de este trabajo proporcionan nueva información sobre las características morfológicas y funcionales de los nervios corneales y las consecuencias de la lesión nerviosa causada tras la PRK sobre la morfología y la función de los diferentes tipos de terminaciones sensoriales de la córnea, la secreción lagrimal y el curso temporal post-quirúrgico de dichos cambios, en ratones jóvenes y viejos. Aporta, además, nuevos datos sobre la influencia del envejecimiento en la estructura y función de los diferentes tipos de fibras nerviosas que inervan la superficie ocular, ofreciendo una explicación experimentalmente fundada a la aparición de trastornos sensoriales (sequedad y dolor ocular) y autonómicos (secreción lagrimal y parpadeo) en pacientes de edad avanzada.

## VI. CONCLUSIONES

1. La queratectomía fotorrefractiva (PRK) produce un daño extenso en los nervios corneales, tanto a nivel morfológico como funcional.
2. La regeneración post-lesión y la recuperación de la respuesta normal a los estímulos naturales de las fibras nerviosas sensoriales corneales de diferente modalidad sensorial (nociceptores polimodales, mecanonociceptores y termorreceptores de frío) sigue un curso temporal, que es diferente para cada uno de esos tipos funcionales.
3. Los trastornos funcionales causados por la PRK no solo afectan a los nervios de la zona directamente dañada sino también a las terminaciones nerviosas del área corneal que rodea a la lesionada, posiblemente originadas en neuronas parcialmente axotomizadas. Este efecto es especialmente marcado en los termorreceptores de frío, que poseen una extensa ramificación terminal.
4. La recuperación de la densidad de fibras nerviosas en la córnea de los ratones tras la PRK es lenta, y a los dos meses de la lesión todavía no se han restablecido ni la arquitectura ni la densidad originales de las fibras nerviosas corneales.
5. La aparición de axones nuevos en el área lesionada no implica una recuperación inmediata y paralela de su función. Los termorreceptores de frío de la zona corneal lesionada son los primeros en responder, aunque presentan cambios tanto en su actividad espontánea como en la respuesta a los descensos de temperatura.
6. La recuperación de la secreción lagrimal basal va en paralelo con la recuperación funcional de las terminaciones sensoriales corneales, en particular los termorreceptores de frío, confirmando su relevante papel en la regulación tónica de la humedad corneal.
7. La cirugía PRK en los ratones viejos provoca daños morfológicos y funcionales más severos que en los animales jóvenes afectando, como en éstos a la zona de la córnea que rodea a la de la lesión.
8. En los ratones viejos, el daño funcional causado por la PRK es diferente para las distintas poblaciones neuronales. Los nociceptores polimodales

son la población más afectada. Una fracción de los termorreceptores de frío presenta ya alteraciones funcionales antes de la PRK. La proporción de terminaciones funcionalmente anómalas aumenta tras la lesión quirúrgica.

9. La lesión quirúrgica de las terminaciones corneales en ratones viejos conduce a largo plazo a su desaparición y a una disminución lenta y progresiva de la tasa de lagrimación, reforzando la hipótesis de que las terminaciones corneales, especialmente las termorreceptoras de frío, juegan un papel importante en regulación de la humedad de la superficie corneal.
10. En los ratones TRPM8 KO los axones corneales de las neuronas originalmente termorreceptoras de frío son finos, largos y sin varicosidades, con una arquitectura diferente a la de los animales WT.
11. En los ratones TRPM8 KO, no se registran terminaciones nerviosas termorreceptoras de frío con las características funcionales de los termorreceptores de frío HB y LB. Sin embargo, conservan un pequeño número de terminaciones que exhiben sensibilidad residual al frío, expresada como cambios en el patrón de disparo o aumento de su frecuencia de disparo. Los nociceptores polimodales y los mecanonociceptores responden como en los ratones WT, confirmando la selectividad de los efectos de la eliminación del TRPM8 a los termorreceptores de frío.
12. En los ratones jóvenes TRPM8 KO, la secreción lagrimal está reducida. Sin embargo, en los viejos aparece un aumento de la secreción lagrimal basal, atribuible a la estimulación de terminaciones nociceptoras por la aparición en los animales viejos de lesiones corneales e inflamación, que excitarían a los canales TRPV1 de los nociceptores polimodales, evocando una lagrimación irritativa.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe J, Hosokawa H, Okazawa M, Kandachi M, Sawada Y, Yamanaka K, Matsumura K, Kobayashi S (2005) TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Mol Brain Res* 136:91–98. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.01.013
- Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J, Carmen Acosta M, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J (2014) Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 55:3403–3412. doi: 10.1167/iops.13-13774
- Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J (2013) Changes in sensory activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain* 154:2353–62. doi: 10.1016/j.pain.2013.07.012
- Acosta MC, Peral A, Luna C, Pintor J, Belmonte C, Gallar J (2004) Tear Secretion Induced by Selective Stimulation of Corneal and Conjunctival Sensory Nerve Fibers. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 45:2333. doi: 10.1167/iops.03-1366
- Adrian ED (1926) The impulses produced by sensory nerve endings. *J Physiol* 61:49–72. doi: 10.1113/jphysiol.1926.sp002273
- Alamri A, Bron R, Brock JA, Ivanusic JJ (2015) Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Front Neuroanat* 9:71. doi: 10.3389/fnana.2015.00071
- Alcalde I, Íñigo-Portugués A, González-González O, Almaraz L, Artime E, Morenilla-Palao C, Gallar J, Viana F, Merayo-Llodes J, Belmonte C (2018) Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice. *J Comp Neurol* 526:1859–1874. doi: 10.1002/cne.24454
- Almaraz L, Manenschijn J-A, de la Peña E, Viana F (2014) TRPM8. In: 2014 S-VBH (ed) *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels, Handbook of Experimental pharmacology*. pp 547–579
- Ang RT, Dartt DA, Tsubota K (2001) Dry eye after refractive surgery. *Curr Opin*

Ophthalmol 12:318–22

- Arcas JM, González A, Gers-Barlag K, González-González O, Bech F, Demirkhanyan L, Zakharian E, Belmonte C, Gomis A, Viana F (2019) The Immunosuppressant Macrolide Tacrolimus Activates Cold-Sensing TRPM8 Channels. *J Neurosci* 39:949–969. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1726-18.2018
- Atoyan R, Shander D, Botchkareva N V. (2009) Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. *J Invest Dermatol* 129:2312–2315. doi: 10.1038/jid.2009.58
- Axelsson HE, Minde JK, Sonesson A, Toolanen G, Högestätt ED, Zygmunt PM (2009) Transient receptor potential vanilloid 1, vanilloid 2 and melastatin 8 immunoreactive nerve fibers in human skin from individuals with and without Norrbottnian congenital insensitivity to pain. *Neuroscience* 162:1322–1332. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.052
- Babes A, Zorzon D, Reid G (2004) Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur J Neurosci* 20:2276–2282. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03695.x
- Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A (2007) From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol.* 17:490–497
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004) Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41:849–857. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00150-3
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267–84. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028
- Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D (2006) TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* 124:1269–1282. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED,

- Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM (2005) Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12248–12252. doi: 10.1073/pnas.0505356102
- Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M (2013) TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. *Annu Rev Physiol* 75:181–200. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183811
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt S-E, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–208. doi: 10.1038/nature05910
- Bean BPBP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8:451–465. doi: 10.1038/nrn2148
- Begley C, Simpson T, Liu H, Salvo E, Wu Z, Bradley A, Situ P (2013) Quantitative analysis of tear film fluorescence and discomfort during tear film instability and thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:2645–53. doi: 10.1167/iovs.12-11299
- Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R (2004) Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 141:737–745. doi: 10.1038/sj.bjp.0705652
- Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J, Gallar J (2015) What Causes Eye Pain? *Curr Ophthalmol Rep* 3:111–121. doi: 10.1007/s40135-015-0073-9
- Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, Luna C, Gallar J (2004) Nerves and Sensations from the Eye Surface. *Ocul Surf* 2:248–253. doi: 10.1016/S1542-0124(12)70112-X
- Belmonte C, Brock JA, Viana F (2009) Converting cold into pain. *Exp Brain Res* 196:13–30. doi: 10.1007/s00221-009-1797-2
- Belmonte C, Cervero F (1996) *Neurobiology of Nociceptors*. Oxford University Press
- Belmonte C, de la Peña E (2013) *Thermosensation*. Galizia GCG, Lledo PM

- Belmonte C, Gallar J (2011) Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 52:3888. doi: 10.1167/iovs.09-5119
- Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I (1991) Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J Physiol* 437:709–725. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018621
- Belmonte C, Garcia-Hirschfeld J, Gallar J (1997) Neurobiology of ocular pain. *Prog Retin Eye Res* 16:117–156. doi: 10.1016/S1350-9462(96)00027-4
- Belmonte C, Giraldez F (1981) Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol* 321:355–368. doi: 10.1113/jphysiol.1981.sp013989
- Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, Dartt DA, Galor A, et al (2017) TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf* 15:404–437. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.002
- Belmonte C, Viana F (2008) Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 4:14. doi: 10.1186/1744-8069-4-14
- Bernal L, Lopez-Garcia JA, Roza C (2016) Spontaneous activity in C-fibres after partial damage to the saphenous nerve in mice: Effects of retigabine. *Eur J Pain* 20:1335–45. doi: 10.1002/ejp.858
- Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Caceres AI, Escalera J, Jordt S-E (2009) Transient receptor potential ankyrin 1 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases. *FASEB J* 23:1102–1114. doi: 10.1096/fj.08-117812
- Beuerman RW, Schimmelpfennig B (1980) Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 69:196–201. doi: 10.1016/0014-4886(80)90154-5
- Bishop T, Marchand F, Young AR, Lewin GR, McMahon SB (2010) Ultraviolet-B-induced mechanical hyperalgesia: A role for peripheral sensitisation. *Pain* 150:141–152. doi: 10.1016/j.pain.2010.04.018
- Block SM (1992) Biophysical principles of sensory transduction. *Soc Gen Physiol*



Ser 47:1–17

- Brock J, Acosta MC, Al Abed A, Pianova S, Belmonte C (2006) Barium ions inhibit the dynamic response of guinea-pig corneal cold receptors to heating but not to cooling. *J Physiol* 575:573–581. doi: 10.1113/jphysiol.2006.110130
- Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C (1998) Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J Physiol* 512:211–217. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.211bf.x
- Brock JA, Pianova S, Belmonte C (2001) Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *J Physiol* 533:493–501. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0493a.x
- Bron R, Wood RJ, Brock JA, Ivanusic JJ (2014) Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *J Comp Neurol* 522:2967–2979. doi: 10.1002/cne.23560
- Burton H, Terashima S-I, Clark J (1972) Response properties of slowly adapting mechanoreceptors to temperature stimulation in cats. *Brain Res* 45:401–416. doi: 10.1016/0006-8993(72)90471-4
- Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001) Response Properties of Mechanoreceptors and Nociceptors in Mouse Glabrous Skin: An In Vivo Study. *J Neurophysiol* 85:1561–1574. doi: 10.1152/jn.2001.85.4.1561
- Callejo G, Castellanos A, Castany M, Gual A, Luna C, Acosta MC, Gallar J, Giblin JP, et al (2015) Acid-sensing ion channels detect moderate acidifications to induce ocular pain. *Pain* 156:483–495. doi: 10.1097/01.j.pain.0000460335.49525.17
- Carr RW, Pianova S, Fernandez J, Fallon JB, Belmonte C, Brock JA (2003) Effects of Heating and Cooling on Nerve Terminal Impulses Recorded from Cold-sensitive Receptors in the Guinea-pig Cornea. *J Gen Physiol* 121:427–439. doi: 10.1085/jgp.200308814
- Carr RW, Pianova S, McKemy DD, Brock JA (2009) Action potential initiation in the peripheral terminals of cold-sensitive neurones innervating the guinea-pig cornea. *J Physiol* 587:1249–1264. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167023
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-

receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436–441. doi: 10.1038/18906

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824. doi: 10.1038/39807

Chao C, Stapleton F, Zhou X, Chen S, Zhou S, Golebiowski B (2015) Structural and functional changes in corneal innervation after laser in situ keratomileusis and their relationship with dry eye. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 253:2029–2039. doi: 10.1007/s00417-015-3120-1

Chen X, Belmonte C, Rang HP (1997) Capsaicin and carbon dioxide act by distinct mechanisms on sensory nerve terminals in the cat cornea. *Pain* 70:23–9

Cillà S De, Ranno S, Carini E, Fogagnolo P, Ceresara G, Orzalesi N, Rossetti LM (2009) Corneal Subbasal Nerves Changes in Patients with Diabetic Retinopathy: An In Vivo Confocal Study. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 50:5155. doi: 10.1167/iops.09-3384

Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524. doi: 10.1038/nature02196

Colburn RW, Lubin M Lou, Stone DJ, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N (2007) Attenuated Cold Sensitivity in TRPM8 Null Mice. *Neuron* 54:379–386. doi: 10.1016/j.neuron.2007.04.017

Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin S-Y, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL-M, et al (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432:723–730. doi: 10.1038/nature03066

Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285–7. doi: 10.1038/224285a0

Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K, Stapleton F (2017) TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul. Surf.* 15:276–283

- Dana R, Bradley JL, Guerin A, Pivneva I, Stillman IÖ, Evans AM, Schaumberg DA (2019) Estimated Prevalence and Incidence of Dry Eye Disease Based on Coding Analysis of a Large, All-age United States Health Care System. *Am J Ophthalmol* 202:47–54. doi: 10.1016/j.ajo.2019.01.026
- Daniels RL, McKemy DD (2007) Mice Left Out in the Cold: Commentary on the Phenotype of TRPM8-Nulls. *Mol Pain* 3:1744-8069-3–23. doi: 10.1186/1744-8069-3-23
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, et al (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183–187. doi: 10.1038/35012076
- De Felipe C, Belmonte C (1999) c-Jun expression after axotomy of corneal trigeminal ganglion neurons is dependent on the site of injury. *Eur J Neurosci* 11:899–906. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00498.x
- de la Peña E, Mätkiä A, Cabedo H, Belmonte C, Viana F (2005) The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *J Physiol* 567:415–426. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086546
- Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A (2008) Visualizing Cold Spots: TRPM8-Expressing Sensory Neurons and Their Projections. *J Neurosci* 28:566–575. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3976-07.2008
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A (2007) TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron* 54:371–378. doi: 10.1016/j.neuron.2007.02.024
- Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A (2006) TRP Ion Channels and Temperature Sensation. *Annu Rev Neurosci* 29:135–161. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958
- Dvorscak L, Marfurt CF (2008) Age-Related Changes in Rat Corneal Epithelial Nerve Density. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 49:910. doi: 10.1167/iovs.07-1324
- Enyedi P, Czirjak G (2010) Molecular Background of Leak K<sup>+</sup> Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiol Rev* 90:559–605. doi:

10.1152/physrev.00029.2009

- Erie EA, McLaren JW, Kittleson KM, Patel S V, Erie JC, Bourne WM (2008) Corneal subbasal nerve density: a comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens* 34:322–325. doi: 10.1097/ICL.0b013e31818b74f4
- Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM (2005) Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK. *Am J Ophthalmol* 140:1059–1064. doi: 10.1016/j.ajo.2005.07.027
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F (2008) TRPA1 Channels Mediate Cold Temperature Sensing in Mammalian Vagal Sensory Neurons: Pharmacological and Genetic Evidence. *J Neurosci* 28:7863–7875. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1696-08.2008
- Fernández-Trillo J, Florez-Paz D, Iñigo-Portugués A, González-González O, González A, Viana F, Belmonte C, Gomis A. Piezo2 mediates mechanically-evoked pain in the cornea. 2019 (en preparación)
- Fink M (1998) A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17:3297–3308. doi: 10.1093/emboj/17.12.3297
- Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 15:6854–62
- FONFRIA E, MURDOCK PR, CUSDIN FS, BENHAM CD, KELSELL RE, MCNULTY S (2006) Tissue Distribution Profiles of the Human TRPM Cation Channel Family. *J Recept Signal Transduct* 26:159–178. doi: 10.1080/10799890600637506
- Fundin BT, Bergman E, Ulfhake B (1997) Alterations in mystacial pad innervation in the aged rat. *Exp brain Res* 117:324–40. doi: 10.1007/s002210050226
- Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP, Belmonte C (1993) Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol* 468:609–622. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019791

- Gallar J, Rincón-Frutos L, Luna C, Velasco E, Aracil A, Diaz-Tahoces A, Acosta MC (2017) Interference of TRPA1 function affects background activity of corneal cold thermoreceptors in ageing mice. *Acta Ophthalmol* 95. doi: 10.1111/j.1755-3768.2017.0S013
- Gees M, Owsianik G, Voets T (2012) TRP Channels. In: *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 563–608
- Georgopoulos AP (1976) Functional properties of primary afferent units probably related to pain mechanisms in primate glabrous skin. *J Neurophysiol* 39:71–83. doi: 10.1152/jn.1976.39.1.71
- Georgopoulos AP (1977) Stimulus-response relations in high-threshold mechanothermal fibers innervating primate glabrous skin. *Brain Res* 128:547–552. doi: 10.1016/0006-8993(77)90181-0
- Giraldez F, Geijo E, Belmonte C (1979) Response characteristics of corneal sensory fibers to mechanical and thermal stimulation. *Brain Res* 177:571–6. doi: 10.1016/0006-8993(79)90475-x
- González-González O, Bech F, Gallar J, Merayo-Llodes JJ, Belmonte C (2017) Functional Properties of Sensory Nerve Terminals of the Mouse Cornea. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 58:404. doi: 10.1167/iovs.16-20033
- Gover TD, Kao JPY, Weinreich D (2003) Calcium signaling in single peripheral sensory nerve terminals. *J Neurosci* 23:4793–4797. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-12-04793.2003
- Gray JAB, Sato M (1953) Properties of the receptor potential in Pacinian corpuscles. *J Physiol* 122:610–636. doi: 10.1113/jphysiol.1953.sp005025
- Gumy LF, Tan CL, Fawcett JW (2010) The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol* 223:28–37. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.06.004
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X 3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11:946–958. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00503.x

- Hamrah P, Cruzat A, Dastjerdi MH, Prüss H, Zheng L, Shahatit BM, Bayhan HA, Dana R, Pavan-Langston D (2013) Unilateral herpes zoster ophthalmicus results in bilateral corneal nerve alteration: an in vivo confocal microscopy study. *Ophthalmology* 120:40–7. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.07.036
- Hao J, Padilla F, Dandonneau M, Lavebratt C, Lesage F, Noël J, Delmas P (2013) Kv1.1 Channels Act as Mechanical Brake in the Senses of Touch and Pain. *Neuron* 77:899–914. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.035
- Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643–51. doi: 10.1016/0896-6273(92)90086-s
- Hensel H (1973) Neural processes in thermoregulation. *Physiol Rev* 53:948–1017. doi: 10.1152/physrev.1973.53.4.948
- Hensel H, Iggo A, Witt I (1960) A quantitative study of sensitive cutaneous thermoreceptors with C afferent fibres. *J Physiol* 153:113–126. doi: 10.1113/jphysiol.1960.sp006522
- Hensel H, Zotterman Y (1951) The Effect of Menthol on the Thermoreceptors. *Acta Physiol Scand* 24:27–34. doi: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00824.x
- Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edn. Sinauer Associates, INC
- Hirata H, Meng ID (2010) Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: implications for dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:3969–76. doi: 10.1167/iovs.09-4744
- Hirata H, Mizerska K, Marfurt CF, Rosenblatt MI (2015) Hyperosmolar Tears Induce Functional and Structural Alterations of Corneal Nerves: Electrophysiological and Anatomical Evidence Toward Neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:8125–40. doi: 10.1167/iovs.15-18383
- Hirata H, Oshinsky ML (2012) Ocular dryness excites two classes of corneal afferent neurons implicated in basal tearing in rats: involvement of transient receptor potential channels. *J Neurophysiol* 107:1199–1209. doi: 10.1152/jn.00657.2011

- Hirata H, Rosenblatt MI (2014) Hyperosmolar Tears Enhance Cooling Sensitivity of the Corneal Nerves in Rats: Possible Neural Basis for Cold-Induced Dry Eye Pain. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 55:5821. doi: 10.1167/iovs.14-14642
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska M V., Hebert SC (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362:31–38. doi: 10.1038/362031a0
- Hovanesian JA, Shah SS, Maloney RK (2001) Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 27:577–584. doi: 10.1016/S0886-3350(00)00835-X
- Hu G, Huang K, Hu Y, Du G, Xue Z, Zhu X, Fan G (2016) Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons. *Sci Rep* 6:31851. doi: 10.1038/srep31851
- Hunt CC, McIntyre AK (1960) Properties of cutaneous touch receptors in cat. *J Physiol* 153:88–98. doi: 10.1113/jphysiol.1960.sp006520
- Immke DC, Gavva NR (2006) The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 17:582–591. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.09.004
- Ivanusic JJ, Wood RJ, Brock JA (2013) Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *J Comp Neurol* 521:877–893. doi: 10.1002/cne.23207
- Jan LY, Jan YN (2012) Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *J Physiol* 590:2591–2599. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224212
- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B (1999) An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* 274:7325–33. doi: 10.1074/jbc.274.11.7325
- Jordt S-E, Bautista DM, Chuang H, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260–265. doi:

10.1038/nature02282

- Julius D, Nathans J (2012) Signaling by Sensory Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005991–a005991. doi: 10.1101/cshperspect.a005991
- Jung H, Yoon BC, Holt CE (2012) Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci* 13:308–324. doi: 10.1038/nrn3210
- Kang D, Choe C, Kim D (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 564:103–116. doi: 10.1113/jphysiol.2004.081059
- Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B (2007) Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 27:9874–9884. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2221-07.2007
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T (2009) TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1273–8. doi: 10.1073/pnas.0808487106
- Katagiri A, Thompson R, Rahman M, Okamoto K, Bereiter DA (2015) Evidence for TRPA1 involvement in central neural mechanisms in a rat model of dry eye. *Neuroscience* 290:204–13. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.046
- Katsura H (2006) Differential Expression of Capsaicin-, Menthol-, and Mustard Oil-Sensitive Receptors in Naive Rat Geniculate Ganglion Neurons. *Chem Senses* 31:681–688. doi: 10.1093/chemse/bjl009
- Kimball SH, King-Smith PE, Nichols JJ (2010) Evidence for the Major Contribution of Evaporation to Tear Film Thinning between Blinks. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 51:6294. doi: 10.1167/iovs.09-4772
- Knowlton WM, Bifulck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD (2010) TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150:340–350. doi: 10.1016/j.pain.2010.05.021
- Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K (2005) Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat



primary afferent neurons with a $\delta$ /c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 493:596–606. doi: 10.1002/cne.20794

Kovács I, Dienes L, Perényi K, Quirce S, Luna C, Mizerska K, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J (2016a) Lacosamide diminishes dryness-induced hyperexcitability of corneal cold sensitive nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 787:2–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.05.044

Kovács I, Luna C, Quirce S, Mizerska K, Callejo G, Riestra A, Fernández-Sánchez L, Meseguer VM, et al (2016b) Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain* 157:399–417. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000455

Kumazawa T (1996) Chapter 1. The polymodal receptor: bio-warning and defense system. pp 3–18

Kurbanyan K, Hoesi LM, Schrems WA, Hamrah P (2012) Corneal nerve alterations in acute *Acanthamoeba* and fungal keratitis: an in vivo confocal microscopy study. *Eye (Lond)* 26:126–32. doi: 10.1038/eye.2011.270

Kurose M, Meng ID (2013) Corneal dry-responsive neurons in the spinal trigeminal nucleus respond to innocuous cooling in the rat. *J Neurophysiol* 109:2517–2522. doi: 10.1152/jn.00889.2012

Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang D-S, Woolf CJ, Corey DP (2006) TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron* 50:277–289. doi: 10.1016/j.neuron.2006.03.042

Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL (2009) TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* 29:4808–4819. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5380-08.2009

Lallemend F, Ernfors P (2012) Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci* 35:373–381. doi: 10.1016/j.tins.2012.03.006

Lamb TD (2013) Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Prog Retin Eye Res* 36:52–119. doi:

10.1016/j.preteyeres.2013.06.001

LaMotte RH, Thalhammer JG (1982) Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate. *Brain Res* 244:279–287. doi: 10.1016/0006-8993(82)90086-5

Lawrenson JG, Ruskell GL (1991) The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat* 177:75–84

Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, Nelson JD, Simpson T (2009) A Link between Tear Instability and Hyperosmolarity in Dry Eye. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 50:3671. doi: 10.1167/iops.08-2689

Llinas R (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* (80- ) 242:1654–1664. doi: 10.1126/science.3059497

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194–217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039

MacIver MB, Tanelian DL (1993) Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurosci* 13:4511–24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-10-04511.1993

Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A (2005) The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Curr Biol* 15:929–934. doi: 10.1016/j.cub.2005.04.018

Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM (2006) More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 32:335–343. doi: 10.1016/j.mcn.2006.05.005

Madrid R, de la Peña 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. *J Neurosci* 29:3120–31. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4778-08.2009

Madrid R, Donovan-Rodríguez T, Meseguer V, Acosta MC, Belmonte C, Viana F

- (2006) Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *J Neurosci* 26:12512–25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3752-06.2006
- Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (1999) TRAAK Is a Mammalian Neuronal Mechano-gated K<sup>+</sup> Channel. *J Biol Chem* 274:1381–1387. doi: 10.1074/jbc.274.3.1381
- Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (2000) TREK-1 is a heat-activated background K<sup>(+)</sup> channel. *EMBO J* 19:2483–91. doi: 10.1093/emboj/19.11.2483
- Mäkiä A, Madrid R, Meseguer V, De La Peña E, Valero M, Belmonte C, Viana F (2007) Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *J Physiol* 581:155–174. doi: 10.1113/jphysiol.2006.123059
- Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L (2010) Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res* 90:478–492. doi: 10.1016/j.exer.2009.12.010
- May CA (1997) Description and Function of the Ciliary Nerves—Some Historical Remarks on Choroidal Innervation. *Exp Eye Res* 65:1–5. doi: 10.1006/exer.1997.0312
- May PJ, Porter JD (1998) The distribution of primary afferent terminals from the eyelids of macaque monkeys. *Exp Brain Res* 123:368–81. doi: 10.1007/s002210050582
- McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52–58. doi: 10.1038/nature719
- Mergler S, Valtink M, Takayoshi S, Okada Y, Miyajima M, Saika S, Reinach PS (2014) Temperature-sensitive transient receptor potential channels in corneal tissue layers and cells. *Ophthalmic Res*. 52:151–159
- Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodríguez T, Viana F, Nilius B, Voets T (2008) Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci*

28:576–586. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4772-07.2008

Michaevlevski I, Segal-Ruder Y, Rozenbaum M, Medzihradzky KF, Shalem O, Coppola G, Horn-Saban S, Ben-Yaakov K, et al (2010) Signaling to Transcription Networks in the Neuronal Retrograde Injury Response. *Sci Signal* 3:ra53–ra53. doi: 10.1126/scisignal.2000952

Michaelis M, Liu X, Jänig W (2000) Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J Neurosci* 20:2742–8

Montell C (2003) Thermosensation: Hot Findings Make TRPNs Very Cool. *Curr Biol* 13:R476–R478. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00406-8

Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323. doi: 10.1016/0896-6273(89)90069-X

Morenilla-Palao C, Luis E, Fernández-Peña C, Quintero E, Weaver JL, Bayliss DA, Viana F (2014) Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation. *Cell Rep* 8:1571–1582. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.003

Mountcastle VB (1968) *Medical Physiology*, 12th edn. The C.V. Mosby Company

Murata Y, Masuko S (2006) Peripheral and central distribution of TRPV1, substance P and CGRP of rat corneal neurons. *Brain Res* 1085:87–94. doi: 10.1016/j.brainres.2006.02.035

Murthy SE, Loud MC, Daou I, Marshall KL, Schwaller F, Kühnemund J, Francisco AG, Keenan WT, Dubin AE, Lewin GR, Patapoutian A (2018) The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Sci Transl Med* 10:eaat9897. doi: 10.1126/scitranslmed.aat9897

Nagasaki T, Zhao J (2003) Centripetal Movement of Corneal Epithelial Cells in the Normal Adult Mouse. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 44:558. doi: 10.1167/iovs.02-0705

Nagata K (2005) Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a

- Channel for Pain and Hearing. *J Neurosci* 25:4052–4061. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005
- Namavari A, Chaudhary S, Sarkar J, Yco L, Patel K, Han KY, Yue BY, Chang J-H, Jain S (2011) In Vivo Serial Imaging of Regenerating Corneal Nerves after Surgical Transection in Transgenic Thy1-YFP mice. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 52:8025. doi: 10.1167/iovs.11-8332
- Namer B, Barta B, Ørstavik K, Schmidt R, Carr R, Schmelz M, Handwerker HO (2009) Microneurographic assessment of C-fibre function in aged healthy subjects. *J Physiol* 587:419–428. doi: 10.1113/jphysiol.2008.162941
- Nichols B, Dawson CR, Togni B (1983) Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:570–6
- Nishida T (2008) [The cornea: stasis and dynamics]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 112:179–212; discussion 213
- Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M (2009) The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28:1308–18. doi: 10.1038/emboj.2009.57
- Odundan AO (2005) Cellular inflammatory response induced by sensory denervation of the conjunctiva in monkeys. *J Anat* 206:287–94. doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00393.x
- Odundan O, Ruskell G (1992) The source of sensory fibres of the inferior conjunctiva of monkeys. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230:258–63
- Olivares E, Salgado S, Maidana JP, Herrera G, Campos M, Madrid R, Orio P (2015) TRPM8-Dependent Dynamic Response in a Mathematical Model of Cold Thermoreceptor. *PLoS One* 10:e0139314. doi: 10.1371/journal.pone.0139314
- Orio P, Parra A, Madrid R, González O, Belmonte C, Viana F (2012) Role of  $I_h$  in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings. *J Neurophysiol* 108:3009–3023. doi: 10.1152/jn.01033.2011
- Osteen JD, Herzig V, Gilchrist J, Emrick JJ, Zhang C, Wang X, Castro J, Garcia-

- Caraballo S, et al (2016) Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature* 534:494–9. doi: 10.1038/nature17976
- Pal-Ghosh S, Pajoohesh-Ganji A, Tadvalkar G, Kyne BM, Guo X, Zieske JD, Stepp MA (2016) Topical Mitomycin-C enhances subbasal nerve regeneration and reduces erosion frequency in the debridement wounded mouse cornea. *Exp Eye Res* 146:361–9. doi: 10.1016/j.exer.2015.08.023
- Papazian D, Schwarz T, Tempel B, Jan Y, Jan L (1987) Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* (80- ) 237:749–753. doi: 10.1126/science.2441470
- Parra A, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J, Belmonte C (2014) Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain* 155:1481–1491. doi: 10.1016/j.pain.2014.04.025
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C (2010) Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 16:1396–1399. doi: 10.1038/nm.2264
- Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Honoré E (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 17:4283–4290. doi: 10.1093/emboj/17.15.4283
- Payrau P, Pouliquen Y, Faure JP, Offret G (1967) [Corneal transparency]. *Bull Mem Soc Fr Ophtalmol* 80:1–35
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108:705–715. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00652-9
- Perl ER (1996) Chapter 2. Cutaneous polymodal receptors: characteristics and plasticity. pp 21–37
- Piña R, Ugarte G, Campos M, Iñigo-Portugues A, Olivares EOrio P, Belmonte C, Bacigalupo J, Madrid R. Role of TRPM8 channels in altered cold Sensitivity

of corneal primary sensory neurons induced by axonal damage. *J Neurosci* 2019 (en prensa)

Pongs O, Kecskemethy N, Müller R, Krahe-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, Ferrus A (1988) Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J* 7:1087–96

Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF (1999) Functional and Molecular Aspects of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel beta Subunits. *Ann N Y Acad Sci* 868:344–355. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb11296.

Quallo T, Vastani N, Horridge E, Gentry C, Parra A, Moss S, Viana F, Belmonte C, Andersson DA, Bevan S (2015) TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat Commun* 6:7150. doi: 10.1038/ncomms8150

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. *Annu Rev Physiol* 68:619–647. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431

Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, Meyer-Lindenberg A, Nolte I, Junghans C, Guthoff R, Stachs O (2010) Comparative in Vivo Confocal Microscopical Study of the Cornea Anatomy of Different Laboratory Animals. *Curr Eye Res* 35:1072–1080. doi: 10.3109/02713683.2010.513796

Reichard M, Weiss H, Poletti E, Ruggeri A, Guthoff RF, Stachs O, Baltrusch S (2016) Age-Related Changes in Murine Corneal Nerves. *Curr Eye Res* 41:1021–1028. doi: 10.3109/02713683.2015.1088952

Reid G, Flonta M-L (2001) Cold transduction by inhibition of a background potassium conductance in rat primary sensory neurones. *Neurosci Lett* 297:171–174. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01694-3

Reimúndez A, Fernández-Peña C, García G, Fernández R, Ordás P, Gallego R, Pardo-Vazquez JL, Arce V, Viana F, Señarís R (2018) Deletion of the Cold Thermoreceptor TRPM8 Increases Heat Loss and Food Intake Leading to Reduced Body Temperature and Obesity in Mice. *J Neurosci* 38:3643–3656.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.3002-17.2018

- Rhodes KJ, Monaghan MM, Barrezueta NX, Nawoschik S, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Nakahira K, Schechter LE, Trimmer JS (1996) Voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta subunits: expression and distribution of Kv beta 1 and Kv beta 2 in adult rat brain. *J Neurosci* 16:4846–60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-16-04846.1996
- Riley NC, Lwigale PY, Conrad GW (2001) Specificity of corneal nerve positions during embryogenesis. *Mol Vis* 7:297–304
- Rózsa AJ, Guss RB, Beuerman RW (1983) Neural remodeling following experimental surgery of the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1033–51
- Saldanha IJ, Petris R, Han G, Dickersin K, Akpek EK (2018) Research Questions and Outcomes Prioritized by Patients With Dry Eye. *JAMA Ophthalmol* 136:1170. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2018.3352
- Schulz DJ, Temporal S, Barry DM, Garcia ML (2008) Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization. *Cell Mol Life Sci* 65:2215–2231. doi: 10.1007/s00018-008-8060-z
- Shaheen BS, Bakir M, Jain S (2014) Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 59:263–285
- Sherrington CS (1903) Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *J Physiol* 30:39–46. doi: 10.1113/jphysiol.1903.sp000980
- Shock NW (1964) Ageing: The Biology of Senescence. *J Gerontol* 19:521–522. doi: 10.1093/geronj/19.4.521
- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, et al (2004) Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* 172:1175–1178. doi: 10.1097/01.ju.0000134880.55119.cf
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, et al (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in



nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819–829. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00158-2

Straub RH (2014) TRPV1, TRPA1, and TRPM8 channels in inflammation, energy redirection, and water retention: role in chronic inflammatory diseases with an evolutionary perspective. *J Mol Med* 92:925–937. doi: 10.1007/s00109-014-1175-9

Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM (2009) Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Res Rev* 60:2–23. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.018

Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD (2007) Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J Neurosci* 27:14147–57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4578-07.2007

Tal M, Eliav E (1996) Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat. *Pain* 64:511–8. doi: 10.1016/0304-3959(95)00175-1

Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JAJ, Damann N, Everaerts W, Benoit M, et al (2009) Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci* 12:1293–1299. doi: 10.1038/nn.2379

Tanelian DL, Beuerman RW (1984) Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Exp Neurol* 84:165–178. doi: 10.1016/0014-4886(84)90013-X

Tashiro A, Okamoto K, Chang Z, Bereiter DA (2010) Behavioral and neurophysiological correlates of nociception in an animal model of photokeratitis. *Neuroscience* 169:455–462. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.034

ten Tusscher MPM, Klooster J, van der Want JJL, Lamers WPMA, Vrensen GFJM (1989) The allocation of nerve fibres to the anterior eye segment and peripheral ganglia of rats. I. The sensory innervation. *Brain Res* 494:95–104. doi: 10.1016/0006-8993(89)90147-9

- Tervo K (1994) Recovery of Corneal Innervation Following Photorefractive Keratoablation. *Arch Ophthalmol* 112:1466. doi: 10.1001/archophth.1994.01090230080025
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* 21:531–543. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80564-4
- Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, Murakami A (2007) Evaluation of novel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4468–75. doi: 10.1167/iovs.06-1486
- Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R (2001) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61:3760–9
- Tuunanen TH, Tervo TM (1996) Schirmer test values and the outcome of photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 22:702–8
- Uosokin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggström J, et al (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* 18:145–153. doi: 10.1038/nn.3881
- Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76:387–417. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
- Viana F (2018) Nociceptors: thermal allodynia and thermal pain. *Handb Clin Neurol* 156:103–119. doi: 10.1016/B978-0-444-63912-7.00006-0
- Viana F, de la Peña E, Belmonte C (2002) Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 5:254–260. doi: 10.1038/nn809
- 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* 430:748–754. doi: 10.1038/nature02732

- Vogelaar CF, Gervasi NM, Gumy LF, Story DJ, Raha-Chowdhury R, Leung KM, Holt CE, Fawcett JW (2009) Axonal mRNAs: Characterisation and role in the growth and regeneration of dorsal root ganglion axons and growth cones. *Mol Cell Neurosci* 42:102–115. doi: 10.1016/j.mcn.2009.06.002
- Walcott B (1998) The Lacrimal Gland and Its Veil of Tears. *News Physiol Sci* 13:97–103
- Wang S, Albers KM (2009) Behavioral and cellular level changes in the aging somatosensory system. *Ann N Y Acad Sci* 1170:745–9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04011.x
- Weil A (2005) Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRPV1 and TRPM8. *Mol Pharmacol*. doi: 10.1124/mol.105.012146
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9652–6. doi: 10.1073/pnas.92.21.9652
- Whitewright M (1960) An electron microscope study of the cornea in mice, with special reference to the innervation. *J Anat* 94:387–409
- Widmaier E, Raff H, Strang K (2006) *Vander's human physiology: the mechanisms of body function*, 10th edn.
- Xiao B, Wang Y, Reinach PS, Ren Y, Li J, Hua S, Lu H, Chen W (2015) Dynamic ocular surface and lacrimal gland changes induced in experimental murine dry eye. *PLoS One* 10:e0115333. doi: 10.1371/journal.pone.0115333
- Xing H, Ling J, Chen M, Gu JG (2006) Chemical and Cold Sensitivity of Two Distinct Populations of TRPM8-Expressing Somatosensory Neurons. *J Neurophysiol* 95:1221–1230. doi: 10.1152/jn.01035.2005
- Zander E, Wedell G (1951) Observations on the innervation of the cornea. *J Anat* 85:68–99
- Zhang L, Jones S, Brody K, Costa M, Brookes SJH (2004) Thermosensitive transient receptor potential channels in vagal afferent neurons of the mouse. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 286:G983–G991. doi:

10.1152/ajpgi.00441.2003

Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L (1995) Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett* 373:193–198. doi: 10.1016/0014-5793(95)01038-G

Zollman TM, Bragg RM, Harrison DA (2000) Clinical effects of oleoresin capsicum (pepper spray) on the human cornea and conjunctiva. *Ophthalmology* 107:2186–9. doi: 10.1016/s0161-6420(00)00463-2

Zotterman Y (1936) Specific action potentials in the lingual nerve of cat. *Skand Arch Physiol* 75:105–119. doi: 10.1111/j.1748-1716.1936.tb01558.x

## VIII. ANEXOS

# Functional and Morphologic Alterations in Mechanical, Polymodal, and Cold Sensory Nerve Fibers of the Cornea Following Photorefractive Keratectomy

Federico Bech,<sup>1</sup> Omar González-González,<sup>1</sup> Enol Artime,<sup>1</sup> Joana Serrano,<sup>1</sup> Ignacio Alcalde,<sup>1</sup> Juana Gallar,<sup>2</sup> Jesús Merayo-Llodes,<sup>1</sup> and Carlos Belmonte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega, Universidad de Oviedo & Fundación de Investigación Oftalmológica, Oviedo, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, San Juan de Alicante, Spain

Correspondence: Carlos Belmonte, Instituto de Neurociencias, UMH-CSIC, Avenida Santiago Ramón y Cajal, San Juan de Alicante, 203550, Spain; carlos.belmonte@umh.es.

FB and OG-G contributed equally to the work presented here and should therefore be regarded as equivalent authors.

Submitted: February 5, 2018

Accepted: April 4, 2018

Citation: Bech F, González-González O, Artime E, et al. Functional and morphologic alterations in mechanical, polymodal, and cold sensory nerve fibers of the cornea following photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:2281–2292. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24007>

**PURPOSE.** To define the characteristics and time course of the morphologic and functional changes experienced by corneal sensory nerves after photorefractive keratectomy (PRK).

**METHODS.** Unilateral corneal excimer laser photoablation was performed in 54 anesthetized 3- to 6-month-old mice; 11 naïve animals served as control. Mice were killed 0, 3, 7, 15, and 30 days after PRK. Excised eyes were placed in a recording chamber superfused at 34°C. Electrical nerve impulse activity of single sensory terminals was recorded with a micropipette applied onto the corneal surface. Spontaneous and stimulus-evoked (cold, heat, mechanical, and chemical stimuli) nerve terminal impulse (NTI) activity was analyzed. Corneas were fixed and stained with anti-β-Tubulin III antibody to measure nerve density and number of epithelial nerve penetration points of regenerating subbasal leases.

**RESULTS.** Nerve fibers and NTI activity were absent in the injured area between 0 and 7 days after PRK, when sparse regenerating nerve sprouts appear. On day 15, subbasal nerve density reached half the control value and abnormally responding cold-sensitive terminals were recorded inside the lesion. Thirty days after PRK, nerve density was almost restored, active cold thermoreceptors were abundant, and polymodal nociceptor activity first reappeared.

**CONCLUSIONS.** Morphologic regeneration of subbasal corneal nerves started shortly after PRK ablation and was substantially completed 30 days later. Functional recovery appears faster in cold terminals than polymodal terminals, possibly reflecting an incomplete damage of the more extensively branched cold-sensitive axon terminals. Evolution of postsurgical discomfort sensations quality may be associated with the variable regeneration pattern of each fiber type.

**Keywords:** nerve regeneration, photorefractive keratectomy, cold thermoreceptors, polymodal nociceptors, dysesthesia

Photorefractive surgery (PRK) is usually accompanied by decreased corneal sensitivity, transitory tear deficiency, and symptoms of dry eye.<sup>1–4</sup> These disturbances are due in a large extent to damage of corneal sensory nerves. Peripheral nerve injury alters sensory input to the somatosensory cortex and to brainstem centers responsible for corneal sensation, blinking, and reflex parasympathetic stimulation of lacrimal gland secretion.<sup>5,6</sup> This results in dysesthesias, reduced blinking rate, and decreased basal production of the aqueous component of the tear film.<sup>7–10</sup>

During the first 24 hours after PRK, a local inflammatory reaction develops in the injured cornea.<sup>11</sup> Macrophages, monocytes, T cells, and polymorphonuclear cells infiltrate and remove damaged epithelium debris.<sup>12</sup> Release of cytokines, chemokines, and growth factors by injured epithelial cells and keratocytes of the anterior stroma, and by resident and migrating inflammatory cells, rapidly activates repair processes including migration and mitosis of healthy epithelial cells, nerve regrowth, and stromal healing.<sup>13,14</sup> Regeneration of corneal nerves after PRK occurs as a biphasic process. First, branches of the subepithelial nerve plexus at the margin of the injury site reconstruct a transient subbasal plexus composed by fine

neurites that run centrally with migrating cells. In a second stage, this plexus degenerates and is replaced by nerves originating from the underlying stroma.<sup>15,16</sup> However, the recovery of subbasal nerve density is gradual and not complete until 2 to 3 years after surgery.<sup>17,18</sup>

Trigeminal ganglion sensory neurons innervating the cornea are functionally heterogeneous and have been classified as polymodal nociceptor, mechano-nociceptor, and cold thermoreceptor neurons, on the basis of intensity and form of energy (mechanical, thermal, chemical) that activates preferentially their peripheral corneal terminals.<sup>19,20</sup> Each functional class of corneal neuron evokes qualitatively distinct conscious sensations<sup>21,22</sup> and contributes differently to the modulation of tearing and blinking.<sup>20,23,24</sup> Experimental evidence suggests that mechano-nociceptors are important in evoking acute pricking pain when the cornea is mechanically stimulated, while activation of polymodal nociceptors by mechanical, thermal, or chemical noxious stimuli evokes burning pain, hyperalgesia, and neurogenic inflammation. Excitation of both types of nociceptor fibers elicits reflex blinking and irritative tearing.<sup>13,25</sup> In contrast, cold thermoreceptors mediate sensations of ocular surface cooling and drying<sup>22,26</sup> and play an



important role in the modulation of basal tearing and blinking rates associated with the homeostasis of eye surface wetness.<sup>24,27</sup> Surgical injury acutely affects the different classes of sensory axons innervating the ocular surface.<sup>28</sup> However, the degree of residual functional impairment in mechano-nociceptor, polymodal nociceptor, and cold thermoreceptor fibers following PRK, leading eventually to dysesthesias and reflex autonomic disturbances in operated eyes, is still poorly known.

In the present work, we analyzed the changes in spontaneous and stimulus-evoked nerve impulse activity experienced by corneal sensory terminals, immediately and at different times up to 30 days after PRK, while observing the parallel evolution of corneal nerve architecture within and around the wounded area. We discovered that cold-sensitive endings regenerate early albeit a fraction of them, located both in the injured and in the intact peripheral cornea, exhibit an abnormal impulse activity attributable to the incomplete branching of regenerating cold thermoreceptor nerve axons. Polymodal nociceptors and mechano-nociceptors required longer times to recover the normal responsiveness to their natural stimuli.

## METHODS

### Animals

Male, 3- to 6-month-old C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratory (L'Arbresle Cedex, France). Animals were handled and housed according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the applicable guidelines of the European Union (2010/63/EU) and the Spanish Government (RD 53/2013). The ethics committee of the University of Oviedo approved all procedures.

### Corneal Nerve Injury Through Photorefractive Keratectomy (PRK)

Surgical corneal injury was performed by using a VISX Star S2 excimer laser (VISX, Inc., Santa Clara, CA, USA) as previously described.<sup>29-31</sup> Right eyes were subjected to PRK surgery with the following parameters: a 1.5-mm<sup>2</sup> circular area, 45 μm of depth. The procedure included simultaneous ablation in a single step of the epithelium (using a defined epithelial thickness profile of 25 μm centrally) and 20 μm of the anterior stroma (representing approximately 20% of the total stromal thickness), removing all subbasal nerve fibers and intraepithelial terminals of the treated area.

Before surgery, mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine hydrochloride (80 mg/kg, Imalgene 1000; Merial Laboratorios S.A., Barcelona, Spain) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg, Rompun; Bayer Hispania S.L., Barcelona, Spain) followed by topical application of 0.5% tetracaine chlorhydrate and 1 mg oxybuprocaine (Colircusí Anestésico Doble; Alcon S.A., Barcelona, Spain).

### In Vivo Evaluation of Epithelial Wound Healing

Fluorescein staining was used to define the area (mm<sup>2</sup>) of the corneal epithelial defect, which was measured under a Leica S6D stereoscopic microscope equipped with an EC3 digital camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and using a fixed magnification of ×12.5. Observations were made immediately after surgery (day 0) and at 3, 7, 15, and 30 days after PRK surgery (T0, T3, T7, T15, and T30, respectively). These time points were selected because they correspond to the moment of important events in the wound-healing process.<sup>29-32</sup> FIJI image analysis software (ImageJ; [\[agej.nih.gov/ij/\]\(http://agej.nih.gov/ij/\); provided in the public domain by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA\) was applied to measure the area of fluorescein-impregnated cornea. This was manually lined with the freehand selection tool of FIJI; the software calculated automatically the area inside the selection.](http://im</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

### Whole-Mounted Cornea Immunohistochemistry

To obtain the enucleated eyes, animals were deeply anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine hydrochloride (80 mg/kg) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg) and killed by cervical dislocation.

### Immunofluorescence

Freshly isolated eyeballs from mice were dissected and fixed 1 hour at room temperature (RT) in methanol and dimethyl sulfoxide (4:1), then were postfixed with 5 minutes of methanol at -21°C. Afterwards, corneas were rehydrated in graded methanol and washed in 0.1 M PBS pH 7.4 (PBS). They were blocked (blocking serum solution) for 1 hour with 5% BSA, 5% goat serum, 0.2% sodium azide, and 0.3% Triton X-100 in PBS (PBS-Triton). After rinsing, corneas were incubated for 24 hours at RT against rabbit anti-neuronal class III β-Tubulin (1:250; Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) in blocking serum solution. After three rinses with 0.2% BSA (washing solution), 0.2% goat serum, 0.2% sodium azide, and PBS-Triton, corneas were incubated in blocking serum solution for 24 hours at RT with secondary antibody against anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Afterwards, corneas were rinsed three times with washing solution, followed by incubation for 10 minutes at RT with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 2 μg/mL; Molecular Probes). Finally, corneas were mounted in slides with fluorescent mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark).

### Image Acquisition

Fluorescence images were obtained with a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems). For whole-mounted corneas, a mosaic of images was obtained at magnification of ×200 by using tile scan utility of LASX and confocal z stacks, spaced 3.5 μm in the Z-axis.

### Morphologic Data Analysis

Images were analyzed by using also the image analysis software FIJI. Whole-mounted corneas were divided in five areas of study (Supplementary Fig. S1): four peripheral zones, which were defined each as two 0.25 mm<sup>2</sup> square regions (a 500 × 500-μm box) whose peripheral borders were approximately 200 μm away from the limbus border and were separated approximately 500 μm from each other; and a fifth area, defined as the injured area in the center of the cornea, which was determined by the absence of DAPI staining in injured corneas (mean injured area, 1.46 ± 0.13 mm<sup>2</sup>). This circular area was divided in three concentric circles (Supplementary Fig. S1), with the first and biggest circle corresponding to the border of the injury in PRK-ablated corneas. For comparison, in uninjured corneas the central corneal area was also divided into three similar concentric circular areas of 1.5, 1.0, and 0.5 mm<sup>2</sup>.

Subbasal nerves were quantified in the periphery by counting the number of nerves intersecting a line drawn inside the square area (parallel to the limbus; see Supplementary Fig. S1). In the central cornea of both injured and control eyes, subbasal nerves were quantified as the number of nerves intersecting the circumferences defining each of the concen-

tric circles (Supplementary Fig. S1). Nerve density was calculated as the mean number of subbasal nerve fibers per  $\text{mm}^2$  entering each circle.

Penetration sites of subepithelial bundles through the epithelial basal lamina were counted within the total area of the cornea. The total number of penetration points, that is, the number of points where axon bundles transverse the basal lamina of corneal epithelium, was counted both outside and inside the largest,  $1.5\text{-mm}^2$  circle by using z-stack images of injured and uninjured corneas, and expressed as number of penetrations per  $\text{mm}^2$  in the periphery (outside the circle) and central cornea, respectively.

## Electrophysiology

For electrophysiological studies, recordings of single corneal nerve terminals *in vitro* were performed as previously described.<sup>24</sup> In brief, mice were killed by cervical dislocation and eyes were excised and placed in a physiological saline solution similar to tear fluid (in mM: NaCl [128], KCl [5],  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [1],  $\text{NaHCO}_3$  [26],  $\text{CaCl}_2$  [2.4],  $\text{MgCl}_2$  [1.3], and glucose [10]) and bubbled with carbogen gas (5%  $\text{CO}_2$  and 95%  $\text{O}_2$ ). The eye was then placed in a recording chamber and was continuously superfused with the same physiological saline solution. Temperature during the experiment was controlled with a homemade Peltier device.

Extracellular electrical activity of single sensory nerve endings of the corneal surface was recorded with a borosilicate glass microelectrode with tip diameter of approximately  $50\ \mu\text{m}$  that was filled with saline solution. An Ag/AgCl wire located in the bath serves as indifferent electrode. With the aid of a micromanipulator, the recording pipette was placed on the corneal surface with slight suction at different points both in the injured area and in the periphery (mean of 15 seals per cornea, 10 in injured area and 5 in periphery), searching for nerve terminal impulse (NTI) activity. NTIs were amplified with an AC amplifier (Neurolog NL104; Digitimer, Welwyn, UK) and stored at 10 kHz into a computer, using a CED micro 1401 interface and Spike 2 software (both from Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

Only recordings containing NTIs originating from a well-defined single nerve terminal were analyzed. In these recordings NTIs were clearly distinguished from noise ( $\sim 10\ \mu\text{V}$  peak-to-peak) and had similar amplitudes and waveforms, indicating that they originated from the same sensory nerve ending. To minimize deterioration of the preparation with time, the total duration of the experiment was limited to a maximum of 120 minutes per eye (30 minutes for preparation; 90 minutes for recording). Percentage of successful attempts refers to the number of seals made on the cornea in which nerve terminal activity was recorded.

## Experimental Protocol

The recording pipette was placed at regularly aligned points on the corneal surface, separated by an approximate distance of 0.2 mm. First, one half of the cornea was explored starting in the center and descending to the periphery; then, the eye was rotated and the opposite side of the cornea was explored.<sup>33</sup> After 90 minutes of recording attempts, the eye was fixed and prepared for morphologic studies.

Cold stimulation was performed by decreasing the background temperature of the perfusing solution (from  $\sim 34^\circ\text{C}$  to  $\sim 14^\circ\text{C}$  or  $\sim 5^\circ\text{C}$ , in cold thermoreceptors or polymodal nociceptors and mechano-nociceptors, respectively), generating a cooling ramp at mean cooling rate of  $0.6^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ ; when the peak temperature of  $\sim 14^\circ\text{C}$  or  $\sim 5^\circ\text{C}$  was attained, warming was applied at a similar speed to return to the basal

temperature. Following a resting period of 120 seconds, mechanical stimulation was performed by moving forward the pipette with a controlled displacement of the micromanipulator. Pressure with the pipette was maintained for 2 seconds. Two minutes later, a heating ramp (from  $34^\circ\text{C}$  to  $\sim 52^\circ\text{C}$  at  $0.5^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $\sim 30$  seconds' duration) was applied, returning to the initial control value of  $34^\circ\text{C}$  when the peak temperature was reached.

## Analysis of NTI Activity

Success percentage indicates the percentage of successful attempts at recording a nerve terminal activity in relation to the total number of attempts. Background activity is defined as the mean basal ongoing frequency in impulses per second ( $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) at the basal temperature ( $33.9^\circ\text{C} \pm 0.07^\circ\text{C}$ ) measured during the 60-second period that preceded the onset of a stimulus.

The following parameters of the NTI activity were analyzed in the different terminal types.

**Cold Thermoreceptor Terminals.** *Cooling Threshold.* Temperature ( $^\circ\text{C}$ ) during a cooling ramp at which NTI frequency increased to a value that was the mean NTI frequency measured during the 10-second period preceding the onset of a cooling ramp plus three times its standard deviation.

*Cooling Response.* Expressed as the mean in NTI frequency between the cooling threshold and the peak response frequency values during the cooling ramp.

**Polymodal and Mechano-nociceptor Terminals.** *Response to Cooling.* The total number of spikes during the 45 seconds following the onset of the cooling ramp was compared with the total number of spikes during 45 seconds immediately before the cooling ramp.

*Response to Heating.* The total number of spikes during the 30 seconds following the onset of the heating ramp was compared with the total number of spikes during 30 seconds immediately before the heating ramp.

*Response to Mechanical Force.* The total number of NTIs during the 10 seconds following the onset of mechanical stimulation was compared with the total number of NTIs during the 10-second period immediately before applying the mechanical stimulus.

## Statistical Analysis

Statistical comparisons were performed by using Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, CA, USA), Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), and InStat 3 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Data are expressed as mean  $\pm$  SD. For electrophysiology data unpaired Student's *t*-test was used. The morphologic measurements were compared by using 1-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparisons post hoc test. Significance threshold was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Sixty-five mice were used in this study. PRK was performed in a total of 54 mice. Immediately after laser ablation, fluorescein staining in seven mice delimited in the cornea a circular area of epithelial damage of  $2.2 \pm 0.1\ \text{mm}^2$ . Twenty-four hours later, the size of the injured area in the same animals had decreased to  $0.46 \pm 0.22\ \text{mm}^2$ . The injury was not visible after 2 days in four of the seven mice and was very small in the remaining three ( $0.05 \pm 0.08\ \text{mm}^2$ ). On the third day, no fluorescein staining was apparent in any of the eyes. PRK caused initially a



marked opacity that reversed progressively with time. Still, 28% of the corneas continued to show light opacity spots 30 days after surgery.

From the 54 operated animals, 26 corneas (at T0,  $n = 5$ ; T3,  $n = 4$ ; T7,  $n = 6$ ; T15,  $n = 5$ ; T30,  $n = 6$ ) and six corneas of intact mice were studied morphologically (Fig. 1A). Electrophysiological recordings were performed in 43 eyes at various times after PRK (T0,  $n = 5$ ; T3,  $n = 5$ ; T7,  $n = 15$ ; T15,  $n = 10$ ; T30,  $n = 8$ ) and in five control eyes where the cornea was intact. The corneas of 15 eyes previously used for electrophysiological recordings were also studied morphologically. In total, electrical activity was recorded from 117 corneal nerve terminals: 66 with receptive fields located within the central area, in the region where the wound was performed, and 51 terminals located in the surrounding peripheral area.

In all recording experiments, the search for nerve terminal impulse activity started by placing the recording electrode on the corneal surface at different pre-established points defined both in the central area where the injury was made and in the intact periphery. From previous studies in intact mice corneas,<sup>35</sup> we defined the fraction of the nerve terminals of the intact cornea responding only to mechanical force as mechano-nociceptors and those activated by heat and mechanical force as polymodal nociceptors. Finally, cold thermoreceptors, initially defined by their responsiveness to cooling, were subclassified by the value of their spontaneous firing at 34°C and the temperature threshold required to increase their firing rate with a cooling ramp<sup>35</sup> as high-background ( $\geq 1.5$  NTI·s<sup>-1</sup>), low-threshold ( $\geq 30.5^\circ\text{C}$ ) cold thermoreceptors (HB-LT), or low-background ( $< 1.5$  NTI·s<sup>-1</sup>) high-threshold ( $< 30.5^\circ\text{C}$ ) cold thermoreceptors (LB-HT). Altogether, in the central cornea 54.1% of the terminals were identified as cold thermoreceptors, 26.7% as polymodal nociceptors, and 10% as mechano-nociceptors. In the peripheral area, 46.7% were cold thermoreceptors; 26.7%, polymodal nociceptors; and 10%, mechano-nociceptors. The remaining units recorded at the central and peripheral cornea could not be accurately classified.

### Nerve Terminal Impulse Activity Was Absent From the PRK-Injured Area at Early Stages of Corneal Nerve Regeneration

At day 0, immediately after laser ablation, the corneal epithelium had disappeared and the normal innervation of the central cornea was virtually absent. Only midstromal nerve trunks, often terminating abruptly, could be identified in the stroma, while subepithelial and subbasal plexuses were lost (Figs. 1B, 2B, 3A), and no nerve penetration points were identified in the wounded area (Table). In accordance with this morphologic observation, electrical activity was undetectable within the lesioned area in the animals studied immediately after PRK (Fig. 3A).

In the peripheral cornea surrounding the wounded area, the density of nerve fibers measured after surgery and the number of nerve penetration points in the basal lamina per mm<sup>2</sup> was slightly lower in day 0 corneas than in the same area of the corneas of control mice (Fig. 3B; Table). At this time, the incidence of NTI activity in the peripheral area surrounding the wound was similar in operated and intact corneas ( $32.4\% \pm 9.3\%$ ,  $n = 5$  at T0 versus  $39.1\% \pm 7.7\%$ ,  $n = 5$  in intact corneas; Fig. 3B).

At day 3, regenerating individual rectilinear axons, sprouting from some of the cut subbasal nerves, started to enter the injured region (Figs. 1C, 2C), although most appeared abruptly interrupted at the wound border. The overall density of these regenerating fibers within the damaged area was only  $14.3\% \pm$

$3.6\%$  of the density values at the central cornea of intact mice ( $P < 0.001$ ; Fig. 3A, Table). At this time, NTI activity was still undetectable in the wounded area (Fig. 3A).

In the peripheral cornea surrounding the wound, the density of nerve fibers at T3 was significantly lower than in control corneas (Fig. 3B; Table). Likewise, the probability of finding an active nerve terminal at day 3 in the noninjured peripheral cornea was also lower ( $13.9\% \pm 7.9\%$ ,  $n = 5$ ; Fig. 3B). Moreover, cold thermosensory terminals exhibiting abnormal low background activity combined with a low cooling threshold, never observed in uninjured corneas, were recorded at the periphery for the first time (Fig. 4).

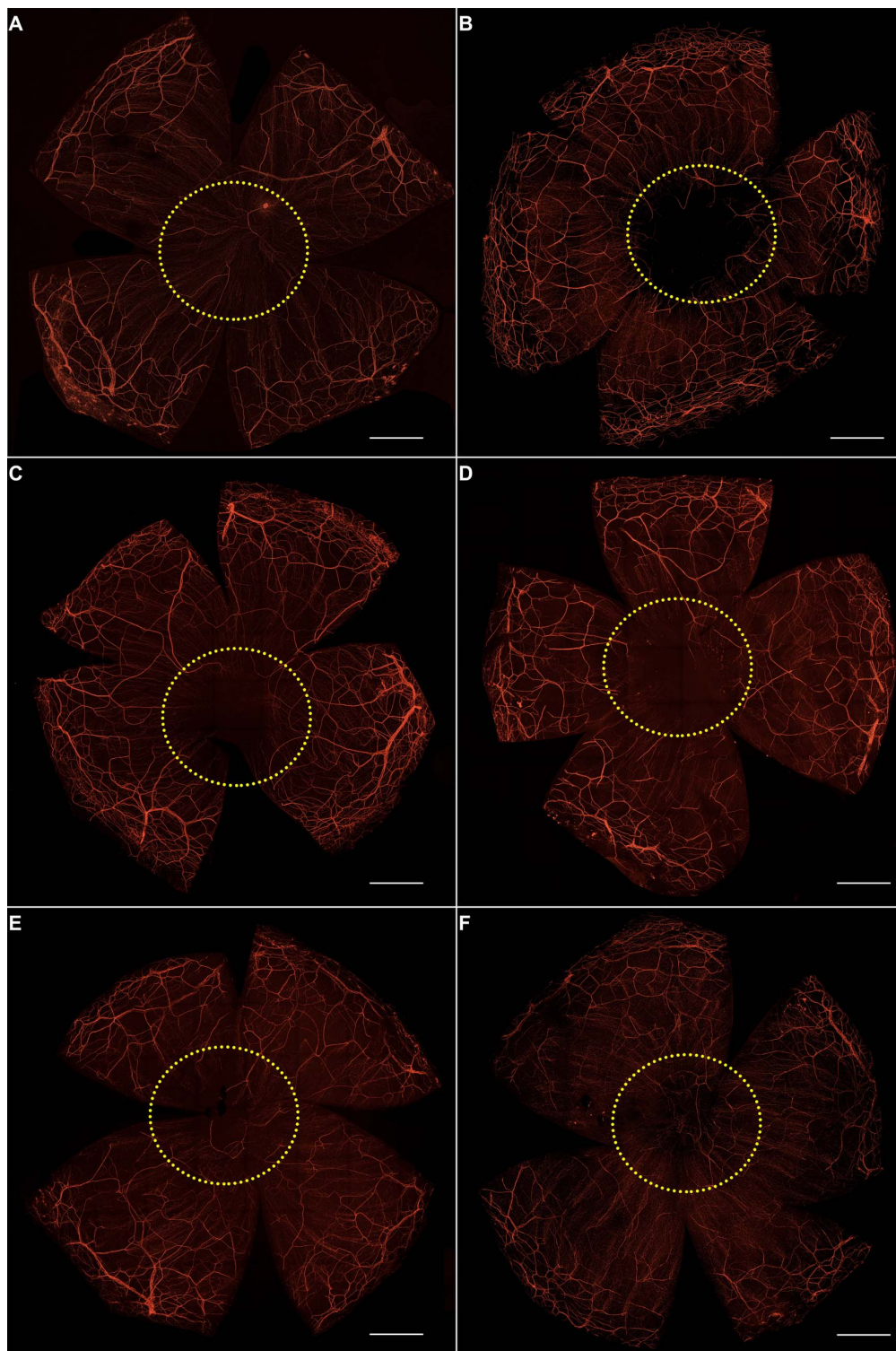
At day 7 an incipient process of remodeling of the stromal nerves below the wounded area was evident, leading to new basal lamina nerve penetration points that reached near-normal numbers (Table). Entering subepithelial axons were short, tortuous, and ramified (Figs. 1D, 2D). However, at T7 most of the axons present in the ablated area originated from peripheral stumps of subbasal leashes that were growing centrally, but the nerve density remained significantly lower ( $P < 0.001$ ) than in control mice, with nerve density values  $51.7\% \pm 4.9\%$  of control values (Table). The first nerve terminal electrical activity within the injured corneal area was recorded at this time point and only in 7 of the 13 explored corneas, with the probability of finding an active unit being significantly lower than for the control value (Fig. 3A). Ten active terminals were clearly identified as cold-sensitive. One active terminal with low background activity ( $0.03$  imp·s<sup>-1</sup>) responded only to mechanical stimulus (from 0 imp/10 s to 71 imp/10 s). In addition, there were three sites with low-amplitude NTIs that could not be identified functionally.

In the peripheral cornea, the mean nerve density increased slightly at T7. In addition, the percentage of points where NTI activity was recorded over the total number of attempts increased to  $23.1\% \pm 6.5\%$  (Fig. 3B). Six of ten terminals were classified as cold thermoreceptors, while the rest were low-amplitude, functionally unidentifiable terminals.

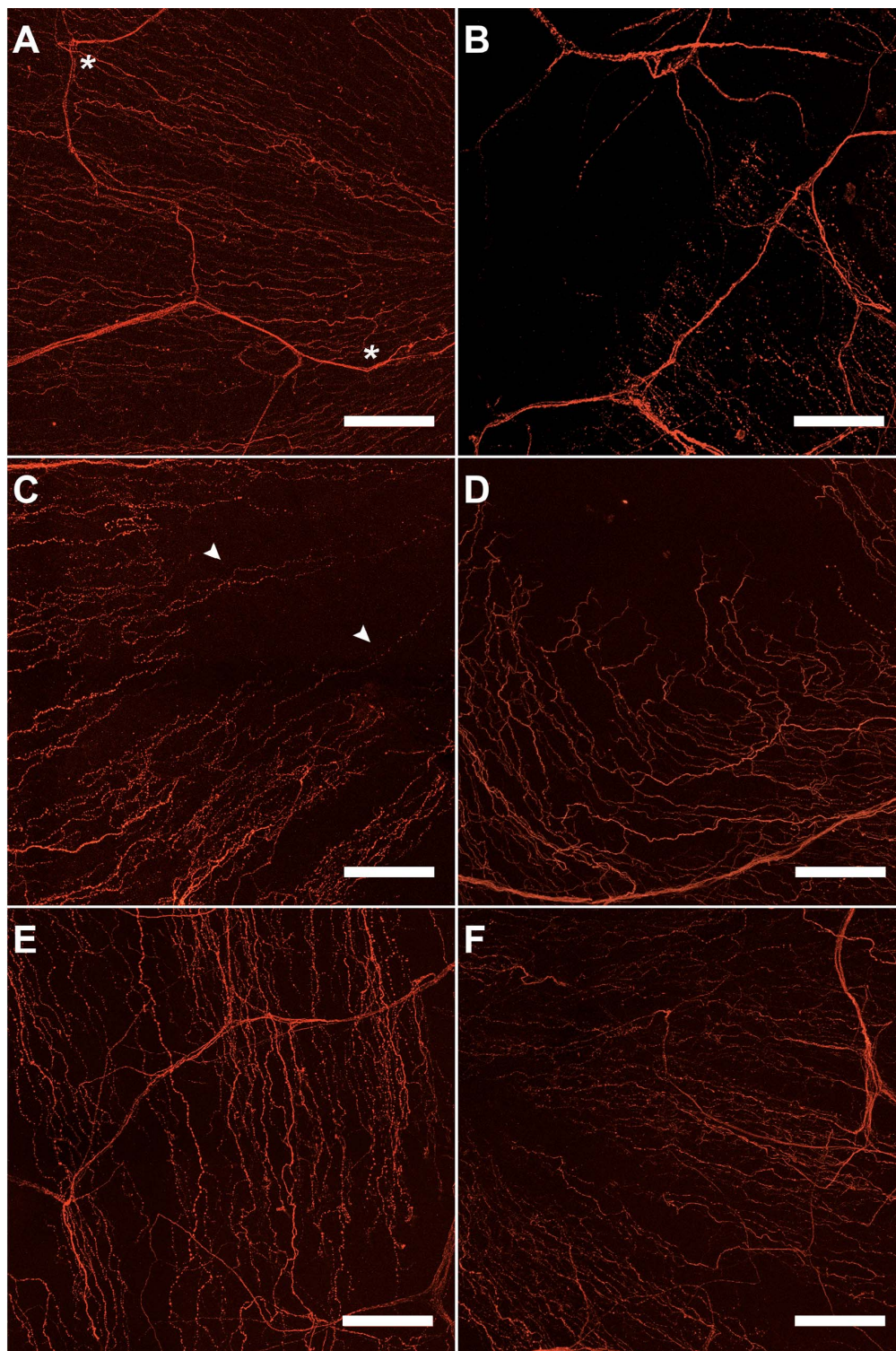
### One Month After PRK, a Subset of the Corneal Endings Exhibited Abnormal Activity Despite the Apparent Morphologic Recovery of the Innervation

At day 15 after injury, the overall density of nerve fibers in the injured area became greater than in the periphery (Table). This was due to a higher number of stromal nerve penetrations (Table) and the incorporation of nerve fibers spreading from the periphery of the wound, forming tortuous and ramified arborizations (Figs. 1E, 2E), although nerve density was still lower ( $58.9\% \pm 3.2\%$ ,  $P < 0.05$ ) than in control eyes. At this time, active terminals were found in 6 of 10 corneas, with a higher probability of finding active recording points than at T7 (Fig. 3A). Six of the identified terminals were characterized as cold-sensitive and one as a mechano-nociceptor. In six instances, units with spontaneous activity were observed that had a low amplitude, which decreased further with cooling, preventing reliable identification of their function.

In the peripheral cornea, nerve density continued to increase at T15 in comparison with earlier stages of the study, and the probability of finding NTIs also increased (Fig. 3B; Table), reaching values near those in the periphery of intact corneas. Four active terminals responded clearly to cold stimuli, while four others presented a low amplitude that prevented a reliable functional identification. Another terminal showed the characteristics of a mechanoreceptor (background activity of  $0.05$  imp·s<sup>-1</sup>, and 0 imp/10 s before and 14 imp/10 s after mechanical stimulation). One polymodal nociceptor



**FIGURE 1.** Subbasal and stromal corneal nerves at different times after PRK. Whole-mount corneas showing at low magnification ( $\times 200$ ) the entire corneal innervation by stromal and subbasal corneal nerves, stained against  $\beta$ -Tubulin III (red). (A) An intact cornea with the area in which the PRK wound is performed has been marked with a circle. (B–F) Corneas excised and stained at different times after PRK (T0, T3, T7, T15, and T30, respectively). The circle indicates in each case the extension of the initial PRK-injured area. Scale bars: 500  $\mu$ m.



**FIGURE 2.** Subbasal and stromal corneal nerves at different times after PRK. z-stack images of whole-mount corneas stained against  $\beta$ -Tubulin III (red). Images from an intact cornea (A) and PRK-operated corneas at different times after PRK ([B–F]: T0, T3, T7, T15, and T30, respectively) are shown. *Asterisks* mark the penetration points. No subbasal nerves were observed immediately after PRK (B). Three days after ablation, some sprouting subbasal nerves started entering the injured area (*arrowheads*, [C]). *Scale bars*: 100  $\mu$ m.

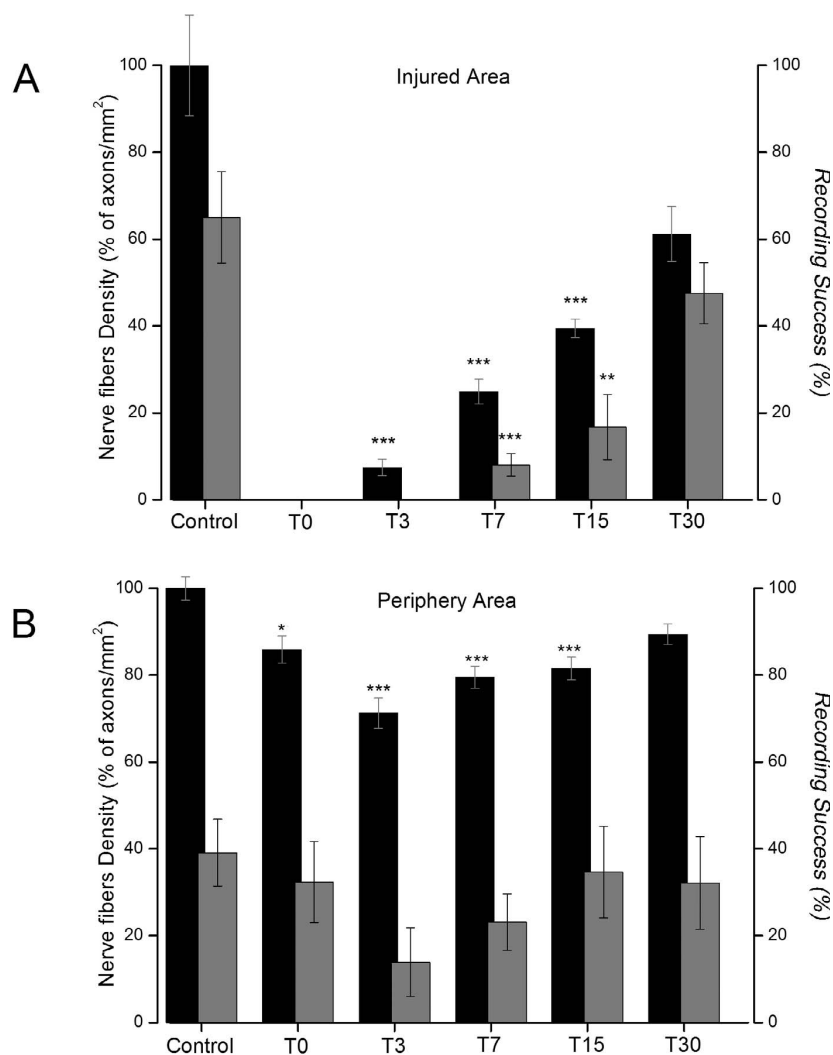


FIGURE 3. Density of subbasal nerve fibers (left axis, black bars) and percentage of successful attempts at recording a terminal (right axis, gray bars) in control eyes and at the different time points after PRK, in the injured area (A) and the peripheral, uninjured area (B). Nerve density is expressed as percentage of the mean number of axons/mm<sup>2</sup> measured in control corneas in the central (A) or the peripheral (B) cornea. Successful recording is expressed as percentage of electrophysiological recording attempts where an active corneal unit is found. Statistical analysis compared differences with control group values: \*P value < 0.05, \*\*P value < 0.01, \*\*\*P value < 0.001.

TABLE. Subbasal Nerve and Epithelial Penetration Point Density Values in the Injured and Peripheral Areas at Different Time Points Post PRK and in Intact Corneas (Control)

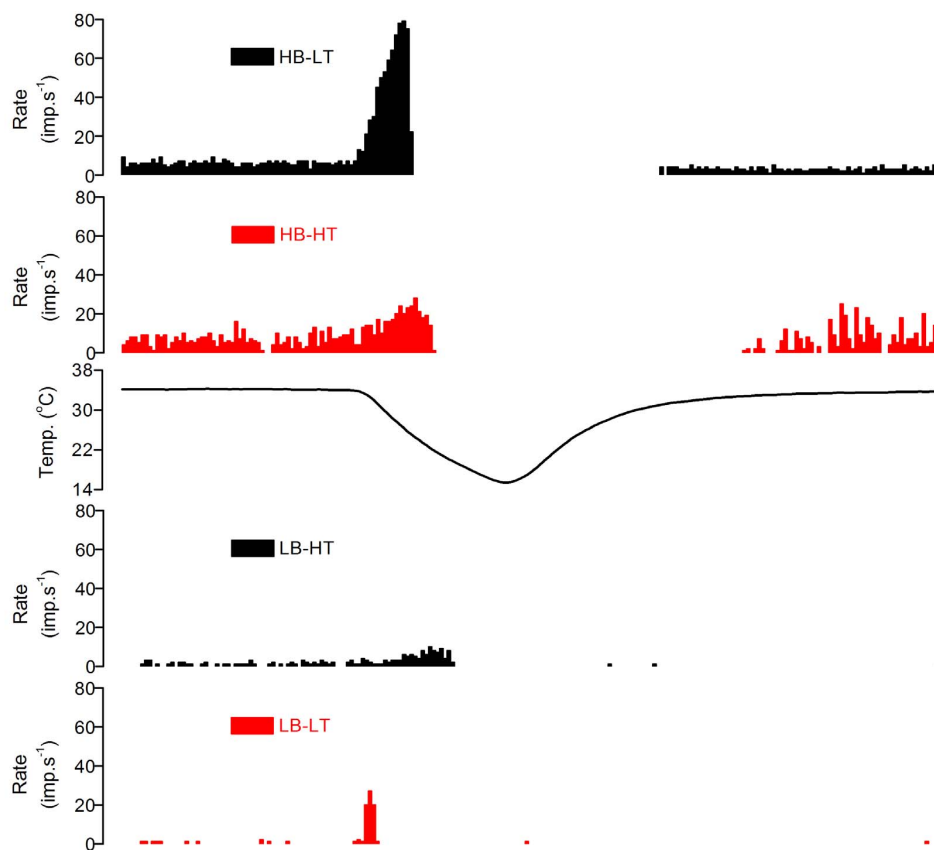
Experimental Groups	Nerve Density, Axons/mm <sup>2</sup>		Penetration Point Density, Points/mm <sup>2</sup>	
	Injured Area	Periphery Area	Injured Area	Periphery Area
Control, n = 6	574.5 ± 66.5	233.1 ± 6.3	9.9 ± 1.0	8.4 ± 0.4
T0, n = 5	0.0 ± 0.0*	200.0 ± 7.2†	0.0 ± 0.0*	8.1 ± 0.4
T3, n = 4	42.9 ± 11.0*	166.1 ± 8.2*	0.8 ± 0.5†	7.3 ± 0.3‡
T7, n = 6	143.0 ± 16.3*	185.4 ± 5.9*	7.9 ± 1.5	7.1 ± 0.6
T15, n = 5	266.5 ± 12.5*	190.0 ± 6.2*	10.0 ± 0.9	8.1 ± 0.4
T30, n = 6	351.6 ± 36.1‡	208.5 ± 5.4	9.4 ± 0.4	9.0 ± 0.4

Corneas were processed at 0, 3, 7, 15, and 30 days after surgery (T0, T3, T7, T15, and T30, respectively).

\* P value < 0.001.

† P value < 0.05.

‡ P value < 0.01.



**FIGURE 4.** Examples of the NTI firing rate recorded in the different subclasses of cold thermoreceptor terminals at 34°C and during application of a cooling ramp down to 15°C. Traces of HB-LT and LB-HT terminals were obtained from control, uninjured mice corneas. Sample recordings of terminals exhibiting abnormal properties (high-background, high-threshold [HB-HT] and low-background, low-threshold [LB-LT] terminals, represented in red) were obtained from 30 days post PRK-operated corneas. Middle trace represents the perfusion solution temperature, in °C.

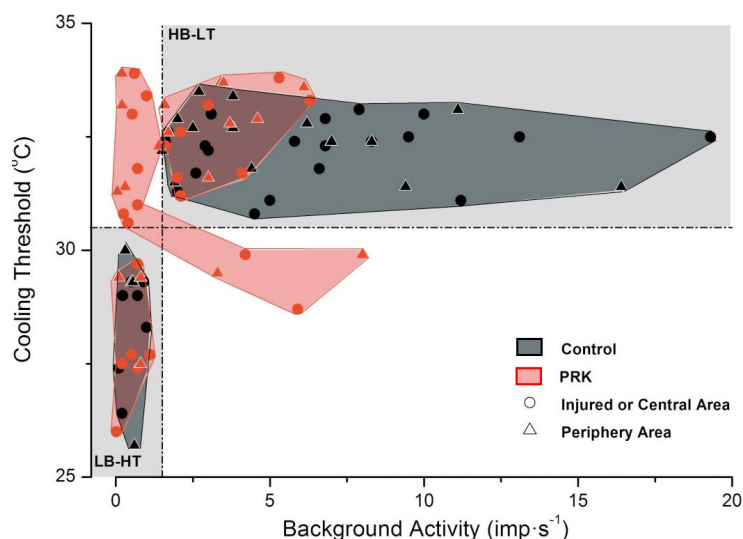
terminal that responded to mechanical stimulation and heat was also found.

At day 30, the overall density of subbasal nerve fibers in the injured area remained significantly lower ( $75.7\% \pm 4.1\%$  of control corneas,  $P < 0.05$ ) than in the central region of intact corneas (Figs. 1F, 2F, 3A; Table). Most of the nerve fibers started to organize, forming a vortex in the apex of the cornea. Nonetheless, a low number of axons still showed an erratic distribution. For the first time in the study, NTI activity was present in the injured area of all corneas tested ( $n = 8$ ). The probability that the recording at defined points contained an active terminal was  $47.5\% \pm 7\%$  ( $n = 8$ ), still below the values found in the central cornea of control eyes ( $65\% \pm 10.5\%$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 3A). Of the 27 active terminals found in operated corneas at T30, 5 were defined as polymodal nociceptors and 7 as cold thermoreceptors. At the remaining 15 recording sites the NTIs had a low amplitude and could not be accurately categorized.

In the corneal periphery surrounding the wounded area, the mean nerve density at T30 was similar to the same area in the intact corneas. At this time the probability of finding sites with nerve activity was  $32.1\% \pm 10.1\%$  (Fig. 3B; Table). Of the eight units recorded, two were characterized as cold thermoreceptors, one as polymodal, and one as a mechano-nociceptor. The remaining four units had low-amplitude NTIs, preventing reliable functional identification.

#### A Fraction of Cold Thermoreceptor Endings Remain Functionally Altered 30 Days After PRK

Collectively, at all times after injury, the firing of high-background cold thermoreceptor terminals found in the injured area was abnormal. HB-LT cold thermoreceptor terminals found in the injured area had on the average lower background activity and cooling response values than those of the same area seen in the healthy cornea (background activity:  $3.4 \pm 0.5$  versus  $6.1 \pm 0.7$   $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ; cooling response:  $21.5 \pm 4.2$  versus  $34.2 \pm 2.3$   $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ; injured,  $n = 20$  versus healthy,  $n = 10$ ). LB-HT terminals also responded less to cooling ( $3.3 \pm 0.9$  versus  $6.1 \pm 0.7$   $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ; injured,  $n = 6$  versus healthy,  $n = 6$ ). Moreover, in the injured and also in the surrounding undamaged area, we frequently observed terminals exhibiting low background activity ( $<1.5$   $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$  at 34°C), but combined with an abnormally low cold threshold (LB-LT). These units were observed first in the uninjured area at T3 and in the injured and uninjured area since T7. Conversely, other terminals had a high background frequency at 34°C ( $>1.5$   $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) but a cooling threshold below 30.5°C (HB-HT). Figure 4 shows an example of the firing pattern of these abnormal cold thermoreceptor terminal types. The overall incidence of abnormal units decreased during the healing period, from 37.5% 1 week after injury to approximately 22.2% 1 month later.



**FIGURE 5.** Distribution of corneal cold thermoreceptor terminals attendant on thermal threshold and background firing frequency. Terminals from intact, control corneas are represented with *black symbols (circles, central area; triangles, peripheral area)*. Terminals recorded in PRK-operated corneas (3–30 days after surgery) are represented with *red symbols (circles, terminals in the central, injured area; triangles, terminals of the uninjured periphery)*. The *horizontal and vertical interrupted lines* delimit respectively the values of threshold and background activity used to define terminals as HB-LT and LB-HT cold thermoreceptor types (*gray quadrants*). Some terminals of PRK-operated corneas located outside the gray quadrants of the graph possess mixed firing characteristics (high background, high threshold [HB-HT] and low background, low threshold [LB-LT]).

In Figure 5, the whole population of corneal cold thermoreceptor terminals recorded in intact corneas and in injured cornea at all postinjury days is plotted, grouped by their mean background NTI frequency at 34°C and the cooling threshold during a cooling ramp. This representation segregates clearly the canonical HB-LT thermoreceptor terminals from the LB-HT thermoreceptors, the two functional types found in intact corneas (Figs. 4, 5, shown in black). This representation also highlights the presence in PRK-treated corneas of a fraction of terminals (red symbols) that maintain the firing characteristics of typical HB-LT and LB-HT cold thermoreceptor terminals, although as indicated earlier, they present on average lower values of background activity than those of intact corneas. Figure 5 also delimits the well-defined population of abnormal cold-sensitive terminals, displaying mixed firing characteristics found in the injured and the intact area of PRK-treated corneas.

#### Activity of Polymodal Nociceptors in the Injured Area Reappears Only 30 Days After PRK

Endings with low background activity or silent at rest but activated by heat and mechanical stimulation were absent in the recordings performed in the injured cornea until T30. In eight corneas studied at this time, 5 of the 27 active terminals were classified as polymodal nociceptors. They presented a low background activity of  $0.5 \pm 0.2 \text{ imp}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n = 5$ ). As occurs with polymodal nociceptors of the intact cornea, this background activity decreased during a cooling ramp so that the total number of impulses fired during the 45-second period before cooling (mean,  $25 \pm 11.8$  NTIs;  $n = 5$ ) decreased during the 45-second cooling ramp to  $16.4 \pm 5.4$  NTIs ( $n = 5$ ). Conversely, polymodal terminals responded clearly to heating ( $7.3 \pm 1.9 \text{ imp}/30 \text{ s}$  before and  $37.8 \pm 10.7 \text{ imp}/30 \text{ s}$  during a heating ramp,  $n = 5$ ) and clearly increased their firing rate in response to mechanical stimulation ( $2.8 \pm 0.4$  NTIs/10 s before and  $22 \pm 13.8 \text{ imp}/10 \text{ s}$  during mechanical stimulation).

In the periphery, polymodal nociceptor activity was also practically absent until T7, with only one terminal responding to heat and to mechanical stimulation at T3. Terminals presenting the characteristics of polymodal nociceptors were identified at T15 and T30; altogether, their incidence was lower, around 10% in lesioned versus 27% in intact corneas.

#### DISCUSSION

The present work confirms the occurrence of extensive morphologic and functional damage to corneal nerves after application of the photoablation procedure used in refractive surgery, and uncovers the marked differences in time course required by corneal sensory nerve fibers of different modality (polymodal nociceptors, mechano-nociceptors, and cold thermoreceptors) to regenerate, and to recover, albeit partially, their normal responsiveness to natural stimuli. Our study additionally revealed that the functional disturbances caused by injury affect also nerve terminals outside the directly wounded area, especially in cold thermoreceptors, possibly reflecting damage by PRK to some terminal branches of parent axons that entered the wound area but that predominantly had their sensory nerve terminals in the noninjured parts of the cornea.

PRK is a procedure that completely removes the epithelium and approximately 20  $\mu\text{m}$  of the anterior stroma of treated corneas, thus affecting the small and medium-sized nerve bundles running in the anterior stromal plexus, particularly its more anterior, dense part, the subepithelial plexus.<sup>34</sup> The laser beam directly destroys the more superficial nerve branches in the treated area, while the distal segments of axons running in a large extent outside the lesion, but affected by the laser beam, degenerate rapidly. Our work confirms previous studies reporting that within hours after PRK, nerves are totally absent from the injured area and those in the surrounding periphery are reduced in number.<sup>16</sup>

In human patients, nerve regeneration is slow. Subbasal nerve fiber bundles visualized with tandem scanning confocal microscopy are present only in 17% of the corneas 1 month after PRK, and the density of these nerve fibers is 98% less than preoperatively. After approximately 3 months, no branched nerve fibers can be seen in the center of the ablation zone; mean subbasal nerve density remains reduced by 59% at 1 year, when compared with preoperative values.<sup>18,35</sup> By 2 years, subbasal nerve density after PRK is similar but morphologic alterations are still present even 5 years after PRK.<sup>36</sup> Despite the timescale differences in regeneration speed between mice and humans, our study showed that recovery of nerve fiber density in the cornea of mice following PRK is also slow, and 1 month later was not fully reestablished the original architecture of corneal innervation.

Maintenance and remodeling of mature axons depend under normal circumstances on extrinsic signals from the environment, which activate their translational machinery, inducing the synthesis of proteins involved in the dynamic regulation of the cytoskeleton.<sup>37</sup> Nerve injury locally generates a cascade of retrograde signaling events that ultimately activate the transcription of genes required for axon survival and regrowth after axotomy.<sup>38–40</sup> Extrinsic signals acting on growth cones of the damaged axons shape the outgrowth pattern regulating the local synthesis of positive and negative regulators of cytoskeletal dynamics, thereby defining the trajectory and length of the growing fibers.<sup>40</sup> In addition to chemotropic cues, mechanical forces exerted by the extruding basal cells during epithelial cell proliferation accompanying corneal wound healing may also influence axonal growth. These forces are transmitted to the subbasal axons and to the reassembling epithelial basement membrane, likely affecting adhesion between epithelial cells, basement membrane, and subbasal axons and thereby, the navigation of regenerating axons.<sup>41</sup> Considering the numerous positive and negative regulators influencing the final trajectory and elongation of axons after injury, the slow and incomplete recovery of the prelesion innervation architecture after PRK is not surprising.<sup>42</sup>

Our study revealed that the appearance of sprouting axons within the injured area does not imply an immediate and parallel recovery of their function. In fact, we observed that corneal sensory terminals of different modality required variable times to recuperate responsiveness to their natural stimuli. Cold thermoreceptor terminals began to respond 1 week after surgery as occurs with mechano-nociceptors, while the first recordings of identifiable polymodal units in the injured area were obtained only 3 weeks later. It is well established that sensory ganglion neurons underlying the various somatosensory modalities possess different genetic signatures, immunocytochemical characteristics, and functional properties.<sup>43,44</sup> The longer time required by polymodal nociceptor neurons to restore their peripheral membrane excitability and transduction properties after PRK may reflect a distinct responsiveness of these nociceptors to the injury-triggered molecular signals responsible for rebuilding the ionic mechanisms required for the transduction and coding of specific stimuli during the regeneration process.<sup>45</sup> Moreover, corneal polymodal nociceptor axons are sparsely branched, generally with simple or ramifying epithelial endings.<sup>46,47</sup> It is therefore possible that in most cases destruction of polymodal axons by PRK affects most if not all the branches of a parent axon within the epithelium and subepithelium, thus requiring a longer time to regenerate. In contrast, cold thermoreceptor corneal axons branch very extensively and form predominantly complex endings,<sup>24,47</sup> a part of which may be spared from injury, thus facilitating regeneration. Still, 30 days after PRK, NTI activity of cold thermoreceptor endings within the treated

area is often abnormal, suggesting that the recovery of electrophysiological properties at this time is still incomplete.

Background firing rate and dynamic sensitivity to cold of intact cold thermoreceptors depend on the level of expression of cold-activated TRPM8 channels and the modulation of their terminals' excitability by Kv and HCN channels.<sup>48–50</sup> It has been postulated that action potential firing of cold thermoreceptors originates within a single spatially restricted region of the nerve terminal arbor of the parent axon, where each separate branch encodes individual action potentials autonomously.<sup>51–53</sup>

Altered architecture of cold terminals and abnormal expression of ion channels involved in cold transduction and coding after injury likely decrease both the transducing membrane surface and the number of membrane points at which propagated impulses may generate. Both circumstances are expected to contribute to the lower background frequency and abnormal firing observed in cold thermoreceptor terminals of the injured cornea after PRK.

Notably, abnormal background activity and altered cooling responses were also observed in some of the cold thermoreceptor endings recorded into the intact cornea surrounding the PRK wound. We hypothesize that these terminals belong to cold thermoreceptor parent axons that had originally some branches extending into the operated area. Their loss after PRK reduced the total number of branches at which NTIs originate, thereby decreasing background frequency and responsiveness to cold. The same abnormal firing has been reported in cold thermoreceptor axons of very old mice, where axonal terminal branching is drastically reduced.<sup>54</sup>

Tearing disturbances and dryness sensation in humans appear often after PRK.<sup>1,2</sup> Acute, strong pain usually disappears a few days after surgery, coincident with corneal re-epithelization, which protects the intact and injured terminals against direct exposure to environmental challenges. However, sensations described as “sharp pains,” “eyelid sticking to the eyeball,” or “soreness of the eyelid to touch” occur 6 or more months after surgery in 5% to 25% of patients, while nearly 50% report feelings of “dryness.”<sup>55</sup> Corneal cold thermoreceptor fibers are implicated in the regulation of basal tearing rate and have been proposed also as the source of the unpleasant dryness sensation associated with dry eye disease.<sup>13,20,24,26</sup> The differences in time course and characteristics of disturbances in corneal nerve activity observed in mice after PRK confirm the important role played by aberrant impulse activity in axotomized nerves for the appearance of dysesthesias following PRK<sup>56</sup> and lend support to the proposal that, among the different functional subclasses of corneal nerves, cold thermoreceptors are major players in the development of phantom unpleasant dryness sensation after photorefractive surgery procedures.

### Acknowledgments

The authors thank the contribution of Rodolfo Madrid and James A. Brock for critical reading of the manuscript.

Supported by FC-15-GRUPIN14-141 (Consejería de Economía y Empleo, Asturias, Spain); SAF2014-54518-C3-1-R, SAF2014-54518-C3-2-R, SAF2017-83674-C2-1-R, and SAF2017-83674-C2-2-R (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spain, and European Regional Development Funds, European Union), and the Spanish “Severo Ochoa” Program for Centers of Excellence in R&D (SEV-2013-0317). Funding from Fundación Ramón Areces and Caja Rural de Asturias, Spain, and European Commission H2020 GA No. 667400 are also acknowledged.

Disclosure: **F. Bech**, None; **O. González-González**, None; **E. Artime**, None; **J. Serrano**, None; **I. Alcalde**, None; **J. Gallar**, None; **J. Merayo-Llaves**, None; **C. Belmonte**, None

## References

- Tuunanen TH, Tervo TM. Schirmer test values and the outcome of photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg.* 1996;22:702-708.
- Ang RT, Dartt DA, Tsubota K. Dry eye after refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol.* 2001;12:318-322.
- Nejima R, Miyata K, Tanabe T, et al. Corneal barrier function, tear film stability, and corneal sensation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol.* 2005;139:64-71.
- Kymionis GD, Tsiklis NS, Ginis H, Diakonis VF, Pallikaris I. Dry eye after photorefractive keratectomy with adjuvant mitomycin C. *J Refract Surg.* 2006;22:511-513.
- Okamoto K, Tashiro A, Thompson R, Nishida Y, Bereiter DA. Trigeminal interpolaris/caudalis transition neurons mediate reflex lacrimation evoked by bright light in the rat. *Eur J Neurosci.* 2012;36:3492-3499.
- Katagiri A, Thompson R, Rahman M, Okamoto K, Bereiter DA. Evidence for TRPA1 involvement in central neural mechanisms in a rat model of dry eye. *Neuroscience.* 2015;290:204-213.
- Gallar J, Acosta MC, Moilanen JA, Holopainen JM, Belmonte C, Tervo TM. Recovery of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg.* 2004;20:229-235.
- Nettune GR, Pflugfelder SC. Post-LASIK tear dysfunction and dysesthesia. *Ocul Surf.* 2010;8:135-145.
- Ambrosio R Jr, Tervo T, Wilson SE. LASIK-associated dry eye and neurotrophic epitheliopathy: pathophysiology and strategies for prevention and treatment. *J Refract Surg.* 2008;24:396-407.
- Kaminer J, Powers AS, Horn KG, Hui C, Evinger C. Characterizing the spontaneous blink generator: an animal model. *J Neurosci.* 2011;31:11256-11267.
- Gartry DS, Muir MG, Lohmann CP, Marshall J. The effect of topical corticosteroids on refractive outcome and corneal haze after photorefractive keratectomy: a prospective, randomized, double-blind trial. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:944-952.
- Kirveskari J, Helinto M, Saaren-Seppala H, Renkonen R, Tervo T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. *Exp Eye Res.* 2003;77:387-390.
- Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J, Gallar J. What causes eye pain? *Curr Ophthalmol Rep.* 2015;3:111-121.
- Toricelli AA, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Exp Eye Res.* 2016;142:110-118.
- Rozsa AJ, Guss RB, Beuerman RW. Neural remodeling following experimental surgery of the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983;24:1033-1051.
- Tervo K, Latvala TM, Tervo TM. Recovery of corneal innervation following photorefractive keratoablation. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:1466-1470.
- Erie JC. Corneal wound healing after photorefractive keratectomy: a 3-year confocal microscopy study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2003;101:293-333.
- Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK. *Am J Ophthalmol.* 2005;140:1059-1064.
- Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, Luna C, Gallar J. Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf.* 2004;2:248-253.
- Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, et al. TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf.* 2017;15:404-437.
- Acosta MC, Tan ME, Belmonte C, Gallar J. Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2063-2067.
- Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J Physiol.* 2001;534:511-525.
- Acosta MC, Peral A, Luna C, Pintor J, Belmonte C, Gallar J. Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2333-2336.
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, et al. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med.* 2010;16:1396-1399.
- Belmonte C, Tervo T, Gallar J. Sensory innervation of the eye. In: Levin L, Nilsson S, Ver Hoeve J, Wu S, Kaufman P, Alm A, eds. *Adler's Physiology of the Eye.* Saunders Elsevier; 2011:363-384.
- Kovacs I, Luna C, Quirce S, et al. Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain.* 2016;157:399-417.
- Quallo T, Vastani N, Horridge E, et al. TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat Commun.* 2015;6:7150.
- Gallar J, Acosta MC, Gutierrez AR, Belmonte C. Impulse activity in corneal sensory nerve fibers after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:4033-4037.
- Anitua E, Sanchez M, Merayo-Llodes J, De la Fuente M, Muruzabal F, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-beta1-induced myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:6066-6073.
- Alcalde I, Inigo-Portugues A, Carreno N, Riestra AC, Merayo-Llodes JM. Effects of new biomimetic regenerating agents on corneal wound healing in an experimental model of post-surgical corneal ulcers. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2015;90:467-474.
- Reimondez-Troitino S, Alcalde I, Csaba N, et al. Polymeric nanocapsules: a potential new therapy for corneal wound healing. *Drug Deliv Transl Res.* 2016;6:708-721.
- Martinez-Garcia MC, Merayo-Llodes J, Blanco-Mezquita T, Marsardana S. Wound healing following refractive surgery in hens. *Exp Eye Res.* 2006;83:728-735.
- Gonzalez-Gonzalez O, Bech F, Gallar J, Merayo-Llodes J, Belmonte C. Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58:404-415.
- Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res.* 2010;90:478-492.
- Erie EA, McLaren JW, Kittleson KM, Patel SV, Erie JC, Bourne WM. Corneal subbasal nerve density: a comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens.* 2008;34:322-325.
- Moilanen JA, Vesaluoma MH, Müller LJ, Tervo TM. Long-term corneal morphology after PRK by in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1064-1069.
- Michaevlevski I, Segal-Ruder Y, Rozenbaum M, et al. Signaling to transcription networks in the neuronal retrograde injury response. *Sci Signal.* 2010;3:ra53.
- Vogelaar CF, Gervasi NM, Gumy LF, et al. Axonal mRNAs: characterisation and role in the growth and regeneration of dorsal root ganglion axons and growth cones. *Mol Cell Neurosci.* 2009;42:102-115.
- Gumy LF, Tan CL, Fawcett JW. The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Exp Neurol.* 2010;223:28-37.
- Jung H, Yoon BC, Holt CE. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13:308-324.



41. Pal-Ghosh S, Pajoohesh-Ganji A, Tadvalkar G, et al. Topical Mitomycin-C enhances subbasal nerve regeneration and reduces erosion frequency in the debridement wounded mouse cornea. *Exp Eye Res.* 2016;146:361-369.
42. Namavari A, Chaudhary S, Sarkar J, et al. In vivo serial imaging of regenerating corneal nerves after surgical transection in transgenic thy1-YFP mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:8025-8032.
43. Lallemand F, Ernfors P. Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci.* 2012;35:373-381.
44. Usoskin D, Furlan A, Islam S, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci.* 2015;18:145-153.
45. Hu G, Huang K, Hu Y, et al. Single-cell RNA-seq reveals distinct injury responses in different types of DRG sensory neurons. *J Neurosci.* 2016;36:1851.
46. Alamri A, Bron R, Brock JA, Ivanusic JJ. Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Front Neuroanat.* 2015;9:71.
47. Ivanusic JJ, Wood RJ, Brock JA. Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *J Comp Neurol.* 2013;521:877-893.
48. Viana F, de la Pena E, Belmonte C. Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci.* 2002;5:254-260.
49. Madrid R, de la Peña E, Donovan-Rodriguez T, Belmonte C, Viana F. Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J Neurosci.* 2009;29:3120-3131.
50. Orio P, Parra A, Madrid R, Gonzalez O, Belmonte C, Viana F. Role of Ih in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings. *J Neurophysiol.* 2012;108:3009-3023.
51. Brock JA, Pianova S, Belmonte C. Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *J Physiol.* 2001;533:493-501.
52. Carr RW, Pianova S, Fernandez J, Fallon JB, Belmonte C, Brock JA. Effects of heating and cooling on nerve terminal impulses recorded from cold-sensitive receptors in the guinea-pig cornea. *J Gen Physiol.* 2003;121:427-439.
53. Carr RW, Pianova S, McKemy DD, Brock JA. Action potential initiation in the peripheral terminals of cold-sensitive neurons innervating the guinea-pig cornea. *J Physiol.* 2009;587:1249-1264.
54. Alcalde I, Íñigo-Portugués A, González-González O, et al. Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice [published online ahead of print April 17, 2018]. *J Comp Neurol.* doi:10.1002/cne.24454.
55. Hovanesian JA, Shah SS, Maloney RK. Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2001;27:577-584.
56. Belmonte C. Eye dryness sensations after refractive surgery: impaired tear secretion or "phantom" cornea? *J Refract Surg.* 2007;23:598-602.

# Functional Properties of Sensory Nerve Terminals of the Mouse Cornea

Omar González-González,<sup>1</sup> Federico Bech,<sup>1</sup> Juana Gallar,<sup>2</sup> Jesús Merayo-Llodes,<sup>1</sup> and Carlos Belmonte<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega, Universidad de Oviedo & Fundación de Investigación Oftalmológica, Oviedo, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, San Juan de Alicante, Spain

Correspondence: Carlos Belmonte, Instituto Universitario Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain; carlos.belmonte@umh.es.

Submitted: May 31, 2016

Accepted: November 13, 2016

Citation: González-González O, Bech F, Gallar J, Merayo-Llodes J, Belmonte C. Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58:404–415. DOI:10.1167/ iovs.16-20033

**PURPOSE.** To define the firing properties of sensory nerve terminals innervating the adult mouse cornea in response to external stimuli of differing modality.

**METHODS.** Extracellular electrical activity of single corneal sensory nerve terminals was recorded in excised eyes of C57BL/6J mice. Eyes were placed in a recording chamber and were continuously superfused with warm saline solution. Nerve terminal impulse (NTI) activity was recorded by means of a glass pipette (tip ~ 50 μm), applied on the corneal surface. Nerve terminal impulse discharges were stored in a computer for offline analysis.

**RESULTS.** Three functionally distinct populations of nerve terminals were identified in the mouse cornea. Pure mechanonociceptor terminals (9.5%) responded passively and only to mechanical stimuli. Polymodal nociceptor terminals (41.1%) were tonically activated by heat and hyperosmolar solutions (850 mOsm·kg<sup>-1</sup>), mechanical force, and/or TRPV1 and TRPA1 agonists (capsaicin and allyl isothiocyanate [AITC], respectively). Cold-sensitive terminals (49.4%) responded to cooling. Approximately two-thirds of them fired continuously at 34°C and responded vigorously to small temperature reductions, being classified as high-background activity, low-threshold (HB-LT) cold thermoreceptor terminals. The remaining one-third exhibited very low ongoing activity at 34°C and responded weakly to intense cooling, being named low-background activity, high-threshold (LB-HT) cold thermoreceptor terminals.

**CONCLUSIONS.** The mouse cornea is innervated by trigeminal ganglion (TG) neurons that respond to the same stimulus modalities as corneal receptors of other mammalian species. Mechano- and polymodal endings underlie detection of mechanical and chemical noxious stimuli while HB-LT and LB-HT cold thermoreceptors appear to be responsible for basal and irritation-evoked tearing and blinking, respectively.

**Keywords:** corneal sensory nerves, thermoreceptors, corneal innervation, polymodal nociceptors, mechanonociceptors

The use of mice in biomedical studies is receiving growing attention due to the ample possibilities of genetic manipulation offered by this species. Such interest extends also to the eye, and in recent years, many publications have used mice to analyze normal and pathologic ocular processes, including those affecting the sensory innervation of the corneal surface.<sup>1–5</sup>

As a result of these studies, the distribution and architecture of mouse corneal sensory innervation is reasonably well known, confirming that it follows the morphologic pattern of corneal nerve branching described in other mammalian species,<sup>4,5</sup> although remarkable differences exist in nerve density between mice strains.<sup>4</sup> Additionally, the corneal innervation of mice has been used to explore the origin and trophic dependence of peripheral sensory nerves during prenatal development<sup>6</sup> and postinjury nerve regeneration in adults,<sup>3,7,8</sup> as well as age-dependent changes in the architecture and function of corneal nerves.<sup>2,9</sup> Moreover, mice have been extensively employed to define the morphologic alterations of corneal nerves caused by a number of pathologic conditions such as diabetes,<sup>10</sup> surgical injury,<sup>1,11,12</sup> herpes virus infections,<sup>13,14</sup> and dry eye disease.<sup>15,16</sup>

In contrast to the ample knowledge of the anatomy of the corneal innervation in mice, its functional characteristics are still poorly defined. Impulse activity of mouse corneal sensory axons and nerve terminals has been recorded in a few studies, and these were mainly centered on the population of low-threshold cold thermoreceptors, whose electrical activity is easiest to record and characterize.<sup>9,17–19</sup>

Electrophysiological experiments in other species (cat, rabbit, guinea pig, rat) firmly established that the cornea is functionally innervated by the peripheral axons of three distinct classes of peripheral sensory receptor neurons: mechanosensory, responding only to mechanical forces; polymodal nociceptor, activated by mechanical stimuli as well as heat and a variety of endogenous and exogenous chemicals; and cold thermoreceptor neurons, primarily excited by moderate cooling and hyperosmolar solutions.<sup>20–36</sup> In the present work, we performed a systematic analysis of the firing properties of the various functional classes of sensory nerve terminals innervating the adult mouse cornea and defined their functional properties and firing pattern in response to stimuli of differing modality.



## METHODS

All experiments were conducted in accordance with the ethical guidelines of the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and the European and Spanish regulations on the protection of animals used for research, and followed a protocol approved by the Ethics Committee of the University of Oviedo. Animals were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (Dolethal; Vetoquinol, Lure, France) injected intraperitoneally.

Recordings of single corneal nerve terminals *in vitro* were performed as described in previous studies.<sup>17,35</sup> The posterior pole of the eyeball and optic nerve was introduced into a silicone tube located at the bottom of a recording chamber filled with saline and secured in place by continuous suction. The eye was continuously superfused with a physiological saline solution of the following composition (in mM): NaCl (128), KCl (5), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1), NaHCO<sub>3</sub> (26), CaCl<sub>2</sub> (2.4), MgCl<sub>2</sub> (1.3), and glucose (10). The solution was bubbled with a gas mixture (5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>) and maintained at the desired temperature (~34°C) with a home-made Peltier device. A borosilicate glass micropipette electrode with a tip diameter of approximately 50 μm filled with saline solution was gently placed in contact with the corneal surface, using a micromanipulator. Light suction was then applied through the pipette to produce a high-resistance seal with the corneal surface, to allow recording of nerve impulses generated at single nerve terminals located beneath the electrode tip. An Ag-AgCl electrode in the recording chamber served as the indifferent electrode. Nerve terminal impulses (NTIs) were amplified with an AC amplifier (Neurolog NL104; Digitimer, Welwyn, UK) and stored at 10 kHz in a computer, using a CED micro 1401 interface and Spike 2 software (both from Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Only recordings containing NTIs originating from a single nerve terminal were analyzed. At these sites the NTIs were clearly distinguished from noise (~10 μV peak to peak) and had similar amplitudes and waveforms indicating that they originated from the same sensory nerve ending. To minimize deterioration of the preparation with time, the total duration of the experiment was limited to a maximum of 5 hours.

## Solutions

Menthol (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) was prepared as a 20 mM stock solution in ethanol and diluted to a final concentration of 20 μM with saline solution. Capsaicin (Sigma-Aldrich Corp.) was prepared as a 1 mM stock solution in ethanol and diluted to a final concentration of 1 μM with saline solution. Allyl isothiocyanate (Sigma-Aldrich Corp.) was prepared as a 100 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted with the saline solution to a final concentration of 100 μM. Hyperosmolar solutions were prepared by adding NaCl (3 M) to the physiological saline solution (310 ± 1.5 mOsm·kg<sup>-1</sup>) until reaching the desired osmolality values (340, 400, and 850 mOsm·kg<sup>-1</sup>), measured with a freezing point osmometer (OSMOSSTAT OM-6020; Kyoto Daiichi, Kyoto, Japan). The “inflammatory soup”<sup>18</sup> contained the following substances dissolved in saline solution: bradykinin (5 μM), histamine (100 μM), PGE<sub>2</sub> (10 μM), 5-HT (100 μM), and ATP (100 μM), all from Sigma-Aldrich Corp.

## Experimental Protocol

In order to obtain an estimation of the relative density of the different functional types of corneal terminals, the recording pipette was placed at sequential points on the corneal surface separated by an approximate distance of 0.2 mm, and aligned

at the intersections of a 6 by 3 grid formed by evenly spaced straight lines going between opposite sides of the limbal border (Figs. 1A, 1B). First, one half of the cornea was explored for nerve activity, and the eye was then rotated and the opposite half of the cornea was explored. After application of the pipette to the corneal surface, responses to cold or mechanical stimuli were assessed. The appearance of spontaneous or stimulus-evoked NTI activity at the recording site was used to ascertain success in detecting an active sensory nerve terminal. If no spontaneous or cold- or mechanically evoked activity was obtained, the electrode was moved to the next recording point. Responsiveness to mechanical stimulation was assessed with a gentle forward displacement (10 μm) of the recording electrode with the micromanipulator. Thereafter, thermal and chemical stimuli were sequentially applied. The same general protocol was applied to sensory terminals of all modalities.

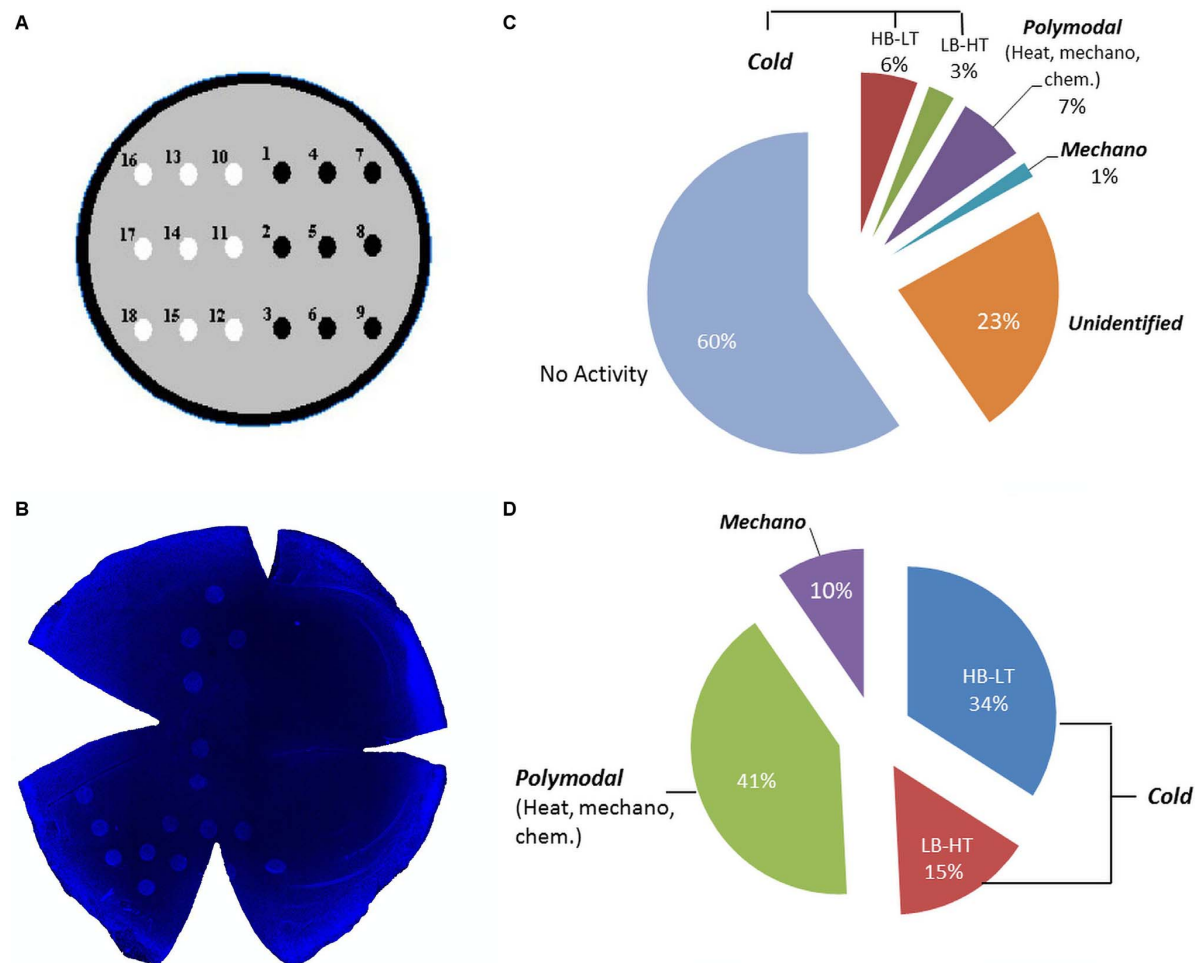
Cold stimulation was first performed by decreasing the background temperature of the perfusion solution from 34°C down to ~14°C. This generated a cooling ramp lasting ~35 seconds at mean cooling rate of ~0.6°C·s<sup>-1</sup>. When the peak temperature fall was attained, warming was applied to return to the basal temperature at a similar speed. After a resting period of 120 seconds, a mechanical stimulation was made, applying pressure with the pipette with a 10-μm forward displacement of the tip of the electrode for 2 or 15 seconds. The number of NTIs evoked during the stimulation period was counted.

After another 120 seconds, a heating ramp from 34°C to ~52°C at 0.5°C·s<sup>-1</sup> (~30-second duration) was applied, and when the peak value was reached, temperature was returned to 34°C at a similar rate.

Chemical stimulation was initiated after a resting period of at least 300 seconds, by switching the perfusion with control saline solution at 34°C to a saline solution containing the drug at 34°C. Menthol (20 μM) was always tested first. Two minutes after the onset of the perfusion with menthol, a cooling ramp down to ~14°C was applied to explore the presence of menthol-induced sensitization of the cold response. After warming back to 34°C, the cornea was washed with the control saline solution for a period of at least 5 minutes. Afterward, stimulation with one or several other test solutions (AITC, “inflammatory soup,” hyperosmolar solutions) was sequentially performed using the same protocol: Namely, after a control recording period of 2 minutes, perfusion with the test solution for 2 to 3 minutes was initiated, including a cooling ramp, followed by a washing time of at least 5 minutes. Capsaicin (1 μM) was applied whenever possible for 2 to 3 minutes at 34°C, always at the end of experiment due to the strong inactivating effect of this drug.

## Analysis of NTI Activity

The following parameters of the NTI activity were analyzed. Background activity, defined as the mean basal ongoing frequency in impulses per second (imp·s<sup>-1</sup>) at the basal temperature (33.9 ± 0.07°C), was measured during the 30-second period that preceded the onset of a stimulus. Cooling threshold was the temperature (°C) value during a cooling ramp at which NTI frequency in imp·s<sup>-1</sup> increased to a value greater than the value of the mean basal NTI frequency during the 10-second period preceding the onset of a cooling ramp, plus three times its standard deviation. Cooling response was mean NTI frequency during cooling. Maximum response to cold was the highest-frequency value measured during a cooling ramp (imp·s<sup>-1</sup>). Silencing temperature was temperature (°C) needed to silence NTI firing during a cooling ramp. Response to heat was the total number of NTIs during 30



**FIGURE 1.** (A) Schematic representation of the cornea to show the location and sequence of points at which the recording electrode was placed during the experiment. (B) Picture of an excised cornea, showing the marks left by the recording electrode tip on the epithelial surface. (C) Probability of finding NTI activity associated with the different modalities of stimuli. (D) Percent of terminals belonging to the different functional classes of corneal receptor terminals identified in all experiments.

seconds following the onset of the heating ramp. Comparison was made with the number of NTIs during the 30-second period immediately preceding the heating ramp. Heating threshold was temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) value during a heating ramp at which NTI frequency in  $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$  increased to a value greater than the value of the mean basal NTI frequency during the 30-second period preceding the onset of a heating ramp, plus three times its standard deviation. Mechanical response was the total number of NTIs during 10 seconds following the onset of mechanical stimulation. As a control, the total number of NTIs fired during the 10-second period immediately prior to mechanical stimulation was used. Chemical response, the mean firing frequency (in  $\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$ ) during the last 30 seconds of perfusion with the test substance (AITC, capsaicin, inflammatory soup, menthol, hyperosmolal solutions), was measured and compared with the NTI firing frequency during the 30-second period preceding chemical stimulation.

#### Statistical Analysis

Data from NTI recordings were exported from Spike 2 (CED) to Origin 8 software for analysis. Statistical comparisons were

performed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), and InStat 3 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Paired Student's *t*-test was used unless the characteristics of the data distribution required the use of the nonparametric Wilcoxon signed-rank test, as indicated in the text. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE) of the mean, with *n* denoting the number of terminals.

#### RESULTS

Experiments were performed in 124 eyes obtained from 62 young adult mice of both sexes (3–6 months of age). A mean of 15 points per cornea were explored.

Based on the response characteristics to different stimuli, corneal sensory terminals were classified as high-threshold mechanoreceptor, polymodal nociceptor, and cold thermoreceptor terminals. Figures 1C and 1D show the proportion of successful attempts, that is, those in which NTIs were detected, as well as the percentage of each functional class of terminal. In more than half of the recording points, no NTI

**TABLE 1.** Functional Characteristics of Mechanonociceptor and Polymodal Nociceptor Terminals

NTI Activity Parameter	Terminal Type	
	Mechanonociceptor	Polymodal Nociceptor
Success, %	1.6	6.9
Cooling response, No. NTI/30 s		
Before	7.7 ± 4.7 <i>n</i> = 3	8.4 ± 1.4 <i>n</i> = 50
During	7.7 ± 6.7 <i>n</i> = 3	3.9 ± 0.7 <i>n</i> = 50
Mechanical stimulation, No. NTI/10 s		
Before	2.5 ± 1.7 <i>n</i> = 4	1.9 ± 0.5 <i>n</i> = 38
During	22.3 ± 4.5 <i>n</i> = 4	14.3 ± 1.4 <i>n</i> = 38
Heating response, No. NTI/30 s		
Before	10 ± 8.5 <i>n</i> = 3	6 ± 0.9 <i>n</i> = 48
During	5 ± 2.1 <i>n</i> = 3	30.2 ± 2.4 <i>n</i> = 48
Chemical stimulation, Δ imp·s <sup>-1</sup>		
100 μM AITC	nd	0.3 ± 0.1 <i>n</i> = 4
1 μM capsaicin	nd	1.6 ± 0.2 <i>n</i> = 23
Hyperosmolal 850 mOsm	nd	0.38 ± 0.09 <i>n</i> = 5

Success % indicates the percentage of successful attempts of recording a terminal from each group with regard to the total number of attempts. The cooling, heating, and mechanical response are expressed as the total number of NTIs during the 30 seconds immediately before and the 30 seconds during the cooling and the heating ramp, and 10 seconds immediately before and during the first 10 seconds of the mechanical pulse, respectively. Chemical stimulation is expressed as the difference increment of activity in the 30 seconds of maximum activity during the 2 to 3 minutes of chemical perfusion with regard to the 30 seconds immediately before (see Methods). nd, no response or quantitative data available.

activity was observed; in an additional 23% of trials, the impulses had small amplitude, preventing reliable identification and quantitative analysis of the nerve terminal characteristics.

### Mechanoreceptor Terminals

Some terminals (9.5%) responding exclusively to mechanical stimulation were found (Table 1). Two of them had very low frequency of ongoing activity (0.1 and 0.5 imp·s<sup>-1</sup>, one of them increased its basal activity after the different experimental maneuvers) while the rest remained silent during the 30-second background activity measuring period prior to stimulation. Pushing the recording pipette against the corneal surface for 2 seconds evoked a burst of NTIs that stopped immediately with the removal of the pipette's pressure (Figs. 2A, 2C). A similar, transient NTI firing response was obtained when pressure was maintained for 15 seconds (Fig. 2C). The mean number of NTIs fired during this stimulus was 22.3 ± 4.5 (*n* = 4).

### Polymodal Nociceptor Terminals

Of the nerve terminals exhibiting a very low or no activity during the initial recording period, 41.1% responded to heat and generally also to mechanical pressure as well as to one or

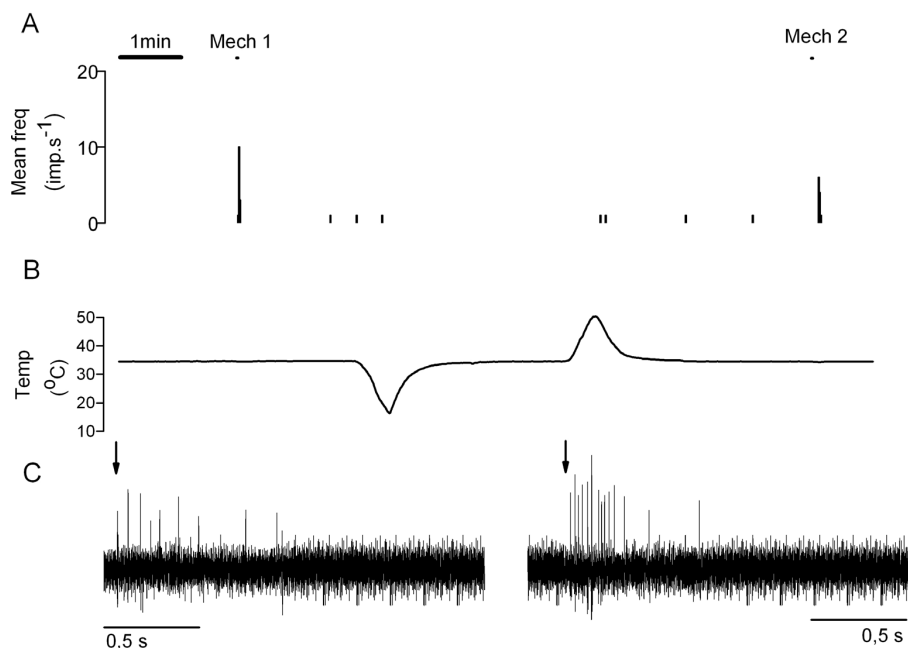
more of the chemical stimuli (Table 1). In the absence of an applied stimulus, the mean spontaneous activity of these polymodal nociceptor terminals was 0.3 ± 0.04 (*n* = 50; range, 0.02-1.5 imp·s<sup>-1</sup>).

**Thermal Stimulation.** Application of a 30-second cooling ramp (from 34°C to 13.7 ± 0.3°C) to polymodal terminals reduced their ongoing activity, so that the mean number of NTIs fired during the cooling ramp was significantly lower than during the 30-second period before applying the cold stimulus (8.4 ± 1.4 NTIs before versus 3.9 ± 0.7 NTIs during the cooling ramp, *n* = 50, *P* < 0.001; Table 1; Fig. 3).

In contrast, in response to a 30-second heating ramp (from 33.7 ± 0.1°C to 52.0 ± 0.2°C, *n* = 48), polymodal terminals showed a marked increase in their firing frequency (Table 1), sometimes adopting a bursting pattern (Fig. 3). The heating threshold was 41.5 ± 0.5°C (*n* = 48). However, such threshold temperature value for the heating response varied widely among individual terminals, ranging between 36.3°C and 51.4°C. Also, the frequency and duration of the NTI discharge differed between the nerve terminals, although, in all cases, NTI activity silenced completely at the onset of cooling at the termination of the heating ramp. The magnitude of the response to heating, measured as the total number of impulses fired during the complete duration of the heating ramp, was 30.2 ± 2.4 NTIs, a value significantly higher than during the 30-second period at 34°C that preceded the heat ramp (6.0 ± 0.9 NTI *n* = 48, *P* < 0.001, Table 1). Around 14% of the polymodal terminals became silent and irresponsive after the first heating stimulus, whereas the rest resumed activity approximately 2 minutes after the end of the heat-evoked NTI discharge, with their activity before and after heating being similar (0.2 ± 0.02 imp·s<sup>-1</sup> and 0.15 ± 0.03 imp·s<sup>-1</sup>, respectively, *n* = 43, *P* > 0.05). In 11 of 18 tested terminals, a second heat ramp was applied 5 to 10 minutes later. In four of them no firing response was evoked; that is, they had been inactivated by the first heating ramp. In the remaining seven terminals, sensitization developed. This appeared either as a drop in heating threshold to -3.3 ± 0.4°C below the value determined during the first heat ramp (*n* = 3), as an increase in the total number of impulses during the heating pulse without change in threshold (*n* = 3), or as a threshold reduction combined with an increase in firing (*n* = 1).

**Mechanical Stimulation.** Mechanical stimulation for 2 seconds activated 38 of 44 polymodal terminals, classified as such by their activation by heat and/or chemical stimuli. The mechanically activated polymodal receptor terminals generated a short burst of NTIs at the onset of the maneuver (Fig. 3). On average, 14.3 ± 1.4 NTIs (*n* = 38) were counted during the 10-second period following the onset of the stimulus, a value that was significantly higher than that counted during the 10 seconds prior to the application of the stimulus (1.9 ± 0.5 NTIs, *n* = 38, *P* < 0.001, Wilcoxon matched-pairs test). In seven of the polymodal terminals responding to mechanical stimulation, the stimulus was repeated 2 minutes later but on this occasion was maintained for 15 seconds. The firing response was again transient, being composed of an initial burst of NTIs lasting for 1 to 2 seconds that returned to the basal firing level for the remainder of the stimulus; the total number NTIs during the first 10 seconds of the mechanical stimulus (9.3 ± 2.1, *n* = 7) was not significantly different from that measured in response to the 2-second stimulus (see above).

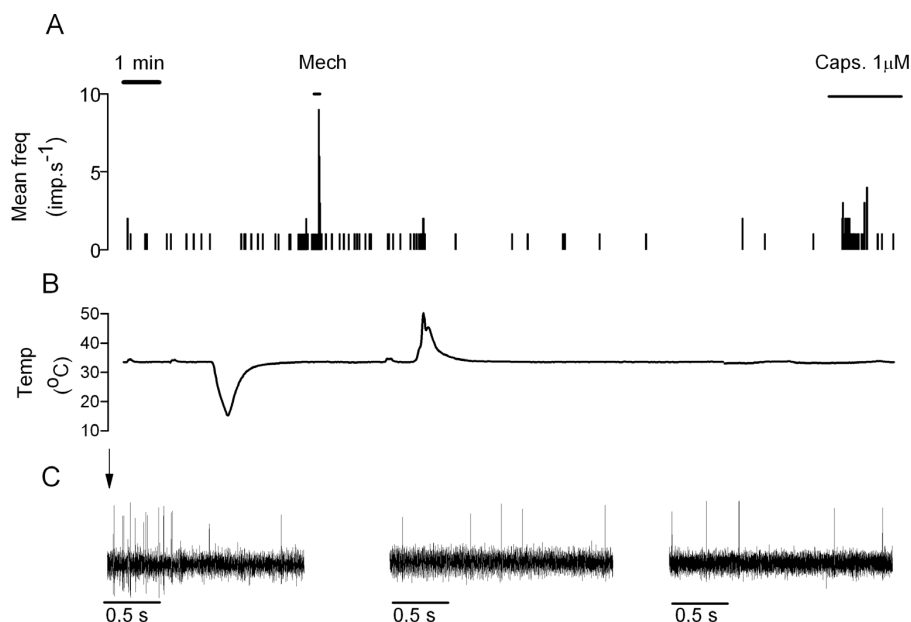
**Chemical Stimulation.** To define chemosensitivity of polymodal terminals, various chemical agents were applied to terminals that previously responded to a heat ramp (Fig. 3). Table 1 summarizes the response of polymodal terminals to the different chemical stimuli tested. Hyperosmolal solutions were tried in a total of 23 terminals (Table 1). The ongoing activity



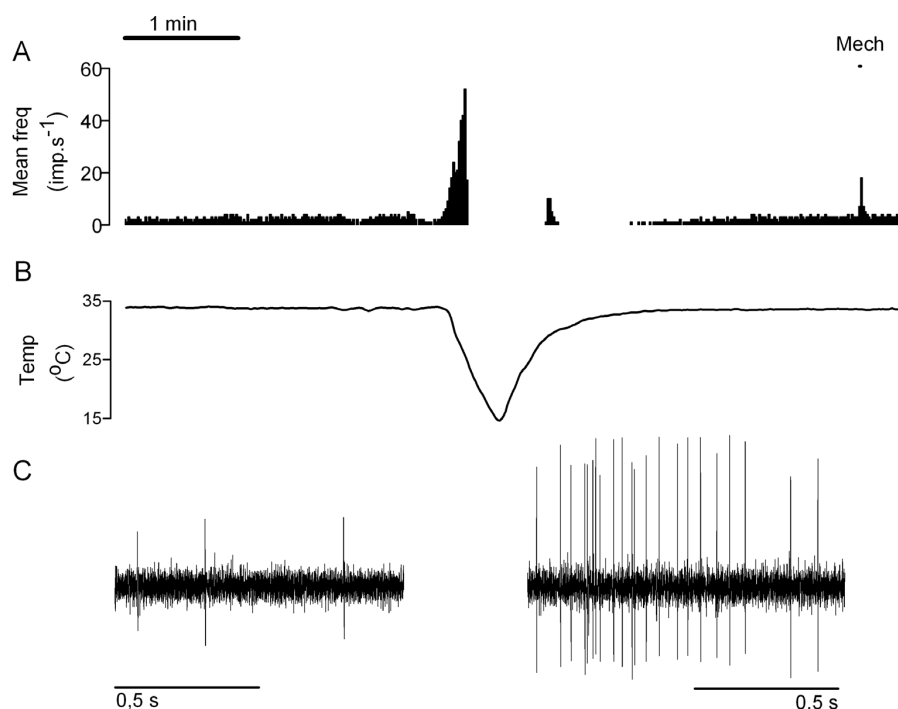
**FIGURE 2.** Example of NTI activity in a mechanonociceptor terminal. (A) Time histogram of the NTI discharge evoked by a 2-second (Mech 1) or a 15-second (Mech 2) forward displacement ( $10\ \mu\text{m}$ ) of the recording electrode. (B) Temperature record of the perfusing solution during the same time period shown in (A). (C) Samples of the recordings of NTI impulse activity evoked in the same mechanonociceptor terminal by a displacement of the electrode during a 2-second (*left*) and a 15-second (*right*) mechanical stimulation. *Arrows* indicate the onset of the stimulus.

increased during perfusion with  $850\ \text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$  solution from  $0.2 \pm 0.1$  to a mean value of  $0.5 \pm 0.1\ \text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). Also, when this high-osmolality solution was applied, the NTI irregular firing pattern changed to a bursting pattern and

the shape of NTIs was altered, becoming wider and of smaller amplitude (data not shown; see also Ref. 35). The TRPA1 agonist AITC ( $100\ \mu\text{M}$ ) was tested in 9 terminals and weakly activated 4 of them, while the TRPV1 agonist capsaicin ( $1\ \mu\text{M}$ )



**FIGURE 3.** Example of the NTI response of a polymodal nociceptor terminal evoked by a  $10\text{-}\mu\text{m}$  forward displacement of the recording electrode for 2 seconds (Mech), changes in bath temperature (see record of temperature of perfusing solution in [B]), and perfusion with  $1\text{-}\mu\text{M}$  capsaicin. (C) Sample records of the NTI impulse activity during a 2-second mechanical stimulation (*left trace*), at the beginning of the response in heating ramp (*center trace*), and during the perfusion with capsaicin (*right trace*), in the same polymodal nociceptor. *Arrow* indicates the onset of the mechanical stimulus.



**FIGURE 4.** Example of the NTI response of a HB-LT cold thermoreceptor terminal to a cooling ramp. (A) Time histogram of the NTI discharge. Notice the transient firing observed during temperature recovery (see text). Mech, mechanical stimulation (10- $\mu$ m forward displacement of the electrode for 2 seconds). (B) Bath temperature trace during the same time period shown in (A). (C) Sample records of the NTI impulse activity during control recording at 34°C (*left*) and during the mechanical stimulation (*right*) in the same HB-LT terminal.

activated 23 of the 24 terminals tested ( $0.1 \pm 0.04$  imp·s<sup>-1</sup> before and  $1.4 \pm 0.2$  imp·s<sup>-1</sup> during capsaicin application,  $P < 0.001$ ). Application of inflammatory soup (see Methods) to seven polymodal terminals for 5 minutes evoked a significant increase in the ongoing NTI firing rate (from  $0.1 \pm 0.02$  to  $0.2 \pm 0.04$  imp·s<sup>-1</sup>,  $P < 0.003$ ).

### Cold Thermoreceptor Terminals

Corneal terminals responding to cooling represented a 49.4% of the total.

**High-Background/Low-Threshold (HB-LT) Cold-Sensitive Terminals.** All nerve terminals exhibiting a repetitive background activity immediately after application of the pipette also responded readily to a cooling ramp with a robust increase in firing frequency. We classified these nerve terminals as high-background activity, low-threshold (HB-LT) cold thermoreceptor terminals; they represented 72% of the total population of cold-sensitive nerve endings found in the cornea. Mechanical pressure evoked a few NTIs in six HB-LT terminals where it was tested (Fig. 4). Table 2 summarizes the firing characteristics of the HB-LT cold thermoreceptor terminals. Their background activity at 34°C was usually composed of regularly appearing individual or paired NTIs, firing at a mean frequency ranging between 1.3 and 19.3 imp·s<sup>-1</sup> (mean  $6.6 \pm 1.0$  imp·s<sup>-1</sup>,  $n = 26$ ). During the initial portion of the cooling ramp, firing pattern often changed from regular beating to bursting and, after reaching a peak frequency value of  $57.8 \pm 3.9$  imp·s<sup>-1</sup> at  $26 \pm 0.7^\circ\text{C}$ , NTIs usually silenced at around 23°C, well before reaching the lowest temperature point (14–15°C). During the 30-second heating period back to the control temperature, a transient NTI discharge (mean number  $102.1 \pm 40$  NTIs), appearing at a mean temperature of  $27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$

and lasting on the average  $7.5 \pm 1.8$  seconds, was observed in 14 out of 26 HB-LT terminals (Fig. 4), followed again by a silence until a temperature of  $31.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$  was attained, at which point the NTI activity gradually recovered to the frequency that it had prior to the cooling ramp. The application of 20  $\mu\text{M}$  menthol increased significantly ongoing activity of HB-LT terminals (Table 2). Also, perfusion with 340 mOsm·kg<sup>-1</sup> hyperosmolar solution increased the ongoing firing frequency (from  $8.0 \pm 1.5$  to  $10.3 \pm 1.6$  imp·s<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ). Sixty-seven percent of the HB-LT terminals responded to a heating ramp with a transient NTI discharge (“paradoxical response”) starting at  $41.9 \pm 2^\circ\text{C}$  (mean number of NTIs,  $355.5 \pm 111.4$ ; mean duration of the firing period,  $9.4 \pm 2.1$  seconds). Four HB-LT terminals with a paradoxical response were tested with 1  $\mu\text{M}$  capsaicin; in all of them, capsaicin increased the mean firing rate at 34°C ( $\Delta = 13.0 \pm 3.5$  imp·s<sup>-1</sup>,  $n = 4$ ) and reduced the cooling threshold to temperature values 3°C to 4°C lower than the pretreatment value. Intriguingly, in two out of four terminals tested, the TRPA1 agonist AITC prolonged the duration of NTI firing during the cooling ramp to a temperature below 20°C (19.9°C and 14.4°C in the two responsive terminals).

**Low-Background/High-Threshold (LB-HT) Cold-Sensitive Terminals.** Among corneal terminals exhibiting a very low initial background activity at 34°C, a proportion were characterized by the firing of a sustained NTI discharge when the temperature decreased by around 6°C, and silencing upon rewarming to 34°C (Figs. 1, 5). These low-background activity, high-threshold (LB-HT) cold thermoreceptor terminals represented 28% of the total number of cold-sensitive terminals. Table 2 summarizes the firing characteristics for these LB-HT cold terminals. Peak frequency and temperature at which cold-evoked firing appeared were significantly lower than in HB-LT

**TABLE 2.** Values of the Different Parameters of the NTI Response Measured in HB-LT and LB-HT Cold Terminals

NTI Activity Parameter	Cold Terminal Type	
	HB-LT	LB-HT
Success, %	6	3
Background activity*, imp·s <sup>-1</sup>	6.6 ± 1.0 <i>n</i> = 26	0.5 ± 0.1 <i>n</i> = 9
Cooling threshold*, °C	32.1 ± 0.2 <i>n</i> = 26	28.2 ± 0.5 <i>n</i> = 9
Cooling response*, imp·s <sup>-1</sup>	34.4 ± 2.3 <i>n</i> = 26	6.3 ± 1.2 <i>n</i> = 9
Silencing temperature, °C	23.1 ± 0.9 <i>n</i> = 26	17.1 ± 1.1 <i>n</i> = 9
Mechanical stimulation, No. NTI/10 s		
Before	39.0 ± 15.9 <i>n</i> = 6	6.3 ± 1.8 <i>n</i> = 3
During	74.1 ± 17.0 <i>n</i> = 6	25.3 ± 6.0 <i>n</i> = 3
Heating response, No. NTI/30 s		
Before	56.8 ± 16.3 <i>n</i> = 6	7.8 ± 2.7 <i>n</i> = 4
During	355.5 ± 111.4 <i>n</i> = 6	32.3 ± 11.0 <i>n</i> = 4
Menthol response, Δ imp·s <sup>-1</sup>	9.5 ± 6.9 <i>n</i> = 2	5.5 ± 3.1 <i>n</i> = 3

Success % indicates the percentage of successful attempts of recording a terminal from each group with regard to the total number of attempts. Background activity, cooling threshold, cooling response, and silencing temperature (see Methods) are measured during a cooling ramp. Mechanical and heating response are expressed as the total number of NTIs immediately before and during the mechanical pulse and heating ramp (in 10 and 30 seconds, respectively). Menthol response is expressed as the increment of activity during menthol perfusion with regard to the 30 seconds immediately before starting menthol perfusion. The statistical analyses were made comparing the values of HB-LT with LB-HT using a Student's *t*-test.

\* *P* < 0.01.

cold thermoreceptor terminals (cf. Figs. 5, 6). In five LB-HT terminals where a 30-second heating ramp was applied, a discharge of impulses (mean 32.3 ± 11.1 NTIs, *n* = 4) was evoked (Fig. 5) with a mean duration of 13.9 ± 5.6 seconds. Also, three out of the five LB-HT terminals tested fired NTIs in response to mechanical stimulation (Table 2).

Three out of four LB-HT tested for sensitivity to a 3-minute application of menthol (20 μM) at 34°C had a marked increase of ongoing activity from 0.7 ± 0.2 to 6.1 ± 3.1 imp·s<sup>-1</sup> (*n* = 3). Moreover, in all four units treated with menthol, this agent decreased cold threshold to a cooling ramp from 28.1 ± 0.2°C to 30.4 ± 0.8°C, *n* = 4. In two LB-HT terminals explored for sensitivity to a 397 mOsm·kg<sup>-1</sup> hyperosmolar solution at 34°C, NTI frequency approximately doubled compared to the pretreatment activity (data not shown).

## DISCUSSION

In this study, we confirmed that the mouse cornea is innervated by trigeminal ganglion (TG) neurons, which respond to the same stimulus modalities as those of other mammalian species, and characterized them as mechanonociceptor, polymodal nociceptor, and cold thermoreceptor sensory nerve terminals. We also defined electrophysiologically two distinct classes of cold thermoreceptor endings whose activity may underlie, respectively, basal and irritation-evoked tearing and blinking.

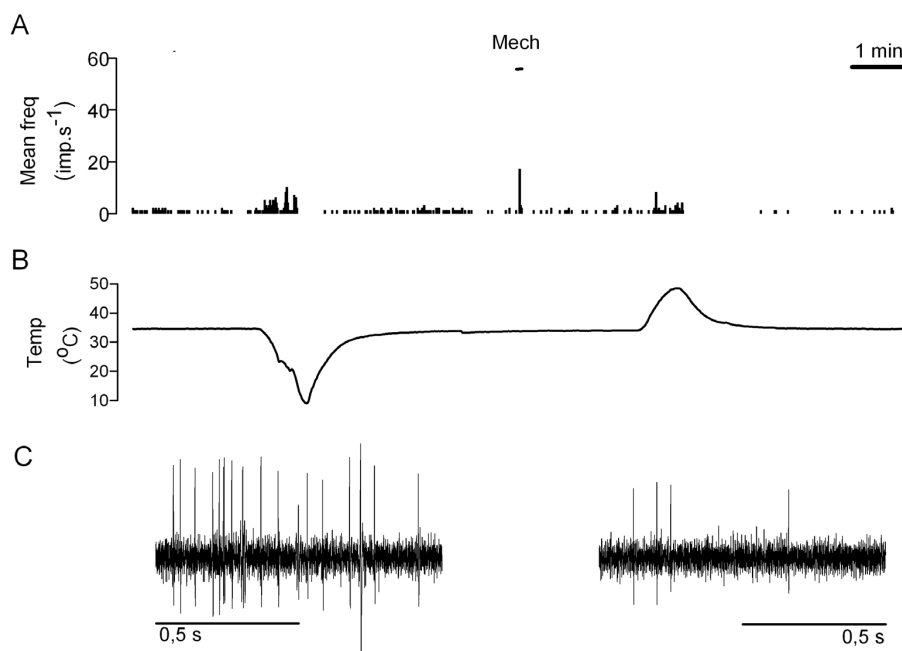
Functional categorization of corneal receptor terminals was performed, selecting the population of terminals that exhibited spontaneous activity or responded positively to mechanical pressure before the electrode was moved to the next recording point. Mechanosensitive terminals were subsequently tested for responsiveness to thermal and chemical stimuli in order to define their polymodality. Hence, this recording strategy does not recruit "silent nociceptors," that is, sensory neurons that are not excited by physiological stimuli, even at potentially tissue-damaging intensities, but develop nerve impulse activity when inflammation develops,<sup>37</sup> and whose existence in the eye has been suggested.<sup>38</sup>

Corneal polymodal nociceptor neurons are the most frequently encountered functional type of sensory nerve terminal in the cat and guinea pig cornea, where they represent around 65% of the total number of corneal nerve fibers.<sup>21-25</sup> Comparatively, polymodal nociceptors appear to be less abundant (approximately 40%) in the mouse. Mechanonociceptors comprise 15% and 12% of all corneal sensory fibers in the cat and guinea pig, respectively,<sup>23-25</sup> and only 9.5% in mice, while the percentage of cold thermoreceptors identified in the mouse is almost double that found in the cat (17%) and the guinea pig (21%).<sup>23-25</sup>

Such variability in the proportion of modality-specific sensory fibers can be attributed to species differences; however, it may also reflect the bias introduced by the use of different identification methods to sample the sensory modality of corneal sensory nerve fibers. The percentage of axons of a given modality has been generally calculated based on their presence in extracellular recordings of single nerve fibers dissected from the ciliary nerves at the back of the eye, in anesthetized cats or in excised and superfused guinea pig eyes.<sup>22,33</sup> In both cases, thinly myelinated A-delta mechanosensory fibers tend to be picked up more easily than the unmyelinated (C) fibers that are in most cases polymodal nociceptor and cold fibers.<sup>24,33,36</sup> In contrast, the technique used to record from single corneal nerve terminals *in vitro* in guinea pig or mouse eyes favors the detection of thin cold thermoreceptor terminals, which display spontaneous activity, are more superficially located, and branch more extensively than polymodal and mechanoreceptor endings, thus producing larger-amplitude NTIs.<sup>17,24,26-28,33,34,39,40</sup> In the present work, we tried to confront this caveat through a systematic sampling of impulse activity at regularly distributed points on the corneal surface, thus reaching theoretically all types of nerve terminals. Only terminals that were unambiguously identified were counted. Hence, the data obtained in mice corneas probably provide a reasonably accurate picture of the relative proportion of terminals of different modality in this species. Still, the group of unidentified terminals, containing units of very low amplitude or not responding clearly to any of the stimuli, may include an unknown proportion of "silent nociceptors."

The method used for application of mechanical force to the corneal surface precluded an accurate measurement of force threshold of purely mechanoreceptor endings, which has been reported to be higher than in polymodal nociceptor endings.<sup>21,24</sup> Still, the short-lasting discharge of NTIs evoked by a sustained pressure in these terminals suggests that they belong to the general class of high-threshold, phasic mechanonociceptive primary sensory neurons also identified in the cornea of the cat and guinea pig.<sup>23-25,33,34</sup> The transducing channels conferring mechanosensitivity to these endings have not been identified yet, although expression of the mechanosensory channel Piezo2<sup>41</sup> has been reported in approximately 30% of corneal TG neurons. This Piezo2-positive subpopulation of neurons possesses an immunocytochemical profile very different from canonical cold or

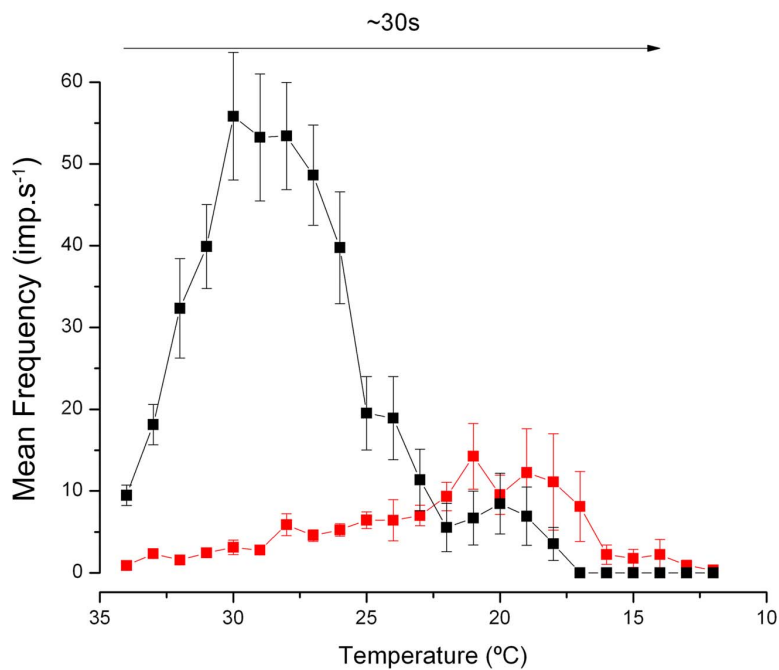




**FIGURE 5.** Example of the NTI response of a LB-HT cold thermoreceptor terminal. (A) Time histogram of the NTI discharge. Mech, mechanical stimulation (10- $\mu$ m forward displacement of the electrode for 2 seconds). (B) Bath temperature trace during the time period shown in (A). (C) Sample records of the NTI impulse activity during the cooling ramp (*left*) and the heating ramp (*right*) in the same LB-HT terminal.

polymodal nociceptor neurons, thus suggesting that they may correspond functionally to pure mechanonociceptive neurons.<sup>42</sup> It could be further speculated that the morphologically distinct group of corneal nerve terminals named

“ramified endings”<sup>39</sup> are given by this group of corneal mechanonociceptor neurons. The recent finding of a selective expression of Nav1.1 channels in high-threshold mechanosensitive fibers of the skin opens new venues for a more



**FIGURE 6.** Stimulus-response curves of HB-LT and LB-HT cold-sensitive terminals. Mean NTI firing frequency values (imp.s<sup>-1</sup>) are represented versus temperature during a cooling ramp from 34°C to 12°C in ~30 seconds, as indicated by the *horizontal arrow*. *Black squares*, HB-LT terminals ( $n = 26$ ). *Red squares*, LB-HT terminals ( $n = 9$ ).

precise identification of the transducing mechanisms in corneal pure mechanosensory terminals.<sup>43</sup>

Corneal polymodal nociceptors of the mouse responded unambiguously with a NTI discharge to mechanical stimuli, noxious heating, and capsaicin and were sensitized by a mixture of inflammatory agents. Their frequency rises with osmolality increases to discrete values; however, it is well established that firing frequency values over 0.5 imp·s<sup>-1</sup> in polymodal human nerve fibers already evoke conscious pain sensations.<sup>44,45</sup> Thus, it seems reasonable to assume that activation of corneal polymodal terminals produced by the different stimuli used in our study would also evoke pain sensation in the awake mouse.

The sensitivity to heating and capsaicin supports the presence of TRPV1 channels, the molecular integrator of noxious heat, and a large variety of algescic substances<sup>46-48</sup> in this class of nerve terminals. The presence of TRPV1 channels in corneal polymodal nociceptors contributing to ocular surface pain is to be expected from the strong tearing and blinking response evoked by application of capsaicin to the eye in many species including mice.<sup>17,49</sup> A smaller proportion of polymodal terminals was also activated by the TRPA1 channel agonist AITC, which also evokes irritative tearing and blinking when applied to mouse eyes.<sup>17</sup> Nonetheless, the low number of polymodal terminals responding to TRPA1 activation in mice, as also seen in guinea pigs,<sup>33</sup> suggests that TRPA1 channels are not highly expressed in corneal polymodal nociceptor endings.

Altogether, mouse polymodal nociceptors innervating the cornea are functionally very similar to polymodal fibers of the mouse skin or tongue<sup>18,50,51</sup> and of the cornea of other species.<sup>22,23,25</sup> They encode approximately the intensity of mechanical stimuli, develop inactivation/sensitization upon repeated noxious stimulation, and respond to a large variety of endogenous and exogenous chemicals.<sup>38,52</sup>

Our study confirms with functional data the dense innervation of the mouse cornea by cold thermoreceptor axon terminals, evidenced by recent immunocytochemical studies.<sup>17,39,48</sup> Canonical low-threshold cold thermoreceptors of various species and tissues are easily recognized by their regular background impulse activity at the normal temperature of the tissue, whose frequency of discharge changes with temperature oscillations of 1°C or less.<sup>23,24,28,53,54</sup> We distinguished in the mouse cornea a high number of HB-LT cold terminals that typically responded to static and dynamic changes in temperature and were activated by menthol and hyperosmotic stimuli, as reported for canonical cold thermoreceptors of the cornea and of various other tissues in many species.<sup>19,32,54-57</sup> In the eye, it has been postulated that these low-threshold corneal thermoreceptors detect small temperature changes linked to interblink tear film evaporation, thereby providing a tonic sensory input to the brain encoding wetness of the eye surface.<sup>17,29,58,59</sup>

The additional presence in the cornea of a subpopulation of unmyelinated cold thermoreceptor axons responding only to strong cooling and osmolality was originally reported in the cat in 1993 by Gallar et al.,<sup>24</sup> who named them “cold” nociceptors. More recently, corneal “dry-sensitive” neurons responding to weak or strong levels of ocular surface desiccation, hyperosmolarity, and menthol and exhibiting parallel high or low sensitivity to corneal cooling were reported in the TG of the rat.<sup>30,32,60</sup> Here, we unambiguously identified and characterized these two subclasses of cold-thermosensitive neurons in the mouse cornea and propose their inclusion within the general class of cold thermoreceptor primary sensory neurons.

The sensitivity of cold thermoreceptor neurons to low temperatures is primarily determined by the expression of

TRPM8, a nonselective cationic channel gated by moderate cold and also by menthol and hyperosmolar solutions.<sup>19,61,62</sup> TRPM8 channel opening contributes to an excitatory, depolarizing current in sensory neurons named I<sub>cold</sub> that triggers propagated impulse responses to cooling (for review see Refs. 63, 64). It has been shown that the cell bodies of cold-thermosensitive neurons in dorsal root and trigeminal sensory ganglia display a wide range of thresholds for cold stimuli.<sup>65-69</sup> This heterogeneity of cooling thresholds is determined to large extent by variability in the density of TRPM8 channels, but is also attributed to the absence or limited expression of the potassium channels Kv1.1-1.2.<sup>70,71</sup> These K<sup>+</sup> channels sustain an outward current termed I<sub>KD</sub> in most primary sensory neurons that opposes the inward current generated by cold activation of TRPM8, thereby acting as an excitability break that prevents unspecific cold-induced depolarization.<sup>65</sup> In TG cold-sensitive neurons in culture, it has been convincingly demonstrated that low-threshold cold thermoreceptor neurons virtually lack I<sub>KD</sub>, while in high-threshold cold thermoreceptor neurons, which respond only to stronger cooling, this current is prominent.<sup>71</sup> Accordingly, cold threshold and cooling-evoked firing rate in cold thermoreceptor sensory neurons depend on a balance between the expression levels of TRPM8 and Kv1 channels.<sup>65,71,72</sup> Therefore, it is conceivable that HB-LT cold thermoreceptor terminals of the mouse cornea belong to TG cold-sensitive neurons presenting a high expression of TRPM8 channels and low or no expression of Kv1 channels, whereas LB-HT terminals originate from TG cold-sensitive neurons with lower levels of TRPM8 channels and a significant presence of Kv1 channels.<sup>70,71</sup>

It is worth noting that the two subtypes of corneal cold thermoreceptor terminals found in the mouse cornea also responded to stimuli such as heat, osmolality changes, mechanical forces, menthol, and a variety of other irritant agents. A variable sensitivity of canonical cold thermoreceptors to these stimuli has been reported earlier.<sup>17-19,24,29,30,32,35,55</sup> This is not exceptional. Other classes of peripheral somatosensory receptors equipped with specific transducing channels that confer preferential sensitivity for a particular form of stimulating energy, also express transduction channels for other stimulus qualities.<sup>73</sup> Our data suggest that this is a prominent characteristic of corneal cold thermoreceptors, where the expression of multiple transduction channels equips the ocular surface with a set of sensory receptors particularly tuned for the detection of the main physical parameters associated with changes in corneal surface wetness (temperature, osmolality, cell shrinking).<sup>59</sup>

It is generally accepted that corneal mechanonociceptor axons, preferentially tuned to fire phasically in response to mechanical stimulation, and polymodal nociceptors tonically activated by a large variety of noxious chemical, mechanical, and thermal stimuli, are the peripheral substrate of acute and chronic eye pain.<sup>52,74</sup> Second-order neurons of this pathway are mainly located at the caudal levels of the spinal trigeminal nucleus, in the transition area between nucleus caudalis and cervical spinal cord (Vc/C1).<sup>75-77</sup> In contrast, there is considerable evidence that a majority of corneal HB-LT cold thermoreceptors project to second-order neurons located at the transition zone between the spinal trigeminal subnucleus caudalis and subnucleus interpolaris (Vi/Vc), an area proposed as the processing center for neural regulation of lacrimation and blinking via the superior salivatory nucleus (SSN) and the facial motor nucleus.<sup>20,32,78</sup> The SSN and facial motor nucleus also receive an input from Vc/C1 neurons connected to corneal nociceptors for reflex motor and autonomic ocular responses evoked by injurious stimuli.<sup>77,79</sup> The location in the brainstem of the second-order neurons connecting with LB-HT cold thermoreceptors is not certain. Kurose and Meng<sup>20</sup>

reported the activation of a subset of second-order neurons of the Vi/Vc region only by strong cooling. These neurons were also activated by acidic stimulation of the cornea, suggesting that they may receive inputs from both LB-HT and polymodal nociceptor corneal fibers. In conditions such as experimental chronic eye dryness where the LB-HT cold thermoreceptors become selectively sensitized,<sup>20,31,36,80</sup> there is enhanced neural activity in ocular responsive neurons in both the Vi/Vc and Vc/C1 regions.<sup>80</sup> It has been suggested that LB-HT neurons contribute importantly to discomfort sensations accompanying chronic eye surface dryness.<sup>36,59</sup> Hence it is tempting to speculate that this subclass of cold thermoreceptor primarily projects into nociceptor-driven second-order neurons of the Vc/C1 region evoking discomfort and, also together with the polymodal nociceptors reaching that area, on the neurons of the Vi/Vc involved in the regulation of tearing and blinking.

Under normal environmental conditions, it has been postulated that small changes in ocular surface temperature and osmolality resulting from tear fluid evaporation at the exposed eye surface are encoded by HB-LT cold thermoreceptors<sup>17,23,24,28,29,35,58,59</sup> and transmitted to second-order Vi/Vc neurons.<sup>20,78</sup> When there is excessive evaporation and/or hyperosmolarity of tear film, the LB-HT cold thermoreceptors may also be recruited, and evoke a sense of irritation through the same pain-labeled pathways as corneal mechano- and polymodal nociceptor nerve fibers. These three sensory receptors types may also be activated by cell shrinkage and local inflammation caused by dryness. Together, this multi-receptor sensory message evokes augmented tearing and blinking as well as the irritative, unpleasant dryness sensations associated with chronic dry eye.<sup>36,59</sup> A similar, variable involvement of the different functional classes of peripheral sensory receptors is expected to occur after injury or pathologic processes affecting the ocular surface.

Electrophysiological classification of somatosensory receptor types, based both on the form of energy to which they preferentially respond and on the stimulus intensity required for their activation, has been a useful approach to correlate stimulus modalities and activation of specific sets of peripheral sensory neurons leading to qualitatively distinct sensations, but has a number of technical limitations. Repeated application of different stimuli may cause tissue damage, favoring the apparition of inactivation, fatigue, or sensitization.<sup>81</sup> This is particularly true for polymodal nociceptors, whose stimulus threshold is by definition close to injurious intensities. The discovery in sensory receptor neurons of specific membrane transducing molecules for different forms of energy<sup>82-84</sup> served as an essential tool to refine the identification of peripheral receptor classes. Still, there is considerable variability in transducing molecule expression within neurons of the same functional receptor category; moreover, neurons with peripheral terminals responding preferentially to a specific stimulus often express also transducing molecules for other stimulus modality.<sup>70,85</sup> Although the functional specificity of the various populations of primary sensory neuron for a particular class of stimulus is well defined, this molecular promiscuity determines their potential excitation by other modalities of stimuli, particularly under abnormal conditions. It is conceivable that the molecular heterogeneity of neurons belonging to a general functional type may be, at least in part, behind the striking variability of the peripheral sensory messages generated at ocular surface tissues under pathological conditions, including inflammation and injury.

The present work has been performed in mice, an experimental model particularly suitable to study the molecular basis of eye surface sensations. It defines in this species the electrophysiological characteristics of the different classes of

sensory nerve endings innervating the cornea, providing new data that can in our view be used for a multidisciplinary approach to the study of normal and pathological eye sensations.

### Acknowledgments

The authors thank Rodolfo Madrid for the contribution to the preparation of corneal nerve terminal recording in the mouse. For critical reading of the manuscript, they also thank James A. Brock. In addition they thank Enol Arttime and Paola Braga for their technical assistance.

Supported by Grants FC-15-GRUPIN14-141 from the Consejería de Economía y Empleo del Principado de Asturias, Spain, cosponsored with FEDER funds from the European Union and the Fundación Ramón Areces, Caja Rural de Asturias, and Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER (SAF2014-54518-C3-1-R and SAF2014-54518-C3-2-R). C.B. acknowledges financial support from the Spanish State Research Agency, through the "Severo Ochoa" Programme for Centres of Excellence in R&D (SEV-2013-0317).

Disclosure: **O. González-González**, None; **F. Bech**, None; **J. Gallar**, None; **J. Merayo-Llones**, None; **C. Belmonte**, None

### References

- Namavari A, Chaudhary S, Sarkar J, et al. In vivo serial imaging of regenerating corneal nerves after surgical transection in transgenic thy1-YFP mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:8025-8032.
- Wang C, Fu T, Xia C, Li Z. Changes in mouse corneal epithelial innervation with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53: 5077-5084.
- Reichard M, Weiss H, Poletti E, et al. Age-related changes in murine corneal nerves. *Curr Eye Res.* 2015;1-8.
- Marfurt CF, Murphy CJ, Florczak JL. Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2242-2251.
- Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003;76:521-542.
- de Castro F, Silos-Santiago I, Lopez de Armentia M, Barbacid M, Belmonte C. Corneal innervation and sensitivity to noxious stimuli in trkA knockout mice. *Eur J Neurosci.* 1998;10:146-152.
- Guaquil VH, Pan Z, Karagianni N, Fukuoka S, Alegre G, Rosenblatt MI. VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:17272-17277.
- Shevalye H, Yorek MS, Coppey LJ, et al. Effect of enriching the diet with menhaden oil or daily treatment with resolvin D1 on neuropathy in a mouse model of type 2 diabetes. *J Neurophysiol.* 2015;114:199-208.
- Íñigo-Portugués A, Alcalde I, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J, Belmonte C, Merayo-Llones J. Decreased basal tear in aged mice is linked to morphological and functional changes in corneal sensory nerve fibers. *Acta Ophthalmol.* 2014;92.
- Cai D, Zhu M, Petroll WM, Koppaka V, Robertson DM. The impact of type 1 diabetes mellitus on corneal epithelial nerve morphology and the corneal epithelium. *Am J Pathol.* 2014; 184:2662-2670.
- Pal-Ghosh S, Pajoohesh-Ganji A, Tadvalkar G, et al. Topical Mitomycin-C enhances subbasal nerve regeneration and reduces erosion frequency in the debridement wounded mouse cornea. *Exp Eye Res.* 2015;146:361-39.
- Pajoohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Kyne BM, Saban DR, Stepp MA. Partial denervation of sub-basal axons persists

- following debridement wounds to the mouse cornea. *Lab Invest.* 2015;95:1305-1318.
13. Hu K, Harris DL, Yamaguchi T, Von Andrian UH, Hamrah P. A dual role for corneal dendritic cells in herpes simplex keratitis: local suppression of corneal damage and promotion of systemic viral dissemination. *PLoS One.* 2015;10:1-23.
  14. Chucair-Elliott AJ, Zheng M, Carr DJJ. Degeneration and regeneration of corneal nerves in response to HSV-1 infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:1097-1107.
  15. Esquenazi S, He J, Li N, Bazan NG, Esquenazi I, Bazan HEP. Comparative in vivo high-resolution confocal microscopy of corneal epithelium, sub-basal nerves and stromal cells in mice with and without dry eye after photorefractive keratectomy. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007;35:545-549.
  16. Bian F, Pellegrino FSA, Pflugfelder SC, Volpe EA, Li D-Q, de Paiva CS. Desiccating stress-induced MMP production and activity worsens wound healing in alkali-burned corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:4908-4918.
  17. Parra A, Madrid R, Echevarria D, et al. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med.* 2010;16:1396-1399.
  18. Zhang X, Mak S, Li L, et al. Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by Gαq. *Nat Cell Biol.* 2012;14:851-858.
  19. Quallo T, Vastani N, Horridge E, et al. TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat Commun.* 2015;6:7150.
  20. Kurose M, Meng ID. Corneal dry-responsive neurons in the spinal trigeminal nucleus respond to innocuous cooling in the rat. *J Neurophysiol.* 2013;109:2517-2522.
  21. Belmonte C, Giraldez F. Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol.* 1981;321:355-368.
  22. Giraldez F, Geijo E, Belmonte C. Response characteristics of corneal sensory fibers to mechanical and thermal stimulation. *Brain Res.* 1979;177:571-576.
  23. Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I. Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J Physiol.* 1991;437:709-725.
  24. Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP, Belmonte C. Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol.* 1993;468:609-622.
  25. Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C. Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J Physiol.* 1998;512:211-217.
  26. Brock JA, Pianova S, Belmonte C. Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *J Physiol.* 2001;533:493-501.
  27. Carr RW. The effects of polarizing current on nerve terminal impulses recorded from polymodal and cold receptors in the guinea-pig cornea. *J Gen Physiol.* 2002;120:395-405.
  28. Carr RW. Effects of heating and cooling on nerve terminal impulses recorded from cold-sensitive receptors in the guinea-pig cornea. *J Gen Physiol.* 2003;121:427-439.
  29. Hirata H, Meng ID. Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: implications for dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3969-3976.
  30. Hirata H, Oshinsky ML. Ocular dryness excites two classes of corneal afferent neurons implicated in basal tearing in rats: involvement of transient receptor potential channels. *J Neurophysiol.* 2012;107:1199-1209.
  31. Hirata H, Rosenblatt MI. Hyperosmolar tears enhance cooling sensitivity of the corneal nerves in rats: possible neural basis for cold-induced dry eye pain. *Invest Ophthalmol and Vis Sci.* 2014;55:5821-5833.
  32. Kurose M, Meng ID. Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *J Neurophysiol.* 2013;110:495-504.
  33. Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Changes in sensory activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain.* 2013;154:2353-2362.
  34. Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:3403-3412.
  35. Parra A, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J, Belmonte C. Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain.* 2014;155:1481-1491.
  36. Kovacs I, Luna C, Quirce S, et al. Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain.* 2016;157:399-417.
  37. Michaelis M, Habler HJ, Jaenig W. Silent afferents: a separate class of primary afferents? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23:99-105.
  38. Belmonte C, Viana F. Transduction and encoding of noxious stimuli. In: Schmidt RF, Willis W, eds. *Encyclopedia of Pain.* Vol. 2513. Berlin: Springer-Verlag; 2007:2515-2528.
  39. Ivanusic JJ, Wood RJ, Brock JA. Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *J Comp Neurol.* 2013;521:877-893.
  40. Carr RW, Pianova S, McKemy DD, Brock JA. Action potential initiation in the peripheral terminals of cold-sensitive neurons innervating the guinea-pig cornea. *J Physiol.* 2009;587:1249-1264.
  41. Ranade SS, Woo SH, Dubin AE, et al. Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature.* 2014;516:121-125.
  42. Bron R, Wood RJ, Brock JA, Ivanusic JJ. Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *J Comp Neurol.* 2014;522:2967-2979.
  43. Osteen JD, Herzig V, Gilchrist J, et al. Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature.* 2016;534:494-499.
  44. Gybels J, Handwerker HO, Van Hees J. A comparison between the discharges of human nociceptive nerve fibres and the subject's ratings of his sensations. *J Physiol.* 1979;292:193-206.
  45. Yarnitsky D, Simone DA, Dotson RM, Cline MA, Ochoa JL. Single C nociceptor responses and psychophysical parameters of evoked pain: effect of rate of rise of heat stimuli in humans. *J Physiol.* 1992;450:581-592.
  46. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389:816-824.
  47. Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013;29:355-384.
  48. Alamri A, Bron R, Brock JA, Ivanusic JJ. Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Front Neuroanat.* 2015;9:71.
  49. Gonzalez GG, De la Rubia PG, Gallar J, Belmonte C. Reduction of capsaicin-induced ocular pain and neurogenic inflammation by calcium antagonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:3329-3335.
  50. Reeh PW. Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett.* 1986;66:141-146.
  51. Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, et al. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat Commun.* 2014;5:3125.

52. Belmonte C, Tervo T, Gallar J. Sensory innervation of the eye. In: Levin LA, Nilsson SFE, Ver Hoeve J, Wu S, Kaufman PL, Aim A, eds. *Adler's Physiology of the Eye*. Amsterdam: Elsevier; 2011:363-384.
53. Hensel H. Neural processes in thermoregulation. *Physiol Rev*. 1973;53:948-1017.
54. Braun HA, Bade H, Hensel H. Static and dynamic discharge patterns of bursting cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms. *Pflugers Arch*. 1980;386:1-9.
55. Hensel H, Zotterman Y. The effect of menthol on the thermoreceptors. *Acta Physiol Scand*. 1951;24:27-34.
56. Orío P, Parra A, Madrid R, González O, Belmonte C, Viana F. Role of Ih in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings. *J Neurophysiol*. 2012;108:3009-3023.
57. Olivares E, Salgado S, Maidana JP, et al. TRPM8-dependent dynamic response in a mathematical model of cold thermoreceptor. *PLoS One*. 2015;10:e0139314.
58. Belmonte C, Gallar J. Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:3888-3892.
59. Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J, Gallar J. What causes eye pain? *Curr Ophthalmol Rep*. 2015;3:111-121.
60. Hirata H, Fried N, Oshinsky ML. Quantitative characterization reveals three types of dry-sensitive corneal afferents: pattern of discharge, receptive field, and thermal and chemical sensitivity. *J Neurophysiol*. 2012;108:2481-2493.
61. McKemy DD, Neuhauss WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416:52-58.
62. Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*. 2007;54:371-378.
63. Latorre R, Brauchi S, Madrid R, Orío P. A cool channel in cold transduction. *Physiology*. 2011;26:273-285.
64. Almaraz L, Manenschijn J-A, de la Pena E, Viana F. TRPM8. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;222:547-579.
65. Viana F, de la Pena E, Belmonte C. Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci*. 2002;5:254-260.
66. Nealen ML, Gold MS, Thut PD, Caterina MJ. TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol*. 2003;90:515-520.
67. Thut PD, Wrigley D, Gold MS. Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience*. 2003;119:1071-1083.
68. Babes A, Zorzon D, Reid G. Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur J Neurosci*. 2004;20:2276-2282.
69. Teichert RW, Raghuraman S, Memon T, et al. Characterization of two neuronal subclasses through constellation pharmacology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:12758-12763.
70. Madrid R, Donovan-Rodríguez T, Meseguer V, Acosta MC, Belmonte C, Viana F. Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *J Neurosci*. 2006;26:12512-12525.
71. Madrid R, de la Peña E, Donovan-Rodríguez T, Belmonte C, Viana F. Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J Neurosci*. 2009;29:3120-3131.
72. Viana F. Chemosensory properties of the trigeminal system. *ACS Chem Neurosci*. 2011;2:38-50.
73. Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain*. 2008;4:14.
74. Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, Luna C, Gallar J. Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf*. 2004;2:248-253.
75. Meng ID, Hu JW, Benetti AP, Bereiter DA. Encoding of corneal input in two distinct regions of the spinal trigeminal nucleus in the rat: cutaneous receptive field properties, responses to thermal and chemical stimulation, modulation by diffuse noxious inhibitory controls, and projections to the parabrachial area. *J Neurophysiol*. 1997;77:43-56.
76. Hirata H, Hu JW, Bereiter DA. Responses of medullary dorsal horn neurons to corneal stimulation by CO(2) pulses in the rat. *J Neurophysiol*. 1999;82:2092-2107.
77. Bereiter DA, Okamoto K, Tashiro A, Hirata H. Endotoxin-induced uveitis causes long-term changes in trigeminal subnucleus caudalis neurons. *J Neurophysiol*. 2005;94:3815-3825.
78. Hirata H, Okamoto K, Tashiro A, Bereiter DA. A novel class of neurons at the trigeminal subnucleus interpolaris/caudalis transition region monitors ocular surface fluid status and modulates tear production. *J Neurosci*. 2004;24:4224-4232.
79. Katagiri A, Thompson R, Rahman M, Okamoto K, Bereiter DA. Evidence for TRPA1 involvement in central neural mechanisms in a rat model of dry eye. *Neuroscience*. 2015;290:204-213.
80. Rahman M, Okamoto K, Thompson R, Katagiri A, Bereiter DA. Sensitization of trigeminal brainstem pathways in a model for tear deficient dry eye. *Pain*. 2015;156:942-950.
81. Mountcastle VB. Physiology of sensory receptors: introduction to sensory processes. In: Mountcastle VB. *Medical Physiology*. 12th ed, Vol. II. St. Louis: Mosby; 1968:1341-1375.
82. Gees M, Owsianik G, Nilius B, Voets T. TRP channels. *Compr Physiol*. 2012;2:563-608.
83. Zhang X. Molecular sensors and modulators of thermoreception. *Channels (Austin)*. 2015;9:73-81.
84. Hao J, Bonnet C, Amsalem M, Ruel J, Delmas P. Transduction and encoding sensory information by skin mechanoreceptors. *Pflugers Arch*. 2015;467:109-119.
85. Belmonte C, Brock JA, Viana F. Converting cold into pain. *Exp Brain Res*. 2009;196:13-30.

# The Immunosuppressant Macrolide Tacrolimus Activates Cold-Sensing TRPM8 Channels

José Miguel Arcas,<sup>1</sup> Alejandro González,<sup>1</sup> Katharina Gers-Barlag,<sup>1</sup> Omar González-González,<sup>1,2</sup> Federico Bech,<sup>1,2</sup> Lusine Demirkhanyan,<sup>3</sup> Eleonora Zakharian,<sup>3</sup> Carlos Belmonte,<sup>1,2</sup> Ana Gomis,<sup>1</sup> and Félix Viana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, 03550 San Juan de Alicante, Spain, <sup>2</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega, Universidad de Oviedo & Fundación de Investigación Oftalmológica, Oviedo, Spain, and <sup>3</sup>Department of Cancer Biology and Pharmacology, University of Illinois College of Medicine, 1 Illini Drive, Peoria, Illinois 61605

TRPM8 is a polymodal, nonselective cation channel activated by cold temperature and cooling agents that plays a critical role in the detection of environmental cold. We found that TRPM8 is a pharmacological target of tacrolimus (FK506), a macrolide immunosuppressant with several clinical uses, including the treatment of organ rejection following transplants, treatment of atopic dermatitis, and dry eye disease. Tacrolimus is an inhibitor of the phosphatase calcineurin, an action shared with cyclosporine. Tacrolimus activates TRPM8 channels in different species, including humans, and sensitizes their response to cold temperature by inducing a leftward shift in the voltage-dependent activation curve. The effects of tacrolimus on purified TRPM8 in lipid bilayers demonstrates conclusively that it has a direct gating effect. Moreover, the lack of effect of cyclosporine rules out the canonical signaling pathway involving the phosphatase calcineurin. Menthol (TRPM8-Y745H)- and icilin (TRPM8-N799A)-insensitive mutants were also activated by tacrolimus, suggesting a different binding site. In cultured mouse DRG neurons, tacrolimus evokes an increase in intracellular calcium almost exclusively in cold-sensitive neurons, and these responses were drastically blunted in *Trpm8* KO mice or after the application of TRPM8 antagonists. Cutaneous and corneal cold thermoreceptor endings are also activated by tacrolimus, and tacrolimus solutions trigger blinking and cold-evoked behaviors. Together, our results identify TRPM8 channels in sensory neurons as molecular targets of the immunosuppressant tacrolimus. The actions of tacrolimus on TRPM8 resemble those of menthol but likely involve interactions with other channel residues.

**Key words:** cornea; neuroimmune; pain; thermoreceptor; trigeminal; TRP channel

## Significance Statement

TRPM8 is a polymodal TRP channel involved in cold temperature sensing, thermoregulation, and cold pain. TRPM8 is also involved in the pathophysiology of dry eye disease, and TRPM8 activation has antiallodynic and antipruritic effects, making it a prime therapeutic target in several cutaneous and neural diseases. We report the direct agonist effect of tacrolimus, a potent natural immunosuppressant with multiple clinical applications, on TRPM8 activity. This interaction represents a novel neuroimmune interface. The identification of a clinically approved drug with agonist activity on TRPM8 channels could be used experimentally to probe the function of TRPM8 in humans. Our findings may explain some of the sensory and anti-inflammatory effects described for this drug in the skin and the eye surface.

## Introduction

Macrolide immunosuppressants are a class of natural compounds sharing a macrolide-like structure and potent immuno-

suppressive activity *in vitro* and *in vivo*. Tacrolimus (TAC), also known as FK506, is the best-known drug in this group. Originally isolated from the bacteria *Streptomyces tsukubaensis*, TAC binds

Received July 4, 2018; revised Nov. 2, 2018; accepted Nov. 18, 2018.

Author contributions: J.M.A., A. González, K.G.-B., E.Z., C.B., A. Gomis, and F.V. designed research; J.M.A., A. González, K.G.-B., O.G.-G., F.B., and L.D. performed research; J.M.A., A. González, O.G.-G., F.B., L.D., and F.V. analyzed data; J.M.A. wrote the first draft of the paper; J.M.A., A. González, K.G.-B., O.G.-G., F.B., L.D., E.Z., C.B., and A. Gomis edited the paper; F.V. wrote the paper.

This work was supported by Project SAF2016-77233-R and cofinanced by the European Regional Development Fund and the Severo Ochoa Programme for Centres of Excellence in R&D SEV-2013-0317. J.M.A. was supported by Spanish Ministry of Education and Science predoctoral fellowships. K.G.-B. was supported by the International PhD

Fellowships Program La Caixa-Severo Ochoa, Call 2015. We thank Ardem Patapoutian and Ajay Dhaka for providing the *Trpm8<sup>EGFP</sup>* mouse line; Carolina Roza, Katharina Zimmermann, and Francina Agosti for generous advice on setting up the mouse skin-nerve preparation; Salvador Sala and Jorge Fernández Trillo for help with the kinetic analysis; and Mireille Tora for excellent technical assistance.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Félix Viana at felix.viana@umh.es.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1726-18.2018>

Copyright © 2019 the authors 0270-6474/19/390949-21\$15.00/0

to FKBP12, a protein of the immunophilin family, and this complex acts as a potent calcineurin inhibitor, a calcium/calmodulin-dependent Ser/Thr phosphatase. Calcineurin inhibition results in the block of T-cell activation and differentiation, thus inhibiting the release of inflammatory cytokines (for review, see Rusnak and Mertz, 2000). TAC is widely used for the prevention of transplant/graft rejection. Cyclosporine is a fungal cyclic undecapeptide, structurally unrelated to TAC but sharing similar inhibitory effects on the calcineurin pathway, and also used in preventing organ rejection. Other clinical applications of TAC include their topical use in several skin disorders, including atopic dermatitis, psoriasis, and pruritus (Beck, 2005; Stull et al., 2016), and in ophthalmology for the treatment of various diseases, including Sjögren's syndrome, allergic conjunctivitis, and dry-eye disease (DED) symptoms (Fukushima et al., 2014; Wan and Dimov, 2014).

In addition to its immunosuppressive actions, previous studies suggested possible direct effects of TAC on sensory nerve endings (Senba et al., 2004). Another study postulated the activation and subsequent desensitization of TRPV1 channels by TAC (Pereira et al., 2010). Nevertheless, the mechanisms involved in TAC effectiveness for the treatment of cutaneous disorders and DED, and its molecular targets in these tissues, are presently unclear.

Here we describe the agonistic effect of TAC, but not cyclosporine, on the cold- and menthol-activated TRPM8 channel (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). This polymodal, nonselective cation channel is expressed in the soma of a subset of small-diameter primary sensory neurons and their peripheral terminals (Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008). Apart from cold and cooling compounds (e.g., menthol and icilin) (McKemy et al., 2002; Bödding et al., 2007; Zakharian et al., 2010), TRPM8 is also activated by the membrane lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) (Liu and Qin, 2005; Rohács et al., 2005).

In addition to its well-established role in the activation of low-threshold thermoreceptors, responsible for the sensation of innocuous cold (Bautista et al., 2007; Dhaka et al., 2007), other studies showed the involvement of TRPM8 channels in noxious cold sensations and cold allodynia (for review, see Almaraz et al., 2014). TRPM8 channels also play a major role in the electrical activity of cold-sensitive corneal endings and have been implicated in the mechanisms of tearing and blinking (Parra et al., 2010; Robbins et al., 2012; Quallo et al., 2015), important players in the pathophysiology of DED (Belmonte et al., 2017). Other studies demonstrated the role of TRPM8 in menthol-induced analgesia during acute and inflammatory pain (Liu et al., 2013). A functional, truncated isoform of TRPM8 is expressed in endoplasmic reticulum of skin keratinocytes where it plays an important role in epidermal homeostasis (Bidaux et al., 2015). Recently, TRPM8 activation was shown to evoke intense itch relief in patients and animal models of chronic itch (Ständer et al., 2017; Palkar et al., 2018).

The involvement of TRPM8 in these and other common pathologies, including migraine, has made it a relevant therapeutic target, triggering major efforts in the identification of novel small-molecule modulators of TRPM8 channels (Moran and Szallasi, 2018). The list of selective antagonists has grown rapidly (for review, see Almaraz et al., 2014), and some have shown clinical efficacy in humans (Andrews et al., 2015). After the identification of menthol, several compounds were shown to have agonist activity on TRPM8, but most of them display cross pharmacology with other ion channels, especially with other members of the TRP family (Macpherson et al., 2006).

Here, we identified TAC, a clinically approved drug, as a TRPM8 agonist with direct gating of the channel. In addition, our characterization of TAC effects on TRPM8 mutants revealed important differences in its agonist effects compared with the canonical activator menthol, illuminating some novel aspects of TRPM8 function as a polymodal sensory receptor.

## Materials and Methods

**Animals.** Studies were performed on young adult (1–4 months old) mice of either sex. Mice were bred at the Universidad Miguel Hernández Animal Research Facilities (ES-119-002001) and kept in a barrier facility under 12 h:12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. WT animals were of the C56Bl6/J strain. All experimental procedures were performed according to the Spanish Royal Decree 1201/2005 and the European Community Council directive 2010/63/EU, regulating the use of animals in research.

Two transgenic mouse lines were used for calcium imaging experiments and electrophysiological recordings on DRG cultures. In *Trpm8*<sup>BAC</sup>-EGFP mice, the fluorescent protein YFP is expressed under the *Trpm8* promoter (Morenilla-Palao et al., 2014). For experiments with *Trpm8* KO mice, we used a transgenic knockin line, *Trpm8*<sup>EGFPf</sup>, in which the *Trpm8* locus was disrupted and EGFP was inserted in frame with the *Trpm8* start codon (Dhaka et al., 2007). Homozygous mice (*Trpm8*<sup>EGFPf/EGFPf</sup>) are null for TRPM8. As previously described, to enhance EGFPf expression, the lox-P-flanked neomycin selection cassette introduced into the *Trpm8* locus during the generation of the transgene was excised (Dhaka et al., 2008). Both transgenic lines allowed the identification of TRPM8-expressing cells by the expression of YFP or GFP fluorescence. Moreover, *Trpm8*<sup>EGFPf/+</sup> (i.e., hemizygous) allowed recordings from GFP(+) neurons with one functional copy of TRPM8. The genotype of transgenic mice was established by PCR.

**Culture and transfection of mammalian cell lines.** Human embryonic kidney 293 cells (HEK293) were maintained in DMEM plus Glutamax, supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin, incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. HEK293 cells were plated in 24-well dishes at 2 × 10<sup>5</sup> cells/well and transiently transfected with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). When necessary, we cotransfect the cells with 1 μg of TRPM8 channel plasmid (from different species) and 0.5 μg of GFP plasmid. For the transfection, 2 μl of Lipofectamine 2000 was mixed with the DNA in 100 μl of OptiMem (Thermo Fisher Scientific), a reduced serum media. Electrophysiological and calcium imaging recordings took place 24–36 h after transfection. The evening before the experiment, cells were trypsinized (0.25% trypsin-EGTA) and reseeded at lower density in 12-mm-diameter glass coverslips previously treated with poly-L-lysine.

The expression vectors used and their source were as follows: mouse TRPM8 (NM\_134252) in pcDNA5, kindly provided by Ardem Patapoutian (Scripps Research Institute), was used as a WT TRPM8. A menthol-insensitive mutant (Y745H) and an icilin-insensitive mutant (N799A) were obtained by site-directed mutagenesis from this WT construct as described previously (Mälkiä et al., 2009). Point mutations were confirmed by sequencing of the plasmids and posterior analysis with LaserGene software (DNASTAR). Human TRPM8 in pcDNA3 (Veit Flockerzi, Saarland University), human TRPA1 in pCMV6-AC-GFP vector (Viktorie Vlachova, Czech Academy of Sciences), mouse mycTRPM3-IRES-GFP (Stefan Phillip, Saarland University), and rat TRPV1 in pcDNA3 (Davis Julius, University of California–San Francisco) were also transiently transfected in HEK293 cells using the same techniques.

HEK293 cells stably expressing rat TRPM8 channels (CR#1 cells) (Brauchi et al., 2004) were cultured in DMEM containing 10% of FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 450 μg/ml geneticin (G418).

**DRG cultures.** Adult mice of either sex (1–4 months) were anesthetized with isoflurane and decapitated. The spinal cord was isolated, and DRGs were dissected out from all spinal segments and maintained in ice-cold HBSS solution. After isolation, DRGs were incubated with collagenase Type XI (Sigma-Aldrich) and dispase II for 30–45 min in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free HBSS medium at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Thereafter, DRGs were mechanically dissociated by passing 15–20 times through a 1 ml pipette

tip and filtered through a 70  $\mu\text{m}$  nylon filter. Neurons were harvested by centrifugation at 1200 rpm during 5 min. The resultant pellet was resuspended in MEM supplemented with 10% FBS, 1% MEM-vit, and 1% penicillin/streptomycin and plated on poly-L-lysine-coated glass coverslips. Electrophysiological and calcium-imaging recordings were performed after 12–36 h in culture.

**Fluorescence  $\text{Ca}^{2+}$  imaging.** Ratiometric calcium imaging experiments were conducted with the fluorescent indicator fura-2 (Thermo Fisher Scientific). DRG neurons or HEK293 cells were incubated with 5  $\mu\text{M}$  fura-2 AM and 0.2% pluronic (Thermo Fisher Scientific) for 45 min at 37°C in standard extracellular solution. Fluorescence measurements were obtained on an inverted microscope (Leica Microsystems) fitted with an Imago-QE Sensicam camera (PCO). Fura-2 was excited at 340 and 380 nm (excitation time 60 ms) with a rapid switching monochromator (TILL Photonics) or an LED-based system (Lambda OBC, Sutter Instruments). Mean fluorescence intensity ratios (F340/F380) were displayed online with TillVision software (TILL Photonics) every 2 s. The standard bath solution contained the following (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2.4  $\text{CaCl}_2$ , 1.3  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, and 10 glucose, and was adjusted to a pH of 7.4 with NaOH (290 mOsm/kg). Calcium imaging and electrophysiological recordings were performed at a basal temperature of  $33 \pm 1^\circ\text{C}$ . Before the start of the experiment, an image of the microscopic field was obtained with transmitted light and under 460 nm excitation wavelength, to identify fluorescent cells.

Responses to agonists were calculated by measuring the peak ratio values, after subtracting the mean baseline fluorescence ratio during the 15 s previous to agonist application. Responses were scored as positive if the increase in fluorescence ( $\Delta\text{fura-2}$  ratio) was  $>0.08$ .

**Electrophysiology in cultured cells.** Whole-cell voltage- and current-clamp recordings were obtained from mice DRG neurons or transiently transfected HEK293 cells with borosilicate glass patch-pipettes (Sutter Instruments, 4–8  $\text{M}\Omega$  resistance) and were performed simultaneously with temperature recordings. Signals were recorded with an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Molecular Devices) and digitized through a Digidata 1322A (Molecular Devices). Stimulus delivery and data acquisition were performed using pCLAMP9 software (Molecular Devices).

For neuronal recordings, we used the standard bath solution (see above) at a basal temperature of 33°C. The intracellular solution contained the following (in mM): 115 K-gluconate, 25 KCl, 9 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 1  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\text{Na}_2\text{GTP}$ , and 3  $\text{K}_2\text{ATP}$ , adjusted to pH 7.35 with KOH (280 mOsm/kg). In voltage-clamp recordings, amplifier gain was set at  $\times 1$ , sampling rate was set to 10 kHz, and the signal was filtered at 2 kHz. Neurons were voltage-clamped at a potential of  $-60$  mV. For current-clamp recordings, gain was set at  $\times 10$ , acquisition rate was 50 kHz, and the signal was filtered at 10 kHz. Once in the whole-cell configuration, resting membrane potential was measured. In neurons that fired action potentials at rest, a small DC current was injected to bring the cell to  $\sim -55$  mV.

For electrophysiological experiments in HEK293 cells, to minimize desensitization of TRPM8 responses, a calcium-free extracellular solution was used (in mM as follows): 144.8 NaCl, 3 KCl, 1 EGTA, 1.3  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, and 10 glucose (290 mOsm/kg, pH adjusted to 7.4 with NaOH). The intracellular solution for HEK293 recordings was (in mM as follows): 135 CsCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 1 EGTA, 5  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , and 0.1  $\text{NaGTP}$ , adjusted to pH 7.4 with CsOH (280 mOsm/kg). Recordings were performed at a basal temperature of  $33 \pm 1^\circ\text{C}$ , except for the experiments in which opening and inactivation kinetics were studied in which temperature was set at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

After a Giga-ohm seal was formed, and the whole-cell configuration was established, cells were voltage-clamped at a potential of  $-60$  mV, and voltage ramps from  $-100$  to 150 mV (0.62 mV/ms) were applied at 3 s intervals (0.33 Hz). For the experiments examining the opening and inactivation kinetics, 100 ms duration voltage steps were applied (from  $-80$  to 240 mV) from a holding potential of  $-80$  mV. The currents were acquired at 10 kHz, filtered at 2 kHz. The ramps were analyzed with WinASCD software package (Prof. G. Droogmans, Laboratory of Physiology, KU Leuven).

**Temperature stimulation.** Glass coverslip pieces with cultured cells were placed in a microchamber and continuously perfused with solu-

tions warmed at 32°C–34°C. The temperature was adjusted with a Peltier device (CoolSolutions) placed at the inlet of the chamber, and controlled by a feedback device (Reid et al., 2001). Cold sensitivity was investigated with a temperature drop to  $\sim 18^\circ\text{C}$ . The bath temperature was monitored with an IT-18 T-thermocouple connected to a Physitemp BAT-12 microprobe thermometer (Physitemp Instruments) and digitized with an Axon Digidata 1322A AD converter running Clampex 9 software (Molecular Devices).

**Preparation and purification of the TRPM8 protein from HEK293 cells.** HEK293 cells stably expressing rat myc-tagged TRPM8 were grown to 70%–80% confluence, washed, and collected with PBS. Cells were harvested and resuspended in NCB buffer, containing 500 mM NaCl, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM HEPES, 10% glycerol, pH 7.5, with addition of 1 mM of protease-inhibitor PMSF, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Thereafter, cells were lysed by the freeze-thawing method and centrifuged at low speed to remove cell debris and DNA. The supernatant was further centrifuged at  $40,000 \times g$  for 2.5 h, and the pellet resuspended in NCB buffer with addition of a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics), 0.1% Nonidet P40 (Roche Diagnostics), and 0.5% dodecyl-maltoside (DDM) (Calbiochem). The suspension was incubated overnight at 4°C on a shaker with gentle agitation and then centrifuged for 1 h, at  $40,000 \times g$ . Further, the TRPM8 protein was purified by immunoprecipitation with anti-Myc-IgG conjugated to A/G-protein magnetic beads (Thermo Fisher Scientific), following the procedure provided by the manufacturer. All steps of purification were performed at 4°C. For the planar lipid bilayers experiments, the protein was eluted with NCB-elution buffer, containing 0.03% lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and Myc-peptide (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

**Planar lipid bilayer measurements.** Planar lipid bilayers measurements were performed as previously described (Zakharian et al., 2010; Asuthkar et al., 2015). Planar lipid bilayers were formed from a solution of synthetic 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine and 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphoethanolaminein (Avanti Polar Lipids) in a 3:1 ratio in *n*-decane (Sigma-Aldrich). The solution was used to paint a bilayer in an aperture of  $\sim 150$   $\mu\text{m}$  diameter in a Delrin cup (Warner Instruments) between symmetric aqueous bathing solutions of 150 mM KCl, 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 20 mM HEPES, pH 7.4, at 22°C. All lipid bilayer experiments were performed in the presence of  $\text{PIP}_2$ , unless specifically omitted as indicated: 2.5  $\mu\text{M}$  DiC8- $\text{PIP}_2$  (Cayman Chemical) dissolved in water was added to both compartments. All salts were ultrapure ( $>99\%$ ) (Sigma-Aldrich). Bilayer capacitances were in the range of 50–75 pF. After the bilayers had been formed, the TRPM8 protein from the micellar suspension (20 ng/ml) was added by painting to both compartments. Unitary currents were recorded with an integrating patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, Molecular Devices). The trans solution (voltage command side) was connected to the CV 201A head stage input, and the *cis*-solution was held at virtual ground via a pair of matched Ag-AgCl electrodes. Currents through the voltage-clamped bilayers (background conductance  $< 1$  pS) were filtered at the amplifier output (low pass,  $-3$  dB at 10 kHz, 8-pole Bessel response). Data were secondarily filtered at 100 Hz through an 8-pole Bessel filter (950 TAF, Frequency Devices) and digitized at 1 kHz using an analog-to-digital converter (Digidata 1322A, Molecular Devices), controlled by pClamp10.3 software (Molecular Devices). Single-channel conductance events, all points' histograms, open probability, and other parameters were identified and analyzed using the Clampfit10.3 software (Molecular Devices).

**Isolated skin nerve preparation.** Extracellular recordings from single cutaneous primary afferent axons in an isolated mouse skin-saphenous nerve preparation were obtained following previously published procedures (Roza et al., 2006; Zimmermann et al., 2009). In brief, adult male C57BL/6J mice were killed by cervical dislocation, and the hairy skin from either hindpaw, with the saphenous nerve attached, was dissected free from underlying muscles and placed in a custom made Teflon recording chamber with the corium side up (Zimmermann et al., 2009).

The chamber containing the preparation was continuously superfused at a rate of 4 ml/min with oxygenated external solution consisting of the following (in mM): 107.8 NaCl, 26.2  $\text{NaHCO}_3$ , 9.64 sodium gluconate, 7.6 sucrose, 5.55 glucose, 3.5 KCl, 1.67  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.53  $\text{CaCl}_2$ , and 0.69



MgSO<sub>4</sub>, which was adjusted to pH 7.4 by continuously gassing with 95% oxygen/5% CO<sub>2</sub>. Temperature of the solution was maintained ~34°C with a SC-20 in-line heater/cooler system, driven by a CL-100 bipolar temperature controller (Warner Instruments).

After pulling back the perineurium with Dumont #5SF forceps, a small bundle of fibers was aspirated into a patch-pipette connected to a high gain AC differential amplifier (model DAM 80; World Precision Instruments). A reference electrode was positioned inside the chamber. Input signals were amplified, digitized (CED Micro1401-3; Cambridge Electronic Design) at 25 kHz and stored in the hard drive of a PC for off-line analysis. For recording and off-line analysis, the Spike 2 software package was used (Cambridge Electronic Design).

A small, cone-shaped piece of frozen external solution was moved slowly over the corium side of the skin and used to identify cold spots: brisk thermoreceptor fiber activity was evoked by the ice cone when in the immediate vicinity of the receptive field, and this activity stopped shortly after removing the stimulus. Cold spots identified in this way were then isolated from the surrounding tissue with a small ABS thermoplastic ring, and delivery of the subsequent cold and chemical stimuli was restricted to a circular area (5 mm diameter) of the skin. Cold stimuli were performed with solutions flowing through a Peltier system custom-designed to deliver a small volume of solution inside the ring isolating the skin area. Starting from a baseline temperature of 34°C–35°C, the temperature reached ~12°C in ~50 s.

In control conditions, at the baseline temperature of 34°C–35°C, cold thermoreceptors were silent, firing action potentials during the cooling ramp. The cold threshold was defined as the temperature corresponding to the first spike during a cooling ramp. When chemical sensitization led to the appearance of ongoing activity already at basal temperature, cold threshold was taken as the mean temperature during the 60 s preceding the start of the cooling ramp. Chemical sensitivity of single fibers was tested with consecutive applications of TAC (30 μM), followed by menthol (50 μM) after a period of wash. Chemical sensitivity during recordings at 34°C was defined as the presence of at least 20 spikes during a period of 2 min before the cooling ramp. To explore their effects on cold sensitivity, a cold temperature ramp was also applied in the presence of TAC or menthol.

**Extracellular recording of corneal nerve terminals.** Adult C57BL/6J mice (3–6 months old; *n* = 10) were killed by cervical dislocation, their eyes extracted, mounted in a small chamber, and continuously perfused with an oxygenated solution (~310 mOsm/kg) of the following composition (in mM): 128 NaCl, 5 KCl, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, and 10 D-glucose. The solution was bubbled with carbogen gas (5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>) and maintained at the desired temperature with a Peltier device.

A broken patch-pipette, mounted on a micromanipulator and connected to a high-gain amplifier (Neurolog NL104, Digitimer) was gently pressed against the corneal surface to obtain extracellular recordings of single cold-sensitive corneal nerve terminals *in vitro*, as described previously (Parra et al., 2010; González-González et al., 2017). Recordings were digitized at 10 kHz and stored in a computer using a CED micro 1401 interface and Spike 2 software (both from Cambridge Electronic Design).

The corneal surface was systematically explored with the recording microelectrode until the isolation of spontaneous activity. Starting from a basal temperature of 34°C, the bath temperature was lowered in a staircase fashion to 30°C and 25°C and maintained at each level for ~3 min. After returning to 34°C, the eye was bathed in 30 μM TAC and the staircase of low temperatures repeated. Each cornea was only exposed once to the drug.

**Behavioral assessment of temperature sensitivity.** Male C57BL/6J mice (2–3 months old) were obtained from The Jackson Laboratory and bred in house. The TRPM8 KO line was the same used in the cellular studies and kept on a C57BL/6J background (Dhaka et al., 2007). Mice were housed in large cages (1290D Eurostandard Type III) with food and water *ad libitum*. Animals were tested between 8:30 A.M. and 11:00 A.M. Before testing, animals were acclimatized to handling and being held in a lightly restrained position for 30 s on a flat surface at room temperature. For baseline measurements, each hindpaw was placed individually in

contact with the surface of a Peltier-regulated metal plate (Bioseb cold/hot plate) set to 10°C, and the withdrawal latency was measured with a cutoff time of 30 s (Menéndez et al., 2002). The mean of the two paws was calculated and taken as the baseline (i.e., naive) value for each mouse. Thereafter, each mouse received vehicle (8% ethanol, 2% Cremophor in saline) in one of their paws and either menthol (1%) or TAC (1%) in the other one. Solutions were injected intraplantarly in a volume of 25 μl. Animals were returned to their cages, and each paw was tested again 20 min after injections. In TRPM8 KO mice, the experiments were identical, except that menthol was not injected in these animals. In all cases, the experimenter was blind to the treatment when doing the measurements.

**Behavioral assessment of blinking.** Adult male C57BL/6J or *Trpm8*<sup>-/-</sup> (Dhaka et al., 2008) mice were lightly restrained, and 5 μl of saline, vehicle (8% ethanol, 2% Cremophor in saline), TAC (1%), or an hyperosmolar (785 mOsm/kg) solution of saline supplemented with NaCl was applied to one eye from the tip of a graduated micropipette (Gilson Pipetman P20). The blinking of that particular eye was recorded using a Logitech HD webcam camera at 30 frames per second. The solutions were then removed and the mice returned to their home cages and left undisturbed for at least 5 h between each experiment. Each animal was tested in morning and afternoon sessions, alternating the left and right eyes. Recordings were replayed at slow motion on a computer screen, and the number of blinks was counted over a 2 min period. Counting started 3 s after the application, as there were always some blinks associated with the application of the drop. Quantification of the number of blinks was performed independently by 2 observers on 100 videos. The correlation coefficient (*r*) for both measurements was 0.996.

**Behavioral assessment of tearing.** Adult male C57BL/6J mice (*n* = 10) were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine hydrochloride (80 mg/kg, Imalgene 1000; Merial Laboratorios) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg, Rompun; Bayer Hispania). Basal tear flow was measured in both eyes, after consecutive applications of a drop (2 μl), using a graduated micropipette (Gilson Pipetman P2), of either saline, vehicle (8% ethanol, 2% Cremophor in saline), and TAC (1%), in this order, using phenol red threads (Zone-Quick, Menicon Pharma). Each solution was applied for 2 min. Thereafter, excess fluid was removed using a sterile absorbent swap (Sugi Eyespear pointed tip, Kettenbach). After a rest period of 5 min, a phenol red thread was gently placed between the lower lid and the bulbar conjunctiva at the nasal angle during 1 min. To quantify the staining of the threads, the wetted length was measured under a stereomicroscope. After 2 additional minutes, a new solution was applied. One week later, the protocol was repeated in some of the same animals (*n* = 5) but applying saline solution in the three consecutive tests.

**Chemicals.** TAC, also known as FK506 (LC Laboratories) was prepared in a DMSO stock (50 mM) and was dissolved in prewarmed (50°C) control solution. When TAC was added to the external solution, a white cloud of precipitation appeared and gentle shaking was applied until total dissolution was obtained. Due to its poor solubility in water, a solution of 30 μM TAC was the highest concentration tested. The stock of cyclosporine (LC Laboratories) was also 50 mM in DMSO. Menthol (Scharlau), BCTC (4-(3-chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazinecarboxamide; Tocris Bioscience), AMTB (N-(3-aminopropyl)-2-[(3-methylphenyl)methoxy]-N-(2-thienylmethyl)benzamide hydrochloride; Tocris Bioscience), M8-B (N-(2-aminoethyl)-N-[[3-methoxy-4-(phenylmethoxy)phenyl]methyl]-2-thiophenecarboxamide hydrochloride), pregnenolone sulfate (Tocris Bioscience), allyl isocyanate (AITC; Sigma-Aldrich), and capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-trans-6-nonenamide; Sigma-Aldrich) were prepared as stocks and stored at -20°C. For *in vivo* experiments, a 10% (100 mg/ml) stock of TAC was prepared in 80% ethanol, 20% Cremophor in PEG-60 Hydrogenated Castor Oil (BASF), and diluted to 1% in saline on the day of the experiment. The final solution had a homogeneous milky white color without precipitations.

**Experimental design and statistical analysis.** To estimate shifts in the voltage dependence of TRPM8 activation, current-voltage (*I*-*V*) relationships obtained from repetitive (0.33 Hz) voltage ramps (-100 to 150

mV, 400 ms duration) were fitted with a function that combines a linear conductance multiplied by a Boltzmann activation term as follows:

$$I = G \times (V - E_{\text{rev}}) / (1 + \exp((V_{1/2} - V)/dx))$$

where  $G$  is the whole-cell conductance,  $E_{\text{rev}}$  is the reversal potential of the current,  $V_{1/2}$  is the potential for half-maximal activation, and  $dx$  is the slope factor. The  $G$  value obtained for a high menthol concentration (800  $\mu\text{M}$ ) was taken as  $G_{\text{max}}$  and was used for the representation of  $G/G_{\text{max}}$  curves.

For the fitting of  $G/G_{\text{max}}$  curves extracted from the voltage pulses protocol, a Boltzmann equation was used as follows:

$$G/G_{\text{max}} = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((V_m - V_{1/2})/dx))$$

where  $A2$  is the maximal normalized conductance,  $A1$  is the minimal normalized conductance,  $V_m$  is the test potential,  $V_{1/2}$  is the potential for half-maximal activation and  $dx$  is the slope factor.

Conductance-voltage ( $G$ - $V$ ) curves were constructed from the  $I$ - $V$  curves of individual cells by dividing the evoked current by the driving force, according to the following equation:

$$G = I / (V_m - V_{\text{rev}})$$

where  $V_m$  is the testing potential and  $V_{\text{rev}}$  is the reversal potential of the current.

The threshold temperatures were estimated as the first point at which the measured signal (F340/F380 or current) deviated by at least 4 times the SD of its baseline. All fittings were performed with the Levenberg-Marquardt method implemented in the Origin 8.0 software. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. When comparing two means, statistical significance ( $p < 0.05$ ) was assessed by Student's two-tailed  $t$  test. For multiple comparisons of means, one-way ANOVAs were performed, followed by Bonferroni's *post hoc* analysis, using Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software).

## Results

### TAC activates recombinant TRPM8 channels

To evaluate the agonist effect of TAC on TRPM8, we performed intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments on HEK293 cells stably expressing rat TRPM8 channels. As shown in Figure 1A, B, TAC produced a dose-dependent activation of TRPM8, with an estimated  $\text{EC}_{50}$  of  $14.1 \pm 25.9 \mu\text{M}$  ( $n = 105$  cells). Due to its poor solubility in aqueous solutions, it was not possible to test TAC at higher concentrations. At low concentrations, the calcium response evoked by TAC was sustained, whereas at higher concentrations there was some desensitization during agonist application, similar to the results observed with other chemical agonists of TRPM8 (e.g., menthol) (Rohács et al., 2005). No changes in  $\text{Ca}^{2+}$  levels were observed when TAC was applied in the absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  (data not shown), indicating that  $\text{Ca}^{2+}$  influx rather than  $\text{Ca}^{2+}$  release is responsible for TAC-induced elevation in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ .

TRPM8 is activated by cold temperature (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002), and menthol potentiates responses to cold (Voets et al., 2004; Mälkiä et al., 2007). Similarly, TAC produced a dose-dependent potentiation of cold-evoked responses in mouse TRPM8, with effects evident at 1  $\mu\text{M}$  and saturation at  $\sim 10 \mu\text{M}$  (Fig. 1C, D). At 10  $\mu\text{M}$ , peak amplitude of cold-evoked responses increased approximately fourfold with respect to responses in control ( $p < 0.005$ ) (Fig. 1D). A closer inspection of TRPM8-evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  responses during cooling pulses revealed that TAC, at concentrations of 10–30  $\mu\text{M}$ , produced a marked shift in the threshold for cold-evoked responses toward warmer temperatures. The average shift was  $\sim 7^\circ\text{C}$  for the highest concentration tested, changing from  $21.9 \pm 0.9^\circ\text{C}$  in control solution to  $29.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  in 30  $\mu\text{M}$  TAC ( $n = 15$ ,  $p < 0.005$ ).

We also explored the sensitivity of human TRPM8 to TAC. As shown in Figure 1E, TAC (30  $\mu\text{M}$ ) produced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevations in HEK293 cells transiently expressing hTRPM8, and this activation was not observed in untransfected cells (Fig. 1E). A summary of the effects of TAC, menthol, and cold on hTRPM8 is shown in Figure 1F.

In contrast to the effects of TAC, cyclosporine (30  $\mu\text{M}$ ), a structurally unrelated calcineurin inhibitor, had no effect on HEK293 cells stably expressing rat TRPM8 channels (Fig. 1G, H).

Together, these results indicate that the immunosuppressant TAC acts like a potent cold-mimetic compound on TRPM8 channels of different mammalian species by a mechanism independent of its canonical signaling pathway.

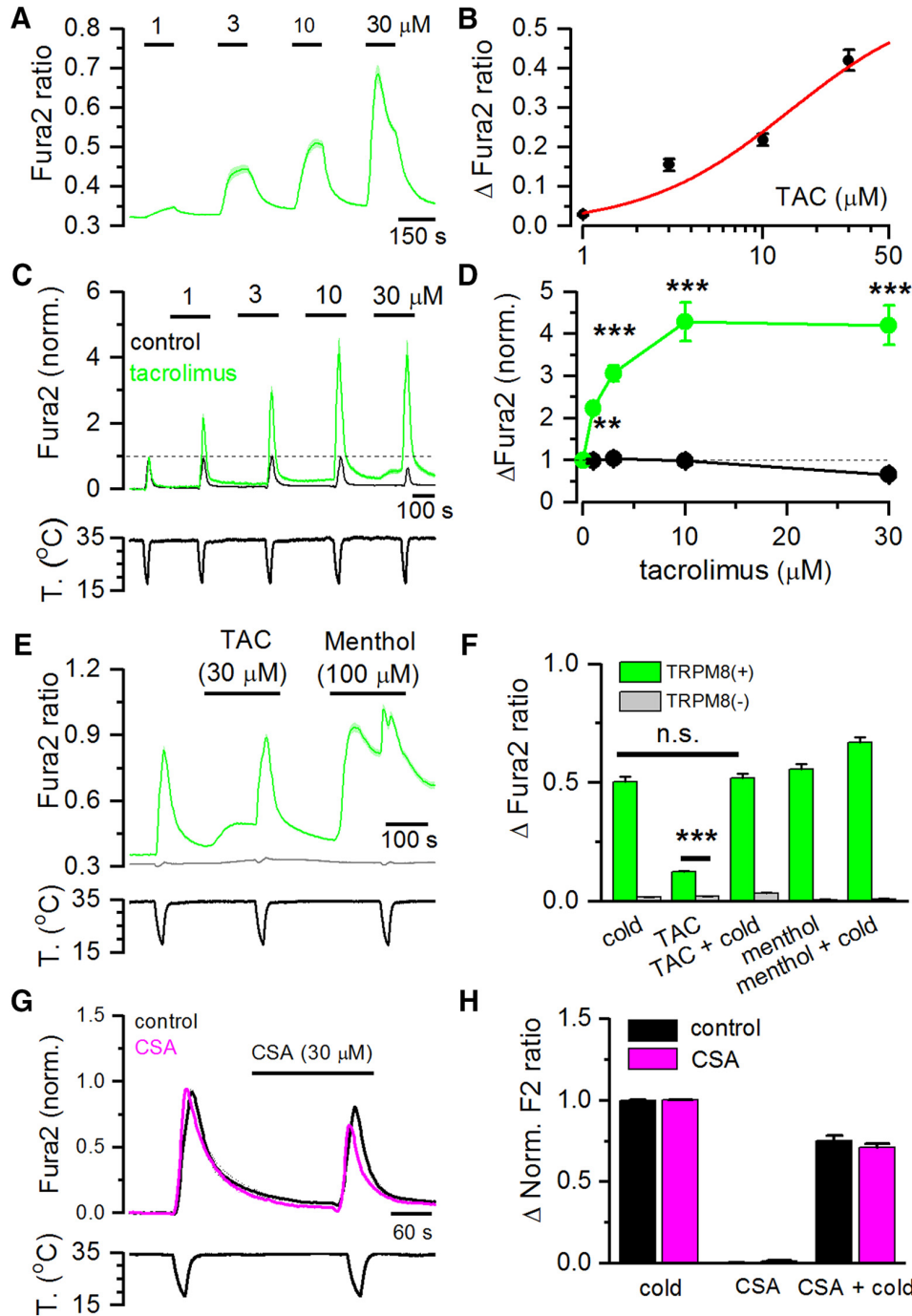
### TAC activates TRPM8 currents

In whole-cell patch-clamp recordings, application of 30  $\mu\text{M}$  TAC activated robust whole-cell currents in HEK293 cells expressing mouse TRPM8 (Fig. 2A). The  $I$ - $V$  relationship of the TAC-activated current showed strong outward rectification and a reversal potential close to 0 mV, in line with the previously described properties of TRPM8 (Fig. 2B) (Voets et al., 2004; Mälkiä et al., 2007). Confirming the results obtained in calcium imaging experiments, cold-evoked inward and outward currents were strongly potentiated in the presence of TAC (Fig. 2A, B), leading to large inward ( $-8.3 \pm 1.7$  pA/pF cold vs  $-101.2 \pm 30.9$  pA/pF TAC plus cold) and outward currents ( $437 \pm 47$  pA/pF cold vs  $597 \pm 59$  pA/pF TAC plus cold) ( $n = 7$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 2C). Similar results were observed in HEK293 cells transfected with human TRPM8. In cells expressing hTRPM8, TAC (30  $\mu\text{M}$ ) activated a rectifying nonselective current, and cold-evoked currents were strongly potentiated by TAC:  $-78.7 \pm 13.4$  pA/pF versus  $-121.9 \pm 18.3$  pA/pF at  $-100$  mV ( $n = 8$ ,  $p < 0.0001$ ) and  $493 \pm 26.2$  pA/pF versus  $594.3 \pm 55.5$  pA/pF at 100 mV ( $n = 8$ ,  $p = 0.0159$ ).

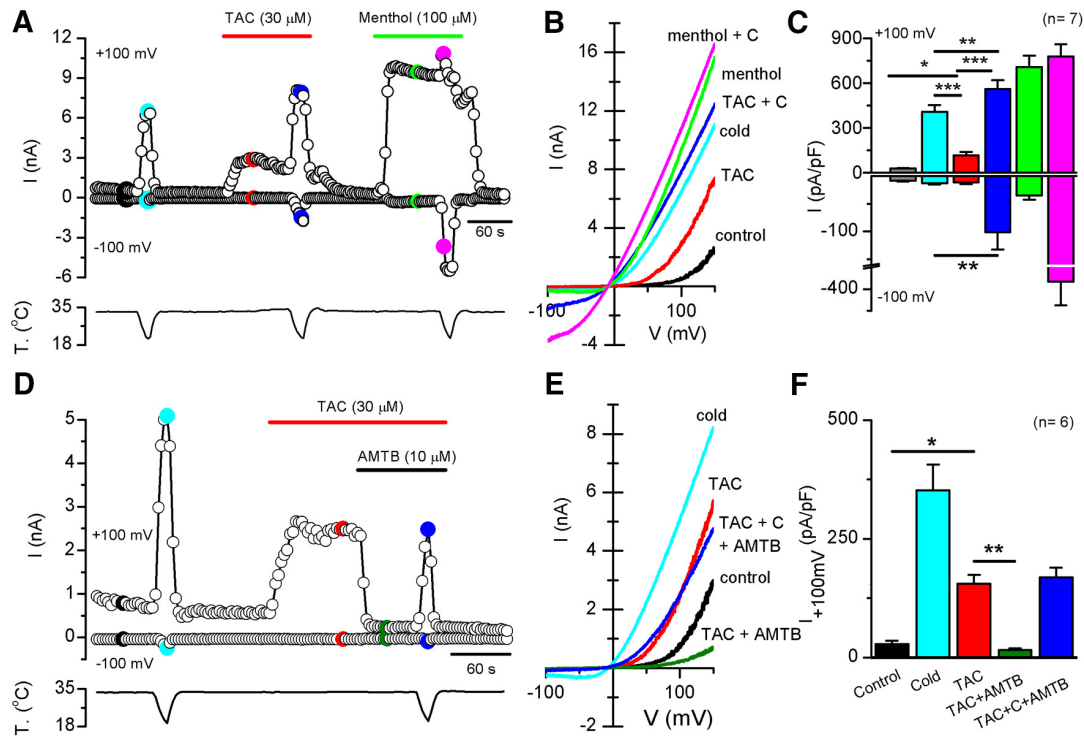
To confirm the agonism of TAC on TRPM8 channels, we tested the effect of AMTB, a selective TRPM8 antagonist. As shown in Figure 2D, the responses to TAC were fully suppressed by 10  $\mu\text{M}$  AMTB ( $352 \pm 55$  pA/pF in TAC vs  $16 \pm 3$  pA/pF in TAC plus AMTB) ( $n = 6$ ,  $p < 0.01$ ). AMTB also reduced the voltage-dependent activation of TRPM8 at the baseline temperature of  $33^\circ\text{C}$ . During combined application of cooling and TAC, the blocking effect of AMTB was only partial (Fig. 2D–F).

### Biophysical characterization of TAC effects on TRPM8 gating

Previous studies showed that low temperature and menthol activate TRPM8 channels by producing a shift in the voltage dependence of activation toward more negative potentials (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004), whereas antagonists have the opposite effect (Mälkiä et al., 2007). Recently, Janssens et al. (2016) applied kinetic analysis to describe the mechanisms whereby chemical ligands impact on TRPM8 channel gating, and differentiated between two types of agonists: those stabilizing the open channel (e.g., menthol) and those that cause a destabilization of the closed state (e.g., AITC). We used mouse TRPM8 heterologously expressed in HEK293 to characterize the effects of TAC (30  $\mu\text{M}$ ) on voltage dependence and channel gating and compared the effects of TAC, menthol, and AITC. Whole-cell recordings during steps from  $-80$  to 240 mV were obtained at room temperature ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), leading to substantial baseline activation of TRPM8. Menthol was applied at 10  $\mu\text{M}$ , TAC at 30  $\mu\text{M}$ , and AITC at 10 mM, concentrations that gave rise to similar steady-state TRPM8 current amplitudes. Following the sequential application of the three agonists, the voltage protocol was



**Figure 1.** TAC activates recombinant TRPM8 channels and potentiates cold-evoked responses. **A**, Average  $\pm$  SEM fura-2 ratio changes in HEK293 cells stably expressing rat TRPM8 during sequential application of TAC at different concentrations ( $n = 105$ ). **B**, Dose–response curve of TAC effects on TRPM8-expressing cells. Data have been fitted with a logistic function ( $EC_{50} = 14.1 \pm 25.9 \mu\text{M}$ ). **C**, Average  $\pm$  SEM time course of fura-2 ratio in HEK293-expressing mouse TRPM8 during consecutive application of cold pulses in control solution (black trace,  $n = 15$ ) or in the presence of increasing TAC concentrations (green trace,  $n = 16$ ). Bottom, Time course of the corresponding temperature ramps. In the absence of TAC, the response to cold was relatively stable, whereas in the presence of TAC, the response to cold was strongly sensitized. Responses in individual cells have been normalized to their response to the first cooling pulse. **D**, Summary plot of the effect of different doses of TAC on the amplitude of cold-evoked responses in mTRPM8 cells.  $^{***}p < 0.01$  (ANOVA test in combination with Bonferroni’s *post hoc* test).  $^{***}p < 0.001$  (ANOVA test in combination with Bonferroni’s *post hoc* test). **E**, Average  $\pm$  SEM fura-2 ratio responses to cold, TAC ( $30 \mu\text{M}$ ), and menthol ( $100 \mu\text{M}$ ) in HEK293 cells transiently transfected with human TRPM8 and GFP. Green represents GFP(+) cells ( $n = 132$ ). Gray represents GFP(–) cells ( $n = 87$ ). **F**, Summary of mean responses in cells transfected with hTRPM8 (green bars) to the different agonists. Gray represents the responses of untransfected, GFP(–) cells. TAC produced a significant activation of hTRPM8 ( $^{***}p < 0.001$ ; unpaired Student’s *t* test). **G**, Average  $\pm$  SEM fura-2 ratio changes in HEK293 cells stably expressing rat TRPM8 during application of two cooling ramps. For the black traces ( $n = 25$ ), cooling ramps were delivered in control solution. For the pink traces ( $n = 107$ ), the second cooling ramp was applied in the presence of  $30 \mu\text{M}$  cyclosporine (CSA). **H**, Histogram summarizing the effects of cyclosporine on cold-evoked calcium responses during the protocol shown in **G**. No significant differences were found between the cells perfused with control solution or cyclosporine (unpaired Student’s *t* test).



**Figure 2.** TAC activates TRPM8-mediated whole-cell currents in HEK293 cells. **A**, Representative time course of whole-cell currents at  $-100$  and  $100$  mV in HEK293 cell transiently transfected with mTRPM8 during application of agonists. Bottom, Simultaneous recording of the bath temperature during the experiment. **B**,  $I$ - $V$  relationship of responses shown in **A**, obtained with a  $400$  ms voltage ramp from  $-100$  to  $150$  mV. The color of individual traces matches the color at each particular time point in **A**. TAC evokes a nonselective cationic current with typical TRPM8 features and potentiates the cold-evoked response. **C**, Bar histogram summarizing the mean current density values at  $100$  and  $-100$  mV to the different stimuli shown in **A**, with the same color code. Statistical differences were evaluated by a one-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test. **D**, Representative time course of whole-cell currents at  $-100$  and  $100$  mV during a protocol in which the effect of AMTB was studied. AMTB  $10$   $\mu$ M totally abolished TAC-evoked currents. Bottom, Simultaneous recording of the bath temperature during the experiment. **E**,  $I$ - $V$  relationship of responses shown in **D**. The color of the  $I$ - $V$  curves matches the colored time points in **D**. AMTB also blocks the voltage-dependent activation of TRPM8 at basal temperature. **F**, Bar histogram summarizing the mean current density values at  $100$  mV to the different stimuli applied in **D**. Statistical differences were evaluated by a one-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

repeated in the presence of  $800$   $\mu$ M menthol, a saturating concentration, to obtain a  $G_{\max}$  value for TRPM8 activity.

Figure 3A shows a representative example of a family of currents recorded in a cell expressing mTRPM8 during  $100$  ms voltage steps ranging from  $-80$  to  $240$  mV. The average steady-state  $I$ - $V$  and  $G$ - $V$  curves for the different conditions are shown in Figure 3B and Figure 3C, respectively. Analysis of these curves revealed a strong leftward shift of the activation curve in the presence of the three agonists, with a change in the voltage for half-maximal activation ( $V_{1/2}$ ) from  $153 \pm 7$  mV in control to  $106 \pm 10$  mV in the presence of TAC (calculated from  $G$ - $V$ ) (Fig. 3D). The shift in  $V_{1/2}$  with respect to control conditions was highly significant ( $p < 0.0001$ ). Menthol ( $10$   $\mu$ M) and AITC ( $10$  mM) had similar effects on  $V_{1/2}$  (Fig. 3D).

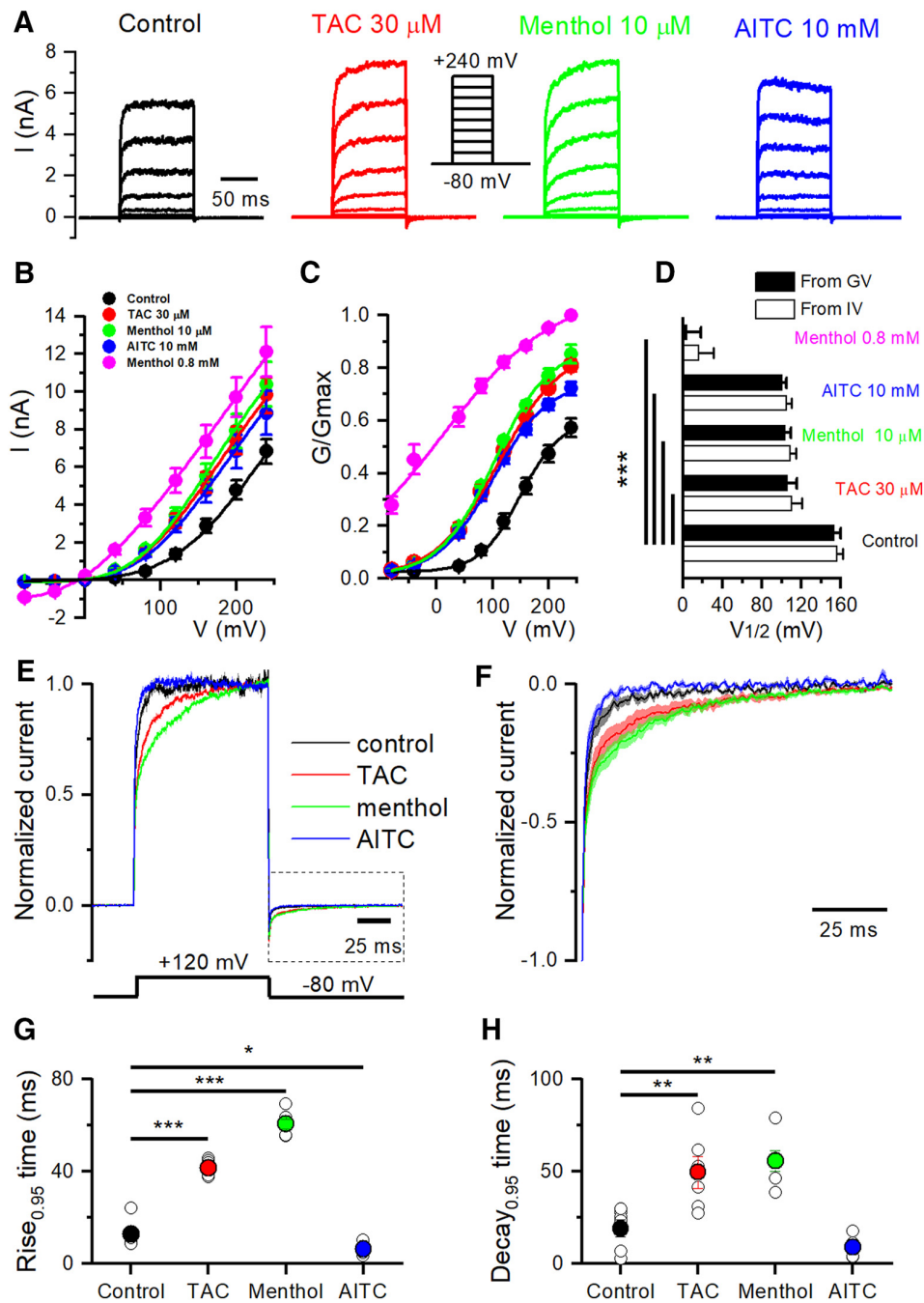
To characterize the effect of the different agonists on TRPM8 gating kinetics, we studied the changes in the time course of current activation during voltage steps to  $120$  mV (Fig. 3E) and their relaxation upon return to  $-80$  mV (Fig. 3F). For a better comparison, currents were normalized to their steady-state values. Both menthol and TAC produced a clear slowing of the gating kinetics during depolarization to  $120$  mV and after the return to  $-80$  mV. In contrast, AITC clearly accelerates the activation kinetics (Fig. 3E), without affecting the current relaxation kinetics upon repolarization to  $-80$  mV (Fig. 3F). Currents in control or during AITC application were adequately fitted with a single exponential (data not shown). In contrast, the currents in

TAC or menthol required a double exponential. To quantify the differences in kinetics produced by the three chemical agonists in more detail, we compared the rise time to 95% of the initial value. These results are shown in Figure 3G, H for the activation and deactivation time course, respectively.

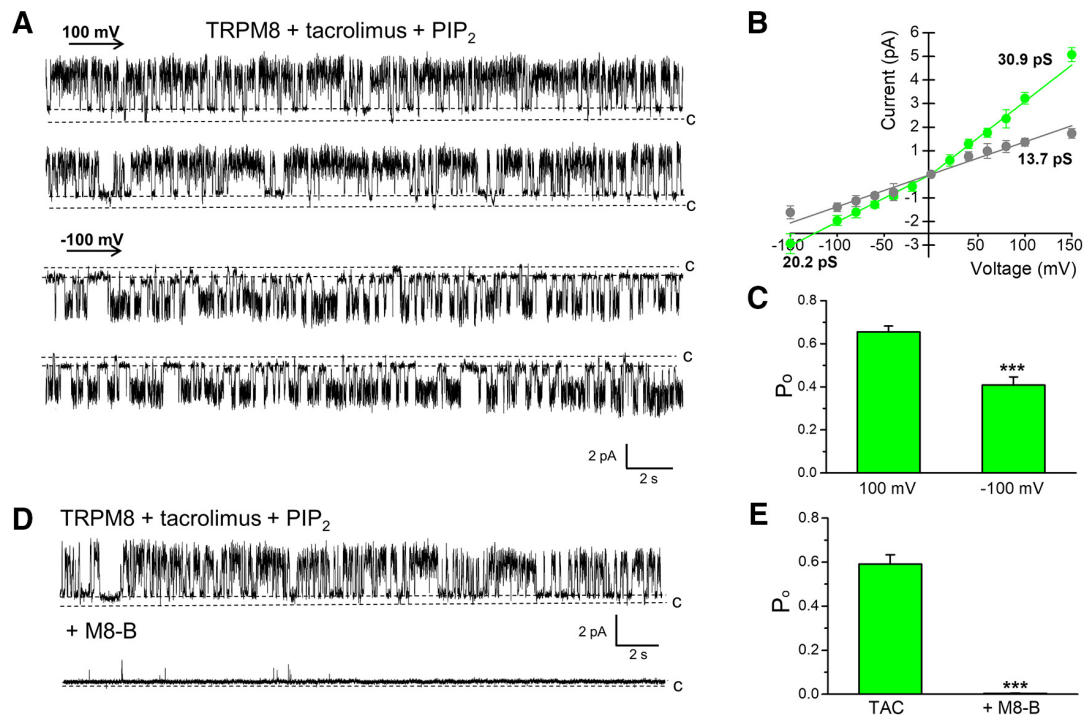
These results show that the mechanism of action of TAC on TRPM8 gating resemble those of menthol and are different of the AITC gating mechanism (Janssens et al., 2016).

#### Gating of TRPM8 by TAC in planar lipid bilayers

To test the possible direct action of TAC on TRPM8 gating, we evaluated channel activity in a reconstituted system. The myc-tagged rat TRPM8 protein was purified from HEK293 cells stably expressing the channels using immunoprecipitation, and incorporated into planar lipid bilayers as previously described (Zakharian et al., 2010). Similarly to other TRPM8 agonists (Zakharian et al., 2010; Asuthkar et al., 2015), TAC led to TRPM8 channel openings only in the presence of its prime gating factor,  $PIP_2$ . Incubation of TRPM8 with TAC alone ( $30$   $\mu$ M) for a few hours ( $2$ – $3$  h of testing) was insufficient to activate the channel (data not shown). Similarly,  $PIP_2$  alone ( $2.5$   $\mu$ M) did not induce channel openings at RT (data not shown). However, TRPM8 opened promptly soon after the addition of  $2.5$   $\mu$ M  $PIP_2$  to TAC (Fig. 4A). In the presence of TAC, TRPM8 exhibited outward currents with a mean slope conductance of  $\sim 31$  pS, and inward conductance of  $\sim 20$  pS. The TAC-induced TRPM8 channel openings also dem-



**Figure 3.** Biophysical characterization of TAC effects on TRPM8 gating. **A**, Whole-cell TRPM8 currents in response to the indicated voltage step protocol (from  $-80$  to  $240$  mV,  $\Delta v = 40$  mV) in control conditions and in the presence of TAC ( $30 \mu\text{M}$ ), menthol ( $10 \mu\text{M}$ ), and AITC ( $10 \text{mM}$ ) at  $24^\circ\text{C}$ . Note the variable effect of agonists on activation kinetics. **B**, Averaged ( $n = 6$ ) steady-state  $I$ - $V$  curves extracted from individual cells after application of Protocol A. The lines indicate the fitting to a linearized Boltzmann equation (see Materials and Methods). **C**, Averaged ( $n = 6$ ) voltage dependence activation curves in control conditions and in the presence of the different agonists. Conductance ( $G$ ) was calculated as the steady-state current divided by the driving force (Driving force =  $V_{\text{test}} - E_{\text{rev}}$ ), and normalized to the estimated maximal conductance ( $G_{\text{max}}$ ), which was the  $G$  value at  $240$  mV in the presence of  $0.8 \text{mM}$  menthol. **D**, Mean ( $n = 6$ )  $V_{1/2}$  values calculated from fitting the individual  $I$ - $V$  curves to the linearized Boltzmann equation (white bars) or the individual  $G/G_{\text{max}}$ - $V$  curves fitted to the Boltzmann equation (black bars). All three agonists produced similar shifts in  $V_{1/2}$  values at the indicated concentrations. Statistical differences were evaluated by a one-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test. **E**, Averaged TRPM8 current during a voltage step from  $-80$  to  $120$  mV, in control condition and in the presence of the different agonists. Currents were normalized to their steady-state amplitude after baseline subtraction. **F**, Averaged  $\pm$  SEM TRPM8 deactivation kinetics at  $-80$  mV obtained from current tails after a voltage step to  $120$  mV (box bounded by dotted line in **E**), in control condition and in the presence of the different agonists. The current was normalized to the maximum value, and baseline was subtracted. **G**, Mean values of the current activation time course, measured from baseline to 95% amplitude, for voltage steps to  $120$  mV. **H**, Mean values of current deactivation time course at  $-80$  mV, measured from baseline to 95% amplitude, following a voltage step to  $120$  mV. **F**, **G**, Statistical differences were evaluated with a one-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 4.** TAC activates purified TRPM8 in planar lipid bilayers. **A**, Representative single-channel recordings of TRPM8 obtained at 100 mV and  $-100$  mV showing the activation with  $30 \mu\text{M}$  TAC in the presence of  $2.5 \mu\text{M}$  PIP<sub>2</sub>. **B**,  $I$ - $V$  curve of TRPM8 single-channel current during TAC activation at different membrane potentials, showing the main conductance of outward and inward currents (green trace), and a lower subconductance state (gray trace). **C**, Bar graph represents open probability ( $P_o$ ) values at 100 and  $-100$  mV in the presence of TAC and PIP<sub>2</sub>. Data represent mean  $\pm$  SEM from 13 experiments; number of events = 28,935.  $P_o$  was significantly higher at 100 mV ( $***p < 0.001$ , paired Student's  $t$  test). **D**, Representative current traces demonstrating inhibition of TAC-induced TRPM8 activity with M8-B ( $20 \mu\text{M}$ ). TRPM8 was activated with  $30 \mu\text{M}$  TAC in the presence of  $2.5 \mu\text{M}$  PIP<sub>2</sub>. Traces were obtained at 100 mV. **E**, Bar graph summarizing the inhibition produced by M8-B on  $P_o$ . Data represent mean  $\pm$  SEM from four experiments ( $***p < 0.001$ , paired Student's  $t$  test).

onstrated a distinct subconductance state of  $\sim 14$  pS (Fig. 4A,B). In addition to the differences in conductance for currents flowing in the inward or outward direction, an outward rectification was also evident in open probability ( $P_o$ ) (Fig. 4C). Next, we tested the effect of a specific TRPM8 antagonist on TAC-induced channel activity. As shown in Figure 4D, E, the TRPM8 inhibitor M8-B essentially eliminated channel openings. Together, these results establish a direct agonistic action of TAC on TRPM8 channels, and also demonstrate the requirement of its activity on PIP<sub>2</sub>.

#### TAC activates the menthol-insensitive TRPM8-Y745H mutant but fails to potentiate its cold response

A single tyrosine residue (Y745), located on transmembrane segment 1 according to recent Cryo-EM structural analysis (Yin et al., 2018), is essential for the activating actions of menthol on TRPM8 channels (Bandell et al., 2006; Mälkiä et al., 2009). These mutant channels are completely insensitive to menthol but retain the normal responsiveness to cold and voltage exhibited by WT channels.

Using calcium imaging, we found that TAC activates mouse TRPM8-Y745H (Fig. 5A,B). On average, the amplitude of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation after application of  $30 \mu\text{M}$  TAC, normalized to the response to a cold ramp in control conditions, was  $0.20 \pm 0.008$  in WT channels ( $n = 66$ ) compared with  $0.17 \pm 0.007$  in TRPM8-Y745H ( $n = 38$ ,  $p < 0.05$ ). Remarkably, despite a normal response to cold or TAC, the TRPM8-Y745H mutant showed no potentiation of the cold response by TAC (ratio of TAC plus cold/cold =  $1.09 \pm 0.05$ ). In contrast, the WT channel showed a strong potentiation ( $1.4 \pm 0.08$ ) (Fig. 5B,  $p < 0.01$ ).

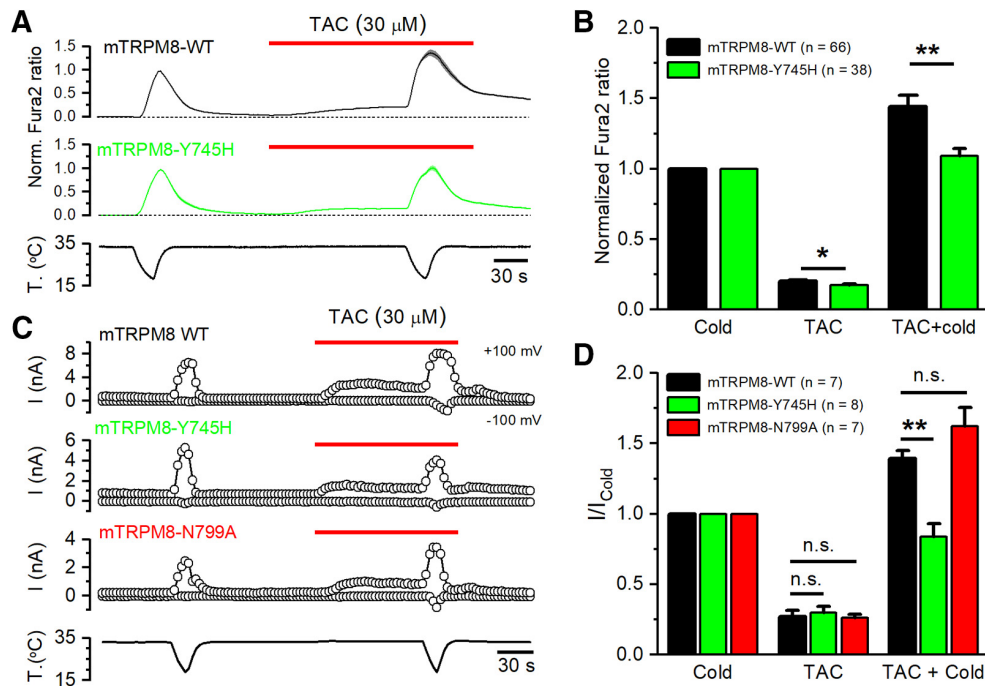
To confirm these differences, we examined the effects of TAC on whole-cell currents in WT and mutant channels (Fig. 5C). The current generated by TAC was normalized to the cold response evoked in control conditions in the same cell, at a potential of 100 mV. On average, TAC current was  $0.27 \pm 0.04$  in WT channels and  $0.30 \pm 0.04$  in the Y745H mutant, confirming that the TRPM8-Y745H mutants maintain their normal sensitivity to TAC. In the same cells, menthol ( $100 \mu\text{M}$ ) had no effect, as expected for the Y745H mutant (data not shown). Moreover, whole-cell recordings confirmed that the potentiation of the cold-evoked response by TAC was absent in the Y745H mutant (WT ratio =  $1.39 \pm 0.05$  vs TRPM8-Y745H ratio =  $0.83 \pm 0.09$ ) (Fig. 5D).

Next, we explored TAC sensitivity in the TRPM8-N799A mutant. This residue was shown to mediate responses to icilin, a different TRPM8 agonist (Chuang et al., 2004). TRPM8-N799A mutants behaved like TRPM8 WT channels, with normal responses to TAC and the potentiation of the cold response (Fig. 5C,D), suggesting that the effects of TAC on TRPM8 do not involve the icilin-binding site.

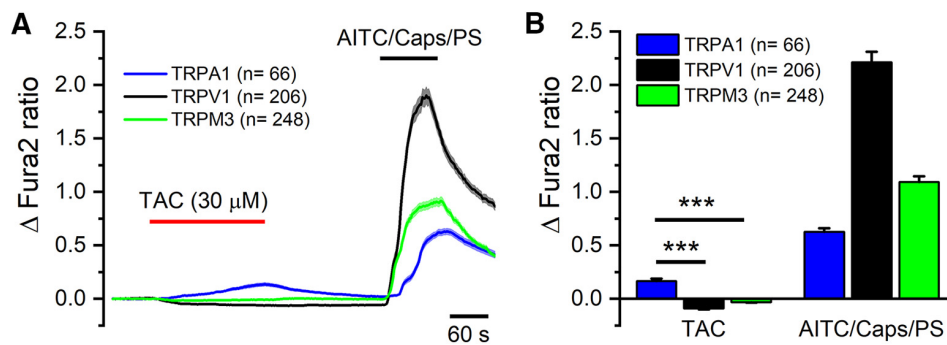
These results suggest a mode of action of TAC independent of the putative menthol and icilin binding sites and unveil the importance of the Y745 residue in the allosteric coupling between cold and TAC activation of TRPM8.

#### Effects of TAC on other thermoTRP channels

Next, we tested the effects of TAC on other thermally sensitive TRP channels (Dhaka et al., 2006). As shown in Figure 6A, TAC ( $30 \mu\text{M}$ ) had no activating effect on rat TRPV1 or mouse TRPM3.



**Figure 5.** TAC activates the menthol- and the icilin-insensitive TRPM8 mutants. **A**, Averaged  $\pm$  SEM fura-2 ratio fluorescence of mouse TRPM8-transfected HEK293 cells during cooling, TAC ( $30 \mu\text{M}$ ) and the combined application of TAC and cooling. Records have been baseline-subtracted and the average trace normalized to the initial response to cold. Top to bottom, Calcium responses of WT TRPM8, the menthol-insensitive TRPM8–Y745H mutant, and a representative recording of the temperature time course in the chamber during the recording. **B**, Histogram of mean response amplitudes to the different stimuli, normalized to the initial cold response. Note the lack of potentiation of the cold-evoked response by TAC in the menthol-insensitive mutant. Statistical differences were evaluated by an unpaired Student's *t* test. **C**, Representative traces of whole-cell recordings exploring the effect of cold and TAC in two different TRPM8 mutants. Top to bottom, Currents, measured at  $-100$  and  $+100$  mV, in WT mouse TRPM8, the menthol-insensitive TRPM8–Y745H mutant, and the icilin-insensitive TRPM8–N799A mutant. Bottom, Representative recording of the temperature change in the chamber during the protocol. **D**, Histogram of the average current values to the different agonists in TRPM8 WT and the different mutants during the protocol shown in **C**. For each cell, current responses were normalized to the initial cold-evoked response. Statistical differences for the response to each agonist in the different TRPM8 constructs were evaluated with a one-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

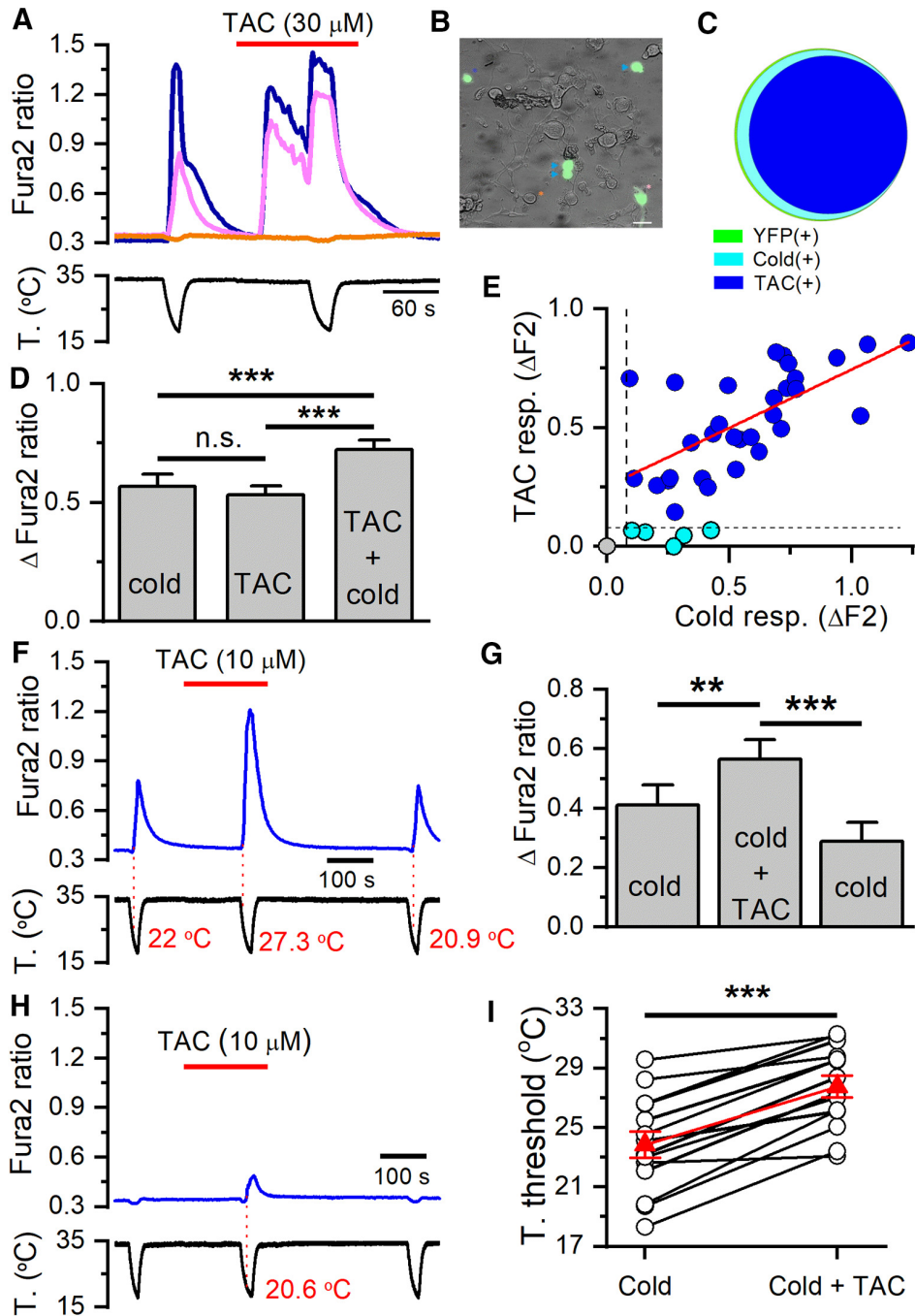


**Figure 6.** TAC activates human TRPA1 channels. **A**, Averaged  $\pm$  SEM fura-2 fluorescence ratio of HEK293 cells transfected with human TRPA1 (blue trace), rat TRPV1 (black trace), or mouse TRPM3 (green trace) during applications of TAC ( $30 \mu\text{M}$ ) and their canonical agonists capsaicin ( $100 \text{ nM}$ ), AITC ( $50 \mu\text{M}$ ), and pregnenolone sulfate (PS,  $50 \mu\text{M}$ ). **B**, Bar histogram summarizing the effect of TAC or the canonical agonists, capsaicin, AITC, or PS, on fura-2 fluorescence ratio. Individual records have been baseline-subtracted. TAC produced a significant elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in TRPA1-transfected cells compared with TRPV1- or TRPM3-transfected cells (\*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test). \*\*\* $p < 0.001$ .

In contrast, the same concentration of TAC activated human TRPA1, with a slowly rising  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response. The activating effects of TAC on TRPA1 were more modest than those produced by its canonical agonist AITC (Fig. 6B). We noticed that application of TAC produced a modest inhibition of basal calcium levels in cells expressing TRPV1 or TRPM3, suggesting some inhibitory effect on background activity at this temperature (i.e.,  $34^\circ\text{C}$ ). The effects of TAC on recombinant TRPM8 and TRPA1 channels motivated a deeper characterization of its action on primary sensory neurons.

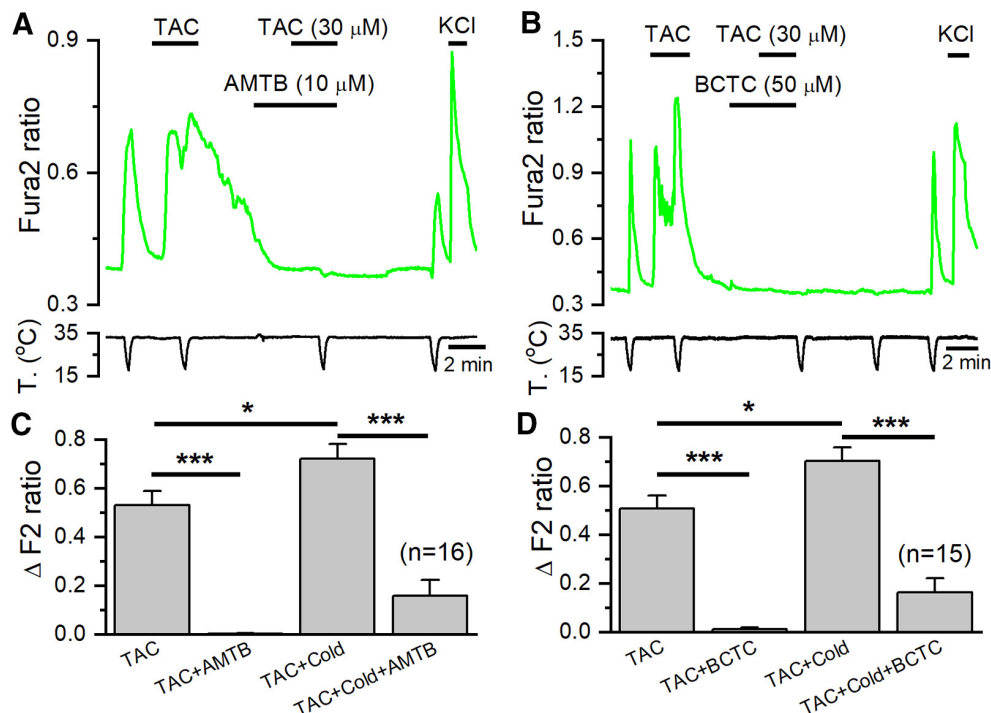
### TAC activates TRPM8-expressing cold-sensitive neurons and potentiates their cold response

TRPM8-expressing neurons represent only a small fraction of all DRG neurons (McKemy et al., 2002; Takashima et al., 2007; Dhaka et al., 2008). We used a BAC-transgenic mouse expressing enhanced YFP under the *Trpm8* promoter, *Trpm8*<sup>BAC</sup>-EYFP (Morenilla-Palao et al., 2014) and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  imaging to identify TRPM8-expressing neurons in DRG cultures. Confirming our previous finding in this transgenic mouse line (Morenilla-Palao et al., 2014), most YFP(+) neurons were



**Figure 7.** TAC activates cold-sensitive neurons selectively. **A**, Ratiometric  $[Ca^{2+}]$  measurement from fura-2 loaded cultured DRG neurons in *Trpm8*<sup>BAC</sup>-EYFP mice. Two cold-sensitive neurons (blue and magenta traces) increased their  $[Ca^{2+}]$  level during the cooling ramp. The same neurons also responded to 30  $\mu$ M TAC, and their response to cold was potentiated. The cold-insensitive neuron (orange trace) did not respond to any of these stimuli. **B**, Representative image of a DRG culture from a *Trpm8*<sup>BAC</sup>-EYFP mouse. **A**, Traces correspond to the neurons marked with the same colored asterisk: orange for YFP(–), blue and magenta for YFP(+). Three additional YFP(+) neurons, marked with blue arrowheads, also responded to cold and TAC. Scale bar, 20  $\mu$ m. **C**, Venn diagram showing the strong overlap between YFP(+) neurons (green,  $n = 37$ ), the response to cooling (cyan,  $n = 36$ ), and the response to TAC (blue,  $n = 31$ ). In this sample, none of the YFP(–) neurons ( $n = 130$ ) responded to TAC. **D**, Bar histogram showing the average amplitude of the responses to cold, to TAC, and to cold in the presence of TAC. Amplitudes were similar for cold and TAC, whereas the responses to cold were significantly higher in the presence of TAC. One-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test. **E**, Correlation between amplitude of cold- and TAC-evoked responses in individual DRG neurons. Black dotted lines indicate the threshold amplitude established for considering a positive response. Blue points represent the neurons that responded to cold and TAC ( $n = 31$ ). Cyan points represent the neurons that responded to cold but did not respond to TAC ( $n = 5$ ). Note the small cold-evoked response in neurons unresponsive to TAC. Gray point represents the single YFP(+) neuron that did not respond to cold or TAC. The linear fit to the blue points (red line) yielded a correlation coefficient ( $r^2$ ) of 0.42. **F**, Representative trace of fura-2 ratio fluorescence in a DRG neuron during three consecutive cooling ramps. Note the strong, reversible potentiation of the cold-evoked response in the presence of 10  $\mu$ M TAC. Red numbers indicate the temperature at which the measured signal (F340/F380) deviated by at least 4 times the SD of its baseline (i.e., temperature threshold). **G**, Bar histogram summarizing the effect of 10  $\mu$ M TAC on the amplitude of the cold-evoked response. One-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test. **H**, Time course of fura-2 ratio in a YFP(+), which was not activated in control conditions (i.e., cold insensitive) but was recruited in the presence of 10  $\mu$ M TAC. **I**, Temperature threshold of individual YFP(+) neurons to cold or cold plus 10  $\mu$ M TAC. The mean temperature threshold (red triangles) shifted from  $23.9 \pm 0.9^\circ\text{C}$  in control solution to  $27.8 \pm 0.8^\circ\text{C}$  in the presence of 10  $\mu$ M TAC ( $p < 0.001$ ,  $n = 14$ , paired Student's *t* test). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .





**Figure 8.** TRPM8 antagonists block the excitatory effects of TAC on mice DRG neurons. **A**, Ratiometric  $[Ca^{2+}]_i$  levels in a fura-2 AM-loaded cultured DRG neuron from a *Trpm8*<sup>BAC</sup>-EGFP mouse, showing the response to cold and TAC in control conditions and in the presence of the TRPM8 blocker AMTB (10  $\mu$ M). **B**, A similar protocol in the presence of BCTC (50  $\mu$ M), a different, structurally unrelated, TRPM8 blocker. **C**, Bar histograms summarizing the effects of AMTB ( $n = 16$ ), and (**D**) BCTC ( $n = 15$ ) on cold- and TAC-evoked responses. Statistical differences evaluated with one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

activated by cold (36 of 37), but only 1 in 130 YFP(–) was cold-sensitive, suggesting a very good match between YFP fluorescence and TRPM8 expression (Fig. 7B,C).

Application of 30  $\mu$ M TAC activated the majority of TRPM8-expressing thermoreceptor neurons (31 of 36), identified by the expression of YFP and by their response to a cold temperature ramp (Fig. 7A,C). In the presence of 30  $\mu$ M TAC, the amplitude of cold-evoked responses also increased significantly in YFP(+) neurons (Fig. 7D). TAC and cold produced a similar activation of individual neurons, and the amplitude of both responses was strongly correlated ( $r^2 = 0.42$ ) (Fig. 7E). In contrast, none (0 of 130) of the YFP(–) neurons (i.e., those not expressing TRPM8) were activated by 30  $\mu$ M TAC, although they showed normal responses to 30 mM KCl (data not shown).

We also examined the effects of lower concentration of TAC on DRG neurons. As shown in Figure 7F, at 10  $\mu$ M, the effects of TAC on  $[Ca^{2+}]_i$  levels on a YFP(+) neuron were negligible. However, we found that this concentration of TAC sensitized the response of TRPM8-expressing neurons to cold in a reversible manner. This is a similar effect to that described for other chemical agonists of TRPM8 (McKemy et al., 2002; Voets et al., 2004). On average, the  $[Ca^{2+}]_i$  response to cold increased from  $0.41 \pm 0.07$  during the first cold ramp to  $0.57 \pm 0.06$  during a second cold ramp, in the presence of TAC ( $p < 0.01$ ,  $n = 14$ ) (Fig. 7G). The larger amplitude in the cold-evoked response was accompanied by a shift in the response threshold of individual neurons toward warmer temperatures (Fig. 7F,I). On average, the threshold shifted by  $\sim 4^\circ$ C, from a mean of  $23.8 \pm 0.9^\circ$ C in control to  $27.8 \pm 0.7^\circ$ C in the presence of 10  $\mu$ M TAC ( $p < 0.001$ ,  $n = 14$ ). In addition, one YFP(+) neuron initially insensitive to cold became cold sensitive during the application of this TAC concentration, and this activation was reversible (Fig. 7H).

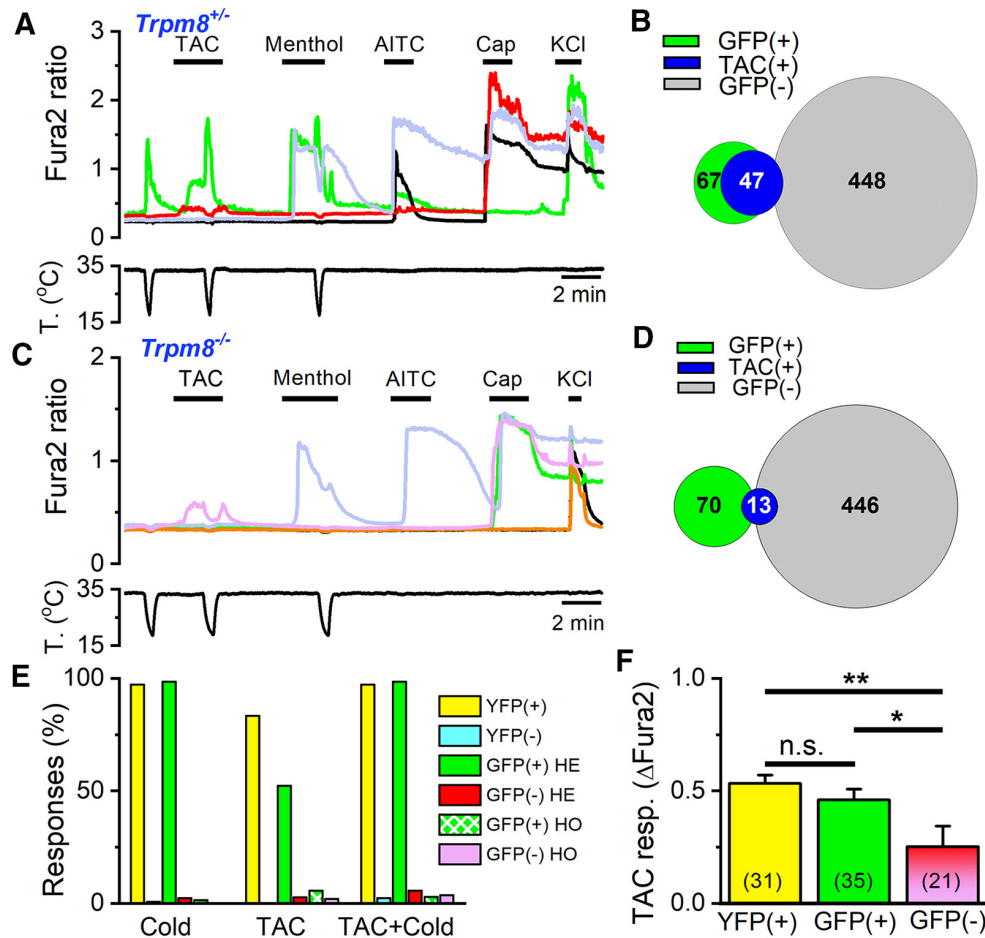
In agreement with the observations obtained in TRPM8-transfected HEK293 cells, cyclosporine (30  $\mu$ M) failed to activate YFP(+) DRG neurons (0 of 37), or sensitize their responses to cold: the increase in cold-evoked fura-2 ratio was  $0.72 \pm 0.13$  in the presence of vehicle ( $n = 16$ ), compared with  $0.63 \pm 0.06$  in the presence of cyclosporine ( $n = 37$ ) ( $p = 0.40$ , unpaired Student's *t* test).

Collectively, these results indicate that TAC excites cold-sensitive neurons that express TRPM8, and potentiates their cold response by shifting the threshold temperature to warmer temperatures.

#### TRPM8 mediates TAC responses in DRG neurons

Next, we explored whether TAC responses in cold-sensitive DRG neurons were mediated by TRPM8 activation. To this end, we combined two experimental strategies: a pharmacological approach using two different TRPM8 blockers and a genetic approximation, characterizing responses in TRPM8 KO mice. If TAC responses were mediated by TRPM8 activation, they should be sensitive to TRPM8 antagonists. As shown in Figure 8A,B, this prediction was fulfilled; the responses to TAC in cold-sensitive DRG neurons were completely blocked by AMTB (10  $\mu$ M) and BCTC (50  $\mu$ M), two structurally unrelated TRPM8 antagonists (Almaraz et al., 2014). A summary of these results is shown in Figures 8C,D. Moreover, the  $[Ca^{2+}]_i$  elevation during cold ramps in the presence of TAC were also greatly reduced by these two antagonists ( $p < 0.001$ ).

To confirm the effects of TAC on native TRPM8 channels, we examined responses to TAC in DRG cultures from a transgenic mouse line in which a farnesylated eGFP is expressed from the *Trpm8* locus (*TRPM8*<sup>EGFPf</sup>) in replacement of TRPM8, allowing the identification of putative TRPM8-expressing neurons



**Figure 9.** TRPM8 is the principal mediator of the excitatory effects of TAC on DRG neurons. **A**, Representative traces of fura-2 ratio fluorescence in a *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> DRG culture. Consecutive applications of cold, TAC (30  $\mu$ M), menthol (100  $\mu$ M), AITC (100  $\mu$ M), capsaicin (100 nM), and high K<sup>+</sup> (30 mM) were used to define the phenotype of each neuron. The GFP(+) neuron (green trace) is activated by cold, TAC, and menthol. A GFP(-) neuron (red trace) is not activated by cold or menthol but shows a small response to TAC; typically, these neurons are activated by capsaicin. **B**, Venn diagram summarizing the responses to TAC in GFP(+) and GFP(-) neurons in *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> mice. **C**, Representative traces of fura-2 ratio fluorescence in cultured DRG neurons from a *Trpm8* KO mouse. Same protocol as in **A**. Note the inhibition of the small TAC response by cooling in a GFP(-) neuron (pink trace). A GFP(+) neuron (green trace) does not respond to cold or menthol but responds to capsaicin. **D**, Venn diagram summarizing the responses to TAC in GFP(+) and GFP(-) neurons in *Trpm8* KO mice. **E**, Summary of responses (in percentage of total neurons) to cold, TAC, and TAC plus cold in *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>, *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup>, and *Trpm8*<sup>EGFP/EGFPf</sup> mice. For each mouse line, neurons have been separated as fluorescent or nonfluorescent. **F**, Mean amplitude of TAC responses in fluorescent (*Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> and *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup>) and nonfluorescent neurons (*Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> and *Trpm8*<sup>EGFP/EGFPf</sup>). Differences in amplitude between fluorescent and nonfluorescent neurons were statistically significant (one-way ANOVA). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

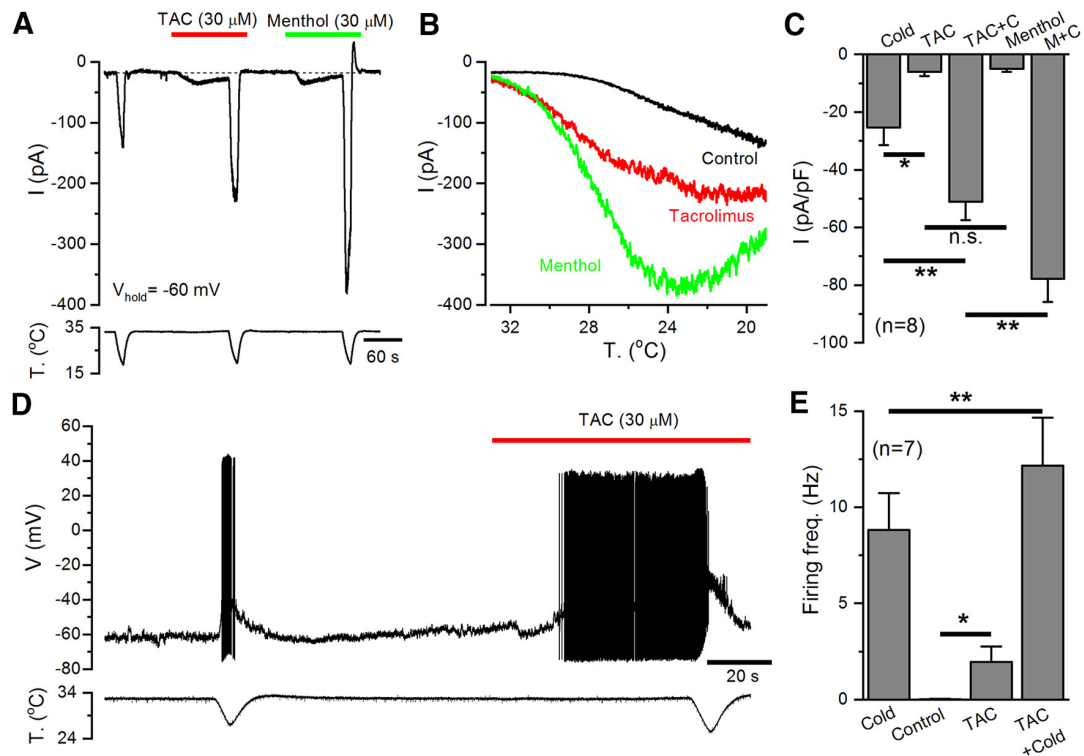
(Dhaka et al., 2007). We compared responses in cultures from *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> mice, which maintain one copy of TRPM8, with those in *Trpm8*<sup>EGFP/EGFPf</sup> animals, thus null for TRPM8.

In *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> DRG cultures, 13% (67 of 515) of the neurons were fluorescent and practically all of them (66 of 67) were activated by cold or menthol, consistent with their expression of TRPM8 (Fig. 9A). Moreover, approximately half of the green fluorescent neurons were activated by TAC (35 of 67). In the presence of TAC, or menthol, cold responses were potentiated (Fig. 9A, green trace), consistent with an effect on TRPM8. The phenotype of GFP(-) neurons was very different: very few (2.4%) were cold-sensitive, and only 2.7% (12 of 448) were activated by TAC (Fig. 9A, red trace), a significantly lower percentage (*p* < 0.001, Z test). A Venn diagram of these results is shown in Figure 9B. In summary, in agreement with the results observed in *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> mice, there is a high correlation between expression of TRPM8 and responses to TAC.

The responses to TAC in *Trpm8*<sup>EGFP/EGFPf</sup> (i.e., *Trpm8* KO) mice were very infrequent, albeit detectable in some neurons

(Fig. 9C, pink trace). In total, only 13 of 516 (2.9%) DRG neurons responded to 30  $\mu$ M TAC in *Trpm8* KO animals (4 were GFP(+) and 9 were GFP(-)). The main reduction occurred in GFP(+) neurons, in parallel with a near suppression of their responses to cold or menthol (Fig. 9C, green trace). As summarized in Figure 9D, of 70 GFP(+) neurons tested, only 4 (5.7%) responded to TAC, a drastic reduction from the responses observed in GFP(+) neurons in *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> mice (*p* < 0.001, Z test). Figure 9E summarizes the responses to TAC and cold in fluorescent and nonfluorescent cells of the two transgenic mouse lines. It is evident that expression of TRPM8 is highly correlated with responses to TAC.

Finally, in GFP(-) neurons of *Trpm8*<sup>EGFP/EGFPf</sup> mice, only 2% (9 of 446) responded to TAC, a very similar percentage to that observed in GFP(-) neurons of *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> mice. The responses to TAC in GFP(-) neurons had some distinct characteristics: because the results were similar in *Trpm8*<sup>EGFP/+</sup> and *Trpm8*<sup>EGFP/EGFPf</sup> animals, we pooled them together. In GFP(-) neurons, the amplitude of TAC responses was smaller (*p* <



**Figure 10.** TAC increases the excitability of cold-sensitive DRG neurons. **A**, Representative whole-cell recording in the voltage-clamp configuration ( $V_{\text{hold}} = -60$  mV) of a TRPM8-expressing, cold-sensitive DRG neuron identified by the expression of YFP. TAC ( $30 \mu\text{M}$ ) evoked an inward current similar in amplitude to that elicited by menthol ( $30 \mu\text{M}$ ). Both TAC and menthol strongly potentiate the response to cold. Bottom, Simultaneous recording of bath temperature during the recording. **B**, Current-temperature relationships for the same neuron in control (black trace) and in the presence of  $30 \mu\text{M}$  TAC (red trace) or  $30 \mu\text{M}$  menthol (green trace). Note the marked shift in temperature threshold. **C**, Bar histogram summarizing the effects of agonists on the amplitude of inward currents during the protocol shown in **A**. The statistical analysis consisted of a one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ). **D**, Representative recording of a cold-sensitive DRG neuron in the whole-cell current-clamp configuration showing responses to cold and to the application of TAC ( $30 \mu\text{M}$ ). TAC evoked AP firing at  $33^\circ\text{C}$  and greatly enhanced the firing frequency during a cold ramp. Bottom, Simultaneous recording of bath temperature. **E**, Bar histogram summarizing the mean responses, measured as average firing frequency, during the different stimuli applied. Firing frequency for cold was averaged from the first to the last spike during the cooling ramp. Firing frequency in control condition was calculated during the minute preceding TAC application (only 3 of 7 neurons fired action potentials in control conditions). TAC-evoked firing was calculated from the first spike during TAC application to the start of the cold ramp. The analysis consisted of a paired *t* test for cold versus TAC plus cold ( $**p = 0.009$ ) and control vs TAC ( $*p = 0.048$ ).

0.001) compared with responses in fluorescent neurons of *Trpm8<sup>EGFP/+</sup>* mice or *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* mice (Fig. 9F), and they were nearly abolished during the cooling ramp (Fig. 9A, C). None of these neurons was cold-sensitive (Fig. 9A, red trace). Interestingly, of the 21 GFP(−) neurons activated by TAC, 18 also responded to capsaicin (100 nM) and 11 responded to AITC (50  $\mu\text{M}$ ). These characteristics are consistent with a possible effect of TAC on TRPV1. However, we note that in these cultures 43.8% (452 of 1031) of the neurons responded to capsaicin, but only 22 of these 452 (4.9%) responded to TAC.

Together, the results obtained with pharmacological blockers and after genetic inactivation of TRPM8 indicate that the main excitatory action of TAC in DRG neurons is mediated by activation of TRPM8 channels in cold-sensitive neurons, with some weaker effects on capsaicin-sensitive neurons, presumably through TRPV1.

#### TAC activates inward currents and elicit AP firing in cold thermoreceptors

The effect of TAC on the excitability of cold thermoreceptors was further evaluated by performing electrophysiological recordings in cultured DRG neurons from *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* mice. As shown in Figure 10A, in whole-cell patch-clamp recordings, TAC ( $30 \mu\text{M}$ ) activated an inward current and potentiated the currents evoked by cold temperature in all the YFP(+) neurons tested.

This potentiation was accompanied by a clear shift in the activation of cold-evoked currents to warmer temperatures (Fig. 10B). In the same neurons, application of menthol ( $30 \mu\text{M}$ ) produced similar effects to TAC, although its potentiating effect on cold-evoked currents was stronger. A summary of these results is shown in Figure 10C.

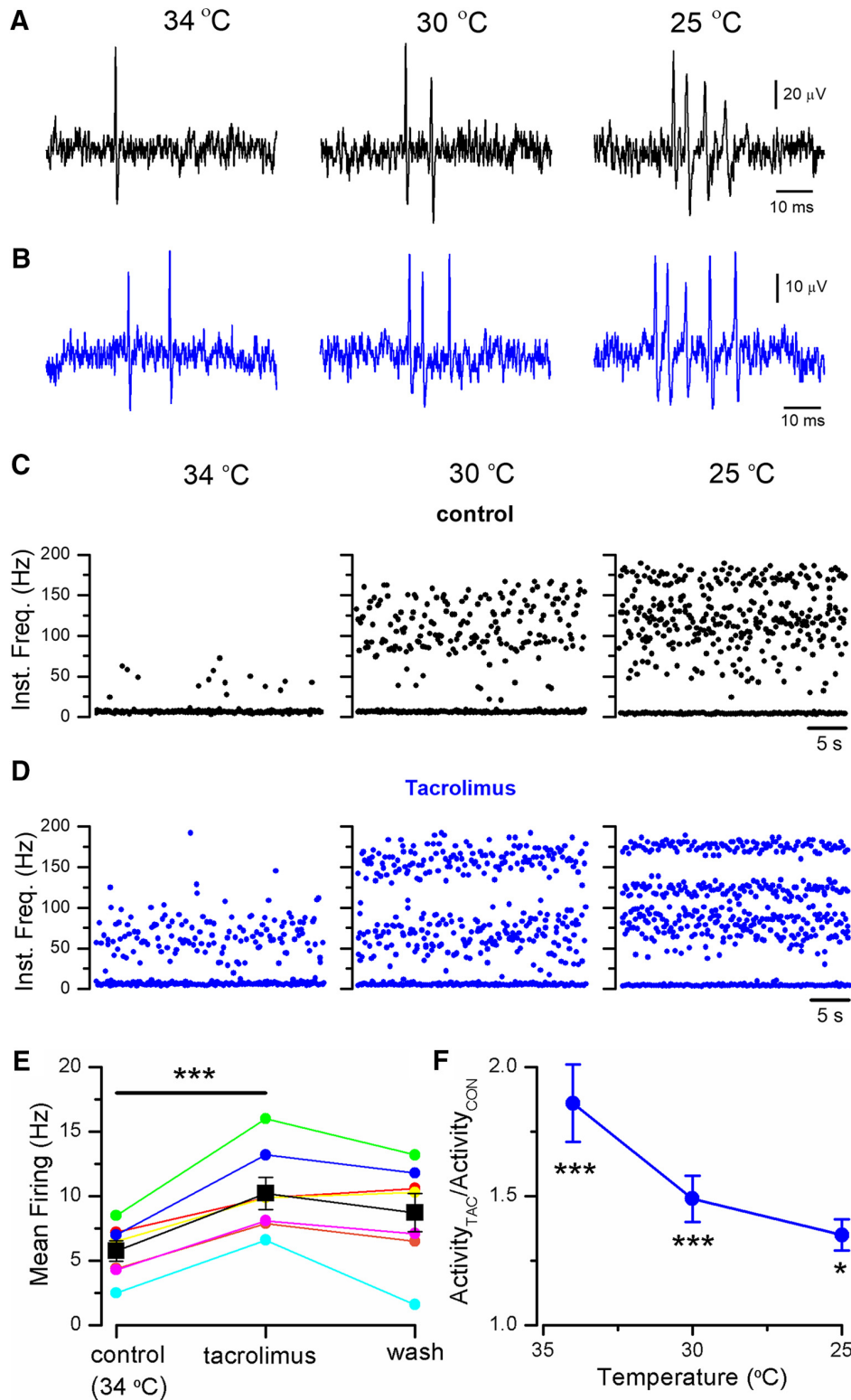
Recordings in the current-clamp configuration of TRPM8-expressing cold thermoreceptors, at a holding temperature of  $33^\circ\text{C}$ , showed that TAC application induced the firing of action potentials and strongly potentiated cold-evoked firing (Fig. 10D). These results are summarized in Figure 10E.

These data confirm that TAC activates a depolarizing inward current similar to the TRPM8-dependent  $I_{\text{Cold}}$  current, increasing the excitability of cold-sensitive neurons.

#### TAC activates cold-sensitive corneal afferents

The corneal surface is densely innervated by cold-sensitive nerve endings that express TRPM8 channels (Parra et al., 2010; Alamri et al., 2018; Alcalde et al., 2018). We used extracellular recordings of these terminals in a mouse *in vitro* preparation to investigate the effects of TAC on sensory nerve endings.

Corneal cold-sensitive nerve endings are characterized by their spontaneous, low-frequency, background activity at  $34^\circ\text{C}$  with a sharp increase in firing rate, often organized in the form of bursts, during cooling (Fig. 11A, C) (Carr et al., 2003; Parra et al.,



**Figure 11.** TAC activates corneal cold thermoreceptor endings. **A**, Representative example of nerve terminal impulses recorded from a mouse corneal ending in control solution, at three different temperatures. **B**, Recordings from the same ending during application of 30  $\mu$ M TAC. **C**, Instantaneous firing frequency from the same ending as in **A** (control solution), and **D**, as in **B** (in TAC). Note the regular firing in bursts during cooling. **E**, Summary of the effects of 30  $\mu$ M TAC on spontaneous firing in 7 individual endings at the basal temperature of 34°C. The increase in firing was statistically significant (\*\* $p < 0.001$ , paired Student's  $t$  test). **F**, Mean firing rate in TAC at three different temperatures in 7 cold thermoreceptor endings. Activity at each temperature has been normalized to the value obtained in control solution. Statistical differences evaluated by one-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni *post hoc* test. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .)

2010; Orío et al., 2012). At a baseline temperature of 34°C, exposure to 30  $\mu$ M TAC produced clear excitatory effects (Fig. 11*B, D*, left), with an increase in the basal firing rate, from  $5.8 \pm 0.8$  Hz in control to  $10.2 \pm 1.6$  Hz in TAC ( $n = 7$ ,  $p < 0.001$ ; paired Student's  $t$  test). The firing rate increases during cooling in the presence of TAC (Fig. 11*B–D*, middle, right). Figure 11*E* shows a summary of the effects of TAC on basal firing rate for individual cold-sensitive endings at 34°C. The excitatory effect of TAC was also evident on the steady-state firing rate at lower temperatures, with an elevation in mean firing frequency and the increase in the number of spikes per burst (Fig. 11*B*). The potentiation of activity mediated by TAC at the different temperatures is shown in Figure 11*F*. The washout of TAC effects was only partial, probably explained by the long application times required to examine the effects of TAC at different temperatures and the lipophilic nature of the compound (Fig. 11*E*).

These results show that the excitatory effects of TAC on cold thermoreceptor activity are maintained at peripheral nerve endings, the physiological site for chemotransduction and thermotransduction in these neurons.

### TAC sensitizes cutaneous cold thermoreceptors

To further characterize the effects of TAC on cold thermoreceptor endings, we used a mouse skin-nerve preparation. We focused our efforts on unimodal cutaneous cold receptors (i.e., cold-activated fibers insensitive to mechanical stimuli) because it is well known that TRPM8 plays an essential role in their cold-evoked activity (Toro et al., 2015; Winter et al., 2017). We identified 9 fibers in the saphenous nerve with the aforesaid characteristics. These fibers were silent at the baseline temperature of 34°C–35°C but were activated when cold solution was delivered to their isolated receptive field (Fig. 12*A, B*), with a mean cold threshold of  $30.4 \pm 1^\circ\text{C}$  ( $n = 9$ ) (Fig. 12*C*). During application of TAC (30  $\mu$ M), none of the fibers presented activity at the basal temperature of 34°C. However, their cold-evoked activity was clearly modified in the presence of TAC (Fig. 12*A, B*). In 6 of these 9 fibers, TAC shifted their cold threshold to warmer temperatures (mean temperature threshold displacement of  $2.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ,  $n = 9$ ) and shifted their stimulus response function to warmer temperatures (Fig. 12*C*). As in the cornea, the washout of TAC effects was only partial (Fig. 12*B, C*). In these endings, menthol (50  $\mu$ M) produced qualitatively similar excitatory effects, although more intense. Thus, menthol produced an increase in spontaneous activity at the basal temperature of 34°C–35°C in 5 of 9 endings tested (Fig. 12*B*). In addition, menthol shifted their temperature threshold, by at least 1°C, to warmer values in all of them ( $n = 9$ ). The mean temperature threshold displacement produced by menthol was  $3.3 \pm 0.7^\circ\text{C}$  (Fig. 12*C*), and their overall firing was more pronounced and shifted to warmer temperatures (Fig. 12*D*). Collectively, these results indicate that TAC sensitizes a population of cutaneous TRPM8-expressing thermoreceptor endings to cold temperature.

### TAC evokes TRPM8-dependent cold hypersensitivity

Agonists of TRPM8 channels can lead to cold-evoked avoidance behaviors (Rossi et al., 2006; Klein et al., 2010). Thus, we examined the possible influence of TAC on cold-evoked behaviors in mice. In adult WT mice, intraplantar injection of 1% TAC decreased the latency of paw withdrawal from a cold plate set at 10°C. The reduction was significant ( $p < 0.01$ , one-way ANOVA) compared with the injection of vehicle or the latency observed in naive paws (Fig. 13*A*, left). Injection of 1% menthol,

the canonical agonist of TRPM8 channels, also caused a significant reduction in withdrawal latency (Fig. 13*A*). To test for the role of TRPM8 in the cold hypersensitivity produced by TAC, we examined the withdrawal latency in *Trpm8* KO mice. As shown in Figure 13*A* (right), in these mice, TAC failed to sensitize their response to cold (one-way ANOVA), and their withdrawal latency was significantly longer compared with results obtained in WT ( $p < 0.01$ , unpaired  $t$  test).

These results confirm the role of TRPM8 channels in the cold hypersensitivity produced by TAC at peripheral nerve endings.

### TAC triggers tearing and blinking

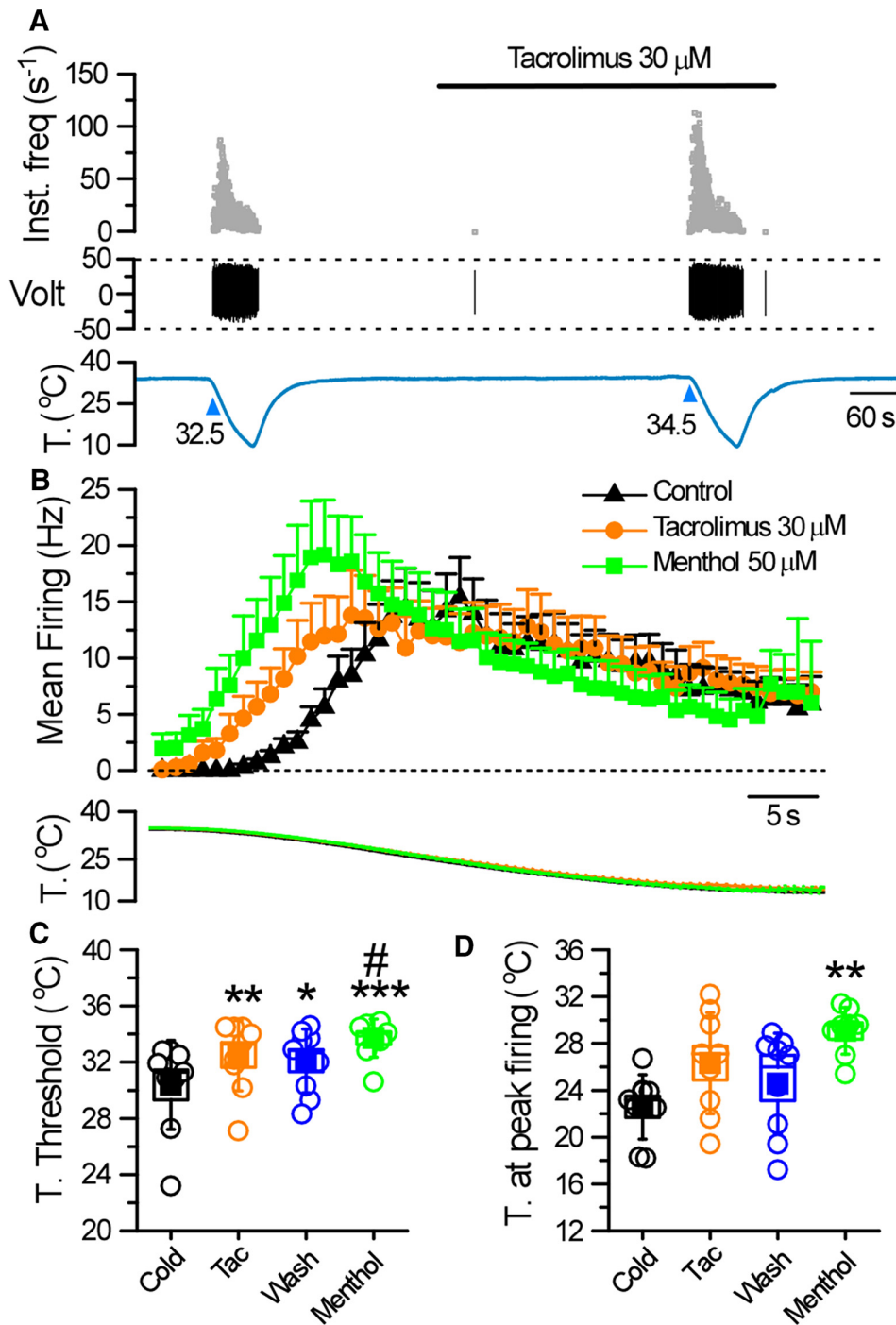
Afferent discharge from different classes of corneal sensory fibers, including cold receptors and polymodal nociceptors, participates in the neural mechanisms of basal and reflex-evoked tearing (Belmonte and Gallar, 2011; Meng and Kurose, 2013). We examined the effect of TAC solutions on tearing in anesthetized WT mice. We applied, sequentially, a small drop of saline, vehicle, or TAC (1%) to both eyes and measured the tearing after a rest period of 5 min. As shown in Figure 13*B*, TAC produced a significant increase in tearing compared with saline ( $p < 0.01$ ) or vehicle ( $p < 0.05$ ; one-way ANOVA). To control for possible sensitization effects produced by repeated applications of solutions to the corneal surface, we designed a control experiment, consisting of 3 consecutive applications of saline, which resulted in very similar mean values of tearing for each of them (Fig. 13*C*).

A previous study identified the critical role of TRPM8 channels in eye blinking in mice following application of hyperosmolar solutions (Quallo et al., 2015). Thus, we decided to investigate the effects of TAC solutions applied to the corneal surface. We counted the number of blinks observed after unilateral application of solutions with 1% TAC to the eyes of WT ( $n = 8$ ) and *Trpm8*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 17$ ). Application of saline (315 mOsm/kg) or vehicle had only a small effect on blinking. In contrast, as shown in Figure 13*D* (left), 1% TAC triggered a large increase in the number of blinks in WT mice. In agreement with previous findings (Quallo et al., 2015), hyperosmotic solutions (785 mOsm/kg) also triggered a marked increase in eye blinking, similar to that observed with TAC.

Repeating the tests in *Trpm8* KO mice confirmed a reduction in blinking, compared with WT ( $p < 0.01$ , unpaired  $t$  test), produced by hyperosmolar solutions reported previously. In contrast, the blinks produced by 1% TAC in *Trpm8* KO mice were very variable, but they were not different from those observed in WT mice (Fig. 13*D*, right). These results suggest that 1% TAC has effects on blinking that are independent of TRPM8 activity.

## Discussion

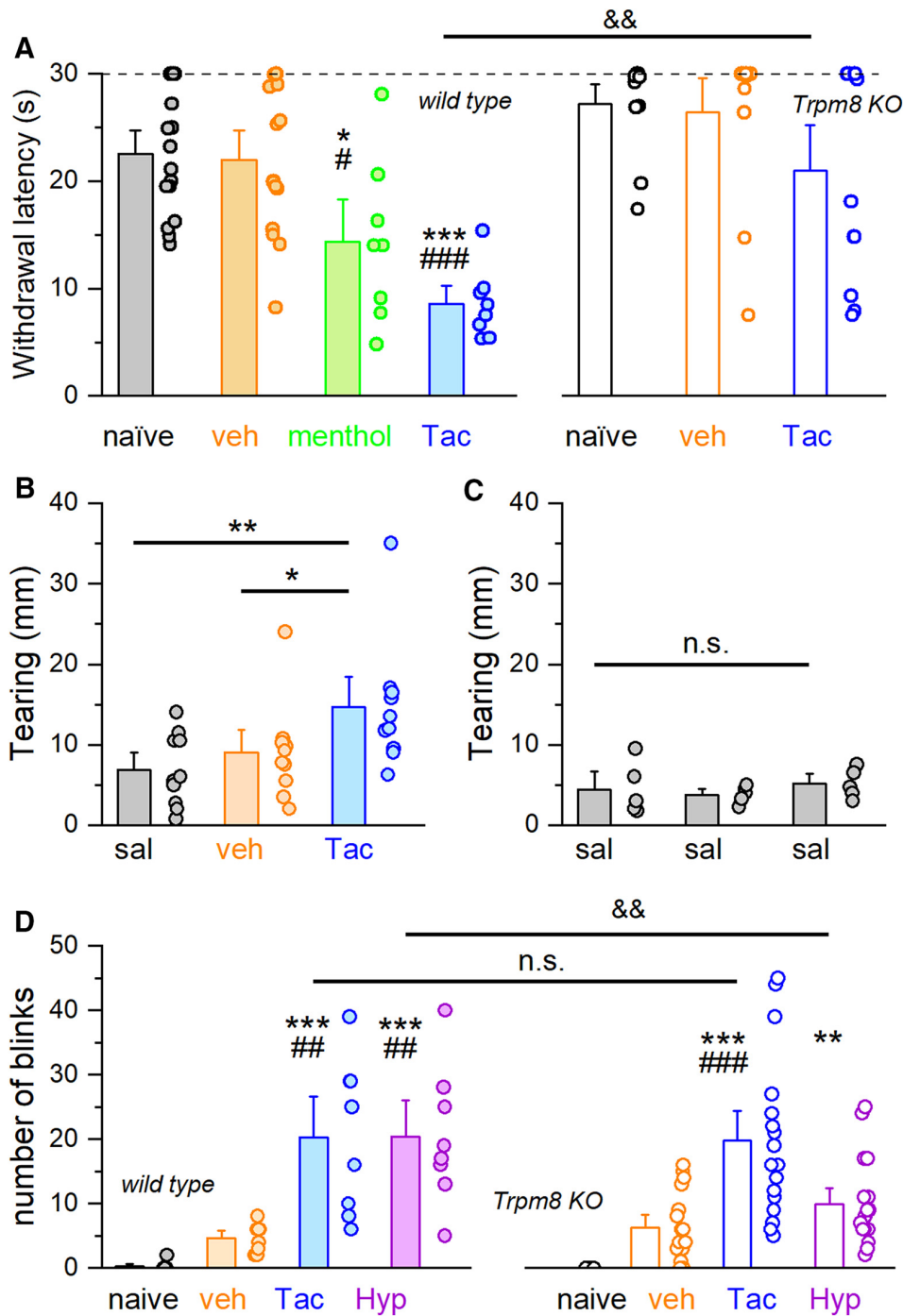
Natural products remain an important source for the development of pharmaceutical drugs (Newman and Cragg, 2016), and have also played a fundamental role in the discovery and characterization of TRP channels (Julius, 2005; Nilius and Appendino, 2011; Meotti et al., 2014). However, despite major drug discovery efforts, the number of chemical agonists reported for TRPM8 channels is still very modest (Bödding et al., 2007; Almaraz et al., 2014; LeGay et al., 2016; Moran and Szallasi, 2018). Moreover, many of these agonists show cross-sensitivity with other TRP channels (Macpherson et al., 2006). We have identified TAC, a clinically relevant macrolide immunosuppressant produced by soil microorganisms, as a novel agonist of TRPM8 channels. These findings highlight a novel neuroimmune interface in peripheral tissues with several potential applications. First, it expands the current arsenal of drugs targeting TRPM8 and provides



**Figure 12.** TAC activates cutaneous cold thermoreceptors. **A**, Representative recording showing the response of a cold fiber to a decrease in the temperature of the isolated receptive field, before and after treatment with 30  $\mu M$  TAC. Top to bottom, Instantaneous firing frequency, the voltage signal, and the temperature of the receptive field. **B**, Histogram showing the averaged cold-evoked response of cold fibers from C57BL/6J mice in control solution (black triangles), in the presence of 30  $\mu M$  TAC (orange circles), and in 50  $\mu M$  menthol (green squares). Average discharge rates are represented in bins of 2 s. Bottom, The temperature ramp for each of the datasets. **C**, Temperature threshold for activation of impulse discharge. **D**, Temperature for reaching the maximal discharge rate. Squares represent mean values. Boxes represent SEM. Error bars indicate standard deviation (SD). In **C** and **D**, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc correction). The asterisks compare significance with respect to cold. The # ( $p < 0.05$ ) compares significance with respect to wash.

new clues about its activation mechanism. Second, the effects of TAC on TRPM8 could be used as an experimental tool to investigate the functional activity of this polymodal ion channel in humans, for example, as a new surrogate model of cold allodynia and hyperalgesia (Andersen et al., 2014).

In contrast to TAC, cyclosporine, a cyclic undecapeptide also targeting calcineurin signaling, had no effect on TRPM8 or cold-evoked responses in DRG neurons. This result excludes this pathway as the one involved in the effects of TAC. Moreover, the activation of reconstituted TRPM8 by TAC in planar lipid bilay-



**Figure 13.** TAC sensitizes cold-evoked responses and triggers eye blinking and tearing. **A**, Withdrawal latencies for hindpaws placed in contact with a cold metal plate set at 10°C. Individual and mean  $\pm$  SEM values in WT (filled bars) mice for different conditions: naive mice, after the injection of vehicle, 1% menthol, and 1% TAC. Right, Open bars represent the same experiment in *Trpm8* KO mice. Differences with respect to naive (\*), to vehicle (#) (one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test). TAC reduces the withdrawal latency in WT mice compared with *Trpm8* KO. && $p < 0.01$  (unpaired Student's *t* test). **B**, Effects of different topical solutions on basal tearing in mice. The left and the right eye received 2  $\mu$ l of saline, vehicle (8% ethanol, 2% Cremophor in saline) or TAC (1%). Tearing was estimated from the length of staining in the threads. The effect of TAC was significant with respect to saline (\*\* $p < 0.01$ ) or vehicle (\* $p < 0.05$ ) ( $n = 10$  mice; one-way ANOVA). **C**, Three consecutive applications of saline were used as a control ( $n = 5$  mice). No increment in tearing was observed in this case (one-way ANOVA). **D**, Effects of different topical solutions (5  $\mu$ l) on eye blinking, monitored over a 2 min period, in WT mice (filled bars;  $n = 8$ ). Compared with saline (\*) and vehicle (#) (see above), 1% TAC and hyperosmotic (785 mOsm/kg) solution increased the number of blinks (\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ). In *Trpm8* KO mice (open bars;  $n = 17$ ), TAC increased the number of blinks with respect to saline (\*\*\* $p < 0.001$ ) or the TAC vehicle (### $p < 0.001$ ), and Hyp increased the blinks with respect to saline (\*\* $p < 0.001$ ) (one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test). The number of blinks to Hyp were significantly reduced in *Trpm8* KO mice compared with WT. && $p < 0.01$  (unpaired Student's *t* test).

ers conclusively demonstrates that the interaction of TAC with the channel is direct and does not require signaling cascades. Similarly to the activation by cold and menthol, the gating of TRPM8 by TAC depended specifically on the presence of PI(4,5)P<sub>2</sub> (Zakharian et al., 2010).

### Biophysical and molecular aspects of TAC agonism on TRPM8

In many aspects, the activation of TRPM8 by TAC resembles the effects of menthol on channel gating: TAC shifts the activation threshold of TRPM8 to higher temperatures and slows the activation kinetics. These characteristics fit with the description of Type I agonists introduced by Janssens et al. (2016), which include menthol, thymol, icilin, and linalool. Interestingly, the effects of TAC persisted in a menthol-insensitive mutant. Our previous characterization of antagonist effects on TRPM8 suggested a sequential model of TRPM8 gating where chemical modulators can favor (e.g., menthol) or hinder (e.g., BCTC or SKF96365) the energetics of subsequent channel opening by cold temperature or voltage from different binding sites (Mälkiä et al., 2009). This model is consistent with the actions of TAC, having an excitatory action on the menthol-insensitive Y745H mutant, but failing to facilitate the gating by cold temperature, suggesting that the actions of different chemical agonists converge from independent binding sites.

The identification of the residues critical for TAC effects should be addressed in the future; we excluded its interaction with the icilin and menthol binding sites. The recent cryostructure of the TRPM8 tetramer could facilitate their identification (Yin et al., 2018).

### Specificity of TAC effects

Based on the pharmacological characterization in WT, hemizygous, and *Trpm8* null mice, we conclude that the effects of TAC on TRPM8-expressing sensory neurons is highly selective. However, this specificity is not absolute. In cultured neurons of *Trpm8* KO mice, a small effect of TAC remains that is likely mediated by TRPV1. A previous study found that TAC activated a small percentage (3.1%) of rat DRG neurons, and many of these neurons were also activated by capsaicin (Senba et al., 2004). As in our case, and consistent with a weak effect, the percentage of capsaicin-positive neurons was much higher than those responding to TAC. Surprisingly, we did not observe any effects of TAC on recombinant TRPV1 channels. In contrast, TAC also activated TRPA1 expressed heterologously, albeit less affectively than TRPM8.

The behavioral results indicate that the cold hypersensitivity produced by TAC is clearly mediated by TRPM8. The stronger effects of TAC compared with menthol, opposite to the effects observed *in vitro*, may be explained by its actions on other ion channels (Swandulla et al., 1987). Moreover, it is well known that high concentrations of topical menthol, as used here, are analgesic (Liu et al., 2013). A reported side effect of TAC treatment is the experience of chills. They could be caused by activation of TRPM8 because it is an effect observed with other TRPM8 agonists (e.g., icilin), and linked to the role of the channel in thermoregulation (Knowlton et al., 2011; Pogorzala et al., 2013; Reimúndez et al., 2018).

Topical applications of 1% TAC solutions also increased basal tearing and triggered eye blinking. However, in this last case, the effects were not reduced in TRPM8 KO mice. This result suggests that this solution has irritant effects that are independent of TRPM8 activation. Because topical TAC formulations have

much higher concentrations of the drug than we could test in solution *in vitro*, it could lead to activation of other nociceptive TRP channels, explaining the transient burning sensation reported upon topical application of TAC to the eye (Fukushima et al., 2014; Abud et al., 2016) and the skin. These irritant actions are the most common side effect associated with topical application of TAC. Consistent with a possible activation of TRPA1, in a murine model of chronic contact hypersensitivity, TAC increased the number of scratch bouts, and these were significantly reduced by topical application of a TRPA1 antagonist (Wong et al., 2018). Alternatively, because a subpopulation of TRPM8-expressing primary sensory neurons have a nociceptive phenotype (Xing et al., 2006; Alcalde et al., 2018), and many also express TRPV1, their activation may contribute to the transient discomfort produced by TAC.

### Therapeutic implications

TRPM8 plays a multifaceted role in cold-related pain. On one hand, it appears to participate in the mechanisms of cold hyperalgesia and allodynia (Knowlton et al., 2013). At the same time, it is the principal mechanism of menthol-induced analgesia (Liu et al., 2013), and also plays a significant role in cooling-mediated analgesia (Proudfoot et al., 2006; Knowlton et al., 2013). Activation of TRPM8 sensory pathways also relieves the sensation of itch (Palkar et al., 2018). Moreover, TRPM8 activation has a potent anti-inflammatory role in the gut (Ramachandran et al., 2013). Therefore, TRPM8 modulators (agonists and antagonists) may offer multiple possibilities in the relief of pain and visceral inflammation (Pérez de Vega et al., 2016; Moran and Szallasi, 2018).

Because activation of TRPM8 regulates basal tearing and blinking (Parra et al., 2010; Quallo et al., 2015), it has been proposed as a possible therapy for DED (Parra et al., 2010; Belmonte and Gallar, 2011). In addition to its use as a systemic immunosuppressant in the prevention of organ rejection, TAC is also used topically in the treatment of DED symptoms (Jones et al., 2017). In clinical ophthalmology, TAC has been used in solutions at concentrations up to 0.1%. This is equivalent to 1.2 mM, suggesting that it should readily activate TRPM8 channels at corneal endings. We observed a clear effect of 1% TAC solutions on basal tearing and eye blinking, suggesting that some of the beneficial effects reported for TAC in dry-eye conditions (Abud et al., 2016) may involve activation of TRPM8 channels in trigeminal cold thermoreceptor endings. However, the fact that blinking was not reduced in TRPM8 null mice clearly indicates that other mechanisms are involved at this concentration and with this particular formulation. The activation of TRPA1, and possibly TRPV1, at these high concentrations of TAC could also explain the burning sensation reported by some patients.

We also show that TAC activates cutaneous cold thermoreceptor endings and sensitizes responses to cold temperature. The apparent potency was lower than for corneal endings. This, however, may reflect a poor accessibility of the drug in the *in vitro* preparation we used, which lacks vascularization and requires application of substances through the corium. Whether activation of TRPM8 by TAC is relevant for the treatment of atopic dermatitis is currently unclear. Nevertheless, it is becoming well established that electrical activity in peripheral sensory endings can have potent immunomodulatory effects (Chavan et al., 2017), suggesting that modulation of TRPM8 channels by TAC may play a role in its anti-inflammatory actions. At this point, this is just a hypothesis but with important implications.



In conclusion, we report the activation of cold-activated TRPM8 channels by the natural immunosuppressant TAC. The speed of the effect and the action on reconstituted channels make it incompatible with transcriptional actions. Biophysically, the effects of TAC on TRPM8 gating resemble those of menthol, although mutagenesis studies suggest an independent binding site.

## References

- Abud TB, Amparo F, Saboo US, Di Zazzo A, Dohlman TH, Ciolino JB, Hamrah P, Dana R (2016) A clinical trial comparing the safety and efficacy of topical tacrolimus versus methylprednisolone in ocular graft-versus-host disease. *Ophthalmology* 123:1449–1457. [CrossRef Medline](#)
- Alamri AS, Wood RJ, Ivanusic JJ, Brock JA (2018) The neurochemistry and morphology of functionally identified corneal polymodal nociceptors and cold thermoreceptors. *PLoS One* 13:e0195108. [CrossRef Medline](#)
- Alcalde I, Íñigo-Portugués A, González-González O, Almaraz L, Arttime E, Morenilla-Palao C, Gallar J, Viana F, Merayo-Llves J, Belmonte C (2018) Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice. *J Comp Neurol* 526:1859–1874. [CrossRef Medline](#)
- Almaraz L, Manenschijn JA, de la Peña E, Viana F (2014) Trpm8. *Handb Exp Pharmacol* 222:547–579. [CrossRef Medline](#)
- Andersen HH, Olsen RV, Møller HG, Eskelund PW, Gazerani P, Arendt-Nielsen L (2014) A review of topical high-concentration L-menthol as a translational model of cold allodynia and hyperalgesia. *Eur J Pain* 18:315–325. [CrossRef Medline](#)
- Andrews MD, Af Forselles K, Beaumont K, Galan SR, Glossop PA, Grenie M, Jessiman A, Kenyon AS, Lunn G, Maw G, Owen RM, Pryde DC, Roberts D, Tran TD (2015) Discovery of a selective TRPM8 antagonist with clinical efficacy in cold-related pain. *ACS Med Chem Lett* 6:419–424. [CrossRef Medline](#)
- Asuthkar S, Demirkhanyan L, Sun X, Elustondo PA, Krishnan V, Baskaran P, Velpula KK, Thyagarajan B, Pavlov EV, Zakharian E (2015) The TRPM8 protein is a testosterone receptor: II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. *J Biol Chem* 290:2670–2688. [CrossRef Medline](#)
- Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, Hwang SW, Patapoutian A (2006) High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* 9:493–500. [CrossRef Medline](#)
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–208. [CrossRef Medline](#)
- Beck LA (2005) The efficacy and safety of tacrolimus ointment: a clinical review. *J Am Acad Dermatol* 53:S165–S170. [CrossRef Medline](#)
- Belmonte C, Gallar J (2011) Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:3888–3892. [CrossRef Medline](#)
- Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, Dartt DA, Galor A, Hamrah P, Ivanusic JJ, Jacobs DS, McNamara NA, Rosenblatt MI, Stapleton F, Wolffsohn JS (2017) TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf* 15:404–437. [CrossRef Medline](#)
- Bidaux G, Borowiec AS, Gordienko D, Beck B, Shapovalov GG, Lemonnier L, Flourakis M, Vandenberghe M, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, Desruelles E, Ritaine A, Polakowska R, Lesage J, Chami M, Skryma R, Prevarskaya N (2015) Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a cold-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E3345–E3354. [CrossRef Medline](#)
- Bödding M, Wissenbach U, Flockerzi V (2007) Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell Calcium* 42:618–628. [CrossRef Medline](#)
- Brauchi S, Orio P, Latorre R (2004) Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15494–15499. [CrossRef Medline](#)
- Carr RW, Pianova S, Fernandez J, Fallon JB, Belmonte C, Brock JA (2003) Effects of heating and cooling on nerve terminal impulses recorded from cold-sensitive receptors in the guinea-pig cornea. *J Gen Physiol* 121:427–439. [CrossRef Medline](#)
- Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ (2017) Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity* 46:927–942. [CrossRef Medline](#)
- Chuang HH, Neuhauser WM, Julius D (2004) The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* 43:859–869. [CrossRef Medline](#)
- Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A (2006) Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29:135–161. [CrossRef Medline](#)
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A (2007) TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54:371–378. [CrossRef Medline](#)
- Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A (2008) Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci* 28:566–575. [CrossRef Medline](#)
- Fukushima A, Ohashi Y, Ebihara N, Uchio E, Okamoto S, Kumagai N, Shoji J, Takamura E, Nakagawa Y, Namba K, Fujishima H, Miyazaki D (2014) Therapeutic effects of 0.1% tacrolimus eye drops for refractory allergic ocular diseases with proliferative lesion or corneal involvement. *Br J Ophthalmol* 98:1023–1027. [CrossRef Medline](#)
- González-González O, Béch F, Gallar J, Merayo-Llves J, Belmonte C (2017) Functional Properties of Sensory Nerve Terminals of the Mouse Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58:404–415. [CrossRef](#)
- Janssens A, Gees M, Toth BI, Ghosh D, Mulier M, Vennekens R, Vriens J, Talavera K, Voets T (2016) Definition of two agonist types at the mammalian cold-activated channel TRPM8. *Elife* 5:e17240. [CrossRef Medline](#)
- Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-Del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, Dong PN, Geerling G, Hida RY, Liu Y, Seo KY, Tauber J, Wakamatsu TH, Xu J, Wolffsohn JS, Craig JP (2017) TFOS DEWS II management and therapy report. *Ocul Surf* 15:575–628. [CrossRef Medline](#)
- Julius D (2005) From peppers to peppermints: natural products as probes of the pain pathway. *Harvey Lect* 101:89–115. [Medline](#)
- Klein AH, Sawyer CM, Carstens MI, Tsagareli MG, Tsiklauri N, Carstens E (2010) Topical application of L-menthol induces heat analgesia, mechanical allodynia, and a biphasic effect on cold sensitivity in rats. *Behav Brain Res* 212:179–186. [CrossRef Medline](#)
- Knowlton WM, Daniels RL, Palkar R, McCoy DD, McKemy DD (2011) Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice. *PLoS One* 6:e25894. [CrossRef Medline](#)
- Knowlton WM, Palkar R, Lippoldt EK, McCoy DD, Baluch F, Chen J, McKemy DD (2013) A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J Neurosci* 33:2837–2848. [CrossRef Medline](#)
- LeGay CM, Gorobets E, Iftinca M, Ramachandran R, Altier C, Derksen DJ (2016) Natural-product-derived transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel modulators. *Org Lett* 18:2746–2749. [CrossRef Medline](#)
- Liu B, Qin F (2005) Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25:1674–1681. [CrossRef Medline](#)
- Liu B, Fan L, Balakrishna S, Sui A, Morris JB, Jordt SE (2013) TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. *Pain* 154:2169–2177. [CrossRef Medline](#)
- Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM (2006) More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 32:335–343. [CrossRef Medline](#)
- Mätkiä A, Madrid R, Meseguer V, de la Peña E, Valero M, Belmonte C, Viana F (2007) Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *J Physiol* 581:155–174. [CrossRef Medline](#)
- Mätkiä A, Pertusa M, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A, Viana F (2009) Differential role of the menthol-binding residue Y745 in the antagonism of thermally gated TRPM8 channels. *Mol Pain* 5:62. [CrossRef Medline](#)
- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52–58. [CrossRef Medline](#)
- Menéndez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A (2002) Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J Neurosci Methods* 113:91–97. [CrossRef Medline](#)
- Meng ID, Kurose M (2013) The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. *Exp Eye Res* 117:79–87. [CrossRef Medline](#)

- Meotti FC, Lemos de Andrade E, Calixto JB (2014) TRP modulation by natural compounds. *Handb Exp Pharmacol* 223:1177–1238. [CrossRef Medline](#)
- Moran MM, Szallasi A (2018) Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *Br J Pharmacol* 175:2185–2203. [CrossRef Medline](#)
- Morenilla-Palao C, Luis E, Fernández-Peña C, Quintero E, Weaver JL, Bayliss DA, Viana F (2014) Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Rep* 8:1571–1582. [CrossRef Medline](#)
- Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79:629–661. [CrossRef Medline](#)
- Nilius B, Appendino G (2011) Tasty and healthy TR(i)Ps: the human quest for culinary pungency. *EMBO Rep* 12:1094–1101. [CrossRef Medline](#)
- 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. *J Neurophysiol* 108:3009–3023. [CrossRef Medline](#)
- Palkar R, Ongun S, Catich E, Li N, Borad N, Sarkisian A, McKemy DD (2018) Cooling relief of acute and chronic itch requires TRPM8 channels and neurons. *J Invest Dermatol* 138:1391–1399. [CrossRef Medline](#)
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C (2010) Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 16:1396–1399. [CrossRef Medline](#)
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705–715. [CrossRef Medline](#)
- Pereira U, Boulais N, Lebonvallet N, Pennec JP, Dorange G, Misery L (2010) Mechanisms of the sensory effects of tacrolimus on the skin. *Br J Dermatol* 163:70–77. [CrossRef Medline](#)
- Pérez de Vega MJ, Gómez-Monterrey I, Ferrer-Montiel A, González-Muñiz R (2016) Transient receptor potential melastatin 8 channel (TRPM8) modulation: cool entryway for treating pain and cancer. *J Med Chem* 59:10006–10029. [CrossRef Medline](#)
- Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA (2013) The cellular code for mammalian thermosensation. *J Neurosci* 33:5533–5541. [CrossRef Medline](#)
- Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, Rosie R, Anderson H, Robertson DC, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R (2006) Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr Biol* 16:1591–1605. [CrossRef Medline](#)
- Quallo T, Vastani N, Horridge E, Gentry C, Parra A, Moss S, Viana F, Belmonte C, Andersson DA, Bevan S (2015) TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat Commun* 6:7150. [CrossRef Medline](#)
- Ramachandran R, Hyun E, Zhao L, Lapointe TK, Chapman K, Hirota CL, Ghosh S, McKemy DD, Vergnolle N, Beck PL, Altier C, Hollenberg MD (2013) TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:7476–7481. [CrossRef Medline](#)
- Reid G, Amuzescu B, Zech E, Flonta ML (2001) A system for applying rapid warming or cooling stimuli to cells during patch clamp recording or ion imaging. *J Neurosci Methods* 111:1–8. [CrossRef Medline](#)
- Reimúndez A, Fernández-Peña C, García G, Fernández R, Ordás P, Gallego R, Pardo-Vazquez JL, Arce V, Viana F, Señaris R (2018) Deletion of the cold thermoreceptor TRPM8 increases heat loss and food intake leading to reduced body temperature and obesity in mice. *J Neurosci* 38:3643–3656. [CrossRef Medline](#)
- Robbins A, Kurose M, Winterson BJ, Meng ID (2012) Menthol activation of corneal cool cells induces TRPM8-mediated lacrimation but not nociceptive responses in rodents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:7034–7042. [CrossRef Medline](#)
- Rohács T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE (2005) PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8:626–634. [CrossRef Medline](#)
- Rossi HL, Vierck CJ Jr, Caudle RM, Neubert JK (2006) Characterization of cold sensitivity and thermal preference using an operant orofacial assay. *Mol Pain* 2:37. [CrossRef Medline](#)
- Roza C, Belmonte C, Viana F (2006) Cold sensitivity in axotomized fibers of experimental neuromas in mice. *Pain* 120:24–35. [CrossRef Medline](#)
- Rusnak F, Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483–1521. [CrossRef Medline](#)
- Senba E, Katanosaka K, Yajima H, Mizumura K (2004) The immunosuppressant FK506 activates capsaicin- and bradykinin-sensitive DRG neurons and cutaneous C-fibers. *Neurosci Res* 50:257–262. [CrossRef Medline](#)
- Ständer S, Augustin M, Roggenkamp D, Blome C, Heitkemper T, Worthmann AC, Neufang G (2017) Novel TRPM8 agonist cooling compound against chronic itch: results from a randomized, double-blind, controlled, pilot study in dry skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31:1064–1068. [CrossRef Medline](#)
- Stull C, Lavery MJ, Yosipovitch G (2016) Advances in therapeutic strategies for the treatment of pruritus. *Expert Opin Pharmacother* 17:671–687. [CrossRef Medline](#)
- Swandulla D, Carbone E, Schäfer K, Lux HD (1987) Effect of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates. *Pflügers Arch* 409:52–59. [CrossRef Medline](#)
- Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD (2007) Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J Neurosci* 27:14147–14157. [CrossRef Medline](#)
- Toro CA, Eger S, Veliz L, Sotelo-Hitschfeld P, Cabezas D, Castro MA, Zimmermann K, Brauchi S (2015) Agonist-dependent modulation of cell surface expression of the cold receptor TRPM8. *J Neurosci* 35:571–582. [CrossRef Medline](#)
- 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* 430:748–754. [CrossRef Medline](#)
- Wan XC, Dimov V (2014) Pharmacokinetic evaluation of topical calcineurin inhibitors for treatment of allergic conjunctivitis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10:543–549. [CrossRef Medline](#)
- Winter Z, Gruschwitz P, Eger S, Touska F, Zimmermann K (2017) Cold temperature encoding by cutaneous TRPA1 and TRPM8-carrying fibers in the mouse. *Front Mol Neurosci* 10:209. [CrossRef Medline](#)
- Wong LS, Otsuka A, Yamamoto Y, Nonomura Y, Nakashima C, Kitayama N, Usui K, Honda T, Kabashima K (2018) TRPA1 channel participates in tacrolimus-induced pruritus in a chronic contact hypersensitivity murine model. *J Dermatol Sci* 89:207–209. [CrossRef Medline](#)
- Xing H, Ling J, Chen M, Gu JG (2006) Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *J Neurophysiol* 95:1221–1230. [CrossRef Medline](#)
- Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC, Lee SY (2018) Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science* 359:237–241. [CrossRef Medline](#)
- Zakharian E, Cao C, Rohács T (2010) Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. *J Neurosci* 30:12526–12534. [CrossRef Medline](#)
- Zimmermann K, Hein A, Hager U, Kaczmarek JS, Turnquist BP, Clapham DE, Reeh PW (2009) Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat Protoc* 4:174–196. [CrossRef Medline](#)