



Programa de Doctorado en Neurociencias  
Instituto de Neurociencias

## Identificación molecular y morfodinámica de las fibras sensoriales de frío corneales en el ratón adulto

Tesis doctoral presentada por:  
**Almudena Íñigo Portugués**

Dirección de tesis:  
**Dra. Juana Gallar Martínez**  
**Dr. Carlos Belmonte Martínez**

Codirección de tesis:  
**Dr. Víctor Manuel Meseguer Viguera**

Universidad Miguel Hernández de Elche

-2022-





San Juan de Alicante, 20 de septiembre de 2022

La presente tesis doctoral se presenta bajo la modalidad de tesis convencional, aportando como indicio de calidad el artículo: Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice. Alcalde I,\* Íñigo-Portugués A,\* González-González O,\* Almaraz L, Artime E, Morenilla-Palao C, Gallar J, Viana F, Merayo-Llodes J, Belmonte C. *J Comp Neurol.* 2018;526(11):1859-1874. DOI:10.1002/cne.24454.



La Dra. Dña. Juana Gallar Martínez y el Dr. D. Carlos Belmonte Martínez, directores de la presente tesis doctoral, y el Dr. D. Víctor Manuel Meseguer Vigueras, codirector,

INFORMAN:

Que Dña. Almudena Íñigo Portugués ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “Identificación molecular y morfodinámica de las fibras sensoriales de frío corneales en el ratón adulto” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos en San Juan de Alicante, a los efectos oportunos, en la fecha abajo indicada.

Directora de la tesis	Director de la tesis	Codirector de la tesis
Dra. Dña. Juana Gallar	Dr. D. Carlos Belmonte	Dr. D. Víctor M. Meseguer

Dña. Elvira María de la Peña García, Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

INFORMA:

Que Dña. Almudena Íñigo Portugués ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “Identificación molecular y morfodinámica de las fibras sensoriales de frío corneales en el ratón adulto” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante, en septiembre de 2022.

Dra. Dña. Elvira María de la Peña García  
Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias



Para la realización de la presente tesis doctoral, Dña. Almudena Íñigo Portugués ha disfrutado de un contrato competitivo para la formación de doctores, con referencia: PRE2018-08398 y asociado al proyecto SAF2017-83674-C2-1-R, ambos financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación (DOI:MCIN/AEI/10.13039/50110001103)/FEDER “Una manera de hacer Europa”.

Asimismo, Dña. Almudena Íñigo Portugués ha realizado durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, una estancia internacional de tres meses financiada por una ayuda adicional concedida por MCIN/AEI.



# Índice

---

<b>Listado de abreviaturas .....</b>	<b>11</b>
<b>Listado de figuras .....</b>	<b>13</b>
<b>Listado de tablas.....</b>	<b>16</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>17</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>20</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>23</b>
1.1. La córnea.....	24
1.1.1. Morfología corneal.....	24
1.1.1.1. Epitelio corneal.....	25
1.1.1.2. Capa de Bowman.....	28
1.1.1.3. Estroma corneal.....	29
1.1.1.4. Membrana de Descemet.....	29
1.1.1.5. Endotelio corneal.....	30
1.1.2. Inervación corneal.....	30
1.1.2.1. Inervación autónoma.....	32
1.1.2.2. Inervación sensorial.....	32
1.1.2.2.1. Características moleculares y electrofisiológicas de las neuronas sensoriales corneales del ganglio trigémino.....	33
1.1.2.2.2. Arquitectura de la inervación sensorial de la córnea.....	34
1.1.2.2.2.1. Plexo estromal.....	35
1.1.2.2.2.2. Plexo subepitelial.....	36
1.1.2.2.2.3. Plexo subbasal.....	36
1.1.2.2.2.4. Terminaciones intraepiteliales.....	40
1.1.2.2.3. Características funcionales y moleculares de la inervación sensorial.....	42
1.1.2.2.3.1. Nociceptores polimodales.....	42
1.1.2.2.3.2. Nociceptores mecánicos.....	45
1.1.2.2.3.3. Termorreceptores de frío.....	45
1.2. Remodelación espontánea de la inervación sensorial corneal.....	48
1.3. Degeneración y regeneración de axones periféricos tras su lesión.....	50
1.3.1. Modelos experimentales de degeneración y regeneración de los axones periféricos.....	53
1.3.2. Papel de la proteína SARM1 en la degeneración y regeneración de los axones periféricos tras su lesión.....	56

<b>2. Objetivos</b> .....	<b>58</b>
2.1. Objetivo general.....	59
2.2. Objetivos específicos.....	59
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	<b>61</b>
3.1. Animales de experimentación .....	62
3.1.1. Líneas de ratones modificados genéticamente .....	62
3.1.1.1. Ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	62
3.1.1.2. Ratones <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	63
3.1.1.3. Ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> .....	64
3.1.1.4. Ratones <i>Piezo2-GFP-IRES-cre</i> .....	65
3.1.1.5. Ratones <i>Trpv1-EGFP</i> .....	66
3.2. Técnicas de inmunofluorescencia en tejido fijado.....	67
3.2.1. Inmunofluorescencia en secciones transversales del ganglio trigémino. ....	67
3.2.2. Inmunofluorescencia de la inervación corneal en preparaciones de córnea entera.....	69
3.2.3. Técnica ABC-peroxidasa en preparaciones de córnea entera. ....	71
3.2.4. Adquisición de imágenes.....	72
3.2.5. Procesamiento de imágenes.....	74
3.3. Microscopía de barrido confocal <i>in vivo</i> de las fibras nerviosas corneales.....	74
3.3.1. Procedimiento experimental. ....	74
3.3.2. Adquisición de imágenes.....	76
3.3.3. Monitorización de la remodelación espontánea de fibras nerviosas corneales individuales en ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	77
3.3.3.1. Procesamiento de las imágenes de fibras nerviosas corneales individuales. ....	78
3.3.4. Monitorización de la degeneración y regeneración de fibras nerviosas corneales tras su lesión en ratones adultos <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> .....	80
3.3.4.1. Modelo de incisión quirúrgica en la córnea.....	80
3.3.4.1.1. Procesamiento de las imágenes adquiridas de la reinervación corneal tras una incisión quirúrgica de la córnea.....	81
3.3.4.2. Axotomía de fibras nerviosas corneales individuales de ratón mediante fotocoagulación con un láser de femtosegundo.....	82
3.3.4.2.1. Procesamiento de las imágenes adquiridas tras la axotomía por fotocoagulación de fibras subbasales individuales.....	85
3.4. Análisis morfométrico.....	86

3.4.1. Análisis morfométrico de las neuronas trigeminales y sus proyecciones corneales en tejido fijado.....	86
3.4.1.1. Cuantificación inmunocitoquímica de las neuronas trigeminales de frío en ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	86
3.4.1.2. Cuantificación de los puntos de penetración de las fibras subepiteliales en el epitelio en preparaciones de córnea aplanada de los ratones <i>Trpv1-GFP</i> .....	86
3.4.1.3. Cuantificación de los parámetros morfométricos analizados en la inervación corneal de los ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	87
3.4.1.3.1. Cuantificación de los puntos de penetración.....	87
3.4.1.3.2. Número de fibras por punto de penetración.....	87
3.4.1.3.3. Densidad de fibras subbasales y terminaciones nerviosas.....	87
3.4.1.3.4. Tipos morfológicos de terminaciones nerviosas.....	89
3.4.2. Análisis morfométrico dinámico de la remodelación espontánea y de la regeneración tras lesión en la inervación corneal de los ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> , <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> y <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> .....	89
3.4.2.1. Longitud de la FSB individual y de sus TN.....	90
3.4.2.2. Volumen que ocupa la FSB individual y sus TN en el epitelio corneal.....	90
3.4.2.3. Dimensión fractal de la FSB individual y de sus TN.....	91
3.4.2.4. Cálculo de la variabilidad diaria de los parámetros morfológicos durante la remodelación espontánea.....	92
3.4.2.5. Cuantificación de la reinervación tras realizar una incisión quirúrgica de la córnea.....	94
3.4.2.6. Análisis del daño tisular generado por el láser de femtosegundo en el epitelio corneal en ratones adultos <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	94
3.4.2.7. Análisis morfométrico dinámico de la regeneración de FSB corneales individuales tras su axotomía por fotocoagulación en ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> .....	94
3.4.3. Análisis morfométrico dinámico de la degeneración de fibras subbasales corneales individuales tras su axotomía por fotocoagulación en ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> .....	95
3.5. Análisis estadístico.....	95
3.6. Imágenes, gráficas y figuras.....	97
<b>4. Resultados.....</b>	<b>98</b>
4.1. Caracterización inmunocitoquímica de las neuronas sensoriales TRPM8-EYFP <sup>+</sup> del ganglio trigémino del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	99

4.2. Identificación molecular de los canales iónicos presentes en las fibras sensoriales que inervan la córnea del ratón.....	102
4.2.1. Identificación molecular de los canales iónicos Piezo2 y TRPV1.....	102
4.2.2. Identificación molecular del canal iónico Nav1.8. ....	106
4.2.3. Identificación molecular de los canales iónicos P2X2 y P2X3. ....	107
4.3. Análisis morfométrico de las fibras sensoriales de frío en la córnea del ratón. ....	109
4.3.1. Ratones control <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> . ....	109
4.3.2. Ratones <i>knockout</i> para TRPM8. ....	113
4.4. Monitorización <i>in vivo</i> de fibras individuales en la córnea de ratones adultos. ....	116
4.4.1. Análisis morfométrico dinámico de fibras corneales individuales TRPM8-EYFP en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> . ....	117
4.4.2. Análisis morfométrico dinámico de fibras individuales GFP <sup>+</sup> en la córnea del ratón <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> . ....	124
4.5. Monitorización <i>in vivo</i> de fibras TRPM8-EYFP <sup>+</sup> en la córnea de ratones adultos tras su axotomía. ....	129
4.5.1. Análisis morfométrico dinámico de la reinervación de las fibras sensoriales de frío tras la incisión quirúrgica de la córnea de ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	130
4.5.2. Análisis morfométrico dinámico de fibras individuales TRPM8-EYFP en la córnea del ratón adulto tras su axotomía mediante fotocoagulación. ....	133
4.5.2.1. Evaluación de la extensión del daño tisular generado por la axotomía mediante láser de femtosegundo de una fibra de frío corneal en ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> . ....	133
4.5.2.2. Análisis morfométrico dinámico de la regeneración de fibras corneales TRPM8-EYFP individuales en ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	137
4.6. Análisis morfométrico dinámico de la degeneración y regeneración de fibras sensoriales de frío individuales en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> tras su axotomía por fotocoagulación. ....	141
4.6.1. Análisis morfométrico de la degeneración de las fibras sensoriales de frío individuales en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> después de realizar una fotocoagulación. ....	142
4.6.2. Estudio de la regeneración de las fibras sensoriales de frío individuales en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> tras su axotomía.....	146
<b>5. Discusión</b> .....	<b>153</b>
5.1. Identificación molecular de dos poblaciones de neuronas trigeminales TRPM8-EYFP.....	155

5.2. Las terminaciones nerviosas corneales expresan canales iónicos Piezo2, Nav1.8, P2X2 y P2X3.....	158
5.3. La eliminación genética del canal iónico TRPM8 provoca alteraciones morfológicas en las fibras corneales provenientes de las neuronas de frío.....	161
5.4. Las fibras sensoriales de frío del epitelio corneal experimentan una continua remodelación espontánea en el ratón adulto.....	163
5.5. La eliminación genética del canal iónico TRPM8 altera la remodelación espontánea de las fibras de frío en el epitelio corneal.....	166
5.6. Tras la lesión quirúrgica, la regeneración de la inervación sensorial de frío de la córnea es parcial.....	168
5.7. La fotocoagulación realizada con un láser de femtosegundo produce una afectación mínima del tejido circundante a la lesión nerviosa.....	168
5.8. Tras la axotomía por fotocoagulación, las fibras subbasales de frío de la córnea experimentan una regeneración parcial, mientras que sus terminaciones nerviosas regeneran completamente.....	171
5.9. La delección genética de SARM1 conlleva un retraso en la degeneración de la porción distal de fibras de frío corneales tras su axotomía mediante fotocoagulación.....	173
5.10. La delección genética de SARM1 no implica cambios en la dinámica de regeneración de la porción distal de fibras de frío corneales tras su axotomía mediante fotocoagulación.....	174
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>177</b>
Conclusions .....	180
<b>7. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>182</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>206</b>

## Listado de abreviaturas

---

AIF: neuronas de alta intensidad de fluorescencia.

AT: células amplificadoras transitorias.

ATP: adenosín trifosfato.

BIF: neuronas de baja intensidad de fluorescencia.

BSA: albúmina de suero bovino.

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

CH: *ConvexHull*.

DAB: hidrato de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DF: dimensión fractal.

DG: degeneración Walleriana.

DW: degeneración Walleriana.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*.

EYFP: *enhanced yellow fluorescent protein*.

FSB: fibra subbasal.

GAP43: *grow associated protein 43*.

GR: ganglio raquídeo.

GS-IB<sub>4</sub>: *Griffonia simplicifolia* isolectina B<sub>4</sub>.

GT: ganglio trigémino.

HB-LT: *high background-low threshold*.

IRES: sitio de entrada al ribosoma.

LB-HT: *low background-high threshold*.

MEC: matriz extracelular.

NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido.

NF200: neurofilamento 200.

NGF: factor de crecimiento nervioso.

NMNAT2: nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa 2.

PBS-X: tampón fosfato salino con Triton X-100.

PBS: tampón fosfato salino.

RAG: genes asociados a la regeneración.

ROI: regiones de interés.

SARM1: *sterile- $\alpha$  and Toll/interleukin 1 receptor motif containing protein 1*.

SB: suero de bloqueo.

SB: suero de bloqueo.

SC: suero de cabra.

SP: sustancia P.

TN: terminaciones nerviosas.

TrkA: receptor quinasa A de la tropomiosina.

TRP: *transient receptor potential*.

TRPA1: receptor de potencial transitorio de la subfamilia anquirina 1.

TRPM8: receptor de potencial transitorio de la subfamilia melastatina 8.

TRPV1: receptor de potencial transitorio de la subfamilia vaniloide 1.

## Listado de figuras

Figura 1.1. Ilustración de las principales estructuras del ojo humano y de la córnea. ....	25
Figura 1.2. Estructura del epitelio corneal.....	26
Figura 1.3 Proceso de renovación de las células epiteliales corneales.....	28
Figura 1.4. Vista medial de la órbita que muestra la inervación sensorial y autónoma del ojo.....	31
Figura 1.5. Ilustración de la inervación corneal. ....	35
Figura 1.6. Micrografías confocales de la inervación sensorial corneal en el ratón C57BL/6J.....	37
Figura 1.7 Anatomía microscópica de las fibras nerviosas de la córnea humana. ....	39
Figura 1.8. Tipos morfológicos de terminaciones intraepiteliales en la córnea de ratón. ...	41
Figura 1.9. Tipos funcionales de fibras sensoriales corneales. ....	44
Figura 1.10. Tipos funcionales de neuronas sensoriales corneales.....	48
Figura 1.11. Remodelación espontánea de la inervación corneal en ratón adulto.....	49
Figura 1.12. Proceso de degeneración y regeneración intrínseco al axón periférico lesionado. ....	52
Figura 1.13. Degeneración Walleriana inducida por la activación de SARM1.....	57
Figura 3.1. Generación del ratón transgénico <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	63
Figura 3.2. Generación del ratón <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	64
Figura 3.3. Generación del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> .....	65
Figura 3.4. Diagrama esquemático de la generación del alelo <i>Piezo2<sup>GFP</sup></i> .....	66
Figura 3.5. Configuración del equipo de microscopía confocal para la adquisición de imágenes <i>in vivo</i> . ....	76
Figura 3.6. Visualización de la inervación sensorial corneal de un ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> ..	78
Figura 3.7. Reconstrucción 3D de un conjunto de fibras subbasales y sus terminaciones..	79
Figura 3.8. Representación esquemática de la incisión quirúrgica de la córnea.....	81
Figura 3.9. Fotocoagulación de una fibra subbasal individual en la córnea del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> . ....	83
Figura 3.10. Cuantificación de la densidad de fibras subbasales y terminaciones nerviosas corneales. ....	88
Figura 3.11. Cálculo de la DF de una fibra subbasal y sus terminaciones nerviosas mediante el método del conteo de cajas.....	92
Figura 4.1. Identificación molecular de dos poblaciones de neuronas TRPM8-EYFP en el ganglio trigémino del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> . ....	101

Figura 4.2. Expresión de Piezo2 en las fibras y terminaciones sensoriales de la córnea de ratón .....	105
Figura 4.3. Imagen confocal de terminaciones nerviosas nociceptoras que coexpresan los canales iónicos TRPV1 y Nav1.8. en la córnea del ratón. ....	107
Figura 4.4. Expresión de los receptores P2X2 y P2X3 en las fibras sensoriales de frío corneales del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	109
Figura 4.5. Arquitectura de las fibras sensoriales de frío corneales en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	111
Figura 4.6. Proporción de los diferentes tipos morfológicos de terminaciones sensoriales de frío en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	112
Figura 4.7. Imágenes de las fibras subbasales y de las terminaciones nerviosas en la córnea del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y del ratón <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> . ....	114
Figura 4.8. Comparación morfológica de la población de fibras de frío corneales del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y del <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	115
Figura 4.9. Arquitectura de las fibras nerviosas de frío en la córnea de un ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP in vivo</i> . ....	118
Figura 4.10. Cambios morfodinámicos de 3 fibras subbasales originadas en el mismo punto de penetración.....	120
Figura 4.11. Ejemplo del curso temporal de los cambios morfodinámicos de una fibra subbasal central y otra periférica en la córnea del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	122
Figura 4.12. Promedio de la variabilidad de los cambios morfodinámicos experimentados por las fibras subbasales localizadas en la periferia y en el centro de la córnea en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	123
Figura 4.13. Ejemplo del curso temporal de los cambios morfodinámicos espontáneos de una fibra corneal subbasal central y otra periférica en el ratón <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	126
Figura 4.14. Promedio de la variabilidad de los cambios morfodinámicos espontáneos que experimentan las fibras subbasales localizadas en la periferia y en el centro de la córnea en un ratón <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	127
Figura 4.15. Promedio de la variabilidad de los cambios morfodinámicos espontáneos que experimentan las fibras subbasales localizadas en la periferia y en el centro de la córnea en los ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	129
Figura 4.16. Evaluación <i>in vivo</i> de la reinervación de las fibras sensoriales de frío tras la realización de una incisión en la córnea de ratones adultos <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	133
Figura 4.17. Fotocoagulación <i>in vivo</i> de fibras individuales de frío corneales en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	134

Figura 4.18. Cuantificación del número de núcleos de las células epiteliales potencialmente dañadas por la fotocoagulación en la córnea de fibras TRPM8-EYFP. ....	136
Figura 4.19. Ejemplo del curso temporal de la regeneración <i>in vivo</i> de una fibra TRPM8-EYFP+ individual tras su axotomía mediante láser de femtosegundo. ....	138
Figura 4.20. Evaluación <i>in vivo</i> de la regeneración de fibras individuales axotomizadas por fotocoagulación en la córnea del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> .....	141
Figura 4.21. Comparación de la degeneración de la porción distal de una fibra individual de frío corneal a las 8 horas de su fotocoagulación en el ratón control <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>+/+</sup></i> y en el ratón <i>knockout Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> . ....	144
Figura 4.22. Curso temporal de la degeneración de la porción distal de las fibras de frío axotomizadas en el ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> . ....	146
Figura 4.23. Curso temporal de la regeneración <i>in vivo</i> de una fibra de frío individual en la córnea del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> . ....	148
Figura 4.24. Análisis morfométrico dinámico de la regeneración de fibras individuales axotomizadas por fotocoagulación en la córnea del ratón <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> . ....	150
Figura 4.25. Comparación morfométrica dinámica de la regeneración de fibras individuales axotomizadas por fotocoagulación en la córnea del ratón control <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y del <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></i> . ....	152

## Listado de tablas

---

Tabla 3.1. Anticuerpos primarios y secundarios usados.....	69
Tabla 3.2. Animales empleados, concentración de las disoluciones y tiempos de incubación aplicados en los protocolos de inmunofluorescencia en preparaciones de córnea aplanada.....	71
Tabla 4.1. Características morfológicas de las fibras y terminaciones sensoriales TRPM8-EYFP que inervan la córnea.....	112
Tabla 4.2. Diferencias en la variabilidad de los cambios morfodinámicos de las fibras subbasales localizadas en el centro respecto a la periferia corneal de los ratones <i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> y <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> .....	129

## Resumen

---

Las terminaciones nerviosas periféricas de las neuronas somatosensoriales primarias que inervan la piel y las mucosas son las estructuras neurales clave en la detección y codificación de las características físicas y/o químicas de los estímulos externos, que son transformadas en señales eléctricas y enviadas al sistema nervioso central, generándose sensaciones conscientes de tacto, calor, frío o dolor. La información sensorial que genera cada tipo de terminación nerviosa viene determinada por la variedad y las características específicas de los canales iónicos implicados en la transducción y codificación del estímulo que contienen. Así, los canales iónicos TRPM8 o Piezo2 son responsables del potencial de receptor en respuesta a descensos de la temperatura ambiental y fuerzas mecánicas, respectivamente. Igualmente, otros canales iónicos dependientes de voltaje, como Nav, Cav y Kv, participan en la generación de los potenciales de acción propagados.

El conocimiento actual de los canales iónicos de las neuronas somatosensoriales primarias proviene en gran medida de los experimentos realizados *in vitro* en el soma de la neurona y no en la terminación nerviosa, lo que no refleja las condiciones en el organismo completo. Las evidentes diferencias morfológicas entre el soma y las terminaciones nerviosas periféricas podrían explicar que la codificación de los estímulos somatosensoriales también sea diferente. Debido a esto, resulta imperativo obtener un conocimiento más detallado de la morfología de las terminaciones nerviosas.

Gracias a su transparencia y alta densidad en nervios sensoriales, la córnea supone un excelente modelo experimental para la identificación de diferentes canales iónicos y la caracterización morfométrica dinámica de la inervación somatosensorial, tanto en condiciones fisiológicas como durante la degeneración y regeneración que acontece a la lesión.

Por un lado, en este trabajo se realizaron procedimientos inmunohistoquímicos en córneas de ratones adultos, que permitieron la identificación de Piezo2 y Nav1.8 en terminaciones nerviosas periféricas de neuronas trigeminales nociceptoras. También se realizó la caracterización morfológica de las fibras sensoriales que expresan TRPM8, principal transductor de las neuronas termorreceptoras de frío, en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, que expresa la proteína fluorescente EYFP bajo el promotor del gen *Trpm8*. En paralelo, se caracterizó el patrón de expresión molecular de estas neuronas, esencial para determinar si poseen un fenotipo típico de neuronas nociceptoras. Se identificaron dos subpoblaciones de neuronas TRPM8<sup>+</sup> en base su nivel de expresión, tanto al estudiar los somas en el ganglio trigémino como las fibras nerviosas que inervan la córnea. En dichas neuronas, se halló la expresión de marcadores moleculares propios de los nociceptores, como son el péptido CGRP, el receptor TrkA o los receptores purinérgicos P2X2 y P2X3.

Por otro lado, se desarrolló un modelo experimental que permitió la monitorización *in vivo* a lo largo del tiempo y el posterior análisis morfométrico de las fibras y de sus terminaciones nerviosas en la córnea de ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* adultos, tanto en condiciones fisiológicas como durante la degeneración y regeneración tras la realización de una lesión.

En condiciones fisiológicas, se observó que la mayor parte de las fibras corneales TRPM8-EYFP<sup>+</sup> experimentaban cambios morfodinámicos que no suponían un crecimiento o decrecimiento neto a lo largo de 2 semanas en lo que respecta a su longitud acumulada, al volumen que ocupan en el epitelio corneal o a su complejidad, siendo estos cambios de mayor magnitud en aquellas fibras localizadas en regiones centrales de la córnea. También se encontraron diferencias en la dinámica de remodelación de las fibras nerviosas corneales de ratones transgénicos que poseen una delección genética del canal iónico TRPM8.

Los cambios morfodinámicos experimentados por las fibras nerviosas corneales tras su lesión se estudiaron mediante dos aproximaciones experimentales. En la primera de

ellas, se realizó una incisión quirúrgica de los nervios estromales de la córnea de ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y, a continuación, se realizó un seguimiento *in vivo* de los cambios morfológicos acontecidos durante las 3 semanas posteriores a la lesión. Se observó una completa degeneración nerviosa en el área lesionada, seguida de una regeneración parcial del conjunto de las fibras axotomizadas al final del periodo de seguimiento. Para la segunda aproximación, se desarrolló un nuevo modelo de lesión nerviosa muy precisa y mínimamente invasiva, basado en la fotocoagulación con un láser de femtosegundo de fibras nerviosas individuales TRPM8-EYFP y en su posterior monitorización y análisis de los cambios morfodinámicos experimentados durante su regeneración. Se encontró que las fibras axotomizadas regeneraban parcialmente, mientras que sus terminaciones nerviosas lo hacían rápidamente y de manera completa.

Además, se estudió el papel de la proteína SARM1, esencial en la activación del proceso de degeneración Walleriana, durante la degeneración y regeneración, tras la lesión de los nervios periféricos en el ratón adulto. Hasta la fecha se desconoce la implicación de SARM1 en la regeneración de los axones periféricos. Con el propósito de definir su contribución, se generaron ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* nulos para la expresión de SARM1, en los que se monitorizó la degeneración de la porción distal y la regeneración de la porción proximal tras la realización de la lesión. Se observó un retraso en la degeneración de la porción distal en el ratón *knockout* para SARM1, mientras que no se observaron diferencias en la dinámica de regeneración entre el ratón control y el ratón *knockout*. Estos resultados confirman que SARM1 es un mecanismo molecular intrínseco y específico para la activación de la degeneración Walleriana y, además, sugieren que SARM1 no afecta al proceso de regeneración intrínseca de las fibras nerviosas corneales, lo que apoyaría el uso de una inhibición de SARM1 como posible estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas periféricas.

## Abstract

---

The peripheral nerve endings from primary somatosensory neurons that innervate the skin and mucosa are key neural structures to detect and encode the features of the physical and chemical external stimuli and convert it into electrical signals, which are sent to the central nervous system, where conscious sensations such as touch, heat, cold and pain are generated. The sensory information that is generated from a nerve ending is determined by the range and specific characteristics of the ion channels involved in stimulus transduction and encoding. Thereby, TRPM8 and Piezo2 channels are responsible for the receptor potential in response to decreasing external temperature and mechanical forces, respectively. Furthermore, nerve endings are endowed of voltage-gated ion channels such as Nav, Cav and Kv, that are involved in the generation of the propagated action potential.

Most of the current knowledge about ion channels of the primary somatosensory neurons come from *in vitro* experiments at the soma of the neuron but not at their nerve endings, which does not reflect the physiological conditions of the whole organism. The clear morphological differences between the soma and peripheral nerve endings could explain why the encoding of somatosensory stimuli is also different between them. Therefore, it is essential to obtain an in-depth understanding of the morphological complexity of the nerve endings.

Due to its transparency and high nerve density, the cornea is an excellent experimental model to perform ion channels' identification and morphometric analysis of somatosensory innervation, both under physiological conditions, and during regeneration and degeneration processes after injury.

In this work, on the one hand, immunohistochemical procedures were performed on the corneas from adult mice that allowed the identification of Piezo2 and Nav1.8 ion channels at peripheral nerve endings of nociceptive trigeminal neurons. Additionally, a

morphological characterization of sensory nerves expressing TRPM8, which is the main molecular transducer of cold thermoreceptor neurons, was also performed by using *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* transgenic mice, that expresses the fluorescent protein EYFP under the control of the *Trpm8* promoter. In parallel, the molecular pattern of cold trigeminal neurons was studied to determine if these neurons have a typical pattern of nociceptive neurons. Two populations of cold thermoreceptor neurons were identified in both, trigeminal ganglion neurons and at nerve fibers that innervate the cornea. Moreover, expression of typical molecular markers of nociceptors such as CGRP, TrkA receptor, P2X2 and P2X3 purinergic receptors was detected.

On the other hand, an experimental model that allowed the *in vivo* monitoring over time and subsequent morphometric analysis of the nerve fibers and their endings on the cornea of the adult *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* mouse was developed, both under physiological conditions, and during regeneration and degeneration processes after injury.

Under physiological conditions, most TRPM8-EYFP corneal nerve fibers experienced continuous morphodynamic changes, which did not involve a net increase or decrease in its total length, occupied volume in the epithelium or complexity over the 2 weeks of study. These morphodynamic changes were more prominent in those fibers located at central areas of the cornea. Furthermore, the remodeling dynamic of corneal nerve fibers in TRPM8 knock-out mice was also different from control mice.

The morphodynamic changes experienced by corneal nerve fibers after injury were studied by using two experimental approaches. At first, a surgical transection of the stromal nerves was performed in *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* mice. The morphological changes experienced by the corneal nerves were monitored *in vivo* for 3 weeks after injury. A complete nerve degeneration was observed in the injured area followed by a partial regeneration of the axotomized corneal nerve fibers at the end of the study period. Also, a new highly accurate and minimally invasive nerve injury model was developed in which single TRPM8-EYFP

nerve fibers were photo-ablated by using a femtosecond laser. The morphodynamic changes that they experienced during regeneration were subsequently monitored and analyzed. It was observed that regeneration of the axotomized nerve fibers was partial while their nerve endings rapidly and completely regenerated.

Additionally, the role of SARM1 in the degeneration and regeneration processes of the peripheral nerves *in vivo* was studied in the adult mouse. SARM1 is essential for Wallerian degeneration of the peripheral nerves after injury, but its role in regeneration process remains unknown. To define the contribution of SARM1 in both processes, SARM1 knock-out mice were generated. In these mice, after laser-induced axotomy, the degeneration of the distal stump and the regeneration of the proximal stump were monitored over 2 weeks. A delayed degeneration of the distal stump was observed in SARM1 knock-out mice, while the regeneration dynamic was not different from *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* control mice. These results confirm *in vivo* that SARM1 is an intrinsic molecular mechanism of Wallerian degeneration and suggest that SARM1 is not involved in the intrinsic regeneration of the corneal nerve fibers. Taken together, the results might support the inhibition of SARM1 as a therapeutic strategy for the treatment of peripheral neurodegenerative diseases without the undesired affection of peripheral axon regeneration.

## 1. Introducción

---

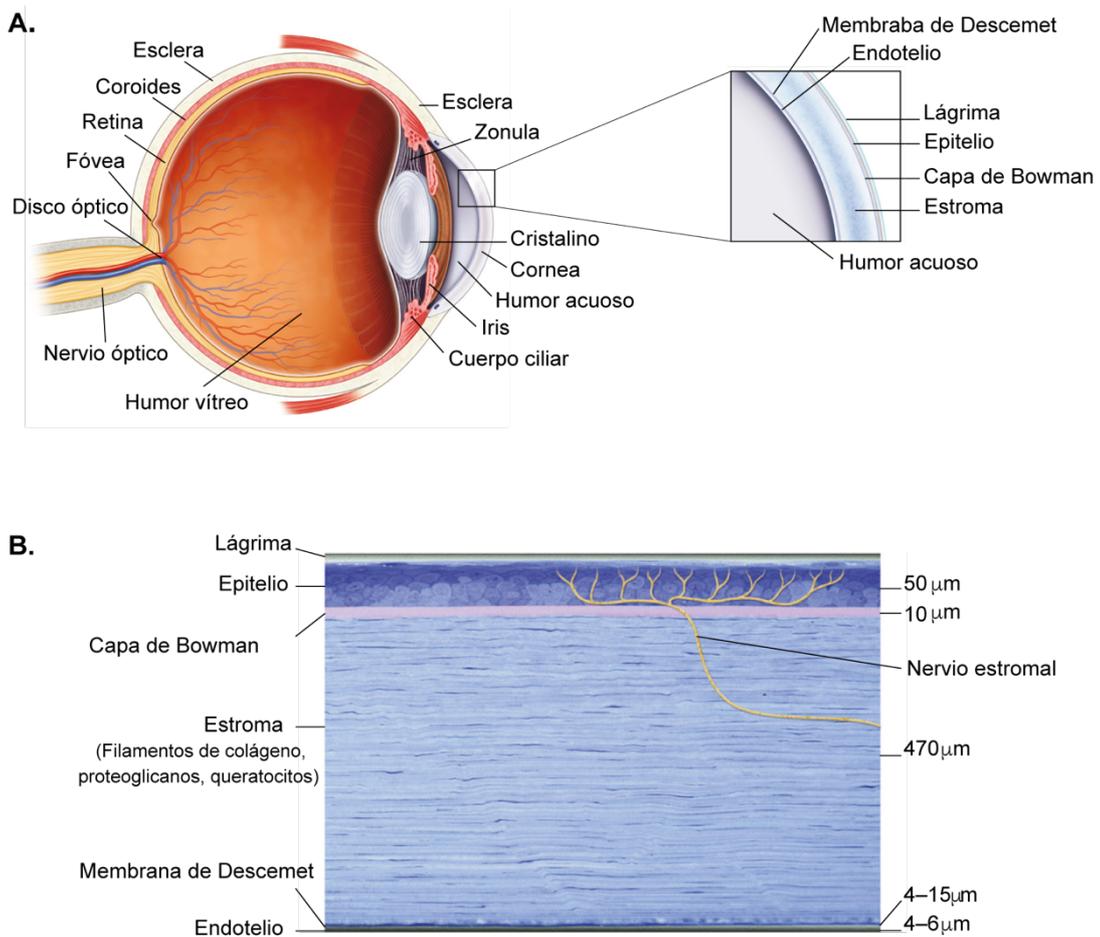
## **1.1. La córnea.**

La córnea es la estructura más externa del ojo junto con la esclera, y ambas constituyen una túnica fibrosa en contacto directo con el medio ambiente, que proporciona integridad estructural al globo ocular. También actúan como primera barrera protectora de los elementos más internos del ojo frente a agentes infecciosos y traumatismos físicos y/o químicos. La córnea está formada por tejido conectivo avascular, altamente organizado para facilitar la transmisión de la luz. Esto, junto con las propiedades fisiológicas de sus componentes celulares convierten a la córnea en una estructura transparente con elevado poder refractivo (Dawson et al., 2011; DelMonte & Kim, 2011).

### **1.1.1. Morfología corneal.**

La córnea humana tiene un grosor de 540 a 700  $\mu\text{m}$ , siendo más estrecha en la zona central (Dawson et al., 2011; H. F. Li et al., 1997) y un diámetro horizontal de 11.5-12.0 mm aproximadamente (Rüfer et al., 2005). Posee una geometría esférica, con un ápice central de mayor curvatura, que se va aplanando gradualmente hacia la periferia y que posibilita la refracción de la luz hacia el resto de estructuras visuales (Figura 1.1) (Dawson et al., 2011; Wolff et al., 1997).

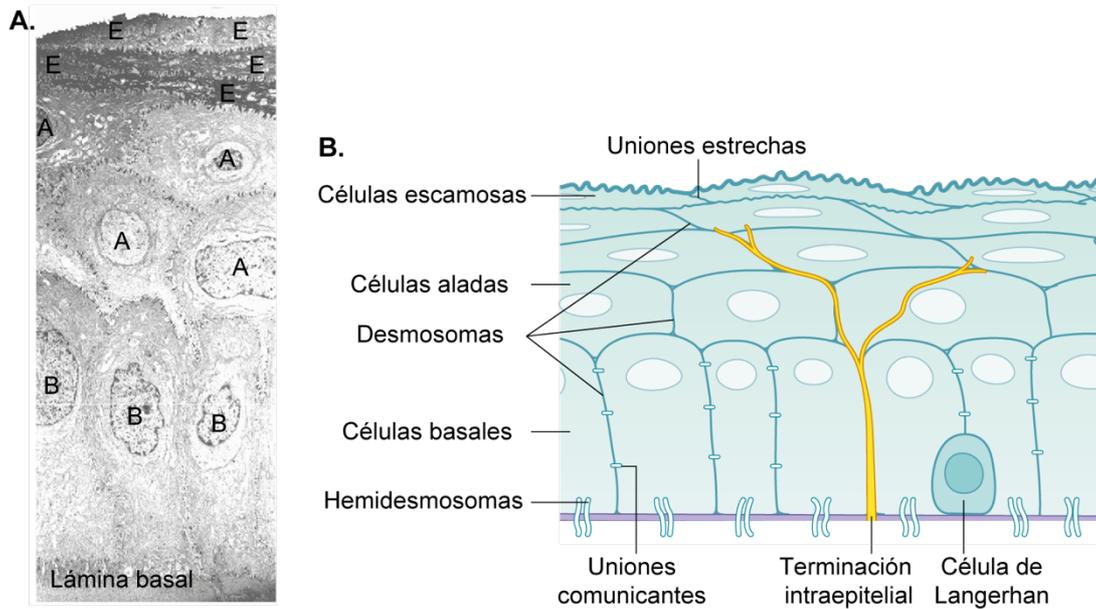
La córnea está organizada en 5 capas: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 1.1); cada una de ellas tiene unas características estructurales y funcionales específicas. Esta configuración anatómica es común para las diferentes especies animales aunque entre ellas existen diferencias en el espesor de las capas corneales (Almubrad & Akhtar, 2012; Cafaro et al., 2009; Hayashi et al., 2002; Henriksson et al., 2009; Ledbetter & Scarlett, 2009; Reichard et al., 2010; Whitear, 1960).



**Figura 1.1. Ilustración de las principales estructuras del ojo humano y de la córnea.**  
**A.** Dibujo de la sección transversal del ojo humano con una ampliación de la córnea y sus diferentes capas. **B.** Sección histológica de la córnea teñida con azul de toluidina. Figura modificada de Dawson et al., 2011.

### 1.1.1.1. Epitelio corneal.

La superficie corneal está cubierta por un epitelio escamoso estratificado no queratinizado de unos 50  $\mu\text{m}$  de grosor (Figura 1.1B y 1.2) (Dawson et al., 2011; Fabiani et al., 2009; H. F. Li et al., 1997). Este está compuesto por 4-6 capas de células que se diferencian a partir de una monocapa de células basales.



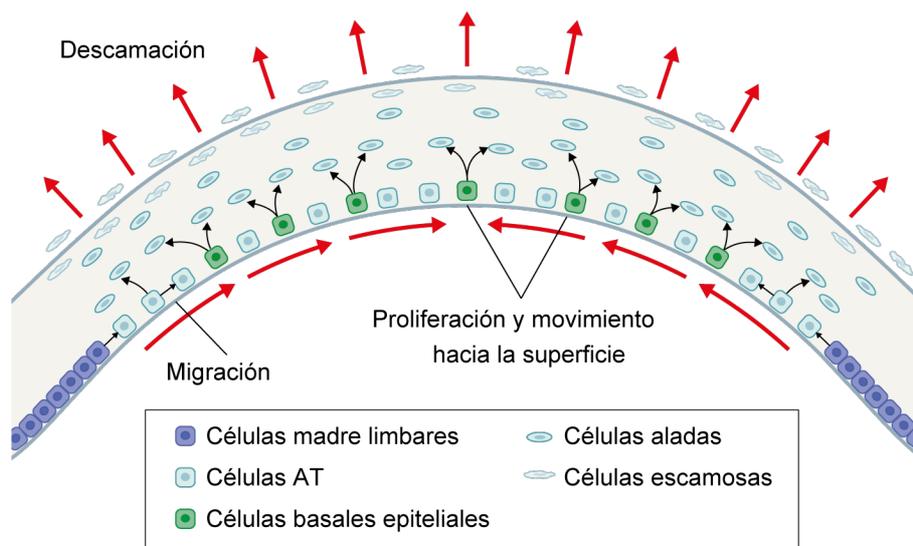
**Figura 1.2. Estructura del epitelio corneal.**

**A.** Micrografía electrónica de transmisión de la zona central del epitelio. Las letras mayúsculas señalan las células basales (B), las aladas (A) y las escamosas (E). **B.** Representación esquemática de las diferentes capas epiteliales y de las uniones célula-célula. Figura modificada de Dawson et al., 2011.

Las células basales forman una monocapa de células columnares, responsables de secretar la lámina basal subyacente, compuesta principalmente por fibrillas de colágeno tipo IV, laminina, heparán sulfato y fibronectina. Están conectadas entre sí a través de desmosomas y uniones comunicantes, y se anclan a la membrana basal por medio de los hemidesmosomas (Figura 1.2) (Dawson et al., 2011; DelMonte & Kim, 2011; Dohlman, 1971). Son las únicas células epiteliales corneales que tienen capacidad de división mitótica y están renovándose continuamente. Estas células se diferencian en células aladas, que se organizan en 2-3 capas por encima de las basales. Las células aladas se unen entre sí y con sus vecinas a través de desmosomas y de uniones comunicantes (Figura 1.2) (Dawson et al., 2011; DelMonte & Kim, 2011). Finalmente, las células aladas se diferencian distalmente en 2-3 capas de células escamosas, que representan el estado de transición entre la capa de células basales y las capas de células superficiales. Las células escamosas son las más superficiales y diferenciadas del epitelio corneal, con una morfología poligonal aplanada

(Figura 1.2) (Dawson et al., 2011; DelMonte & Kim, 2011). En su superficie apical poseen microvellosidades cubiertas por una fina capa de glicocáliz que aumenta el área de contacto con la capa de mucinas de la película lagrimal que recubre el epitelio, de forma que contribuye al mantenimiento de la humectabilidad de la córnea. Están unidas entre sí mediante uniones estrechas, que les confieren una elevada resistencia a los agentes externos (toxinas, microorganismos patógenos, ...) y una baja permeabilidad a los iones y fluidos de la película lagrimal en contacto con ellas (Dawson et al., 2011; DelMonte & Kim, 2011).

El epitelio corneal es una estructura altamente dinámica, debido a que sus células se están renovando continuamente. Se estima que la capa de células epiteliales tiene una tasa de renovación de 7-10 días (Hanna et al., 1961). Existe un delicado equilibrio entre la descamación de las células superficiales de la córnea y la proliferación de nuevas células, que es crítico para el mantenimiento de la homeostasis epitelial (Dawson et al., 2011; Hanna & O'brien, 1960). Por un lado, tiene lugar un proceso de proliferación y migración vertical por el cual las células basales del epitelio, con capacidad mitótica, se dividen en células aladas, que van migrando hacia la superficie y diferenciándose, hasta convertirse finalmente en células escamosas, que se acaban desprendiendo de la córnea. En paralelo, ocurre un proceso de proliferación y migración horizontal. En él, las células madre del limbo producen células amplificadoras transitorias (AT), que migran de manera centrípeta desde la periferia de la córnea hasta el centro. Las células AT tienen una elevada capacidad de proliferación mixta, es decir, son capaces de producir células basales epiteliales y células aladas. Sin embargo, su capacidad proliferativa acaba cuando han alcanzado el centro de la córnea, convirtiéndose en células basales epiteliales (Dawson et al., 2011). Estos procesos fueron descritos formalmente en la década de los ochenta en la llamada hipótesis XYZ, en la que X es la proliferación de las células epiteliales basales (proliferación vertical), Y es la proliferación de las células limbares (proliferación horizontal) y Z es la descamación de las células más superficiales (Figura 1.3) (Thoft et al., 1983).



**Figura 1.3 Proceso de renovación de las células epiteliales corneales.**

Representación esquemática de la hipótesis XYZ, en la que se muestra la proliferación y migración, vertical y horizontal. Figura modificada de Dawson et al., 2011.

#### 1.1.1.2. Capa de Bowman.

La capa de Bowman es un condensado acelular de 15-18  $\mu\text{m}$  de grosor (H. F. Li et al., 1997) que en humanos y otros mamíferos se encuentra entre la lámina basal del epitelio y el estroma (Figura 1.1) (Wilson, 2020). No obstante, hay discrepancias respecto a su existencia en la córnea de ratón (Hayashi et al., 2002; Wilson et al., 1996). Constituye una capa compuesta por fibrillas de colágeno organizadas aleatoriamente, cuyo componente principal es el colágeno tipo I, aunque también se encuentran presentes los colágenos tipo III, V y XII (Wilson, 2020). Debido a su rigidez, ayuda a mantener la forma de la córnea. Sin embargo, su función fisiológica todavía se desconoce y se hipotetiza para el colágeno una posible función de barrera frente a la infiltración de agentes patógenos, que favorecería el proceso de cicatrización de las lesiones la corneales (Wilson & Hong, 2000).

### **1.1.1.3. Estroma corneal.**

El estroma corneal en humanos comprende aproximadamente el 90% del grosor de la córnea (~470  $\mu\text{m}$ ) (Figura 1.1B)(Dawson et al., 2011; Espana & Birk, 2020) y varía entre especies, teniendo un grosor aproximado de 70  $\mu\text{m}$  en ratones (dos tercios del espesor de la córnea) (Chakravarti et al., 2000).

El estroma de la córnea está compuesto principalmente por agua, matriz extracelular (MEC) y un entramado de fibras de colágeno y queratocitos (Figura 1.1B) (Espana & Birk, 2020). La función estructural del estroma se basa principalmente en el ensamblaje controlado de sus fibrillas de colágeno tipo I y tipo V para formar estructuras de orden superior llamadas lamelas, que se disponen entre sí formando ángulos rectos. Este elevado grado de organización contribuye decisivamente a la transparencia y resistencia mecánica de la córnea (DelMonte & Kim, 2011; Espana & Birk, 2020).

Las células más abundantes del estroma son los queratocitos, que se localizan intercalados entre las lamelas de colágeno. Son células quiescentes con una morfología aplanada y compacta, que emiten numerosos lamelipodios citoplasmáticos (Hahnel et al., 2000). Los queratocitos son responsables de la síntesis de los componentes de la MEC estromal (colágenos, proteoglicanos, metaloproteasas...) (DelMonte & Kim, 2011; Espana & Birk, 2020).

### **1.1.1.4. Membrana de Descemet.**

La membrana de Descemet es una matriz de transición entre el estroma posterior y la membrana basal de endotelio (Figura 1.1) (Espana & Birk, 2020). Se caracteriza por ser una MEC acelular compuesta por redes hexagonales de colágeno tipo VIII, IV y XII (Fitch et al., 1990; Hemmavanh et al., 2013; Ljubimov et al., 1996; Marchant et al., 2002; Sawada et al., 1990). A través de esta capa, las células del endotelio emiten proyecciones que permiten

su comunicación funcional con los queratocitos del estroma posterior (Feneck et al., 2020; Jeang et al., 2020).

#### **1.1.1.5. Endotelio corneal.**

El endotelio está formado por una monocapa de células hexagonales contiguas que recubren el estroma posterior (Figura 1.1) (DelMonte & Kim, 2011). Las células endoteliales interaccionan y se unen entre sí a través de extensas interdigitaciones laterales, presentando en sus extremos laterales uniones estrechas y comunicantes incompletas. Ello posibilita la difusión de moléculas y nutrientes esenciales, como glucosa y aminoácidos (Dawson et al., 2011; DelMonte & Kim, 2011; Klyce, 2020).

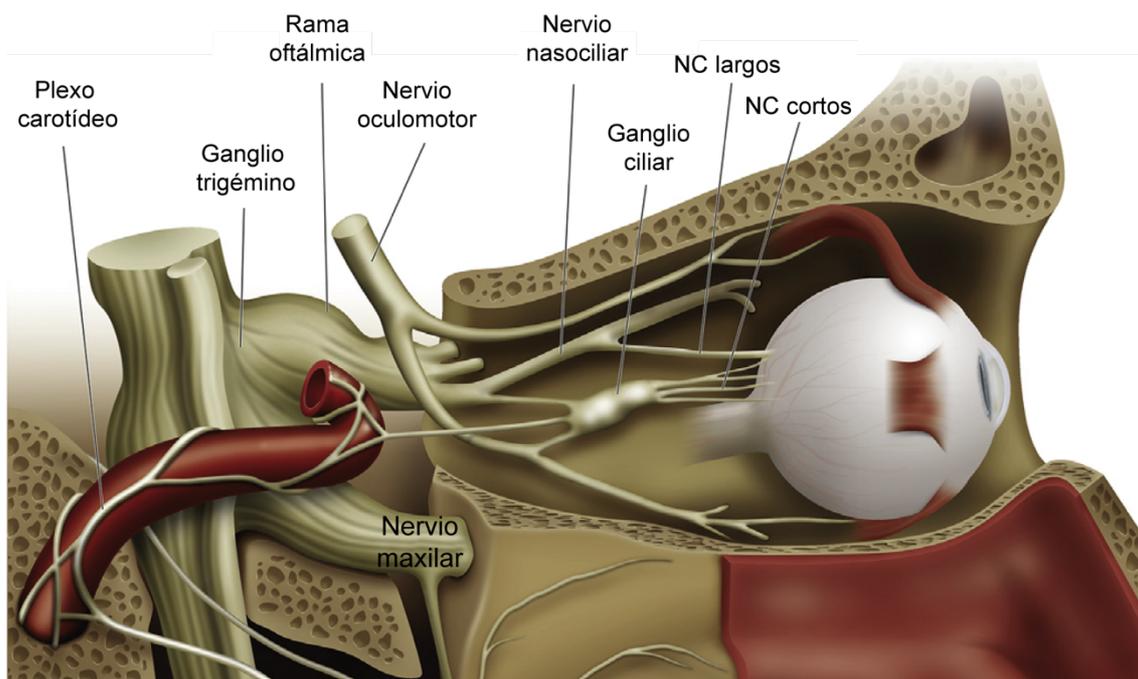
El endotelio corneal se comporta como una barrera altamente permeable, involucrada en el mantenimiento de la transparencia y de la deturgescencia corneal. Este fenómeno se produce por la presencia de bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa transportadoras de iones, en la membrana basolateral de las células endoteliales. Estas bombas generan el flujo de iones necesario para establecer un gradiente osmótico, que permite el movimiento pasivo de fluidos desde el estroma (hiposmótico) al humor acuoso (hiperosmótico) (Dawson et al., 2011; DelMonte & Kim, 2011; Klyce, 2020).

#### **1.1.2. Inervación corneal.**

La córnea es uno de los tejidos más densamente inervados del organismo y posee inervación autónoma y sensorial (Figura 1.4) (Marfurt et al., 1989, 1998, 2010). Su densa red de fibras y terminaciones nerviosas corneales sirve principalmente para detectar diferentes modalidades de estímulos externos potencialmente nocivos generando respuestas protectoras (Belmonte et al., 2017). Además, la estimulación de la inervación corneal inicia reflejos de lacrimación y parpadeo necesarios para el mantenimiento de la correcta hidratación de la córnea (Belmonte & Gallar, 2011; Parra et al., 2010; Quallo et al.,

2015). Cuando se producen infecciones corneales o daños en el nervio trigémino causados por cirugías, traumatismos o enfermedades neurológicas, se pueden desencadenar alteraciones en el reflejo de parpadeo, en la calidad y cantidad de lágrimas y en la sensibilidad corneal (Belmonte et al., 2017). Estas afecciones generan comúnmente signos y síntomas de neuropatías corneales. Por tanto, la integridad morfológica y funcional de la inervación corneal es esencial para el mantenimiento de una correcta homeostasis tisular (Medeiros & Santhiago, 2020).

Adicionalmente, la inervación corneal ejerce una significativa influencia trófica sobre el epitelio corneal, siendo capaz de secretar neuropéptidos que tienen un efecto mitogénico sobre las células epiteliales (García-Hirschfeld et al., 1994). Por tanto, las deficiencias en la inervación pueden dar lugar a defectos epiteliales persistentes, queratitis neurotróficas y síndrome de ojo seco entre otras patologías (Shaheen et al., 2014).



**Figura 1.4. Vista medial de la órbita que muestra la inervación sensorial y autónoma del ojo.** La rama oftálmica del ganglio trigémino se ramifica, dando lugar al nervio nasociliar que proyecta los nervios ciliares largos y cortos hasta el ojo. La rama maxilar del trigémino da lugar al nervio infraorbitario, que inerva parte del ojo y del párpado inferior. Las fibras simpáticas y parasimpáticas procedentes del ganglio cervical superior y de los ganglios ciliar y pterigopalatino, respectivamente, se unen a los nervios ciliares cortos. Figura adaptada de Belmonte et al., 2017.

### **1.1.2.1. Inervación autónoma.**

La inervación autónoma de la córnea es muy reducida y está compuesta por nervios simpáticos, que provienen del ganglio cervical superior (Belmonte & Cervero, 1996; Ivanusic et al., 2013; Marfurt et al., 1989; Morgan et al., 1987), y nervios parasimpáticos, que derivan de los ganglios ciliares (Figura 1.4) (Marfurt et al., 1998). Está presente en la córnea de diferentes mamíferos, aunque su densidad varía entre especies (Marfurt et al., 1989, 1998; Marfurt & Ellis, 1993; Müller et al., 2003). La inervación autónoma de la córnea está implicada en la regulación de los procesos inflamatorios y de cicatrización tras la lesión corneal (Xue et al., 2018).

### **1.1.2.2. Inervación sensorial.**

La inervación sensorial del ojo proviene de neuronas sensoriales primarias localizadas en el ganglio trigémino (GT) ipsilateral, que proyectan sus axones a través de la rama oftálmica (V1) (Figura 1.4) (De Felipe et al., 1999; Marfurt et al., 1989; Marfurt & Del Toro, 1987). También se ha observado que la rama maxilar del ganglio trigémino (V2) puede inervar el área inferior de la córnea (Figura 1.4) (Dawson et al., 2011; Müller et al., 2003). En mamíferos, se estima que alrededor de un 2% de las neuronas trigeminales proyecta sus axones hasta la córnea (De Felipe et al., 1999; Launay et al., 2015; LaVail et al., 1993; Morgan et al., 1978).

Las neuronas sensoriales primarias que inervan la córnea se encuentran localizadas en el área dorsomedial del GT (De Felipe et al., 1999; Launay et al., 2015) y proyectan sus axones periféricos a través de la rama nasociliar del nervio oftálmico. Después, los axones viajan por los nervios ciliares largos y por la rama comunicante del ganglio ciliar, que emite 5-10 nervios ciliares cortos, que contienen tanto fibras sensoriales como autónomas. Los nervios ciliares largos y los cortos penetran por la parte posterior del ojo, perforando la esclera alrededor del nervio óptico, hasta alcanzar el segmento anterior del espacio

supracoroideo y proporcionando una escasa innervación de la parte posterior del ojo (Figura 1.4) (Belmonte et al., 2011; May, 1997; Wolff et al., 1997). Una vez los nervios entran en la coroides, se ramifican repetidamente y se dirigen hacia el limbo esclerocorneal. Una parte de estas fibras inervan el cuerpo ciliar y el iris, mientras que la gran mayoría de las mismas forman una densa red nerviosa alrededor del limbo esclerocorneal, originando el plexo limbar (Belmonte et al., 2011). Finalmente, un número variable de haces nerviosos procedentes del plexo limbar penetra en el estroma corneal (Marfurt et al., 2010; Müller et al., 2003).

En los mamíferos, se estima que un 20-30% de los axones que penetran en la córnea poseen un bajo grado de mielinización (A $\delta$ ) mientras que el resto de los axones son amielínicos (C) (Belmonte et al., 2011; Bron et al., 2014; De Felipe & Belmonte, 1999). Además, las fibras mielínicas pierden su vaina de mielina antes de acceder al estroma corneal; sin embargo, continúan rodeadas por células de Schwann no mielinizantes (Müller et al., 2003). La ausencia de mielina en los axones contribuye al mantenimiento de la transparencia corneal (Müller et al., 1996, 2003).

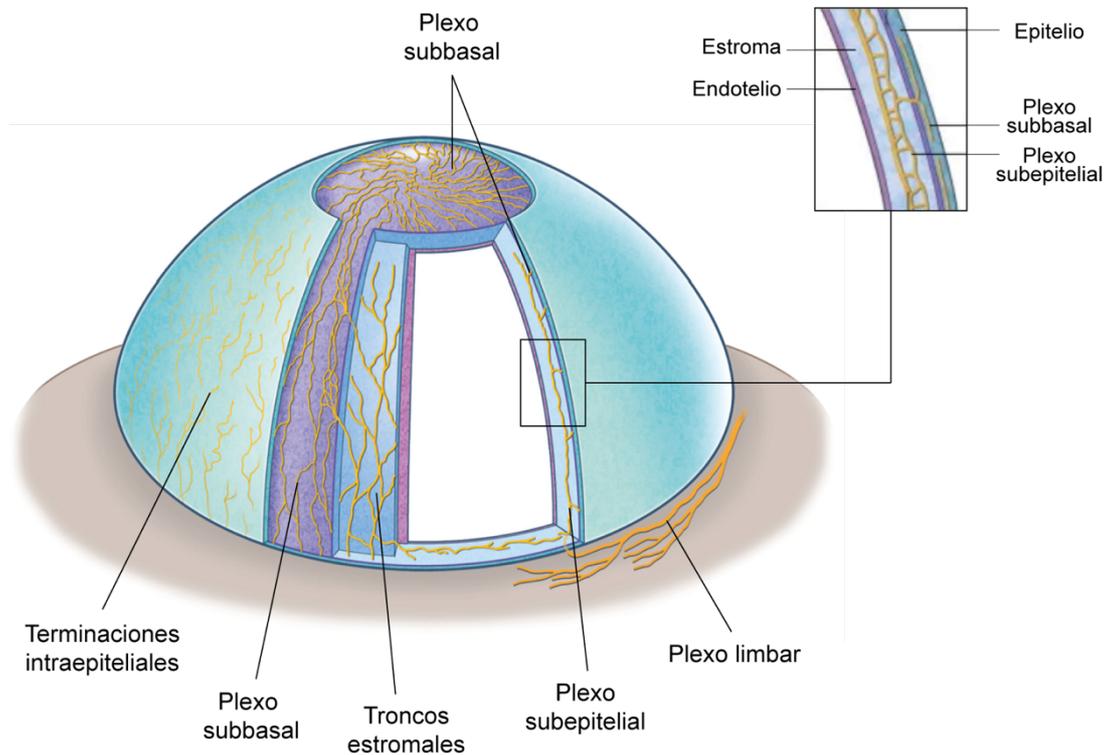
#### **1.1.2.2.1. Características moleculares y electrofisiológicas de las neuronas sensoriales corneales del ganglio trigémino.**

Diversos estudios electrofisiológicos de las neuronas sensoriales primarias corneales han permitido clasificarlas como neuronas tipo A $\delta$  o tipo C con propiedades de membrana pasivas y activas muy heterogéneas (Boada, 2013; López de Armentia et al., 2000; Veiga Moreira et al., 2007). Esta heterogeneidad también se refleja en la expresión de diferentes marcadores moleculares, de modo que las neuronas sensoriales primarias se pueden categorizar también como A $\delta$  o C, en función de si expresan marcadores como el neurofilamento 200 (NF200) o la periferina, respectivamente (Dhaka et al., 2008; Kobayashi et al., 2005; Stucky et al., 2009; Takashima et al., 2007). A su vez, las neuronas

tipo C se pueden subclasificar como neuronas peptidérgicas, si expresan neuropéptidos tales como la sustancia P (SP) y el gen relacionado con la calcitonina (CGRP), o no peptidérgicas si expresan isolectina B<sub>4</sub> (Averill et al., 1995; Bae et al., 2015; McCoy et al., 2013). Además, mediante el estudio de la expresión del receptor quinasa A de la tropomiosina (TrkA), es posible segregar las que están moduladas por el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Averill et al., 1995; Babes et al., 2004; Han et al., 2019; Kobayashi et al., 2005). Sin embargo, no existe una delimitación totalmente clara entre los diferentes grupos, debido a que estos marcadores son parcialmente selectivos (Abraira & Ginty, 2013; Bae et al., 2015; McCoy et al., 2013).

#### **1.1.2.2.2. Arquitectura de la inervación sensorial de la córnea.**

La inervación corneal está anatómicamente organizada en 4 niveles, desde que los haces nerviosos penetran en el estroma hasta que las terminaciones intraepiteliales cubren la superficie epitelial (Figura 1.5). Su descripción anatómica ha sido estudiada en multitud de especies tales como el gato (Chan-Ling, 1989; He et al., 2019), el perro (Marfurt et al., 2001, 2019), la cobaya (Ivanusic et al., 2013; Marfurt et al., 2019), la rata (He et al., 2021; Marfurt et al., 2019), el ratón (Alcalde et al., 2018; Harris & Purves, 1989; Whitear, 1960; Yu & Rosenblatt, 2007), el mono (Marfurt et al., 2019) y el humano (Al-Aqaba et al., 2019; Marfurt et al., 2010; Müller et al., 1996) entre otros.



**Figura 1.5. Ilustración de la inervación corneal.**

Algunos haces nerviosos estromales penetran radialmente en el estroma desde el anillo que forma el plexo limbar alrededor del limbo esclerocorneal. Los troncos estromales se dividen a medida que ascienden por el estroma formando el plexo subepitelial. Las ramificaciones de este plexo ascienden hacia el epitelio y una vez atraviesan la membrana de Bowman forman el plexo subbasal. Las fibras subbasales están localizadas entre la lámina basal y recorren la córnea en paralelo a la superficie. Estas fibras emiten terminaciones intraepiteliales a lo largo de su recorrido. Figura modificada de Belmonte et al., 2011.

#### 1.1.2.2.2.1. Plexo estromal.

Los haces nerviosos estromales acceden radialmente y de manera uniforme en el tercio anterior del estroma de la córnea (Figura 1.5 y 1.6A, flecha) en el humano y otros mamíferos, aunque difieren en el número de troncos estromales que penetran (He et al., 2010, 2019, 2021; Marfurt et al., 2010; Müller et al., 1996, 2003; Zander & Weddell, 1951). Una vez ha entrado en la córnea, cada tronco estromal (Figura 1.6B) se ramifica repetidamente en ramas progresivamente más finas a medida que avanzan hacia el centro de la córnea. Las ramificaciones distales de esta arborización se anastomosan con frecuencia y forman el plexo estromal anterior (Figura 1.5) (Belmonte et al., 2011; Marfurt et al., 2010). Dicho plexo es más denso y complejo en la periferia y disminuye

progresivamente hacia el centro de la córnea (Marfurt et al., 2010). Por el contrario, la mitad posterior del estroma y el endotelio carecen de inervación (Figura 1.5) (Belmonte et al., 2011).

En el ratón, el plexo limbar no forma un anillo pericorneal de fibras nerviosas y los haces estromales penetran directamente en la córnea, ramificándose irregularmente para cubrir toda la superficie de ésta (Figura 1.6A, flecha) (Mckenna & Lwigale, 2011).

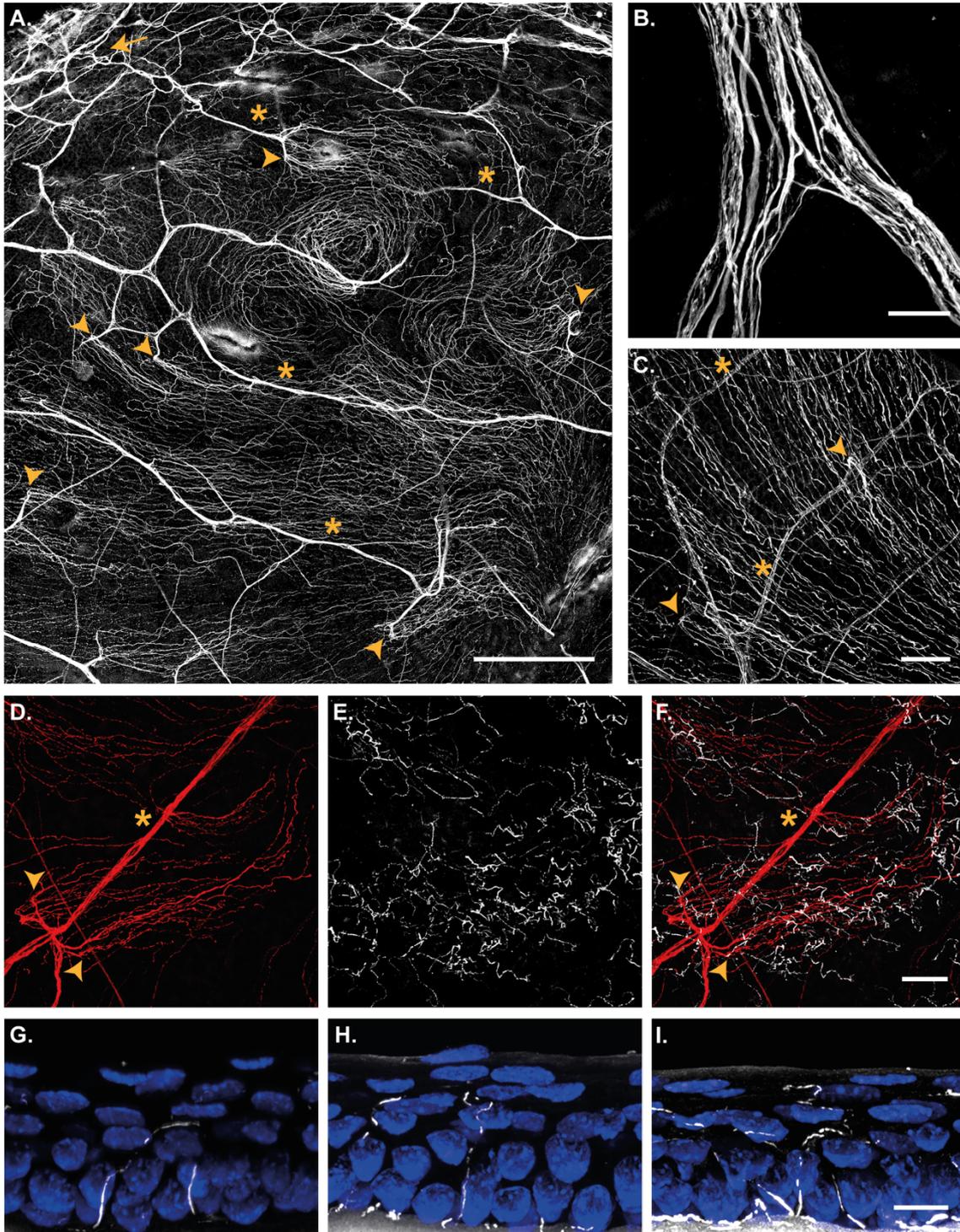
#### *1.1.2.2.2. Plexo subepitelial.*

El plexo subepitelial está formado por una densa red de fibras originadas a partir del plexo estromal, que se colocan en la superficie del estroma anterior, justo por debajo de la membrana de Bowman (Figura 1.5) (Marfurt et al., 2010). En general, la densidad de fibras subepiteliales es mayor en la periferia que en el centro de la córnea (Belmonte et al., 2011; Marfurt et al., 2010). Se distinguen dos tipos morfológicos de fibras subepiteliales. Las más abundantes forman una compleja red de fibras delgadas y tortuosas con un elevado grado de anastomosis que no penetran en la membrana de Bowman. Las restantes fibras, menos numerosas, tienen forma curvilínea, con un diámetro mayor; la gran mayoría de ellas penetra en la membrana de Bowman por la periferia (He et al., 2010; Marfurt et al., 2010).

#### *1.1.2.2.3. Plexo subbasal.*

Cuando una fibra estromal entra en el epitelio, se pliega 90° y se mantiene como única o se divide en varias fibras subbasales que discurren paralelamente a la superficie entre la membrana basal y las células basales del epitelio (Figura 1.5, 1.7A-B)(Al-Aqaba et al., 2010; Belmonte et al., 2011; Ivanusic et al., 2013; Marfurt et al., 2010; Müller et al., 2003). Sin embargo, un bajo número de fibras estromales atraviesa la membrana de Bowman por el centro de la córnea, adonde llegan también la mayoría de las fibras que penetran

directamente desde el plexo limbar (He et al., 2010). En conjunto, todas estas fibras forman el plexo subbasal (Figura 1.5, 1.6A, C y D).



**Figura 1.6. Micrografías confocales de la inervación sensorial corneal en el ratón C57BL/6J.** Los nervios sensoriales aparecen marcados con el anticuerpo  $\beta$ -tubulina clase III tanto en preparaciones de córnea aplanada (A-F) como en secciones transversales (G-I). El color de las fibras y terminaciones nerviosas presentes en la imagen se modificó usando diferentes paletas de pseudocolor en Fiji (NIH) para diferenciar las fibras subbasales y las terminaciones nerviosas. A. Los

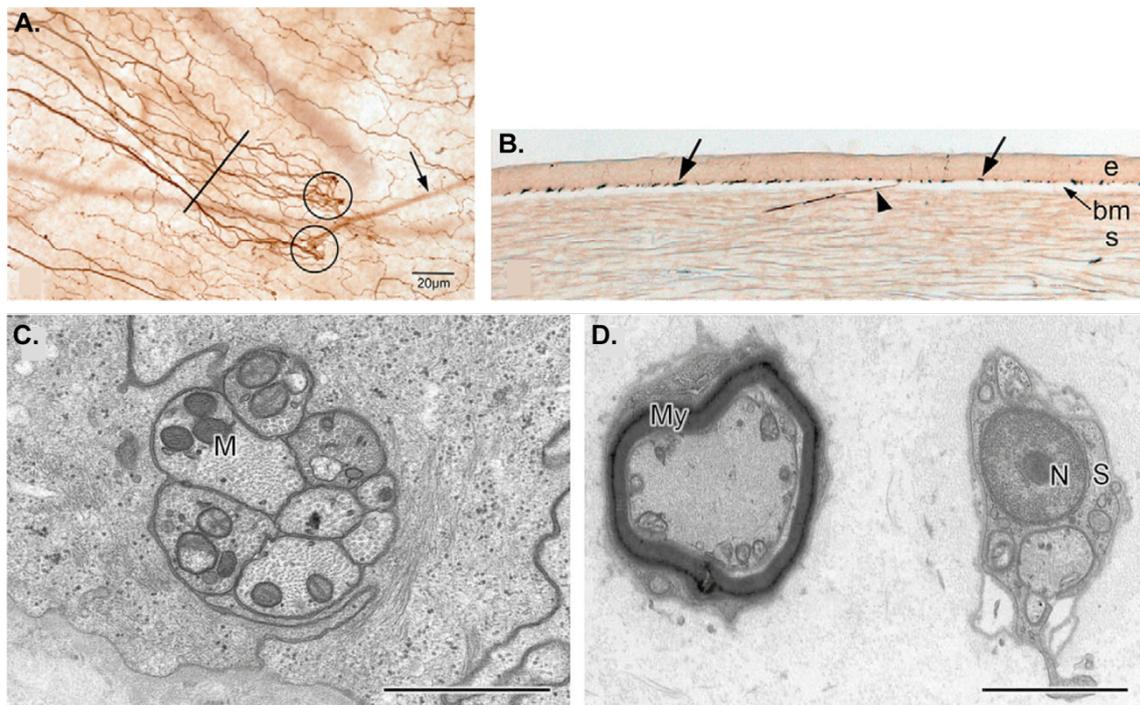
haces nerviosos sensoriales entran en el estroma desde el plexo limbar (flecha) y se ramifican, originando el plexo subepitelial (asteriscos). **B.** Detalle del tronco estromal. **C.** Las fibras subepiteliales del estroma ascienden y penetran a través de la lámina basal (puntas de flecha) formando el plexo subbasal. Estas fibras recorren el epitelio en paralelo a la superficie a nivel de la lámina basal. **D-F.** Las fibras subbasales (en rojo; D y F) emiten a lo largo de su recorrido terminaciones intraepiteliales (en blanco; E y F) que ascienden hasta las capas más superficiales del epitelio corneal. **G-I.** Hay descritos tres tipos morfológicos de terminaciones nerviosas según el número de ramificaciones que presentan: simples (G), ramificadas (H) y complejas (I). Los núcleos de las células epiteliales están teñidos con Hoechst 33342. Barras de escala: A, 250  $\mu\text{m}$ ; B, 25  $\mu\text{m}$ ; C-F, 50  $\mu\text{m}$ ; G-I, 10  $\mu\text{m}$ . Imagen extraída de Frutos-Rincón et al., 2022.

Las fibras subbasales del epitelio carecen de células de Schwann no mielinizantes debido a que estas no atraviesan la membrana basal (Stepp et al., 2017). Algunos estudios sugieren que las células basales del epitelio envuelven y dan sostén a esa densa red de fibras subbasales, desempeñando una función similar a la de las células de Schwann en el estroma (Müller et al., 2003; Stepp et al., 2017).

En su trayecto en el plexo subbasal de la córnea, las fibras subbasales forman unas estructuras neuroanatómicas características llamadas “traíllas” “cintas” o “correas nerviosas del epitelio” (del término inglés “*epithelial leashes*”). Están formadas por el conjunto de axones subbasales que emergen de un mismo fascículo estromal y viajan en paralelo (Figura 1.6, puntas de flecha) (Chan-Ling, 1989; Ivanusic et al., 2013; Marfurt et al., 2010; Rózsa & Beuerman, 1982; Schimmelpfennig, 1982). Se han identificado dos tipos morfológicos de fibras subbasales en función de si presentan o no varicosidades. Además, mediante estudios de microscopía electrónica se ha comprobado que cada una de las fibras subbasales contiene de 3 a 7 axones individuales (Figura 1.7C) y se ha mostrado, además, que las fibras con varicosidades presentan una elevada densidad de mitocondrias y vesículas (Figura 1.7D) (Marfurt et al., 2010; Müller et al., 2003)

Las fibras subbasales del epitelio anastomosan repetidas veces unas con otras, formando una densa red que hace muy difícil el reconocimiento individual de las “traíllas nerviosas del epitelio”, aunque en la periferia la densidad de estas “traíllas nerviosas” es menor y se las encuentra más separadas (Marfurt et al., 2010). Finalmente, las fibras

subbasales convergen en el centro de la córnea formando un “vórtice” o “remolino” (Al-Aqaba et al., 2010; Marfurt et al., 2010; Patel & McGhee, 2005, 2008). Estas espirales, observadas en el humano, también se encuentran en otras especies de mamíferos (Dvorscak & Marfurt, 2008; He et al., 2019, 2021; Marfurt et al., 2019), incluyendo al ratón (Figura 1.6A) (Ivanusic et al., 2013; Mckenna & Lwigale, 2011; Yu & Rosenblatt, 2007). Se desconocen los mecanismos implicados en la formación del vórtice, aunque se especula que su formación puede estar causada por la migración centripeta de las células basales del epitelio (Nagasaki & Zhao, 2003; Patel & McGhee, 2005).



**Figura 1.7 Anatomía microscópica de las fibras nerviosas de la córnea humana.**

**A.** Un nervio estromal anterior ramifica y penetra en la membrana de Bowman (círculos) y de cada punto de penetración surgen las “traíllas nerviosas del epitelio” formadas por un conjunto de 16-18 fibras subbasales. La línea negra indica el plano aproximado de una sección transversal de 30 µm de grosor (en una córnea diferente), de la imagen mostrada en **B.** Ésta muestra las fibras subbasales (flechas) dispuestas en paralelo entre ellas en la capa de las células basales del epitelio, por encima de la membrana de Bowman (bm). Un nervio de pequeño diámetro (punta de flecha) penetra desde el estroma (s) al epitelio (e) a través de la membrana de Bowman. **C.** Micrografía electrónica de la sección transversal de una fibra subbasal compuesta por ocho axones no mielinizados individuales en los que se observan las mitocondrias. Los axones están ubicados dentro de un ensanchamiento de la hendidura intercelular entre dos células epiteliales basales adyacentes. Las mitocondrias se pueden observar en el interior de algunos axones (M). **D.** Imágenes de una fibra subbasal mielinizada (izquierda) y una no mielinizada (derecha). My, vaina de mielina; N, núcleo; S, célula de Schwann. Barras de escala: A-B, 20 µm; C, 1 µm; D, 3 µm. Imágenes A y B obtenidas de Marfurt et al., 2010; C y D, de Müller et al., 2003.

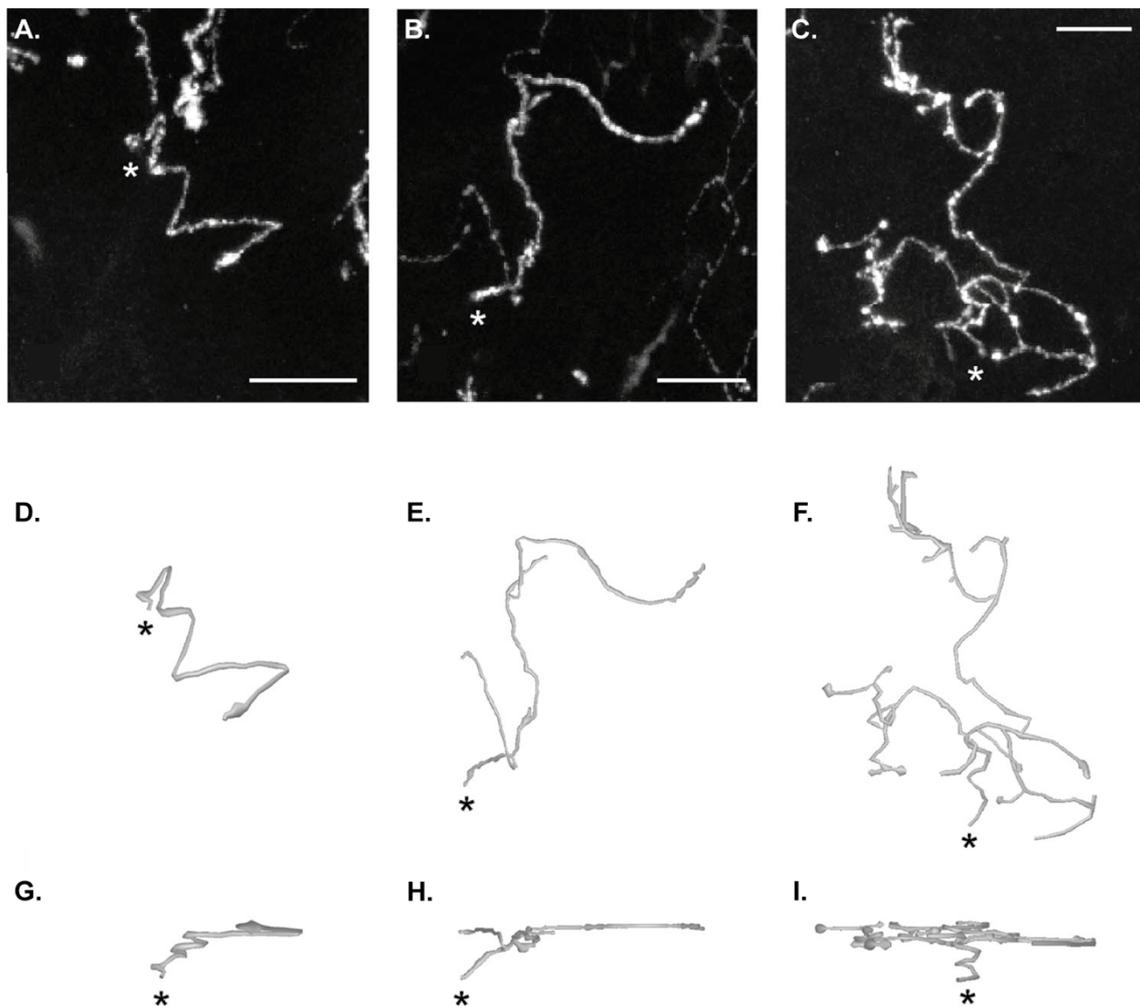
#### *1.1.2.2.4. Terminaciones intraepiteliales.*

Las fibras subbasales, a lo largo de su recorrido, emiten terminaciones nerviosas libres que ascienden verticalmente a través de las células epiteliales, y a su vez pueden ir ramificándose hasta alcanzar la superficie del epitelio (Figura 1.5 y 1.6E-I) (Ivanusic et al., 2013; Marfurt et al., 2010; Müller et al., 2003; Rózsa & Beuerman, 1982). Sin embargo, algunas fibras subbasales terminan formando pequeños botones a nivel de la capa de células basales del epitelio (Ivanusic et al., 2013).

La terminación intraepitelial comprende la estructura individual del axón epitelial desde su punto de origen en la fibra subbasal hasta su extremo más distal incluyendo todas sus ramificaciones (Figura 1.6G-I y 1.8) (Marfurt et al., 2010). Se han descrito tres tipos morfológicos de terminaciones en función del número de ramificaciones que presentan: terminaciones simples, ramificadas y complejas (Ivanusic et al., 2013).

Las terminaciones intraepiteliales simples no tienen puntos de ramificación y acaban con un engrosamiento apical en la capa de las células escamosas del epitelio corneal (Figura 1.6G y 1.8A, D, G); son más abundantes en el centro de la córnea que en la periferia (Ivanusic et al., 2013). Las terminaciones ramificadas poseen alrededor de 3-4 ramas horizontales a nivel de las células escamosas. Estas ramas están dispuestas horizontalmente a la superficie y al igual que las terminaciones simples, acaban con un engrosamiento en sus extremos apicales (Figura 1.6H y 1.8B, E, H); este tipo de terminación es más abundante en la periferia de la córnea (Ivanusic et al., 2013). El tercer tipo morfológico lo forman las terminaciones complejas, que emiten numerosas ramificaciones en la capa de células aladas y forman terminaciones bulbosas cuando alcanzan las capas más superficiales del epitelio (Figura 1.6I y 1.8C, F, I). Las terminaciones complejas se localizan tanto en el centro como en la periferia de la córnea, aunque su complejidad y tamaño es mayor en la periferia (Ivanusic et al., 2013).

La literatura científica ha estimado que en el área central de la córnea de humanos hay alrededor de 2500 terminaciones/mm<sup>2</sup> (Oyster, 1999) o incluso 16000 terminaciones/mm<sup>2</sup> (Guthoff et al., 2005). Sin embargo, estudios más recientes las cuantifican en aproximadamente 600-700 terminaciones/mm<sup>2</sup> (Marfurt et al., 2010). La densidad de terminaciones intraepiteliales varía en función de la edad (Alcalde et al., 2018; Dvorscak & Marfurt, 2008; C. Wang et al., 2012) y en determinadas patologías (Gao et al., 2016; Guerrero-Moreno et al., 2020; He & Bazan, 2012).



**Figura 1.8. Tipos morfológicos de terminaciones intraepiteliales en la córnea de ratón.** Según el número de ramificaciones que tengan las terminaciones nerviosas se distinguen tres tipos morfológicos: simples (A, D, G), ramificadas (B, E, H) y complejas (C, F, I). **A-C.** Imágenes confocales de terminaciones nerviosas individuales teñidas con el anticuerpo anti-PGP9.5 en preparaciones de córnea aplanada. **D-F.** Reconstrucción 3D de las terminaciones intraepiteliales mostradas en A-C desde el punto en el que se originan en la fibra subbasal (asterisco) hasta su extremo más distal. **G-I.** Vista lateral de las reconstrucciones en 3D D-F, respectivamente. La barra de escala de las reconstrucciones es la misma que la de las imágenes confocales. Barra de escala: 10  $\mu$ m. Imagen extraída de Ivanusic et al., 2013.

### **1.1.2.2.3. Características funcionales y moleculares de la innervación sensorial.**

Las terminaciones intraepiteliales de la córnea son las responsables de detectar los estímulos procedentes del medio externo (químicos, térmicos y mecánicos) y de realizar el proceso de transducción sensorial, iniciando de este modo la cascada de eventos que conducen a la percepción consciente de las diferentes modalidades sensoriales y a la activación de las vías autonómicas eferentes implicadas (Belmonte et al., 1997, 2017; Belmonte & Gallar, 2011).

Diversos estudios electrofisiológicos de la innervación sensorial corneal describen la existencia de tres tipos de neuronas sensoriales primarias: mecanonociceptoras, nociceptoras polimodales y termorreceptoras de frío (Figura 1.9) (Belmonte et al., 1991, 1997; Belmonte, Acosta, et al., 2004; Belmonte, Aracil, et al., 2004; Gallar et al., 1993; González-González et al., 2017). Estos tres tipos de neuronas también pueden ser clasificadas en base a su morfología y a su fenotipo molecular (Alamri et al., 2015; Bron et al., 2014; Ivanusic et al., 2013).

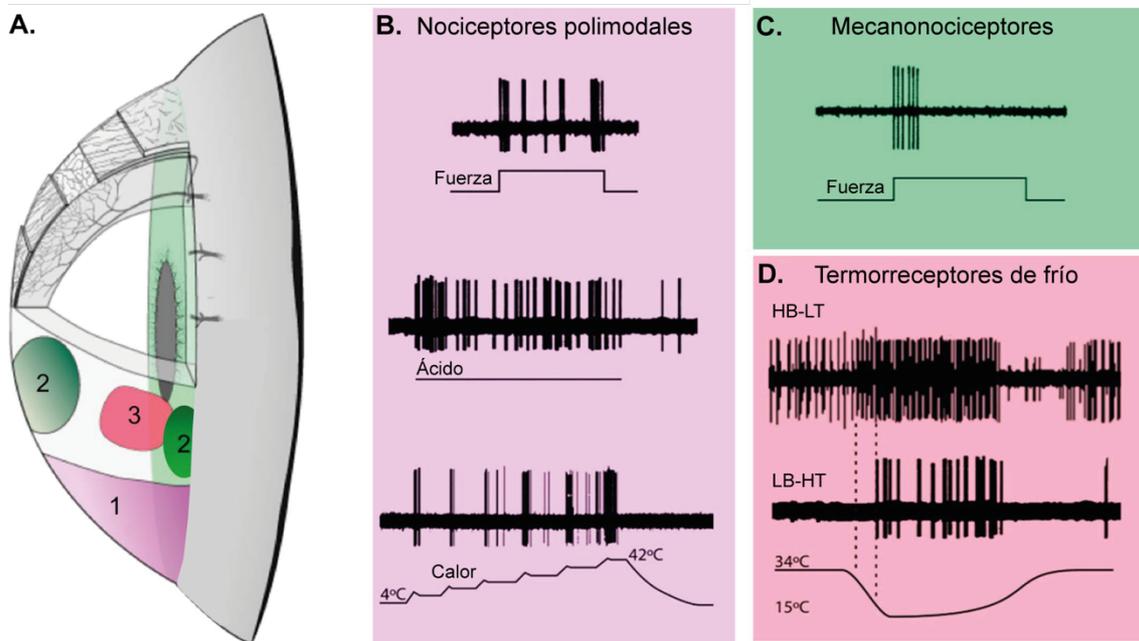
#### *1.1.2.2.3.1. Nociceptores polimodales.*

La córnea está innervada mayoritariamente por fibras nociceptoras polimodales (~70%) (Figura 1.9A) (Belmonte, Acosta, et al., 2004; Gallar et al., 1993) aunque esta proporción puede variar según la especie; en el ratón, por ejemplo, representan el 41% (González-González et al., 2017). Cuando el tejido que innervan está intacto, los nociceptores polimodales tienen una baja o nula actividad. Cuando se activan, producen una irregular descarga de impulsos nerviosos, de frecuencia proporcional a la intensidad del estímulo (Figura 1.9B) (Belmonte et al., 1991; Belmonte, Acosta, et al., 2004; Belmonte & Giraldez, 1981; Gallar et al., 1993). Los nociceptores polimodales son sensibles a estímulos de muy distinta naturaleza, tales como sustancias químicas irritantes, calor o fuerzas mecánicas de

intensidad cercana a la lesión tisular o abiertamente nocivas (Belmonte et al., 1994; Belmonte & Giraldez, 1981; Tanelian & Beuerman, 1984). También son activados por mediadores químicos endógenos, liberados por el tejido corneal dañado tras producirse una lesión, como protones, prostaglandinas u otros producidos por células inflamatorias residentes o que migran desde los vasos sanguíneos que irrigan el limbo (Xiaojie Chen, Belmonte, et al., 1997; Xiaojie Chen, Gallar, et al., 1997). Cuando los nociceptores polimodales son estimulados de modo repetido se sensibilizan, es decir, disminuyen su umbral de respuesta e incrementan la frecuencia de disparo evocada por los estímulos subsiguientes (Belmonte & Giraldez, 1981; Bessou & Perl, 1969).

El principal transductor molecular de los nociceptores polimodales es el canal iónico TRPV1, miembro de la subfamilia vaniloide (TRPV) dentro de la superfamilia de canales iónicos con potencial de receptor transitorio (TRP, del inglés "*transient receptor potential*"). Por ello, el receptor TRPV1 es ampliamente utilizado como marcador molecular de este tipo de neuronas sensoriales nociceptoras (Alamri et al., 2018; Tominaga et al., 1998). El TRPV1 es activado directamente por la capsaicina, el calor nocivo ( $>42^{\circ}\text{C}$ ), los protones ( $\text{pH}>6.5$ ) (Belmonte et al., 1991; Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998) y las soluciones hiperosmolares (Gallar et al., 1993; Naeini et al., 2006) y también indirectamente por una amplia variedad de mediadores inflamatorios endógenos (Caterina et al., 2000). Otro transductor molecular presente en una fracción de las neuronas polimodales, también perteneciente a la superfamilia TRP, es el receptor TRPA1, miembro de la subfamilia anquirina. Este canal iónico es sensible a gran número de irritantes químicos exógenos, toxinas de origen natural, agentes pruritogénicos, fuerzas mecánicas de alta intensidad y temperaturas frías nocivas (Bandell et al., 2004; Patapoutian et al., 2003; Vilceanu & Stucky, 2010) así como a lipopolisacáridos bacterianos (Meseguer et al., 2014). Otros canales iónicos, también presentes en las neuronas sensoriales nociceptoras, son los canales iónicos que detectan la acidificación del medio (ASICs) (Callejo et al., 2015) y los P2X, que se activan en respuesta a la molécula adenosín trifosfato (ATP) (Bouvier et al.,

1991; Rae et al., 1998; Robertson et al., 1996). Los nociceptores polimodales pueden expresar adicionalmente el canal iónico mecanosensible Piezo2 (Bron et al., 2014; Fernández-Trillo et al., 2020).



**Figura 1.9. Tipos funcionales de fibras sensoriales corneales.**

**A.** Esquema representativo de la localización y tamaño de los campos receptores de las diferentes clases de fibras sensoriales. **B-D.** Representación de la descarga de impulsos eléctricos registrada en respuesta a diferentes estímulos en fibras nociceptoras polimodales (B), en mecanonociceptoras (C) y en termorreceptoras de frío (D). Los diferentes estímulos aplicados para cada tipo funcional de fibra están trazados en cada una de las figuras. Figura extraída y modificada de Belmonte, 2019.

Además de las neuronas nociceptoras polimodales “canónicas”, hay evidencia indirecta de la presencia en la córnea de terminaciones nerviosas pertenecientes a un subtipo de neuronas nociceptoras de alto umbral, que solo se activan cuando el tejido que inervan se inflama, respondiendo entonces tanto a los estímulos mecánicos como a los químicos o térmicos. Estas neuronas, que podrían llegar a ser hasta el 20% del total de las nociceptoras en los seres humanos, han sido denominadas “nociceptoras silentes” debido a su inactividad, incluso frente a estímulos intensos, en condiciones de integridad tisular (Prato et al., 2017). Es posible que una parte de las neuronas de alto umbral que señalan el dolor y que llamamos nociceptoras, no expresen en condiciones de normalidad tisular un

número suficiente de moléculas transductoras en sus terminaciones periféricas para ser reclutadas, pero sí lo hacen en respuesta al desencadenamiento del proceso inflamatorio (Belmonte, 2019; Michaelis, 1996).

#### *1.1.2.2.3.2. Nociceptores mecánicos.*

Las fibras mecanonociceptoras representan alrededor del 20% de la inervación sensorial de la córnea (Figura 1.9A, C) (Bron et al., 2014; Fernández-Trillo et al., 2020; González-González et al., 2017) y son activadas selectivamente por fuerzas mecánicas provocando una descarga de impulsos de corta duración (fásica) (Figura 1.9C) (Belmonte et al., 1991; Fernández-Trillo et al., 2020; MacIver & Tanelian, 1993).

A nivel molecular, la estimulación mecánica es detectada por el canal iónico Piezo2 (Coste et al., 2010; Ranade et al., 2014). Este canal iónico es el principal transductor de las fuerzas mecánicas inocuas que activan a las neuronas mecanorreceptoras de bajo umbral que inervan la piel, mucosas, músculo, etcétera (Florez-Paz et al., 2016; Ranade et al., 2014; Woo et al., 2014). Sin embargo, Piezo2 ha sido también identificado en neuronas sensoriales primarias que expresan marcadores de nocicepción, por lo que es probable que Piezo2 esté igualmente implicado en la transducción sensorial de estímulos mecánicos nocivos (Coste et al., 2010; Murthy et al., 2018; Nguyen et al., 2017; Szczot et al., 2017; Zheng et al., 2019).

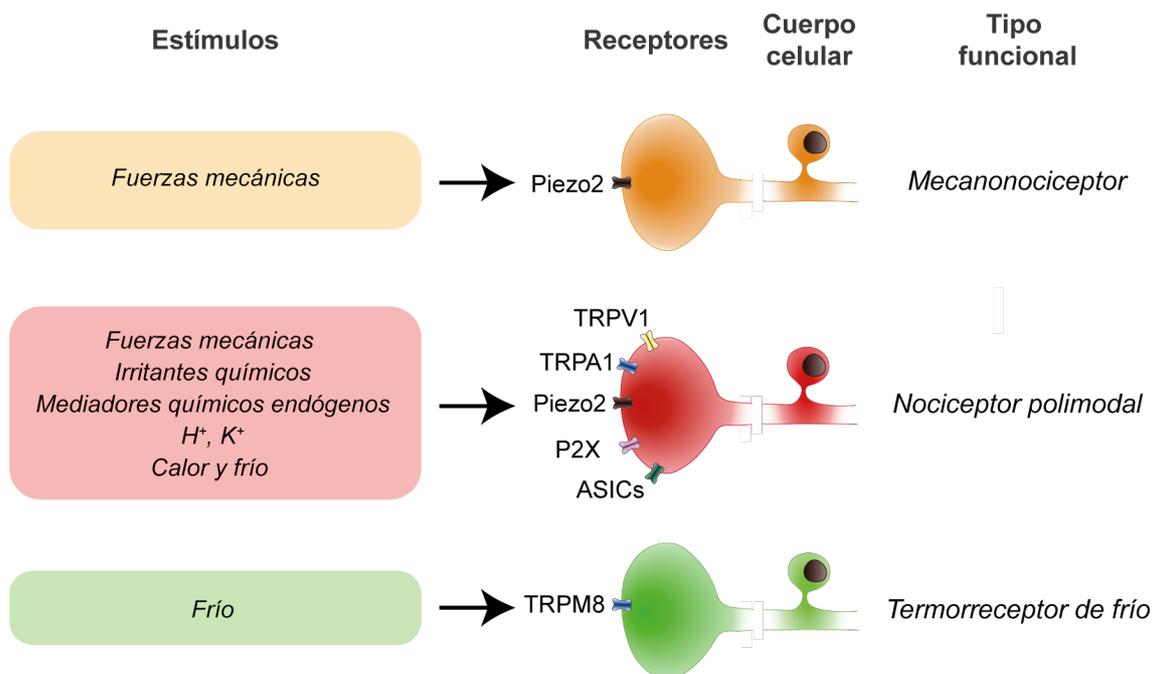
#### *1.1.2.2.3.3. Termorreceptores de frío.*

Las fibras sensoriales sensibles a los descensos de temperatura representan alrededor del 10-15% de la inervación corneal, tienen campos receptores generalmente pequeños y son más abundantes en la periferia de la córnea (Figura 1.9A) (Gallar et al., 1993). De acuerdo con sus características electrofisiológicas, se han distinguido en la córnea dos poblaciones de neuronas sensoriales sensibles al frío. La población predominante (~70%), está compuesta por neuronas que tienen una actividad basal continua a

temperaturas estables similares a las de la superficie corneal (34-35°C), incrementando la frecuencia de descarga de impulsos nerviosos tan pronto se producen descensos de temperatura inferiores a 0.5°C (Belmonte et al., 1991; Brock et al., 2006; Carr et al., 2003; Gallar et al., 1993; Tanelian & Beuerman, 1984). Esta población de fibras termorreceptoras sensibles al frío, con una alta actividad basal (HB) y un bajo umbral de activación (LT) (del inglés "*high background-low threshold*"), es similar a la población de termorreceptores de frío descrita en la piel y otros tejidos, responsables de las sensaciones térmicas conscientes y la regulación de la temperatura (Belmonte et al., 2017). En la córnea han sido denominados termorreceptores de frío tipo HB-LT (Figura 1.9D) (González-González et al., 2017). La actividad de estos termorreceptores de frío aumenta por la aplicación de estímulos de frío estáticos a diferentes temperaturas y en mayor medida por estímulos dinámicos de frío (Gallar et al., 1993; Kovács et al., 2016). Además, las fibras termorreceptoras de frío HB-LT son también sensibles a incrementos moderados de osmolaridad, como los que causa la evaporación de las lágrimas (Gallar et al., 1993; Hirata & Meng, 2010; Kurose & Meng, 2013; Parra et al., 2014; Quallo et al., 2015). Una segunda población, más minoritaria (~30%), de neuronas corneales sensibles de frío es la llamada termonociceptora de frío tipo LB-HT (del inglés "*low background-high threshold*"), que presentan una baja actividad basal (LB) y requieren enfriamientos más intensos para activarse, es decir, tienen un umbral de frío alto (HT) comparadas con las HB-LT. Por ello, en condiciones de temperatura y sequedad corneales normales permanecen silentes y únicamente se activan cuando detectan disminuciones de temperatura de al menos 4°C, produciendo una frecuencia de descarga de impulsos nerviosos menor que la de los termorreceptores térmicos HB-LT (Figura 1.9D) (Gallar et al., 1993; González-González et al., 2017; Hirata et al., 2012).

El transductor molecular de los termorreceptores de frío es un canal de la superfamilia TRP perteneciente a la subfamilia melastatina, denominado TRPM8 (Knowlton et al., 2013; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002), ampliamente utilizado para la

identificación molecular de la población de neuronas sensoriales primarias de frío, así como de sus proyecciones periféricas corneales (Dhaka et al., 2008; Parra et al., 2010). El TRPM8 es un canal catiónico no selectivo dependiente de voltaje, que detecta descensos de temperatura y responde a compuestos químicos como el mentol, la icilina (Chuang et al., 2004; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Voets et al., 2007) o el tacrolimus (Arcas et al., 2019), así como a incrementos de la osmolaridad (Parra et al., 2014; Quallo et al., 2015). La expresión de TRPM8 en las neuronas HB-LT es mayor que en las LB-HT y ello determina, en gran medida, la diferente descarga de impulsos nerviosos de los tipos de neuronas sensoriales de frío (Alcalde et al., 2018). Además, parece establecido que las diferencias entre los umbrales de temperatura de los termorreceptores de frío HB-LT y LB-HT se debe también a la expresión diferencial de canales Kv (Madrid et al., 2009; Viana et al., 2002) que actúa como un freno a la excitabilidad por el frío, así como de canales iónicos dependientes de voltaje Nav1.8, que permiten que se mantenga la descarga de impulsos nerviosos aún a bajas temperaturas (Zimmermann et al., 2007) y finalmente de la expresión de canales iónicos HCN (Orio et al., 2012).



**Figura 1.10. Tipos funcionales de neuronas sensoriales corneales.**

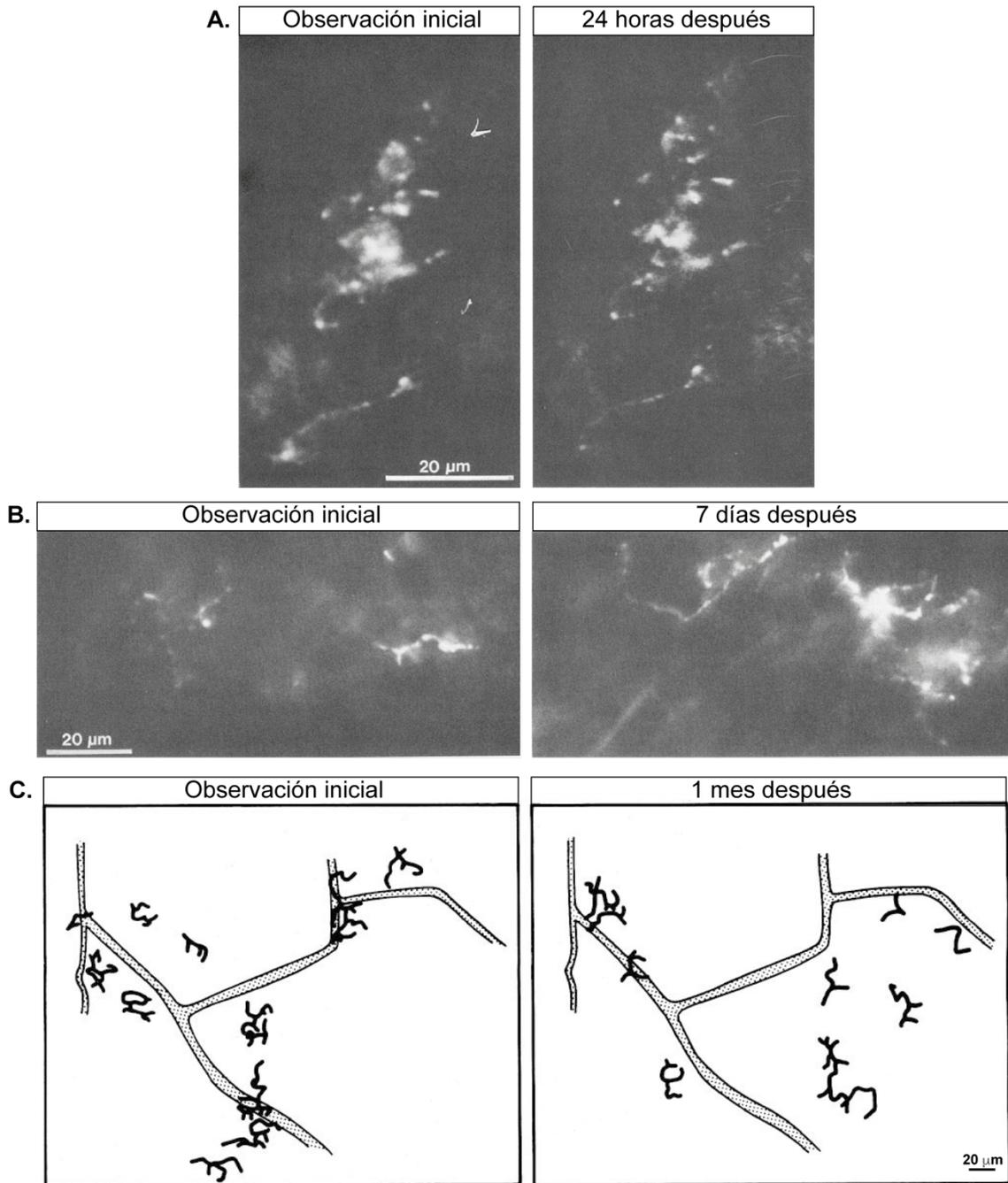
Representación esquemática de las tres poblaciones de neuronas sensoriales primarias que inervan la córnea y de los canales iónicos responsables de la detección y transducción sensorial de las diferentes modalidades de estímulos. Figura adaptada de Belmonte & Viana, 2008.

Finalmente, cabe destacar que una fracción de los termorreceptores de frío dispara también en respuesta a calor nocivo (Hirata et al., 2012). Es posible que esta respuesta “paradójica” se deba a que tales neuronas expresan también TRPV1 (Alamri et al., 2015).

**1.2. Remodelación espontánea de la inervación sensorial corneal.**

En 1989, Harris y Purves describieron por vez primera los cambios morfológicos espontáneos que experimentan los nervios que inervan la córnea, al lograr su monitorización *in vivo* en ratones adultos (Harris & Purves, 1989). La aplicación sobre la superficie ocular del colorante catiónico mitocondrial 4-Di-2-ASP (4-(4-dietilaminostiril)-N-metilperidinio iodado) les permitió teñir transitoriamente los nervios corneales y visualizarlos con un microscopio de epifluorescencia, permitiendo registrar *in vivo* la morfología de fibras nerviosas corneales individuales a diferentes intervalos de tiempo, comprendidos entre 4 horas y 30 días (Harris & Purves, 1989).

Con ello pudieron establecer objetivamente que las proyecciones periféricas de las neuronas sensoriales primarias que inervan la córnea experimentan cambios morfodinámicos tanto en su configuración estructural como en su distribución espacial (Figura 1.11). Además, observaron que el grado de remodelación espontánea de las fibras nerviosas corneales variaba según su nivel anatómico. Así, tanto las fibras nerviosas que componen el plexo subbasal como sus terminaciones epiteliales están continuamente reorganizándose a lo largo del tiempo, poniendo en evidencia que la inervación del epitelio corneal experimenta una remodelación morfológica espontánea (Figura 1.11A-C). Por el contrario, las fibras nerviosas estromales mantenían estable su estructura y posición espacial a lo largo del tiempo de estudio (Figura 1.11C) (Harris & Purves, 1989).



**Figura 1.11. Remodelación espontánea de la inervación corneal en ratón adulto.**

A, B. Imágenes de fluorescencia *in vivo* de las terminaciones nerviosas en las que se observan diferencias en la configuración estructural y en la distribución espacial a las 24 horas (A) y a los 7 días (B) desde su primera observación. C. Las fibras nerviosas estromales mantienen su morfología y su distribución espacial estable durante el mes posterior a su primera observación; sin embargo, las terminaciones nerviosas experimentan tanto cambios morfológicos como cambios en su distribución espacial. Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ . Figura extraída y modificada de Harris & Purves, 1989.

Trabajos más recientes han demostrado la expresión de la proteína GAP43 (del inglés “*growth associated protein 43*”) en los axones subbasales y en sus terminaciones intraepiteliales (R. E. Martin & Bazan, 1992; Stepp et al., 2017). Esta proteína está implicada en la extensión y guía axonal y se sobreexpresa tras la lesión de los nervios sensoriales periféricos (Shaheen et al., 2014). Por tanto, la expresión de GAP43 en las terminaciones y axones intraepiteliales corneales en ausencia de lesión, sugiere la existencia de un proceso activo de crecimiento axonal en la córnea intacta, apoyando la conclusión de Harris y Purves de que la inervación corneal está continuamente sujeta a procesos de remodelación espontánea (Stepp et al., 2017).

Pese a estos datos y al creciente interés científico de las últimas décadas por entender los procesos de degeneración y regeneración de los axones periféricos en neuronas sensoriales primarias, no existen observaciones experimentales recientes que cuantifiquen la magnitud y el curso temporal de la aparente plasticidad morfológica adscrita en las terminaciones nerviosas sensoriales periféricas *in vivo*, más allá de la mencionada descripción cualitativa realizada por Harris y Purves el siglo pasado. Por ello, en este trabajo de tesis se ha pretendido utilizar la córnea, como modelo experimental para llevar a cabo un análisis morfométrico dinámico de las modificaciones que experimentan las fibras subbasales y sus terminaciones en neuronas de frío del epitelio corneal, mediante su monitorización *in vivo* en ratones adultos.

### **1.3. Degeneración y regeneración de axones periféricos tras su lesión.**

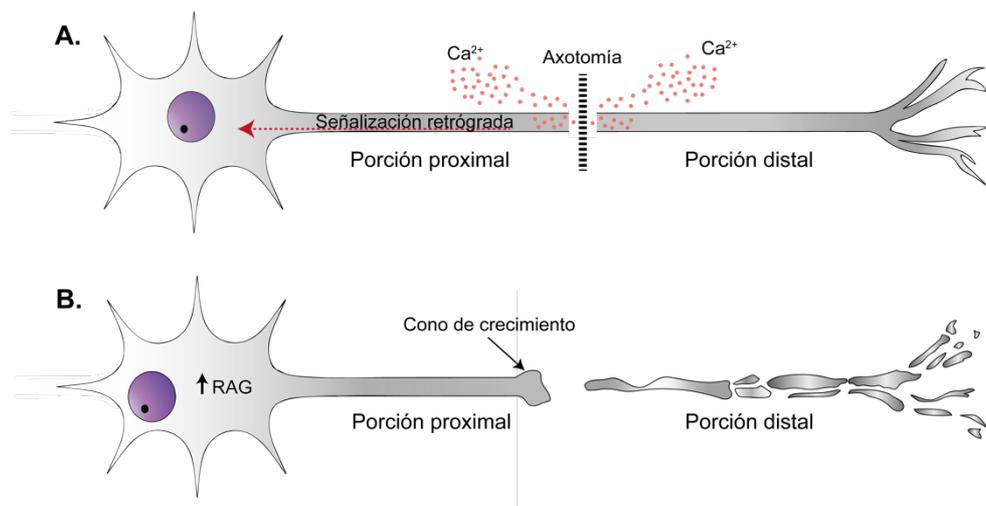
El sistema nervioso periférico posee una notable capacidad de regenerar tras sufrir una lesión. Sin embargo el daño causado a los axones aferentes de neuronas somatosensoriales primarias genera importantes alteraciones morfológicas y funcionales (Bech et al., 2018; Geuna, 2015; Piña et al., 2019) cuya trascendencia y duración varían en

función de la magnitud y de la localización del daño periférico (Beuerman & Schimmelpfennig, 1980; De Felipe & Belmonte, 1999; Geuna, 2015).

Cuando se produce una lesión en algún lugar de la anatomía de las neuronas sensoriales periféricas, se activa una compleja respuesta celular. Así, en el segmento distal de un axón lesionado se pone en marcha el llamado proceso de degeneración Walleriana (DW), que determina la degradación del fragmento de axón distal a la lesión, mientras que en la porción proximal, todavía conectada al cuerpo celular, se inicia la “fase de regeneración” (Figura 1.12) (Gumy et al., 2010).

La DW es un proceso caracterizado por la activación de una serie de señales moleculares, que causan una rápida desintegración granular del citoesqueleto, tumefacción de las mitocondrias y fragmentación del segmento nervioso distal a la lesión (Waller, 1851). Las investigaciones sobre el curso temporal de los eventos que acontecen tras la lesión axonal han mostrado que, en cuestión de segundos, los iones  $Ca^{2+}$  del medio extracelular penetran en las porciones nerviosas proximal y distal de la zona lesionada, a través de los canales de calcio (Figura 1.12A). A continuación, en una horquilla de tiempo que va desde unos minutos a unas pocas horas tras la lesión, se produce la proteólisis dependiente de  $Ca^{2+}$  mediada por la enzima calpaína, que trae como resultado una degeneración de los segmentos axónicos proximales y distales al sitio de la lesión de varios cientos de micrómetros (Figura 1.12B) (DeFrancesco-Lisowitz et al., 2015; Gordon, 2015; Kerschensteiner et al., 2005). Además, se inicia una cascada de respuestas celulares que trae consigo la activación de las células gliales e inmunitarias encargadas de la eliminación de los detritos resultantes de la degradación del axón (DeFrancesco-Lisowitz et al., 2015). En este sentido, las células de Schwann juegan un papel fundamental en la reabsorción de los residuos axónicos y en la reparación axonal (Campana, 2007). No obstante, en la córnea, cabe recordar que las células de Schwann están restringidas al estroma; las “mielinizantes” localizadas exclusivamente en los nervios de la periferia del estroma, mientras que las “no mielinizantes” en el centro del estroma asociadas a los nervios estromales amielínicos

(Müller et al., 2003). Una vez que los nervios estromales atraviesan la membrana basal y alcanzan el epitelio para formar los nervios intraepiteliales, estos pierden el apoyo de las células de Schwann. Es importante señalar, sin embargo, que en el epitelio corneal son las células basales las que aparentemente desempeñan una función similar a las de Schwann en lo que se refiere a la reabsorción de los residuos axónicos y la reparación axonal después de producirse la lesión de las fibras corneales (Stepp et al., 2017).



**Figura 1.12. Proceso de degeneración y regeneración intrínseco al axón periférico lesionado.** Tras la axotomía, se produce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en las porciones proximal y distal de la lesión, activando una cascada de señalización molecular retrógrada desde el área lesionada hasta el soma (A). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la porción distal causa la proteólisis mediada por calpaína, que provoca su degeneración (B). En el soma se sobreexpresan los genes RAG que determinan la formación del cono de crecimiento y la elongación del axón (B).

En paralelo al proceso de degeneración de la porción distal a la lesión, en el extremo proximal tiene lugar la activación de una cascada de señalización retrógrada que viaja hasta el núcleo neuronal y que es consecuencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Figura 1.12A) (Gordon, 2015). Estos eventos traen consigo el sellado de la membrana en el extremo proximal y la formación del cono de crecimiento, esencial para que comience el proceso de regeneración en el área denervada (DeFrancesco-Lisowitz et al., 2015; Gordon, 2015; Ramon y Cajal, 1928; Scheib & Höke, 2013). Además, como respuesta a la cascada de señalización retrógrada, en el soma neuronal se sobreexpresan genes asociados a la

regeneración (RAG, del inglés “*regeneration-associated genes*”), necesarios para la promoción de este proceso (Figura 1.12B) (DeFrancesco-Lisowitz et al., 2015; Gordon, 2015; Ma & Willis, 2015; Scheib & Höke, 2013).

Finalmente, cabe señalar que la capacidad de regeneración en respuesta a una lesión está determinada por otros factores adicionales a los intrínsecos de la propia neurona, como la presencia de un entorno permisivo en el que los axones puedan alargarse, o la intervención de células no neuronales como las células de Schwann (DeFrancesco-Lisowitz et al., 2015).

### **1.3.1. Modelos experimentales de degeneración y regeneración de los axones periféricos.**

En la actualidad, la mayoría de los estudios sobre la degeneración axonal periférica han sido realizados en modelos experimentales *in vitro* (Geisler et al., 2019; Ketschek et al., 2022; Osterloh et al., 2012) o en tejidos fijados y analizados a diferentes tiempos de estudio (Geisler et al., 2019; Gerdts et al., 2015; Ketschek et al., 2022; Osterloh et al., 2012). Los estudios *in vivo* sobre degeneración del axón periférico tras su lesión han sido realizados principalmente en el pez cebra (Asgharsharghi et al., 2021; Di Stefano et al., 2017; Tian et al., 2020; Tian & López-Schier, 2020), aprovechando su transparencia, que permite practicar lesiones muy precisas y localizadas de fibras nerviosas periféricas mediante láser, con una afectación mínima del tejido circundante. Este modelo permite, además, la posterior monitorización *in vivo* de la degeneración del axón periférico. Todo ello ha hecho que el pez cebra represente un modelo experimental muy útil para el estudio *in vivo* de los mecanismos moleculares intrínsecos de la degeneración Walleriana en los axones periféricos de los vertebrados.

En los mamíferos, el modelo experimental más utilizado para el estudio de la regeneración de los nervios periféricos ha sido el de lesión experimental del nervio ciático

(Geuna, 2015). En este modelo, las lesiones nerviosas incluyen compresiones o incisiones quirúrgicas, practicadas en diversas especies animales como el ratón, la rata, el conejo o el gato (Pfister et al., 2011; Wood et al., 2011). Para el análisis de la evolución temporal de la reinervación que tiene lugar en las fibras nerviosas lesionadas, la mayoría de investigadores ha utilizado métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos en el tejido fijado (Carriel et al., 2014; Di Scipio et al., 2008; Sinis et al., 2009), cuantificando posteriormente diferentes parámetros morfométricos a distintos tiempos de la lesión nerviosa; muchos de estos estudios han sido complementados con análisis moleculares y funcionales (Geuna, 2015).

En las últimas dos décadas han surgido diversas estrategias en técnicas de microscopía, usando animales transgénicos que expresan proteínas fluorescentes en sus axones nerviosos, lo que permite visualizar la dinámica y el crecimiento axonal *in vivo* durante la reinervación postlesional en ratones adultos (Ertürk et al., 2007; Kerschensteiner et al., 2005; Ylera et al., 2009). Así, la microscopía de excitación de dos fotones ha permitido llevar a cabo lesiones de axones individuales en la médula espinal del ratón, monitorizados después repetidamente a lo largo del tiempo (Lorenzana et al., 2015; Schaffran et al., 2019; Ylera et al., 2009). La ventaja que ofrece la ejecución de fotocoagulaciones con el láser del microscopio de excitación de dos fotones es que, además de provocar lesiones muy precisas en axones individuales, produce daños mínimos en los tejidos circundantes, sin formación de tejido cicatricial y con una baja activación de células gliales o inflamatorias cercanas (Canty et al., 2013; Ylera et al., 2009). Sin embargo, el procedimiento quirúrgico requerido para conseguir una exitosa monitorización de los axones medulares lesionados, presenta una alta dificultad técnica, además de resultar muy invasivo para el animal de experimentación (Farrar et al., 2012; Fenrich et al., 2012; Figley et al., 2013; Schaffran et al., 2019). En este sentido, la córnea parece ser un modelo experimental adecuado para el estudio de la regeneración de los axones periféricos *in vivo* aprovechando que es muy accesible, avascular, transparente y posee una inervación muy densa y exclusiva de neuronas sensoriales bien identificadas morfológica y funcionalmente

(Belmonte, Acosta, et al., 2004; McKay et al., 2019; Reichard et al., 2014; Yu & Rosenblatt, 2007).

Hasta la fecha, los estudios de regeneración de la inervación corneal en modelos animales han empleado diversos tipos de lesiones como son las transecciones parciales o totales (Piña et al., 2019; Rexed & Rexed, 1950; Rozsa et al., 1983; Yu & Rosenblatt, 2007), criolesiones (Chan et al., 1990), trepanaciones (Namavari et al., 2011; Pajoohesh-Ganji et al., 2015; Reichard et al., 2014), queratectomías mediante láser excimer (Bech et al., 2018; Trabucchi et al., 1994) o debridaciones epiteliales (de Leeuw & Chan, 1989; Romano et al., 2014; Wu et al., 2020; Yu et al., 2008), que implican daños tisulares adyacentes e importantes respuestas inflamatorias. Este tipo lesiones practicadas en la córnea de ratones transgénicos que expresan proteínas fluorescentes en el sistema nervioso periférico, han permitido visualizar la reinervación corneal *in vivo* a lo largo del tiempo, tras una lesión (Namavari et al., 2011; Reichard et al., 2014; Yu & Rosenblatt, 2007). No obstante, parece esencial desarrollar un modelo de daño nervioso más selectivo, que minimice los efectos derivados de la lesión tisular no neural. En este sentido, se ha desarrollado recientemente un modelo de lesión de los nervios corneales mediante la fotocoagulación de los axones parentales estromales en ratones adultos, que permite la monitorización *in vivo* de la regeneración del conjunto de axones subepiteliales, del plexo subbasal y terminaciones nerviosa corneales, lo que ha permitido revelar el papel inhibitorio que juega el canal iónico Piezo1 en la regeneración de la inervación corneal en mamíferos (Song et al., 2019). Aunque esta aproximación experimental es adecuada para el estudio de los mecanismos moleculares intrínsecos de la regeneración de los axones periféricos, no contempla el seguimiento individualizado de los cambios morfodinámicos experimentados por la fibra subbasal y sus terminaciones en el epitelio corneal. Además, en el estudio de Song y colaboradores no se cuantifica el tamaño de la lesión producida ni del daño generado en el tejido circundante, más allá del descarte de daños aparentemente visibles en el conjunto de la córnea. Por todo ello, este trabajo de tesis ha desarrollado un nuevo paradigma de lesión

de la inervación corneal, que consiste en la realización de una fotocoagulación de fibras de frío individuales en el plexo subbasal de la córnea, mediante el uso de un láser de femtosegundo y la posterior monitorización *in vivo* y de modo individualizado, de la degeneración y regeneración de la fibra lesionada en ratones adultos. Además, se ha cuantificado el tamaño de la lesión de la fibra nerviosa, así como del tejido circundante a la misma tras la realización de la fotocoagulación.

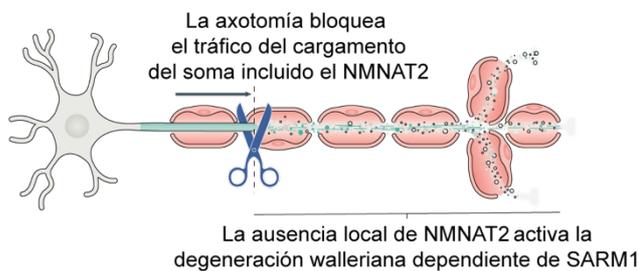
### **1.3.2. Papel de la proteína SARM1 en la degeneración y regeneración de los axones periféricos tras su lesión.**

Recientes investigaciones han identificado la proteína SARM1 (del inglés "*sterile- $\alpha$  and Toll/interleukin 1 receptor motif containing protein 1*") como un mecanismo molecular intrínseco del axón periférico, que resulta clave en la activación de la vía de señalización molecular que induce la DW en la porción distal del axón lesionado (Essuman et al., 2017; Gerdts et al., 2013, 2015; Osterloh et al., 2012). En condiciones normales, SARM1 se encuentra en estado inactivo, pero cuando ocurre la lesión axonal esta proteína se activa, induciendo una rápida destrucción del cofactor metabólico nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), probablemente debido a la pérdida de la enzima nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa 2 (NMNAT2), lo que da lugar al colapso metabólico y la muerte axonal (Figura 1.13A) (Coleman & Höke, 2020; Gerdts et al., 2015; Gilley et al., 2015).

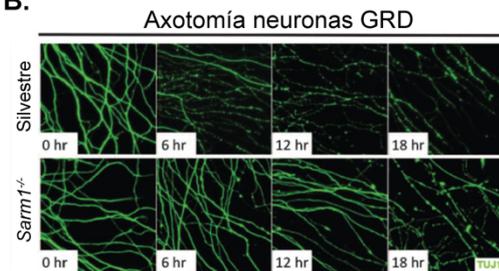
Experimentos con ratones transgénicos que han sufrido una delección genética de SARM1 (*Sarm1*<sup>-/-</sup>), han mostrado que en estos animales se produce un importante retraso en la degradación postlesión de los axones periféricos (Figura 1.13B) (Geisler et al., 2019; Gerdts et al., 2015), lo que ha sugerido, además, que la inhibición de SARM1 puede ser una prometedora estrategia para tratar patologías asociadas a la degeneración axonal (Coleman & Höke, 2020; Geisler et al., 2016, 2019).

Existen evidencias señalan a la DW como un proceso necesario para la correcta regeneración de los axones periféricos lesionados (Gaudet et al., 2011). Sin embargo, no existen estudios directos que analicen la posible implicación de SARM1 en el proceso de regeneración intrínseca de la porción proximal de los axones lesionados. Por ello, en el presente trabajo, se ha estudiado si la proteína SARM1 juega algún papel en la degeneración y regeneración de fibras de frío corneales individuales tras su axotomía por fotocoagulación.

### A. Degeneración Walleriana



### B.



### Figura 1.13. Degeneración Walleriana inducida por la activación de SARM1.

**A.** Esquema representativo de la activación de la DW inducida por una axotomía. La lesión axonal bloquea el tráfico de nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa 2 (NMNAT2) desde el soma, junto con otras moléculas. El NMNAT2 tiene una corta vida media y se metaboliza rápidamente en la porción distal a la axotomía, desencadenando la activación de la DW dependiente de SARM1. **B.** Cultivo primario de neuronas de GRD en un embrión E13.5 del ratón *Sarm1*<sup>-/-</sup> en el que se observa el retraso en el proceso de degeneración a diferentes tiempos tras la axotomía en comparación con las neuronas de un ratón silvestre. Los axones están marcados con el anticuerpo anti-TUJ1 (en verde). Figura A extraída y modificada de Coleman & Höke, 2020; B, obtenida de Osterloh et al., 2012.

## 2. Objetivos

---

### **2.1. Objetivo general.**

Ampliar el conocimiento del fenotipo estructural y molecular de la población de neuronas sensoriales primarias de frío del ganglio trigémino que inervan la córnea del ratón adulto, a fin de emplearlas como un modelo experimental ventajoso para estudiar *in vivo* los cambios morfodinámicos que experimentan los axones periféricos corneales durante el proceso normal de remodelación en condiciones de normalidad y los de degeneración y regeneración tras la lesión axonal periférica.

### **2.2. Objetivos específicos.**

1. Identificar la presencia de marcadores moleculares asociados a nociceptores en las neuronas sensoriales de frío que expresan el canal iónico TRPM8 en el ganglio trigémino de ratones adultos.

2. Realizar la caracterización morfológica de la inervación corneal por fibras que expresan el canal iónico TRPM8 en la córnea del ratón adulto.

3. Identificar la presencia de los canales iónicos Piezo2 y Nav1.8 en fibras nerviosas corneales del ratón adulto.

4. Identificar en los axones periféricos corneales TRPM8<sup>+</sup> de las neuronas trigeminales de frío la posible presencia de marcadores moleculares asociados a las neuronas nociceptoras.

5. Determinar si la morfología de la inervación sensorial corneal por fibras nerviosas TRPM8<sup>+</sup> en el ratón adulto resulta afectada por la eliminación genética del canal iónico TRPM8.

6. Describir la dinámica de la remodelación morfológica espontánea de las fibras sensoriales de frío corneales individuales en ratones adultos.

**7.** Determinar si la ausencia del canal iónico TRPM8 conlleva alteraciones en la morfodinámica de la remodelación espontánea de fibras sensoriales de frío corneales individuales en ratones adultos.

**8.** Describir los cambios morfológicos experimentados por la inervación sensorial por fibras TRPM8<sup>+</sup> tras una lesión quirúrgica de la córnea en ratones adultos.

**9.** Desarrollar un modelo de lesión selectiva de fibras individuales subbasales de frío TRPM8<sup>+</sup> de la córnea del ratón adulto, mediante el uso de un láser de femtosegundos.

**10.** Describir los cambios morfodinámicos experimentados por fibras individuales subbasales de frío TRPM8<sup>+</sup> del epitelio corneal tras su axotomía mediante fotocoagulación en el ratón adulto.

**11.** Determinar la implicación de la proteína SARM1 en la morfodinámica de la degeneración y regeneración de fibras subbasales individuales de frío TRPM8<sup>+</sup> tras su axotomía por fotocoagulación en la córnea de ratones adultos.

### **3. Materiales y Métodos**

---

### **3.1. Animales de experimentación.**

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizaron ratones silvestres C57BL/6J y cinco líneas de ratones modificados genéticamente: *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, *Trpm8<sup>-/-</sup>*, *Trpv1-GFP*, *Piezo2-GFP-IRES-Cre* y *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*. Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo tanto en ratones macho como en hembras de edades comprendidas entre 3 semanas y 6 meses, siguiendo las pautas institucionales de cuidado de animales que recoge el Real Decreto de España 53/2013 y la Directiva de la Unión Europea 2010/63/EU sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Además, los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche y autorizados por la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalitat Valenciana. Los animales fueron criados y estabulados en el animalario de la Universidad Miguel Hernández de Elche en salas con temperatura controlada (21°C), ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y acceso a comida y agua *ad libitum*.

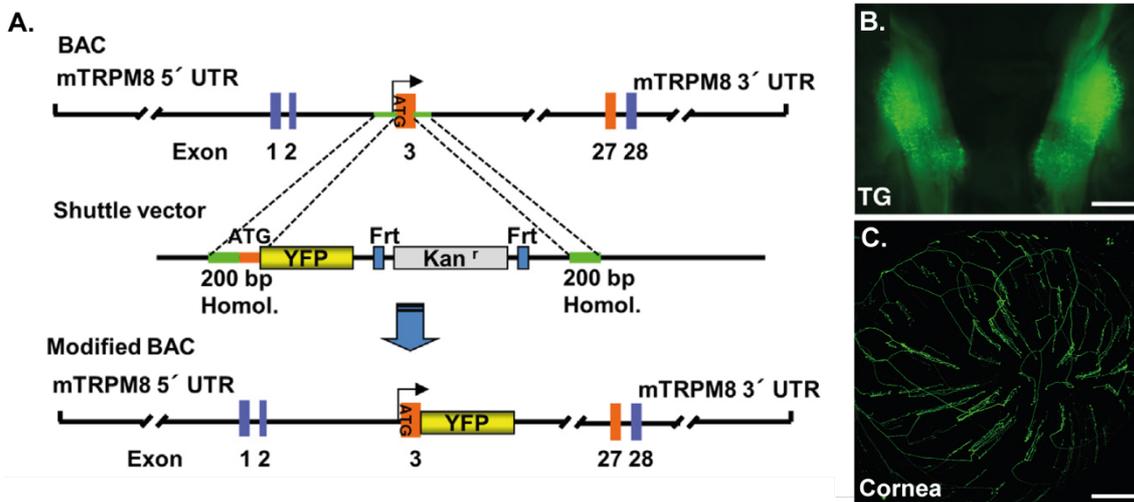
#### **3.1.1. Líneas de ratones modificados genéticamente.**

Las 5 líneas de ratones modificados genéticamente comparten el fondo genético de los ratones silvestres C57BL/6J.

##### **3.1.1.1. Ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

El ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* presenta una modificación genética de tipo *knockin* que permite la expresión de la proteína EYFP bajo el control de las secuencias reguladoras de la transcripción del gen *Trpm8*. La transgénesis fue realizada a través de la modificación de un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que contiene el locus completo de *Trpm8* de ratón, en el que se inserta ADNc que codifica la proteína EYFP (del inglés “*enhanced yellow fluorescent protein*”) (Morenilla-Palao et al., 2014). Esta modificación genética trae consigo

la coexpresión de TRPM8 y EYFP en neuronas sensoriales primarias, de modo que la excitación de la proteína con luz de una longitud de onda de 512 nm produce una emisión de fluorescencia en aquellas neuronas que expresan TRPM8 de forma nativa (Figura 3.1)

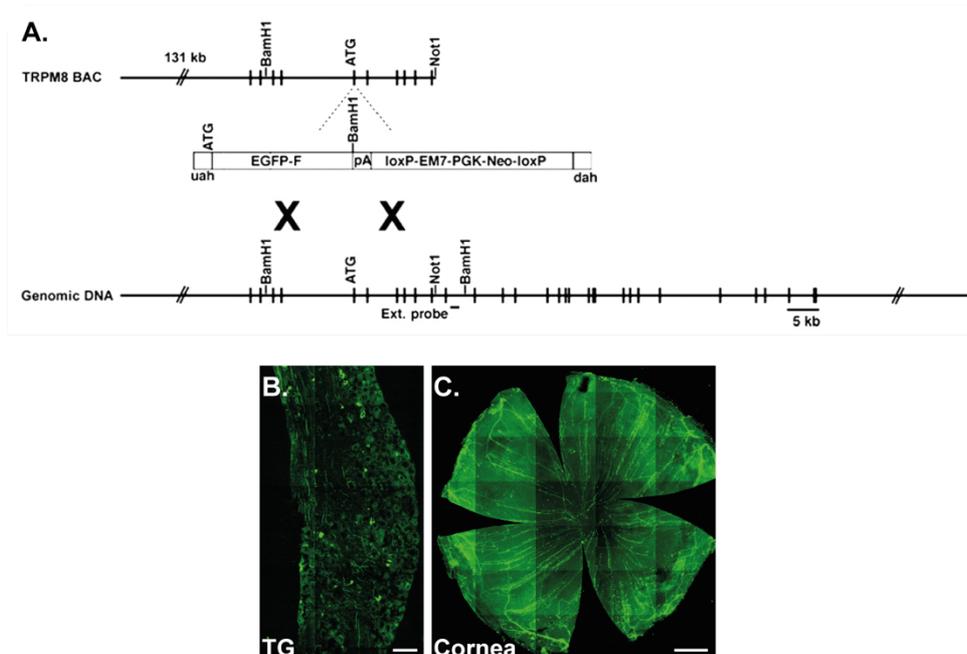


**Figura 3.1. Generación del ratón transgénico *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*.**

A. Representación esquemática de la estrategia de direccionalidad utilizada para obtener un BAC modificado que contiene el gen EYFP y que se expresa bajo la dirección de las secuencias reguladoras del gen *Trpm8* de ratón. B-C. Expresión de la proteína EYFP en neuronas sensoriales del ganglio trigémino (B) y en sus proyecciones periféricas corneales (C) en el ratón *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*. Barras de escala: B, 1 mm; C, 500 µm. Figura modificada de Morenilla-Palao et al., 2014.

### 3.1.1.2. Ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup>.

El ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> presenta una modificación genética de tipo *knockout* que permite anular la expresión del canal iónico TRPM8, además de una modificación genética de tipo *knockin* que permite la expresión de la EGFP (del inglés “*enhanced green fluorescent protein*”) bajo el promotor del gen *Trpm8*. Esta línea transgénica fue generada mediante un constructo de direccionalidad que elimina 27 residuos de TRPM8 en el marco de lectura del codón de iniciación en el exón 5, e inserta en esa posición una proteína EGFP farnesilada seguida por una cola de SV40polyA, que evita la transcripción completa de la proteína TRPM8 a la vez que promueve la expresión de la proteína EGFP (Dhaka et al., 2007). De esta manera, los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> homocigotos expresan EGFP en aquellos somas en los que la transcripción de TRPM8 es incompleta (Figura 3.2).



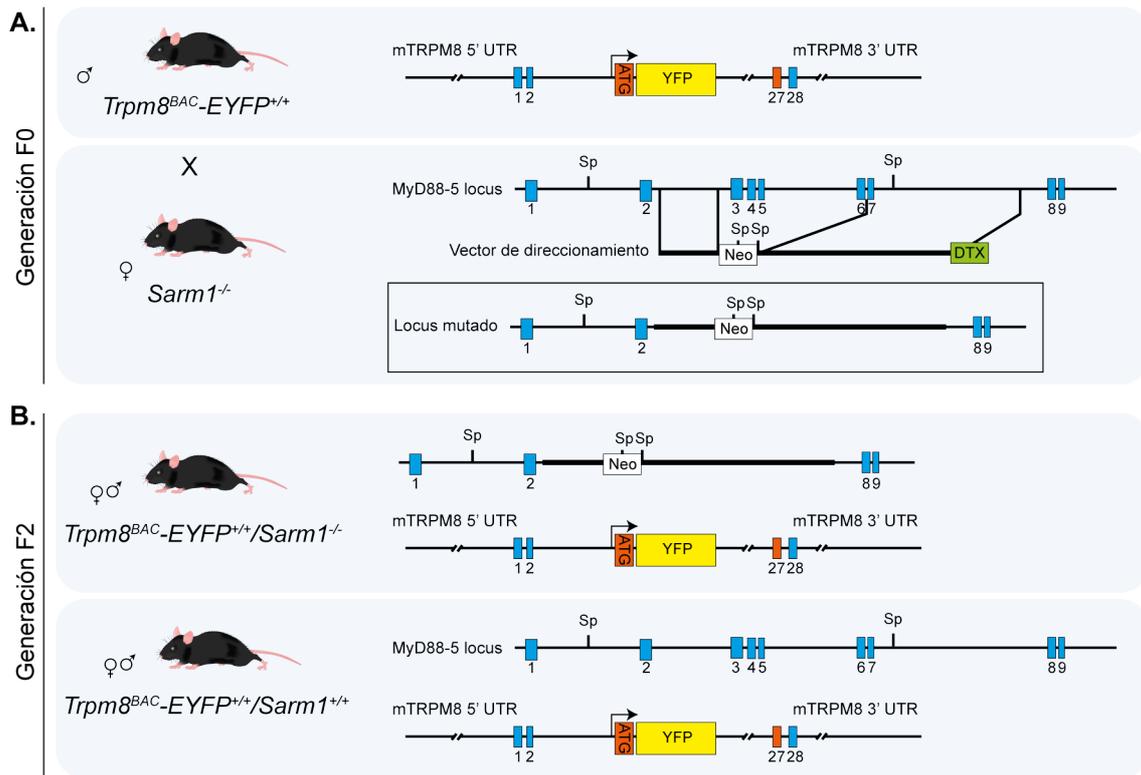
**Figura 3.2. Generación del ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup>.**

**A.** Estrategia de direccionamiento para la disrupción del gen *Trpm8*. **B-C.** Expresión de la proteína EGFP en las neuronas sensoriales carentes de TRPM8 en el ganglio trigémino (B) y en sus proyecciones periféricas corneales (C). Barras de escala: B, 100μm; C, 500 μm. Figura A extraída de Dhaka et al., 2007.

### 3.1.1.3. Ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>/*Sarm1*<sup>-/-</sup>.

El ratón *Sarm1*<sup>-/-</sup> presenta una modificación genética de tipo *knockout* para el gen *Sarm1*. Esta línea genética fue generada mediante un vector de direccionamiento que contiene un casete resistente a neomicina (en orientación inversa) que produce una disrupción desde el exón 3 al exón 6 del gen *Sarm1*, truncando la expresión de la proteína SARM1 (Kim et al., 2007).

Posteriormente, dentro de los objetivos del presente trabajo, esta línea de ratones fue cruzada con la línea *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> para obtener ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>/*Sarm1*<sup>-/-</sup> y los controles *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>/*Sarm1*<sup>+/+</sup> que poseen un genotipo silvestre para *Sarm1* (Figura 3.3). De esta manera, las neuronas sensoriales primarias que expresan de forma nativa la proteína TRPM8 son deficientes en la expresión de la proteína SARM1 a la vez que emiten fluorescencia al ser excitadas con luz a una longitud de onda de 512 nm.

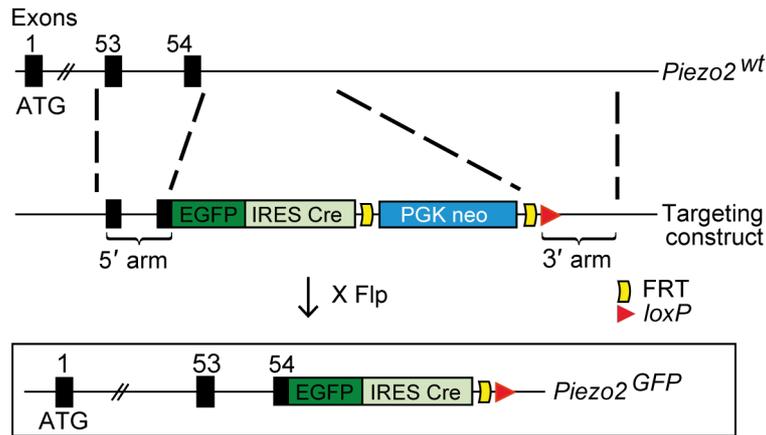


**Figura 3.3. Generación del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

**A.** Se realizó un primer cruce con hembras del ratón *Sarm1<sup>-/-</sup>* y machos *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* para producir la generación F1. **B.** La generación F1 se cruzó entre sí seleccionando animales *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* y los controles *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>+/+</sup>* en la generación F2.

#### 3.1.1.4. Ratones *Piezo2-GFP-IRES-cre*.

El ratón *Piezo2-EGFP-IRES-cre* (*Piezo2<sup>GFP</sup>*) presenta una modificación genética de tipo *knockin* que permite la expresión de la proteína EGFP fusionada al extremo carboxilo terminal de la región codificante de *Piezo2*, seguida la enzima Cre recombinasa expresada a través del sitio de entrada al ribosoma (IRES, del inglés “*internal ribosome entry site*”) (Figura 3.4). Por tanto, los ratones que contienen este alelo expresan la proteína de fusión *Piezo2-GFP*, así como la recombinasa Cre bajo el control del promotor endógeno de *Piezo2* (Woo et al., 2014).



**Figura 3.4. Diagrama esquemático de la generación del alelo *Piezo2<sup>GFP</sup>*.**

El constructo EGFP-IRES-Cre se fusionó con el extremo final del exón 54 (extremo C-terminal de la región codificante de *Piezo2*) seguido de un casete de Neomicina flanqueado por secuencias FRT mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias C2 derivadas de ratones C57BL/6J. Los ratones resultantes se cruzaron con animales que expresan la recombinasa FLP. Imagen extraída de Woo et al., 2014.

### 3.1.1.5. Ratones *Trpv1-EGFP*.

El ratón *Trpv1-EGFP* (Colección GENSAT; Repositorio MMRR, 033029-UCD) presenta una modificación genética de tipo *knockin* que permite la expresión de la proteína EGFP bajo el control de las secuencias reguladoras de la transcripción del gen *Trpv1*. Este ratón fue generado mediante la inserción de un clon BAC que contenía el gen reportero EGFP en el codón de iniciación de la región codificante del exón 1 del gen *Trpv1*. Esta modificación genética implica la coexpresión de TRPV1 y EGFP en neuronas sensoriales primarias. Cuando estas células son excitadas con luz a una longitud de onda de 488 nm se produce la emisión de fluorescencia del fluoróforo permitiendo la identificación de la población de neuronas TRPV1.

### 3.2. Técnicas de inmunofluorescencia en tejido fijado.

#### 3.2.1. Inmunofluorescencia en secciones transversales del ganglio trigémino.

Los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* usados para este estudio fueron anestesiados mediante la inyección intraperitoneal de una mezcla de xilacina (5mg/kg; Xilagesic 20mg/ml Calier, Barcelona, España) y ketamina (16mg/kg; Ketamidol 100 mg/ml, Richter Pharma AG, Wels, Austria). A continuación, se les practicó una perfusión intracardiaca. Para ello, se abrió la caja torácica del animal y se separó el pericardio del corazón dejándolo expuesto, tras lo que se realizó una incisión en el extremo distal del ventrículo izquierdo y se introdujo una cánula de punta roma que estaba conectada a una bomba peristáltica. A través de la aorta ascendente, y generando un flujo continuo de líquido, se introdujeron las soluciones necesarias para la fijación de los tejidos y se facilitó la salida de líquidos del circuito realizando un corte en la aurícula derecha. Para eliminar restos de sangre en el sistema cardiovascular, se introdujo a través de la bomba peristáltica una solución salina al 0.9% durante 3-5 minutos. Posteriormente, se introdujo una solución fijadora, compuesta por paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0.2% diluidos en tampón fosfato salino 0.1M pH 7.4 (PBS), durante 15 minutos. Después, se diseccionaron los GT y se postfijaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la misma solución fijadora. Tras 5 lavados de 10 minutos cada uno, los GT se introdujeron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% durante 16-24 horas. Transcurrido este tiempo, los GT fueron embebidos en bloques con Tissue-Tek® O.C.T. Compound (#94-4583, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y congelados rápidamente en nitrógeno líquido. Los bloques fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

Los bloques que contenían los GT fueron cortados en serie, en secciones de 7 µm de grosor con un criostato (Leica Microsystem, Mannheim, Alemania), y se montaron en portaobjetos especiales para muestras congeladas (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR). Después, los portaobjetos fueron congelados a -20°C hasta su uso.

Para realizar la técnica de inmunofluorescencia sobre las secciones, se seleccionó 1 de cada 6 portaobjetos por muestra, de modo que se tenían un total de 5-6 portaobjetos con 2 secciones de GT cada uno. Los diferentes marcadores moleculares fueron estudiados en series diferentes. Todas las secciones seleccionadas se lavaron con PBS para eliminar el OCT. Después, se realizaron lavados con PBS más Triton X-100 (PBS-X) al 0.03% (5 lavados de 5 minutos cada uno) y las secciones se incubaron durante 1 hora con suero de bloqueo (SB), que contenía suero de cabra (SC) al 10% (#S-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido en PBS-X al 0.03% a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se incubaron a 4°C durante 16-24 horas con los anticuerpos primarios (Tabla 3.1) diluidos en SB. A continuación, se hicieron 5 lavados de 5 minutos cada uno y las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 3.1) diluidos en PBS. Las secciones fueron lavadas de nuevo (5 lavados de 5 minutos cada uno) e incubadas 10 minutos a temperatura ambiente con el marcador nuclear 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 2 µm/ml; Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR). Finalmente, las secciones se lavaron con PBS (5 lavados de 5 minutos), se aplicó el medio de montaje (#S3023; DAKO, Glostrup, Dinamarca) y se cubrieron con un cubreobjetos para su visualización.

Se llevaron a cabo controles negativos de todos los anticuerpos secundarios utilizados repitiendo el mismo protocolo, pero sin realizar la incubación con los anticuerpos primarios.

**Tabla 3.1. Anticuerpos primarios y secundarios usados.**

<i>Anticuerpos</i>	<i>Origen</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Catálogo #</i>	<i>Concentración</i>
<i>Anticuerpos primarios</i>				
Anti- neuronal $\beta$ -tubulina clase III	Ratón	BioLegend, San Diego, CA	801201	1:500
Anti-GFP	Pollo	Abcam, Cambridge, MA	ab13970	1:500
Anti-TRPV1	Cabra	Neuromics, Edina, MN	GT15129	1:100
Anti-Nav1.8	Conejo	Abcam	ab93616	1:100
Anti-Piezo2	Conejo	Novus Biologicals, Centennial, CO	NBPI-78624	1:50
Anti-GAP43	Pollo	Abcam	ab134019	1:500
Anti-NF200	Conejo	Sigma Aldrich, St Louis, MO	N4142	1:1000
Anti-Periferina	Conejo	Millipore, Darmstadt, Alemania	AB1530	1:500
Anti-TrkA	Conejo	Millipore	06-574	1:500
Anti-CGRP	Cabra	Abcam	ab36001	1:500
Anti-GFP	Conejo	Thermo Fisher Scientific	A11122	1:500
<i>Anticuerpos secundarios</i>				
Alexa Fluor 488 IgG antiratón	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A11229	1:500
Alexa Fluor 488 IgG anticonejo	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A11008	1:500
Alexa Fluor 488 IgG antipollo	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A11039	1:500
Alexa Fluor 555 IgG antiratón	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A32727	1:500
Alexa Fluor 594 IgG antiratón	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A11032	1:500
Alexa Fluor 594 IgG anticonejo	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A11037	1:500
Alexa Fluor 594 IgG anticabra	Buroo	Thermo Fisher Scientific	A11058	1:500
Alexa Fluor 647 IgG anticabra	Burro	Abcam, Cambridge, MA	ab150131	1:500
Alexa Fluor 647 IgG antipollo	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A21449	1:500
Alexa Fluor 647 IgG anticonejo	Cabra	Thermo Fisher Scientific	A32733	1:500
IgG biotilnada anticonejo	Cabra	Vector Laboratories	BA-1000	1:200

### 3.2.2. Inmunofluorescencia de la inervación corneal en preparaciones de córnea entera.

Los ratones C57BL/6J, *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, *Trpm8<sup>-/-</sup>*, *Trpv1-GFP*, *Piezo2-GFP-IRES-Cre* y *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* usados en los diferentes experimentos fueron sacrificados mediante la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol, Lure, Francia). A continuación, se realizó una dislocación cervical y los ojos fueron cuidadosamente enucleados. Seguidamente, se practicó una punción en el limbo esclerocorneal de los ojos con el objetivo de que la solución fijadora penetrara en el interior del ojo y la fijación resultase homogénea. Los ojos fueron posteriormente fijados durante un tiempo de 25 min-2 horas en una solución compuesta por metanol y dimetilsulfóxido (4:1), en agitación y a temperatura ambiente. Los tiempos de fijación fueron establecidos según los anticuerpos primarios utilizados en los diferentes ratones empleados (Tabla 3.2). A continuación, se procedió a la disección de la córnea y se practicaron 4 cortes formando

un trébol de 4 pétalos para así aplanar la córnea. Inmediatamente después, las córneas fueron postfijadas durante 5 minutos en metanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  y rehidratadas en una batería decreciente de metanol con PBS. Las córneas se lavaron 3 veces en PBS-X al 0.1%-1% durante 30 minutos (10 minutos por lavado) y se incubaron durante 30 min-16 horas en SB compuesto por un 1%-2% de albúmina de suero bovino (BSA; #SP-5050; Vector Laboratories) y un 5%-10% de SC (Vector Laboratories), diluido todo en PBS-X (Tabla 3.2). Las concentraciones de las disoluciones y los tiempos de incubación variaron en función de los anticuerpos utilizados (Tabla 3.2). Posteriormente, las córneas fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en suero de bloqueo durante 2-4 días (Tabla 3.2) a  $4^{\circ}\text{C}$  y en agitación moderada (80 r.p.m). Tras la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 3.1), se realizaron 5 lavados en PBS (10 minutos por lavado), y se procedió a la incubación de los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3.1) diluidos en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación moderada. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno en PBS y después, las córneas fueron incubadas con el colorante fluorescente de ADN Hoechst 33342 (#H1399; ThermoFisher Scientific) diluido en PBS (1:1000) durante 10 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos y finalmente, las córneas se montaron en un portaobjetos usando como medio de montaje Fluoromount-G (#00-4958-02; ThermoFisher Scientific, OR, Waltham, USA).

Se hicieron controles negativos de todos los anticuerpos secundarios utilizados mediante la repetición del mismo protocolo de inmunotinción, pero sin realizar la incubación con los anticuerpos primarios.

**Tabla 3.2. Animales empleados, concentración de las disoluciones y tiempos de incubación aplicados en los protocolos de inmunofluorescencia en preparaciones de córnea aplanada.**

<i>Animales</i>	<i>Tiempo fijación</i>	<i>Concentración SB (%) / Tiempo de incubación</i>	<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Tiempo incubación anticuerpos primarios</i>
<i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i> <i>Trpm8<sup>-/-</sup></i> <i>Sarm1<sup>-/-</sup>/Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i>	2 horas	1% BSA; 10% SC; 0.1% Tritón X-100 / 60 min	anti- neuronal $\beta$ -tubulina clase III; anti-GFP	2 días
<i>Trpv1-GFP</i> <i>Piezo2-GFP-IRES-Cre</i>	2 horas	1% BSA; 10% SC; 1% Tritón X-100 / 16 horas	anti- neuronal $\beta$ -tubulina clase III; anti-GFP; anti-Piezo2; anti-TRPV1	4 días
C57BL/6j	25 min	2% BSA; 5% SC; 0.1% Tritón X-100 / 30 min	anti- neuronal $\beta$ -tubulina clase III; anti-TRPV1; anti-Nav1.8	2 días
<i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i>	120 min	1% BSA; 5% SC; 0.1% Tritón X-100 / 120 horas	anti- neuronal $\beta$ -tubulina clase III; anti-GFP; anti-P2X2; anti-P2X3	4 días

Cada protocolo fue usado en un conjunto de experimentos diferente. SB: suero de bloqueo; BSA: albúmina de suero bovino; SC: suero de cabra.

### 3.2.3. Técnica ABC-peroxidasa en preparaciones de córnea entera.

En este bloque de experimentos se usaron ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y *Trpm8<sup>-/-</sup>*. Una vez se enuclearon los ojos tras el sacrificio del animal, se les practicó una punción en el limbo esclerocorneal para que la solución fijadora penetrara en el interior del ojo y la fijación resultase homogénea. A continuación, los globos oculares fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0.2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación moderada (80 rpm). Posteriormente, se diseccionaron las córneas y se les practicó 4 cortes formando un trébol para aplanarlas. Inmediatamente después, las córneas fueron lavadas 3 veces en PBS durante 30 minutos (10 minutos por lavado). Para incrementar la permeabilidad, las muestras se incubaron alrededor de 16 horas a 37°C en una solución que contenía 0.01% de hialuronidasa tipo IV-S (Sigma Aldrich), 0.1% de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Sigma Aldrich) (Marfurt et al., 2010) diluido en una solución reguladora de acetato a pH 6.0. Transcurrido este tiempo, las córneas se lavaron 3 veces en PBS-X al 0.1% (10 minutos por lavado) y fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente en suero de bloqueo compuesto por un 1% de BSA (Vector Laboratories) y un 10% de SC (Vector Laboratories), diluido en PBS-X al 0.1%.

Seguidamente, las córneas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-GFP (1:500; Thermo Fisher Scientific; Tabla 3.1) diluido en suero de bloqueo. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS-X al 0.1% (3 lavados de 10 minutos) y las córneas fueron incubadas durante 2 horas, a temperatura ambiente y en agitación, con un anticuerpo secundario hecho en cabra IgG biotinilado anticonejo (1:200; Vector Laboratories; Tabla 3.1). Posteriormente, las córneas fueron lavadas de nuevo en PBS-X al 0.1% (3 lavados de 10 minutos) y se incubaron durante 2 horas, a temperatura ambiente y en agitación, con el complejo enzimático avidina-biotina-peroxidasa de rábano picante (1:200; Kit ABC, #PK-4001; Vector Laboratories). A continuación, las córneas fueron lavadas 3 veces (10 minutos por lavado) en PBS-X 0.1% e inmediatamente después, se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente en una solución que contenía 0.1% de hidrato de tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina (DAB; #D5637; Sigma Aldrich) y 0.003% de peróxido de hidrógeno (#216763; Sigma Aldrich). La reacción se paró lavando las córneas con PBS (3 lavados de 10 minutos). Después de realizar los lavados, las córneas fueron deshidratadas por inmersión en concentraciones crecientes de etanol, clarificadas con xilol y montadas en cubreobjetos con el medio de montaje Entellan (#1.07960; Sigma Aldrich).

Se realizaron los controles negativos del anticuerpo secundario biotinilado utilizado mediante la repetición del mismo protocolo de inmunotinción pero sin realizar la incubación con el anticuerpo primario.

#### **3.2.4. Adquisición de imágenes.**

Las imágenes de los GT fueron adquiridas con un microscopio de epifluorescencia Leica DM 6000B (Leica Microsystems) equipado con una fuente de iluminación Leica CTR 6000 y una cámara DFC310 FX. El microscopio disponía de un objetivo seco de 10x (HI PLAN I 10x0.22 DRY), un objetivo seco de 20x (HC PL FLUOTAR 20x0.50 DRY) y un objetivo seco

de 40x (HCX FL PLAN 40x0.65 DRY), así como de filtros de fluorescencia L5, TX3 y A4. Las imágenes se adquirieron a una resolución de 1392x1040 píxeles y a una profundidad de 16 bits. Se realizó una adquisición en mosaico automática, y las imágenes que lo componían fueron unidas con una superposición del 10% usando el módulo específico de procesamiento que contenía el software LAS AF de Leica. Todas las imágenes fueron guardadas en el formato de datos Leica Image Format (.lif) para su posterior análisis.

Todas las imágenes de inmunofluorescencia de fibras nerviosas en córneas fijadas se adquirieron con un microscopio confocal invertido Zeiss LSM880 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania). Para ello se utilizó un objetivo con lentes de 25x y de inmersión en agua (Apochromat 25x/0.8 Imm DIC) y un objetivo con lentes de 63x y de inmersión en aceite (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC). Al microscopio se acoplaron diferentes líneas de láser (405, 488, 561, 594 y 647 nm), de modo que los fluoróforos de los anticuerpos secundarios AlexaFluor-488 fueron excitados con luz a longitud de onda de 488 nm, AlexaFluor-555 con luz de longitud de onda de 561 nm, AlexaFluor-594 con luz de longitud de onda de 594 nm, y AlexaFluor-647 con luz de longitud de onda de 635 nm. Los marcadores fluorescentes de unión a ADN, DAPI y Hoescht 33342, fueron excitados con luz de una longitud de onda de 405 nm. La excitación y detección de la señal producida por los fluorocromos se realizó mediante fotomultiplicadores espectrales y de modo secuencial para evitar el solapamiento de los espectros de emisión entre los distintos fluoróforos.

Las imágenes de fluorescencia se adquirieron a una resolución de 1024x1024 píxeles y a una profundidad de 8 bits mediante el software Zen Black versión 2.3 (Carl Zeiss AG). El radio de escaneo fue de 2.05  $\mu\text{s}$ /píxel cuando se utilizó el objetivo de 25x y de 8.19  $\mu\text{s}$ /píxel cuando se utilizó el de 63x. El tamaño de cada píxel es de 0.33x0.33  $\mu\text{m}$  en todas las imágenes adquiridas. El salto de plano (z-step) se definió de acuerdo con el teorema de muestreo de Nyquist-Shannon de 1.39  $\mu\text{m}$  para las imágenes adquiridas a 25x y de 1.15  $\mu\text{m}$  para las adquiridas a 63x. Todas las imágenes fueron guardadas en formato de datos Carl Zeiss Image (.czi) para su posterior análisis.

En las córneas en las que fue aplicada la técnica ABC-peroxidasa, las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Leica DM 6000B (Leica Microsystem) utilizado para las adquisiciones de las imágenes de los ganglios trigéminos. En este caso, las muestras fueron iluminadas con luz transmitida para realizar la adquisición. Las imágenes de campo claro se adquirieron a una resolución de 1392x1040 píxeles y a una profundidad de 16 bits. Se realizó una adquisición en mosaico automática, y las imágenes que lo componían fueron unidas con una superposición del 10% usando el módulo específico de procesamiento que contenía el software LAS AF de Leica. Todas las imágenes fueron guardadas en el formato de datos Leica Image Format (.lif) para su posterior análisis.

### **3.2.5. Procesamiento de imágenes.**

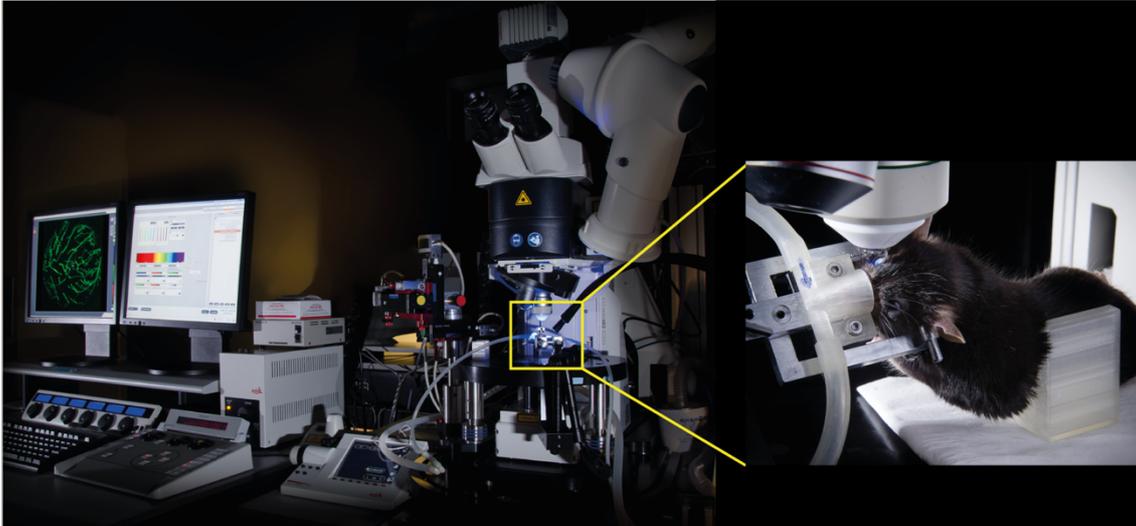
Las imágenes obtenidas de los tejidos fijados fueron procesadas usando el software de análisis de imagen Fiji versión: 2.0.0-rc69/1.52i (NIH). Para la cuantificación de las fibras nerviosas presentes en las imágenes obtenidas de las preparaciones de córnea, así como para la cuantificación manual del número de somas que expresaban los marcadores moleculares TRPM8, TrkA, CGRP, NF200, Periferina y GS-IB4, se usó el complemento “cell counter” habilitado en el software. Los datos obtenidos de ambos análisis se almacenaron en formato de Excel (.xls).

## **3.3. Microscopía de barrido confocal *in vivo* de las fibras nerviosas corneales.**

### **3.3.1. Procedimiento experimental.**

Los ratones transgénicos *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, *Trpm8<sup>-/-</sup>* y *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* utilizados fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de xilacina (Xilagesic 16mg/kg). A continuación, fueron sujetados por la cabeza en un soporte móvil específico de ratón (SGM-4, Narishige International USA, Amityville, NY, USA) mediante sendas barras colocadas sobre los huesos temporales izquierdo y derecho. Para el

mantenimiento de un grado de anestesia estable y prolongado en el ratón, se suministró anestesia volátil durante todo el experimento mediante un vaporizador de isoflurano (FUJIFILM VisualSonics, Toronto, ON, Canadá) que llevaba incorporada una máscara que permitía la inhalación continua de isoflurano (1-2%) a lo largo de todo el experimento (Figura 3.5). El soporte con el ratón fue colocado en una platina *in vivo* para la realización de experimentos de imagen intravital (Luigs&Neuman, Ratingen, Alemania), con motorización XY diseñada para el microscopio DM6000 CFS (Leica Microsystems), todo ello instalado en el microscopio de barrido confocal LEICA SP5-II (Leica Microsystem). Posteriormente, mediante ajustes manuales de la posición del soporte móvil de la cabeza del ratón, se colocó la superficie ocular del ojo derecho bajo el objetivo, permitiendo así la visualización de las fibras nerviosas fluorescentes una vez eran excitadas con el láser correspondiente. El ojo izquierdo fue humedecido continuamente aplicando lágrima artificial (Optiben, Laboratorios Cinfa, Navarra, España) sobre la superficie ocular para evitar la evaporación de la película lagrimal y proteger así el epitelio corneal (Figura 3.5). A continuación, se adquirieron una serie de imágenes con un objetivo seco de bajo aumento (5x) para conocer el estado general de la inervación, tras lo que se adquirieron imágenes de las fibras objeto de estudio usando un objetivo de inmersión en agua y de mayor aumento (25x). En este caso, se aplicó una gota de lágrima artificial (Optiben, Laboratorios Cinfa) entre la superficie corneal y el objetivo para permitir la visualización de las fibras. Una vez terminada la adquisición de imágenes, se liberó la cabeza del ratón del soporte, se le inyectó de forma subcutánea 1ml de suero salino glucosado y finalmente se colocó encima de una manta térmica regulada a 37°C hasta su recuperación.



**Figura 3.5. Configuración del equipo de microscopía confocal para la adquisición de imágenes *in vivo*.**

Fotografía del microscopio confocal de barrido LEICA SP5-II (Leica Microsystem) adaptado para la realización de experimentos *in vivo*. El recuadro muestra el soporte móvil dónde es fijada la cabeza del ratón y que además lleva incorporada una máscara que permite la inhalación de isoflurano. La superficie ocular está colocada perpendicularmente al objetivo y se puede observar el menisco formado por la solución de lágrima artificial entre el objetivo y la córnea.

### 3.3.2. Adquisición de imágenes.

La adquisición de imágenes confocales *in vivo* se llevó a cabo mediante un microscopio de barrido láser LEICA SP5-II. Se utilizó un objetivo seco de 5x (HCX PL FLUOTAR CS 5x/0.15) y un objetivo de inmersión en agua (HCX IRA APO L 25x/0.95 W). Las proteínas EYFP y EGFP, codificadas genéticamente bajo el promotor de TRPM8 en las distintas líneas transgénicas, presentan un pico de excitación a luz de longitudes de onda de 513 y 488 nm respectivamente, y fueron consecuentemente excitadas usando un láser de iones argón multilínea (488 y 514 nm). El pico máximo de emisión de la proteína EYFP es de 527 nm y el de la proteína EGFP es de 509 nm, por lo que la detección se llevó a cabo con un fotomultiplicador espectral entre 525 y 600 nm. Se adquirieron series de imágenes apiladas en el plano z (z-stack) de las fibras fluorescentes utilizando el software LAS AF versión 2.7.3.9723 (Leica Microsystems). Las micrografías fueron realizadas a una resolución de 1024x1024 píxeles y con una profundidad de 8 bits. La velocidad de escaneo fue de 1200 Hz en todas las adquisiciones. El tamaño de cada píxel fue de 2.90x2.90  $\mu\text{m}$  para

las imágenes adquiridas a 5x y de 0.58x0.58  $\mu\text{m}$  para las adquiridas a 25x. Se definió un salto de plano (z-step) de acuerdo con el teorema de muestreo de Nyquist-Shannon de 9.68  $\mu\text{m}$  para las imágenes adquiridas a 5x. Sin embargo, debido a pequeños movimientos en el ojo del ratón, en las adquisiciones realizadas a 25x se tuvo que buscar el equilibrio óptimo entre la velocidad de adquisición y la resolución de la imagen, por lo que se estableció un salto de plano de 0.49  $\mu\text{m}$ , que fue mayor al establecido de acuerdo con el teorema Nyquist-Shannon.

Todas las imágenes fueron guardadas en formato Leica Image Format (.lif) para su posterior análisis.

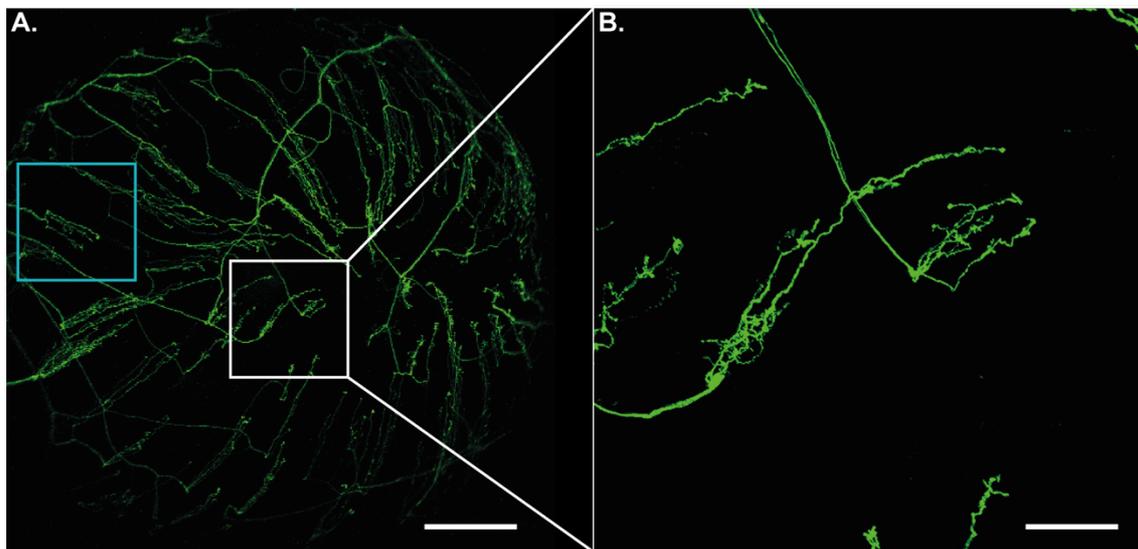
### **3.3.3. Monitorización de la remodelación espontánea de fibras nerviosas corneales individuales en ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y *Trpm8<sup>-/-</sup>*.**

Como se describe en la introducción (ver apartado 1.1.2.2.2.3), las fibras subbasales del epitelio anastomosan repetidas veces entre ellas formando una densa red que imposibilita su reconocimiento individual (Marfurt et al., 2010). Sin embargo, el uso de ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y *Trpm8<sup>-/-</sup>* permite el análisis morfométrico dinámico de fibras nerviosas corneales de manera individualizada debido a que únicamente alrededor de un 20% del total de fibras expresa la proteína de membrana TRPM8 (Alcalde et al., 2018).

En este bloque de experimentos, se monitorizaron fibras subbasales y terminaciones nerviosas corneales en un total de 6 ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y en 2 ratones *Trpm8<sup>-/-</sup>*. Las fibras nerviosas subbasales fueron seleccionadas a partir de puntos de penetración en el epitelio localizados tanto en la zona periférica como en la zona central (Figura 3.6A, B). Con el fin de analizar los cambios morfológicos espontáneos que suceden en las fibras nerviosas corneales con el tiempo, se llevó a cabo el seguimiento y la adquisición de imágenes de las fibras nerviosas seleccionadas durante 12 días consecutivos (una imagen por fibra, animal y día), aplicando el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1. Durante el periodo de seguimiento, con el fin de minimizar el riesgo de lesiones

oculares, los animales fueron estabulados individualmente y en aquellos casos en los que se identificaron pérdidas de fluorescencia irreversibles en regiones o en el conjunto de la inervación corneal, así como opacidad corneal en algún momento del seguimiento, los animales fueron sacrificados y las imágenes excluidas del análisis morfométrico, por tratarse de un indicio de daño en el epitelio corneal.

Concluido el periodo de monitorización, los animales fueron sacrificados mediante una inyección de pentobarbital sódico intraperitoneal y posteriormente, se les practicó una dislocación cervical.



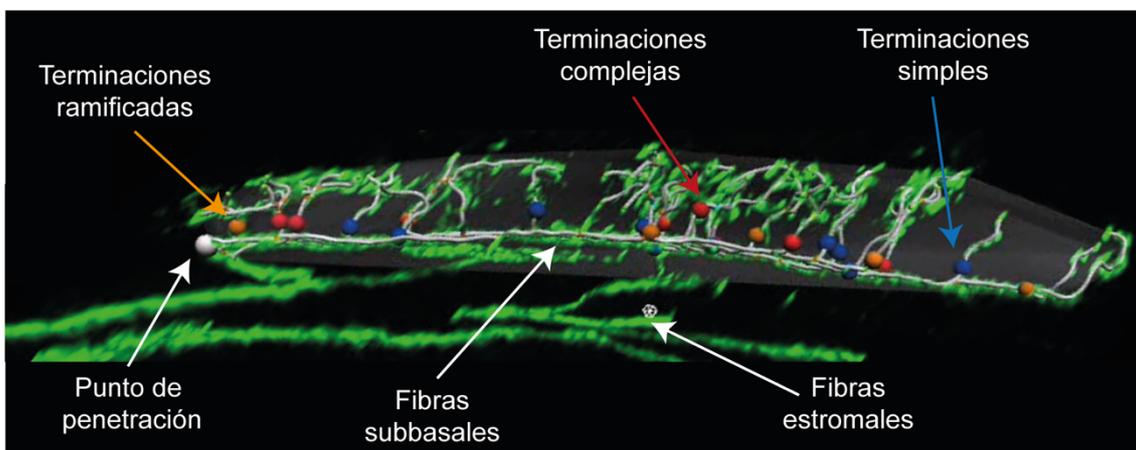
**Figura 3.6. Visualización de la inervación sensorial corneal de un ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP***

**A.** Imagen representativa de la arquitectura general de las fibras sensoriales EYFP positivas de la córnea obtenida mediante el objetivo de menor magnificación (5x). Los recuadros indican las fibras localizadas en la periferia (azul) y en el centro (blanco) de la córnea, ambas seleccionadas para el estudio morfológico. **B.** Imágen de la fibra central seleccionada (recuadro blanco) adquirida con el objetivo de mayor aumento (25x) para su posterior análisis morfométrico tridimensional. Barras de escala: A, 500  $\mu\text{m}$ ; B, 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3.1. Procesamiento de las imágenes de fibras nerviosas corneales individuales.

Las imágenes de las fibras nerviosas corneales adquiridas a 25x *in vivo*, fueron reconstruidas tridimensionalmente con el software de análisis de imagen Imaris 9.3 (Oxford Instruments, Inglaterra). Primero, las imágenes obtenidas en formato de datos de

Leica (.lif) fueron convertidas a formato de datos de Imaris (.ims) mediante el programa ImarisFileConverter (Oxford Instruments). Para facilitar la visualización de las fibras nerviosas corneales se utilizó el visor 3D y se procedió a la reconstrucción tridimensional mediante el uso de la herramienta de trazado de filamentos de manera semiautomática. Sobre el punto de penetración que produce la fibra estromal en la base del epitelio, se generó el punto inicial a partir del cual se trazaron las diferentes fibras subbasales y sus terminaciones nerviosas (Figura 3.7). Una vez realizada la reconstrucción y segmentación, las terminaciones nerviosas se clasificaron en función del número de ramificaciones como simples, ramificadas y complejas (Figura 3.7). Todos los datos obtenidos fueron exportados en formato de datos de Excel (.xls). Por último, se exportó el gráfico completo del filamento generado para todas las fibras analizadas, y se almacenó en formato 'Neuron File Format' (.hoc) para el posterior análisis de la envoltente convexa (ConvexHull) y de la dimensión fractal.



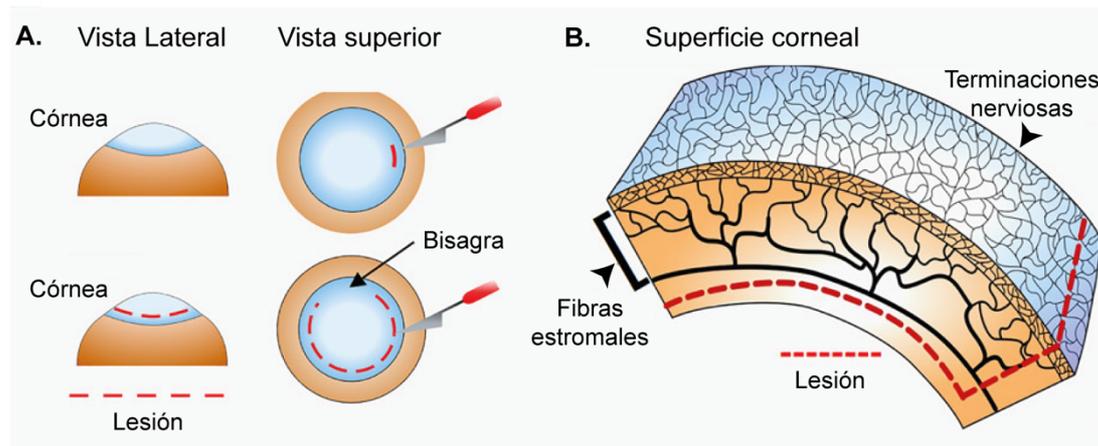
**Figura 3.7. Reconstrucción 3D de un conjunto de fibras subbasales y sus terminaciones**

La imagen confocal obtenida fue reconstruida con Imaris 9.3. A partir del punto de penetración (esfera blanca) se trazaron las diferentes fibras subbasales y sus terminaciones nerviosas simples (esferas azules), ramificadas (esferas naranjas) y complejas (esferas rojas). La envoltente convexa aparece representada como un sombreado gris.

### **3.3.4. Monitorización de la degeneración y regeneración de fibras nerviosas corneales tras su lesión en ratones adultos *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

#### **3.3.4.1. Modelo de incisión quirúrgica en la córnea.**

Se desarrolló un modelo de lesión corneal seccionando de manera controlada las fibras nerviosas presentes en el estroma de la córnea (Figura 3.8) (Piña et al., 2019). Se usaron 3 ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* en este estudio. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) inyectada intraperitonealmente. La cirugía fue realizada en el ojo derecho de cada animal, en el cual se aplicó una gota de Colircusi anestésico doble (1 mg/ml de tetracaína y 4 mg/ml de oxibuprocaína; #735142.9; Novartis, Basilea, Suiza) antes del procedimiento. En el ojo izquierdo se aplicó lágrima artificial (Optiben, Laboratorios Cinfa) para evitar la evaporación de la película lagrimal y proteger la superficie ocular. A continuación, el ojo fue inmovilizado aplicando una presión constante con una junta tórica de plástico hasta el final de la cirugía. Se realizó una pequeña incisión tangencial a la córnea de unos 15° usando un microbisturí oftálmico recto desechable (#78-6810, CorzaMedical, Westwood, MA, USA). A través de la incisión se fue cortando cuidadosamente la córnea describiendo un arco de aproximadamente 330° que generó una solapa superficial de 2 mm de diámetro, unida a la córnea por una bisagra de unos 30° (Figura 3.8A). Tras la cirugía, se inyectó de forma subcutánea 1ml de suero salino glucosado en el ratón y se dejó encima de una manta térmica regulada a 37°C hasta su recuperación. Todos los animales fueron tratados con buprenorfina (0.02 mg/kg; Dechra Pharmaceuticals, Northwich, Reino Unido) cada 12 horas durante las primeras 72 horas y se estabularon en jaulas individuales.



**Figura 3.8. Representación esquemática de la incisión quirúrgica de la córnea.**

**A.** Incisión inicial (panel superior) y extensión de la lesión quirúrgica (panel inferior) realizando un seccionamiento de 330° alrededor de la córnea y dejando una zona bisagra intacta. **B.** Esquema de la invasión corneal que muestra el seccionamiento de los nervios estromales (trazado discontinuo rojo). Imagen modificada de Piña et al., 2019.

Se adquirieron imágenes a 5x de la invasión sensorial corneal previamente a la realización de la lesión, inmediatamente después de realizar la lesión, y a los días 3, 10, 17 y 21. Durante todo el estudio los animales fueron estabulados individualmente, y fueron sacrificados al finalizar los experimentos mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico seguida de una dislocación cervical.

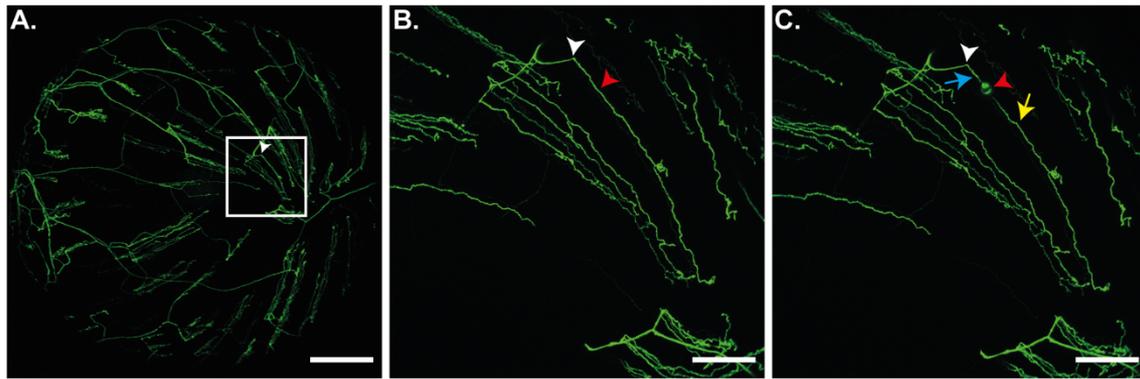
### 3.3.4.1.1. Procesamiento de las imágenes adquiridas de la reinervación corneal tras una incisión quirúrgica de la córnea.

Las imágenes adquiridas con el objetivo 5x fueron analizadas usando el software de análisis de imagen Fiji (NIH). Todas las secciones adquiridas en el eje Z de cada serie de imágenes fueron proyectadas en un único plano usando la herramienta proyección máxima, y se aplicó un aumento de contraste del 0.5% y un filtro de mediana de radio 0.3 píxeles. Después, se realizó una sustracción del ruido local de la imagen aplicando un 'rolling ball radius' de 10 píxeles. Las imágenes fueron segmentadas automáticamente aplicando un valor umbral mediante el método de Li (C. Li & Lee, 1993; C. Li & Tam, 1998). Una vez fue

obtenida la imagen binarizada, se dibujaron dos regiones de interés (ROI): una que incluía toda la inervación corneal y otra de la región lesionada. Posteriormente, se cuantificó el número de píxeles negros (valor 255 en la imagen binarizada) presentes en cada ROI que se correspondían con el objeto de interés (las fibras sensoriales TRPM8 positivas). Los datos procedentes de los valores del histograma se guardaron en formato de datos de Excel (.xls).

#### **3.3.4.2. Axotomía de fibras nerviosas corneales individuales de ratón mediante fotocoagulación con un láser de femtosegundo.**

Con el objetivo de realizar lesiones precisas en fibras nerviosas corneales individuales, se realizaron fotocoagulaciones en fibras del plexo subbasal mediante el uso de un láser de femtosegundo acoplado al microscopio. Para ello, ratones de las líneas transgénicas *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* fueron anestesiados y colocados en el microscopio tal y como se describe en el apartado 3.3.1. La axotomía mediada por láser de femtosegundo se realizó en una única fibra subbasal, localizada en el área central de la córnea del ojo derecho, en cada uno de los ratones utilizados en el estudio (Figura 3.9). En el ojo izquierdo se aplicaron unas gotas de lágrima artificial (Optiben, Laboratorios Cinfa) para proteger la superficie ocular. Para hacer la axotomía se utilizó el láser de infrarrojo MaiTai HP DeepSee (Spectra-Physics, Mountains View, CA) sintonizable desde 690 a 1040 nm, conectado ópticamente al microscopio de barrido láser LEICA SP5-II. El láser de infrarrojo emite pulsos a una frecuencia de 100 femtosegundos, concentrando los fotones en el plano focal (z).



**Figura 3.9. Fotocoagulación de una fibra subbasal individual en la córnea del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

**A.** Micrografía de la innervación sensorial de frío corneal. El recuadro blanco indica el área central donde se localiza la fibra seleccionada a lesionar (punta de flecha blanca). **B.** Micrografía a mayor magnificación del área indicada en el recuadro de la imagen A. Aparece señalada la fibra subbasal individual que va a ser lesionada (punta de flecha blanca) y el punto exacto donde se procederá a incidir con el láser de femtosegundo (punta de flecha roja). **C.** Imagen adquirida inmediatamente después de realizar la fotocoagulación. La marca fluorescente (punta de flecha roja) generada tras la axotomía divide a la fibra en una porción proximal (flecha azul) y una porción distal (flecha amarilla). Barras de escala: A, 500  $\mu\text{m}$ ; B, C, 100  $\mu\text{m}$ .

Con el fin de minimizar el grado de variabilidad entre las diferentes lesiones, se establecieron y aplicaron los mismos parámetros en la configuración del láser de femtosegundo para realizar la fotocoagulación de todas las fibras. De esta manera, se usó el láser a una potencia del 90% y a una longitud de onda de 800nm. A continuación, se seleccionó la región de interés a fotocoagular, se aplicó un *zoom-in* en una localización próxima al punto de penetración de la fibra subbasal (Figura 3.9B, punta de flecha roja). Después, se definió un límite superior y uno inferior en el plano Z para delimitar el punto exacto donde se iba a realizar la fotocoagulación y se estableció una distancia de 1  $\mu\text{m}$  entre las diferentes secciones ópticas (*z-step*) para la adquisición de imágenes. La velocidad de barrido fue de 1200 Hz y se configuró un doble barrido por línea (*line average=2*). Tras efectuar el disparo con el láser IR, se realizó una comprobación visual con el microscopio para confirmar que la fibra subbasal seleccionada había sido fotocoagulada debido a que, tras la axotomía, en el sitio donde había incidido el láser se generaba una marca fluorescente (Figura 3.9C). Como resultado de la fotocoagulación láser, la fibra quedaba dividida en una porción comprendida entre el punto de penetración y la marca fluorescente, que será

denominada en este trabajo como la “porción proximal” (Figura 3.9C, flecha azul); y otra porción comprendida entre la marca de fluorescencia y su extremo terminal, desconectada de la porción proximal, que se denominará “porción distal” (Figura 3.9C, flecha amarilla).

Con la finalidad de estudiar el curso temporal de la regeneración de las fibras sensoriales de frío tras su lesión mediante fotocoagulación por láser, se usaron 11 ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y 11 ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>-/-</sup>*. Se realizó el seguimiento y la adquisición de imágenes de las fibras lesionadas según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1 y 3.3.2. La regeneración fue monitorizada mediante la adquisición de imágenes antes de realizar la axotomía de fibras individuales, inmediatamente después de realizar la fotocoagulación, y a los días 1, 3, 7, 10 y 15 posteriores a la lesión. Durante este periodo de tiempo los animales fueron estabulados individualmente. Aquellos animales que experimentaron una pérdida de fluorescencia en alguna región o en la totalidad de la inervación corneal, en algún punto temporal del seguimiento, fueron sacrificados y los datos obtenidos excluidos del análisis morfológico.

Para evaluar el volumen de tejido lesionado tras realizar la fotocoagulación (n=9) en los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*, se realizó una reconstrucción, usando la herramienta de trazado de superficies de Imaris 9.3 (Oxford Instruments), de la marca fluorescente generada por el láser de femtosegundo tal y como se describe en un estudio previo en el que cuantifican el tamaño de lesiones puntuales generadas mediante láser en neuronas corticales (Canty et al., 2013). Además, para determinar si la lesión afecta a otras capas o fibras circundantes del epitelio corneal, se realizó un estudio inmunohistoquímico del tejido en 5 animales *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*. Para ello, 8 horas después de realizar la fotocoagulación de las fibras nerviosas individuales (n=5) se procedió al sacrificio de los animales e inmediatamente después, los ojos fueron enucleados. A continuación, se procedió a su estudio inmunohistoquímico aplicando el protocolo descrito en el apartado 3.2.2 y 3.2.4. Posteriormente se cuantificó el número de células corneales dañadas en el sitio de la lesión. Estas células fueron identificadas debido a que mostraron un incremento de la intensidad

de fluorescencia para el marcador de ADN Hoechst 333342 (Zhivotosky & Orrenius, 2001) con respecto a las células alejadas de la lesión; y fueron reconstruidas mediante el uso de la herramienta de trazado de superficies de Imaris 9.3. (Oxford Instruments).

Por otro lado, con el propósito de determinar si los tiempos de degeneración de la porción distal de la fibra axotomizada son diferentes entre las dos líneas de ratones transgénicos utilizados, se fotocoagularon 3 fibras de 3 ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* y 4 fibras de 4 ratones control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>+/+</sup>*, descendientes de la misma camada que poseen un genotipo silvestre para *Sarm1*. Las fibras nerviosas individuales fueron monitorizadas antes, después y a las ocho horas tras realizar la fotocoagulación. A continuación, se procedió al sacrificio de los animales e inmediatamente después, los ojos fueron enucleados y fijados para proceder a su análisis inmunohistoquímico aplicando el protocolo descrito en el apartado 3.2.2.

Asimismo, con la finalidad de estudiar los cambios morfológicos dinámicos que suceden durante la degeneración inducida por la fotocoagulación, se realizó una tanda de experimentos adicionales utilizando 16 ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*. Se monitorizaron 16 fibras nerviosas individuales antes, después y diariamente durante los 4 días posteriores a la fotocoagulación. Los restos de la porción distal que expresan EYFP fueron reconstruidos mediante la herramienta de trazado de filamentos de Imaris 9.3 (Oxford Instruments).

#### **3.3.4.2.1. Procesamiento de las imágenes adquiridas tras la axotomía por fotocoagulación de fibras subbasales individuales.**

Las imágenes de las fibras subbasales corneales adquiridas *in vivo* a 25x se procesaron y reconstruyeron según se describe en el apartado 3.3.3.1. Cabe señalar que, en el caso de los experimentos de regeneración, se reconstruyó exclusivamente la porción proximal de la fibra una vez realizada la axotomía láser a los diferentes tiempos estudiados;

y para el análisis de la degeneración, se reconstruyó únicamente la porción distal de la fibra tras su axotomía.

Para la cuantificación del número de células dañadas en el área lesionada tras la fotocoagulación de la fibra subbasal TRPM8-EYFP, se realizó una reconstrucción tridimensional de los núcleos afectados mediante el uso de la herramienta de renderizado de superficies del programa Imaris 9.3 (Oxford Instruments). Los núcleos de las células de la córnea afectados fueron identificados con el marcador nuclear Hoechst 33342.

### **3.4. Análisis morfométrico.**

#### **3.4.1. Análisis morfométrico de las neuronas trigeminales y sus proyecciones corneales en tejido fijado.**

##### **3.4.1.1. Cuantificación inmunocitoquímica de las neuronas trigeminales de frío en ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

La cuantificación manual de las neuronas TRPM8-EYFP se realizó usando el módulo “cell counter” habilitado en el programa de análisis de imagen Fiji (NIH). Los resultados se muestran como el porcentaje de neuronas TRPM8-EYFP que se coexpresa con los marcadores moleculares TrkA, CGRP, NF200, Periferina y GS-IB4.

##### **3.4.1.2. Cuantificación de los puntos de penetración de las fibras subepiteliales en el epitelio en preparaciones de córnea aplanada de los ratones *Trpv1-GFP*.**

En este bloque de experimentos se cuantificaron manualmente los puntos de penetración presentes en los 4 pétalos que conforman cada una de las córneas usadas en el estudio mediante el módulo “cell counter” de Fiji (NIH). Los resultados se presentan como

el porcentaje de puntos de penetración que son inmunorreactivos a los anticuerpos anti-neuronal  $\beta$ -tubulina clase III, anti-GFP y/o anti-Piezo2.

#### **3.4.1.3. Cuantificación de los parámetros morfométricos analizados en la inervación corneal de los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y *Trpm8<sup>-/-</sup>*.**

Para la cuantificación de los diferentes parámetros morfométricos se utilizaron tanto las preparaciones de córneas tratadas con la técnica inmunohistoquímica ABC-peroxidasa como las tratadas con técnicas de inmunofluorescencia.

##### **3.4.1.3.1. Cuantificación de los puntos de penetración.**

Los puntos de penetración positivos para el anticuerpo anti-neuronal  $\beta$ -tubulina clase III y anti-GFP fueron cuantificados en cada uno de los pétalos corneales. Los valores se presentan como densidad del número de penetraciones por unidad de superficie corneal (penetraciones/mm<sup>2</sup>)

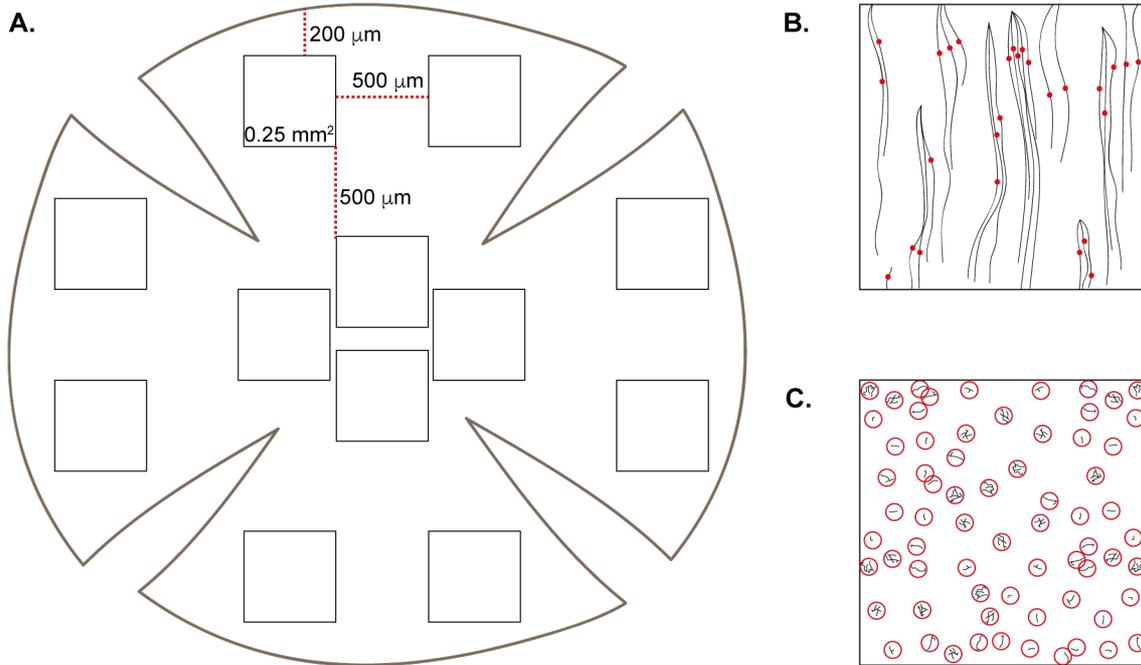
##### **3.4.1.3.2. Número de fibras por punto de penetración.**

Se cuantificó el número de fibras inmunorreactivas a los marcadores  $\beta$ -tubulina clase III y GFP que emergen de un punto de penetración y se clasificaron morfológicamente. Los datos se exponen en valores absolutos o en porcentaje.

##### **3.4.1.3.3. Densidad de fibras subbasales y terminaciones nerviosas.**

En las imágenes de cada uno de los 4 pétalos que forman la córnea se dibujaron 3 recuadros de 500  $\mu$ m de lado, cuya área era de 0.25 mm<sup>2</sup> para cada uno de ellos (Figura 3.10A). Dos de los recuadros se situaron en la zona periférica separados entre ellos por 500

$\mu\text{m}$  y a  $200 \mu\text{m}$  del limbo esclerocorneal. El otro recuadro se situó en la zona central de la córnea a  $500 \mu\text{m}$  de los recuadros periféricos (Figura 3.10A). Las cuantificaciones de las fibras subbasales y de las terminaciones nerviosas se llevaron a cabo en el área delimitada por los recuadros (Figura 3.10).



**Figura 3.10. Cuantificación de la densidad de fibras subbasales y terminaciones nerviosas corneales.**

**A.** Esquema de las áreas estudiadas para calcular la densidad de fibras subbasales y terminaciones nerviosas. En cada uno de los cuatro pétalos que forman la córnea se definieron dos recuadros periféricos y uno central de  $0.25 \text{ mm}^2$ . La distancia entre los recuadros periféricos es de  $500 \mu\text{m}$  y de  $200 \mu\text{m}$  con el limbo esclerocorneal. El recuadro central está separado de los periféricos por  $500 \mu\text{m}$ . **B-C.** Se cuantificaron todas las fibras subbasales (B) y las terminaciones nerviosas (C) contenidas en el interior del área delimitada por cada uno de los recuadros de estudio.

La densidad de fibras que componen el plexo subbasal fue calculada mediante el conteo de todas las fibras inmunorreactivas a  $\beta$ -tubulina clase III o GFP que atraviesan total o parcialmente el interior del área delimitada por el recuadro (Figura 3.10B). Los resultados se muestran como densidad del número de fibras por unidad de superficie corneal (fibras/ $\text{mm}^2$ ).

La densidad de terminaciones nerviosas inmunorreactivas a  $\beta$ -tubulina clase III o GFP, se calculó cuantificando todas las terminaciones nerviosas presentes en el interior del área delimitada por el recuadro (Figura 3.10C). Los resultados se presentan como densidad del número de terminaciones nerviosas por unidad de superficie corneal (terminaciones/mm<sup>2</sup>).

#### **3.4.1.3.4. Tipos morfológicos de terminaciones nerviosas.**

Mediante el uso del microscopio, las terminaciones nerviosas fueron clasificadas de visu según el número de ramificaciones que poseen en simples, ramificadas y complejas. Un total de 100 terminaciones seleccionadas aleatoriamente fueron clasificadas en cada una de las córneas, independientemente de su localización.

#### **3.4.2. Análisis morfométrico dinámico de la remodelación espontánea y de la regeneración tras lesión en la inervación corneal de los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*, *Trpm8<sup>-/-</sup>* y *Trpm8<sup>BAC-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></sup>*.**

Para el análisis tridimensional dinámico de las fibras subbasales y las terminaciones nerviosas se midieron diferentes parámetros morfológicos durante el periodo de seguimiento establecido para los experimentos de remodelación espontánea o de regeneración tras producir una lesión. Estos parámetros fueron los siguientes: la longitud acumulada de las fibras subbasales (FSB) individuales, la longitud acumulada de las terminaciones nerviosas (TN) originadas a partir de cada fibra subbasal, la longitud acumulada de la FSB y sus TN (FSB+TN), el volumen que ocupa cada FSB+TN en la superficie epitelial de la córnea, y la complejidad que presenta cada FSB+TN.

#### **3.4.2.1. Longitud de la FSB individual y de sus TN.**

La longitud de cada fibra subbasal individual y de sus terminaciones nerviosas se cuantificó a partir de la reconstrucción realizada con Imaris 9.3 (Oxford Instruments). Por un lado, se obtuvo exclusivamente la longitud acumulada de cada FSB y por otro, se halló la longitud acumulada de las TN que emite cada FSB. Por último, se determinó la longitud acumulada de cada FSB+TN.

#### **3.4.2.2. Volumen que ocupa la FSB individual y sus TN en el epitelio corneal.**

Se determinó el volumen ocupado por cada fibra subbasal y sus correspondientes terminaciones nerviosas en el epitelio corneal mediante el análisis matemático de la envolvente convexa, a partir de ahora denominada CH por sus siglas en inglés “ConvexHull”. El CH de un conjunto de puntos P es la intersección de todos los semiplanos que contienen a P (Barber et al., 1996). En este estudio, el cálculo de la CH se ha realizado aplicando el algoritmo Quickhull (Preparata & Shamos, 1985) que consiste en encontrar los puntos más distales en un conjunto de puntos y formar cuadriláteros utilizando esos puntos como vértices hasta unir todos los puntos. De este modo, en este trabajo, la figura geométrica resultante, representa el volumen que ocupa la FSB y sus TN.

Para el análisis del CH se usaron los archivos almacenados en formato ‘Neuron File Format’ (.hoc) exportados a partir de la reconstrucción 3D realizada en el programa Imaris 9.3 (Oxford Instruments). Estos archivos fueron analizados en Python mediante la ejecución del script Qhull (Barber et al., 1996) disponible en la biblioteca científica libre SciPy (Virtanen et al., 2020).

### 3.4.2.3. Dimensión fractal de la FSB individual y de sus TN.

La dimensión fractal se calculó mediante el método del conteo de cajas (Barnsley, 1993; Falconer, 1997, 2003) aplicado a cada fibra subbasal individual junto con sus terminaciones nerviosas, reflejando así el nivel de complejidad que presenta esta estructura en el espacio (Figura 3.11).

El método del conteo de cajas (en este caso cubos, por analizar una estructura tridimensional) consiste en dividir en cubos el espacio ocupado por la fibra subbasal y sus terminaciones con una longitud de lado  $\varepsilon$ . Esos cubos cubrirán la estructura fractal y se contarán como N. A continuación, se reitera el proceso aplicando cubos cuyo lado se reduce a la mitad en cada iteración (Figura 3.11A). La cantidad total de cubos aumenta a medida que disminuye el tamaño de los cubos; por tanto, la DF teórica de conteo de cubos es la relación de  $\log(N)$  dividido por  $\log(1/\varepsilon)$  cuando  $\varepsilon$  tiende a 0:

$$DF := \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left( \frac{\log N(\varepsilon)}{\log(1/\varepsilon)} \right)$$

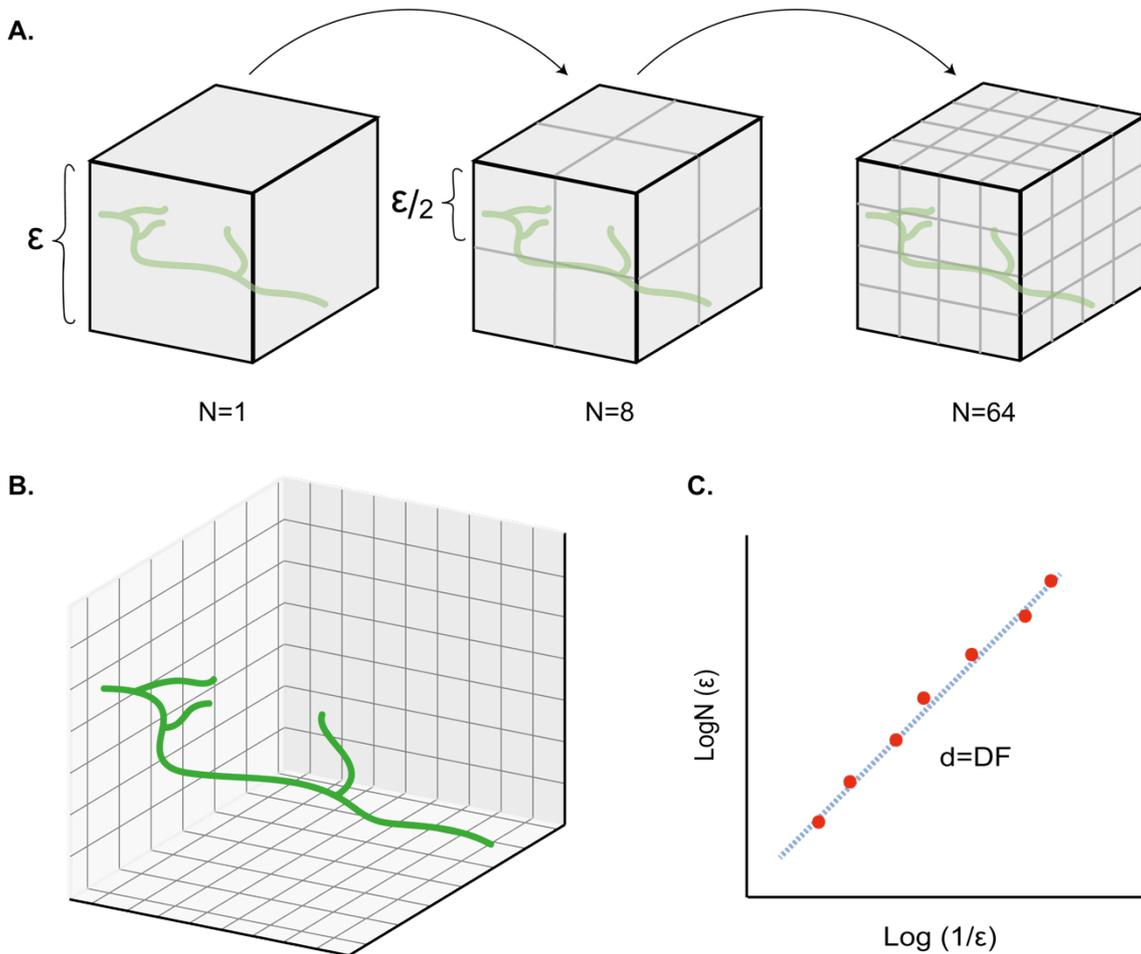
donde DF es la dimensión fractal de la estructura,  $\varepsilon$  es la longitud del lado del cubo y  $N(\varepsilon)$  es el número más pequeño de cubos de lado  $\varepsilon$  requeridas para cubrir el contorno de la estructura completamente (Di Ieva et al., 2014; Mandelbrot, 1982). Sin embargo, en la práctica es imposible realizar este cálculo dado que el límite de cero no puede ser aplicado a objetos naturales, de modo que la DF se estima con la siguiente fórmula:

$$D=d$$

donde d es la pendiente de la recta de regresión que se obtiene al representar el  $\log\{N(\varepsilon)\}$  en el eje de ordenadas y  $\log(1/\varepsilon)$  en el eje de abscisas en cada una de las iteraciones (Figura 3.11B). De modo que la DF representa una estimación de la complejidad morfológica (Cutting & Garvin, 1987) y a mayor complejidad, mayor valor de DF.

Para el análisis de la DF de cada fibra subbasal y sus terminaciones nerviosas se usaron los archivos almacenados en formato 'Neuron File Format' (.hoc) exportados a partir

de la reconstrucción 3D realizada en el programa Imaris 9.3 (Oxford Instruments). Estos archivos fueron analizados en Python mediante la ejecución de un script diseñado para el cálculo de la DF, a través del método descrito, en estructuras tridimensionales.



**Figura 3.11. Cálculo de la DF de una fibra subbasal y sus terminaciones nerviosas mediante el método del conteo de cajas.**

**A.** Un cubo de lado  $\epsilon$  recubre todo el espacio que ocupa una FSB y sus TN. A continuación, el cubo inicial se divide aplicando cubos cuyo lado  $\epsilon$  se reduce a la mitad. Los cubos que recubren la FSB y sus TN se cuentan como  $N$ . **B.** El proceso se reitera y en cada iteración aumenta la  $N$  y se divide a la mitad  $\epsilon$ . **C.** La DF es la pendiente de la recta de regresión que se obtiene al representar en el eje Y el  $\text{Log}\{N(\epsilon)\}$  y en el eje X el  $\text{Log}(1/\epsilon)$  en cada una de las iteraciones.

#### 3.4.2.4. Cálculo de la variabilidad diaria de los parámetros morfológicos durante la remodelación espontánea.

La variación que experimentan los parámetros morfométricos estudiados en el intervalo de un día se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$Var(i) = \frac{(T_n - T_{n-1})}{(T_{max} - T_{min})} \cdot 100$$

donde Var representa la variabilidad de cada una de las variables (i) en un día,  $T_n$  es el valor que tiene el parámetro (i) en el día n de estudio,  $T_{n-1}$  es el valor que tiene el parámetro (i) el día anterior a n (n-1),  $T_{max}$  es el valor máximo que alcanza el parámetro (i) durante el periodo de seguimiento y  $T_{min}$  es el valor mínimo que alcanza el parámetro (i) durante el periodo de seguimiento.

Para determinar si los cambios producidos en la FSB y sus TN suponen un aumento o disminución neta significativa en el valor medio de los parámetros estudiados durante los 12 días de seguimiento, se calculó la variabilidad diaria entre cada uno de los días del periodo estudiado, asignando el valor 0 al primer día de monitorización. A continuación, se aplicó una prueba T para una muestra a los valores obtenidos dentro del periodo de seguimiento de la FSB y sus TN para cada una de las variables estudiadas. Cuando los valores de p-valor son mayores de 0.05 ( $p > 0.05$ ), rechazamos la hipótesis nula y se considera que el valor medio de cada uno de los parámetros estudiados no es diferente de 0 y, por tanto, la FSB y sus TN no experimenta cambios morfológicos netos significativos; por el contrario, cuando p-valor es menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ) se considera que el valor medio de los parámetros analizados es distinto de cero y la FSB y sus TN experimentan cambios morfológicos netos significativos.

Para estudiar el grado de dinamismo de los cambios morfológicos que presentan las fibras, a partir de los valores absolutos de variabilidad diaria obtenidos para cada parámetro, se calcularon los promedios en función de la localización de la fibra y/o de la línea transgénica utilizada en el estudio.

#### **3.4.2.5. Cuantificación de la reinervación tras realizar una incisión quirúrgica de la córnea.**

La cuantificación del curso temporal de la reinervación inducida tras practicar una incisión quirúrgica en las fibras nerviosas de frío corneales, se determinó mediante el análisis de la longitud acumulada del conjunto de la inervación de frío. Este parámetro fue calculado a partir de la conversión a milímetros del número de píxeles negros obtenido en cada una de las imágenes calibradas tras su análisis con Fiji (NIH). Los resultados se muestran como el valor promedio para cada uno de los días de estudio establecidos.

#### **3.4.2.6. Análisis del daño tisular generado por el láser de femtosegundo en el epitelio corneal en ratones adultos *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

Los datos resultantes de la cuantificación del volumen que abarca la marca fluorescente generada tras la fotocoagulación se expresan como el valor promedio. El número de células corneales afectadas tras realizar la axotomía con el láser de femtosegundo se muestran como el valor promedio.

#### **3.4.2.7. Análisis morfométrico dinámico de la regeneración de FSB corneales individuales tras su axotomía por fotocoagulación en ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

La regeneración de la fibra nerviosa corneal lesionada se cuantifica como el porcentaje de recuperación con respecto al valor inicial prelesión de la longitud acumulada, el volumen y la dimensión fractal. Para calcular este valor, sobre los valores obtenidos del análisis morfométrico para cada una de las fibras individuales, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación}(i) = \frac{(T_n - T_0)}{(T_{max} - T_0)} \cdot 100$$

donde  $T_n$  es el valor que tiene el parámetro (i) en el día n de estudio,  $T_0$  es el valor que tiene el parámetro (i) inmediatamente después de la axotomía y  $T_{max}$  es el valor máximo que alcanza el parámetro (i) durante el periodo de seguimiento.

Posteriormente, para estudiar el curso temporal de la regeneración en las fibras lesionadas, se calcularon los promedios en función del día de estudio y de la línea transgénica utilizada en el estudio.

### **3.4.3. Análisis morfométrico dinámico de la degeneración de fibras subbasales corneales individuales tras su axotomía por fotocoagulación en ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

Los resultados del curso temporal de la degeneración se expresan como el promedio del porcentaje de la longitud acumulada de todos los residuos de la porción distal de las fibras lesionadas en cada uno de los días de estudio.

### **3.5. Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron estadísticamente usando los programas GraphPad Prism versión 9.0.1 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) e IBM SPSS Statistics para Windows, versión 22 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Todos los resultados fueron expresados como el valor de la media  $\pm$  error típico de la muestra. Aquellas diferencias con  $p \leq 0.05$  se consideraron significativas.

Antes de proceder al análisis estadístico se realizó el estudio de la normalidad para cada grupo muestral mediante el uso de las pruebas Kolmogórov-Smirnov o Shapiro-Wilk. El análisis de las varianzas se llevó a cabo aplicando la prueba de Bartlett.

Para realizar la comparación de los parámetros morfométricos obtenidos del análisis de la inervación sensorial en las preparaciones de córneas fijadas de ratones

*Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y *Trpm8<sup>-/-</sup>*, se realizaron pruebas T para muestras independientes o pruebas U de Mann-Withney, según si los datos de la muestra analizada se ajustaban a una distribución normal o no paramétrica, respectivamente. Las comparaciones entre porcentajes se realizaron usando pruebas Z.

En los estudios de la remodelación espontánea de las fibras subbasales individuales, se aplicó una prueba T para una muestra con el fin de determinar si durante el periodo de tiempo estudiado la variabilidad neta en los parámetros morfométricos estudiados era significativa. Además, para comparar las diferencias en la variabilidad diaria entre la zona periférica y central, así como las diferencias entre los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y *Trpm8<sup>-/-</sup>* se aplicaron pruebas T para muestras independientes.

Para realizar los contrastes de hipótesis en los estudios de reinervación de las fibras nerviosas tras la realización de una incisión quirúrgica en los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*, se aplicó una prueba ANOVA de un factor con la posterior prueba de comparaciones múltiples Holm-Sidak.

En los estudios de la regeneración de fibras nerviosas individuales después de realizar una fotocoagulación en los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*, se realizaron pruebas ANOVA de un factor con la posterior prueba de comparaciones múltiples de Dunn. En el caso de los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></sup>* se aplicaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Para hallar las diferencias estadísticas entre las variables analizadas en el grupo de ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>* y *Trpm8<sup>BAC-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup></sup>* se utilizaron pruebas ANOVA de dos factores.

Todas las pruebas estadísticas usadas en cada caso aparecen indicadas en sus correspondientes apartados durante el desarrollo de los resultados de este trabajo.

### **3.6. Imágenes, gráficas y figuras.**

Los gráficos fueron generados con el programa GraphPad Prism versión de prueba 9.0.1 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) y editados con Adobe Illustrator versión de prueba 25.4.1 (Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA). Para el ajuste de brillo y contraste de las imágenes de las figuras se usó FIJI versión 2.0.0-rc69/1.52i (NIH) o Adobe Photoshop versión de prueba 22.5.0 (Adobe Systems Inc.). La composición final de las figuras se hizo con Adobe Illustrator versión de prueba 25.4.1 (Adobe Systems Inc).

## 4. Resultados

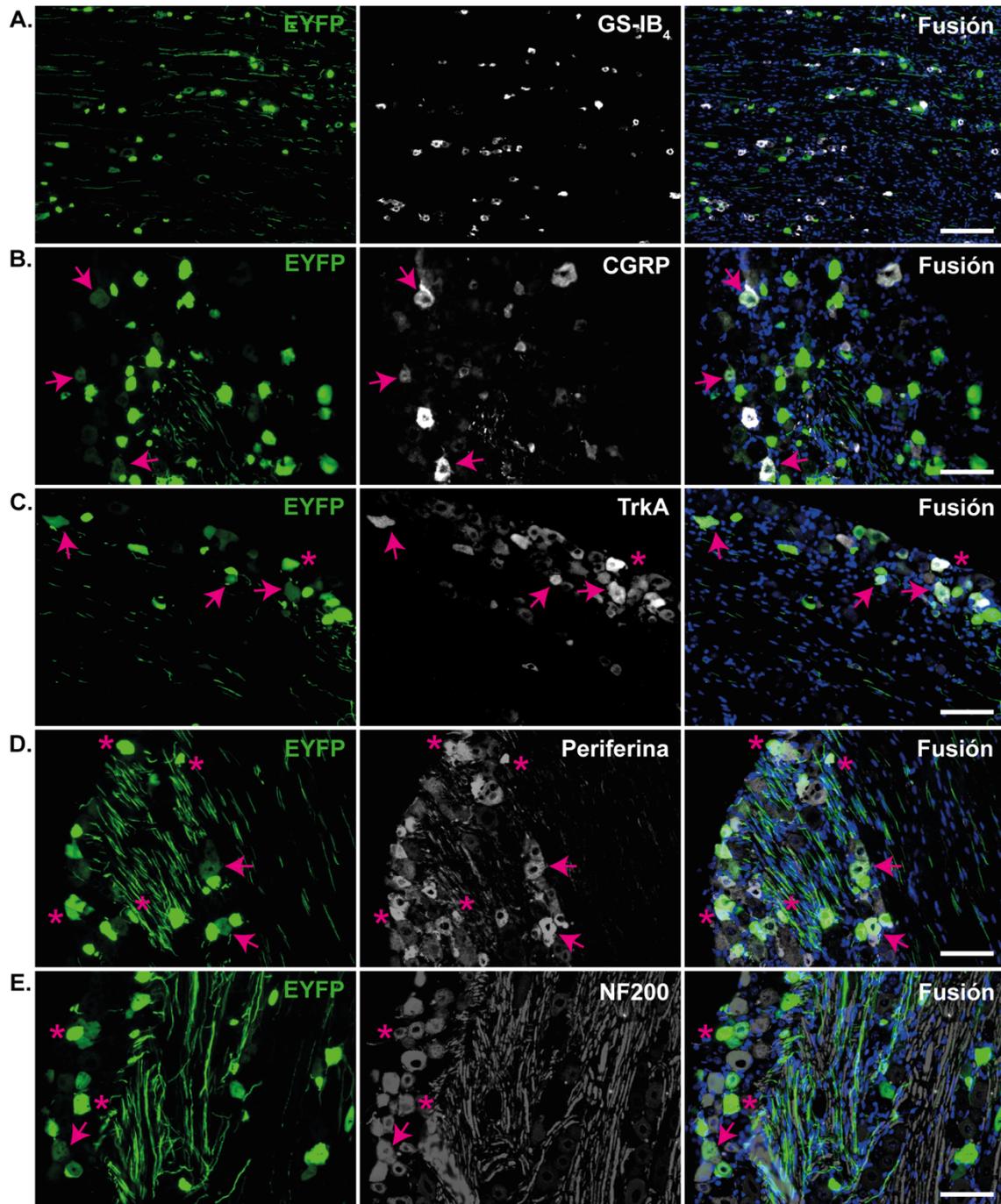
---

#### **4.1. Caracterización inmunocitoquímica de las neuronas sensoriales TRPM8-EYFP<sup>+</sup> del ganglio trigémino del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

En este bloque de experimentos se realizó una caracterización molecular del soma de las neuronas sensoriales primarias putativas de frío presentes en el GT del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia. Para ello, se utilizaron distintas secciones longitudinales de cada uno de los 3 GT estudiados, procedentes de animales diferentes, tal y como se describe en el apartado 3.2.1 de métodos.

Del total de neuronas cuantificadas ( $2268.4 \pm 266.5$  neuronas por GT), las neuronas TRPM8-EYFP representaron el  $17.8 \pm 0.9\%$  del total. Dentro de éstas, se identificaron dos poblaciones diferentes de neuronas TRPM8-EYFP, de acuerdo con la intensidad de fluorescencia presente en el soma. Tal intensidad se expresó en unidades arbitrarias de gris dentro de una escala de 256 tonos. Un  $56.3 \pm 1.3\%$  de las neuronas TRPM8-EYFP fueron definidas como neuronas de alta intensidad de fluorescencia (AIF,  $>90$  unidades arbitrarias en la escala de gris) (Figura 4.1, asteriscos), mientras que el  $43.7 \pm 1.3\%$  restante mostraba una baja intensidad de EYFP ( $<90$  unidades arbitrarias en la escala de gris) y se denominaron neuronas de baja intensidad de fluorescencia (BIF, Figura 4.1, flechas).

Tras la caracterización cualitativa del fenotipo molecular de las neuronas TRPM8-EYFP del GT, se cuantificó el número de somas de cada una de las subpoblaciones AIF y BIF que mostraba inmunoreactividad a diferentes marcadores moleculares expresados en los nociceptores periféricos, tales como GS-IB<sub>4</sub>, periferina, NF200, TrkA y CGRP (M. E. Goldstein et al., 1991; Hunt & Mantyh, 2001; Silverman & Kruger, 1988).



**Figura 4.1. Identificación molecular de dos poblaciones de neuronas TRPM8-EYFP en el ganglio trigémino del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

**A-E.** Micrográficas de fluorescencia de secciones longitudinales del ganglio trigémino. **A.** Neuronas TRPM8-EYFP negativas para GS-IB<sub>4</sub>. **B-E.** Los asteriscos señalan neuronas AIF positivas para los marcadores: CGRP (B), TrkA (C), periferina (D) y NF200 (E). Las flechas señalan las neuronas BIF inmunorreactivas a los mismos marcadores. Los núcleos están teñidos con DAPI. Barra de escala: A: 150  $\mu$ m; B-E: 75  $\mu$ m. **F.** Proporción de neuronas TRPM8-EYFP AIF (panel superior) y TRPM8-EYFP BIF (panel inferior) positivas para los marcadores CGRP, TrkA, Periferina y NF200.

En primer lugar, para identificar la población de neuronas TRPM8-EYFP no peptidérgicas, se estudió la inmunorreactividad a la isolectina GS-IB<sub>4</sub>. Esta glicoproteína se obtiene a partir de las semillas de la legumbre *Griffonia simplicifolia*, y se une a los residuos  $\alpha$ -d-galactosa de glicoconjugados localizados en la superficie celular de neuronas sensoriales no peptidérgicas del ganglio raquídeo (GR) y GT (Ambalavanar & Morris, 1992; Silverman & Kruger, 1990). En las secciones de GT analizadas con este marcador, se observó que todas las neuronas TRPM8-EYFP, tanto las AIF como las BIF, son negativas para IB<sub>4</sub> (Figura 4.1A), lo que sugiere que esta población de neuronas presenta un fenotipo peptidérgico. Estudios previos sugieren que la mayoría de neuronas sensoriales peptidérgicas (IB<sub>4</sub> negativas) expresan el neuropéptido CGRP así como receptores TrkA (Averill et al., 1995); por lo que a continuación, se cuantificó la expresión de estas proteínas en las neuronas TRPM8-EYFP. Así, se observó que las neuronas AIF no expresan CGRP mientras que el  $44.1 \pm 11.4\%$  de las neuronas BIF son positivas al CGRP (Figura 4.1B y F). Por su parte, el receptor TrkA se expresa en el  $13.8 \pm 2.4\%$  de las neuronas AIF y en el  $48.7 \pm 5.7\%$  de las neuronas BIF (Figura 4.1C y F). Posteriormente, con el fin de clasificar los axones de las neuronas TRPM8-EYFP como mielínicos o amielínicos, se estudió la expresión de NF200 y Periferina, respectivamente (Lawson & Waddell, 1991; Takashima et al., 2007). La periferina es un filamento intermedio de tipo III que se expresa en neuronas sensoriales de pequeño diámetro cuyas fibras son amielínicas y de tipo C. De esta manera, se observó que el  $79.2 \pm 0.5\%$  de las neuronas AIF y el  $53.4 \pm 4.9\%$  de las neuronas BIF son inmunorreactivas al anticuerpo periferina (Figura 4.1D y F). Con la finalidad de conocer el porcentaje de neuronas TRPM8 positivas que tienen fibras mielinizadas tipo A $\beta$ , se estudió

la expresión de NF200 y se observó que el  $12.1 \pm 1.3\%$  de las neuronas AIF y el  $20.2 \pm 3.0\%$  de las neuronas BIF son inmunopositivas para NF200 (Figura 4.1E y F).

En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de dos poblaciones de neuronas TRPM8<sup>+</sup> en función de su alta o baja intensidad de fluorescencia EYFP en el soma. Además, ambas poblaciones exhiben un fenotipo molecular heterogéneo, con una mayor proporción de neuronas trigeminales de frío pertenecientes a la subpoblación BIF que expresan marcadores asociados a los nociceptores.

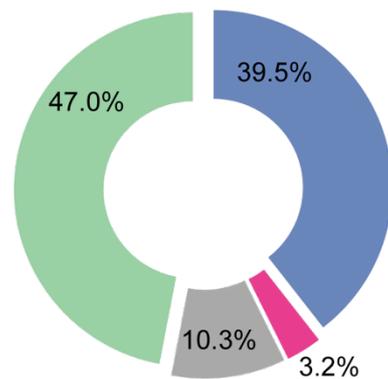
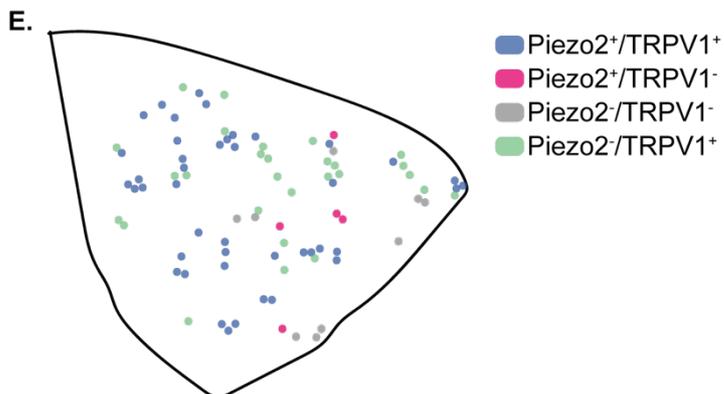
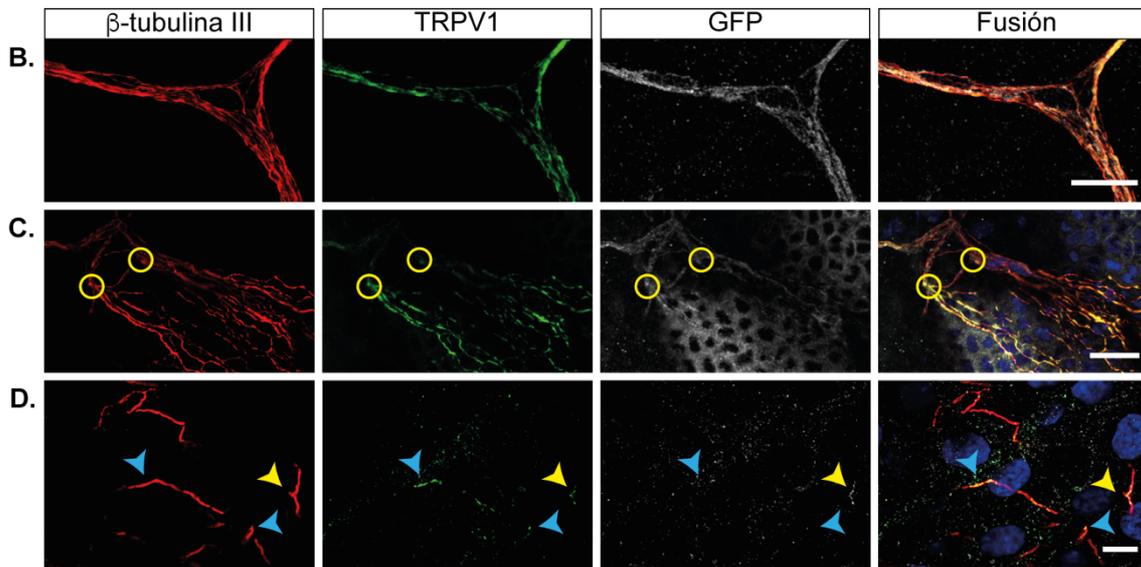
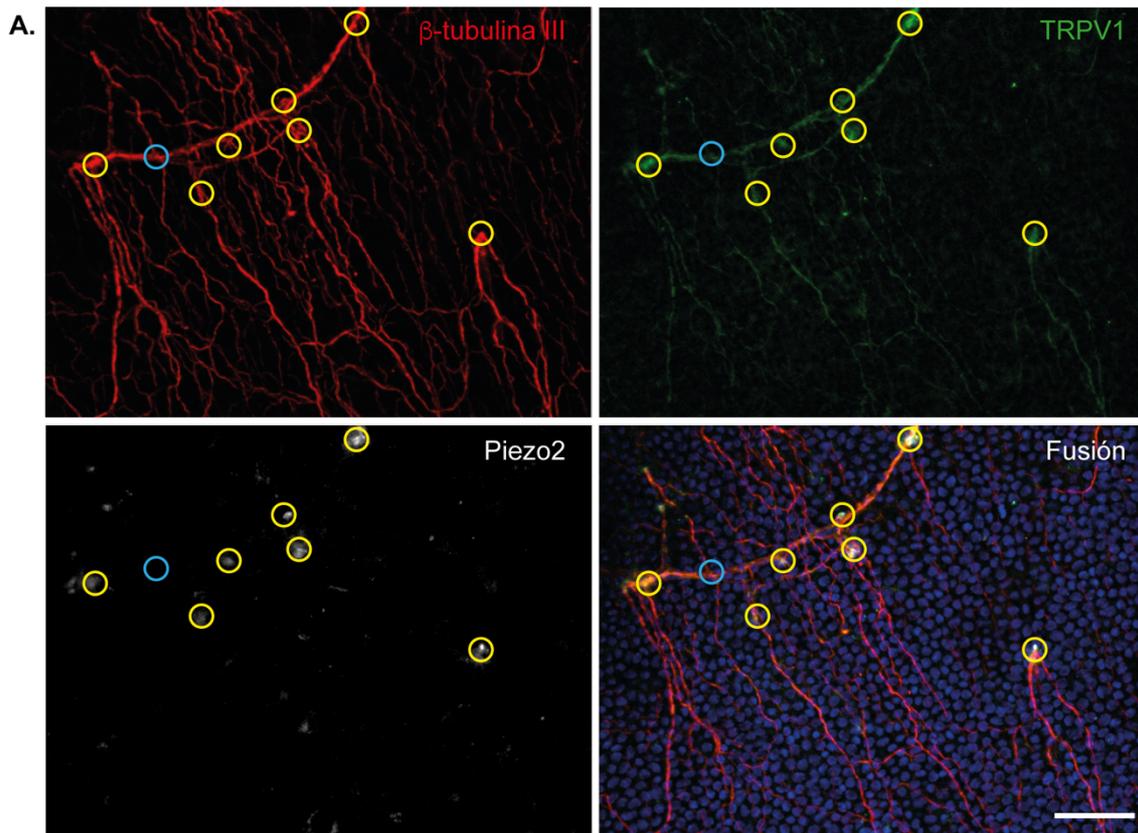
#### **4.2. Identificación molecular de los canales iónicos presentes en las fibras sensoriales que inervan la córnea del ratón.**

En este bloque de experimentos se realizó la caracterización molecular, mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia, de las fibras sensoriales que inervan la córnea de ratón.

##### **4.2.1. Identificación molecular de los canales iónicos Piezo2 y TRPV1.**

El canal iónico Piezo2 fue propuesto inicialmente como el principal transductor molecular de los estímulos mecánicos inocuos en las neuronas somatosensoriales (Florez-Paz et al., 2016; Ranade et al., 2014; Woo et al., 2014). Más recientemente se ha sugerido que también contribuye a la mecanotransducción de estímulos mecánicos de intensidad lesiva (Coste et al., 2010; Murthy et al., 2018; Nguyen et al., 2017; Szczot et al., 2017; Zheng et al., 2019). Sin embargo, su posible expresión en los diferentes tipos funcionales de fibras sensoriales corneales que exhiben sensibilidad mecánica (mecanociceptoras puras y polimodales) no había sido abordada. En este estudio, se discriminó inmunocitoquímicamente la expresión del canal iónico Piezo2 y del canal iónico TRPV1 (principal transductor molecular en los nociceptores polimodales) en las poblaciones de fibras sensoriales mecanociceptoras puras y polimodales de la córnea de ratón. Para ello,

se realizó una triple inmunotinción en preparaciones de córnea entera aplanada de ratones C57BL/6J, con el fin de visualizar la trayectoria que siguen las fibras sensoriales desde el estroma al epitelio corneal. Los anticuerpos usados fueron anti-neuronal  $\beta$ -tubulina clase III, anti-TRPV1 y anti-Piezo2 (Figura 4.2A). Las terminaciones sensoriales TRPV1 positivas, se visualizaron también usando ratones transgénicos *Trpv1-GFP*. Las imágenes obtenidas de las muestras corneales, mediante microscopía confocal, permitió visualizar la trayectoria de los haces subepiteliales, las fibras subbasales individuales y las terminaciones intraepiteliales. En la figura 4.2A, se aprecia la existencia de fibras subbasales que expresan TRPV1 (en verde) pero sorprendentemente, en ninguna de ellas se detecta la expresión de Piezo2, pese a que sí se observa coexpresión de Piezo2 y TRPV1 en la mayoría de los puntos de penetración de los troncos nerviosos subepiteliales (circunferencias amarillas). De hecho, solamente algunos de esos puntos de penetración eran inmunorreactivos exclusivamente para Piezo2 o para TRPV1 (circunferencia azul, positivo para TRPV1 y negativo para Piezo2).



**Figura 4.2. Expresión de Piezo2 en las fibras y terminaciones sensoriales de la córnea de ratón.**

**A.** Micrografías confocales del plexo subbasal en la córnea de un ratón C57BL/6J. Las fibras sensoriales fueron inmunomarcadas con  $\beta$ -tubulina clase III (en rojo), TRPV1 (en verde) y Piezo2 (en gris). Las circunferencias marcan los puntos de penetración en el epitelio de las fibras subepiteliales que fueron positivas para TRPV1 y Piezo2 (en amarillo) y exclusivamente para TRPV1 (en azul). **B-D.** Imágenes confocales de un nervio subepitelial (B), de las fibras subbasales (C) y de las terminaciones nerviosas de la córnea del ratón transgénico *Piezo2-GFP-IRES-Cre* inmunoteñidas con anti- $\beta$ -tubulina clase III (en rojo), anti-TRPV1 (en verde) y anti-Piezo2 (en gris). Las circunferencias marcan los puntos de penetración y las flechas señalan las terminaciones nerviosas TRPV1<sup>+</sup>/Piezo2<sup>+</sup> (en amarillo) y TRPV1<sup>+</sup>/Piezo2<sup>-</sup> (en azul). Los núcleos de las células corneales están marcados con Hoechst 33342. Barras de escala: A, 50  $\mu$ m; B, 10  $\mu$ m; C, 25  $\mu$ m; E: 10  $\mu$ m. **F.** Representación esquemática de los puntos de penetración existentes en un cuadrante de la córnea (izquierda). El código de colores indica la expresión de Piezo2 y/o TRPV1. Proporción de los puntos de penetración cuyas fibras expresan Piezo2 y/o TRPV1 (derecha; n=1347 puntos de penetración de 4 córneas divididas en 4 cuadrantes).

Con el fin de intentar mejorar la esperable visualización de Piezo2 en las fibras subbasales, se realizó una triple inmunotinción, usando los anticuerpos anti-neuronal  $\beta$ -tubulina clase III, anti-GFP y anti-TRPV1 en 5 córneas de ratones transgénicos *Piezo2-GFP-IRES-Cre* (*Piezo2<sup>GFP</sup>*, n=5), que expresan Piezo2 en neuronas sensoriales primarias (Woo et al., 2014). Con esta estrategia se pudieron observar fibras subepiteliales en el estroma (Figura 4.2B) y fibras subbasales en el epitelio (Figura 4.2C) que expresan GFP (Piezo2<sup>+</sup>) y TRPV1. Además, se visualizaron algunas terminaciones intraepiteliales de tipo simple que coexpresan Piezo2 (GFP<sup>+</sup>) y TRPV1 (Figura 4.2D, punta de flecha azul). Otras terminaciones, por el contrario, eran únicamente positivas para TRPV1 (Figura 4.2D, punta de flecha amarilla) o negativas para ambos marcadores. Cabe destacar que la detección de Piezo2 en las fibras sensoriales corneales y en sus terminaciones intraepiteliales fue muy irregular entre las diferentes muestras estudiadas, lo que dificultó la cuantificación de la coexpresión de Piezo2 y TRPV1. Finalmente, se usaron ratones *Trpv1-GFP* (n=3 ratones, 4 córneas) para tratar de obtener una estimación de la densidad y la distribución espacial de los puntos de penetración que originan las fibras subepiteliales cuando atraviesan la lámina basal y dan lugar a las diferentes fibras subbasales localizadas en la base del epitelio corneal (Figura 4.2E). La cuantificación de los puntos de penetración inmunorreactivos a los anticuerpos:

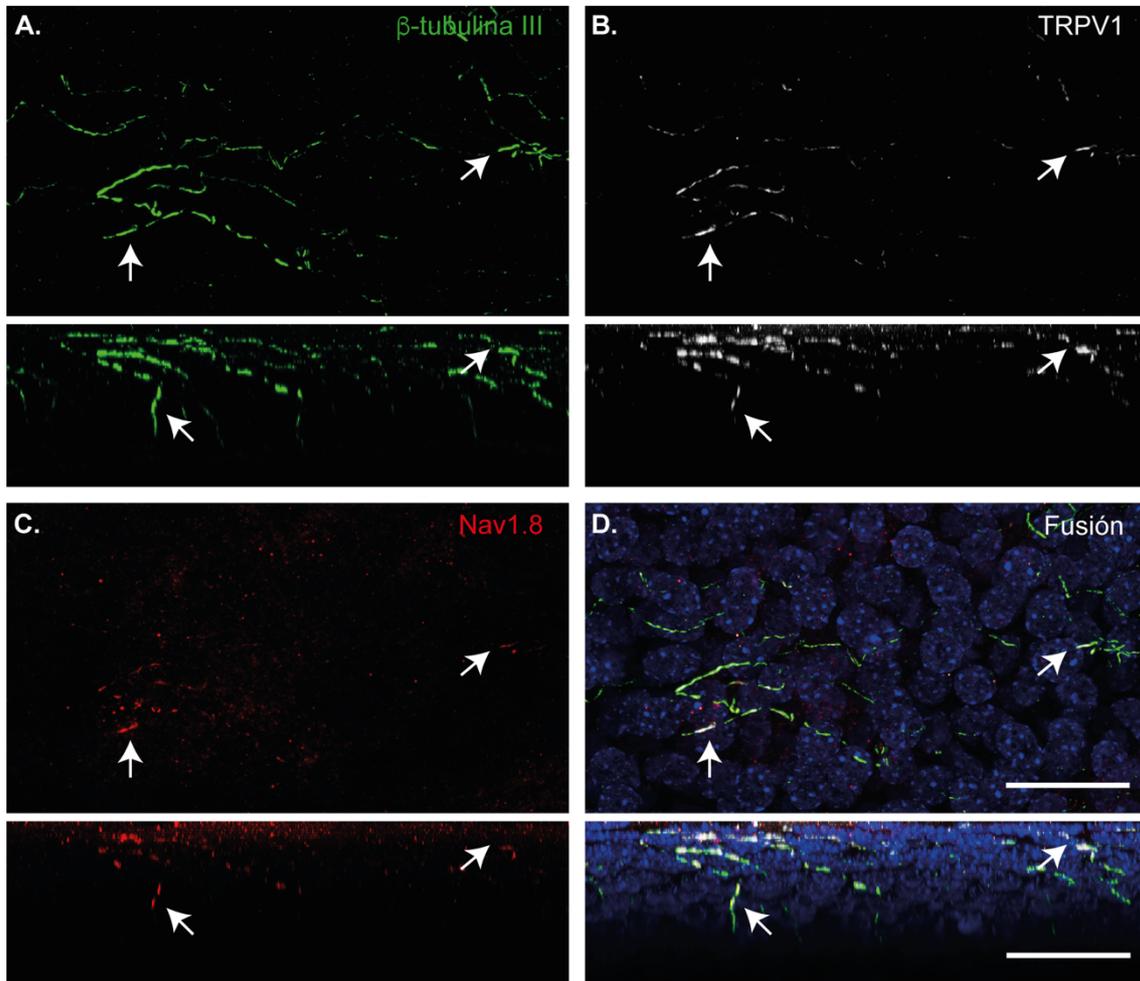
anti-neuronal  $\beta$ -tubulina clase III, anti-GFP y anti-Piezo2 permitió establecer las siguientes poblaciones de fibras: Piezo2<sup>+</sup>/TRPV1<sup>+</sup>, Piezo2<sup>+</sup>/TRPV1<sup>-</sup>, Piezo2<sup>-</sup>/TRPV1<sup>+</sup> y Piezo2<sup>-</sup>/TRPV1<sup>-</sup>. Se observó que un  $86.49 \pm 1.56\%$  de los puntos de penetración eran positivos para el marcador TRPV1, siendo el  $45.84 \pm 5.20\%$  de ellos inmunorreactivos a Piezo2. Los puntos de penetración Piezo2<sup>+</sup>/TRPV1<sup>-</sup> representaron un  $3.24 \pm 0.67\%$  (Figura 4.2E).

Estos resultados confirman la presencia de Piezo2 en fibras sensoriales periféricas de la córnea, la mayoría de las cuales coexpresan con TRPV1, lo que sugiere que la mayor parte de fibras que expresan Piezo2 corresponden a axones de neuronas nociceptoras polimodales. Por otro lado, una baja proporción de las fibras estudiadas expresan exclusivamente Piezo2, sugiriendo que poseen un fenotipo correspondiente a los axones de neuronas mecanonociceptoras puras.

#### **4.2.2. Identificación molecular del canal iónico Nav1.8.**

La caracterización molecular de las fibras sensoriales corneales se continuó con el estudio de la presencia del canal iónico Nav1.8 en la población de fibras nociceptoras. Estudios previos demuestran que las terminaciones nerviosas nociceptoras expresan Nav1.8 en otros tejidos (Black et al., 2012; Black & Waxman, 2002; Carr et al., 2002; Persson et al., 2010). Existen registros extracelulares en terminaciones nerviosas de córneas *ex vivo* que indican que los canales Nav1.8 desempeñan un papel crucial en la generación de potenciales de acción en las fibras sensoriales nociceptoras de la córnea (Brock et al., 1998). Sin embargo, no existen datos acerca de la distribución de los canales Nav1.8 a lo largo de las terminaciones nerviosas corneales. Por tanto, con el propósito de examinar la distribución de los canales Nav1.8 en las fibras nociceptoras corneales y sus terminaciones, se realizó una triple inmunotinción, usando anticuerpos contra  $\beta$ -tubulina clase III, TRPV1 y Nav1.8 (Figura 4.3). Ello permitió observar que las terminaciones nerviosas nociceptoras

TRPV1<sup>+</sup> (Figura 4.3B) expresan canales Nav1.8 (Figura 4.3C), localizados principalmente en la porción más distal de la terminación (Figura 4.3, puntas de flecha).



**Figura 4.3. Imagen confocal de terminaciones nerviosas nociceptoras que coexpresan los canales iónicos TRPV1 y Nav1.8. en la córnea del ratón.**

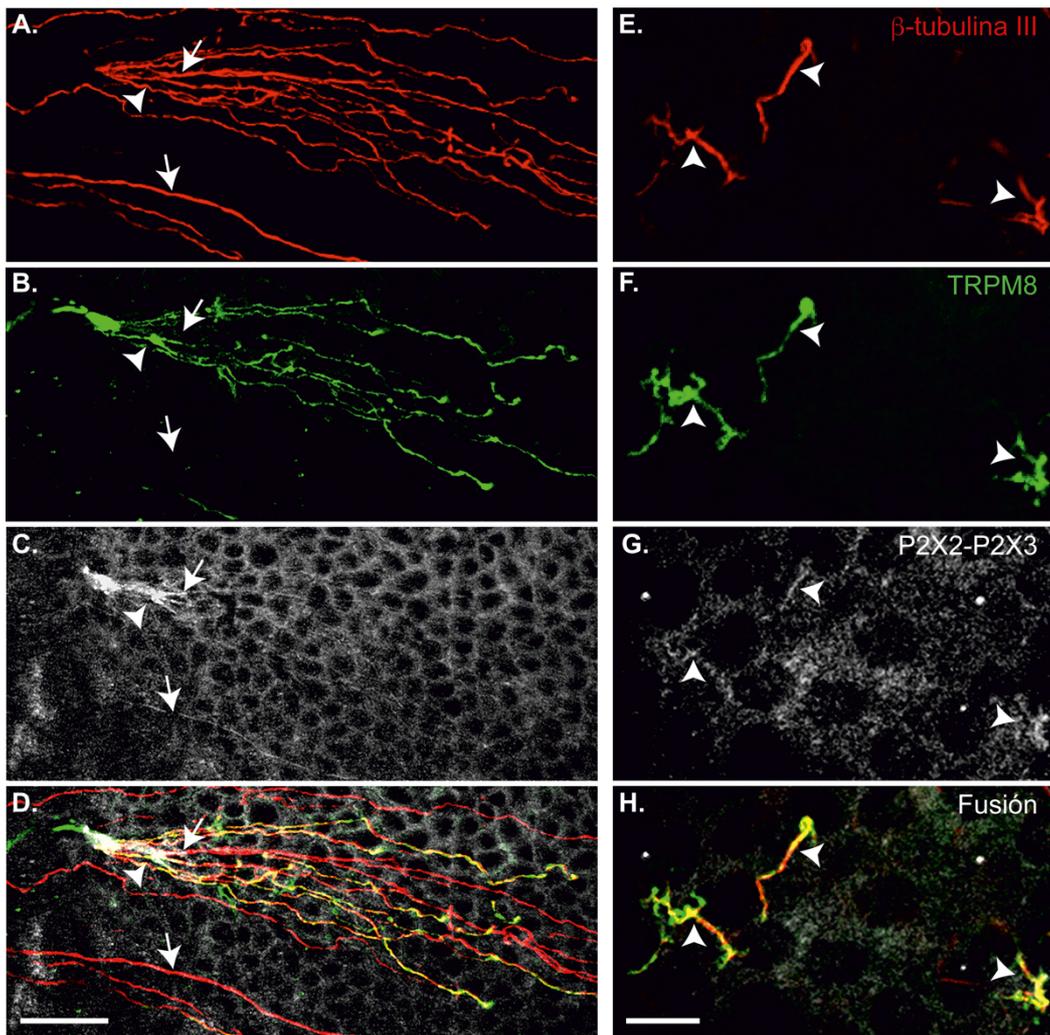
**Paneles superiores:** proyección máxima de una serie de imágenes apiladas en el plano z de una córnea aplanada teñida con anticuerpos contra  $\beta$ -tubulina clase III (A, en verde), TRPV1 (B, en gris) y Nav1.8 (C, en rojo). La Imagen D es la combinación de A, B y C. **Paneles inferiores:** proyección ortogonal de la misma serie de imágenes apiladas en el plano z. Las flechas indican las terminaciones nerviosas que coexpresan TRPV1 y Nav1.8. Los núcleos de las células epiteliales están marcados con Hoechst 33342 (D, en azul). Barra de escala: 30  $\mu$ m.

#### 4.2.3. Identificación molecular de los canales iónicos P2X2 y P2X3.

Estudios previos muestran la expresión inmunohistoquímica de los receptores purinérgicos P2X2 y P2X3 en las neuronas sensoriales primarias (Bo et al., 1999; Burnstock, 2000; C. C. Chen et al., 1995; Kobayashi et al., 2005; Vulchanova et al., 1997), así como la

coexpresión del receptor purinérgico P2X3 con el canal iónico TRPM8 en el soma de neuronas de los GR (Takashima et al., 2010).

Sin embargo, la expresión de P2X2 y P2X3 en terminaciones sensoriales periféricas no ha sido todavía establecida de manera directa. A tal efecto, se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas para identificar la posible presencia de receptores P2X2 y P2X3 en las fibras y terminaciones nerviosas sensoriales TRPM8<sup>+</sup> que inervan la córnea. Las inmunotinciones se realizaron en córneas aplanadas (n=3) de ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* (n=3); los anticuerpos utilizados fueron: anti- $\beta$ -tubulina III, anti-GFP y una mezcla de anticuerpos anti-P2X2 y anti-P2X3. Por primera vez, se observó la expresión y distribución de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X2 y P2X3 en las fibras y terminaciones nerviosas de frío corneales (Figura 4.4, puntas de flecha).



**Figura 4.4. Expresión de los receptores P2X2 y P2X3 en las fibras sensoriales de frío corneales del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

Proyección máxima de una serie de micrografías confocales apiladas en el plano z, donde se observan las fibras subbasales de frío corneales (A-D) y las terminaciones nerviosas (E-H) inmunomarcadas con anti- $\beta$ -tubulina III (en rojo), anti-GFP (en verde), anti-P2X2 y anti-P2X3 (en gris). El panel inferior muestra la imagen combinada de las fibras subbasales (D) y de las terminaciones nerviosas (H). Las puntas de flecha indican las fibras y terminaciones que coexpresan TRPM8-EYFP, P2X2 y P2X3. Las flechas señalan aquellas que expresan P2X2 y P2X3 y que son negativas para TRPM8-EYFP. Barra de escala: A-D, 30  $\mu$ m; E-H, 15  $\mu$ m.

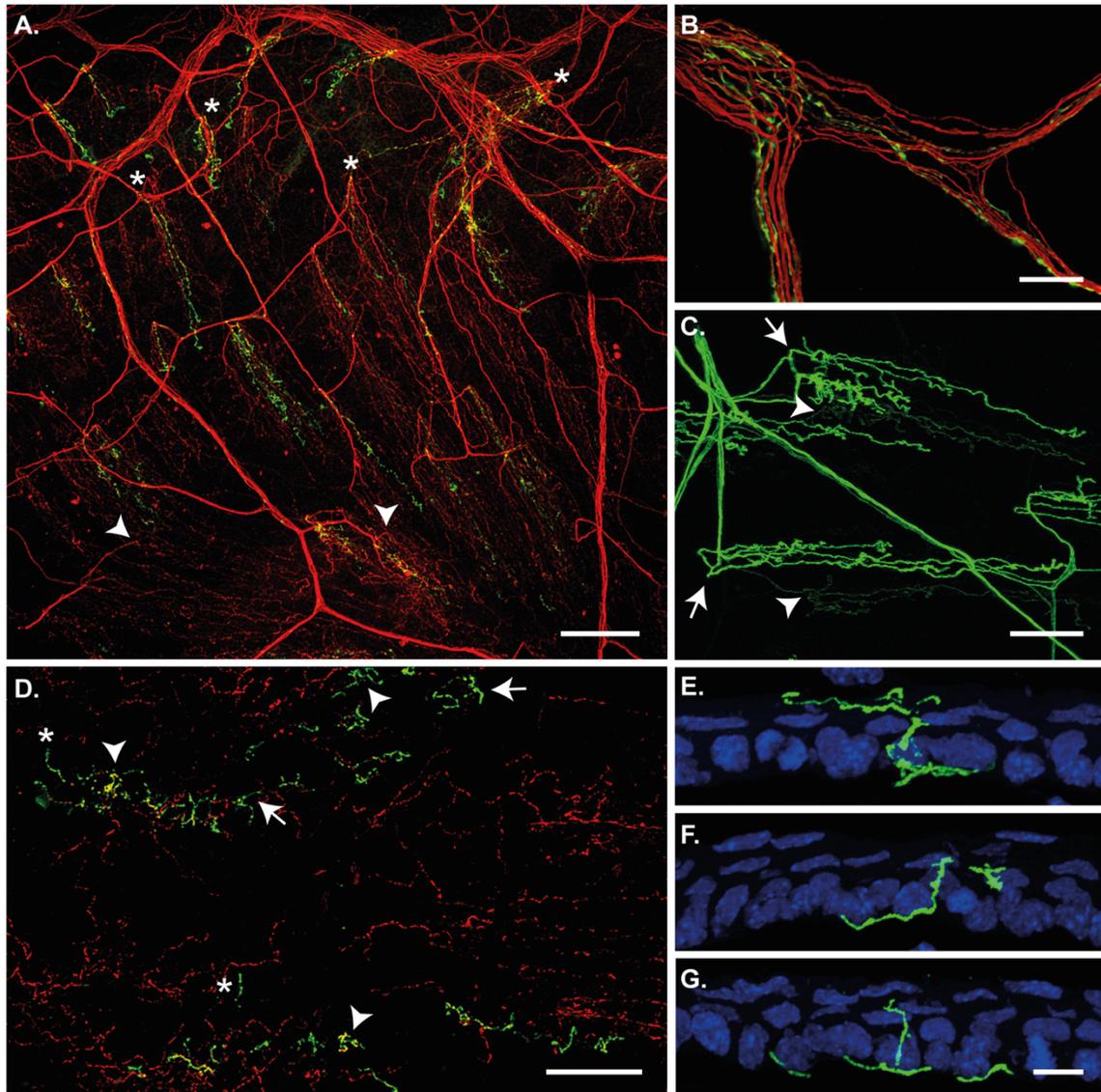
**4.3. Análisis morfométrico de las fibras sensoriales de frío en la córnea del ratón.**

**4.3.1. Ratones control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

Para realizar el análisis morfométrico de la población de fibras sensoriales sensibles al frío se usaron 9 ratones macho *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*. Las fibras TRPM8-EYFP se estudiaron a nivel de los troncos estromales profundos (Figura 4.5B), y en las ramificaciones que estos van originando a medida que ascienden desde el estroma hasta penetrar a través de la lámina basal en el epitelio (Figura 4.5A). En el epitelio corneal de los ratones se cuantificó una media de  $26.16 \pm 1.50$  puntos de penetración/ $\text{mm}^2$ , de los cuales el 43.81% contiene al menos una fibra EYFP<sup>+</sup> (Tabla 4.1). Cada una de las fibras subepiteliales, que originan un punto de penetración, emite de media  $10.65 \pm 0.66$  fibras subbasales, de las cuales el 48.76% son EYFP positivas (Tabla 4.1). La densidad media de las fibras subbasales es de  $563.99 \pm 47.67$  fibras/ $\text{mm}^2$ , de las cuales un 22.4% son EYFP positivas (Tabla 4.1). Las fibras corneales EYFP<sup>+</sup> son morfológicamente heterogéneas. Un  $50.04 \pm 6.55\%$  de ellas muestra alta intensidad de fluorescencia EYFP y presenta varicosidades, y son denominadas fibras tipo I. El  $49.96 \pm 6.55\%$  de fibras subbasales EYFP<sup>+</sup> restantes presenta una baja intensidad de fluorescencia y ausencia de varicosidades, y son denominadas fibras tipo II (Figura 4.5C, Tabla 4.1). La medida de la longitud de las fibras tipo I, desde su origen en el punto de penetración hasta su extremo distal, muestra una longitud similar tanto en el centro ( $303.50 \pm 27.67$   $\mu$ m) como en la periferia de la córnea ( $308.95 \pm 20.80$   $\mu$ m;  $p=0.88$ , Prueba T para muestras independientes); sin embargo, las fibras tipo II, con origen en la periferia corneal,

son más largas ( $227.60 \pm 11.58 \mu\text{m}$ ) que las localizadas en el centro ( $142.00 \pm 11.68 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ; Prueba T para muestras independientes). En conjunto, las fibras tipo I son significativamente más largas ( $306.20 \pm 17.09 \mu\text{m}$ ) que las de tipo II ( $184.80 \pm 10.62 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ; Prueba T para muestras independientes).

También se observó que todas las fibras subbasales, a lo largo de su trayectoria, emiten terminaciones nerviosas que ascienden perpendicularmente a través de las células epiteliales estratificadas de la córnea hasta alcanzar la superficie (Figura 4.5D-G). La densidad media de todas terminaciones intraepiteliales observadas en la córnea del ratón es de  $527.8 \pm 23.2$  terminaciones/ $\text{mm}^2$  ( $n=3$ ) de las que un 29.6% son EYFP positivas (Tabla 4.1), presentando los 3 tipos morfológicos de terminaciones nerviosas corneales descritas en previos estudios. Estos tipos morfológicos se clasifican de acuerdo al número de ramificaciones que presentan en: terminaciones simples (sin ramificaciones) (Figura 4.5D, E), terminaciones ramificadas (con un punto de ramificación) (Figura 4.5D, F) y terminaciones complejas (con más de un punto de ramificación) (Figura 4.5D, E) (Alcalde et al., 2018; Ivanusic et al., 2013). En las fibras tipo I la proporción de terminaciones complejas EYFP+ es significativamente más alta ( $51.09 \pm 2.05\%$ ) que en las de tipo II ( $10.42 \pm 2.72\%$ ;  $z=11.05$ ,  $p < 0.0001$ , Prueba Z). Por el contrario, en las fibras tipo I el porcentaje de terminaciones ramificadas ( $20.81 \pm 1.63\%$ ) es significativamente menor que en las de tipo II ( $31.67 \pm 1.84\%$ ;  $z=-3.25$ ,  $p=0.0012$ , Prueba Z); y la proporción de terminaciones simples también es menor en las fibras tipo I ( $28.63 \pm 0.64\%$ ) que en las de tipo II ( $57.92 \pm 0.90\%$ ;  $z=-7.40$ ,  $p < 0.0001$ , Prueba Z) (Figura 4.6).



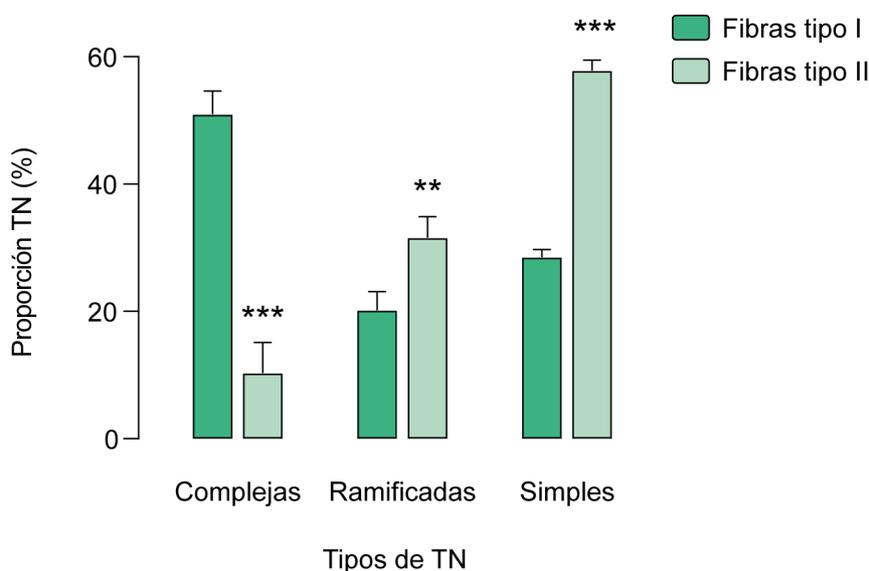
**Figura 4.5. Arquitectura de las fibras sensoriales de frío corneales en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.** Imágenes confocales de las fibras y terminaciones nerviosas en preparaciones de córnea aplanada (A-D) y en secciones transversales (E-G) marcadas con anticuerpos anti- $\beta$ -tubulina III (en rojo) y anti-GFP (en verde). Los núcleos celulares están teñidos con DAPI (E-G). **A.** Imagen de un cuadrante de la córnea que muestra cómo las fibras subepiteliales penetran a través de la lámina basal y emergen las fibras subbasales tanto en la periferia (asteriscos) como en el centro de la córnea. **B.** Nervio estromal profundo que contiene fibras TRPM8-EYFP. **C.** Conjunto de fibras subbasales que presentan una alta intensidad de fluorescencia (fibras tipo I, flechas) y una baja intensidad de fluorescencia (fibras tipo II, puntas de flecha). **D.** Terminaciones nerviosas EYFP<sup>+</sup> complejas (puntas de flecha), ramificadas (flechas) y simples (asteriscos). **E-G.** Vista transversal de las terminaciones nerviosas complejas (E), ramificadas (F) y simples (G) ascendiendo hacia la superficie a través del epitelio estratificado de la córnea. Barras de escala: A, 150  $\mu$ m; B, 50  $\mu$ m; C, 100  $\mu$ m; D, 75  $\mu$ m; E-G, 10  $\mu$ m.

**Tabla 4.1. Características morfológicas de las fibras y terminaciones sensoriales TRPM8-EYFP que inervan la córnea.**

Parámetros morfométricos	n	Resultados	Unidades
Puntos de penetración en lámina basal	5	11.46 ± 0.47	penetraciones/mm <sup>2</sup>
Fibras subbasales tipo I	3	50.04 ± 6.55	%
Fibras subbasales tipo II	3	49.96 ± 6.55	%
Densidad de fibras subbasales	7	126.40 ± 5.91	fibras/mm <sup>2</sup>
Número de fibras por punto de penetración	3	5.19 ± 0.32	fibras
Densidad de terminaciones intraepiteliales	7	156.20 ± 8.03	terminaciones/mm <sup>2</sup>

Los valores para cada uno de los parámetros estudiados se muestran como el promedio ± error típico de la media.

Las fibras subbasales tipo I son aquellas que presentan una alta intensidad de fluorescencia EYFP y poseen varicosidades. Por el contrario, las fibras tipo II muestran una baja intensidad de fluorescencia EYFP y no poseen varicosidades.

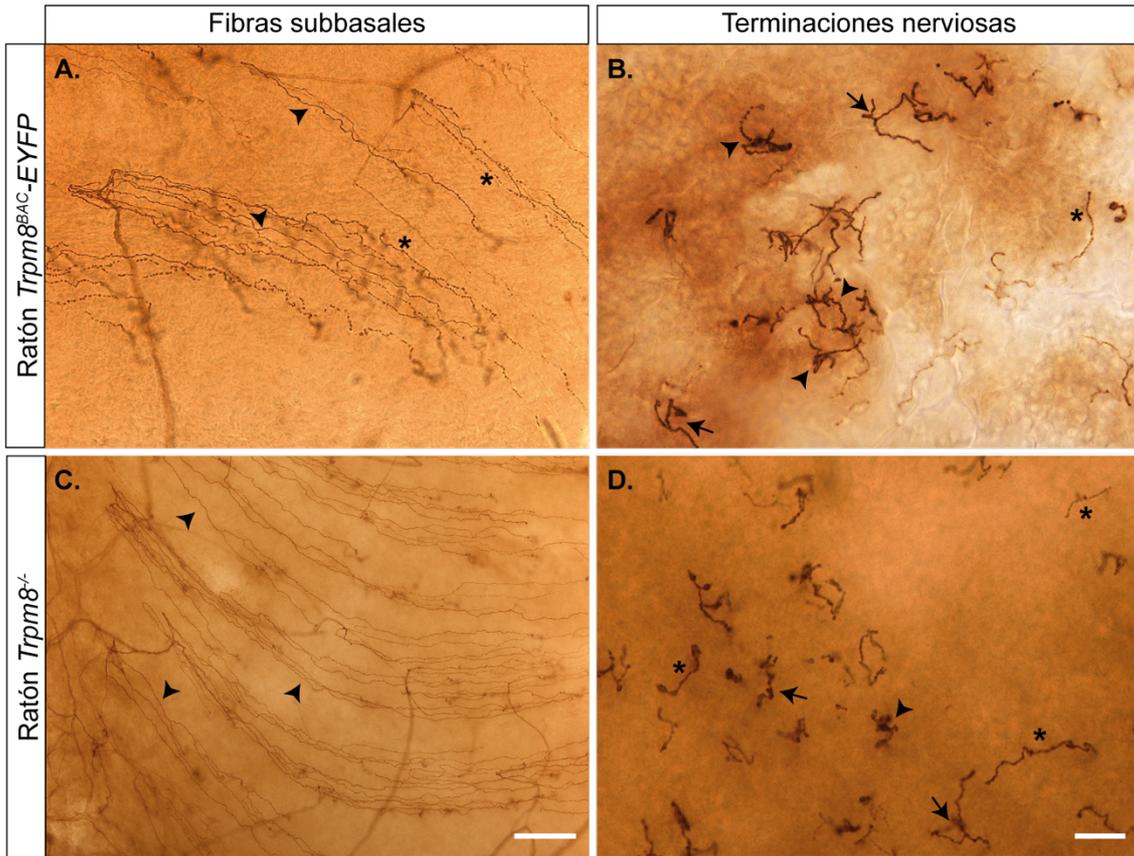


**Figura 4.6. Proporción de los diferentes tipos morfológicos de terminaciones sensoriales de frío en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

Análisis del porcentaje de TN según su tipo morfológico (terminaciones complejas, ramificadas y simples) en las FSB tipo I, que muestran una alta intensidad de fluorescencia EYFP y poseen varicosidades; así como en las FSB tipo II, que muestran una baja intensidad de fluorescencia EYFP y son lisas con ausencia de varicosidades. El contraste de hipótesis se realizó mediante una prueba-Z ( $p < 0.001$ \*\*\*,  $p < 0.01$ \*\*).

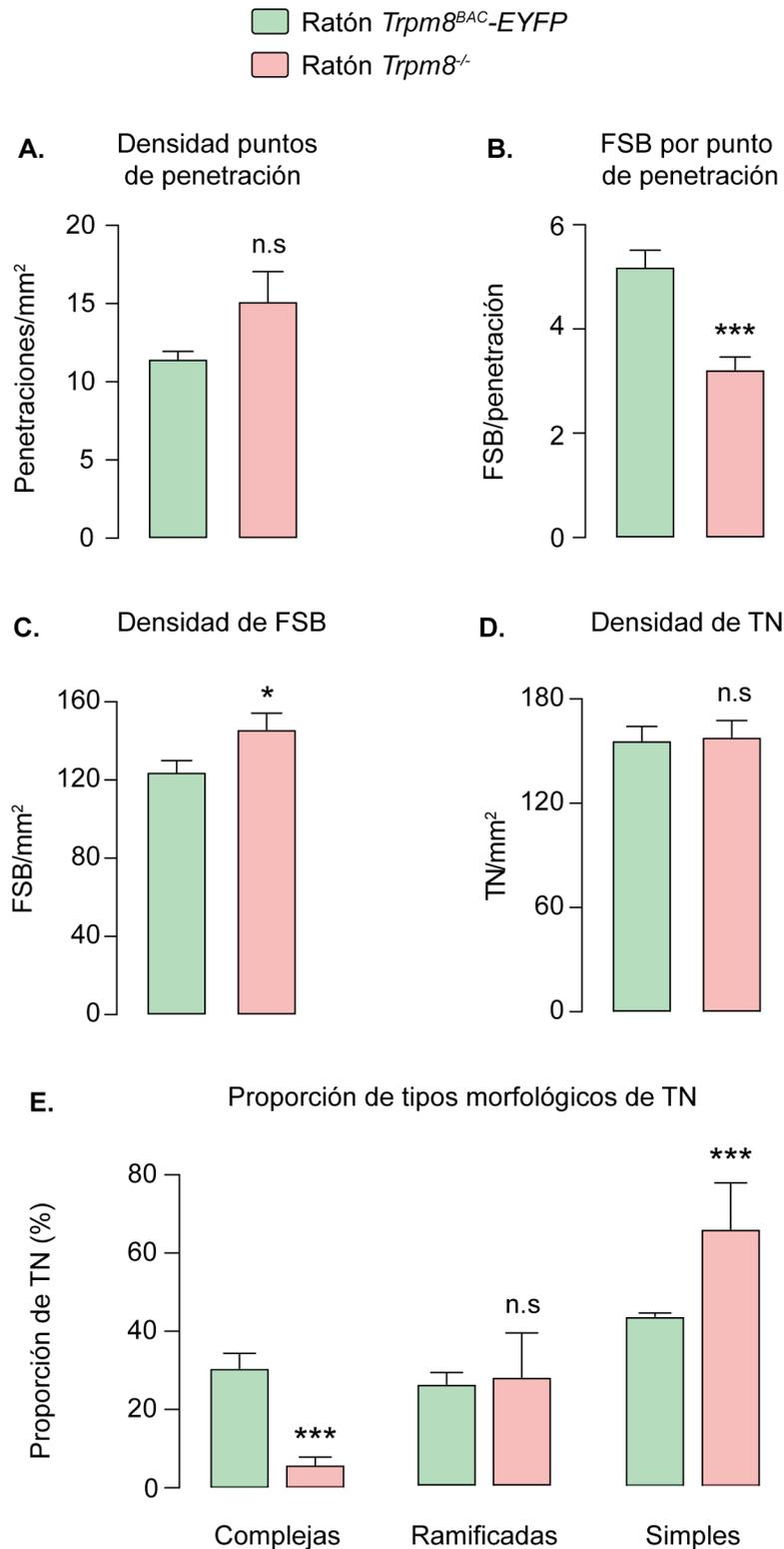
#### 4.3.2. Ratones *knockout* para TRPM8.

Con la finalidad de conocer si la ausencia del canal iónico TRPM8 tiene efectos sobre la arquitectura de la inervación sensorial en la población de fibras sensibles al frío, se estudiaron diferentes parámetros morfométricos en 5 córneas de 5 ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup>, pero que siguen exhibiendo fluorescencia verde. Así, se observó que la densidad de puntos de penetración que contiene alguna fibra GFP positiva ( $15.13 \pm 2.01$  penetraciones/mm<sup>2</sup>) no es diferente estadísticamente de la del ratón *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $11.46 \pm 0.7$  penetraciones/mm<sup>2</sup>; p=0.09, Prueba U de Mann-Whitney, Figura 4.7 y 4.8A). Sin embargo, los puntos de penetración en el ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> poseen un promedio de  $6.52 \pm 0.37$  fibras por punto de penetración, un número significativamente menor que el de los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $10.65 \pm 0.66$  fibras subbasales; p<0.001, Prueba U de Mann-Whitney). Como consecuencia, en los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup>, el promedio del número total de fibras nerviosas presentes en los puntos de penetración que contienen fibras GFP positivas ( $3.22 \pm 0.24$  fibras) es significativamente menor que en los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $5.19 \pm 0.32$  fibras GFP<sup>+</sup>; p<0.001, Prueba U de Mann-Whitney, Figura 4.8B). Sorprendentemente, se observó que la densidad de fibras sensoriales GFP<sup>+</sup> del plexo subbasal es significativamente mayor en el ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> ( $145.92 \pm 5.97$  fibras subbasales/mm<sup>2</sup>) que en el ratón *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $126.40 \pm 5.91$  fibras subbasales/mm<sup>2</sup>; p=0.03, Prueba T para muestras independientes, Figura 4.8C). Cabe destacar que esta mayor densidad de fibras subbasales de frío en el ratón *knockout* la generan fibras GFP<sup>+</sup>, que son homogéneas morfológicamente, asemejándose, por tanto, a las fibras tipo II presentes en el ratón *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> (Figura 4.7, puntas de flecha).



**Figura 4.7. Imágenes de las fibras subbasales y de las terminaciones nerviosas en la córnea del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y del ratón *Trpm8<sup>-/-</sup>*.**

Inmunotinción de las fibras sensoriales de frío con anti-GFP mediante la técnica ABC-peroxidasa. **A-B.** Se pueden observar las fibras subbasales (A) tipo I (asteriscos) y tipo II (puntas de flecha) en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, así como los tres tipos de terminaciones intraepiteliales (B): complejas (puntas de flecha), ramificadas (flechas) y simples (asterisco). **C-D.** Por el contrario, en el ratón *Trpm8<sup>-/-</sup>* se observan exclusivamente fibras subbasales similares a las de tipo II (C, puntas de flecha). Nótese la ausencia de varicosidades. Se pueden observar los tres tipos morfológicos de terminaciones nerviosas (D), destacando una menor proporción de terminaciones complejas (puntas de flecha) y una mayor de terminaciones simples (asteriscos) en comparación con el ratón silvestre (B). Barras de escala: A-C, 100  $\mu\text{m}$ ; B-D, 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.8. Comparación morfológica de la población de fibras de frío corneales del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y del *Trpm8<sup>-/-</sup>*.**

Diagramas de barras que representan el promedio y el error típico de la muestra para los siguientes parámetros: densidad de puntos de penetración en la lámina basal (A), número de FSB que emite un punto de penetración (B), densidad de FSB (C), densidad de TN (D) y proporción de los diferentes tipos morfológicos de TN (E). Las pruebas utilizadas para realizar el contraste de hipótesis fueron:

Prueba U de Mann-Whitney (A, B), Prueba T para muestras independientes (C, D) y Prueba Z (E) ( $p < 0.001^{***}$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.05^*$  y  $p > 0.05$  n.s).

Por el contrario, no se observaron diferencias en la densidad de terminaciones intraepiteliales GFP<sup>+</sup> del ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> ( $158.12 \pm 9.45$  terminaciones/mm<sup>2</sup>) y del *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $156.20 \pm 8.03$  terminaciones/mm<sup>2</sup>,  $p = 0.88$ , Prueba T para muestras independientes, Figura 4.8D). Sin embargo, se encontraron diferencias en la proporción de los tipos morfológicos de las terminaciones intraepiteliales de las fibras GFP<sup>+</sup> en la córnea de los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> con respecto a las de los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> (Figura 4.7 y 4.8E). Los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> presentan un porcentaje significativamente menor de terminaciones complejas ( $5.85 \pm 1.13$  %,  $z = 8.52$ ,  $p < 0.001$ , Prueba Z) y significativamente mayor de terminaciones simples ( $65.69 \pm 6.83$ %,  $z = -6.41$   $p < 0.001$ , Prueba Z), mientras que la proporción de terminaciones ramificadas no presenta diferencias ( $27.82 \pm 6.50$ %,  $z = -0.58$ ,  $p = 0.56$ , Prueba Z) (Figura 4.8E). Además, en el ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> se observa un número reducido de fibras subbasales que no emiten terminaciones en su extremo distal ( $0.64 \pm 0.64$ %,  $z = -2.01$ ,  $p = 0.04$ , Prueba Z), un fenómeno que no se observa en los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> de esa misma edad (Alcalde et al., 2018)

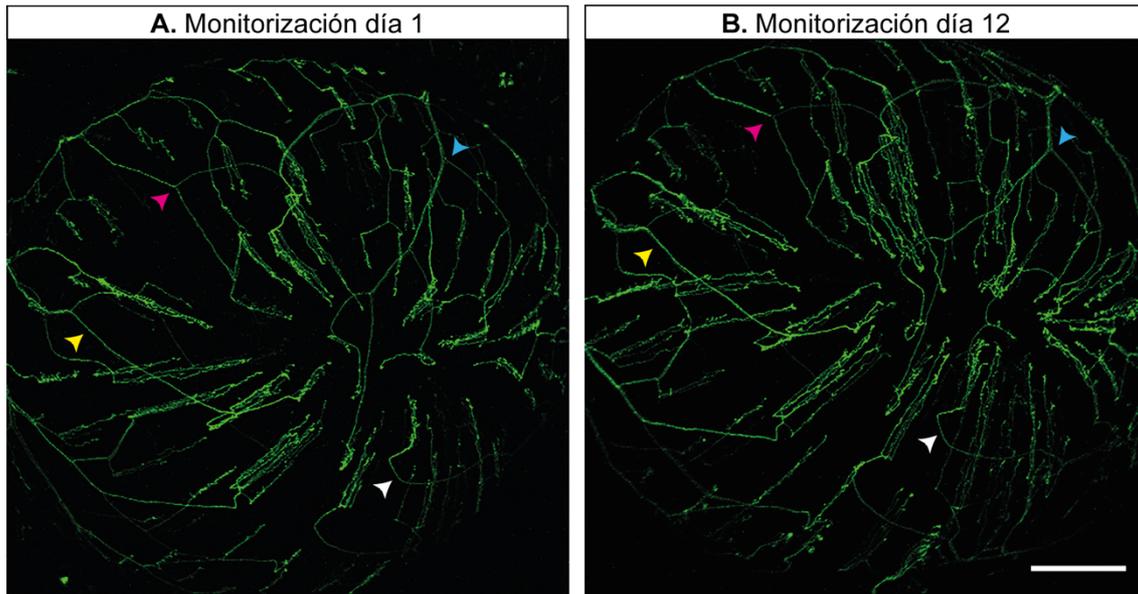
#### **4.4. Monitorización *in vivo* de fibras individuales en la córnea de ratones adultos.**

En este bloque de experimentos se realizó un análisis morfométrico dinámico de los cambios morfológicos que se producen durante los procesos de remodelación morfológica espontánea en las fibras y terminaciones nerviosas de frío corneales. Para ello, se usaron ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> y *Trpm8*<sup>-/-</sup>, lo que permitió la identificación, reconocimiento y monitorización de las fibras sensoriales y sus terminaciones de manera individualizada mediante técnicas de microscopía confocal *in vivo*.

#### **4.4.1. Análisis morfométrico dinámico de fibras corneales individuales**

##### **TRPM8-EYFP en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

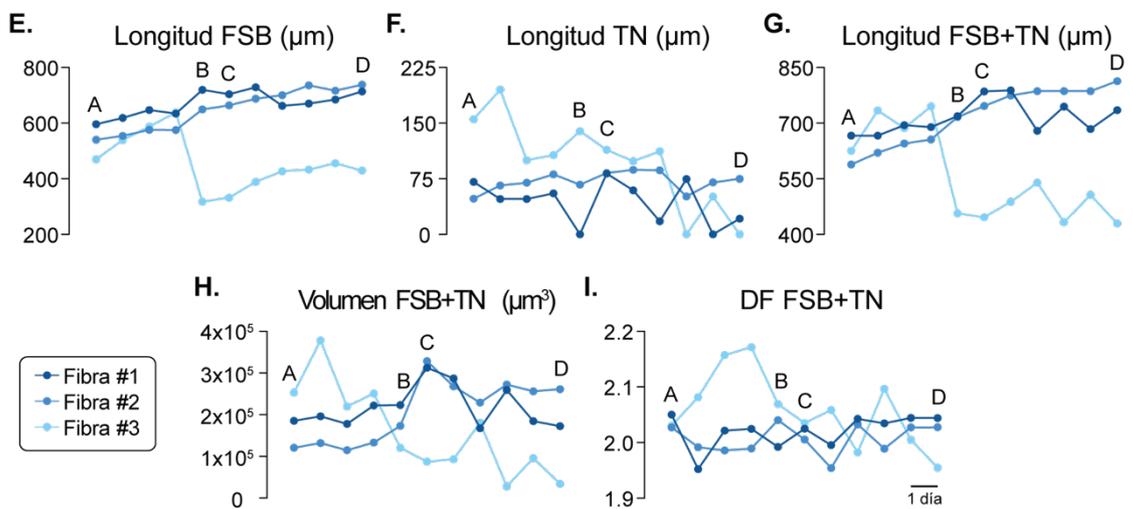
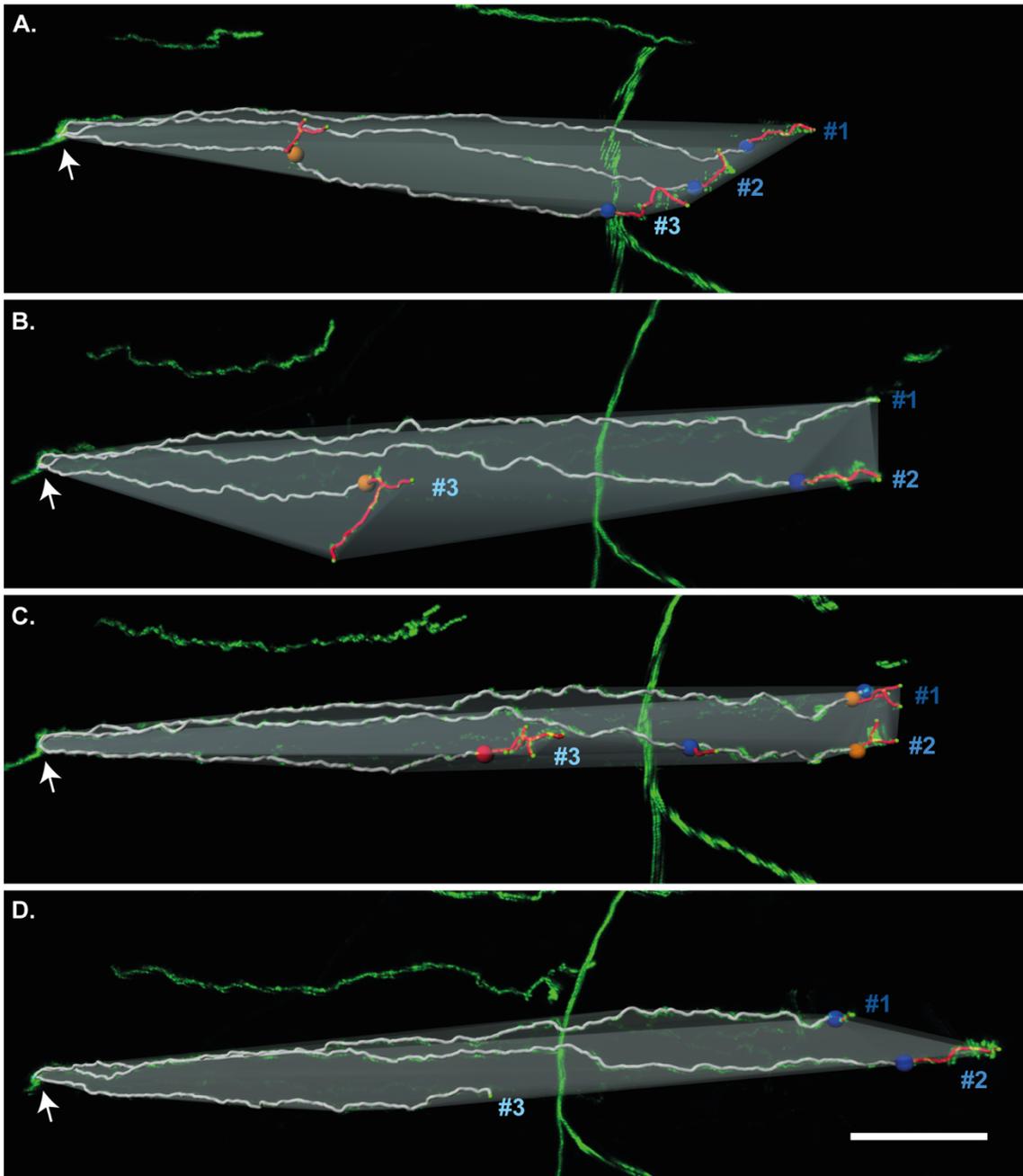
En 1989, Harris & Purves probaron la existencia de cambios morfodinámicos espontáneos en las terminaciones sensoriales de la córnea del ratón en periodos de tiempo tan cortos como 24 horas. Sin embargo, la tecnología disponible no les permitió llevar a cabo la cuantificación de los cambios observados, por lo que quedaron reducidos a una observación general, meramente cualitativa. El desarrollo de métodos de análisis morfométrico dinámico más precisos (ver apartado 3.4.2 de métodos) permite cuantificar la remodelación espontánea de las fibras y las terminaciones nerviosas de la córnea, siguiendo los cambios estructurales y las variaciones que tienen lugar en la distribución espacial de estas fibras y de sus terminaciones a lo largo de un periodo de 12 días. Para ello, se estudió la inervación en 6 córneas de ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* (n=6), confirmando así la observación realizada por Harris & Purves de que en los troncos nerviosos estromales no se producen cambios morfológicos significativos a lo largo del tiempo (Figura 4.9, puntas de flecha). Aprovechando esta estabilidad morfológica, se usaron las fibras nerviosas estromales como puntos de referencia fijos para el seguimiento de la remodelación espontánea que, como se observó, experimentan las FSB y sus respectivas TN a diferentes tiempos de estudio (Figura 4.10). En total se monitorizaron 19 FSB y sus TN, localizadas tanto en la periferia (n=9) como en el centro (n=10) de la córnea (ver apartado 3.3 de la sección de metodología).



**Figura 4.9. Arquitectura de las fibras nerviosas de frío en la córnea de un ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* *in vivo*.**

Inervación sensorial presente en una córnea de ratón en el primer día de monitorización (A) y en el día 12 (B). Las puntas de flecha en A y B que tienen el mismo color señalan la misma fibra subepitelial a día 1 y 12, respectivamente. Barra de escala A, B: 500  $\mu$ m

La Figura 4.10 muestra la reconstrucción, mediante el uso del software Imaris 9.3 (Oxford Instruments), de tres FSB individuales (en gris) y de sus TN (en rojo), que emergen de un mismo punto de penetración (flecha). En las imágenes A, B, C y D se observan los cambios morfológicos que ocurren en los días 1, 5, 6 y 11 de seguimiento, respectivamente. En ellas es posible identificar *de visu* los cambios que se producen en la longitud de las FSB y en sus TN, así como variaciones en la distribución espacial de las estructuras estudiadas, medida a través del volumen que ocupa cada una de las fibras y sus terminaciones en el epitelio corneal (representada en la Figura 4.10A-D por la superficie translúcida que cubre cada una de las fibras individuales). Asimismo, fue posible cuantificar y representar el curso temporal de los cambios de: longitud de cada FSB individualmente (E), longitud acumulada de las TN de cada FSB (F), longitud acumulada de cada FSB y sus TN (FSB+TN; G), volumen de cada FSB+TN (H) y dimensión fractal de cada FSB+TN (I).



**Figura 4.10. Cambios morfodinámicos de 3 fibras subbasales originadas en el mismo punto de penetración.**

**A-D.** Las fibras (en gris) y sus terminaciones (en rojo), procedentes de un mismo punto de penetración (flecha), fueron reconstruidas tridimensionalmente y fusionadas con la imagen original como se muestra en las imágenes A (día 1 de monitorización), B (día 5), C (día 6) y D (día 11). Cada una de las fibras está numerada (#1, #2, #3) para su identificación en las imágenes. **A-D.** Las terminaciones nerviosas están etiquetadas con esferas de colores según su tipo morfológico: simple (azul), ramificado (naranja) y complejo (rosa). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . **E-I.** Curso temporal de la longitud de cada FSB (E), de la longitud acumulada de las TN de cada fibra subbasal (F), de la longitud total de FSB+TN (G), del volumen que ocupa cada FSB+TN en el epitelio corneal (H) y de la dimensión fractal de cada FSB+TN(I). Barra de escala: 1 día.

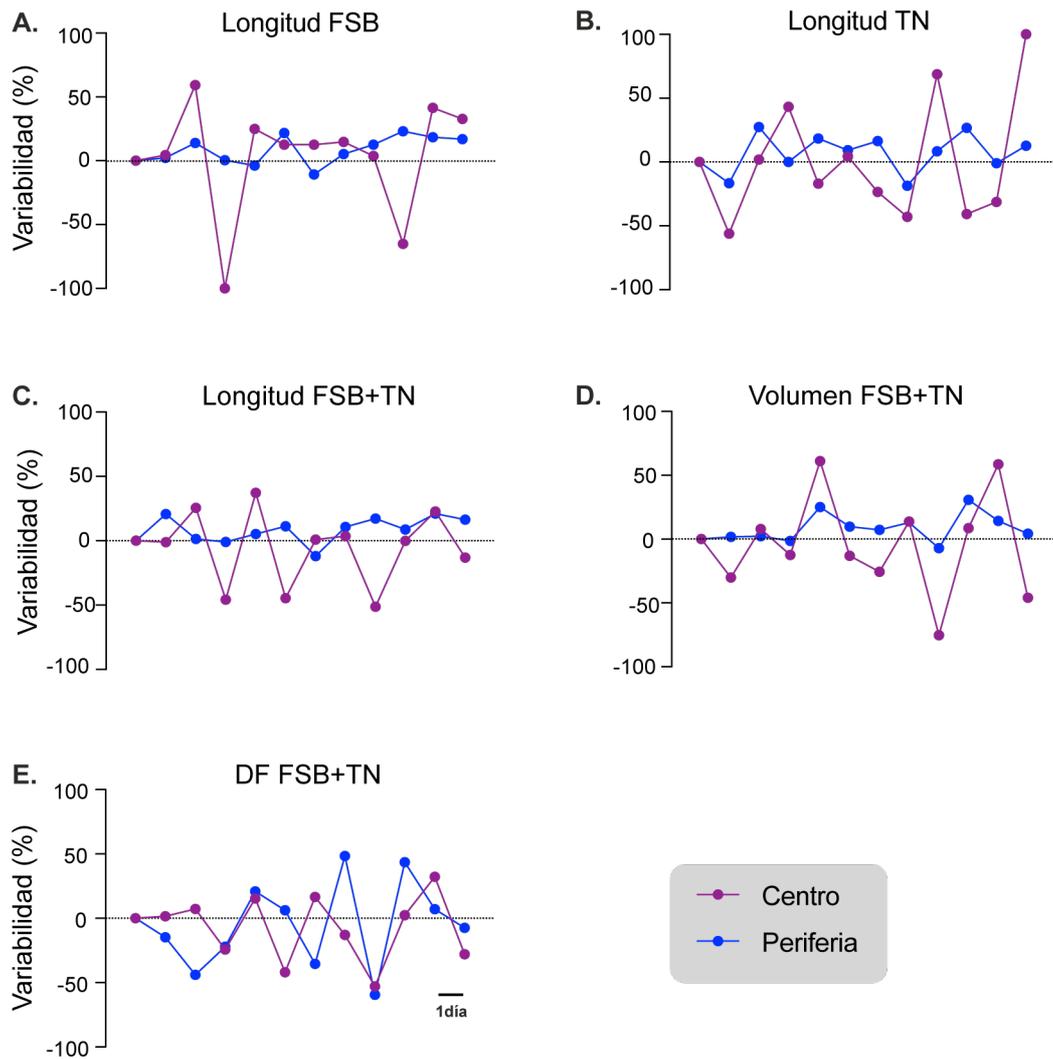
Con el objetivo de determinar cuán dinámicos son los cambios morfológicos observados, se analizó individualmente la variabilidad diaria, expresada como el porcentaje de cambio del valor de un parámetro morfométrico dado con respecto al valor registrado el día anterior (Figura 4.11). Cabe destacar que en todas las fibras analizadas se observaron cambios morfológicos diarios. Además, para una mayor comprensión del proceso de remodelación espontánea, es importante determinar si los cambios diarios producidos traen consigo un crecimiento o decrecimiento neto de los parámetros estudiados en cada fibra; o por el contrario no implican cambios netos a lo largo del periodo estudiado. Para lograrlo, se aplicó una prueba T para una muestra, considerando que si la p-valor es menor a 0.05 existen variaciones estadísticamente significativas, en cuyo caso los cambios producidos son diferentes a 0 (ver apartado 3.4.2 de métodos).

Esta aproximación permite observar que el 74% de las fibras (14 de 19) experimentan un cambio neto igual a 0 ( $p > 0.05$ ) en cualquiera de los parámetros analizados, mientras que las fibras restantes mostraron, a lo largo de los 12 días de seguimiento, crecimientos o decrecimientos netos en los parámetros morfológicos analizados. La Figura 4.11 presenta dos ejemplos de fibras en las que el cambio neto en los distintos parámetros analizados no es estadísticamente diferente de cero.

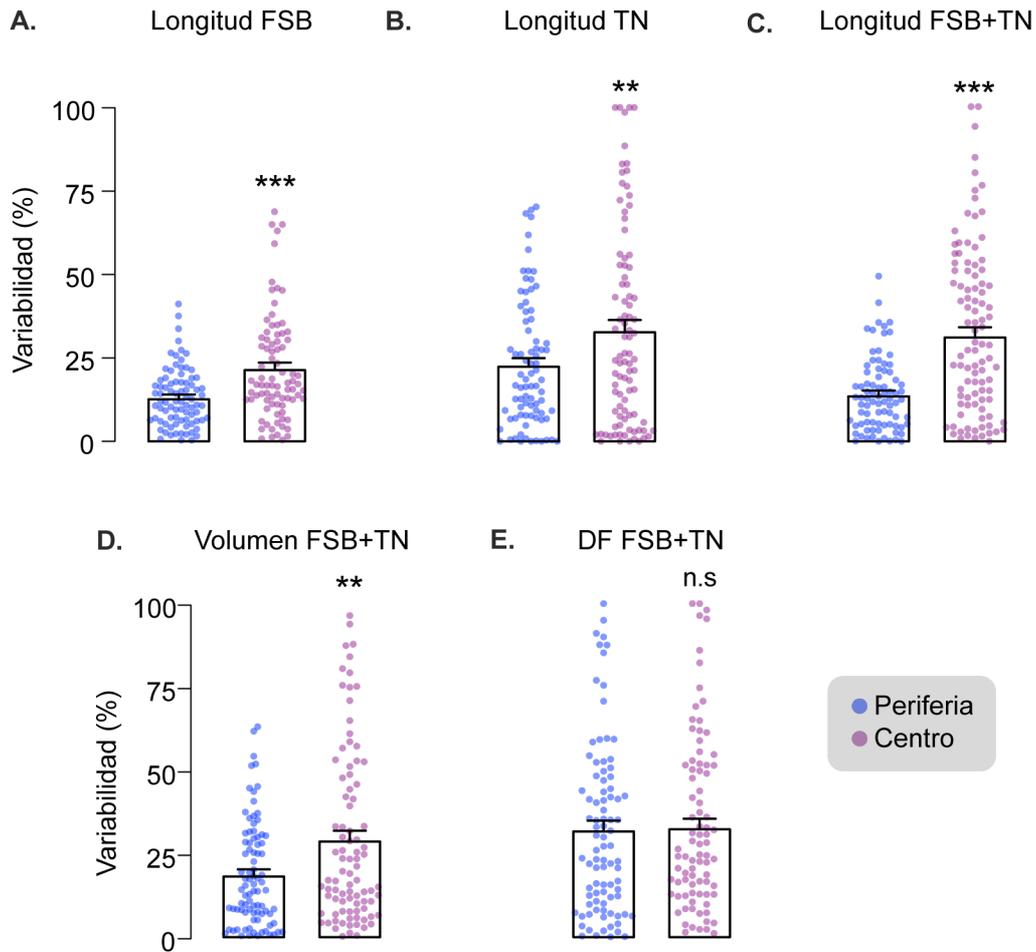
Además, se analizaron los cambios morfodinámicos que se producen en las FSB y en sus TN en función de su localización en la córnea. Para ello, se promedió la variabilidad en

números absolutos de cada uno de los parámetros morfométricos y se compararon las diferencias entre las fibras de la periferia y el centro corneal (Figura 4.12). Se observó que el promedio de la variabilidad diaria en la longitud de cada FSB es mayor en las fibras centrales ( $21.89 \pm 1.74\%$ ) que en las periféricas ( $13.10 \pm 0.95\%$ ;  $p < 0.0001$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.11A y 4.12A), así como en la longitud acumulada de las TN de cada FSB ( $33.23 \pm 2.11\%$  vs  $22.84 \pm 2.14\%$ ;  $p = 0.0080$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.11B y 4.12B), en la longitud total de cada FSB+TN ( $31.53 \pm 2.63\%$  vs  $13.98 \pm 1.20\%$ ;  $p < 0.0001$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.11C y 4.12C) y en el volumen ocupado por cada FSB+TN en el epitelio corneal ( $29.21 \pm 2.76\%$  vs  $18.68 \pm 1.67\%$ ;  $p = 0.0014$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.11D y 4.12D). Sin embargo, se observó que la dimensión fractal de cada FSB+TN no muestra diferencias significativas entre centro ( $32.87 \pm 2.70\%$ ) y periferia ( $32.19 \pm 2.73$ ;  $p = 0.8607$ ; Prueba T para muestras independientes; Figura 4.11E y 4.12E).

En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que las fibras sensoriales de frío en el epitelio corneal, a diferencia de las fibras del estroma, experimentan cambios morfológicos espontáneos en su longitud, volumen y dimensión fractal. Además, en la mayoría de las fibras analizadas, tales cambios no implican un crecimiento o decrecimiento neto de las fibras a lo largo de un periodo de 12 días de monitorización. Asimismo, los cambios morfodinámicos son de mayor amplitud en la población de fibras sensoriales de frío localizadas en el área central de la córnea en comparación con aquellas de la periferia, lo que sugiere un mayor dinamismo en la remodelación morfológica espontánea de las fibras sensoriales de frío del centro de la córnea.



**Figura 4.11. Ejemplo del curso temporal de los cambios morfodinámicos de una fibra subbasal central y otra periférica en la córnea del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.** Variabilidad diaria de la longitud de cada FSB (A), de la longitud acumulada de las TN de cada fibra subbasal (B), de la longitud total acumulada de FSB+TN (C), del volumen de cada FSB+TN (D) y de la dimensión fractal de cada FSB+TN (E). Se representa una fibra subbasal localizada en la periferia (líneas azules) y otra en el centro (líneas lilas) de la córnea. El curso temporal de la variabilidad de las fibras representadas oscila alrededor del valor medio de cero (representado con una línea continua de puntos). Barra de escala: 1 día.



**Figura 4.12. Promedio de la variabilidad de los cambios morfodinámicos experimentados por las fibras subbasales localizadas en la periferia y en el centro de la córnea en el ratón *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*.**

Diagrama de barras en el que se representa el promedio y el error típico de la media de la variabilidad en la longitud de cada FSB (A) y en la longitud acumulada de sus TN (B), en la longitud acumulada de cada FSB+TN (C), en el volumen ocupado en la superficie corneal por cada FSB+TN (D) y en la dimensión fractal de cada FSB+NT (E). En cada una de las variables analizadas, los valores de la variabilidad diaria para cada una de las fibras nerviosas estudiadas se representan como puntos sobre las barras que agrupan los datos en función de si las fibras se localizan en la periferia (en azul) o en el centro (en lila) de la córnea. El contraste de hipótesis se realizó mediante una prueba T para muestras independientes ( $p < 0.001$ \*\*\*,  $p < 0.01$ \*\* ,  $p < 0.05$ \* ,  $p > 0.05$  ns).

#### 4.4.2. Análisis morfométrico dinámico de fibras individuales GFP+ en la córnea del ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup>.

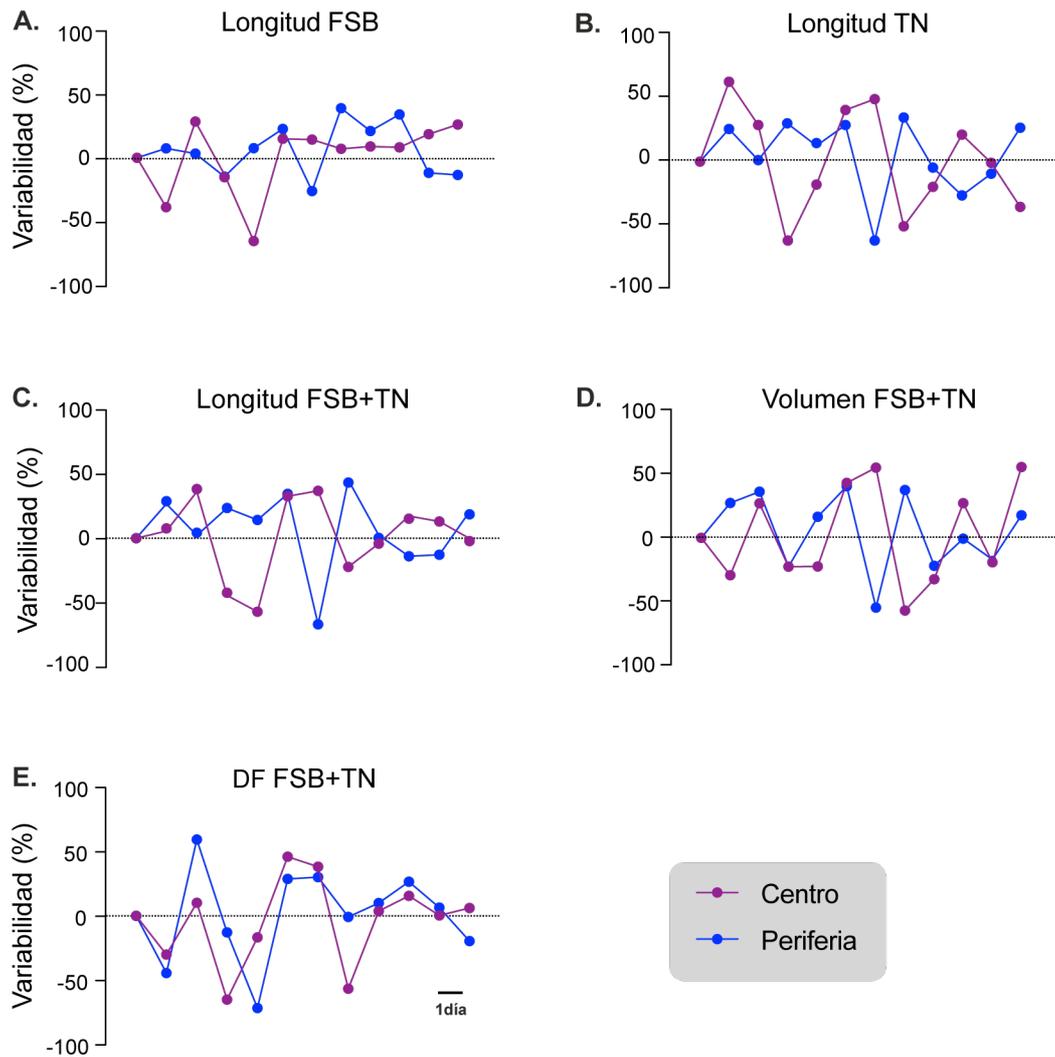
Dado que los resultados obtenidos del análisis morfométrico estático de las fibras de frío corneales de los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> muestran diferencias morfológicas con respecto a los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>, se exploró además si la ausencia del receptor TRPM8 tiene efectos sobre el proceso de remodelación espontánea de estas fibras. Con este objetivo, se realizaron los experimentos de monitorización de fibras individuales corneales durante 12 días, en 9 fibras subbasales presentes en 4 córneas de 2 ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup>.

Al igual que en los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>, en los *Trpm8*<sup>-/-</sup> se observó que existen cambios morfológicos espontáneos diarios en las fibras sensoriales de frío (Figura 4.13). Además, se analizó si estas variaciones implican cambios netos en la morfología de las fibras durante el periodo estudiado. Mediante la prueba T para una muestra, se obtuvo que el 89% de las fibras (8 de 9) no experimentan cambios morfológicos netos estadísticamente significativos durante los 12 días de estudio ( $p > 0.05$ ). Posteriormente, se cuantificó la variabilidad de los cambios morfológicos, y a diferencia de lo observado en las fibras de los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>, en los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> se observó que no existen diferencias significativas entre las fibras periféricas y centrales (Figura 4.13 y 4.14) en cuanto a la variabilidad de la longitud de cada FSB ( $15.59 \pm 1.79\%$  vs  $12.26 \pm 1.20\%$ ;  $p = 0.1132$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.14A) y a la longitud acumulada de sus TN ( $32.91 \pm 4.44\%$  vs  $27.37 \pm 2.83\%$ ;  $p = 0.2728$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.14B), a la longitud de cada FSB+TN ( $18.17 \pm 3.04\%$  vs  $22.04 \pm 2.15\%$ ;  $p = 0.2970$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.14C) y al volumen de cada FSB+TN ( $25.78 \pm 3.80$  vs  $24.10 \pm 2.51\%$ ;  $p = 0.7032$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.14D) (ver Tabla 4.2). Cabe destacar que del mismo modo que en las fibras del ratón *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>, no existen diferencias estadísticamente significativas en la dimensión fractal de cada una de las FSB+TN localizadas en la periferia con respecto a las localizadas en el centro de la córnea

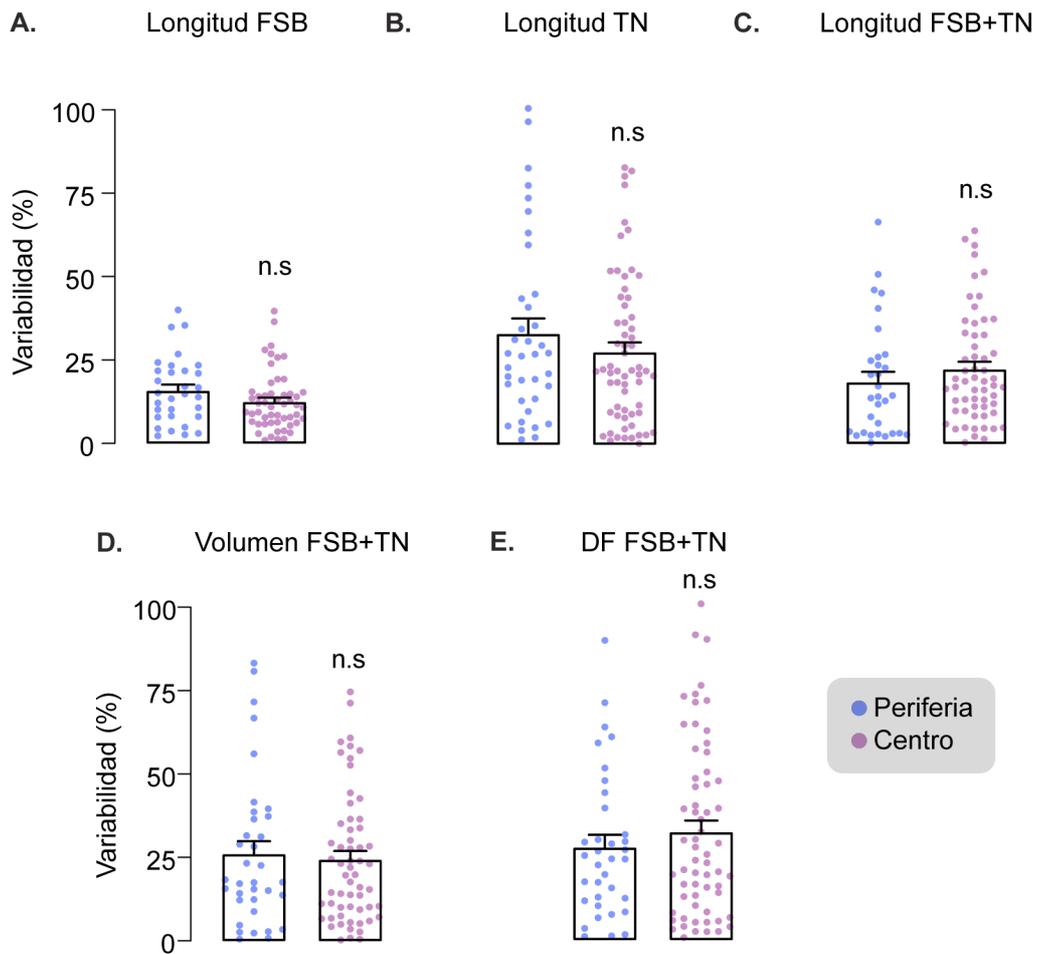
del ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> ( $27.47 \pm 3.64\%$  vs  $32.08 \pm 3.30\%$ ;  $p=0.3748$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.14E).

En la Figura 4.15 se compara la variabilidad de los cambios morfológicos de las fibras sensoriales de frío en los ratones transgénicos *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> y en los *Trpm8*<sup>-/-</sup>. De este modo, en las fibras localizadas en la periferia de la córnea se observan diferencias significativas en la longitud acumulada de las TN, siendo mayor la variabilidad de los cambios en las TN de ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> ( $32.92 \pm 4.44\%$ ) en comparación con las TN de ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $22.84 \pm 2.14\%$ ;  $p=0.0227$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.15B; Tabla 4.2). Sin embargo, en la región central de la córnea, las fibras muestran una menor variabilidad en los cambios de longitud de las FSB de los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> ( $12.26 \pm 1.2\%$ ) en comparación con los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $21.89 \pm 1.74\%$ ;  $p<0.0001$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.15F; Tabla 4.2). Además, se observó una menor variabilidad en los cambios de longitud de las FSB+TN en los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> ( $22.04 \pm 2.15\%$ ) respecto a los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> ( $31.53 \pm 2.63\%$ ;  $p=0.0117$ , Prueba T para muestras independientes; Figura 4.15H; Tabla 4.2). En el resto de los parámetros morfométricos estudiados no se observaron diferencias significativas entre las fibras localizadas en la región periférica y central de la córnea (Tabla 4.2 y Figura 4.15).

En conjunto, estos resultados apuntan a una posible implicación del canal iónico TRPM8 en la remodelación espontánea de las fibras sensoriales de frío corneales.

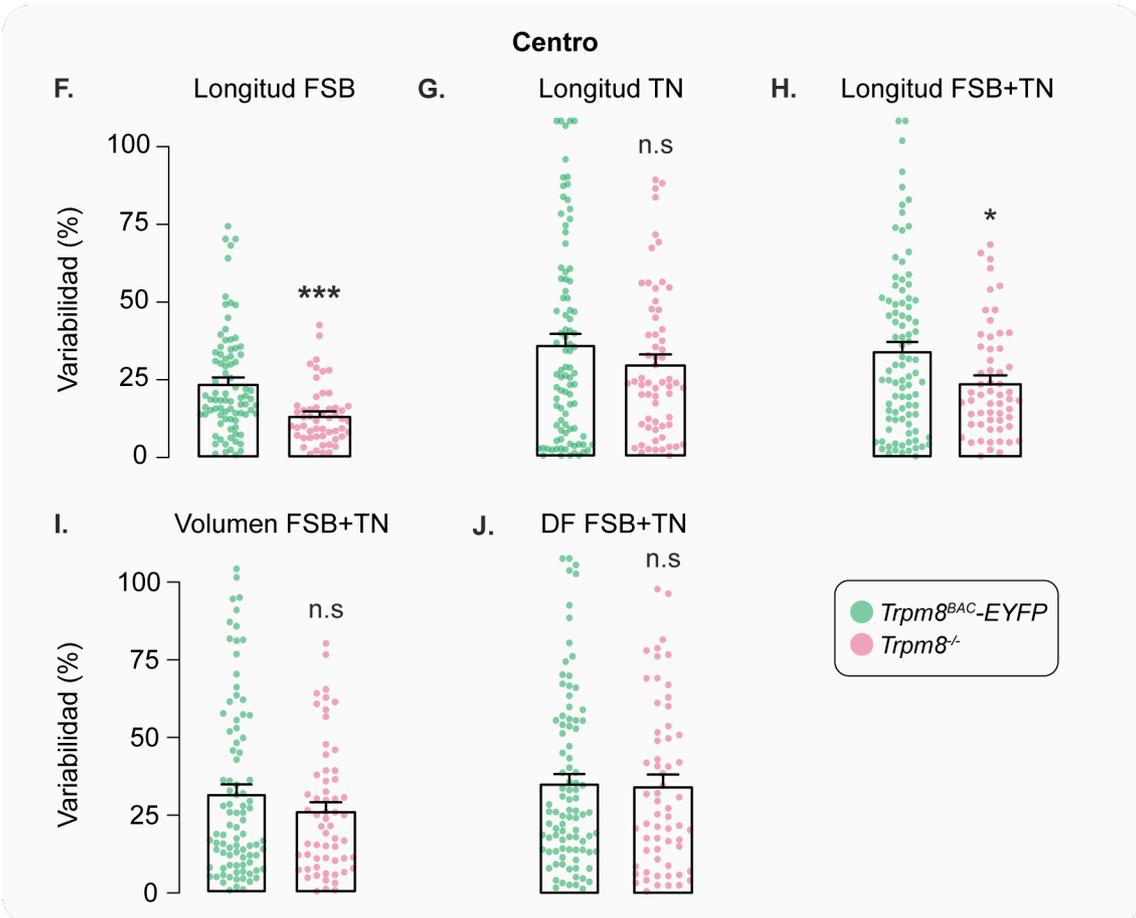
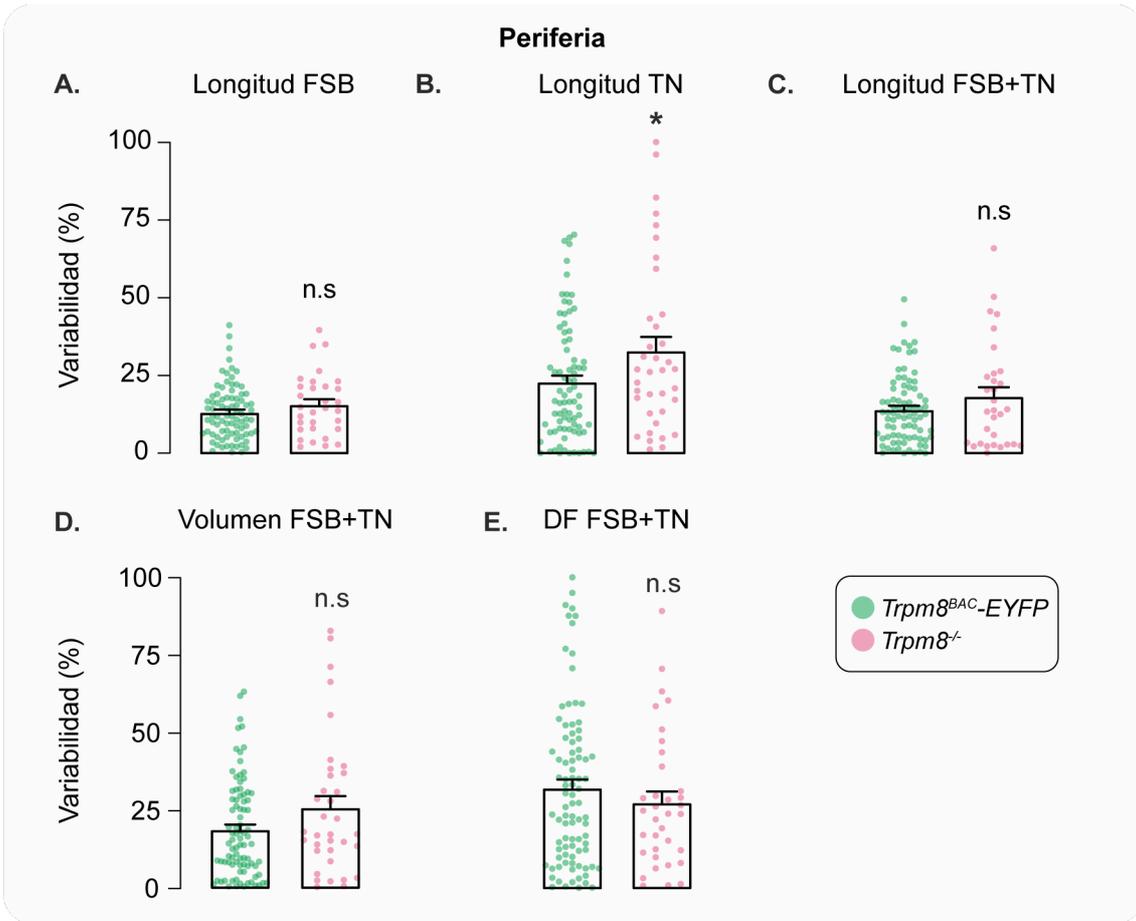


**Figura 4.13. Ejemplo del curso temporal de los cambios morfodinámicos espontáneos de una fibra corneal subbasal central y otra periférica en el ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup>.** Variabilidad diaria de la longitud de cada FSB (A), de la longitud acumulada de las TN de cada fibra subbasal (B), de la longitud total de cada FSB+TN (C), del volumen de cada FSB+TN (D) y de la dimensión fractal de cada FSB+TN (E). Se representa una FSB localizada en la periferia (líneas azules) y otra en el centro (líneas lilas) de la córnea. El curso temporal de la variabilidad de las fibras representadas varía alrededor del valor medio de cero (representado con una línea continua de puntos). Barra de escala: 1 día.



**Figura 4.14. Promedio de la variabilidad de los cambios morfodinámicos espontáneos que experimentan las fibras subbasales localizadas en la periferia y en el centro de la córnea en un ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup>.**

Diagrama de barras en el que se representa el promedio y el error típico de la media de la variabilidad en la longitud de las FSB (A), en la longitud acumulada de las TN (B), en la longitud acumulada de las FSB+TN (C), en el volumen ocupado en la superficie corneal por las FSB+TN (D) y en la dimensión fractal de las FSB+TN (E). Los valores individuales de cada variable se representan como puntos sobre las barras que agrupan los datos de las fibras periféricas (en azul) y de las centrales (en lila). El contraste de hipótesis se realizó mediante una prueba T para muestras independientes ( $p > 0.05$  ns).



**Figura 4.15. Promedio de la variabilidad de los cambios morfodinámicos espontáneos que experimentan las fibras subbasales localizadas en la periferia y en el centro de la córnea en los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y *Trpm8<sup>-/-</sup>*.**

En los paneles superior e inferior se muestran los datos morfométricos de la variabilidad en valores absolutos de las fibras localizadas en la periferia y en el centro de la córnea, respectivamente. El promedio y el error típico de la media se representan en diagramas de barras. Los valores individuales de cada variable se indican con puntos superpuestos encima de las barras para los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* (en verde) y *Trpm8<sup>-/-</sup>* (en rosa). Se muestran la variabilidad en la longitud de las FSB (A, F), en la longitud acumulada de las TN (B, G), en la longitud acumulada de las FSB+TN (C, H), en el volumen ocupado en el epitelio corneal por las FSB+TN (D, I) y en la dimensión fractal de las FSB+TN (E, J). El contraste de hipótesis se realizó mediante una prueba T para muestras independientes ( $p < 0.001^{***}$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.05^*$ ,  $p > 0.05$  ns).

**Tabla 4.2. Diferencias en la variabilidad de los cambios morfodinámicos de las fibras subbasales localizadas en el centro respecto a la periferia corneal de los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y *Trpm8<sup>-/-</sup>*.**

Parámetros	Periferia corneal			Centro corneal		
	<i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i>	<i>Trpm8<sup>-/-</sup></i>	p-valor	<i>Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP</i>	<i>Trpm8<sup>-/-</sup></i>	p-valor
<b>Longitud FBS</b>	13.10 ± 0.95	15.59 ± 1.79	0.19 (n.s)	21.89 ± 1.74	12.26 ± 1.20	<1x10 <sup>-4</sup> (***)
<b>Longitud NT</b>	22.84 ± 2.14	32.91 ± 4.44	0.02 (*)	33.23 ± 3.11	27.37 ± 2.83	0.19 (n.s)
<b>Longitud FSB+NT</b>	13.98 ± 1.20	18.17 ± 3.04	0.12 (n.s)	31-53 ± 2.63	22.04 ± 2.14	0.01 (*)
<b>Volumen FSB+NT</b>	18.68 ± 1.67	25.78 ± 3.80	0.04 (*)	29.21 ± 2.76	24.10 ± 2.51	0.20 (n.s)
<b>DF FSB+NT</b>	32.19 ± 2.73	29.22 ± 3.98	0.55 (n.s)	32.87 ± 2.70	32.08 ± 3.30	0.85 (n.s)

Porcentaje de cambio con respecto al día anterior. Los valores se muestran como el promedio ± error típico de la media. Para realizar las comparaciones entre las medias de los diferentes parámetros en cada ratón, tanto para las fibras localizadas en la periferia como en el centro, se utilizaron pruebas T para muestras independientes ( $p < 0.001^{***}$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.05^*$ ,  $p > 0.05$  ns).

**4.5. Monitorización *in vivo* de fibras TRPM8-EYFP<sup>+</sup> en la córnea de ratones adultos tras su axotomía.**

A continuación, se estudió la morfodinámica de la regeneración de fibras corneales de frío tras su axotomía. Para ello, se adquirieron imágenes confocales *in vivo* de las fibras corneales en los días posteriores a la axotomía. En un primer conjunto de experimentos, se realizó una lesión quirúrgica en la región central de la córnea mediante la incisión de los nervios contenidos en un área de 2 mm de diámetro, y posteriormente, se determinó el curso temporal de la reinervación del conjunto de fibras lesionadas durante 21 días. Por otro lado, se desarrolló y caracterizó un nuevo modelo de lesión, que consistió en la

fotocoagulación de fibras individuales corneales mediante el uso de un láser de femtosegundo. Posteriormente, se monitorizaron y cuantificaron los cambios morfodinámicos experimentados por cada una de las fibras lesionadas durante su regeneración, a través de la medida de parámetros morfométricos tales como la longitud, el volumen ocupado en el epitelio corneal y la dimensión fractal, a lo largo de los 15 días posteriores a la lesión. Cabe destacar, que esta lesión mínimamente invasiva de las fibras corneales supone una oportunidad para el estudio *in vivo* de los mecanismos moleculares intrínsecos de la regeneración nerviosa periférica, en contraste a las lesiones amplias realizadas mediante intervenciones quirúrgicas. En este sentido, se estudió el posible papel de la proteína SARM1, en la degeneración Walleriana y regeneración de las fibras sensoriales de frío corneales.

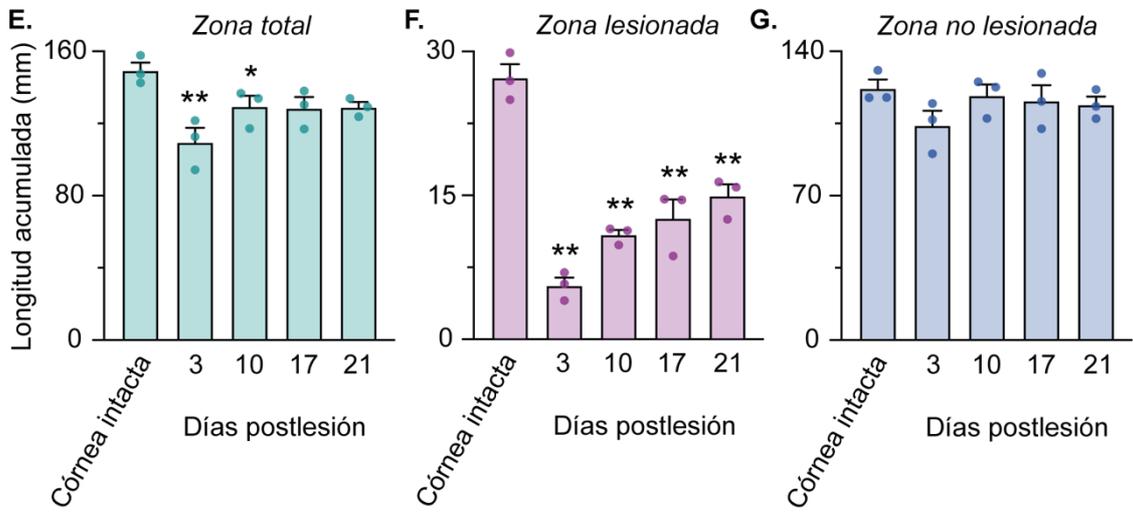
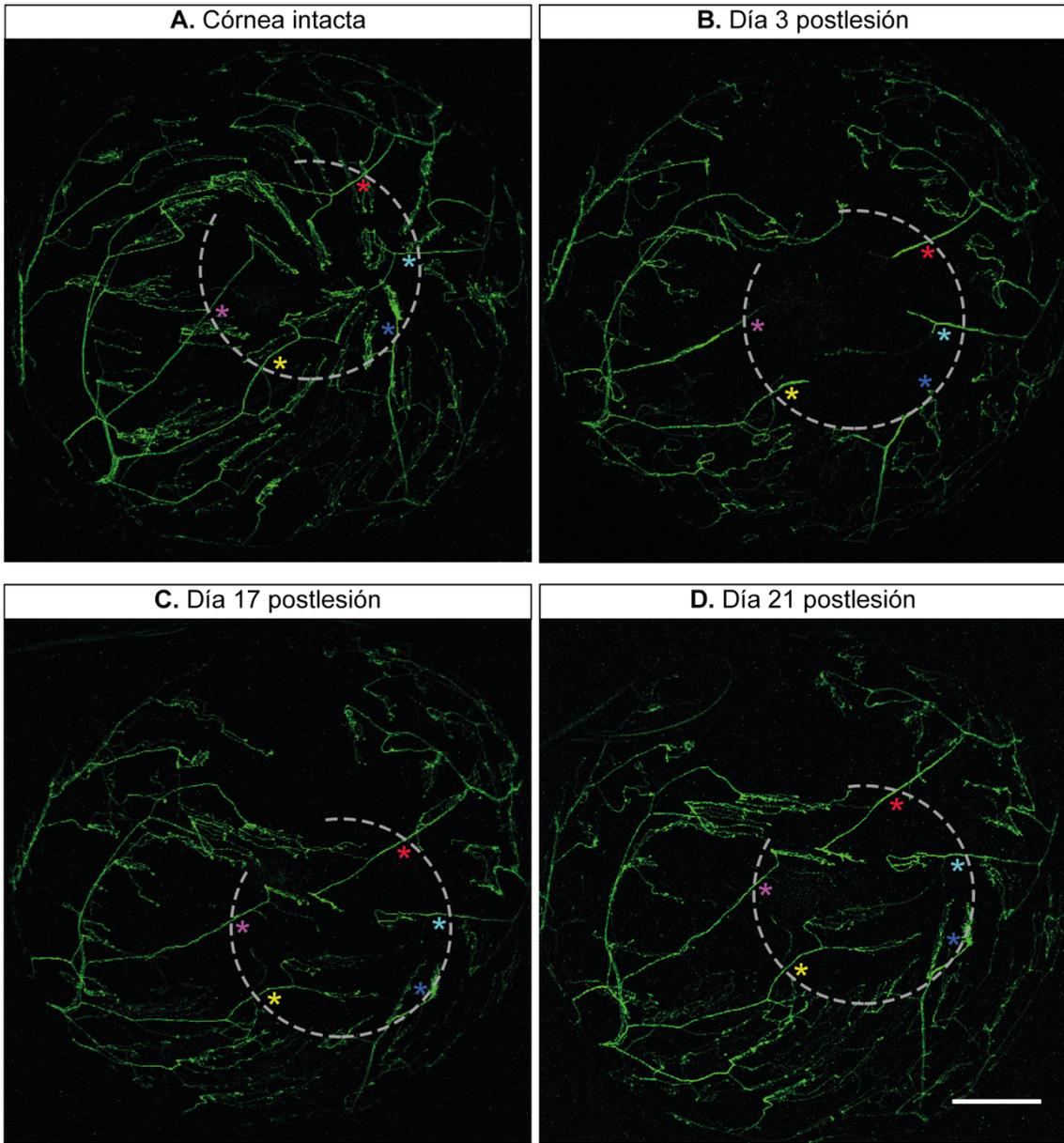
#### **4.5.1. Análisis morfométrico dinámico de la reinervación de las fibras sensoriales de frío tras la incisión quirúrgica de la córnea de ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron 3 ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* machos. Los ojos derechos fueron lesionados seccionando quirúrgicamente las fibras corneales (ver Figura 3.10 de la sección de métodos). Se realizó una monitorización *in vivo* de la inervación sensorial de frío (Figura 4.16), mediante el uso de microscopía confocal, antes de realizar la lesión corneal (Figura 4.16A) y a los días 3 (Figura 4.16B), 10, 17 (Figura 4.16C) y 21 después de practicar dicha lesión (Figura 4.16D).

A continuación, se realizó el análisis estadístico de la longitud acumulada del conjunto de las fibras corneales de frío obtenido de las diferentes imágenes. Seguidamente, se realizaron las comparaciones múltiples con respecto al control usando el método de Holm-Sidak. Los resultados obtenidos mostraron que la longitud acumulada del conjunto de las fibras de frío en la córnea intacta es de  $149.30 \pm 4.49$  mm, de los cuales  $27.27 \pm 1.43$  mm se distribuyen en el área central y  $122.03 \pm 4.43$  en el resto de la córnea (Figura 4.16B,

E-G). A los 3 días de haber realizado la axotomía, se observó una reducción significativa del  $79.69 \pm 2.13\%$  de la longitud acumulada del conjunto de fibras localizadas en el área lesionada ( $5.60 \pm 0.85$  mm,  $p=0.004$ ; Figura 4.16F). Sin embargo, en el área externa a la lesión, a pesar de observarse una ligera disminución de la inervación, no se produjeron cambios estadísticamente significativos ( $104.00 \pm 7.18$  mm,  $p=0.34$ ). A los 10 días, se observó un crecimiento notable en la inervación total, pero sin existir una recuperación de la longitud acumulada anterior a la lesión ( $129.35 \pm 6.06$  mm,  $p=0.035$ ; Figura 4.16E). Esta recuperación incompleta también fue observada al analizar el área lesionada ( $10.89 \pm 0.53$  mm,  $p=0.003$ ; Figura 4.16F). Durante los días 17 y 21, en el área lesionada, el conjunto de fibras seguía incrementando su longitud, aunque sin alcanzar la longitud inicial (día 17:  $12.62 \pm 1.96$  mm,  $p=0.002$ ; día 21:  $14.94 \pm 1.22$  mm,  $p=0.001$ ; Figura 4.16C, D y F). A pesar de que la recuperación de la longitud inicial es incompleta en el área lesionada (Figura 4.16F), se observó una estabilización en el crecimiento del conjunto total de las fibras sensoriales de frío (día 17:  $128.52 \pm 6.15$  mm,  $p=0.09$ ; día 21:  $129.03 \pm 2.92$  mm,  $p=0.07$ ; Figura 4.16E).

Estos resultados muestran que la lesión quirúrgica efectuada da lugar a una marcada denervación en el área lesionada, sin producir cambios significativos en el área externa a la lesión. Además, ofrecen una estimación cuantitativa de la regeneración de la inervación sensorial de la córnea por las fibras sensoriales de frío, mostrando que un 45% de la longitud total de estas fibras se ha recuperado a los 21 tras la lesión.



**Figura 4.16. Evaluación *in vivo* de la reinervación de las fibras sensoriales de frío tras la realización de una incisión en la córnea de ratones adultos *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

**A-D.** Micrografías confocales de la monitorización de la inervación sensorial TRPM8-EYFP en la córnea intacta del ratón (A), y en la misma córnea 3 días (B), 17 días (C) y 21 días después de realizar el seccionamiento quirúrgico de las fibras (D). La circunferencia punteada marca la zona axotomizada. Los asteriscos que presentan el mismo color señalan la misma fibra subepitelial a diferentes puntos temporales. Barra de escala: 500  $\mu$ m. **E-G.** Diagramas de barras que muestran el promedio y el error típico de la media de la longitud acumulada (mm) de fibras nerviosas TRPM8-EYFP en el área total de la córnea (E), en el área lesionada (F) y en la zona externa al área lesionada (G). El contraste de hipótesis fue determinado aplicando una prueba ANOVA para un factor. Se aplicó el método de Holm-Sidak para realizar las comparaciones múltiples con respecto al control ( $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.05^{*}$  y  $p > 0.05$  n.s).

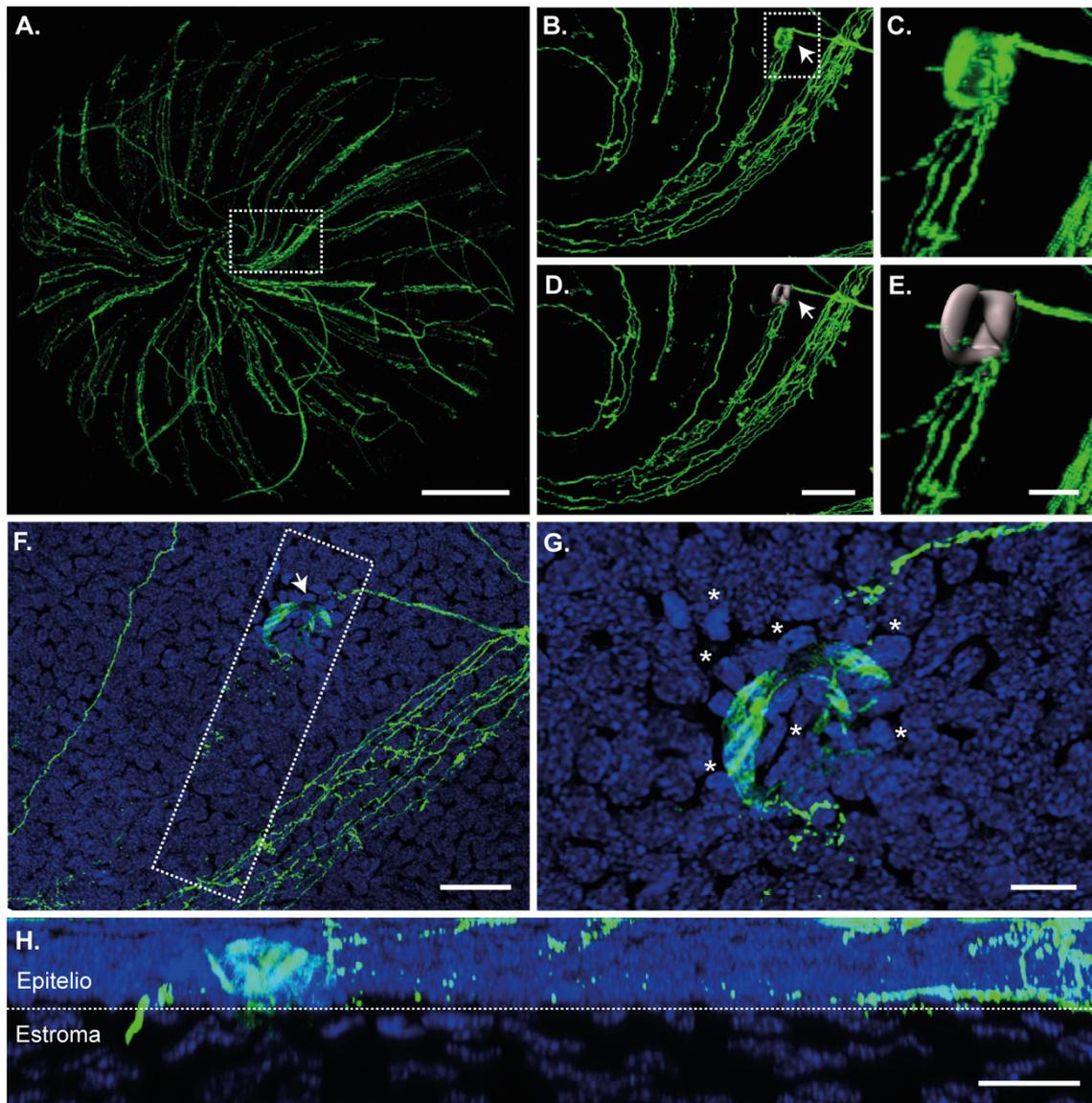
**4.5.2. Análisis morfométrico dinámico de fibras individuales TRPM8-EYFP en la córnea del ratón adulto tras su axotomía mediante fotocoagulación.**

Para continuar con el estudio de la regeneración en las fibras sensoriales de frío corneales, se llevaron a cabo experimentos en los que se realizaron axotomías de fibras individuales. La axotomía consistió en la fotocoagulación de una fibra del plexo subbasal mediante un láser de femtosegundo (ver apartado 3.3.4.2 de métodos). El objetivo de estos experimentos fue generar una lesión mínimamente invasiva que permita evaluar los cambios morfodinámicos que se producen tras la lesión de una fibra individual.

**4.5.2.1. Evaluación de la extensión del daño tisular generado por la axotomía mediante láser de femtosegundo de una fibra de frío corneal en ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

En este conjunto de experimentos se intentó establecer el tamaño de la lesión en la fibra de frío corneal y los daños agudos producidos en el epitelio circundante como resultado de la fotocoagulación. Tal y como se describe en el apartado 3.3.4.2 de métodos, tan pronto se realiza la fotocoagulación individual de la fibra, se observa una marca fluorescente en la zona de la lesión (Figura 4.17). El tamaño de la marca fluorescente ha sido previamente utilizado para cuantificar la dimensión de las lesiones puntuales producidas

mediante un láser de femtosegundo en neuronas corticales (Canty et al., 2013). En el presente trabajo, se procedió igualmente a la medida del volumen ocupado por la marca generada en el epitelio (Figura 4.17A-E), obteniéndose unas dimensiones medias de  $5155.32 \pm 1223.25 \mu\text{m}^3$  (n=9). Asumiendo que la esfericidad de la marca fluorescente es igual a 1, el diámetro de dicha marca sería de  $20.32 \pm 1.72 \mu\text{m}$ .



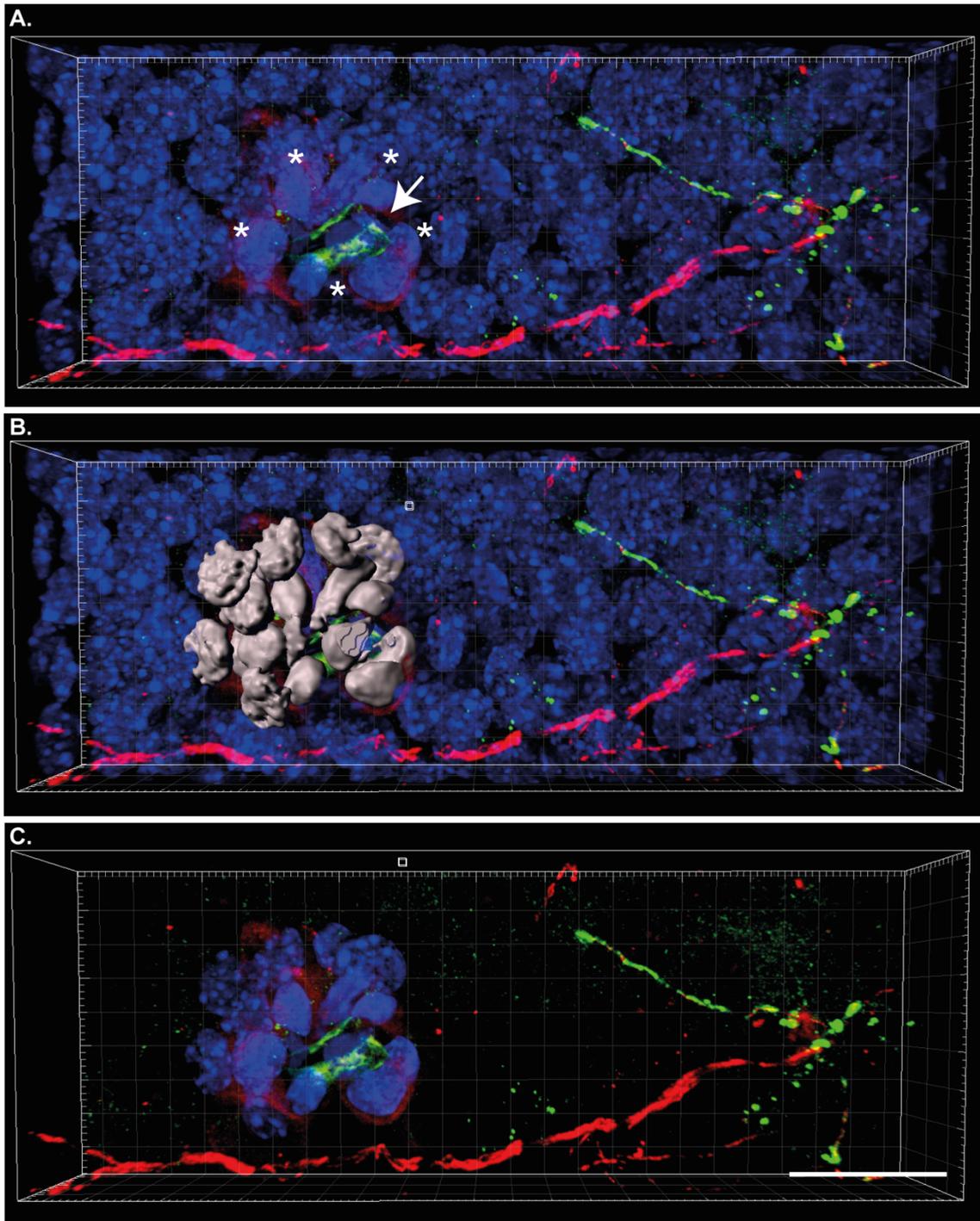
**Figura 4.17. Fotocoagulación *in vivo* de fibras individuales de frío corneales en el ratón *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>*.**

**A-D.** Imágenes confocales *in vivo* que muestran una axotomía generada con el láser de femtosegundo. **A.** Inervación corneal TRPM8-EYFP en una córnea intacta. El recuadro punteado indica el área en la que se va a realizar la fotocoagulación y está ampliado en B y D. **B.** Fibras individuales axotomizadas. La flecha indica la marca fluorescente generada tras la realización de la fotocoagulación. El recuadro punteado encuadra la marca fluorescente ampliada en C y E. **C.** Marca fluorescente generada por la axotomía de las fibras. **D, E.** Reconstrucción tridimensional del volumen ocupado por la marca

fluorescente (en gris) y superpuesto en la imagen original. **F-H.** Imágenes confocales de la misma córnea fijada e inmunoteñida 8 horas después de la fotocoagulación. **F.** Área donde se ha realizado la axotomía. La flecha indica la marca fluorescente ampliada en G. **G.** Núcleos circundantes a la marca fluorescente afectados por la fotocoagulación (asteriscos). **H.** Proyección ortogonal de la zona indicada con un recuadro punteado en la imagen F. La línea punteada separa la capa epitelial de la estromal. Los núcleos de las células corneales están marcados con Hoechst 33342. Barras de escala: A, 500  $\mu\text{m}$ ; B-C, 100  $\mu\text{m}$ ; D-E, 20  $\mu\text{m}$ ; F, 30  $\mu\text{m}$ ; G-H, 10  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente, para determinar si la lesión estaba exclusivamente localizada en el epitelio corneal o si afectaba también a otras capas o fibras circundantes, se realizó un estudio inmunohistoquímico del tejido. Transcurridas 8 horas desde la realización de la fotocoagulación se procedió a la fijación e inmunotinción de la córnea (n=5). Se observó que las fibras próximas a la lesión siguen presentes y, además, no muestran cambios aparentes en su arquitectura (Figura 4.17F). Por el contrario, en el área lesionada se observó que los núcleos de las células epiteliales presentan una morfología alargada diferente a la de otros núcleos más alejados, así como un incremento en la intensidad de fluorescencia del marcador nuclear Hoechst 33342 (Figura 4.17G, asteriscos), lo que indica que existe daño celular.

A continuación, se procedió a cuantificar el número de núcleos epiteliales próximos a la lesión que presentan indicios de alteraciones morfológicas (Figura 4.18). De esta manera, se determinó que un total de  $23.40 \pm 2.27$  células (n=5), localizadas alrededor de la lesión, muestran una emisión de fluorescencia más alta que el promedio del conjunto de células marcadas con Hoescht 33342. Cabe destacar que, a pesar del daño producido por la fotocoagulación en las células circundantes a la lesión, no se observó la desaparición de estas en ninguna de las imágenes adquiridas. Además, la marca fluorescente se localiza exclusivamente en la capa epitelial sin afectar al estroma corneal (Figura 4.17H y 4.18).



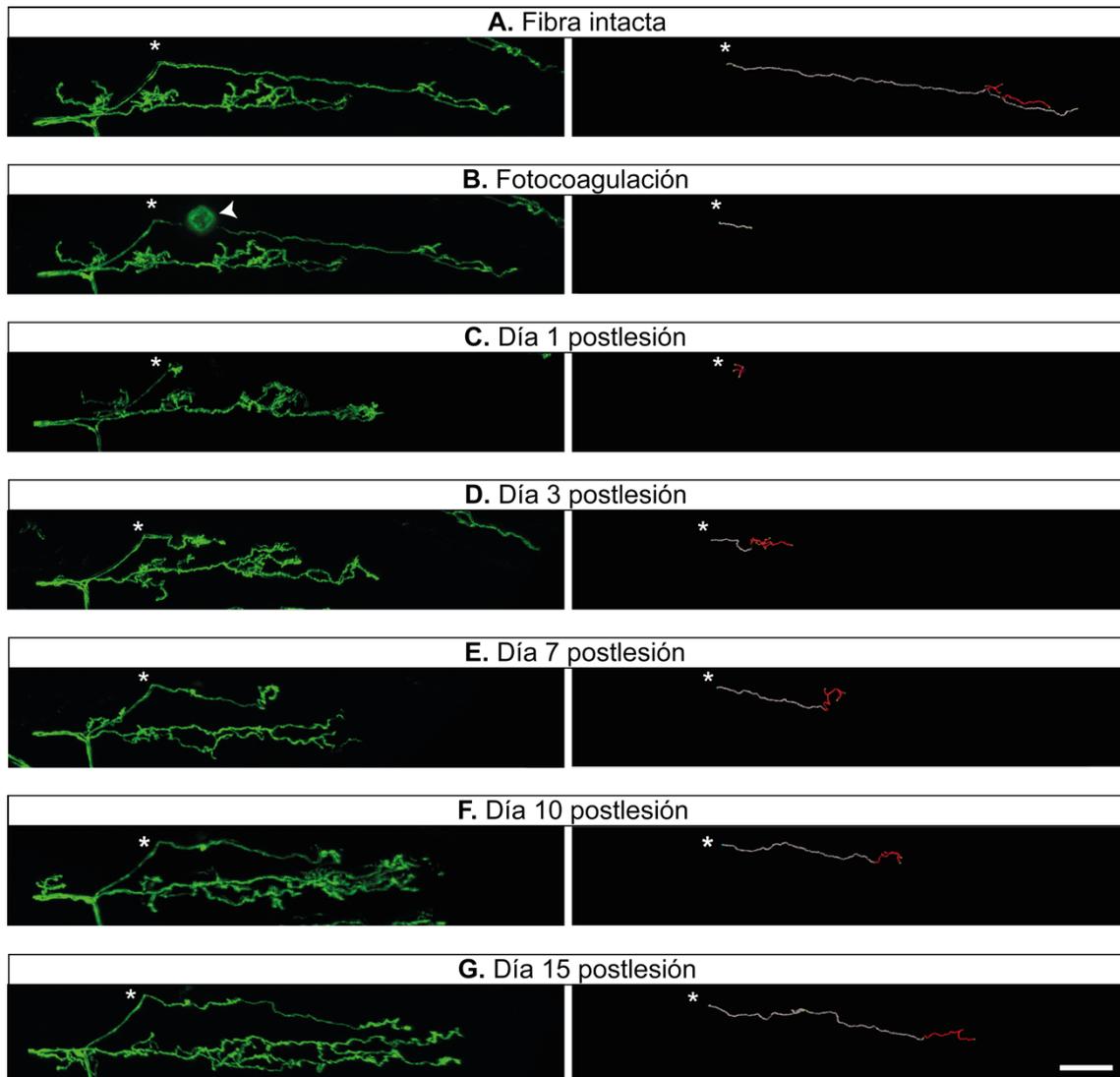
**Figura 4.18. Cuantificación del número de núcleos de las células epiteliales potencialmente dañadas por la fotocoagulación en la córnea de fibras TRPM8-EYFP.**

Transcurridas 8 horas desde la fotocoagulación, las córneas fueron fijadas e inmunomarcadas con anti- $\beta$ -tubulina III (en rojo) y anti-GFP (en verde). Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst 33342. **A.** Vista tridimensional de una serie de imágenes confocales realizadas en el plano z. La flecha señala la marca fluorescente generada por la axotomía. Los núcleos que tienen una morfología alterada están indicados con un asterisco. **B.** Reconstrucción 3D de los núcleos dañados mediante el software Imaris 9.3 (gris) y superpuesta en la imagen original. **C.** Imagen modificada que posibilita visualizar únicamente los núcleos reconstruidos. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la generación de una lesión localizada en la fibra de frío corneal, con una afectación mínima del tejido circundante a la lesión nerviosa.

#### **4.5.2.2. Análisis morfométrico dinámico de la regeneración de fibras corneales TRPM8-EYFP individuales en ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

En este apartado se describen los cambios morfodinámicos experimentados por una fibra sensorial de frío tras su axotomía mediante fotocoagulación (Figura 4.19 y 4.20). Se utilizaron ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* adultos (3-5 meses de edad) a los que se les realizó la axotomía de una única fibra corneal en uno de los dos ojos. Un total de 12 fibras individuales localizadas en el área central de la córnea fueron axotomizadas. La fotocoagulación se realizó en fibras individuales pertenecientes al plexo subbasal (Figura 4.19A), en una localización cercana al punto de penetración. Inmediatamente después de provocar la lesión, se observa la aparición de la marca de fluorescencia que divide a la fibra originando una porción de fibra comprendida entre la marca de fluorescencia y su extremo periférico terminal, denominada “porción distal”; y otro segmento de fibra comprendido entre la marca de fluorescencia y el punto de penetración, denominado “porción proximal” (Figura 3.9C y 4.19B). Los cambios morfodinámicos cuantificados en la porción proximal durante el proceso de regeneración incluyeron medidas de la longitud, el volumen y la dimensión fractal. Todas las medidas fueron obtenidas a partir de la reconstrucción tridimensional de la fibra, realizadas antes de practicar la fotocoagulación (Figura 4.19A), inmediatamente después (Figura 4.19B) y a los días 1 (Figura 4.19C), 3 (Figura 4.19D) 7 (Figura 4.19E), 10 (Figura 4.19F) y 15 (Figura 4.19G).



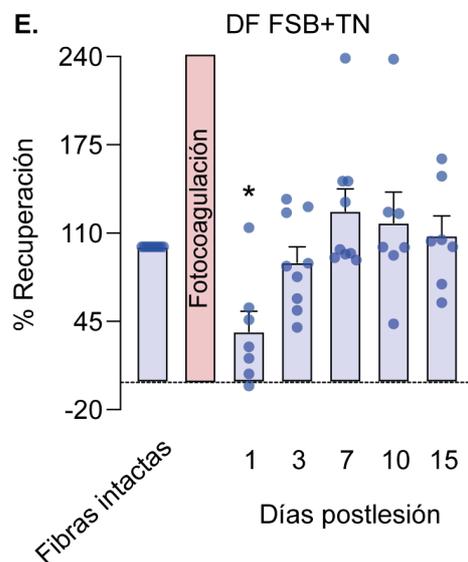
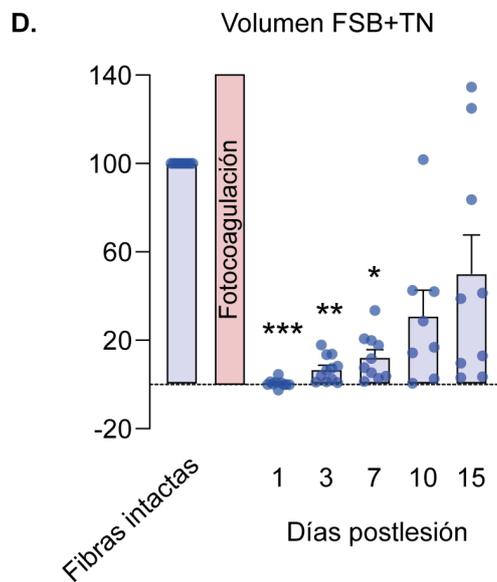
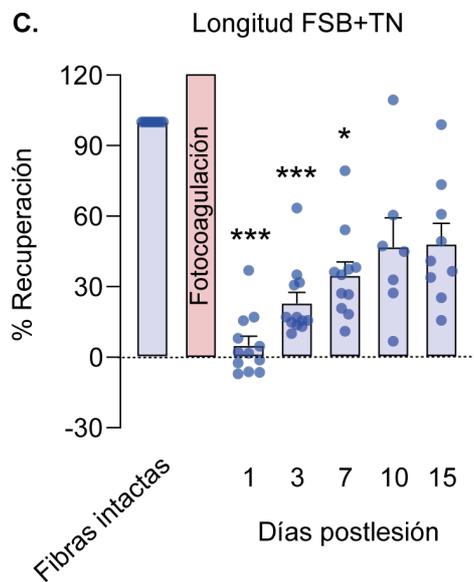
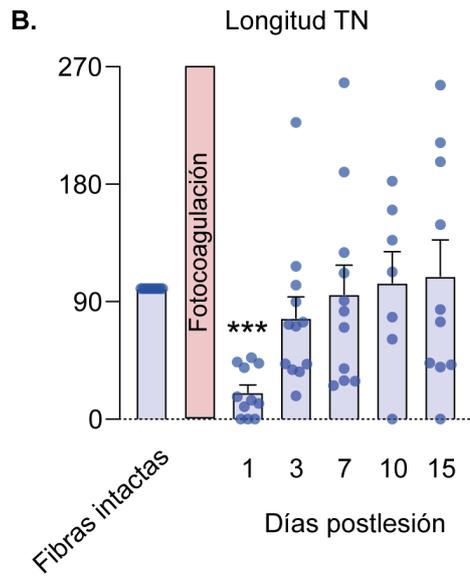
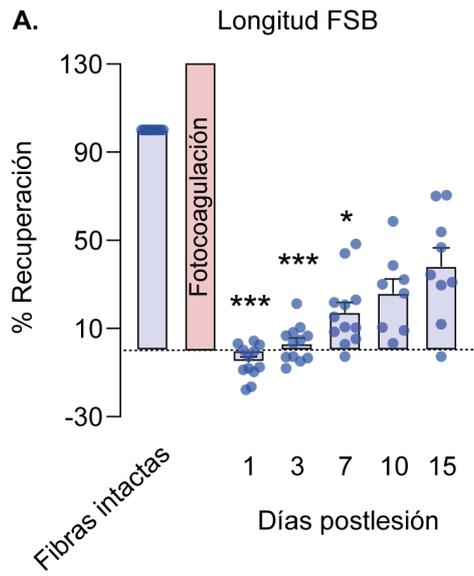
**Figura 4.19. Ejemplo del curso temporal de la regeneración *in vivo* de una fibra TRPM8-EYFP+ individual tras su axotomía mediante láser de femtosegundo.**

Paneles superiores: Imágenes confocales de un conjunto de fibras subbasales antes de practicar la fotocoagulación en una fibra individual (A), inmediatamente después (B), a los 3 días (C), 7 días (D) y 10 días (E). La flecha indica la marca fluorescente generada después de hacer la axotomía láser (B). Los asteriscos señalan la fibra individual que fue fotocoagulada y monitorizada en el tiempo. Paneles inferiores: Reconstrucción tridimensional de la fibra axotomizada a partir de las imágenes originales (panel superior) mediante el software Imaris 9.3. La fibra subbasal se representa en gris; y sus terminaciones nerviosas, en rosa. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Nota: no se muestra la reconstrucción de la porción distal en B para facilitar el seguimiento de la regeneración.

Al día siguiente de la lesión, la fluorescencia emitida por la proteína EYFP en la porción distal desaparece completamente. Además, se observa una retracción media del  $5.00 \pm 2.15\%$  en cada FSB con respecto a su longitud inicial (Figura 4.19B, Figura 4.20A). Por el contrario, en este primer día postlesión, se observa un crecimiento en el plano vertical

de la porción proximal que es considerada la terminación nerviosa. De este modo, la longitud acumulada de las TN en cada FSB recupera un  $20.59 \pm 5.72\%$  de su longitud acumulada previa a la lesión (Figura 4.20B). Asimismo, no se observa recuperación del volumen ocupado por la porción proximal (FSB+TN) en relación con el valor anterior a la lesión (Figura 4.20D). Además, cabe resaltar que el valor de la DF de la porción proximal (FSB+TN) el día 1 postlesión, muestra una recuperación notable ( $37.60 \pm 14.89\%$ ) respecto al valor prelesión (Figura 4.20E).

En el día 3 tras la fotocoagulación, se observa una modesta recuperación de la longitud de cada FSB ( $3.30 \pm 2.37\%$ , Figura 4.20A) y del volumen que ocupa cada FSB+TN en el epitelio corneal ( $7.01 \pm 1.70\%$ , Figura 4.20D). Cabe resaltar en este punto temporal, que las TN de cada FSB muestran una robusta recuperación ( $77.62 \pm 16.09\%$ ) de su longitud acumulada, valor que no es estadísticamente significativo respecto a la longitud que presentaban inicialmente (Figura 4.20B). En la misma línea, la DF de cada FSB+TN recupera el  $88.42 \pm 11.53\%$  de su valor previo a la lesión, y no es diferente estadísticamente al valor que tenía antes de ser fotocoagulada (Figura 4.20E). Durante los días 7, 10 y 15 post-lesión, se observa una recuperación parcial de la longitud de cada FBS ( $38.35 \pm 8.22\%$  a día 15; Figura 4.20A) y del volumen de cada FSB+TN ( $50.35 \pm 17.27\%$  a día 15; Figura 4.20D); mientras que el valor de la DF muestra una recuperación completa para cada FSB+TN ( $108.10 \pm 14.58\%$ ), no presentando diferencias estadísticas con respecto al valor previo a la lesión (Figura 4.20E), al igual que ocurre con la longitud acumulada de las TN de cada FSB ( $109.78 \pm 27.66\%$ ; Figura 4.20B). A pesar de la recuperación completa de la longitud acumulada de las TN, la longitud total de cada FSB+TN, experimenta una recuperación parcial ( $48.33 \pm 8.61\%$ ; Figura 4.20C), presumiblemente debido a la limitada recuperación de la longitud de la FSB a los 15 días postlesión.



**Figura 4.20. Evaluación *in vivo* de la regeneración de fibras individuales axotomizadas por fotocoagulación en la córnea del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.**

Diagramas de barras que muestran el promedio y el error típico de la media de la tasa de recuperación (%) de las fibras fotocoaguladas con el láser de femtosegundo en: la longitud de la FSB (A), en la longitud acumulada de las TN (B), en la longitud acumulada de las FSB+TN (C), en el volumen de la FSB+TN (D) y en la dimensión fractal de la FSB+TN (E). Los valores individuales de los parámetros para cada fibra fotocoagulada se representan como puntos sobre las barras. La barra naranja indica el momento de la fotocoagulación. La línea base ( $y=0$ ) se representa como una línea punteada horizontal. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente la prueba de Dunn's para las comparaciones múltiples con respecto a los valores anteriores a la fotocoagulación ( $p<0.001^{***}$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.05^{*}$ ).

Estos resultados son consistentes con la previsible activación del proceso de degeneración Walleriana de la porción distal de la fibra de frío corneal durante el primer día tras su axotomía, seguido de un proceso de regeneración en la porción proximal, también observable el primer día tras la lesión. Asimismo, es notoria la existencia de una regeneración rápida y completa de las terminaciones nerviosas, así como de la complejidad morfológica de la fibra subbasal y sus terminaciones (día 3 postlesión), en contraste con una recuperación más lenta e incompleta (a día 15 postlesión) de la longitud de la fibra subbasal y del volumen ocupado por la fibra y sus terminaciones nerviosas en el epitelio corneal.

**4.6. Análisis morfométrico dinámico de la degeneración y regeneración de fibras sensoriales de frío individuales en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* tras su axotomía por fotocoagulación.**

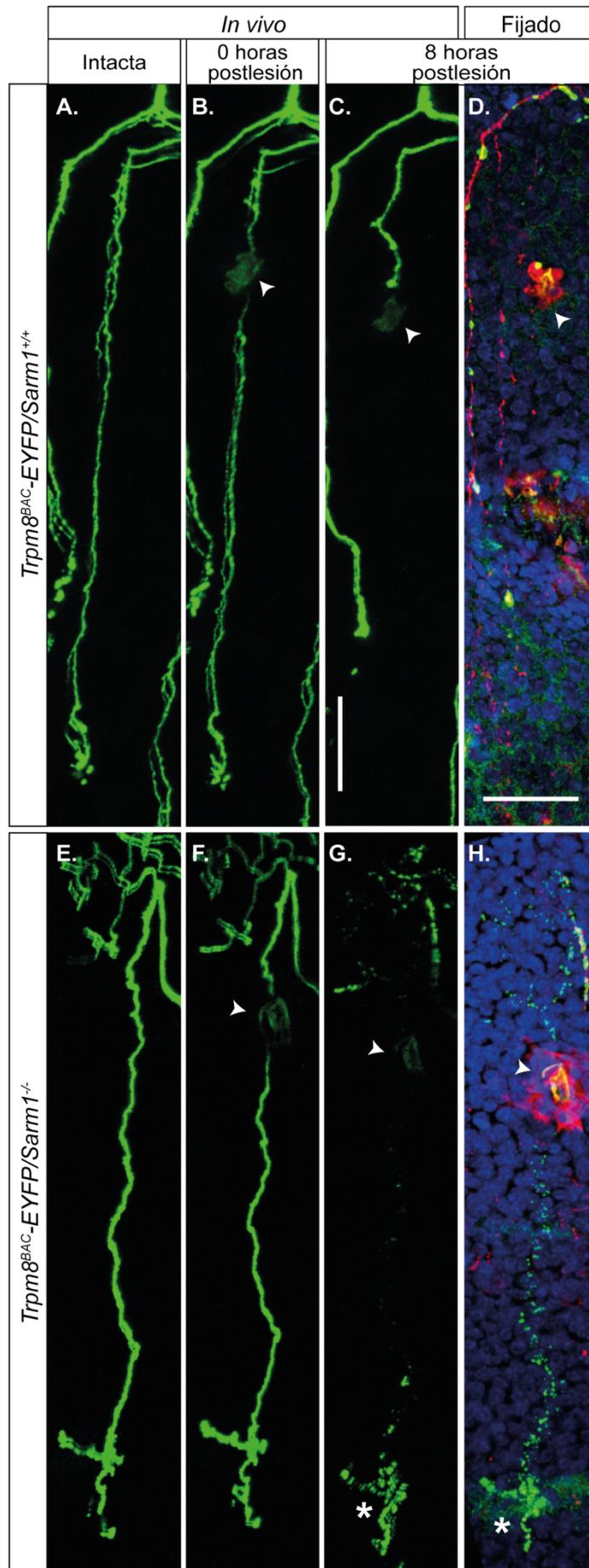
Estudios recientes muestran que la proteína SARM1 está implicada en la degeneración Walleriana de los axones periféricos y su ausencia o inhibición provoca un retraso en la degeneración de las fibras nerviosas después de ser axotomizadas (Geisler et al., 2019; Gerdtts et al., 2015). Por tanto, con el propósito de estudiar la implicación de SARM1 en la degeneración de las fibras sensoriales de frío individuales tras la axotomía, se procedió a analizar el curso temporal de la pérdida de fluorescencia asociada a la

degeneración de la porción distal de las fibras individuales fotocoaguladas en el ratón transgénico *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>-/-</sup>*.

Por otro lado, como se desconoce si la proteína SARM1 está involucrada en la regeneración de los axones periféricos tras su neurodegeneración o lesión, se estudió también el curso temporal de la regeneración de fibras de frío corneales individuales tras su axotomía en los ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>-/-</sup>*. Para ello, cada una de las fibras proximales fue monitorizada y, posteriormente, se cuantificaron los cambios morfodinámicos experimentados en su longitud, volumen y dimensión fractal a lo largo de 15 días.

#### **4.6.1. Análisis morfométrico de la degeneración de las fibras sensoriales de frío individuales en el ratón *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>-/-</sup>* después de realizar una fotocoagulación.**

En 3 ratones *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>-/-</sup>* y 4 descendientes de la misma camada con un genotipo silvestre para *Sarm1* (*Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>+/+</sup>*), un total de 7 fibras independientes fueron monitorizadas *in vivo* antes de la fotocoagulación, inmediatamente después y a las 8 horas de la misma. A continuación, los ratones fueron sacrificados y sus córneas fijadas para proceder al estudio inmunohistoquímico (Figura 4.21). Se observó que justo después de practicar la fotocoagulación, la fluorescencia proveniente de la porción distal de la fibra permanece intacta tanto en el ratón control *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>+/+</sup>* (Figura 4.21B) como en el *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>-/-</sup>* (Figura 4.21F). Sin embargo, transcurridas 8 horas, en el ratón control *Trpm8<sup>BAC-EYFP</sup>/Sarm1<sup>+/+</sup>* no se observa fluorescencia procedente de la porción distal (Figura 4.21C), mientras que el ratón carente del gen *Sarm1* muestra una disminución de la fluorescencia de la porción distal a este mismo tiempo (Figura 4.21G, asterisco).

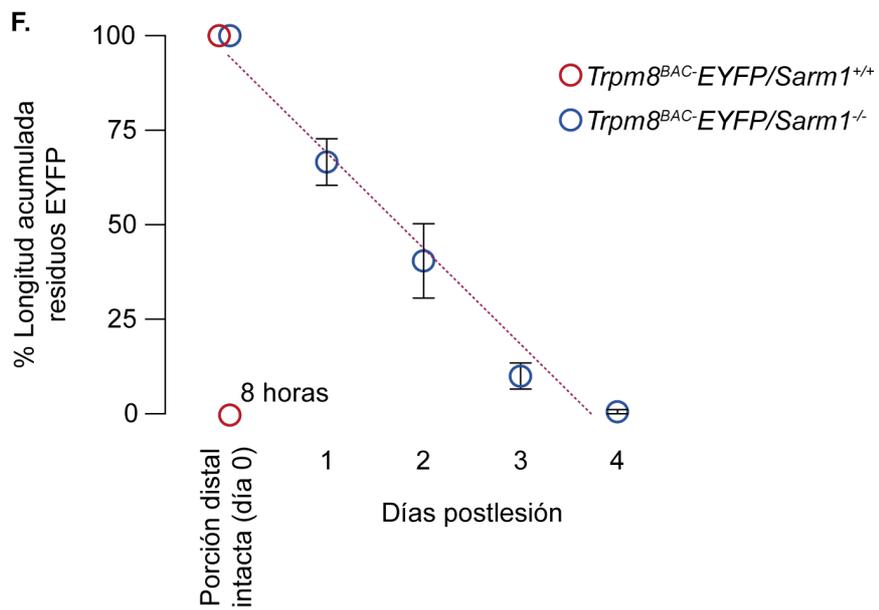
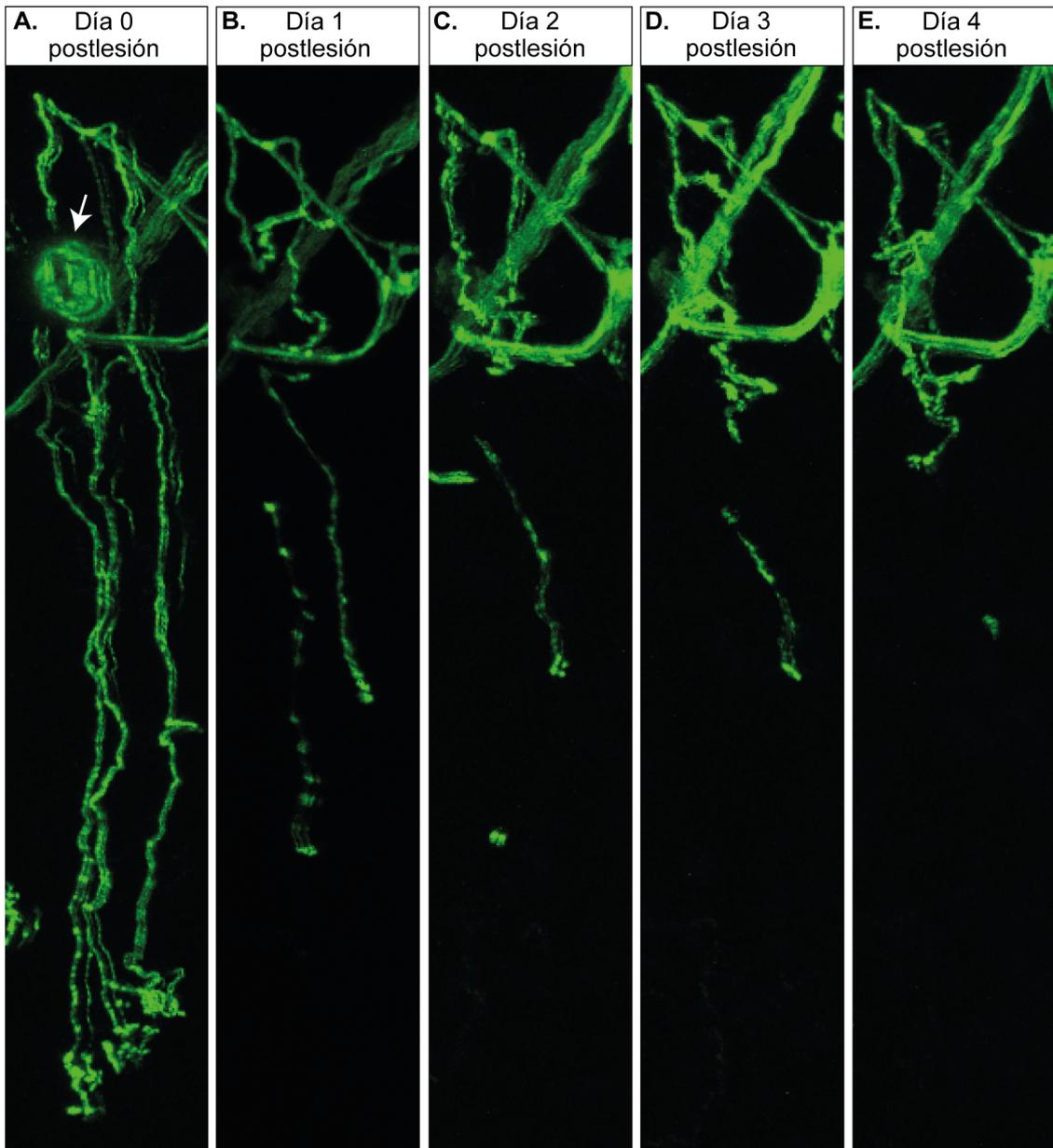


**Figura 4.21. Comparación de la degeneración de la porción distal de una fibra individual de frío corneal a las 8 horas de su fotocoagulación en el ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>+/+</sup>* y en el ratón *knockout Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

Imágenes confocales *in vivo* de una fibra sensorial del ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>+/+</sup>* (panel superior) y del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* (panel inferior) antes de ser fotocoagulada (A, E), inmediatamente después (B, F) y a las 8 horas (C, G). Posteriormente se procedió al estudio inmunohistoquímico (D, H) usando anticuerpos anti- $\beta$ -tubulina III (en rojo) y anti-GFP (en verde). Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst 334442. La flecha indica la marca fluorescente generada por la fotocoagulación. El asterisco señala los residuos de remanentes de EYFP en la córnea del ratón que tiene delecionada la proteína SARM1. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Con el objetivo de determinar si la pérdida de fluorescencia es debida a una reducción de la emisión de fluorescencia de la EYFP, o a la desaparición real de la proteína EYFP, se realizaron inmunotinciones en las córneas tras ser fijadas, observándose que en los ratones control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>+/+</sup>* no existen restos de EYFP en la porción distal a las 8 horas tras la axotomía (Figura 4.21D), mientras que en los *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* sí se observan remanentes de proteína EYFP (Figura 4.21 H).

A fin de cuantificar si la velocidad de degradación de la proteína estaba alterada en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*, se realizó una monitorización diaria de las fibras (n=16) durante los 4 días siguientes a la axotomía (Figura 4.22A-E, asteriscos). Posteriormente, se midió la velocidad de degeneración a través del análisis de la longitud acumulada de los residuos EYFP en cada uno de los días comprendidos en el periodo de tiempo estudiado. Se observó que la disminución de la longitud se ajusta a un modelo de regresión lineal según la ecuación  $y = -25.55x + 94.64$  ( $r^2 = 0.97$ ,  $p < 0.002$ ), donde la pendiente de la recta representa el porcentaje de degeneración diaria (Figura 4.22F), es decir, la longitud acumulada de la porción axotomizada de fibra EYFP positiva desaparece a razón de un 25.55% por día.



**Figura 4.22. Curso temporal de la degeneración de la porción distal de las fibras de frío axotomizadas en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

**A-E.** Imágenes confocales representativas de una fibra subbasal y sus terminaciones inmediatamente después de ser fotocoagulada (A) y a los días 1 (B), 2 (C), 3 (D) y 4 (E). La flecha señala la marca fluorescente generada por la fotocoagulación. Los asteriscos indican los residuos EYFP originarios de la fibra axotomizada. Barra de escala A-E, 50  $\mu$ m. **F.** Disminución en el porcentaje de la longitud acumulada de los residuos EYFP en el tiempo. Las esferas representan el valor promedio de la longitud acumulada y el error típico de la media en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>+/+</sup>* (en rojo) y en el *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* (en azul). La línea roja punteada se corresponde con la recta del ajuste lineal ( $r^2=0.97$ ,  $p<0.002$ ) para los valores analizados en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.

El conjunto de estos datos muestra que la ausencia de la proteína SARM1 conlleva un retraso del proceso de degeneración Walleriana de las fibras sensoriales de frío corneales individuales axotomizadas.

**4.6.2. Estudio de la regeneración de las fibras sensoriales de frío individuales en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* tras su axotomía.**

En este apartado del trabajo se exploró si después de realizar una axotomía por fotocoagulación, la regeneración de las fibras de frío corneales individuales resulta alterada en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* en comparación con el ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.

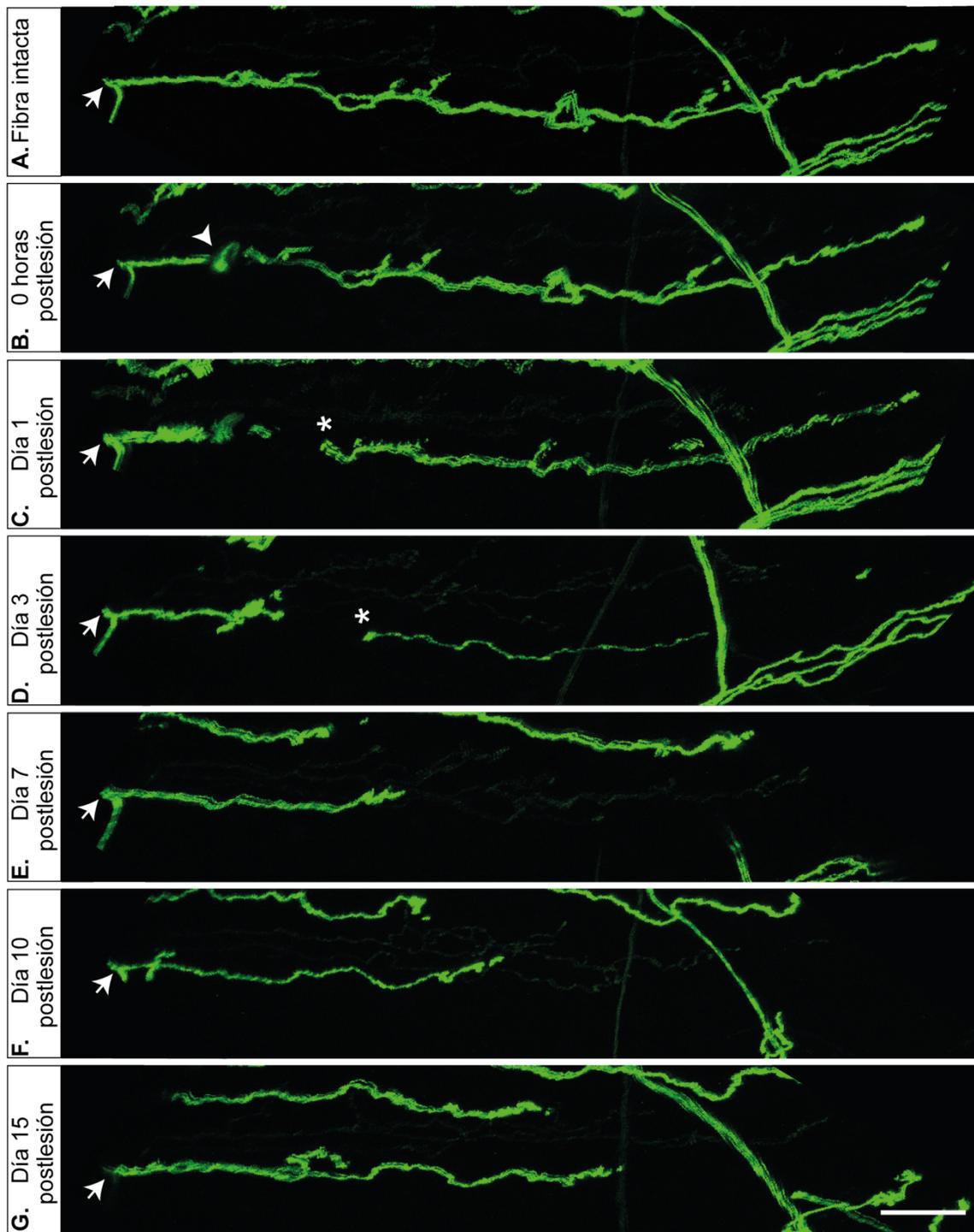
En estos experimentos se utilizaron 11 ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* adultos (3-5 meses). El protocolo experimental y el análisis morfométrico utilizado fue el mismo que se usó para realizar la descripción del curso temporal de la regeneración de fibras individuales en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*.

Las imágenes obtenidas en los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* a partir de su monitorización (Figura 4.23) y posterior análisis morfométrico dinámico (Figura 4.24), muestran que, al día siguiente de la lesión (Figura 4.23C), la porción proximal de la FSB axotomizada experimenta un retroceso del  $2.42 \pm 2.09\%$  con respecto a la longitud que tenía inmediatamente después de la axotomía (Figura 4.24A). De manera similar, la DF de cada FSB+TN también decreció significativamente un  $25.17 \pm 22.44\%$  (Figura 4.24E). Por el

contrario, la longitud acumulada de las TN de cada FSB muestra una recuperación del  $23.26 \pm 10.10\%$  respecto a su longitud inicial (Figura 4.24B).

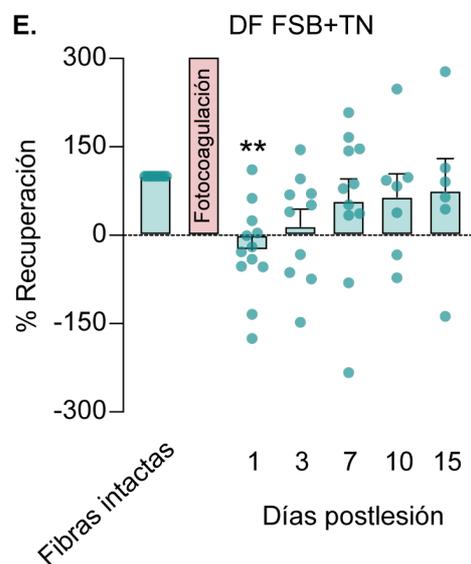
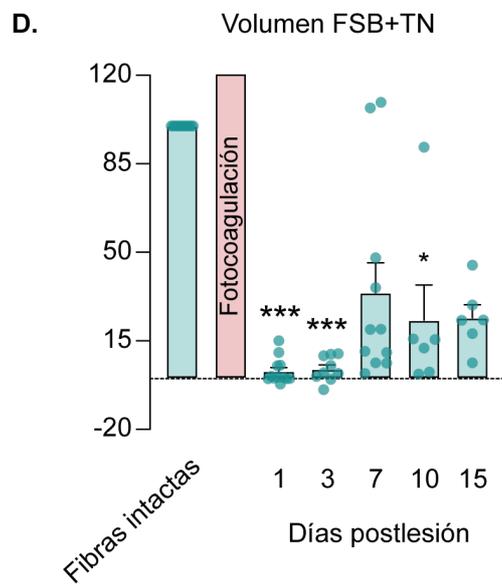
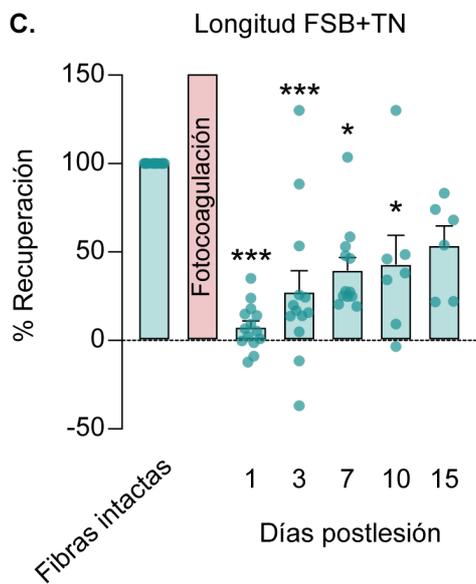
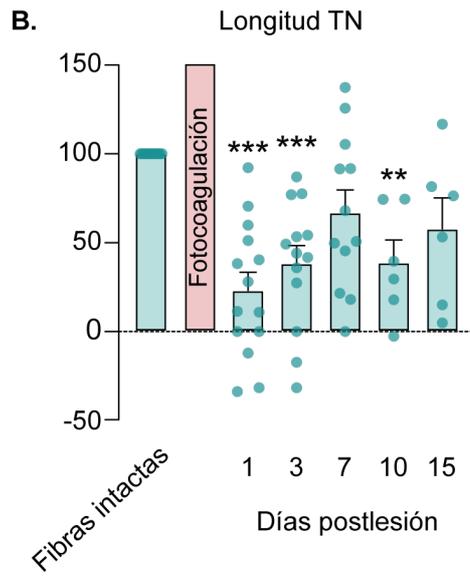
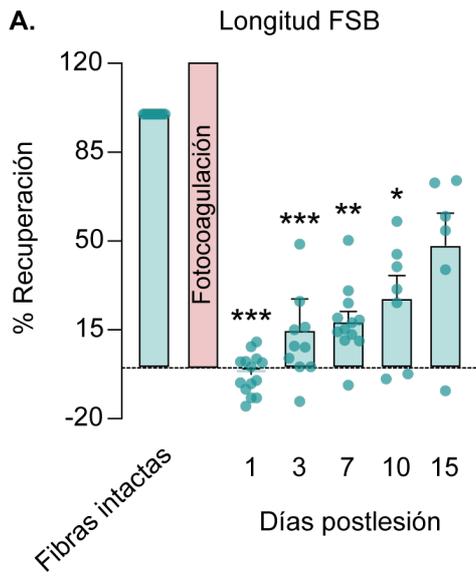
En lo que respecta al volumen de la FSB+TN, apenas se recupera al día siguiente de la fotocoagulación ( $3.01 \pm 1.47\%$ , Figura 4.24D). En el día 3, las FSB muestran una recuperación lenta ( $14.89 \pm 12.34\%$ , Figura 4.23 y 4.24A); y las TN cada una de las FSB presentan un notable crecimiento en la longitud acumulada del  $38.36 \pm 10.01\%$  (Figura 4.24B). En este mismo día de estudio, la longitud total de la porción proximal (FSB+TN) muestra una recuperación del  $27.60 \pm 1.82\%$  respecto a su valor inicial (Figura 4.24C) y el volumen que ocupa la porción proximal en el epitelio corneal es el  $3.87 \pm 1.65\%$  de su volumen inicial (Figura 4.24D). En este punto, la DF de la FSB+TN alcanza de nuevo el  $15.32 \pm 28.74\%$  de su DF inicial (Figura 4.24E). Durante los siguientes días se observó que la longitud de cada FSB aumentaba hasta alcanzar, en el día 15, el  $48.41 \pm 12.64\%$  de la longitud inicial (Figura 4.23 y 4.24A); las TN recuperan por completo su longitud acumulada a día 7 (Figura 4.24B). Sin embargo, el conjunto formado por la FSB y las TN únicamente recupera el  $53.86 \pm 10.81\%$  de su longitud inicial a día 15 (Figura 4.24C). Además, la fibra muestra un volumen inferior al que tenía antes de ser sometida a la fotocoagulación, recuperando un  $24.10 \pm 5.21\%$  de su volumen inicial en el último día de estudio (Figura 4.24D). En cuanto a la DF de la FSB+TN, se observa una robusta recuperación del  $75.66 \pm 54.53\%$  el día 15.

Al igual que en el ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, estos datos muestran una rápida regeneración de la longitud acumulada de las TN de cada FSB y de la DF de cada FSB+TN, en comparación con la regeneración más lenta de las FSB y del volumen que ocupa cada FSB+TN en el epitelio corneal del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*. Del mismo modo que en el ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* la recuperación de la longitud total de la porción proximal de la fibra axotomizada (FSB+TN) es incompleta y modesta respecto al valor inicial que mostraba antes de ser lesionada.



**Figura 4.23. Curso temporal de la regeneración *in vivo* de una fibra de frío individual en la córnea del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

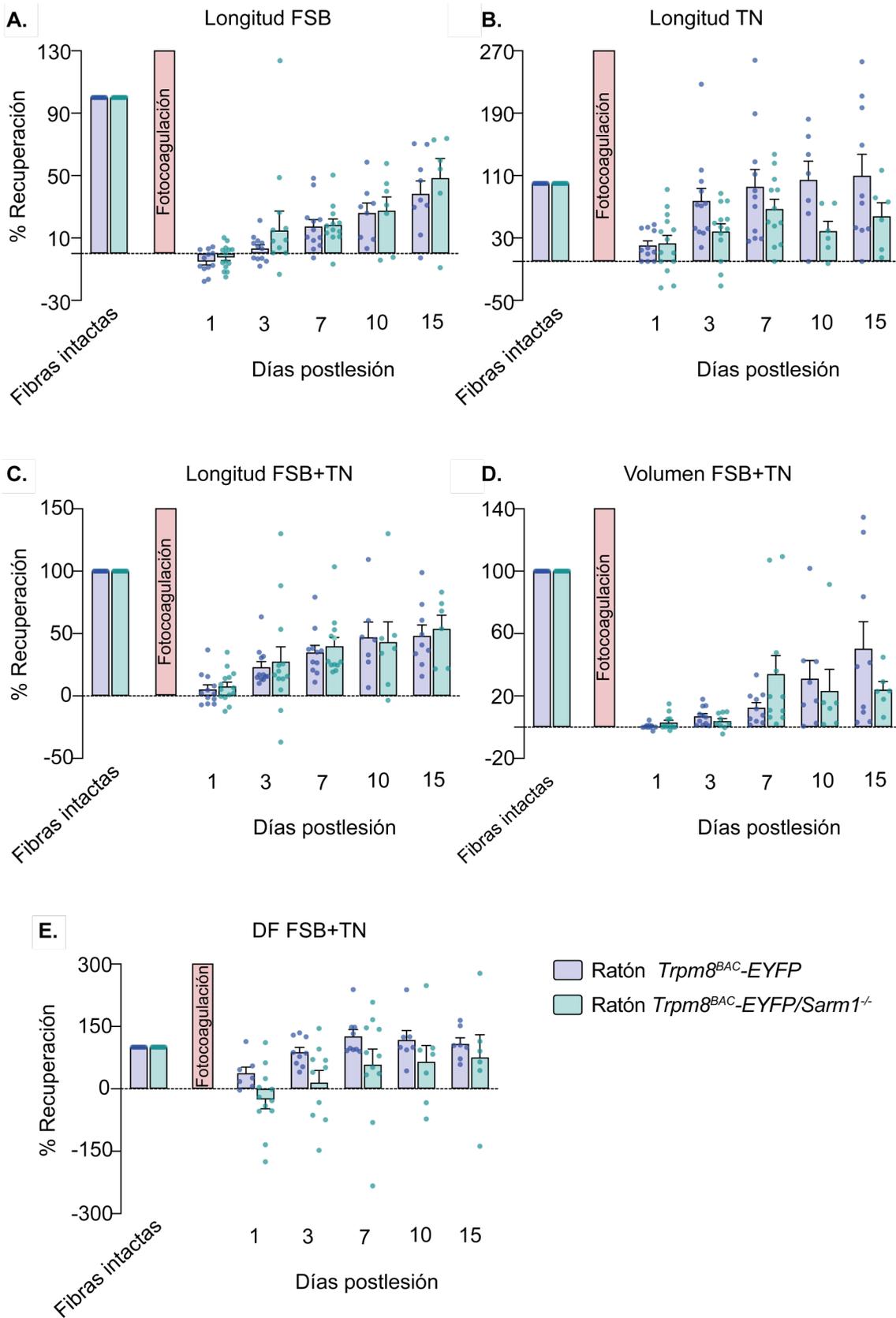
Imágenes confocales de una fibra subbasal individual antes de practicar la fotocoagulación (A), inmediatamente después (B), y a los días 1 (C), 3 (D), 7 (E), 10 (F) y 15 (G) después de realizar la axotomía láser. La flecha indica el punto de penetración de la fibra fotocoagulada. Los asteriscos señalan la porción distal de la fibra axotomizada, que presenta una degeneración retrasada. Barra de escala: 50 $\mu$ m.



**Figura 4.24. Análisis morfométrico dinámico de la regeneración de fibras individuales axotomizadas por fotocoagulación en la córnea del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*.**

Diagramas de barras que muestran el promedio y el error típico de la media de la tasa de recuperación (%) de las fibras fotocoaguladas con el láser en: la longitud de la FSB (A), en la longitud acumulada de las TN (B), en la longitud acumulada de la FSB+TN (C), en el volumen de la FSB+TN (D) y en la dimensión fractal de la FSB+TN (E). Los valores individuales de los parámetros para cada fibra fotocoagulada se representan como puntos sobre las barras. La barra naranja indica el momento de la fotocoagulación. La línea base ( $y=0$ ) se representa como una línea punteada horizontal. A, C-D. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente la prueba de Dunn's para las comparaciones múltiples con respecto a los valores anteriores a la fotocoagulación ( $p<0.001^{***}$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.05^*$ ). B, E. Se usó una ANOVA de un factor y la prueba de Dunnett para obtener las comparaciones múltiples con respecto a los valores de la fibra antes de practicar la axotomía ( $p<0.001^{***}$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.05^*$ ).

Posteriormente, se comparó si el porcentaje de recuperación de los cinco parámetros morfodinámicos estudiados es diferente entre los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y los *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* (Figura 4.25) Para ello, se aplicó una prueba ANOVA de 2 factores para cada una de las variables. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas entre la regeneración de las fibras de frío en ambas líneas de ratones en los siguientes parámetros: longitud de las FSB ( $p=0.865$ ; Figura 4.25A), longitud acumulada de las TN de cada FSB ( $p=0.150$ ; Figura 4.25B), longitud total de las FSB+TN ( $p=0.992$ ; Figura 4.25C), volumen ocupado por la FSB+TN en el epitelio corneal ( $p=0.076$ ; Figura 4.25D) y DF de la FSB+TN ( $p=.0559$ ; Figura 4.25E). Estos resultados demuestran que a pesar de existir un retraso en la degeneración de la fibra lesionada del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>*, aparentemente el proceso de regeneración no está alterado con respecto al ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*. Estos resultados sugieren que la proteína SARM1 no forma parte del mecanismo molecular intrínseco implicado el proceso de regeneración de las fibras sensoriales tras la axotomía.



**Figura 4.25. Comparación morfológica dinámica de la regeneración de fibras individuales axotomizadas por fotocoagulación en la córnea del ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* y del *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>***

Diagramas de barras que muestran el promedio y el error típico de la media de la tasa de recuperación (%) de las fibras fotocoaguladas con el láser en: la longitud de la FSB (A), en la longitud acumulada de las TN (B), en la longitud acumulada de la FSB+TN (C), en el volumen de la FSB+TN (D) y en la dimensión fractal de la FSB+TN (E) en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* (en azul) y en el *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/Sarm1<sup>-/-</sup>* (en verde). Los valores individuales de los parámetros para cada fibra fotocoagulada se representan como puntos sobre las barras. La barra naranja indica el momento de la fotocoagulación. La línea base ( $y=0$ ) se representa como una línea punteada horizontal. A-E. Se aplicó una prueba ANOVA de 2 factores para cada una de las variables.

## 5. Discusión

---

Como se indica en la descripción inicial de objetivos de la presente tesis doctoral, el propósito de esta investigación ha sido utilizar la población de neuronas sensoriales primarias que inervan la córnea del ratón adulto y que responden a reducciones de temperatura (neuronas sensoriales de frío), como un modelo sencillo y accesible para ampliar el conocimiento de las características morfológicas, inmunocitoquímicas y moleculares del cuerpo celular y los axones periféricos de las neuronas somatosensoriales de los mamíferos. Sobre esa base, se estudiaron los cambios morfodinámicos que tienen lugar en las fibras nerviosas periféricas que inervan la córnea, tanto en condiciones de normalidad como tras la lesión axonal a distintos niveles de su trayectoria periférica. Finalmente, se analizaron experimentalmente las consecuencias que tales lesiones provocan en la estructura y los procesos inmunocitoquímicos y moleculares, previamente observados en las neuronas intactas.

La existencia de neuronas termosensibles específicas para la detección de los descensos moderados de temperatura fue demostrada electrofisiológicamente por Hensel y colaboradores a mediados del siglo XX (Hensel & Zotterman, 1951). Desde entonces se han producido avances importantes en el conocimiento de las características biofísicas, canales iónicos implicados en la activación neuronal, codificación de los estímulos en descargas de impulsos nerviosos o sensaciones conscientes y respuestas autonómicas asociadas a la detección de los cambios de temperatura por las neuronas termorreceptoras en condiciones de normalidad como en variadas situaciones patológicas.

Este estudio aporta datos novedosos sobre la arquitectura y el dinamismo morfológico y funcional de las neuronas termorreceptoras de frío y su posible papel funcional. Asimismo, identifica nuevos canales iónicos implicados en la transducción de las señales periféricas de frío y profundiza en el conocimiento de su previsible función en la construcción del mensaje sensorial y las capacidades transductoras y codificadoras de los descensos de temperatura detectados por las terminaciones de frío. En paralelo, este estudio proporciona por vez primera, información cuantitativa sobre la plasticidad de los

axones periféricos de la subpoblación de neuronas sensoriales primarias termosensibles, en condiciones de normalidad y tras la lesión de los axones y terminaciones nerviosas periféricas, que tiene un interés señalado para alcanzar una comprensión mecanicista de las neuropatías postquirúrgicas, en la córnea del ojo y previsiblemente también, en la inervación sensorial de otros órganos y tejidos.

### **5.1. Identificación molecular de dos poblaciones de neuronas trigeminales TRPM8-EYFP.**

Los canales iónicos TRPM8 son los principales transductores moleculares implicados en la detección del frío en un rango de temperaturas inocuas por los termorreceptores de mamíferos (Knowlton et al., 2013; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002) y su expresión está directamente relacionada con la sensibilidad neuronal a los descensos de la temperatura (de la Peña et al., 2005; Madrid et al., 2009; Parra et al., 2010; Viana et al., 2002). En este trabajo se han identificado, basándose en la intensidad de fluorescencia que emiten, dos poblaciones de neuronas TRPM8<sup>+</sup> en el ganglio trigémino del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*: una subpoblación exhibe una alta intensidad de fluorescencia (AIF) y la otra, una baja intensidad (BIF). En el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, la expresión de EYFP está regulada por el promotor de TRPM8 y por tanto, cabe esperar que en las AIF haya una mayor expresión de TRPM8 en comparación a las BIF. Consistentemente con estudios previos, ambas poblaciones de neuronas TRPM8<sup>+</sup> no coexpresan IB4 y sí los marcadores característicos de las fibras amielínicas C y las mielínicas A $\delta$  (J. Abe et al., 2005; Dhaka et al., 2008; Kobayashi et al., 2005; Peier et al., 2002; Takashima et al., 2007). Cabe destacar que ninguna de las neuronas AIF del presente estudio expresa el neuropéptido CGRP y solo una pequeña proporción lo hace con TrkA. Por el contrario, las neuronas BIF expresan en aproximadamente la mitad de la subpoblación CGRP y TrkA. En conjunto, estos resultados evidencian que la población total de neuronas TRPM8<sup>+</sup> expresa marcadores tanto de

neuronas nociceptoras como de neuronas no nociceptoras (Babes et al., 2004; Takashima et al., 2007) y sugiere, además, que las neuronas BIF poseen preferentemente un fenotipo molecular asociado a neuronas nociceptoras polimodales peptidérgicas (J. Abe et al., 2005; Knowlton et al., 2013; Takashima et al., 2007).

Adicionalmente, las evidencias obtenidas indican que la intensidad de fluorescencia en las poblaciones neuronales encontradas en este estudio, se correlaciona con la amplitud de las respuestas evocadas por frío o mentol, lo que sugiere que las neuronas AIF generan una mayor respuesta a los agonistas de TRPM8 que las BIF (Alcalde et al., 2018).

En esta tesis doctoral se establece, adicionalmente, que los receptores TRPM8 están presentes en el 22.4% de las fibras nerviosas que inervan la córnea y, como ocurría en el caso de los somas, se ha podido confirmar la existencia de dos subpoblaciones de fibras corneales TRPM8 positivas. Estas subpoblaciones pueden ser clasificadas, de acuerdo con su grado de expresión mayor o menor de EYFP, en tipo I y tipo II, cada una de ellas con características morfológicas propias. Las fibras tipo I muestran una alta intensidad de fluorescencia y varicosidades a lo largo de su trayectoria; por el contrario, las fibras tipo II presentan una baja intensidad de fluorescencia y carecen de varicosidades. Estudios previos de microscopía electrónica han confirmado la presencia de mitocondrias en las varicosidades de las fibras corneales (Marfurt et al., 2010; Müller et al., 2003), descritas igualmente en terminaciones nerviosas sensoriales presentes en otros tejidos tales como la articulación de la rodilla en gato, la pleura parietal del cerdo y del conejo o la duramadre de la rata (Chu et al., 2011; Messlinger, 1996; Müller et al., 2003). Esto sugiere que las fibras tipo I presentan una elevada densidad de mitocondrias, al contrario que las fibras tipo II. Se ha sugerido que la presencia de mitocondrias en las fibras tipo I podría estar relacionada con un mayor requerimiento de consumo de energía, de modo que la densidad de las mitocondrias sería un indicador indirecto de la actividad eléctrica (Messlinger, 1996). En conjunto, estas evidencias sugieren que las proyecciones periféricas de las neuronas de frío AIF localizadas en el GT podrían corresponderse con las fibras corneales sensoriales de frío

tipo I, que en su gran mayoría emiten terminaciones complejas y, según estudios funcionales previos, presentan una elevada actividad espontánea, un bajo umbral de temperatura y una intensa actividad en respuesta al enfriamiento (HB-LT) (Alamri et al., 2018; Alcalde et al., 2018; Carr et al., 2009; Gallar et al., 1993; González-González et al., 2017; Madrid et al., 2009; Olivares et al., 2015; Parra et al., 2010; Teichert et al., 2012). Por otro lado, la población de neuronas BIF, cuyo patrón de expresión molecular se asemeja al de las neuronas nociceptoras polimodales peptidérgicas (J. Abe et al., 2005; Alcalde et al., 2018; Knowlton et al., 2013; Takashima et al., 2007), podría ser el origen más probable de las fibras tipo II (Alcalde et al., 2018; González-González et al., 2017), que emiten principalmente terminaciones simples o ramificadas, asociadas con un fenotipo nociceptor (Alamri et al., 2018), y que presentan una baja intensidad de fluorescencia EYFP y ausencia de varicosidades a lo largo de su trayectoria periférica. Estas fibras tipo II, se corresponderían funcionalmente con la población de fibras sensoriales de frío, caracterizada por presentar una actividad eléctrica espontánea baja, un alto umbral de respuesta a frío y una descarga de impulsos nerviosos de frecuencia moderada en respuesta al enfriamiento (Alcalde et al., 2018; Gallar et al., 1993; González-González et al., 2017). Es razonable especular que el reclutamiento de esta subpoblación de neuronas de frío, que responde solo a enfriamientos intensos, sea el origen del cambio en la cualidad de la sensación consciente percibida por los humanos cuando se estimula la córnea con una corriente de aire frío de temperatura decreciente. En esos experimentos, cuando la temperatura basal de la córnea desciende más de 2°C, la inicial sensación subjetiva de frescor pasa a ser de irritación y sequedad (Acosta et al., 2004; Acosta, Belmonte, et al., 2001; Acosta, Tan, et al., 2001; Kovács et al., 2016). Los datos aportados en esta tesis apuntan a que este cambio resulta del reclutamiento, por el mayor enfriamiento corneal, de fibras tipo II, que actúan funcionalmente como termonociceptores de frío, conectados, por tanto, con las vías centrales que median las sensaciones de irritación y dolor ocular.

## **5.2. Las terminaciones nerviosas corneales expresan canales iónicos Piezo2, Nav1.8, P2X2 y P2X3.**

Hasta la fecha, el estudio de las bases moleculares de la transducción para la nocicepción se ha llevado a cabo preferentemente, en preparaciones *in vitro* de los ganglios trigémino (GT) y raquídeo (GR). En estas, se ha definido la expresión genética de canales iónicos transductores en el soma de neuronas sensoriales primarias, identificadas electrofisiológicamente como nociceptoras (Hameed, 2019; Premkumar, 2011). No obstante, la presencia de estas proteínas en las minúsculas terminaciones nerviosas, precisamente las estructuras fisiológicamente relevantes para la transducción sensorial, no ha podido ser directamente confirmada (Aleixandre-Carrera et al., 2021; R. H. Goldstein et al., 2019). Por tanto, la presunción de una igualdad entre el soma y las terminaciones nerviosas, en cuanto a la expresión de los canales iónicos implicados en la detección de estímulos lesivos, como TRPV1, TRPA1 o ASICs, se basa en datos indirectos. Algo similar ocurre con la expresión de la variedad de canales iónicos de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje, responsables de la producción y modulación del potencial generador y de la generación de potenciales de acción propagados que llevan el mensaje sensorial al sistema nervioso central, cuya presencia y distribución en las terminaciones sensoriales solo ha podido ser establecida indirectamente (Aleixandre-Carrera et al., 2021; Binshtok, 2011; Chung et al., 2011; Hucho & Levine, 2007; Waxman & Zamponi, 2014).

En este trabajo se han obtenido las primeras evidencias a favor de la presencia del canal iónico Piezo2 en fibras sensoriales corneales que expresan TRPV1. Piezo2 es el principal mecanotransductor molecular de las neuronas sensoriales en los mamíferos (Ranade et al., 2014), habiendo sido localizado en el soma de las neuronas de los GR (Ranade et al., 2014; Woo et al., 2014) y del GT (Bron et al., 2014; Nguyen et al., 2017; Schneider et al., 2014). El hallazgo de Piezo2 en fibras nerviosas corneales que expresan también el canal TRPV1 es consistente con estudios transcriptómicos, probando que algunas neuronas trigeminales de ratón coexpresan TRPV1 y Piezo2 (Nguyen et al., 2017). Además, estudios

funcionales previos señalan que alrededor de un 8% de terminaciones nerviosas nociceptoras polimodales de la córnea del ratón responden tanto a estímulos mecánicos como a calor nocivo ( $>40^{\circ}\text{C}$ ) (Fernández-Trillo et al., 2020; González-González et al., 2017). La identificación en este estudio, de fibras sensoriales que coexpresan TRPV1 y Piezo2, sugiere que la transducción en los nociceptores polimodales corneales de fuerzas mecánicas de baja intensidad, que evocan dolor ocular, está mediada por la apertura de canales Piezo2 presentes en sus terminaciones (Belmonte et al., 1991; Fernández-Trillo et al., 2020; González-González et al., 2017). En el presente estudio, también se identificó una baja proporción (3.2%) de fibras nerviosas corneales que expresan exclusivamente Piezo2. Ese tipo neuronal había sido ya observado molecularmente en neuronas corneales del ganglio trigémino (Bron et al., 2014) y funcionalmente, desde hace años, mediante registros electrofisiológicos de las fibras nerviosas corneales mecanonociceptoras puras (Brock et al., 1998; Gallar et al., 1993; González-González et al., 2017); y más recientemente, en terminaciones nerviosas aisladas que responden exclusivamente a estímulos mecánicos de alta intensidad (Fernández-Trillo et al., 2020; González-González et al., 2017).

Desde hace décadas se conoce que los canales de sodio Nav1.8 se expresan en los axones somatosensoriales periféricos (Black et al., 2012; Black & Waxman, 2002; Carr et al., 2002; Persson et al., 2010). El registro electrofisiológico de terminaciones nerviosas corneales individuales confirmó la presencia en su porción terminal más distal de canales de sodio, así como la decisiva contribución de estos a la generación de potenciales de acción propagados en los axones nerviosos nociceptores (Brock et al., 1998). Más recientemente, el registro óptico *in vivo* de terminaciones corneales ha posibilitado estudiar la dinámica de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en terminales nociceptoras en respuesta a la aplicación de estímulos nocivos (R. H. Goldstein et al., 2019). Esta técnica ha permitido confirmar que el lugar de iniciación de los potenciales de acción propagados, mediados por los canales Nav, se encuentra alejado del extremo distal de la terminación y depende de la disponibilidad funcional de estos canales iónico (R. H. Goldstein et al., 2019). Estudios previos demuestran que la cantidad de

canales Nav funcionalmente disponibles está parcialmente determinada por sus propiedades de inactivación lenta, que dependen en gran medida del potencial de membrana (Blair & Bean, 2003), de manera que pequeños cambios en el potencial de membrana en reposo pueden hacer que los canales Nav no estén funcionalmente disponibles (Leipold et al., 2013). En este sentido, se ha descrito que, en las terminaciones sensoriales nociceptoras corneales, la deficiencia en la disponibilidad funcional de los canales Nav implica que las terminaciones estén relativamente despolarizadas en comparación con los segmentos axonales más centrales, implicando la inactivación de los canales de Nav en la punta de la terminación, trasladando la ubicación del punto donde se inicia la propagación del impulso eléctrico, mediada por los canales Nav, a regiones más centrales del axón principal (R. H. Goldstein et al., 2019). Por tanto, la identificación inmunohistoquímica de los canales Nav1.8 a lo largo de las terminaciones nerviosas nociceptoras ha sido fundamental para sugerir que, aun expresándose en el extremo distal de la terminación, los canales Nav1.8 se encuentran en un estado inactivo (R. H. Goldstein et al., 2019).

En el presente trabajo se identifica, también por primera vez, la presencia de los receptores purinérgicos, P2X2 y P2X3, en las fibras corneales que expresan el canal iónico TRPM8. Este resultado es consistente con un estudio previo en el que se muestra la coexpresión de los receptores P2X3 y TRPM8 en una fracción de neuronas del GR (Takashima et al., 2010). En las últimas dos décadas, numerosos estudios han establecido la implicación de los receptores purinérgicos P2X2 y P2X3 en la nocicepción e identificado, mediante técnicas inmunohistoquímicas, la presencia de P2X3 en una subpoblación de neuronas nociceptoras no peptidérgicas tanto en los GR como en el GT (Burnstock, 2000; C. Chen et al., 1995; Eriksson et al., 1998; Ramer et al., 2001) y en sus proyecciones periféricas (Bo et al., 1999; Burnstock, 2000; Vulchanova et al., 1998). La expresión funcional de P2X3 en neuronas sensoriales primarias ha sido también confirmada en estudios electrofisiológicos que demuestran que el 40-96% de las neuronas del GR

responden a su agonista ATP (Bouvier et al., 1991; Rae et al., 1998; Robertson et al., 1996). Más aún, existen evidencias de que P2X3 forma heterodímeros con P2X2, que también se expresa a bajos niveles en los GR (Burnstock, 2000; Kobayashi et al., 2005; Vulchanova et al., 1997). Por tanto, la localización de canales P2X3 y P2X2 en las fibras sensoriales corneales que expresan el canal iónico TRPM8, añade nuevas evidencias de la expresión de marcadores moleculares nociceptivos en los termorreceptores de frío corneales.

### **5.3. La eliminación genética del canal iónico TRPM8 provoca alteraciones morfológicas en las fibras corneales provenientes de las neuronas de frío.**

Estudios funcionales han demostrado que la deleción genética del receptor TRPM8 en ratones reduce drásticamente su capacidad de detectar descensos en la temperatura ambiental, así como de responder a compuestos agonistas de TRPM8 como el mentol o la icilina, conocidos por evocar sensaciones de frío. Por todo ello, el canal iónico TRPM8 ha sido identificado como el principal transductor molecular de frío en las neuronas termorreceptoras (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Además, en los termorreceptores de frío corneales, la actividad de TRPM8 juega un papel fundamental para la regulación de la lacrimación y del parpadeo basal por las neuronas oculares termosensibles al frío (Parra et al., 2010; Quallo et al., 2015). Sin embargo, se desconocía si la deleción genética de TRPM8 tenía algún efecto sobre la morfología de los nervios corneales sensibles al frío. El presente trabajo indica que este es el caso en algunos aspectos, ya que la densidad de las fibras subbasales de frío es superior en los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> mientras que el número de fibras subbasales por punto de penetración es inferior, en comparación con los ratones control *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>. Además, en los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup>, solamente se observa una población morfofuncional de fibras nerviosas fluorescentes, a diferencia de las dos poblaciones observadas en el ratón *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>. Cabe destacar que las fibras observadas en el ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> presentan similitudes morfológicas con las tipo II

descritas en el ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*, como son su aspecto liso y ausencia de varicosidades. Además, el ratón *Trpm8<sup>-/-</sup>* muestra una drástica disminución de la proporción de terminaciones complejas y un aumento significativo de las simples en comparación con el ratón control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*. Estas evidencias apuntan a que la población de fibras termorreceptoras de frío canónicas HB-LT está ausente en el ratón *Trpm8<sup>-/-</sup>* (Parra et al., 2010).

Por otro lado, se ha descrito que algunos canales iónicos TRP están implicados en la guía axonal y la quimiotaxis (Gomez, 2005; Ramsey et al., 2006; Talavera et al., 2008). Así, estudios en neuronas espinales y cerebelosas indican que los canales iónicos TRPC se localizan en los conos de crecimiento, donde su actividad es modulada por proteínas implicadas en la guía axonal como la netrina-1 y el BDNF, lo que trae consigo una despolarización de la membrana plasmática y la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, un requisito necesario para la guía del cono de crecimiento (Y. Li et al., 2005; Talavera et al., 2008; G. X. Wang & Poo, 2005). Otros estudios en los GR sugieren que el TRPV1, expresado en los conos de crecimiento, desempeña un papel inhibitorio en la extensión y motilidad axonal, a través de la regulación de la dinámica de microtúbulos. Asimismo, proponen que su activación evoca una rápida retracción de los conos de crecimiento, desensamblaje de los microtúbulos y formación de varicosidades, de manera parcialmente independiente de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Goswami et al., 2006; Goswami & Hucho, 2007). Hasta el momento, los mecanismos a través de los que los canales iónicos TRP regulan la guía axonal o quimiotaxis no han sido dilucidados. Asimismo, no se conocen estudios que demuestren la implicación de otros canales iónicos TRP, como podría ser el caso del canal iónico TRPM8. Las alteraciones morfológicas observadas en la inervación corneal por fibras nerviosas termosensibles tras su neutralización funcional apuntarían a una posible implicación del TRPM8 en el crecimiento y la motilidad axonal, aunque la confirmación de esta especulación requiere realizar nuevos experimentos en el futuro.

#### **5.4. Las fibras sensoriales de frío del epitelio corneal experimentan una continua remodelación espontánea en el ratón adulto.**

Este trabajo confirma la existencia de cambios morfológicos espontáneos en las terminaciones nerviosas corneales termosensibles de frío intactas, previamente observada por Harris & Purves en 1989 (Harris & Purves, 1989) en fibras nerviosas corneales no identificadas funcionalmente. También, por primera vez, se ha llevado a cabo la cuantificación morfodinámica del proceso de remodelación espontánea de esas fibras sensoriales de frío corneales y de sus terminaciones intraepiteliales. Su monitorización diaria ha permitido cuantificar mediante un análisis morfométrico dinámico en 3D, los cambios morfológicos espontáneos y significativos experimentados durante 12 días, tanto en fibras subbasales individuales de frío como en sus terminaciones nerviosas, localizadas en el epitelio corneal del ratón adulto. Además, en el presente trabajo se confirma que los troncos nerviosos situados por debajo del epitelio, es decir, en el estroma corneal, no manifiestan cambios morfológicos detectables durante el periodo de seguimiento, lo que indica que poseen una alta estabilidad morfológica, siendo este resultado consistente con lo observado anteriormente por Harris & Purves respecto a la inervación corneal del estroma (Harris & Purves, 1989). La notable diferencia en la dinámica de remodelación de la inervación corneal en función de su localización en los distintos estratos corneales podría deberse a las diferencias que existen en la anatomía funcional y la dinámica de los procesos de renovación celular entre el epitelio y el estroma. El estroma corneal está compuesto principalmente por una matriz extracelular y una densa red de fibras de colágeno que alberga un escaso número de queratocitos en un estado metabólico quiescente (España & Birk, 2020; Hahnel et al., 2000), apareciendo, por tanto, como una estructura corneal extremadamente estática en condiciones fisiológicas. De ser así, cabe esperar que las fibras nerviosas allí localizadas se mantengan en un estado quiescente, como hemos observado en las fibras subepiteliales. En cambio, el epitelio corneal, compuesto por 4-6 capas de células, es una estructura altamente dinámica y sus células están continuamente renovándose,

debido a que existe un permanente proceso de proliferación, migración y descamación. Las células basales se van dividiendo y diferenciando a medida que ascienden en las sucesivas capas del epitelio hasta la superficie, donde finalmente se produce la descamación de las más superficiales (Dawson et al., 2011; Hanna et al., 1961). Partiendo de la premisa de que la inervación en el epitelio corneal tiene que ir adaptándose a un entorno celular cambiante, esto explicaría el alto nivel de reorganización estructural y espacial que presentan las fibras subbasales y sus respectivas terminaciones nerviosas (Harris & Purves, 1989), en comparación con las fibras subepiteliales.

Además, es importante destacar que el epitelio y el estroma están separados por una lámina basal, que es una fina capa compuesta principalmente por fibrillas de colágeno tipo IV, laminina, heparán sulfato y fibronectina (Dawson et al., 2011). Esto implicaría la existencia de dos ambientes diferenciados en términos de la presencia de sustancias endógenas que podrían promover los cambios morfodinámicos observados en la fibra nerviosa (Kowtharapu & Stachs, 2020).

La cuantificación de la variabilidad diaria de los cambios morfodinámicos que ocurren en las fibras subbasales y en sus terminaciones nerviosas, constituye un aspecto novedoso de este trabajo. La mayor parte de las fibras localizadas en el epitelio corneal experimentan cambios morfológicos diarios que no determinan un crecimiento o decrecimiento neto a lo largo del periodo de tiempo estudiado, en lo que respecta a su longitud acumulada, volumen que ocupan en el epitelio o complejidad, estimada a partir del cálculo la dimensión fractal. Llama la atención que la magnitud de los cambios morfodinámicos diarios observados es mayor en las fibras localizadas en el centro en comparación con las de la periferia corneal, sugiriendo que las fibras centrales tienen un mayor dinamismo. Existen evidencias experimentales que sugieren que la descamación de las células superficiales ocurre preferentemente en el centro de la córnea (Mathers & Lemp, 1992; Ren & Wilson, 1996) debido al movimiento centrípeto constante de las células epiteliales durante el proceso de renovación celular (Thoft et al., 1983). Este movimiento

podría explicar que los cambios morfodinámicos diarios en las fibras nerviosas del centro de la córnea sean más acusados. Contrariamente, la variabilidad diaria en la complejidad de las fibras subbasales y sus terminaciones nerviosas en la córnea central o periférica, medida a través de la dimensión fractal, no muestra diferencias significativas. Por ello, se podría especular con la posibilidad de que la dimensión fractal sea un parámetro morfológico altamente conservado en las terminales nerviosas individuales a lo largo del tiempo, pudiendo indicar que existe una relación entre la complejidad de la organización fractal de las ramas de las terminaciones nerviosas y su actividad. De hecho, se ha sugerido que la actividad de las terminaciones nerviosas depende de su complejidad morfológica (Barkai et al., 2020). Mediante la aplicación de modelos computacionales de terminaciones nerviosas, se ha demostrado que la longitud y la resistencia axial de la membrana de las ramificaciones afectan a la respuesta de la terminación cuando es activada, sugiriendo que la activación simultánea de las múltiples ramificaciones de una misma terminación trae consigo la sumación de las respuestas de cada una de ellas (Barkai et al., 2020). En un estudio que relaciona la organización morfológica de neuronas del hipocampo de la rata en patrones fractales con aspectos funcionales se sugiere, basándose en un modelo computacional, que la organización morfológica en patrones fractales de las dendritas de estas neuronas optimiza su red de conexiones (Smith et al., 2021).

En la literatura científica se clasifican las terminaciones nerviosas corneales como simples, ramificadas y complejas y cada una de ellas, a su vez, según su expresión neuroquímica (Alamri et al., 2015, 2018; Ivanusic et al., 2013). Basándose en los datos obtenidos, se ha sugerido que las terminaciones con morfología compleja e inmunorreactivas a TRPM8 son funcionalmente termorreceptoras de frío, mientras que las terminaciones con morfología ramificada o simple e inmunorreactivas a TRPV1 corresponden a axones nociceptores polimodales (Alamri et al., 2015, 2018; Ivanusic et al., 2013). Sin embargo, en el presente trabajo se han encontrado distintos tipos morfológicos de terminaciones nerviosas en una misma fibra subbasal TRPM8, en consistencia con

estudios previos (Alcalde et al., 2018). Además, los diferentes tipos morfológicos cambian a lo largo del tiempo, lo que cuestiona que cada tipo morfológico de terminación nerviosa se correlacione unívocamente con un determinado tipo funcional de las mismas.

El dinamismo observado en las neuronas sensoriales primarias no parece ser único. Existe evidencia de remodelación morfológica en neuronas del sistema nervioso central, restringida a subpoblaciones específicas de neuronas del bulbo olfatorio o del hipocampo, y en ellas, la expresión en el cono de crecimiento de la proteína GAP43, implicada en la extensión y guía axonal embrionaria, se mantiene a lo largo de la vida adulta (De la Monte et al., 1989). Igualmente se ha identificado la expresión de la proteína GAP43 en las terminaciones nerviosas y axones intraepiteliales de la córnea (R. E. Martin & Bazan, 1992; Stepp et al., 2017). Todo ello sugiere la existencia de un proceso de extensión y retracción activa, que caracteriza la remodelación espontánea de las fibras de frío corneales descrita en este trabajo.

### **5.5. La eliminación genética del canal iónico TRPM8 altera la remodelación espontánea de las fibras de frío en el epitelio corneal.**

La monitorización diaria de las fibras sensoriales de frío corneales del ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> muestra que, a diferencia de lo observado en el ratón control *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup>, en el que las fibras centrales experimentan cambios morfodinámicos diarios de mayor magnitud que las periféricas, en el ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup> los cambios morfodinámicos en las fibras del centro de la córnea y las de la periferia corneal, no difieren significativamente.

Sin embargo, el dinamismo de los cambios morfológicos espontáneos en las fibras de frío corneales de los ratones *Trpm8*<sup>BAC-EYFP</sup> y los ratones *Trpm8*<sup>-/-</sup> si es diferente, observándose mayores cambios en la longitud acumulada de las terminaciones nerviosas de la periferia de la córnea del ratón *Trpm8*<sup>-/-</sup>, mientras que las fibras subbasales el centro de la córnea muestran un menor dinamismo. Aunque en este estudio se carecen de datos

mecanísticos para interpretar estas diferencias, en su conjunto podrían reflejar una implicación del canal iónico TRPM8 en los procesos de guía y motilidad axonal de manera similar a como ocurre en otros miembros de la familia de los canales iónicos TRP (Goswami et al., 2006; Goswami & Hucho, 2007; Y. Li et al., 2005; Talavera et al., 2008; G. X. Wang & Poo, 2005).

Parece importante destacar que el modelo experimental de estudio morfométrico dinámico tridimensional implementado en este trabajo de tesis presenta una alta resolución espacial, dado que permite monitorizar las fibras corneales a nivel individual, con la limitación bien conocida de que una fibra subbasal corneal amielínica puede contener un número variable de axones únicos (Müller et al., 2003). Aun así, esta aproximación experimental ha permitido detectar alteraciones en la reorganización morfodinámica espontánea de fibras corneales individuales en los ratones modificados genéticamente, como es el caso de la línea *Trpm8*<sup>-/-</sup>, lo que hace pensar que este modelo de estudio dinámico de la morfología de las fibras nerviosas puede ser una potente herramienta experimental en la búsqueda de posibles alteraciones morfológicas neurales no detectadas en distintas condiciones patológicas. Además del interés en la generación de conocimiento, la detección de esas alteraciones sería importante desde el punto de vista clínico y abriría nuevas oportunidades de desarrollo de marcadores tempranos de diagnóstico, más allá de los usados actualmente para patologías como la enfermedad de ojo seco (Guerrero-Moreno et al., 2020), la neuropatía diabética periférica (Hossain et al., 2005), el dolor neuropático corneal (Seyed-Razavi et al., 2014) u otras neuropatías periféricas (Petropoulos et al., 2020). En este sentido, cabe indicar que la dimensión fractal se utiliza desde hace años como indicador en la descripción de la complejidad de estructuras geométricas y en la cuantificación objetiva de sus cambios dinámicos (Di Ieva et al., 2014; Mandelbrot, 1982), como se refleja en estudios de naturaleza tan diversa como los cambios morfodinámicos en los sistemas costeros (Mandelbrot, 1967; Southgate et al., 2003), la evolución de tumores en base a su patrón fractal (Elkington et al., 2022; Lennon et al., 2015) o el diagnóstico de

neuropatías periféricas a través del estudio de la dimensión fractal del plexo subbasal de la córnea (Xin Chen et al., 2018; Petropoulos et al., 2020).

#### **5.6. Tras la lesión quirúrgica, la regeneración de la inervación sensorial de frío de la córnea es parcial.**

El presente trabajo confirma que la incisión quirúrgica de los nervios corneales en el estroma provoca la completa degeneración de su parte distal, acompañada de una leve disminución de la densidad de inervación localizada en el área externa a la lesión. En los días posteriores a la generación del daño, la inervación de la zona no lesionada se recupera totalmente. Sin embargo, a los 21 días tras la lesión, la reinervación del área lesionada es parcial, recuperando únicamente el 45% de la densidad de la inervación inicial. En otro estudio, se ha demostrado que tras la realización de una queratectomía fotorrefractiva en la córnea de ratón, la regeneración nerviosa también es incompleta para otras modalidades de fibras sensoriales corneales (Bech et al., 2018). Además, estudios electrofisiológicos de las terminaciones nerviosas de frío corneales en regeneración confirman la existencia de alteraciones en la actividad eléctrica a temperatura basal y en la respuesta a la exposición a agonistas de TRPM8 (Bech et al., 2018; Piña et al., 2019).

#### **5.7. La fotocoagulación realizada con un láser de femtosegundo produce una afectación mínima del tejido circundante a la lesión nerviosa.**

Los modelos de lesión nerviosa corneal usados en los estudios de regeneración nerviosa periférica en mamíferos implican la realización de macrolesiones que producen la sección parcial o total de un elevado número de fibras nerviosas (Bech et al., 2018; Namavari et al., 2011; Pajooresh-Ganji et al., 2015; Piña et al., 2019; Rozsa et al., 1983). Este tipo de lesiones se acompaña de la activación de células inflamatorias y la liberación de moléculas proinflamatorias que intervienen en la capacidad de regeneración del tejido y de

las fibras nerviosas lesionadas (Pajooresh-Ganji et al., 2015). Por tanto, para evaluar *in vivo* la capacidad de regeneración intrínseca, propia de las fibras nerviosas presentes en la córnea, resulta fundamental el desarrollo de modelos de lesión nerviosa periférica que se acompañen del menor daño posible al tejido circundante. En este sentido, se ha desarrollado recientemente un modelo de axotomía de fibras estromales de la córnea mediante el uso de un láser de femtosegundo (Song et al., 2019). Sin embargo, la fotocoagulación de los troncos nerviosos profundos en el estroma conduce a la denervación de grandes áreas en el epitelio corneal debido a que estos troncos son los que dan lugar al plexo subbasal. Si bien este tipo de microlesión permite estudiar la reinervación *in vivo* del conjunto de fibras subbasales en un área del epitelio corneal (Song et al., 2019), no permite el seguimiento de los cambios morfodinámicos de fibras nerviosas individuales del epitelio corneal tras su lesión. Los autores de este modelo de microlesión de fibras corneales informan de que la lesión producida en el estroma es mínimamente invasiva y no presenta indicios de daños macroscópicos en la córnea. Sin embargo, no ofrecen una cuantificación de la extensión de los posibles daños microscópicos infligidos al tejido estromal que circunda a la lesión. En el presente trabajo, el uso de un láser de femtosegundo para fotocoagular individualmente a fibras subbasales del epitelio corneal ha permitido la monitorización y análisis en 3D de los cambios morfométricos experimentados por fibras subbasales aisladas y sus respectivas terminaciones nerviosas tras su lesión en el epitelio corneal. Además, nos ha permitido determinar el tamaño de la lesión circundante mediante la medición del volumen de la marca fluorescente resultante de la fotocoagulación, una estrategia similar a la usada para ver la extensión de las lesiones realizadas con el láser de femtosegundo en axones de la corteza cerebral (Canty et al., 2013). Este volumen es equivalente al que posee un macrófago alveolar, lo que refleja el pequeño volumen que presenta la marca fluorescente en el epitelio corneal.

El conjunto de estos datos muestra que la fotocoagulación de una fibra subbasal individual produce una lesión muy precisa en el área donde incide el rayo láser, no

produciendo alteraciones morfológicas en las fibras nerviosas de frío circundantes. De hecho, inmediatamente después de realizar la fotocoagulación de una fibra subbasal única, no se observa cambio alguno en las fibras subbasales que comparten el mismo punto de penetración que la fibra axotomizada. Estos datos corroboran un estudio previo que demuestra la precisión espacial de la lesión con el láser de femtosegundo al fotocoagular de manera individual espinas dendríticas corticales sin producir alteraciones en las espinas adyacentes (Allegra Mascaro et al., 2010).

Las fibras subbasales se localizan entre la membrana basolateral y la apical de las células basales y suprabasales del epitelio corneal. Tras la fotocoagulación no se observan espacios intercelulares que se pudieran corresponder con los dejados por alguna célula epitelial destruida. No obstante, aplicando la tinción de Hoechst, un marcador fluorescente ampliamente usado para visualizar el daño en el ADN celular (Zhivotosky & Orrenius, 2001), se pueden observar signos de lesión celular en un promedio de 23 células alrededor de la marca de fluorescencia. Las fotocoagulaciones de las fibras subbasales se realizaron siempre en una localización cercana al punto de penetración, es decir, a pocos micrómetros de la lámina basal, sin que se aprecien indicios de daño tisular en la región del estroma más cercana a la lesión.

El conjunto de estos datos confirma el logro de una lesión muy localizada y precisa en la fibra subbasal, que produce una afectación mínima del tejido epitelial circundante, por lo que cabría esperar una respuesta inflamatoria mínima al daño. De hecho, en un estudio de fotocoagulación de axones corticales individuales se ha demostrado que las células inmunitarias se acumulan en el área lesionada 4-5 horas después de lesionar, disipándose a los 3 días, lo que indica que la respuesta inmune es rápida, localizada y transitoria (Canty et al., 2013).

Hasta la fecha, el estudio *in vivo* de la regeneración nerviosa periférica, mediante la realización de lesiones precisas de fibras individuales y mínimamente invasivas ha quedado

mayoritariamente restringido al uso del pez cebra como modelo experimental (O'Brien et al., 2009; Rosenberg et al., 2012; Xiao et al., 2015). Este trabajo permite proponer este modelo de lesión mediante fotocoagulación de fibras corneales individuales y su posterior monitorización análisis de los cambios morfodinámicos durante la regeneración, como una nueva herramienta experimental general para el estudio de los mecanismos intrínsecos de degeneración y regeneración de los nervios sensoriales periférico en mamíferos.

**5.8. Tras la axotomía por fotocoagulación, las fibras subbasales de frío de la córnea experimentan una regeneración parcial, mientras que sus terminaciones nerviosas regeneran completamente.**

Según los modelos computacionales que proponen que la morfología de las terminaciones nerviosas influye en su funcionalidad (Barkai et al., 2020; R. H. Goldstein et al., 2019), cabría esperar que la regeneración incompleta de las fibras nerviosas conllevara una alteración de su actividad funcional. Por ello, es necesario realizar una descripción más detallada de los cambios estructurales que acontecen a la lesión.

La monitorización de la porción proximal de la fibra lesionada con el láser de femtosegundo a lo largo del tiempo de estudio y el posterior análisis de algunos de sus parámetros morfométricos, como longitud, volumen y complejidad del patrón fractal de sus ramificaciones, muestra que, 15 días después de la fotocoagulación, la fibra lesionada ha recuperado el 48% de la longitud acumulada y el 50 % del volumen de epitelio inervado por el conjunto de la fibra subbasal y sus terminaciones nerviosas antes de ser axotomizada. Esta recuperación parcial es similar a la observada en el modelo de regeneración tras una lesión por incisión quirúrgica de las fibras de frío corneales. Por tanto, dado que la regeneración del conjunto de la fibra subbasal y sus terminaciones nerviosas es incompleta tras realizar una lesión nerviosa mínimamente invasiva, cabe especular que en el caso de la regeneración nerviosa inducida por macrolesiones, no es la prominente respuesta

inflamatoria (Alio & Javaloy, 2013) el factor determinante de una reinervación incompleta. Una recuperación incompleta similar del plexo subbasal, ha sido descrita tras denervaciones parciales mediante lesión quirúrgica corneal del ratón adulto, no atribuible a la inflamación observada en la córnea (Pajoohesh-Ganji et al., 2015).

El análisis de la dinámica de regeneración de la fibra subbasal axotomizada y de sus correspondientes terminaciones nerviosas por separado, reveló que, en contraste con la dinámica de regeneración de la fibra subbasal axotomizada, sus terminaciones nerviosas recuperan la totalidad de la longitud acumulada inicial transcurridos solamente 7 días desde la axotomía, evidenciando que las dinámicas de regeneración de la fibra subbasal y la de sus terminaciones nerviosas son diferentes, sugiriendo que dependen de procesos celulares de regeneración al menos parcialmente distintos. Estudios previos en neuronas sensoriales primarias han mostrado que, tras la axotomía periférica, se activa una cascada de señalización retrógrada a través de la que se pone en marcha en el soma la transcripción de los genes que modifican el patrón de crecimiento de los axones lesionados (N. Abe & Cavalli, 2009; Rishal & Fainzilber, 2010; Rossi et al., 2007). Intervienen, además, señales extrínsecas que actúan directamente sobre los conos de crecimiento de los axones lesionados y que son capaces de modular diferencialmente la síntesis local de las proteínas que regulan independientemente la dinámica de ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto (Jung et al., 2012). Dado que los conos de crecimiento se localizan en los extremos de la fibra en regeneración, se podría especular con la posibilidad de que la síntesis local de proteínas fuese el mecanismo que determina la mayor capacidad de regeneración de las terminaciones nerviosas frente a la de los axones en el plexo subbasal.

La estimación de la complejidad de la porción proximal del axón lesionado en regeneración, mediante la cuantificación de la dimensión fractal, muestra que el valor inicial de esta se recupera completamente y tan pronto como al tercer día postlesión, a pesar de que la recuperación de la longitud y el volumen de la fibra en regeneración es todavía muy incipiente en ese momento temporal. Esta observación indica que la dimensión fractal debe

ser considerada un parámetro morfológico altamente conservado, no solamente durante la remodelación morfológica espontánea de las fibras corneales de frío, sino también durante su regeneración postlesión.

### **5.9. La delección genética de SARM1 conlleva un retraso en la degeneración de la porción distal de fibras de frío corneales tras su axotomía mediante fotocoagulación.**

La proteína SARM1 ha sido descrita como un mecanismo molecular intrínseco esencial en la activación del proceso de degeneración Walleriana que sucede a la lesión nerviosa periférica. De este modo, la lesión de un axón periférico activaría la proteína prodegenerativa SARM1, promoviendo el proceso de degeneración Walleriana en la porción distal del axón axotomizado (Gerdt et al., 2013, 2015; Osterloh et al., 2012). Así, experimentos realizados en preparaciones *in vitro* de neuronas del ganglio cervical superior, en neuronas de los GR y en neuronas corticales muestran que, tras realizar una axotomía de sus axones periféricos, en la porción distal de las neuronas de ratones *Sarm1*<sup>-/-</sup> empieza la degeneración a partir del tercer día después de la axotomía, mientras que en ratones con un genotipo silvestre ya ha degenerado por completo entre las 8-12 horas tras la lesión (Osterloh et al., 2012). Por otro lado, en ratones con genotipo silvestre, tras la lesión del nervio ciático *in vivo*, se observa que la degeneración de la porción distal comienza 3 días después de la lesión; en cambio, en los ratones *Sarm1*<sup>-/-</sup> esta degeneración no comienza hasta pasados 14 días (Osterloh et al., 2012). Es importante destacar que en los experimentos *in vivo* en ratones, el seguimiento y la visualización de los axones lesionados durante el proceso de degeneración se realiza en tejidos fijados a diferentes tiempos de estudio. Hasta la fecha, el único modelo experimental usado para estudiar la evolución de la degeneración *in vivo* en axones periféricos lesionados ha sido el pez cebra (Asgharsharghi et al., 2021; Di Stefano et al., 2017; Tian et al., 2020; Tian & López-Schier, 2020). En el

presente trabajo se realiza, por primera vez en ratones adultos, la monitorización *in vivo* de la degeneración de la porción distal de una fibra subbasal individual tras su lesión por fotocoagulación. Los resultados obtenidos muestran que en los ratones control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/SARM<sup>+/+</sup>*, la porción distal de las fibras subbasales corneales degenera completamente transcurridas 8 horas desde la fotocoagulación. En cambio, en los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/SARM1<sup>-/-</sup>* la completa degeneración de la porción distal se observa entre 72 y 96 horas tras la lesión. Estos resultados son consistentes con otros estudios que muestran que la inactivación de SARM1 provoca un retraso en la degeneración de la porción distal del axón lesionado (Gerdtts et al., 2013, 2015; Osterloh et al., 2012).

#### **5.10. La delección genética de SARM1 no implica cambios en la dinámica de regeneración de la porción distal de fibras de frío corneales tras su axotomía mediante fotocoagulación.**

A pesar de que numerosos estudios demuestran una implicación de SARM1 en la activación de la vía de señalización celular del proceso de degeneración Walleriana de los axones periféricos tras su lesión (Essuman et al., 2017; Gerdtts et al., 2013, 2015; Osterloh et al., 2012), el posible papel de SARM1 en su regeneración no ha sido explorado. Según la bibliografía existente, no se ha llevado a cabo hasta ahora un estudio analizando la dinámica de regeneración de fibras nerviosas periféricas tras su lesión en modelos animales de pez cebra o ratón en los que la proteína SARM1 haya sido genéticamente eliminada (Gonzalez & Allende, 2021). Este trabajo es el primero en abordar posibles alteraciones en la dinámica de regeneración de fibras sensoriales periféricas de mamífero, tras la realización de fotocoagulaciones individuales de fibras subbasales de frío corneales en ratones adultos. Los resultados obtenidos indican que la dinámica de regeneración de la porción proximal de la fibra axotomizada no se encuentra alterada en los ratones *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP/SARM1<sup>-/-</sup>* con respecto a los ratones control *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*. Apoyando estos resultados, cabe

mencionar un estudio reciente (Tian et al., 2020), que muestra como en axones periféricos axotomizados por fotocoagulación en un mutante de pez cebra *Sarm1*<sup>-/-</sup>, la eliminación de la porción distal de los axones lesionados no es esencial para la regeneración de la porción proximal y la reinervación de los órganos sensoriales.

La línea de ratones mutantes *Wld<sup>s</sup>* (del inglés, *slow Wallerian degeneration*), que codifica la proteína quimérica *Wld<sup>s</sup>* responsable del retraso en la fragmentación axonal de la porción distal del axón lesionado (Coleman & Höke, 2020; Lunn et al., 1989), se ha empleado en algún estudio previo para evaluar el proceso de regeneración. Sin embargo, existen discrepancias en los resultados observados. Por un lado, la regeneración del nervio ciático tras ser lesionado en el ratón *Wld<sup>s</sup>* es similar a la observada en el ratón de genotipo silvestre, a pesar de que persiste la porción distal axotomizada (Lunn et al., 1989). Otros estudios, sin embargo, señalan que tras la lesión de los nervios ciático (Bisby & Chen, 1990), safeno, frénico (Brown et al., 1994) o tibial (Benavides & Alvarez, 1998), la porción proximal no regenera mientras esté presente el segmento distal axotomizado intacto. Esta aparente contradicción con los datos obtenidos en el presente trabajo podría deberse al uso de diferentes modelos animales de degeneración Walleriana, así como de distintos modelos de lesión. Sin embargo, y en coincidencia con nuestros resultados, se ha publicado recientemente un trabajo que muestra en una línea de pez cebra *Wld<sup>s</sup>*, que los axones periféricos del GT regeneran evitando aquellas zonas donde los fragmentos de axones de la porción distal axotomizada no han sido eliminados del medio, lo que sugiere que esos fragmentos repelen a los axones que están regenerando (S. M. Martin et al., 2010). En el caso de los nervios corneales, el gran dinamismo de las células epiteliales de la córnea podría ofrecer un ambiente permisivo para que la porción proximal en regeneración disponga de alternativas de crecimiento distintas a los espacios previamente ocupados por la porción distal en degeneración. Esto ofrecería un escenario muy diferente al de otros nervios sensoriales, como el ciático o el safeno, donde los axones proximales en regeneración no

tendrían una alternativa de crecimiento, debido al espacio ocupado por los axones distales en degeneración.

Se puede concluir que, en conjunto, los resultados de esta última parte de la presente tesis doctoral avalan el uso del modelo de lesión por fotocoagulación de fibras subbasales individuales en la córnea y la posterior monitorización y análisis morfométrico dinámico en 3D, como herramienta experimental adecuada y prometedora para el estudio *in vivo* de los mecanismos moleculares intrínsecos de degeneración y regeneración nerviosa periférica en ratones adultos.

## **6. Conclusiones**

---

1. Existen dos poblaciones diferenciadas de neuronas trigeminales que expresan el canal iónico TRPM8, tanto en el soma como en las prolongaciones nerviosas que inervan la córnea del ratón *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP*. Estas se distinguen por su nivel de expresión de TRPM8, presencia o no de varicosidades y número de ramificaciones de sus terminaciones nerviosas.

2. Las neuronas con baja expresión de TRPM8 expresan en su soma marcadores moleculares (periferina, NF200, TrkA y CGRP) propios de neuronas nociceptoras peptidérgicas.

3. Los canales iónicos Piezo2 y Nav1.8 se expresan en los axones y las terminaciones nerviosas nociceptoras (TRPV1<sup>+</sup>) de la córnea del ratón adulto.

4. Los receptores purinérgicos P2X2 y P2X3 se expresan en una fracción de las terminaciones nerviosas TRPM8<sup>+</sup> de la córnea del ratón adulto, confirmando la presencia de marcadores moleculares característicos de los nociceptores en la población de las neuronas corneales sensibles al frío.

5. Las fibras nerviosas corneales que expresan TRPM8 experimentan cambios morfológicos espontáneos de manera continua, que se traducen en modificaciones de su longitud, del volumen y dimensión fractal de la fibra y de sus terminaciones nerviosas. Estos cambios morfodinámicos son mayores en las fibras nerviosas del centro de la córnea que en las de la periferia.

6. La deleción genética del canal iónico TRPM8 altera tanto la morfología de las fibras sensoriales de frío como su dinámica de remodelación espontánea en la córnea del ratón adulto.

7. En el ratón adulto, la incisión quirúrgica de la córnea produce una denervación completa y rápida del área lesionada, seguida de una recuperación incompleta de la densidad y longitud de los nervios subbasales y de sus terminaciones nerviosas sensibles al frío en las semanas posteriores a la lesión.

**8.** La axotomía selectiva de una fibra subbasal TRPM8<sup>+</sup>, mediante el láser de femtosegundo, no afecta a las fibras nerviosas TRPM8<sup>+</sup> cercanas y genera escaso daño en el tejido circundante, constituyendo un novedoso modelo de lesión para el estudio *in vivo* de los mecanismos de degeneración y regeneración de los axones periféricos en mamíferos.

**9.** Tras la axotomía selectiva de una fibra subbasal de frío corneal, se produce una rápida degeneración de la porción distal a la lesión seguida de una rápida regeneración de la porción proximal, que permite la completa recuperación de su dimensión fractal original, así como de la longitud acumulada de sus terminaciones nerviosas, en la primera semana postlesión. Sin embargo, no se recupera totalmente la longitud acumulada de la fibra subbasal ni el volumen que esta ocupa en el epitelio.

**10.** La abolición genética de la proteína SARM1 retrasa la degeneración de la porción distal de la fibra subbasal de frío axotomizada sin afectar la dinámica de regeneración de la porción proximal. Esta observación avala el papel de la proteína SARM1 como un mecanismo molecular específico de la degeneración Walleriana, pero no así de la regeneración de los axones periféricos de mamíferos tras su lesión

## Conclusions

---

1. Two populations of trigeminal neurons expressing TRPM8 channels in the cell body and corneal nerve projections have been detected in *Trpm8<sup>BAC</sup>-EYFP* mice. They are distinguished by their TRPM8 expression level, presence of varicosities and number of branches of their nerve terminals.

2. The soma of neurons with low TRPM8-associated fluorescence also express molecular markers (periferin, NF200, TrkA y CGRP) characteristics of peptidergic nociceptive neurons.

3. Piezo 2 and Nav1.8 ion channels are expressed in TRPV1-expressing nociceptive axons and nerve terminals in the mouse cornea.

4. P2X2 and P2X3 purinergic receptors are expressed by a fraction of TRPM8<sup>+</sup> nerve terminals of the cornea of the adult mouse. This confirms the presence of typical molecular markers of the nociceptors in the population of corneal cold neurons.

5. Corneal nerve fibers expressing TRPM8 channels experience continuous and spontaneous morphological changes which are evidenced by modifications of their length, volume and fractal dimension. These changes are more pronounced in nerve fibers located in the center of the cornea than in the periphery.

6. Genetic deletion of TRPM8 channels impairs the morphology of cold sensory nerves and their dynamic spontaneous remodeling in the cornea of the adult mouse.

7. Surgical transection of the cornea in the adult mouse produces a rapid and complete denervation of the injured area, followed by the incomplete recovery of the density and length of the cold-sensitive subbasal nerves and terminals in the weeks after injury.

**8.** Femtosecond laser-induced axotomy of a single TRPM8<sup>+</sup> subbasal nerve does not affect the nearby TRPM8<sup>+</sup> nerve fibers and generates a modest damage in the surrounding tissue. This provides a novel *in vivo* injury model to study the intrinsic mechanisms of degeneration and regeneration of the peripheral axons in mammals.

**9.** After selective axotomy of a single corneal subbasal cold fiber, a rapid degeneration of the distal stump occurs, followed by a rapid regeneration of the proximal stump. This enables the complete recovery of its initial fractal dimension and the accumulated length of its nerve endings one week after injury. Nonetheless, the length of the subbasal fiber and the volume occupied at the epithelium are not fully recovered.

**10.** Genetic deletion of SARM1 protein delays the degeneration of the distal stump but does not affect the dynamic of regeneration of the proximal stump of axotomized subbasal cold fibers. This observation supports the role of SARM1 as a specific molecular mechanism for Wallerian degeneration, without affecting peripheral axon regeneration after injury in mammals

## **7. Referencias bibliográficas**

---

- 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. *Molecular Brain Research*, 136(1–2), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.01.013>
- Abe, N., & Cavalli, V. (2009). *Nerve injury signalling*. 18(3), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.06.005>.Nerve
- Abraira, V. E., & Ginty, D. D. (2013). The sensory neurons of touch. *Neuron*, 79(4), 618–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.051>
- Acosta, M. C., Belmonte, C., & Gallar, J. (2001). Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *Journal of Physiology*, 534(2), 511–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00511.x>
- Acosta, M. C., Peral, A., Luna, C., Pintor, J., Belmonte, C., & Gallar, J. (2004). Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(7), 2333–2336. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1366>
- Acosta, M. C., Tan, M. E., Belmonte, C., & Gallar, J. (2001). Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(9), 2063–2067.
- Al-Aqaba, M. A., Dhillon, V. K., Mohammed, I., Said, D. G., & Dua, H. S. (2019). Corneal nerves in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 73(December 2018), 100762. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.05.003>
- Al-Aqaba, M. A., Fares, U., Suleman, H., Lowe, J., & Dua, H. S. (2010). Architecture and distribution of human corneal nerves. *British Journal of Ophthalmology*, 94(6), 784–789. <https://doi.org/10.1136/bjo.2009.173799>
- Alamri, A., Bron, R., Brock, J. A., & Ivanusic, J. J. (2015). Transient receptor potential cation channel subfamily v member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00071>
- Alamri, A., Wood, R. J., Ivanusic, J. J., & Brock, J. A. (2018). The neurochemistry and morphology of functionally identified corneal polymodal nociceptors and cold thermoreceptors. *PLoS ONE*, 13(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195108>
- 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. *Journal of Comparative Neurology*, 526(11), 1859–1874. <https://doi.org/10.1002/cne.24454>
- Alexandre-Carrera, F., Engelmayer, N., Ares-Suárez, D., Acosta, M. del C., Belmonte, C., Gallar, J., Meseguer, V., & Binshtok, A. M. (2021). Optical assessment of nociceptive TRP channel function at the peripheral nerve terminal. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22020481>
- Alio, J. L., & Javaloy, J. (2013). Corneal Inflammation Following Corneal Photoablative Refractive Surgery With Excimer Laser. *Survey of Ophthalmology*, 58(1), 11–25.

<https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2012.04.005>

- Allegra Mascaro, A. L., Sacconi, L., & Pavone, F. S. (2010). Multi-photon nanosurgery in live brain. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00021>
- Almubrad, T., & Akhtar, S. (2012). Ultrastructure features of camel cornea - collagen fibril and proteoglycans. *Veterinary Ophthalmology*, 15(1), 36–41. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2011.00918.x>
- Ambalavanar, R., & Morris, R. (1992). The distribution of binding by isolectin I-B4 from *Griffonia simplicifolia* in the trigeminal ganglion and brainstem trigeminal nuclei in the rat. *Neuroscience*, 47(2), 421–429. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90256-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90256-2)
- Arcas, J. M., 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. *The Journal of Neuroscience*, 39(6), 949 LP – 969. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1726-18.2018>
- Asgharsharghi, A., Tian, W., Haehnel-Taguchi, M., & López-Schier, H. (2021). Sarm1 is dispensable for mechanosensory-motor transformations in zebrafish. *MicroPublication Biology*, 2021, 1–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33688624><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7930918>
- Averill, S., McMahon, S. B., Clary, D. O., Reichardt, L. F., & Priestley, J. V. (1995). Immunocytochemical Localization of trkA Receptors in Chemically Identified Subgroups of Adult Rat Sensory Neurons. *European Journal of Neuroscience*, 7(7), 1484–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01143.x>
- 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. *European Journal of Neuroscience*, 20(9), 2276–2282. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03695.x>
- Bae, J. Y., Kim, J. H., Cho, Y. S., Mah, W., & Bae, Y. C. (2015). Quantitative analysis of afferents expressing substance P, calcitonin gene-related peptide, isolectin B4, neurofilament 200, and Peripherin in the sensory root of the rat trigeminal ganglion. *Journal of Comparative Neurology*, 523(1), 126–138. <https://doi.org/10.1002/cne.23672>
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J., & Patapoutian, A. (2004). Three other TRPV ion channels with distinct thresholds (mTRPA1) show a sharp increase in intracellular calcium. *Neuron*, 41, 849–857. <http://www.neuron.org/cgi/content/full/>
- Barber, C. B., Dobkin, D. P., & Huhdanpaa, H. (1996). The Quickhull Algorithm for Convex Hulls. *ACM Transactions on Mathematical Software*, 22(4), 469–483. <https://doi.org/10.1145/235815.235821>
- Barkai, O., Butterman, R., Katz, B., Lev, S., & Binshtok, A. M. (2020). *The Input-Output Relation of Primary Nociceptive Neurons is Determined by the Morphology of the Peripheral Nociceptive Terminals*. 40(49), 9346–9363.
- Barnsley, M. F. (1993). *Fractals Everywhere*. (2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.2307/2983297>
- Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S.

- E., & Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, *448*(7150), 204–208. <https://doi.org/10.1038/nature05910>
- Bech, F., González-González, O., Artime, E., Serrano, J., Alcalde, I., Gallar, J., Merayo-Llodes, J., & Belmonte, C. (2018). Functional and morphologic alterations in mechanical, polymodal, and cold sensory nerve fibers of the cornea following photorefractive keratectomy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *59*(6), 2281–2292. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24007>
- Belmonte, C. (2019). Pain, Dryness, and Itch Sensations in Eye Surface Disorders Are Defined by a Balance between Inflammation and Sensory Nerve Injury. *Cornea*, *38*(11), S11–S24. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002116>
- Belmonte, C., Acosta, M. C., & Gallar, J. (2004). Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Experimental Eye Research*, *78*(3), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.023>
- Belmonte, C., Aracil, A., Acosta, M. C., Luna, C., & Gallar, J. (2004). Nerves and sensations from the eye surface. *Ocular Surface*, *2*(4), 248–253. [https://doi.org/10.1016/S1542-0124\(12\)70112-X](https://doi.org/10.1016/S1542-0124(12)70112-X)
- Belmonte, C., & Cervero, F. (1996). *Neurobiology of nociceptors*. Oxford University Press.
- Belmonte, C., & Gallar, J. (2011). Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *52*(6), 3888–3892. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5119>
- Belmonte, C., Gallar, J., Lopez-Briones, L. G., & Pozo, M. A. (1994). Polymodality in Nociceptive Neurons: Experimental Models of Chemotransduction. In L. Urban (Ed.), *Cellular Mechanisms of Sensory Processing* (pp. 87–117). Springer Berlin Heidelberg.
- Belmonte, C., Gallar, J., Pozo, M. A., & Rebollo, I. (1991). Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *The Journal of Physiology*, *437*(1), 709–725. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018621>
- Belmonte, C., Garcia-Hirschfeld, J., & Gallar, J. (1997). Neurobiology of ocular pain. *Progress in Retinal and Eye Research*, *16*(1), 117–156. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(96\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(96)00027-4)
- Belmonte, C., & Giraldez, F. (1981). Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *The Journal of Physiology*, *321*, 355–368. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013989>
- Belmonte, C., Nichols, J. J., Cox, S. M., Brock, J. A., Begley, C. G., Bereiter, D. A., Dartt, D. A., Galor, A., Hamrah, P., Ivanusic, J. J., Jacobs, D. S., McNamara, N. A., Rosenblatt, M. I., Stapleton, F., & Wolffsohn, J. S. (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocular Surface*, *15*(3), 404–437. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.002>
- Belmonte, C., Tervo, T. M. T., & Gallar, J. (2011). Sensory Innervation of the Eye. In P. L. Kaufman, A. Alm, L. A. Levin, S. F. E. Nilsson, J. Ver Hoeve, & W. Samuel (Eds.), *Adler's Physiology of the Eye* (11th ed., pp. 363–384). Elsevier. [https://journals.lww.com/optvissci/Fulltext/2012/04000/Adler\\_s\\_Physiology\\_of\\_the\\_Eye\\_11th\\_ed\\_\\_21.aspx](https://journals.lww.com/optvissci/Fulltext/2012/04000/Adler_s_Physiology_of_the_Eye_11th_ed__21.aspx)
- Belmonte, C., & Viana, F. (2008). Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular Pain*, *4*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-14>

- Benavides, E., & Alvarez, J. (1998). Peripheral axons of Wld(s) mice, which regenerate after a delay of several weeks, do so readily when transcription is inhibited in the distal stump. *Neuroscience Letters*, *258*(2), 77–80. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00746-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00746-0)
- Bessou, P., & Perl, E. R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of Neurophysiology*, *32*(6), 1025–1043. <https://doi.org/10.1152/jn.1969.32.6.1025>
- Beuerman, R. W., & Schimmelpfennig, B. (1980). Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Experimental Neurology*, *69*(1), 196–201. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(80\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(80)90154-5)
- Binshtok, A. M. (2011). Mechanisms of Nociceptive Transduction and Transmission: A Machinery for Pain Sensation and Tools for Selective Analgesia. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 97). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385198-7.00006-0>
- Bisby, M. A., & Chen, S. (1990). Delayed Wallerian degeneration in sciatic nerves of C57BL/Ola mice is associated with impaired regeneration of sensory axons. *Brain Research*, *530*(1), 117–120. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90666-Y](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90666-Y)
- Black, J. A., Frézel, N., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2012). Expression of Nav1.7 in DRG neurons extends from peripheral terminals in the skin to central preterminal branches and terminals in the dorsal horn. *Molecular Pain*, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-82>
- Black, J. A., & Waxman, S. G. (2002). Molecular identities of two tetrodotoxin-resistant sodium channels in corneal axons. *Experimental Eye Research*, *75*(2), 193–199. <https://doi.org/10.1006/exer.2002.2014>
- Blair, N. T., & Bean, B. P. (2003). Role of Tetrodotoxin-Resistant Na<sup>+</sup> Current Slow Inactivation in Adaptation of Action Potential Firing in Small-Diameter Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience*, *23*(32), 10338–10350. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-32-10338.2003>
- Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A., & Burnstock, G. (1999). Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *NeuroReport*, *10*(5), 1107–1111. <https://doi.org/10.1097/00001756-199904060-00037>
- Boada, M. D. (2013). Relationship between electrophysiological signature and defined sensory modality of trigeminal ganglion neurons in vivo. *Journal of Neurophysiology*, *109*(3), 749–757. <https://doi.org/10.1152/jn.00693.2012>
- Bouvier, M. M., Evans, M. L., & Benham, C. D. (1991). Calcium Influx Induced by Stimulation of ATP Receptors on Neurons Cultured from Rat Dorsal Root Ganglia. *European Journal of Neuroscience*, *3*(3), 285–291. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00090.x>
- Brock, J., Acosta, M. C., 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. *The Journal of Physiology*, *575*(Pt 2), 573–581. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.110130>
- Brock, J., McLachlan, E. M., & Belmonte, C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *Journal of Physiology*, *512*(1), 211–

217. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.211bf.x>

- Bron, R., Wood, R. J., Brock, J. A., & Ivanusic, J. J. (2014). Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 522(13), 2967–2979. <https://doi.org/10.1002/cne.23560>
- Brown, M. C., Perry, V. H., Hunt, S. P., & Lapper, S. R. (1994). Further Studies on Motor and Sensory Nerve Regeneration in Mice With Delayed Wallerian Degeneration. *European Journal of Neuroscience*, 6(3), 420–428. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb00285.x>
- Burnstock, G. (2000). P2X receptors in sensory neurones. *British Journal of Anaesthesia*, 84(4), 476–488. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bja.a013473>
- Cafaro, T. A., Ortiz, S. G., Maldonado, C., Espósito, F. A., Croxatto, J. O., Berra, A., Ale, O. L., Torrealday, J. I., Urrets-Zavalía, E. A., Urrets-Zavalía, J. A., & Serra, H. M. (2009). The cornea of Guinea pig: Structural and functional studies. *Veterinary Ophthalmology*, 12(4), 234–241. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00708.x>
- Callejo, G., Castellanos, A., Castany, M., Gual, A., Luna, C., Acosta, M. C., Gallar, J., Giblin, J. P., & Gasull, X. (2015). Acid-sensing ion channels detect moderate acidifications to induce ocular pain. *Pain*, 156(3), 483–495. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460335.49525.17>
- Campana, W. M. (2007). Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(5), 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.12.008>
- Canty, A. J., Huang, L., Jackson, J. S., Little, G. E., Knott, G., Maco, B., & De Paola, V. (2013). In-vivo single neuron axotomy triggers axon regeneration to restore synaptic density in specific cortical circuits. *Nature Communications*, 4(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms3038>
- Carr, R. W., Pianova, S., & Brock, J. A. (2002). The effects of polarizing current on nerve terminal impulses recorded from polymodal and cold receptors in the guinea-pig cornea. *Journal of General Physiology*, 120(3), 395–405. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028628>
- Carr, R. W., Pianova, S., Fernandez, J., Fallon, J. B., Belmonte, C., & Brock, J. A. (2003). Effects of heating and cooling on nerve terminal impulses recorded from cold-sensitive receptors in the guinea-pig cornea. *Journal of General Physiology*, 121(5), 427–439. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308814>
- Carr, R. W., Pianova, S., McKemy, D. D., & Brock, J. A. (2009). Action potential initiation in the peripheral terminals of cold-sensitive neurones innervating the guinea-pig cornea. *Journal of Physiology*, 587(6), 1249–1264. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.167023>
- Carriel, V., Garzón, I., Alaminos, M., & Cornelissen, M. (2014). Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regeneration Research*, 9(18), 1657–1660. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.141798>
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., & Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5464), 306–313. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.306>

- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, *389*(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chakravarti, S., Petroll, W. M., Hassell, J. R., Jester, J. V., Lass, J. H., Paul, J., & Birk, D. E. (2000). Corneal opacity in lumican-null mice: Defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *41*(11), 3365–3373.
- Chan-Ling, T. (1989). Sensitivity and neural organization of the cat cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *30*(6), 1075–1082.
- Chan, K. Y., Jarvelainen, M., Chang, J. H., & Edenfield, M. J. (1990). A cryodamage model for studying corneal nerve regeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *31*(10), 2008–2021.
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., & Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. In *Nature* (Vol. 377, Issue 6548, pp. 428–431). <https://doi.org/10.1038/377428a0>
- Chen, Xiaojie, Belmonte, C., & Rang, H. P. (1997). Capsaicin and carbon dioxide act by distinct mechanisms on sensory nerve terminals in the cat cornea. *Pain*, *70*(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(96\)03256-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(96)03256-3)
- Chen, Xiaojie, Gallar, J., & Belmonte, C. (1997). Reduction by antiinflammatory drugs of the response of corneal sensory nerve fibers to chemical irritation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *38*(10), 1944–1953. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(99\)80127-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(99)80127-5)
- Chen, Xin, Graham, J., Petropoulos, I. N., Ponirakis, G., Asghar, O., Alam, U., Marshall, A., Ferdousi, M., Azmi, S., Efron, N., & Malik, R. A. (2018). Corneal nerve fractal dimension: A novel corneal nerve metric for the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *59*(2), 1113–1118. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23342>
- Chu, C., Levine, E., Gear, R. W., Bogen, O., & Levine, J. D. (2011). Mitochondrial dependence of nerve growth factor-induced mechanical hyperalgesia. *Pain*, *152*(8), 1832–1837. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.03.034>
- Chuang, H. H., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2004). The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron*, *43*(6), 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.038>
- Chung, M.-K., Jung, S. J., & Oh, S. B. (2011). *Role of TRP Channels in Pain Sensation BT - Transient Receptor Potential Channels* (M. S. Islam (ed.); pp. 615–636). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3\\_33](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_33)
- Colburn, R. W., Lubin, M. Lou, Stone, D. J., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M. R. R., Brandt, M. R., Liu, Y., Flores, C. M., & Qin, N. (2007). Attenuated Cold Sensitivity in TRPM8 Null Mice. *Neuron*, *54*(3), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.017>
- Coleman, M. P., & Höke, A. (2020). Programmed axon degeneration: from mouse to mechanism to medicine. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(4), 183–196. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0269-3>
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct

- mechanically activated cation channels. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>
- Cutting, J. E., & Garvin, J. J. (1987). Fractal curves and complexity. *Perception & Psychophysics*, 42(4), 365–370.
- Dawson, D. G., Ubels, J. L., & Edelhauser, H. F. (2011). Cornea and Sclera. In P. L. Kaufman, A. Alm, L. A. Levin, S. F. E. Nilsson, J. Ver Hoeve, & W. Samuel (Eds.), *Adler's Physiology of the Eye* (11th ed., pp. 71–130). Elsevier.
- De Felipe, C., & Belmonte, C. (1999). c-Jun expression after axotomy of corneal trigeminal ganglion neurons is dependent on the site of injury. *European Journal of Neuroscience*, 11(3), 899–906. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00498.x>
- De Felipe, C., Gonzalez, G. G., Gallar, J., & Belmonte, C. (1999). Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: Effect of corneal wounding. *European Journal of Pain*, 3(1), 31–39. [https://doi.org/10.1016/S1090-3801\(99\)90186-6](https://doi.org/10.1016/S1090-3801(99)90186-6)
- De la Monte, S. M., Federoff, H. J., Ng, S. C., Grabczyk, E., & Fishman, M. C. (1989). GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system. *Developmental Brain Research*, 46(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(89\)90279-4](https://doi.org/10.1016/0165-3806(89)90279-4)
- de la Peña, E., Mälkiä, A., Cabedo, H., Belmonte, C., & Viana, F. (2005). The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *Journal of Physiology*, 567(2), 415–426. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086546>
- de Leeuw, A. M., & Chan, K. Y. (1989). Corneal nerve regeneration. Correlation between morphology and restoration of sensitivity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 30(9), 1980–1990.
- DeFrancesco-Lisowitz, A., Lindborg, J. A., Niemi, J. P., & Zigmond, R. E. (2015). The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *Neuroscience*, 302, 174–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.027>
- DelMonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 37(3), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
- Dhaka, A., Earley, T. J., Watson, J., & Patapoutian, A. (2008). Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *Journal of Neuroscience*, 28(3), 566–575. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3976-07.2008>
- Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J., & Patapoutian, A. (2007). TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron*, 54(3), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.024>
- Di Ieva, A., Grizzi, F., Jelinek, H., Pellionisz, A. J., & Losa, G. A. (2014). Fractals in the neurosciences, part I: General principles and basic neurosciences. *Neuroscientist*, 20(4), 403–417. <https://doi.org/10.1177/1073858413513927>
- Di Scipio, F., Raimondo, S., Tos, P., & Geuna, S. (2008). A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation. *Microscopy Research and Technique*, 71(7), 497–502. <https://doi.org/10.1002/jemt.20577>

- Di Stefano, M., Loreto, A., Orsomando, G., Mori, V., Zamporlini, F., Hulse, R. P., Webster, J., Donaldson, L. F., Gering, M., Raffaelli, N., Coleman, M. P., Gilley, J., & Conforti, L. (2017). NMN Deamidase Delays Wallerian Degeneration and Rescues Axonal Defects Caused by NMNAT2 Deficiency In Vivo. *Current Biology*, 27(6), 784–794. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.070>
- Dohlman, C. H. (1971). The function of the corneal epithelium in health and disease. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Investigative Ophthalmology*, 10(6), 383–407.
- Dvorscak, L., & Marfurt, C. F. (2008). Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(3), 910–916. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1324>
- Elkington, L., Adhikari, P., & Pradhan, P. (2022). Fractal Dimension Analysis to Detect the Progress of Cancer Using Transmission Optical Microscopy. *Biophysica*, 2(1), 59–69. <https://doi.org/10.3390/biophysica2010005>
- Eriksson, J., Bongenhielm, U., Kidd, E., Matthews, B., & Fried, K. (1998). Distribution of P2X3 receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury. *Neuroscience Letters*, 254(1), 37–40. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00656-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00656-9)
- Ertürk, A., Hellal, F., Enes, J., & Bradke, F. (2007). Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *Journal of Neuroscience*, 27(34), 9169–9180. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0612-07.2007>
- Espana, E. M., & Birk, D. E. (2020). Composition, structure and function of the corneal stroma. *Experimental Eye Research*, 198(July), 108137. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108137>
- Essuman, K., Summers, D. W., Sasaki, Y., Mao, X., DiAntonio, A., & Milbrandt, J. (2017). The SARM1 Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Possesses Intrinsic NAD<sup>+</sup> Cleavage Activity that Promotes Pathological Axonal Degeneration. *Neuron*, 93(6), 1334–1343.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.022>
- Fabiani, C., Barabino, S., Rashid, S., & Dana, M. R. (2009). Corneal epithelial proliferation and thickness in a mouse model of dry eye. *Experimental Eye Research*, 89(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.03.003>
- Falconer, K. J. (1997). *Techniques in fractal geometry*. Wiley.
- Falconer, K. J. (2003). The local structure of random processes. *Journal of the London Mathematical Society*, 67(3), 657–672.
- Farrar, M. J., Bernstein, I. M., Schlafer, D. H., Cleland, T. A., Fetcho, J. R., & Schaffer, C. B. (2012). Chronic in vivo imaging in the mouse spinal cord using an implanted chamber. *Nature Methods*, 9(3), 297–302. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1856>
- Feneck, E. M., Lewis, P. N., & Meek, K. M. (2020). Identification of a primary stroma and novel endothelial cell projections in the developing human cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 61(6). <https://doi.org/10.1167/IOVS.61.6.5>
- Fenrich, K. K., Weber, P., Hocine, M., Zalc, M., Rougon, G., & Debarbieux, F. (2012). Long-term in vivo imaging of normal and pathological mouse spinal cord with subcellular resolution using implanted glass windows. *Journal of Physiology*, 590(16), 3665–3675. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230532>

- Fernández-Trillo, J., Florez-Paz, D., Íñigo-Portugués, A., González-González, O., del Campo, A. G., González, A., Viana, F., Belmonte, C., & Gomis, A. (2020). Piezo2 mediates low-threshold mechanically evoked pain in the cornea. *Journal of Neuroscience*, *40*(47), 8976–8993. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0247-20.2020>
- Figley, S. A., Chen, Y., Maeda, A., Conroy, L., McMullen, J. D., Silver, J. I., Stapleton, S., Vitkin, A., Lindsay, P., Burrell, K., Zadeh, G., Fehlings, M. G., & DaCosta, R. S. (2013). A Spinal Cord Window Chamber Model for In Vivo Longitudinal Multimodal Optical and Acoustic Imaging in a Murine Model. *PLoS ONE*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058081>
- Fitch, J. M., Birk, D. E., Linsenmayer, C., & Linsenmayer, T. F. (1990). The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *Journal of Cell Biology*, *110*(4), 1457–1468. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1457>
- Florez-Paz, D., Bali, K. K., Kuner, R., & Gomis, A. (2016). A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons. *Scientific Reports*, *6*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep25923>
- Frutos-Rincón, L., Gómez-Sánchez, J. A., Íñigo-Portugués, A., Carmen Acosta, M., & Gallar, J. (2022). An Experimental Model of Neuro-Immune Interactions in the Eye: Corneal Sensory Nerves and Resident Dendritic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms23062997>
- Gallar, J., Pozo, M. A., Tuckett, R. P., & Belmonte, C. (1993). Response of Sensory Units With Unmyelinated Fibres. *Journal of Physiology*, *468*, 609–622.
- Gao, N., Yan, C., Lee, P., Sun, H., & Yu, F. S. (2016). Dendritic cell dysfunction and diabetic sensory neuropathy in the cornea. *Journal of Clinical Investigation*, *126*(5), 1998–2011. <https://doi.org/10.1172/JCI85097>
- Garcia-Hirschfeld, J., Lopez-Briones, L. G., & Belmonte, C. (1994). Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. In *Experimental Eye Research* (Vol. 59, Issue 5, pp. 597–605). <https://doi.org/10.1006/exer.1994.1145>
- Gaudet, A. D., Popovich, P. G., & Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 1–13.
- Geisler, S., Doan, R. A., Strickland, A., Huang, X., Milbrandt, J., & DiAntonio, A. (2016). Prevention of vincristine-induced peripheral neuropathy by genetic deletion of SARM1 in mice. *Brain*, *139*(12), 3092–3108. <https://doi.org/10.1093/brain/aww251>
- Geisler, S., Huang, S. X., Strickland, A., Doan, R. A., Summers, D. W., Mao, X., Park, J., DiAntonio, A., & Milbrandt, J. (2019). Gene therapy targeting SARM1 blocks pathological axon degeneration in mice. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(2), 294–303. <https://doi.org/10.1084/jem.20181040>
- Gerds, J., Brace, E. J., Sasaki, Y., DiAntonio, A., & Milbrandt, J. (2015). SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD<sup>+</sup> destruction. *Science*, *348*(6233), 453–457. <https://doi.org/10.1126/science.1258366>
- Gerds, J., Summers, D. W., Sasaki, Y., DiAntonio, A., & Milbrandt, J. (2013). Sarm1-mediated axon degeneration requires both SAM and TIR interactions. *Journal of Neuroscience*, *33*(33), 13569–13580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1197-13.2013>
- Geuna, S. (2015). The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *Journal of*

- Neuroscience Methods*, 243, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.01.021>
- Gilley, J., Orsomando, G., Nascimento-Ferreira, I., & Coleman, M. P. (2015). Absence of SARM1 rescues development and survival of NMNAT2-Deficient axons. *Cell Reports*, 10(12), 1975–1982. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.060>
- Goldstein, M. E., House, S. B., & Gainer, H. (1991). NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells. *Journal of Neuroscience Research*, 30(1), 92–104. <https://doi.org/10.1002/jnr.490300111>
- Goldstein, R. H., Barkai, O., Íñigo-Portugués, A., Katz, B., Lev, S., & Binshtok, A. M. (2019). Location and Plasticity of the Sodium Spike Initiation Zone in Nociceptive Terminals In Vivo. *Neuron*, 102(4), 801-812.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.005>
- Gomez, T. (2005). Channels for pathfinding. *Nature*, 434(7035), 835–837. <https://doi.org/10.1038/434835a>
- González-González, O., Bech, F., Gallar, J., Merayo-Llodes, J., & Belmonte, C. (2017). Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(1), 404–415. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20033>
- Gonzalez, D., & Allende, M. L. (2021). Current advances in comprehending dynamics of regenerating axons and axon–glia interactions after peripheral nerve injury in zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms22052484>
- Gordon, T. (2015). The Biology, Limits, and Promotion of Peripheral Nerve Regeneration in Rats and Humans. In *Nerves and Nerve Injuries* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802653-3.00110-X>
- Goswami, C., Dreger, M., Otto, H., Schwappach, B., & Hucho, F. (2006). Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *Journal of Neurochemistry*, 96(1), 254–266. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03551.x>
- Goswami, C., & Hucho, T. (2007). TRPV1 expression-dependent initiation and regulation of filopodia. *Journal of Neurochemistry*, 103(4), 1319–1333. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04846.x>
- Guerrero-Moreno, A., Baudouin, C., Melik Parsadaniantz, S., & Réaux-Le Goazigo, A. (2020). Morphological and Functional Changes of Corneal Nerves and Their Contribution to Peripheral and Central Sensory Abnormalities. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.610342>
- Gumy, L. F., Tan, C. L., & Fawcett, J. W. (2010). The role of local protein synthesis and degradation in axon regeneration. *Experimental Neurology*, 223(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.004>
- Guthoff, R. F., Wienss, H., Hahnel, C., & Wree, A. (2005). Epithelial Innervation of Human Cornea. *Cornea*, 24(5), 608–613. <https://doi.org/10.1097/01.ico.0000154384.05614.8f>
- Hahnel, C., Somodi, S., Weiss, D. G., & Guthoff, R. F. (2000). The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*, 19(2), 185–193. <https://doi.org/10.1097/00003226-200003000-00012>

- Hameed, S. (2019). Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Molecular Pain*, 15. <https://doi.org/10.1177/1744806919858801>
- Han, H. M., Kim, T. H., Bae, J. Y., & Bae, Y. C. (2019). Primary sensory neurons expressing tropomyosin receptor kinase A in the rat trigeminal ganglion. *Neuroscience Letters*, 690(October 2018), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.009>
- Hanna, C., Bicknell, D. S., & O'brien, J. E. (1961). Cell Turnover in the Adult Human Eye. *Archives of Ophthalmology*, 65(5), 695–698. <https://doi.org/10.1001/archopht.1961.01840020697016>
- Hanna, C., & O'brien, J. E. (1960). Cell Production and Migration in the Epithelial Layer of the Cornea. *Archives of Ophthalmology*, 64(4), 536–539. <https://doi.org/10.1001/archopht.1960.01840010538009>
- Harris, L. W., & Purves, D. (1989). Rapid remodeling of sensory endings in the corneas of living mice. *Journal of Neuroscience*, 9(6), 2210–2214. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-06-02210.1989>
- Hayashi, S., Osawa, T., & Tohyama, K. (2002). Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *Journal of Morphology*, 254(3), 247–258. <https://doi.org/10.1002/jmor.10030>
- He, J., & Bazan, H. E. P. (2012). Mapping the nerve architecture of diabetic human corneas. *Ophthalmology*, 119(5), 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.10.036>
- He, J., Bazan, N. G., & Bazan, H. E. P. (2010). Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Experimental Eye Research*, 91(4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.07.007>
- He, J., Pham, T. L., & Bazan, H. E. P. (2019). Mapping the entire nerve architecture of the cat cornea. *Veterinary Ophthalmology*, 22(3), 345–352. <https://doi.org/10.1111/vop.12600>
- He, J., Pham, T. L., & Bazan, H. E. P. (2021). Neuroanatomy and neurochemistry of rat cornea: Changes with age. *Ocular Surface*, 20(July 2020), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.11.005>
- Hemmavanh, C., Koch, M., Birk, D. E., & Espana, E. M. (2013). Abnormal corneal endothelial maturation in collagen XII and XIV Null mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(5), 3297–3308. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11456>
- Henriksson, J. T., McDermott, A. M., & Bergmanson, J. P. G. (2009). Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(8), 3648–3654. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2941>
- Hensel, H., & Zotterman, Y. (1951). The response of the cold receptors to constant cooling. *Acta Physiologica Scandinavica*, 22(2–3), 96–105. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00758.x>
- Hirata, H., Fried, N., & Oshinsky, M. L. (2012). Quantitative characterization reveals three types of dry-sensitive corneal afferents: Pattern of discharge, receptive field, and thermal and chemical sensitivity. *Journal of Neurophysiology*, 108(9), 2481–2493. <https://doi.org/10.1152/jn.00523.2012>
- Hirata, H., & Meng, I. D. (2010). Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of

- ocular stimuli central to tear production: Implications for dry eye disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(8), 3969–3976. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4744>
- Hossain, P., Sachdev, A., & Malik, R. A. (2005). Early detection of diabetic peripheral neuropathy with corneal confocal microscopy. *Lancet*, 366(9494), 1340–1343. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67546-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67546-0)
- Hucho, T., & Levine, J. D. (2007). Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. *Neuron*, 55(3), 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.008>
- Hunt, S. P., & Mantyh, P. W. (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(2), 83–91.
- Ivanusic, J. J., Wood, R. J., & Brock, J. A. (2013). Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 521(4), 877–893. <https://doi.org/10.1002/cne.23207>
- Jeang, L., Cha, B. J., Birk, D. E., & Espana, E. M. (2020). Endothelial–Stromal Communication in Murine and Human Corneas. *Anatomical Record*, 303(6), 1717–1726. <https://doi.org/10.1002/ar.24393>
- Jung, H., Yoon, B. C., & Holt, C. E. (2012). Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(5), 308–324. <https://doi.org/10.1038/nrn3210>
- Kerschensteiner, M., Schwab, M. E., Lichtman, J. W., & Misgeld, T. (2005). In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nature Medicine*, 11(5), 572–577. <https://doi.org/10.1038/nm1229>
- Ketschek, A., Holland, S. M., & Gallo, G. (2022). SARM1 Suppresses Axon Branching Through Attenuation of Axonal Cytoskeletal Dynamics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.726962>
- Kim, Y., Zhou, P., Qian, L., Chuang, J. Z., Lee, J., Li, C., Iadecola, C., Nathan, C., & Ding, A. (2007). MyD88-5 links mitochondria, microtubules, and JNK3 in neurons and regulates neuronal survival. *Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2063–2074. <https://doi.org/10.1084/jem.20070868>
- Klyce, S. D. (2020). 12. Endothelial pump and barrier function. *Experimental Eye Research*, 198(July), 108068. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108068>
- Knowlton, W. M., Palkar, R., Lippoldt, E. K., McCoy, D. D., Baluch, F., Chen, J., & McKemy, D. D. (2013). A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *Journal of Neuroscience*, 33(7), 2837–2848. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1943-12.2013>
- Kobayashi, K., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Tokunaga, A., & Noguchi, K. (2005). Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 481(4), 377–390. <https://doi.org/10.1002/cne.20393>
- Kovács, I., Luna, C., Quirce, S., Mizerska, K., Callejo, G., Riestra, A., Fernández-Sánchez, L., Meseguer, V. M., Cuenca, N., Merayo-Llodes, J., Acosta, M. C., Gasull, X., Belmonte, C., & Gallar, J. (2016). Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain*, 157(2), 399–417. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000455>

- Kowtharapu, B. S., & Stachs, O. (2020). Corneal Cells: Fine-tuning Nerve Regeneration. *Current Eye Research*, 45(3), 291–302. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1675175>
- Kurose, M., & Meng, I. D. (2013). Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *Journal of Neurophysiology*, 110(2), 495–504. <https://doi.org/10.1152/jn.00222.2013>
- Launay, P. S., Godefroy, D., Khabou, H., Rostene, W., Sahel, J. A., Baudouin, C., Melik Parsadaniantz, S., & Reaux-Le Goazigo, A. (2015). Combined 3DISCO clearing method, retrograde tracer and ultramicroscopy to map corneal neurons in a whole adult mouse trigeminal ganglion. *Experimental Eye Research*, 139, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.008>
- LaVail, J. H., Johnson, W. E., & Spencer, L. C. (1993). Immunohistochemical identification of trigeminal ganglion neurons that innervate the mouse cornea: Relevance to intercellular spread of herpes simplex virus. *Journal of Comparative Neurology*, 327(1), 133–140. <https://doi.org/10.1002/cne.903270111>
- Lawson, B. Y. S. N., & Waddell, P. J. (1991). *Sciences, University*. 41–63.
- Ledbetter, E. C., & Scarlett, J. M. (2009). In vivo confocal microscopy of the normal equine cornea and limbus. *Veterinary Ophthalmology*, 12(SUPPL. 1), 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00730.x>
- Leipold, E., Liebmann, L., Korenke, G. C., Heinrich, T., Gießelmann, S., Baets, J., Ebbinghaus, M., Goral, R. O., Stöddberg, T., Hennings, J. C., Bergmann, M., Altmüller, J., Thiele, H., Wetzel, A., Nürnberg, P., Timmerman, V., De Jonghe, P., Blum, R., Schaible, H.-G., ... Kurth, I. (2013). A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nature Genetics*, 45(11), 1399–1404. <https://doi.org/10.1038/ng.2767>
- Lennon, F. E., Cianci, G. C., Cipriani, N. A., Hensing, T. A., Zhang, H. J., Chen, C.-T., Murgu, S. D., Vokes, E. E., Vannier, M. W., & Salgia, R. (2015). Lung cancer—a fractal viewpoint HHS Public Access. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(11), 664–675. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.108.Lung>
- Li, C., & Lee, C. K. (1993). Minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition*, 26(4), 617–625. [https://doi.org/10.1016/0031-3203\(93\)90115-D](https://doi.org/10.1016/0031-3203(93)90115-D)
- Li, C., & Tam, P. K. S. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters*, 19(8), 771–776. [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(98)00057-9)
- Li, H. F., Petroll, W. M., Møller-Pedersen, T., Maurer, J. K., Cavanagh, H. D., & Jester, J. V. (1997). Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Current Eye Research*, 16(3), 214–221. <https://doi.org/10.1076/ceyr.16.3.214.15412>
- Li, Y., Jin, Y. C., Cul, K., Li, N., Zheng, Z. Y., Wang, Y. Z., & Yuan, X. B. (2005). Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 434(7035), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature03477>
- Ljubimov, A. V., Burgeson, R. E., Butkowski, R. J., Couchman, J. R., Wu, R. R., Ninomiya, Y., Sado, Y., Maguen, E., Nesburn, A. B., & Kenney, M. C. (1996). Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 37(6), 997–1007.

- López de Armentia, M., Cabanes, C., & Belmonte, C. (2000). Electrophysiological properties of identified trigeminal ganglion neurons innervating the cornea of the mouse. *Neuroscience*, *101*(4), 1109–1115. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00440-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00440-1)
- Lorenzana, A. O., Lee, J. K., Mui, M., Chang, A., & Zheng, B. (2015). A Surviving Intact Branch Stabilizes Remaining Axon Architecture after Injury as Revealed by InVivo Imaging in the Mouse Spinal Cord. *Neuron*, *86*(4), 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.061>
- Lunn, E. R., Perry, V. H., Brown, M. C., Rosen, H., & Gordon, S. (1989). Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *European Journal of Neuroscience*, *1*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1989.tb00771.x>
- Ma, T. C., & Willis, D. E. (2015). What makes a RAG regeneration associated? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*(AUGUST), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00043>
- MacIver, M. B., & Tanelian, D. L. (1993). Free nerve ending terminal morphology is fiber type specific for A $\delta$  and C fibers innervating rabbit corneal epithelium. *Journal of Neurophysiology*, *69*(5), 1779–1783. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.69.5.1779>
- Madrid, R., De La Peña, E., Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C., & Viana, F. (2009). Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *Journal of Neuroscience*, *29*(10), 3120–3131. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4778-08.2009>
- Mandelbrot, B. B. (1967). How Long Is the Coast of Britain? Statistical Self-Similarity and Fractional Dimension. *Science*, *156*(3775), 636–638.
- Mandelbrot, B. B. (1982). *The fractal geometry of nature* (Vol. 1). WH freeman New York.
- Marchant, J. K., Zhang, G., & Birk, D. E. (2002). Association of Type XII Collagen with Regions of Increased Stability and Keratocyte Density in the Cornea. *Experimental Eye Research*, *75*(6), 683–694. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/exer.2002.2058>
- Marfurt, C. F., Anokwute, M. C., Fetcko, K., Mahony-Perez, E., Farooq, H., Ross, E., Baumanis, M. M., Weinberg, R. L., McCarron, M. E., & Mankowski, J. L. (2019). Comparative anatomy of the mammalian corneal subbasal nerve plexus. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *60*(15), 4972–4984. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-28519>
- Marfurt, C. F., Cox, J., Deek, S., & Dvorscak, L. (2010). Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental Eye Research*, *90*(4), 478–492. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.12.010>
- Marfurt, C. F., & Del Toro, D. R. (1987). *Marfurt\_et\_al-1987-Journal\_of\_Comparative\_Neurology*. *459*, 450–459.
- Marfurt, C. F., & Ellis, L. C. (1993). Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *Journal of Comparative Neurology*, *336*(4), 517–531. <https://doi.org/10.1002/cne.903360405>
- Marfurt, C. F., Jones, M. A., & Thrasher, K. (1998). Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Experimental Eye Research*, *66*(4), 437–448. <https://doi.org/10.1006/exer.1997.0445>
- Marfurt, C. F., Kingsley, R. E., & Echtenkamp, S. E. (1989). Sensory and sympathetic

- innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 30(3), 461–472.
- Marfurt, C. F., Murphy, C. J., & Florczak, J. L. (2001). Morphology and neurochemistry of canine corneal innervation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(10), 2242–2251.
- Martin, R. E., & Bazan, N. G. (1992). Growth-associated protein GAP-43 and nerve cell adhesion molecule in sensory nerves of cornea. *Experimental Eye Research*, 55(2), 307–314. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(92\)90195-X](https://doi.org/10.1016/0014-4835(92)90195-X)
- Martin, S. M., O'Brien, G. S., Portera-Cailliau, C., & Sagasti, A. (2010). Wallerian degeneration of zebrafish trigeminal axons in the skin is required for regeneration and developmental pruning. *Development*, 137(23), 3985–3994. <https://doi.org/10.1242/dev.053611>
- Mathers, W. D., & Lemp, M. A. (1992). Morphology and movement of corneal surface cells in humans. *Current Eye Research*, 11(6), 517–523. <https://doi.org/10.3109/02713689209001807>
- May, C. A. (1997). Description and function of the ciliary nerves--some historical remarks on choroidal innervation. *Experimental Eye Research*, 65(1), 1–5. <https://doi.org/10.1006/exer.1997.0312>
- McCoy, E. S., Taylor-Blake, B., Street, S. E., Pribisko, A. L., Zheng, J., & Zylka, M. J. (2013). Peptidergic CGRP $\alpha$  Primary Sensory Neurons Encode Heat and Itch and Tonicity Suppress Sensitivity to Cold. *Neuron*, 78(1), 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.030>
- McKay, T. B., Seyed-Razavi, Y., Ghezzi, C. E., Dieckmann, G., Nieland, T. J. F., Cairns, D. M., Pollard, R. E., Hamrah, P., & Kaplan, D. L. (2019). Corneal pain and experimental model development. *Progress in Retinal and Eye Research*, 71(March 2018), 88–113. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.11.005>
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>
- Mckenna, C. C., & Lwigale, P. Y. (2011). Innervation of the mouse cornea during development. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(1), 30–35. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5902>
- Medeiros, C. S., & Santhiago, M. R. (2020). Corneal nerves anatomy, function, injury and regeneration. *Experimental Eye Research*, 200(June), 108243. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108243>
- Meseguer, V., Alpizar, Y. A., Luis, E., Tajada, S., Denlinger, B., Fajardo, O., Manenschijn, J.-A., Fernández-Peña, C., Talavera, A., Kichko, T., Navia, B., Sánchez, A., Señarís, R., Reeh, P., Pérez-García, M. T., López-López, J. R., Voets, T., Belmonte, C., Talavera, K., & Viana, F. (2014). TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nature Communications*, 5(1), 3125. <https://doi.org/10.1038/ncomms4125>
- Messlinger, K. (1996). The Polymodal Pathological Pain Receptor—A Gateway to Pathological Pain. *Progress in Brain Research*, 113, 273–298. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308610948>

- Michaelis, M. (1996). Silent afferents: A separate class of primary afferents? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 23(2), 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb02579.x>
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J. L., Bayliss, D. A., & Viana, F. (2014). Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation. *Cell Reports*, 8(5), 1571–1582. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.003>
- Morgan, C., DeGroat, W. C., & Jannetta, P. J. (1987). Sympathetic innervation of the cornea from the superior cervical ganglion. An HRP study in the cat. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 20(2), 179–183. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(87\)90115-9](https://doi.org/10.1016/0165-1838(87)90115-9)
- Morgan, Nadelhaft, I., & de Groat, W. C. (1978). Anatomical localization of corneal afferent cells in the trigeminal ganglion. *Neurosurgery*, 2(3), 252–258. <https://doi.org/10.1227/00006123-197805000-00012>
- Müller, L. J., Marfurt, C. F., Kruse, F., & Tervo, T. M. T. (2003). Corneal nerves: Structure, contents and function. *Experimental Eye Research*, 76(5), 521–542. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00050-2)
- Müller, L. J., Pels, L., De Wolf, A., Kliffen, M., & Vrensen, G. F. J. M. (1996). Ultrastructural analysis of human corneal nerves. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 37(3).
- Murthy, S. E., Loud, M. C., Daou, I., Marshall, K. L., Schwaller, F., Kühnemund, J., Francisco, A. G., Keenan, W. T., Dubin, A. E., Lewin, G. R., & Patapoutian, A. (2018). The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Science Translational Medicine*, 10(462). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat9897>
- Naeini, R. S., Witty, M. F., Séguéla, P., & Bourque, C. W. (2006). An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nature Neuroscience*, 9(1), 93–98. <https://doi.org/10.1038/nn1614>
- Nagasaki, T., & Zhao, J. (2003). Centripetal movement of corneal epithelial cells in the normal adult mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(2), 558–566. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0705>
- Namavari, A., Chaudhary, S., Sarkar, J., Yco, L., Patel, K., Han, K. Y., Yue, B. Y., Chang, J. H., & Jain, S. (2011). In vivo serial imaging of regenerating corneal nerves after surgical transection in transgenic thy1-YFP mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(11), 8025–8032. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8332>
- Nguyen, M. Q., Wu, Y., Bonilla, L. S., von Buchholtz, L. J., & Ryba, N. J. P. (2017). Diversity amongst trigeminal neurons revealed by high throughput single cell sequencing. *PLoS ONE*, 12(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0185543>
- O'Brien, G. S., Martin, S. M., Söllner, C., Wright, G. J., Becker, C. G., Portera-Cailliau, C., & Sagasti, A. (2009). Developmentally Regulated Impediments to Skin Reinnervation by Injured Peripheral Sensory Axon Terminals. *Current Biology*, 19(24), 2086–2090. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.051>
- Olivares, E., Salgado, S., Maidana, J. P., Herrera, G., Campos, M., Madrid, R., & Orio, P. (2015). TRPM8-dependent dynamic response in a mathematical model of cold thermoreceptor. *PLoS ONE*, 10(10), 1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139314>

- Orio, P., Parra, A., Madrid, R., González, O., Belmonte, C., & Viana, F. (2012). Role of Ih in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings. *Journal of Neurophysiology*, *108*(11), 3009–3023. <https://doi.org/10.1152/jn.01033.2011>
- Osterloh, J. M., Yang, J., Rooney, T. M., Fox, A. N., Adalbert, R., Powell, E. H., Sheehan, A. E., Avery, M. A., Hackett, R., Logan, M. A., MacDonald, J. M., Ziegenfuss, J. S., Milde, S., Hou, Y. J., Nathan, C., Ding, A., Brown, R. H., Conforti, L., Coleman, M., ... Freeman, M. R. (2012). dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. *Science*, *337*(6093), 481–484. <https://doi.org/10.1126/science.1223899>
- Oyster, C. W. (1999). *The human eye : structure and function*. Sunderland (Mass.) : Sinauer associates. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:001042610>
- Pajooohesh-Ganji, A., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., Kyne, B. M., Saban, D. R., & Stepp, M. A. (2015). Partial denervation of sub-basal axons persists following debridement wounds to the mouse cornea. *Laboratory Investigation*, *95*(11), 1305–1318. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.113>
- 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*(8), 1481–1491. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.04.025>
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., Del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M. C., Gallar, J., Dhaka, A., Viana, F., & Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature Medicine*, *16*(12), 1396–1399. <https://doi.org/10.1038/nm.2264>
- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., & Viswanath, V. (2003). Thermotrmp channels and beyond: Mechanisms of temperature sensation. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrn1141>
- Patel, D. V., & McGhee, C. N. J. (2005). Mapping of the normal human corneal sub-basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*(12), 4485–4488. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0794>
- Patel, D. V., & McGhee, C. N. J. (2008). In vivo laser scanning confocal microscopy confirms that the human corneal sub-basal nerve plexus is a highly dynamic structure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *49*(8), 3409–3412. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1951>
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, *108*(5), 705–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)
- Persson, A. K., Black, J. A., Gasser, A., Cheng, X., Fischer, T. Z., & Waxman, S. G. (2010). Sodium-calcium exchanger and multiple sodium channel isoforms in intra-epidermal nerve terminals. *Molecular Pain*, *6*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-84>
- Petropoulos, I. N., Al-Mohammed, A., Chen, X., Ferdousi, M., Ponirakis, G., Kemp, H., Chopra, R., Hau, S., Schargus, M., Vollert, J., Sturm, D., Bharani, T., Kleinschnitz, C., Stettner, M., Peto, T., Maier, C., Rice, A. S. C., & Malik, R. A. (2020). The utility of corneal nerve fractal dimension analysis in peripheral neuropathies of different etiology. *Translational Vision Science and Technology*, *9*(9), 1–9. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.9.43>

- Pfister, B. J., Gordon, T., Loverde, J. R., Kochar, A. S., Mackinnon, S. E., & Cullen, D. K. (2011). Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: surgical applications, state of the art, and future challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 39(2), 81–124. <https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v39.i2.20>
- Piña, R., Ugarte, G., Campos, M. M., Inigo-Portugues, A., Olivares, E., Orio, P., Belmonte, C., Bacigalupo, J., Madrid, R., Piña, R., Ugarte, G., Campos, M. M., Íñigo-Portugués, A., Olivares, E., Orio, P., Belmonte, C., Bacigalupo, J., Madrid, R., Pina, R., ... Madrid, R. (2019). Role of trpm8 channels in altered cold sensitivity of corneal primary sensory neurons induced by axonal damage. *Journal of Neuroscience*, 39(41), 8177–8192. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-19.2019>
- Prato, V., Taberner, F. J., Hockley, J. R. F., Callejo, G., Arcourt, A., Tazir, B., Hammer, L., Schad, P., Heppenstall, P. A., Smith, E. S., & Lechner, S. G. (2017). Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive “Silent” Nociceptors. *Cell Reports*, 21(11), 3102–3115. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.066>
- Premkumar, L. S. (2011). *Methods Used for Studying TRP Channel Functions in Sensory Neurons*. (M. X. Zhu (ed.)).
- Preparata, F. P., & Shamos, M. I. (1985). *Computational Geometry: An Introduction*. Springer, Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1098-6>
- Quallo, T., Vastani, N., Horridge, E., Gentry, C., Parra, A., Moss, S., Viana, F., Belmonte, C., Andersson, D. A., & Bevan, S. (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature Communications*, 6(May), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms8150>
- Rae, M. G., Rowan, E. G., & Kennedy, C. (1998). Pharmacological properties of P2X3-receptors present in neurones of the rat dorsal root ganglia. *British Journal of Pharmacology*, 124(1), 176–180. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701803>
- Ramer, M. S., Bradbury, E. J., & McMahon, S. B. (2001). Nerve growth factor induces P2X3 expression in sensory neurons. *Journal of Neurochemistry*, 77(3), 864–875. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00288.x>
- Ramon y Cajal, S. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. In *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Clarendon Press.
- Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology*, 68(2), 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
- Ranade, S. S., Woo, S., Dubin, A. E., Moshourab, R. a, Wetzell, C., Petrus, M., Mathur, J., Bégay, V., Coste, B., Mainquist, J., Wilson, a J., Francisco, A. G., Reddy, K., Qiu, Z., Wood, N., Lewin, G. R., & Patapoutian, A. (2014). Sensation in Mice. *Nature*, 516(7529), 121–125. <https://doi.org/10.1038/nature13980>
- Reichard, M., Hovakimyan, M., Guthoff, R. F., & Stachs, O. (2014). In vivo visualisation of murine corneal nerve fibre regeneration in response to ciliary neurotrophic factor. *Experimental Eye Research*, 120, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.12.015>
- 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. *Current Eye Research*, 35(12), 1072–1080. <https://doi.org/10.3109/02713683.2010.513796>

- Ren, H., & Wilson, G. (1996). The cell shedding rate of the corneal epithelium -a comparison of collection methods. *Current Eye Research*, 15(10), 1054–1059. <https://doi.org/10.3109/02713689609017655>
- Rexed, B., & Rexed, U. (1950). *DEGENERATION AND REGENERATION OF CORNEAL NERVES \* certain diseases of the cornea and the condition of the corneal and herpes zoster ophthalmicus are known to be dependent on nerves , an exact knowledge of the normal corneal innervation and of the reaction.* 38–49.
- Rishal, I., & Fainzilber, M. (2010). Retrograde signaling in axonal regeneration. *Experimental Neurology*, 223(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.010>
- Robertson, S. J., Rae, M. G., Rowan, E. G., & Kennedy, C. (1996). Characterization of a P(2X)-purinoceptor in cultured neurones of the rat dorsal root ganglia. *British Journal of Pharmacology*, 118(4), 951–956. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15491.x>
- Romano, M. R., Biagioni, F., Carrizzo, A., Lorusso, M., Spadaro, A., Micelli Ferrari, T., Vecchione, C., Zurria, M., Marrazzo, G., Mascio, G., Sacchetti, B., Madonna, M., Fornai, F., Nicoletti, F., & Lograno, M. D. (2014). Effects of vitamin B12 on the corneal nerve regeneration in rats. *Experimental Eye Research*, 120, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.017>
- Rosenberg, A. F., Wolman, M. A., Franzini-Armstrong, C., & Granato, M. (2012). In vivo nerve-macrophage interactions following peripheral nerve injury. *Journal of Neuroscience*, 32(11), 3898–3909. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5225-11.2012>
- Rossi, F., Gianola, S., & Corvetti, L. (2007). Regulation of intrinsic neuronal properties for axon growth and regeneration. *Progress in Neurobiology*, 81(1), 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.12.001>
- Rózsa, A. J., & Beuerman, R. W. (1982). Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*, 14(2), 105–120. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(82\)90092-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(82)90092-6)
- Rozsa, A. J., Guss, R. B., & Beuerman, R. W. (1983). Neural remodelling following experimental surgery of the rabbit cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 24(8), 1033–1051.
- Rüfer, F., Schröder, A., & Erb, C. (2005). White-to-White Corneal Diameter. *Cornea*, 24(3), 259–261. <https://doi.org/10.1097/01.ico.0000148312.01805.53>
- Sawada, H., Konomi, H., & Hirosawa, K. (1990). Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen. *The Journal of Cell Biology*, 110(1), 219–227. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.1.219>
- Schaffran, B., Hilton, B. J., & Bradke, F. (2019). Imaging in vivo dynamics of sensory axon responses to CNS injury. *Experimental Neurology*, 317(November 2018), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.02.010>
- Scheib, J., & Höke, A. (2013). Advances in peripheral nerve regeneration. *Nature Reviews Neurology*, 9(12), 668–676. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2013.227>
- Schimmelpfennig, B. (1982). Nerve structures in human central corneal epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 218(1), 14–20. <https://doi.org/10.1007/BF02134093>

- Schneider, E. R., Mastrotto, M., Laursen, W. J., Schulz, V. P., Goodman, J. B., Funk, O. H., Gallagher, P. G., Gracheva, E. O., & Bagriantsev, S. N. (2014). Neuronal mechanism for acute mechanosensitivity in tactile-foraging waterfowl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(41), 14941–14946. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413656111>
- Seyed-Razavi, Y., Chinnery, H. R., & McMenamin, P. G. (2014). A novel association between resident tissue macrophages and nerves in the peripheral stroma of the murine cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *55*(3), 1313–1320. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12995>
- Shaheen, B. S., Bakir, M., & Jain, S. (2014). Corneal nerves in health and disease. *Survey of Ophthalmology*, *59*(3), 263–285. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.09.002>
- Silverman, J. D., & Kruger, L. (1988). Lectin and neuropeptide labeling of separate populations of dorsal root ganglion neurons and associated “nociceptor” thin axons in rat testis and cornea whole-mount preparations. *Somatosensory & Motor Research*, *5*(3), 259–267. <https://doi.org/10.3109/07367228809144630>
- Silverman, J. D., & Kruger, L. (1990). Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *Journal of Neurocytology*, *19*(5), 789–801. <https://doi.org/10.1007/BF01188046>
- Sinis, N., Kraus, A., Tselis, N., Haerle, M., Werdin, F., & Schaller, H.-E. (2009). Functional recovery after implantation of artificial nerve grafts in the rat- a systematic review. *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury*, *4*, 19. <https://doi.org/10.1186/1749-7221-4-19>
- Smith, J. H., Rowland, C., Harland, B., Moslehi, S., Montgomery, R. D., Schobert, K., Watterson, W. J., Dalrymple-Alford, J., & Taylor, R. P. (2021). How neurons exploit fractal geometry to optimize their network connectivity. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81421-2>
- Song, Y., Li, D., Farrelly, O., Miles, L., Li, F., Kim, S. E., Lo, T. Y., Wang, F., Li, T., Thompson-Peer, K. L., Gong, J., Murthy, S. E., Coste, B., Yakubovich, N., Patapoutian, A., Xiang, Y., Rompolas, P., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2019). The Mechanosensitive Ion Channel Piezo Inhibits Axon Regeneration. *Neuron*, *102*(2), 373–389.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.050>
- Southgate, H. N., Wijnberg, K. M., Larson, M., Capobianco, M., & Jansen, H. (2003). Analysis of Field Data of Coastal Morphological Evolution over Yearly and Decadal Timescales. Part 2: Non-Linear Techniques. *Journal of Coastal Research*, *19*(4), 776–789.
- Stepp, M. A., Tadvalkar, G., Hakh, R., & Pal-Ghosh, S. (2017). Corneal epithelial cells function as surrogate Schwann cells for their sensory nerves. *Glia*, *65*(6), 851–863. <https://doi.org/10.1002/glia.23102>
- Stucky, C. L., Dubin, A. E., Jeske, N. A., Malin, S. A., McKemy, D. D., & Story, G. M. (2009). Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Research Reviews*, *60*(1), 2–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.018>
- Szczot, M., Pogorzala, L. A., Solinski, H. J., Young, L., Yee, P., Le Pichon, C. E., Chesler, A. T., & Hoon, M. A. (2017). Cell-Type-Specific Splicing of Piezo2 Regulates Mechanotransduction. *Cell Reports*, *21*(10), 2760–2771. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.035>

- Takashima, Y., Daniels, R. L., Knowlton, W., Teng, J., Liman, E. R., & McKemy, D. D. (2007). Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(51), 14147–14157. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4578-07.2007>
- Takashima, Y., Ma, L., & McKemy, D. D. (2010). The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience*, 169(2), 828–842. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.039>
- Talavera, K., Nilius, B., & Voets, T. (2008). Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends in Neurosciences*, 31(6), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.03.002>
- Tanelian, D. L., & Beuerman, R. W. (1984). Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Experimental Neurology*, 84(1), 165–178. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(84\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0014-4886(84)90013-X)
- Teichert, R. W., Raghuraman, S., Memon, T., Cox, J. L., Foulkes, T., Rivier, J. E., & Olivera, B. M. (2012). Characterization of two neuronal subclasses through constellation pharmacology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12758–12763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209759109>
- Thoft, R., Friend, J., Jm, E., E, A., F, F., E, G., H, H., & G, V. (1983). The X , Y , Z Hypothesis of Comeol Epitheliol Mointenonce To the Editor : For the past few years , studies of corneal epithelial of corneal epithelial disease . Department of Ophthalmology. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24(October), 1442–1443.
- Tian, W., Czopka, T., & López-Schier, H. (2020). Systemic loss of Sarm1 protects Schwann cells from chemotoxicity by delaying axon degeneration. *Communications Biology*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0776-9>
- Tian, W., & López-Schier, H. (2020). Blocking Wallerian degeneration by loss of Sarm1 does not promote axon resealing in zebrafish. *MicroPublication Biology*, 2020. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000283>
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., & Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), 531–543. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4)
- Trabucchi, G., Brancato, R., Verdi, M., Carones, F., & Sala, C. (1994). Corneal nerve damage and regeneration after excimer laser photokeratectomy in rabbit eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 35(1), 229–235.
- Veiga Moreira, T. H., Gover, T. D., & Weinreich, D. (2007). Electrophysiological properties and chemosensitivity of acutely dissociated trigeminal somata innervating the cornea. *Neuroscience*, 148(3), 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.056>
- Viana, F., De la Peña, E., & Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nature Neuroscience*, 5(3), 254–260. <https://doi.org/10.1038/nn809>
- Vilceanu, D., & Stucky, C. L. (2010). TRPA1 Mediates Mechanical currents in the plasma membrane of Mouse Sensory Neurons. *PLoS ONE*, 5(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012177>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski,

- E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., ... Vázquez-Baeza, Y. (2020). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*, *17*(3), 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Voets, T., Owsianik, G., Janssens, A., Talavera, K., & Nilius, B. (2007). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nature Chemical Biology*, *3*(3), 174–182. <https://doi.org/10.1038/nchembio862>
- Vulchanova, L., Reidl, M. S., Shuster, S. J., Stone, L. S., Hargreaves, K. M., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A., & Elde, R. (1998). P2X 3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *European Journal of Neuroscience*, *10*(11), 3470–3478. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00355.x>
- Vulchanova, L., Riedl, M. S., Shuster, S. J., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A., & Elde, R. (1997). Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology*, *36*(9), 1229–1242. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00126-3)
- Waller, A. (1851). Experiments on the Section of the Glosso-Pharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, *76*(189), 369–376.
- Wang, C., Fu, T., Xia, C., & Li, Z. (2012). Changes in mouse corneal epithelial innervation with age. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *53*(8), 5077–5084. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9704>
- Wang, G. X., & Poo, M. M. (2005). Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature*, *434*(7035), 898–904. <https://doi.org/10.1038/nature03478>
- Waxman, S. G., & Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience*, *17*(2), 153–163. <https://doi.org/10.1038/nn.3602>
- Whitear, M. (1960). An electron microscope study of the cornea in mice, with special reference to the innervation. *Journal of Anatomy*, *94*, 387–409. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13844416><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1244376>
- Wilson, S. E. (2020). Bowman's layer in the cornea- structure and function and regeneration. *Experimental Eye Research*, *195*, 108033. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108033>
- Wilson, S. E., He, Y. G., Weng, J., Li, Q., McDowall, A. W., Vital, M., & Chwang, E. L. (1996). Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Experimental Eye Research*, *62*(4), 325–338. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0038>
- Wilson, S. E., & Hong, J. W. (2000). Bowman's layer structure and function: Critical or dispensable to corneal function? A Hypothesis. *Cornea*, *19*(4), 417–420. <https://doi.org/10.1097/00003226-200007000-00001>
- Wolff, E., Bron, A. J., Tripathi, R. C., & Tripathi, B. J. (1997). *Wolff's anatomy of the eye and orbit* (8th ed., pp. 233–260). Chapman & Hall medical.

- Woo, S. H., Ranade, S., Weyer, A. D., Dubin, A. E., Baba, Y., Qiu, Z., Petrus, M., Miyamoto, T., Reddy, K., Lumpkin, E. A., Stucky, C. L., & Patapoutian, A. (2014). Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature*, *509*(7502), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature13251>
- Wood, M. D., Kemp, S. W. P., Weber, C., Borschel, G. H., & Gordon, T. (2011). Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, *193*(4), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.04.008>
- Wu, M., Downie, L. E., Grover, L. M., Moakes, R. J. A., Rauz, S., Logan, A., Jiao, H., Hill, L. J., & Chinnery, H. R. (2020). The neuroregenerative effects of topical decorin on the injured mouse cornea. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01812-6>
- Xiao, Y., Faucherre, A., Pola-Morell, L., Heddleston, J. M., Liu, T. L., Chew, T. L., Sato, F., Sehara-Fujisawa, A., Kawakami, K., & López-Schier, H. (2015). High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *8*(6), 553–564. <https://doi.org/10.1242/dmm.018184>
- Xue, Y., He, J., Xiao, C., Guo, Y., Fu, T., Liu, J., Lin, C., Wu, M., Yang, Y., Dong, D., Pan, H., Xia, C., Ren, L., & Li, Z. (2018). The mouse autonomic nervous system modulates inflammation and epithelial renewal after corneal abrasion through the activation of distinct local macrophages. *Mucosal Immunology*, *11*(5), 1496–1511. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0031-6>
- Ylera, B., Ertürk, A., Hellal, F., Nadrigny, F., Hurtado, A., Tahirovic, S., Oudega, M., Kirchhoff, F., & Bradke, F. (2009). Chronically CNS-Injured Adult Sensory Neurons Gain Regenerative Competence upon a Lesion of Their Peripheral Axon. *Current Biology*, *19*(11), 930–936. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.017>
- Yu, C. Q., & Rosenblatt, M. I. (2007). Transgenic corneal neurofluorescence in mice: A new model for in vivo investigation of nerve structure and regeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *48*(4), 1535–1542. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1192>
- Yu, C. Q., Zhang, M., Matis, K. I., Kim, C., & Rosenblatt, M. I. (2008). Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*(9), 3870–3878. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1418>
- Zander, E., & Weddell, G. (1951). Observations on the innervation of the cornea. *Journal of Anatomy*, *85*(1), 68–99.
- Zheng, W., Nikolaev, Y. A., Gracheva, E. O., & Bagriantsev, S. N. (2019). Piezo2 integrates mechanical and thermal cues in vertebrate mechanoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(35), 17547–17555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910213116>
- Zhivotosky, B., & Orrenius, S. (2001). Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA. *Curr Protoc Cell Biol.*, *18*(3), 1–23.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C. M., Carr, R. W., Kobayashi, J. I., Nau, C., Wood, J. N., & Reeh, P. W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*, *447*(7146), 855–858. <https://doi.org/10.1038/nature05880>

**Anexo**

---

# Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice

Ignacio Alcalde<sup>1</sup>  | Almudena Íñigo-Portugués<sup>1,2</sup>  | Omar González-González<sup>1</sup> | Laura Almaraz<sup>2</sup> | Enol Artime<sup>1</sup> | Cruz Morenilla-Palao<sup>2</sup> | Juana Gallar<sup>2</sup>  | Félix Viana<sup>2</sup>  | Jesús Merayo-Lloves<sup>1</sup>  | 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 Ramon y Cajal, 2, 03550 San Juan de Alicante.  
Email: carlos.belmonte@umh.es

## Funding information

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Grant/Award Number: SAF2014-54518-C3-1-R, SAF2014-54518-C3-2-R, SAF2016-77233-R, SAF2017-83674-C2-1-R, SAF2017-83674-C2-2-R, SEV-2013-0317; Consejería de Economía y Empleo, Grant/Award Number: FC-15-GRUPIN14-141

## Abstract

Morphological and functional alterations of peripheral somatosensory neurons during the aging process lead to a decline of somatosensory perception. Here, we analyze the changes occurring with aging in trigeminal ganglion (TG), TRPM8-expressing cold thermoreceptor neurons innervating the mouse cornea, which participate in the regulation of basal tearing and blinking and have been implicated in the pathogenesis of dry eye disease (DED). TG cell bodies and axonal branches were examined in a mouse line (TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP) expressing a fluorescent reporter. In 3 months old animals, about 50% of TG cold thermoreceptor neurons were intensely fluorescent, likely providing strongly fluorescent axons and complex corneal nerve terminals with ongoing activity at 34°C and low-threshold, robust responses to cooling. The remaining TRPM8<sup>+</sup> corneal axons were weakly fluorescent with nonbeaded axons, sparsely ramified nerve terminals, and exhibited a low-firing rate at 34°C, responding moderately to cooling pulses as do weakly fluorescent TG neurons. In aged (24 months) mice, the number of weakly fluorescent TG neurons was strikingly high while the morphology of TRPM8<sup>+</sup> corneal axons changed drastically; 89% were weakly fluorescent, unbranched, and often ending in the basal epithelium. Functionally, 72.5% of aged cold terminals responded as those of young animals, but 27.5% exhibited very low-background activity and abnormal responsiveness to cooling pulses. These morpho-functional changes develop in parallel with an enhancement of tear's basal flow and osmolarity, suggesting that the aberrant sensory inflow to the brain from impaired peripheral cold thermoreceptors contributes to age-induced abnormal tearing and to the high incidence of DED in elderly people.

## KEYWORDS

aging, cold thermoreceptors, dry eye, pain, tearing, trigeminal ganglion, RRID: AB\_221569, RRID: AB\_300798, RRID: AB\_291637, RRID: AB\_477272, RRID: AB\_90725, RRID: AB\_310180, RRID: AB\_725807, RRID: AB\_2313606, RRID: AB\_2534095, RRID: AB\_2576217, RRID: AB\_142924, RRID: AB\_142540, RRID: AB\_2313921

## 1 | INTRODUCTION

Ignacio Alcalde, Almudena Íñigo-Portugués, and Omar González-González contributed equally to this study.

Wetness of the ocular surface is maintained by the tear film, a complex entity that is composed of a muco-aqueous fluid layer, isolated from air

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2018 Wiley Periodicals, Inc.

by a superficial lipid layer (Stern et al., 2004). Aqueous tear fluid is continuously produced by the lacrimal glands at a mean basal rate of  $\sim 2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  in humans (basal tearing) (Furukawa & Polse, 1978). Basal, continuous tear production is tonically modulated by peripheral sensory input from the eye surface (Lamberts et al., 1979; Robbins et al., 2012). Recent evidence suggests a prominent role for ocular cold thermoreceptors in the regulation of basal tear production. When activity of cold thermoreceptors is silenced in mice by genetic deletion of TRPM8, the ion channel conferring them cold sensitivity (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002), basal tear flow is markedly reduced (Parra et al., 2010). Likewise, warming the ocular surface in humans, which decreases cold thermoreceptor sensory input, reduces basal tearing while cooling increases tear secretion (Acosta et al., 2004; Parra et al., 2010). The majority of cold thermoreceptors innervating the ocular surface display a continuous ongoing firing at normal eye surface temperatures of 33–34°C, that is augmented or reduced by cooling or heating, respectively (Brock et al., 2001; Gallar et al., 1993; González-González et al., 2017). Together, these observations support the hypothesis that sensory inflow from cold thermoreceptors, which is increased by evaporation-induced cooling, modulates tear flow, and possibly also contributes to conscious dryness sensations of the eye surface (Belmonte & Gallar, 2011; Belmonte et al., 2015, 2017; González-González et al., 2017; Hirata & Oshinsky, 2012; Kovács et al., 2016).

Dry eye disease (DED) is a multifactorial disease defined by an inability to produce a tear film of volume and/or quality adequate to allow proper lubrication and protection of the corneal surface. It is accompanied by discomfort or pain, increased tear osmolarity, disturbed visual acuity, inflammation, and an elevated susceptibility to infection. DED is the most common ocular disease, affecting >5% of the world's population (Craig et al., 2017). Noteworthy, DED incidence increases sharply with age, reaching prevalence values of 25–30% in individuals over sixty (Craig et al., 2017).

At the eye surface, aging causes a variety of morphological and functional changes (Gipson, 2013), including a reduced mechanical sensitivity and a decrease in the number of subbasal axons and nerve terminals in the corneal epithelium (Acosta et al., 2006; Dvorscak & Marfurt, 2008). Accordingly, a relationship between age-dependent reduction of eye innervation and disturbed tear production has been repeatedly suggested (Acosta et al., 2006; Belmonte et al., 2015; Hirata & Meng, 2010; Hirata & Oshinsky, 2012; Meng & Kurose, 2013). Aging affects the structure and performance of peripheral sensory nerves in all tissues (Bergman & Ulfhake, 1998; Wang & Albers, 2009). Corneal nerves represent an ideal experimental model to study the aging process in sensory nerves due to their accessibility, ordered distribution, and well-established function. Furthermore, the noted dependence of basal tearing rate on cold thermoreceptor input in mice (Parra et al., 2010) opens the possibility that age-induced disturbances in this subpopulation of sensory fibers are linked to the sensory and tearing alterations observed in patients with DED.

In the present work, we used transgenic TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP mice (Morenilla-Palao et al., 2014; Parra et al., 2010) in which TRPM8-expressing cold thermoreceptor neurons are intrinsically fluorescent, to

investigate the effects of aging on the morphology and function of the cell bodies and sensory nerve terminals of this population of somatosensory neurons. We also determined whether the changes detected for cold thermoreceptor neurons are related with the changes in basal tearing flow that occur with aging.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Experimental animals

Experiments were conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, the European Union Directive (2010/63/EU) and the Spanish regulations on the protection of animals used for research (RD 53/2013), and followed a protocol approved and supervised by the Ethics Committee of the Universities of Oviedo and Miguel Hernandez.

A total of 60 TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP and 105 C57BL/6 mice of 3 months (3M) and 24 months (24M) of both sexes were used. Animals were housed conventionally in temperature- and humidity-controlled facilities with food and water available ad libitum.

### 2.2 | Immunohistochemistry

TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP mice were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg; Imalgène 500<sup>®</sup>, Merial; Toulouse, France) and xylazine (5 mg/kg; Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Munich, Germany) and euthanized with an overdose of intraperitoneal sodium pentobarbital (Dolethal<sup>®</sup>, Vetoquinol, Lure, France). Eyes and trigeminal ganglia (TG) were carefully removed and processed, as detailed below.

#### 2.2.1 | Whole-mounted corneas

##### ABC-peroxidase method

Eyeballs were fixed for 1 hr at room temperature (RT) in 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). Corneas were dissected and washed in PBS. To increase their permeability, corneas were incubated overnight at 37°C in 0.01% hyaluronidase type IV-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 0.1% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich) (Marfurt et al., 2010) in 0.1 M acetate buffer (pH 6.0). Afterward, the corneas were rinsed in PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBS-TX) and incubated for 2 hr in blocking solution containing 1% bovine serum albumin (BSA; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and 10% normal goat serum (Vector Laboratories) in PBS-TX at RT. Corneas were then incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal antibody against GFP (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR). After rinsing with PBS-TX, corneas were incubated for 2 hr at RT with a goat anti-rabbit IgG biotinylated secondary antibody (1:200; Vector Laboratories). After again rinsing with PBS-TX, the corneas were incubated for 2 hr at RT in avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (ABC reagent; Vector Laboratories). Corneas were washed with PBS-TX and incubated for 2 min at RT in 0.1% diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After rinsing with PBS, the corneas were dehydrated in graded ethanol, cleared with xylol and mounted on slides with Entellan mounting medium (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

## Immunofluorescence

Corneas were fixed for 2 hr at RT in methanol and DMSO (4:1), rehydrated, and washed in PBS. They were incubated for 1 hr in blocking solution containing 1% BSA (Vector Laboratories) and 10% normal goat serum (Vector Laboratories) in PBS-TX at RT. After rinsing with PBS-TX, corneas were incubated for 48 hr at 4°C with the primary antibodies diluted in PBS-TX. Rabbit anti-neuronal class III  $\beta$ -tubulin (1:500; Covance Research Products, Berkeley, CA) and chicken anti-GFP (1:500; Abcam, Cambridge, MA) were used. After rinsing with PBS-TX, corneas were incubated for 2 hr at RT with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 goat anti-chicken IgG, respectively (1:500; Molecular Probes) in PBS, followed by incubation for 10 min at RT with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 2  $\mu$ g/mL; Molecular Probes).

### 2.2.2 | Trigeminal ganglia

Deeply anesthetized mice, in which eyeballs were removed to use their corneas for whole mount immunostaining as described above, were perfused immediately afterward with physiological saline through the ascending aorta, followed by 15 min perfusion with 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in PBS. TG were then removed and postfixed for 1 hr at RT in the same fixative, cryoprotected overnight at 4°C in 30% sucrose in PBS, embedded in OCT medium (Sakura Finetek, Torrance, CA) and rapidly frozen in liquid nitrogen. Blocks were stored at -80°C until used. TG were cut on a cryostat microtome in serial 7- $\mu$ m thick sections and mounted on Superfrost Plus slides. Tissue sections were washed in PBS containing 0.03% Triton X-100 for 10 min and blocked for 1 hr in PBS containing 10% goat serum or donkey serum (depending on secondary antibodies used) at RT and incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution. The following rabbit polyclonal antibodies were used: anti-NF200 (1:1000, Sigma-Aldrich), anti-Peripherin (1:500, Millipore) and anti-TrkA (1:500, Millipore). In addition, goat polyclonal anti-CGRP (1:500, Abcam) was used. Sections were then washed with PBS and incubated for 2 hr at RT with goat anti-rabbit IgG or donkey anti-goat IgG secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 594 (1:500, Molecular Probes) in PBS. To detect IB4 staining, sections were incubated overnight with *Griffonia simplicifolia* isolectin, (GS-IB<sub>4</sub> Alexa Fluor 594 conjugate, 1:500; Molecular Probes) in PBS at 4°C. Thereafter, sections were washed in PBS and incubated with DAPI for 10 min at RT. Finally, slides were coverslipped with fluorescence mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark).

### 2.2.3 | Antibody characterization

Details of antibodies and dilutions are provided in Table 1. The anti-GFP (Molecular Probes, A11122, RRID: AB\_221569) is a polyclonal antibody raised in rabbit against GFP isolated directly from the jellyfish *Aequorea Victoria* and is an IgG fraction purified by ion-exchange chromatography. The anti-GFP (Abcam, ab13970, RRID: AB\_300798) is a polyclonal antibody raised in chicken using as immunogen a recombinant full-length protein corresponding to GFP from *A. victoria* (UniProt number P42212). The anti-tubulin  $\beta$  III (Covance, PRB-435P, RRID: AB\_291637) is a polyclonal rabbit IgG (clone Poly 18020) generated against the same epitope as recognized by TUJ1 using microtubules

derived from rat brain as immunogen. The epitope is located within the last 15 C-terminal residues. It was subsequently purified on a peptide affinity column. This antibody is well characterized and highly reactive to neuron specific class III  $\beta$ -tubulin ( $\beta$ III) but does not identify  $\beta$ -tubulin found in glial cells. Anti-NF200 (Sigma-Aldrich, N4142, RRID: AB\_477272) is a polyclonal antibody produced in rabbit using as immunogen purified neurofilament 200 from bovine spinal cord. Whole antiserum is purified to provide an IgG fraction of antiserum. Anti-peripherin (Millipore, AB1530, RRID: AB\_90725) is a polyclonal antibody produced in rabbit as purified serum using as immunogen electrophoretically pure trp-E-peripherin fusion protein, containing all but the 4 N terminal amino acids of rat peripherin. The antibody recognizes Peripherin (UniProt number P41219) and stains a ~57 kDa band cleanly and specifically and does not stain vimentin, GFAP, alpha-internexin or any of the neurofilament subunits. Strong staining on rat, mouse, human, pig, and cow peripherin. Does not stain chicken, quail, or other more distantly related species which appear to lack peripherin. The anti-TrkA (Millipore, 06-574, RRID: AB\_310180) is a purified polyclonal antibody (IgG) raised in rabbit immunized with bacterially expressed purified protein corresponding to the entire extracellular domain of rat TrkA receptor. Recognizes TrkA, Mr 140 kDa (UniProt number P04629). Does not cross-react with TrkB or TrkC. The anti-CGRP (Abcam, ab36001, RRID: AB\_725807) is a polyclonal antibody produced in goat immunized with a synthetic peptide corresponding to rat CGRP (C terminal, VKDNFVPTNVGSEAF). The antibody reacts with whole molecule (1-37) and 23-37 fragment (C terminal).

The secondary antibody used for immunoperoxidase technique (Vector Laboratories, BA-1000, RRID: AB\_2313606) is an affinity purified (chromatography), polyclonal biotinylated anti-rabbit IgG, made in goat following proprietary immunization schedules from the manufacturer. The antibody recognizes both heavy and light chains of rabbit IgG. The incubation solution contained secondary antibody to a 1:200 dilution. The following polyclonal secondary antibodies were all purchased from Molecular Probes and were used to a final dilution of 1:500. AF594-anti-rabbit (A11037, RRID: AB\_2534095) is a secondary antibody raised in goat against heavy and light chains of rabbit Gamma immunoglobulins IgG and conjugated with the Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 fluorescent dye (6 fluorophore molecules per IgG molecule with ideal excitation at 594 nm). AF488-anti-rabbit IgG (A11034, RRID: AB\_2576217) is a secondary antibody raised in goat against heavy and light chains of chicken Gamma immunoglobulins IgG and conjugated with the Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 fluorescent dye (6 fluorophore molecules per IgG molecule with ideal excitation at 488 nm). According to manufacturer's description, to minimize the cross-reactivity of goat anti-rabbit IgGs whole antibodies have been cross-adsorbed against bovine, goat, mouse, rat and human IgG. AF488-anti-Chicken IgY (A11039, RRID: AB\_142924) is a secondary antibody raised in goat against heavy and light chains of chicken Gamma immunoglobulins IgY and conjugated with the Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 fluorescent dye (7 fluorophore molecules per IgY molecule with ideal excitation at 488 nm). This goat anti-chicken IgY whole antibody has been purified by cross-adsorption through a column matrix containing immobilized serum proteins from potentially cross-reactive species.

TABLE 1 Antibodies and lectins used in this study

Name	Immunogen	Manufacturer; catalog number; RRID; host species; mono/polyclonal	Dilution
Primary antibodies			
Anti-GFP	The GFP was isolated directly from the jellyfish <i>A. victoria</i>	Molecular Probes; A11122; AB_221569; rabbit; polyclonal	1:500
Anti-GFP	Recombinant full-length protein corresponding to GFP from <i>A. victoria</i>	Abcam; ab13970; AB_300798; chicken; polyclonal	1:500
Anti-tubulin $\beta$ III	Neuronal class III beta tubulin	Covance Research Products; PRB-435P; AB_291637; rabbit; polyclonal	1:500
Anti-NF200	Neurofilament 200 from bovine spinal cord	Sigma Aldrich; N4142; AB_477272; rabbit; polyclonal	1:1000
Anti-peripherin	Trp-E-peripherin fusion protein containing all but the 4 N-terminal amino acids of rat peripherin	Millipore; AB1530; AB_90725; rabbit; polyclonal	1:500
Anti-TrkA	Purified protein corresponding to the entire extracellular domain of rat TrkA receptor	Millipore; 06-574; AB_310180; rabbit; polyclonal	1:500
Anti-CGRP	Synthetic peptide corresponding to rat CGRP (C-terminal)	Abcam; ab36001; AB_725807; goat; polyclonal	1:500
Secondary antibodies			
Biotinylated anti-rabbit IgG	Gamma immunoglobulins heavy and light chains; IgG	Vector Laboratories; BA-1000; AB_2313606; goat; polyclonal	1:200
AF594-anti-rabbit	Gamma Immunoglobulins heavy and light chains; IgG	Molecular Probes; A11037; AB_2534095; goat; polyclonal	1:500
AF488-anti-rabbit	Gamma immunoglobulins heavy and light chains; IgG	Molecular Probes; A11034; AB_2576217; goat; polyclonal	1:500
AF488-anti-chicken	Gamma immunoglobulins heavy and light chains; IgY	Molecular probes; A11039; AB_142924; goat; polyclonal	1:500
AF594-anti-goat	Gamma immunoglobulins heavy and light chains; IgG	Molecular Probes; A11058; AB_142540; donkey; polyclonal	1:500
Lectin stain			
GS-IB <sub>4</sub>	The GS-IB <sub>4</sub> was isolated from the seeds of the <i>G. simplicifolia</i>	Molecular Probes; I21413; AB_2313921	1:500

AF594-anti-goat (A11058, RRID: AB\_142540) is a secondary antibody raised in donkey against heavy and light chains of goat gamma immunoglobulins IgG and conjugated with the Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 fluorescent dye (4 fluorophore molecules per IgG molecule with ideal excitation at 594 nm).

Additionally, isolectin GS-IB<sub>4</sub> (Molecular Probes, I21413, RRID: AB\_2313921) was isolated from the seeds of the *G. simplicifolia* legume conjugated with the Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 fluorescent dye (6 fluorophore molecules per IgG molecule with ideal excitation at 594 nm). Subunit A binds preferentially to N-acetyl-D-galactosamine end groups while the B subunit is selective for terminal  $\alpha$ -D-galactosyl residues. It was used at a final concentration of 1:500.

The antibody specificity was assured by performing a battery of control experiments consisting in: (a) incubation of the sections without secondary antibodies to check for unspecific background or autofluorescence from the tissue; (b) elimination of the primary antibodies to check for unspecific cross-reactivity of the antibodies with other immunoglobins in the tissue; (c) incubation with the peroxidase reveal

system (ABC) only to assure the specificity of the DAB deposits; (d) immunostaining of positive control tissue sections (brain sections from C57BL/6n young mice and dorsal root ganglion sections from TRPM8-EYFP mice).

#### 2.2.4 | Image acquisition

Bright field and fluorescence images were collected using a Leica DM 6000B microscope, equipped with a Leica CTR 6000 fluorescence filter set and a Leica DFC310 FX camera (Leica Microsystems, Germany) and with a Laser Scanning Spectral Confocal Microscope Olympus Fluoview FV1200 (Olympus Corp, Tokyo, Japan).

### 2.3 | Electrophysiological recording of cultured TG neurons

Primary cultures of TG obtained from TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP mice (3M or 24M) were prepared following the procedure described elsewhere (Madrid et al., 2009). In brief, TG dissociated cells were plated on poly-

*L*-lysine-coated glass coverslips and cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM) with Earle's BSS and *L*-glutamine plus 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% vitamin solution and 100 µg/mL penicillin/streptomycin (all from Invitrogen). Cells were used after 12–36 hr in culture.

Coverslips were transferred to a 0.15 mL recording chamber (Warner Instrument Corporation, Hamden, CT) on the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot-TMD, Nikon Instruments, Tokyo, Japan) and superfused (1.5–3 mL·min<sup>-1</sup>) at basal temperature (32–34°C, maintained with a computer-controlled Peltier device, Embit, Modena, Italy) with physiological solution. Before each recording, light-transmitted and fluorescent images of each neuron were taken (filter cube for GFP: 41017\_Nikon; Watec camera), and the fluorescence intensity of each recorded neuron was expressed as percent of the maximum value of fluorescence measured in the whole population, in non-saturating conditions. Cell membrane potentials were recorded using the perforated patch clamp technique. Pipettes of borosilicate glass (Harvard Apparatus, UK, 2–4 MΩ) were filled with a solution containing (in mM): 105 K gluconate, 50 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 0.2 mg/mL nystatin (pH 7.3 adjusted with NaOH; final Na<sup>+</sup> concentration ≈ 10 mM). Electrophysiological signals were recorded with an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Molecular Devices, CA). Stimulus delivery, data acquisition and analysis were performed using pClamp 9.2 software (Molecular Devices). Cooling ramps to 20–22°C (50 s duration) and extracellular *L*-menthol (100 µM) were used to study the functional characteristics of TRPM8<sup>+</sup> neurons.

## 2.4 | Extracellular recording of corneal nerve terminals

C57BL/6 mice aged 3M or 24M were killed by cervical dislocation and their corneas used for electrophysiological recordings of cold nerve terminals.

Extracellular recordings of single corneal nerve terminals *in vitro* were performed as described in previous studies (González-González et al., 2017; Parra et al., 2010). The eye ball and the attached optic nerve were dissected and fixed with a suction tube to the bottom of a recording chamber and were continuously perfused with a solution (~310 mOsm·L<sup>-1</sup>) 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 borosilicate glass microelectrode (tip diameter ~50 µm) with an Ag/AgCl wire inside and filled with the extracellular solution was placed in contact with the cornea surface using a micromanipulator. Gentle suction was then applied to record nerve terminal impulse (NTI) activity. NTIs were amplified with an AC amplifier (Neurolog NL104, Digitimer, Welwyn, UK) and digitized at 10 KHz and stored in a computer using a CED micro 1401 interface and Spike 2 software (both from Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Only recording sites where the NTI activity arose from a single nerve terminal were used for further analysis. At these sites, the NTIs were clearly distinguished from noise (~10 µV peak to peak) and identifiable by their similar waveform shape and firing pattern as arising from a single nerve terminal (Brock et al., 1998).

To minimize the effects introduced by the deterioration of the preparation with time, the total duration of the experiment was restricted to a maximum of 5 h.

### 2.4.1 | Experimental protocol

The corneal surface was systematically explored with the microelectrode, from the center to the periphery, keeping the microelectrode in place at each location for 2 min to detect the possible occurrence during this time of at least one spontaneous NTI. The appearance of activity after application of the pipette onto the cornea was used to ascertain the successful location of a responsive sensory nerve terminal (González-González et al., 2017).

Cold thermoreceptor terminals were recognized either by the immediate detection of ongoing NTI activity at the control temperature of the bath (~34°C), which increased markedly in response to cooling, or by a NTI discharge in response to cooling, in terminals that had fired at least one NTI during the 2 min waiting period following application of the pipette to the cornea (González-González et al., 2017; see "Results" section). For cold stimulation, a cooling ramp was applied from the mean basal temperature of 34°C down to 12–13°C at a mean rate of 0.7 ± 0.03°C·s<sup>-1</sup>. Temperature was returned to basal values at the end of cold thermal stimuli at a similar rate.

Mechanical stimulation was performed by gentle (20 µm) forward displacement of the recording electrode against the ocular surface for 2 s. Chemical stimulation with *L*-menthol (20 µM) was carried out by shifting the perfusion from saline solution to saline solution plus the drug. A cooling ramp from 34°C was applied 2 min after the onset of perfusion with menthol, followed by a washing period of at least 5 min before testing other stimuli. Stimulation with a hyperosmolar solution was carried out by shifting the perfusion from the control solution to a 397 mOsm·L<sup>-1</sup> solution for 2 min followed by a 5 min washing period.

### 2.4.2 | Solutions

*L*-Menthol (Sigma-Aldrich) was prepared as a 20 mM stock solution in ethanol and diluted to a final concentration of 20 µM with saline solution. Hyperosmolar solutions were prepared by adding NaCl (3 M) to the physiological saline solution (310 ± 1.5 mOsm·L<sup>-1</sup>) until reaching the desired osmolarity value of 397 mOsm·L<sup>-1</sup>, measured with a freezing point osmometer (OSMOSTAT OM-6020, Kyoto Daiichi Kagaku, Kyoto, Japan).

## 2.5 | Tear flow and tear osmolarity measurements

Basal tear flow was measured in both eyes in 3M and 24M anesthetized TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP and C57BL/6 mice (*n* = 110) using phenol red threads (Zone-Quick, Menicon Pharma S.A., Graffenstaden, France) gently placed between the lower lid and the bulbar conjunctiva at the nasal angle during 1 min (Parra et al., 2010). No differences in the tear flow measurements were observed between TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP and C57BL/6 mice. Therefore, data from both strains were analyzed together.

Osmolarity of the tear fluid was measured in C57BL/6 mice of different ages, using the TearLab Osmolarity System (OcuSense Inc., San

Diego, CA). Tear fluid (50 nL) was collected from restrained, awake mice by gently placing the probe of the instrument into the meniscus formed at the nasal side of the inferior lid margin. Samples were obtained from both eyes in each mouse.

## 2.6 | Data analysis

### 2.6.1 | Morphological data

Whole-mounted corneas were divided into four quadrants. Epithelial innervation densities were determined in one central and two peripheral zones of each quadrant. The peripheral zones were defined as two 0.25 mm<sup>2</sup> square regions (a 500 × 500 μm box) whose peripheral borders were ~200 μm away from the limbus internal border. The two peripheral zones were separated 500 μm from each other. The central zone was defined as a 0.25 mm<sup>2</sup> region, 500 μm away from the peripheral boxes, that is, located at a distance of 1.2 mm from the limbus. Corneal nerve densities in the 0.25 mm<sup>2</sup> boxes were determined from microphotographs captured with a Leica DM6000B light microscope. Two independent images were obtained from each 0.25 mm<sup>2</sup> zone: one image was taken at the level of subbasal fibers, and the other at the level of the corneal epithelium layers, including the intraepithelial nerve terminals that derive from subbasal axons. Images were analyzed using the image analysis software FIJI (ImageJ 1.4, NIH, Bethesda, MD). Nerve density was calculated as the number of subbasal nerves or nerve terminals per mm<sup>2</sup>. Subbasal nerves were quantified as the number of them intersecting a line drawn inside the square area. The total number of the intraepithelial nerve terminals was counted inside each square area, defining the type of nerve terminal (simple, ramified, or complex) (Ivanusic et al., 2013). No differences in the number of subbasal nerves and nerve terminals per mm<sup>2</sup> were observed between peripheral and central zones both in 3M and 24M mice. Therefore, values from both areas were averaged. Penetration sites of subepithelial bundles through the basal lamina were counted throughout the total area of the cornea and expressed as penetrations per mm<sup>2</sup>.

Counts of TG neurons were performed on reconstructions of the ganglion made by tiling each image of the serial TG sections under the fluorescence microscope using a 20× objective magnification, a motorized slide holder, and the Tile Scan module of the Leica AF6000 software, so that the entire extension of the ganglion was scanned and imaged. For the quantitation of the number of TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP neurons in the TG, the FIJI software was used. Only neurons with a visible nucleus were counted. Neurons exhibiting a fluorescence intensity between zero and 90 arbitrary units on a 256-channel gray scale were considered weak fluorescent neurons. To avoid overestimation of the number of TG neurons, images of one in every nine microtome sections (that is, one image in every 63 microns) were analyzed. A minimum of three TG of each group were used.

### 2.6.2 | Analysis of NTI activity

In computer-stored recordings of NTI activity of corneal nerve terminals, the following parameters were analyzed off-line:

- Background activity: Mean basal ongoing frequency in impulses per second (imp·s<sup>-1</sup>) at 34°C, measured during the 30 s preceding the onset of a cooling ramp.
- Cooling threshold: Temperature (°C) during a cooling ramp at which NTI frequency increased to a value that was the mean NTI frequency measured during the 10-s period preceding the onset of a cooling ramp plus 3 times its standard deviation.
- Cooling response: The increase in firing rate (imp·s<sup>-1</sup>), measured between the cooling threshold and the peak frequency value reached during a cooling ramp.

## 2.7 | Statistical analysis

Data were analyzed using SigmaStat v3.5 (Systat Software, Point Richmond, CA). Statistical significance was determined by Mann-Whitney *U* test or *Z* test for morphological and tearing studies; *t*-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni or Dunn's post hoc test for analysis of data of electrophysiological recording of cultured TG neurons; *t* test or Mann-Whitney test for analysis of data of extracellular electrophysiological recordings. \**p* < .05, \*\**p* < .01, \*\*\**p* < .001.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | TRPM8-EYFP<sup>+</sup> TG neurons exhibit different fluorescence levels

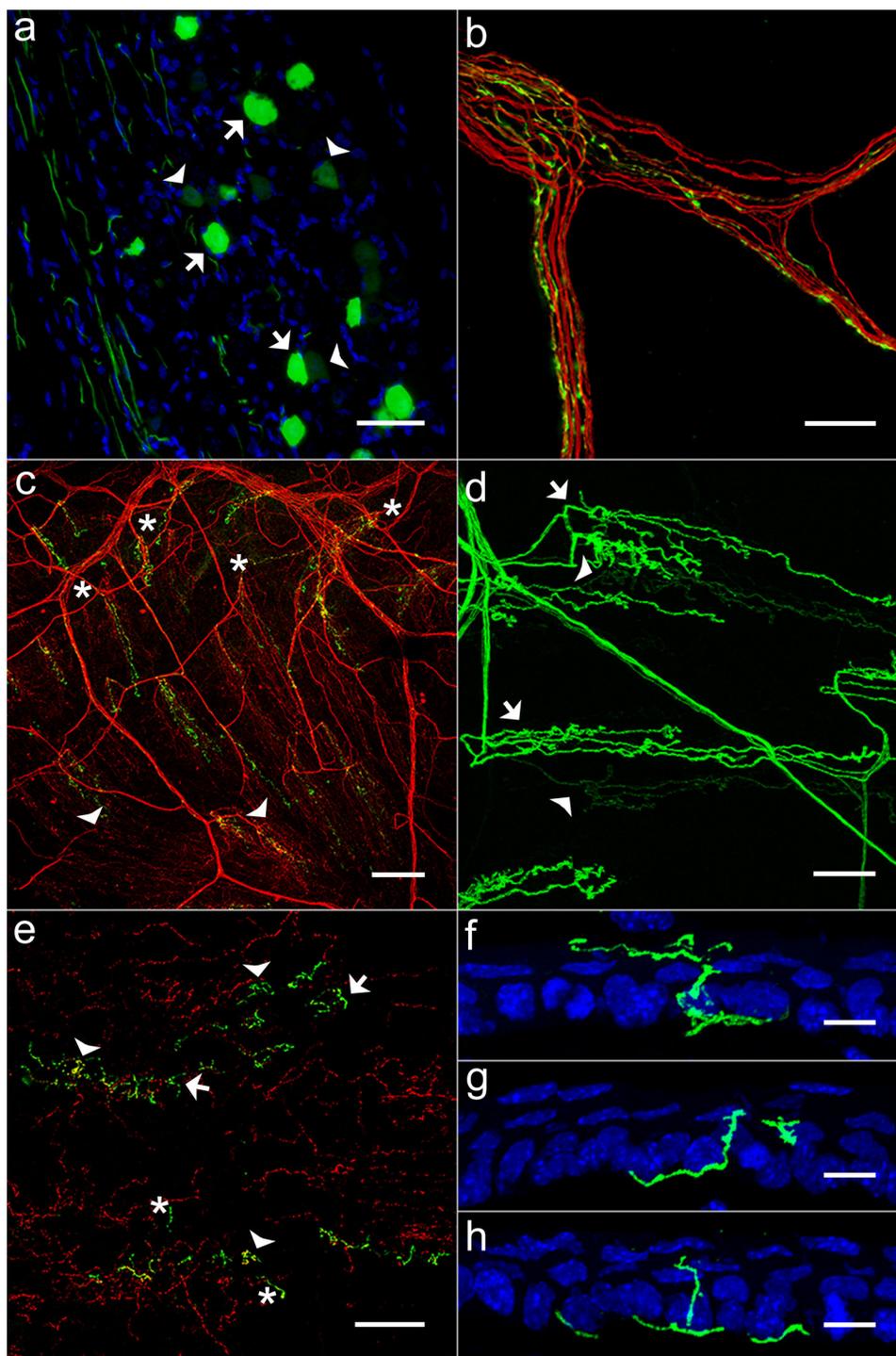
Microscopic inspection of EYFP fluorescence in TG cell bodies and corneal nerve fibers of TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP mice (EYFP<sup>+</sup> mice) evidenced clear differences in fluorescence intensity both between individual somas and peripheral axons (Figure 1).

#### 3.1.1 | Cell body

17.8 ± 0.9% of the neurons counted (2268.4 ± 266.5 neurons per ganglion, *n* = 3) in TG tissue sections of 3M EYFP<sup>+</sup> mice displayed fluorescence (Figure 1a). In 56.3 ± 1.3% of them, fluorescence intensity was high (>90 arbitrary units on a 256-channel gray scale) being thus called intensely fluorescent (IF) neurons. The majority of these neurons were peripherin positive and CGRP negative (Table 2). The remaining EYFP<sup>+</sup> neurons (43.7 ± 1.3%) showed a weaker fluorescence intensity (≤90 arbitrary units on the 256-channel gray scale) and were named weakly fluorescent (WF) neurons (Figure 1a); almost half of them were immunoreactive to CGRP (Table 2). Both IF and WF neurons were IB4 negative (data not shown). Immunoreactivity to other neuronal markers (neurofilaments, TrkA) differed between IF and WF neurons (Table 2). In TG cultures, the two populations of IF and WF neurons were also clearly differentiated (see below).

#### 3.1.2 | Peripheral axons

Corneal EYFP<sup>+</sup> axons were easily recognized within stromal nerve trunks and their extensively ramified, ascending intraepithelial branches, by their YFP immunofluorescence (Figure 1b–e), and specific immunoperoxidase staining (Figure 2).



**FIGURE 1** Immunostaining of TG neurons and peripheral corneal nerve branches of 3M TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP mice. (a) Fluorescence in IF (arrows) and WF (arrowheads) TG neurons. (b) Stromal nerve bundle containing EYFP<sup>+</sup> green axons mixed with non-EYFP<sup>+</sup> anti-β III tubulin red axons. (c) Low-magnification image showing penetrations through the basal lamina of ascending peripheral (asterisks) and central (arrowheads) nerve branches. (d) EYFP<sup>+</sup> nerve fibers displaying intense (arrows) and weak (arrowheads) fluorescence. (e) TRPM8<sup>+</sup> intraepithelial, complex (arrowheads), ramifying (arrows), and simple (asterisk) terminal branches. (f–h) Corneal cross sections showing the ascending trajectory within the corneal epithelium layers of presumed complex (f), ramified (g) and simple (h) immunofluorescent terminal axons. Epithelium cell nuclei are counterstained with DAPI. Scale bars: a and b, 50 μm; c, 150 μm; d and e, 75 μm; f–h, 10 μm

Corneal EYFP<sup>+</sup> axons of the subbasal plexus were morphologically heterogeneous. About half of them were IF, thick axons and showed beads along their length. The other half appeared as

less intense fluorescent (WF), thinner, smooth axons (Figures 1d and 2a). Overall mean density of subbasal EYFP<sup>+</sup> fibers was 22.4% of the total number of corneal sensory fibers running in

**TABLE 2** Molecular phenotype of TRPM8-EYFP<sup>+</sup> TG neurons in young and aged mice

	% IF-EYFP-TRPM8 neurons		% WF-EYFP-TRPM8 neurons	
	3-month-old mice	24-month-old mice	3-month-old mice	24-month-old mice
Peripherin-IR	7.7 ± 0.5 (79.2 ± 4.1)	7.6 ± 1.0 (74.6 ± 4.9)	4.1 ± 0.6 (53.4 ± 4.9)	7.9 ± 0.4** (56.0 ± 5.0)
NF200-IR	1.3 ± 0.1 (12.1 ± 1.3)	2.8 ± 0.6** (22.5 ± 2.4)	1.6 ± 0.4 (20.2 ± 3.0)	2.7 ± 0.3 (17.1 ± 2.5)
TrkA-IR	1.3 ± 0.3 (13.8 ± 2.4)	1.6 ± 0.5 (16.4 ± 3.8)	3.9 ± 0.7 (48.7 ± 5.7)	5.2 ± 0.6* (61.2 ± 2.4)
CGRP-IR	0 ± 0 (0 ± 0)	0 ± 0 (0 ± 0)	3.6 ± 1.2 (44.1 ± 11.4)	4.2 ± 0.4* (43.9 ± 2.3)

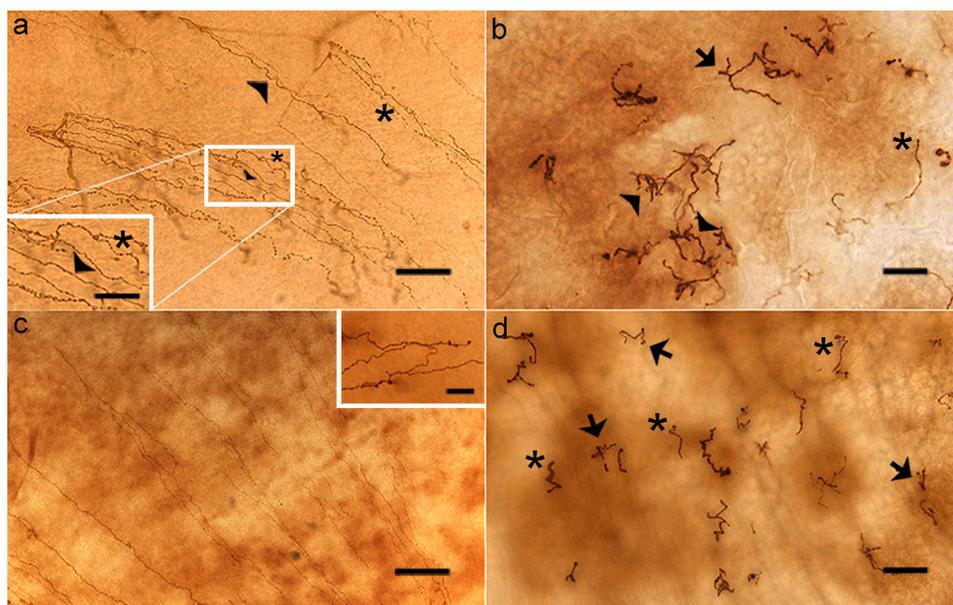
Note. Data of IF and WF neurons are expressed as percentage of total number of neurons counted in the TG and compared as a function of age using the z test. \* $p < .05$ ; \*\* $p < .01$ . The data in parenthesis give the proportion of IF and WF TRPM8-EYFP<sup>+</sup> neurons, expressed as percentage of the total number of TRPM8-EYFP<sup>+</sup> TG neurons.

the leashes (Figure 1c). The ascending terminal branches from the leashes end superficially as intraepithelial endings (Figures 1e–h and 2b). Mean density of intraepithelial endings of 3M mice was  $527.8 \pm 23.2$  endings/mm<sup>2</sup> ( $n = 3$ ); 29.6% of this total were EYFP<sup>+</sup> endings of variable morphological complexity (Ivanusic et al., 2013). A majority ( $51.1 \pm 2.1\%$ ) of the IF ascending branches formed “complex” endings; a smaller proportion ( $20.3 \pm 2.8\%$ ) produced “ramifying” nerve endings or terminate as “simple” nerve endings ( $28.6 \pm 0.6\%$ ). In contrast, WF axons branched less in the subbasal plexus and formed simple ( $57.9 \pm 0.9\%$ ) or ramifying ( $31.7 \pm 1.8\%$ ) ending types; only  $10.4 \pm 2.7\%$  of them produced complex nerve endings.

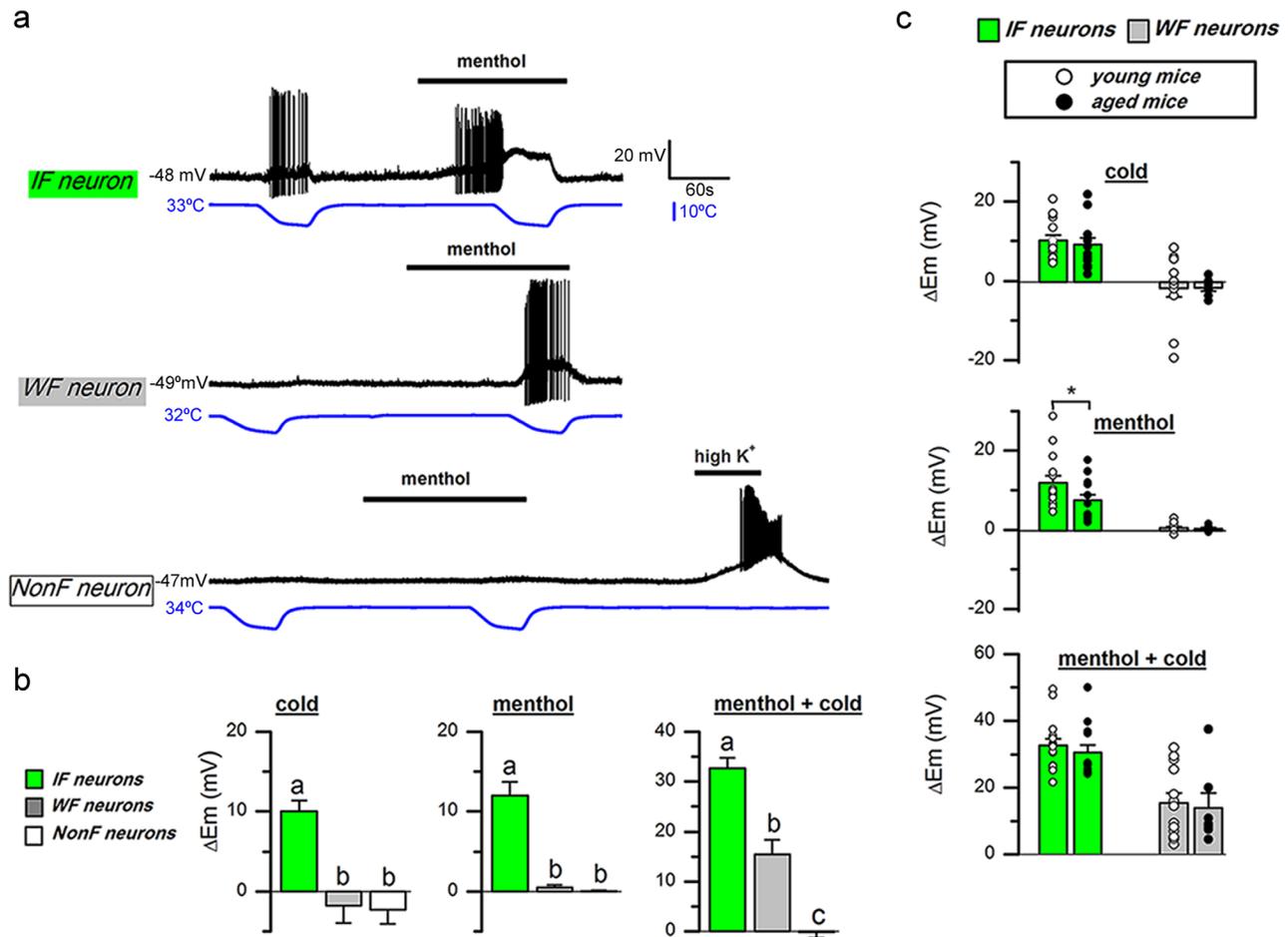
### 3.2 | Fluorescence intensity in TRPM8-EYFP<sup>+</sup> neurons correlates with their cold sensitivity

#### 3.2.1 | Cell body

To evaluate the possible correlation between fluorescent intensity in EYFP<sup>+</sup> TG neurons and their TRPM8 expression levels, we analyzed the relationship between somatic fluorescence intensity and electrophysiological responses to cold and menthol in TG cultured neurons of 3M mice. We recorded changes in membrane potential ( $E_m$ ) to cooling ramps and during application of menthol (100  $\mu$ M) in the two groups of EYFP<sup>+</sup> neurons (Figure 3a,b): IF neurons (mean fluorescence =  $64.3 \pm 5.6\%$  of maximum), WF neurons (mean fluorescence =  $6.3 \pm 1.0\%$  of maximum), and in NonF neurons (no fluorescence).



**FIGURE 2** Anti-GFP immunostaining of corneal nerve fibers in the periphery of whole-mounted corneas of 3M and 24M old mice. (a and b) 3M mouse. (a) Subbasal EYFP<sup>+</sup> longer, beaded (asterisks) and smooth, shorter (arrowheads) axons. Inset: Higher magnification the dashed area. (b) Intraepithelial, terminal branches forming complex (arrowhead), ramifying (arrows) and simple (asterisks) endings. (c and d) 24M mouse. (c) EYFP<sup>+</sup> subbasal axons, some ending abruptly forming “collapsed axons” (inset). (d) Intraepithelial terminal branches generally form ramifying (arrows) or simple endings (asterisks). Scale bars: a, 100  $\mu$ m, inset, 50  $\mu$ m; b and d, 20  $\mu$ m; c, 100  $\mu$ m, inset 20  $\mu$ m



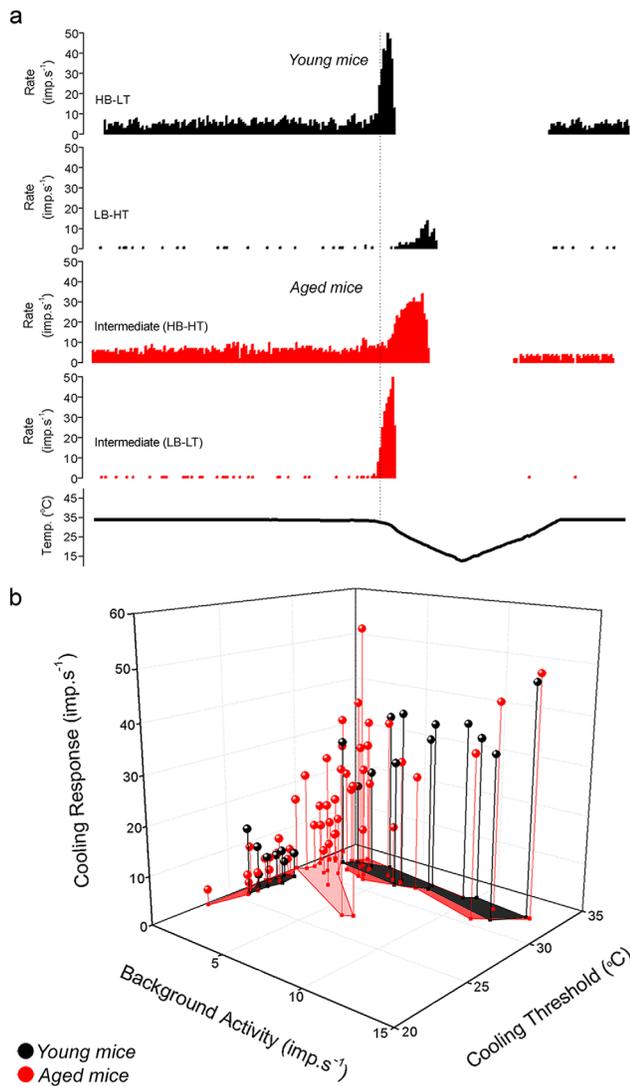
**FIGURE 3** Correlation between fluorescence intensity of cultured TRPM8-EYFP<sup>+</sup> TG neurons and cold and menthol sensitivity. (a) Sample recordings obtained from typical TG neurons of 3M mice presenting IF, WF and NonF neurons. Membrane potential ( $E_m$ ) trace is represented in black and bath temperature in blue. Horizontal black bars mark perfusion with 100  $\mu$ M menthol and 37.5 mM K<sup>+</sup>, respectively. (b) Average changes in  $E_m$  elicited by a cold ramp, menthol, and menthol plus a cold ramp in the three classes of neurons. Data are mean  $\pm$  SEM of IF ( $n = 15$ ), WF ( $n = 13$ ) and NonF ( $n = 12$ ) neurons. One-way ANOVA ( $p < .001$  in all cases) with Bonferroni or Dunn's post hoc test ( $p < .001$  for cold stimulus;  $p < .05$  for menthol and menthol + cold stimuli). (c) Average (bars) and individual (circles) changes in  $E_m$  elicited by cold ramps, menthol and menthol plus cold in IF and WF neurons from 3M (○), and 24M (●) mice. \* $p = .05$  by  $t$  test

IF neurons were depolarized by cold and menthol ( $\Delta E_m = 10.0 \pm 1.4$  mV and  $12.0 \pm 1.7$  mV, respectively,  $n = 15$ ). In addition, their responses to cooling were strongly potentiated by menthol ( $\Delta E_m = 32.7 \pm 2.0$  mV). In WF neurons ( $n = 13$ ), the effects of cold or menthol on  $E_m$ , when applied separately, were weak or negligible, although all neurons were depolarized by simultaneous application of both stimuli, leading to action potential firing in a few of them (4/13, Figure 3a). Finally, none of the NonF neurons ( $n = 12$ ) showed  $E_m$  changes during application of cold or menthol; their functional integrity was proved by the strong depolarization evoked by high K<sup>+</sup> exposure ( $\Delta E_m = 25.7 \pm 1.9$  mV;  $n = 12$ ). There were no significant differences between the three classes of neurons recorded regarding values of resting  $E_m$  (IF =  $-57.3 \pm 2.2$  mV; WF =  $-56.0 \pm 2.7$  mV; NonF =  $-53.6 \pm 2.5$  mV;  $p = .571$ , one-way ANOVA), or membrane capacitance (IF =  $11.8 \pm 1.3$  pF; WF =  $14.4 \pm 1.7$  pF; NonF =  $14.7 \pm 1.5$  pF;  $p = .340$ , one-way ANOVA). In sharp contrast with the typical ongoing firing of most peripheral corneal cold nerve terminals, only one of the

IF cold-sensitive neurons exhibited spontaneous discharge at 33°C. Altogether, these results indicate (Figure 3b) that IF neurons are more sensitive to TRPM8 agonists (cold and menthol) than WF neurons, suggesting their differential TRPM8 expression levels. Figure 3c presents the electrophysiological parameters of fluorescent neurons in young mice, to allow their comparison with those of old animals, as discussed below.

### 3.2.2 | Peripheral terminals

The presence of two-functional subpopulations of cold thermoreceptors with different sensitivity to cooling (González-González et al., 2017) was confirmed in 18 corneas of 3M C57BL/6 mice. In  $5.7 \pm 1.6\%$  of all recording attempts, terminals exhibiting a robust ongoing repetitive activity (more than  $2 \text{ imp} \cdot \text{s}^{-1}$ ) at the holding temperature of 34°C were identified. These endings also gave a vigorous response to cooling ramps, firing readily during temperature decreases (Figure 4a). Menthol (20  $\mu$ M) and hyperosmolar solutions (397 mOsm·L<sup>-1</sup>)



**FIGURE 4** Aging effects on NTI activity of corneal cold-sensitive terminals. (a) Examples of the NTI discharge and the response to a cooling ramp from 34 to 15°C (lowest trace) recorded in the different classes of cold-sensitive terminals. Traces of high background, low threshold (HB-LT) and low background, high threshold (LB-HT) NTI activity were obtained from 3M mice. Those from terminals exhibiting intermediate properties (high background, high threshold, HB-HT and low background, low threshold, LB-LT; in red) were obtained from 24M mice. (b) Plot of individual cold-sensitive endings attending to background activity at 34°C, firing response to cooling and cooling threshold in °C. Data from 3M mice (black) and from 24M mice (red) are projected onto the horizontal plane as black or red-filled areas, separating the intermediate fibers of the last group (light red) to highlight their differences with HB-LT and LB-HT terminals

increased significantly their spontaneous activity and peak firing response to cooling ramps. Accordingly, these endings were classified as high-background, low-threshold (HB-LT) cold thermoreceptors.

In  $2.6 \pm 1.2\%$  of the recording attempts, low-background, high-threshold (LB-HT) cold thermoreceptor terminals were also identified. These endings exhibited a very low mean firing frequency at 34°C and

responded to cooling ramps with a relatively modest increase in firing frequency, starting at a mean threshold temperature 4–5°C below the value seen in HB-LT cold receptor terminals (Figure 4a). Menthol (20  $\mu\text{M}$ ) and perfusion with 397  $\text{mOsm}\cdot\text{L}^{-1}$  solution augmented their spontaneous activity and reduced their threshold, also increasing the maximum firing response to cooling ramps. Table 4 summarizes the firing characteristics of HB-LT and LB-HT cold thermoreceptor endings in young mice.

### 3.3 | The number and molecular phenotype of TRPM8-EYFP<sup>+</sup> TG neurons and the architecture and density of corneal axonal branches change with age

#### 3.3.1 | Cell body

In aged, 24M mice,  $21.6 \pm 1.1\%$  of the TG neurons ( $2723.0 \pm 263.8$  neurons per ganglion,  $n = 3$ ) were EYFP<sup>+</sup>, a proportion significantly larger than in young animals ( $p = .002$ ,  $z$  test). This increase was accompanied by a higher percentage of WF neurons ( $10.7 \pm 0.9\%$  in 24M mice vs.  $7.8 \pm 0.4$  in 3M mice,  $p < .001$ ,  $z$  test). The proportion of WF neurons expressing peripherin, TrkA, and CGRP also increased significantly with age (Table 2).

#### 3.3.2 | Peripheral axons

In 24M mice, the number and architecture of corneal sensory nerves including the subpopulation of EYFP<sup>+</sup> fibers appeared strikingly modified in comparison with younger animals (Figure 2 and Table 3). In this age group, the density of penetration points into the lamina basal containing EYFP axons was significantly higher than in young animals (49.6% increase,  $p = .019$ , Table 3). This was due to a higher number of penetration points at the periphery in old mice ( $15.3 \pm 1.5$  penetrations/ $\text{mm}^2$  vs.  $8.6 \pm 0.6$  penetrations/ $\text{mm}^2$ , in 24M and 3M mice, respectively,  $p = .004$ ), while in the center of the cornea differences in penetration points density with age were not significant.

Notably, in 24M mice, nearly all ( $95.1 \pm 2.9\%$ ) TRPM8-EYFP<sup>+</sup> axons were nonbeaded (smooth), faintly fluorescent, and remarkably long and thin (compare Figure 2a,c), often reaching the center of the cornea, in sharp contrast with young animals (average length of the subbasal axons:  $304.9 \pm 14.0$   $\mu\text{m}$  vs.  $227.6 \pm 11.6$   $\mu\text{m}$ ,  $p = .002$ ,  $t$  test). On the other hand, the density of EYFP<sup>+</sup> subbasal axons of 24M mice was significantly lower (27.7%) than in 3M mice ( $p < .001$ ; Table 3). Also, they were distributed differently within the leashes, with more leashes containing EYFP<sup>+</sup> axons in aged mice albeit with a lower mean number of fluorescent axons per leash.

The total density of EYFP<sup>+</sup> terminals in 24M mice was 35.6% lower than in 3M mice ( $p < .001$ ). In addition, the proportion of the different morphological subtypes of EYFP<sup>+</sup> intraepithelial nerve endings was markedly altered for complex endings in aged mice; there,  $59.7 \pm 0.7\%$  of terminals had simple endings (3M:  $43.4 \pm 1.7$ ,  $p = \text{n.s.}$ , Mann-Whitney  $U$  test),  $25.6 \pm 1.2\%$  had ramifying endings (3M:  $26.0 \pm 1.7\%$ ,  $p = \text{n.s.}$ ,  $z$  test), and only  $2.6 \pm 0.7\%$  had complex endings (3M:  $30.6 \pm 1.7$ ,  $p < .001$ ,  $z$  test) (compare Figure 2b,d). Moreover,  $12.1 \pm 2.6\%$  of the subbasal EYFP<sup>+</sup> axons ended abruptly within the subbasal plane without emitting any branches that ascend to terminate more

**TABLE 3** Morphological characteristics of TRPM8-EYFP<sup>+</sup> axons and epithelial nerve endings innervating the cornea of mice at different ages

Morphometric parameter	3-month-old mice	24-month-old mice
Penetration of subepithelial bundles (number/mm <sup>2</sup> )	11.5 ± 0.5 n = 5	17.2 ± 1.2*** n = 5
% beaded subbasal nerve axons	50.1 ± 6.5 n = 3	4.9 ± 2.9*** n = 4
% smooth subbasal nerve axons	49.9 ± 6.5 n = 3	95.1 ± 2.9*** n = 4
Density of subbasal axons (number/mm <sup>2</sup> )	126.4 ± 5.9 n = 7	91.6 ± 4.2*** n = 10
Number of axons per leash	5.2 ± 0.3 n = 3	2.6 ± 0.2*** n = 4
Density of terminal branches (number/mm <sup>2</sup> )	156.2 ± 8.0 n = 7	111.2 ± 5.6*** n = 10

Note. Comparisons of measures performed in 24-month-old mice were made against the values obtained in 3-month-old mice. Mann-Whitney *U* test was used except for the data of percentage of beaded and smooth subbasal axons, which were analyzed using a *z* test. \*\*\**p* < .001, *n* = number of mice.

superficially in the epithelium. We called such terminations, “collapsed axons” (see Figure 2c, inset) and were not found in young animals (*p* = .009, *z* test).

### 3.4 | Aging modifies the electrophysiological responses of peripheral cold-sensitive endings but not of TG TRPM8-EYFP<sup>+</sup> neurons

Next, we analyzed the functional changes developed with aging by TG EYFP<sup>+</sup> neurons and their cold-sensitive nerve terminals.

#### 3.4.1 | Cell body

Cultured TG EYFP<sup>+</sup> neurons of 24M mice were also divided into IF and WF neurons. Even though they were not counted, WF neurons were clearly more abundant in these cultures compared with those from young animals. As in young mice, IF neurons were more sensitive to TRPM8 agonists than WF neurons (Figure 3c).  $\Delta E_m$  observed in IF versus WF neurons during exposure to cold, menthol, and menthol

plus cold were 9.1 ± 1.6 versus −1.7 ± 0.8 mV; 7.5 ± 1.4 versus 0.3 ± 0.3 mV; and 30.6 ± 2.1 versus 14.0 ± 4.3 mV, respectively. Moreover, the amplitudes of membrane depolarizations induced by cold exposure alone or in the presence of menthol were similar to those of young mice (see Figure 3c) for both neuronal types, IF and WF. Only in the group of the IF neurons of aged mice, the amplitude of the menthol-evoked depolarization was slightly lower than in IF neurons of young animals ( $\Delta E_m$  = 7.5 ± 1.4 mV vs. 12.0 ± 1.7 mV; *p* = .05, *t* test). Resting membrane potential at 33°C, membrane capacitance and fluorescence intensity of the recorded IF and WF neurons in aged animals did not differ from those reported in the same neuronal types of young mice. ( $E_m$  = −53.7 ± 2.7 and −56.7 ± 2.3 mV;  $C_m$  = 12.7 ± 1.4 and 17.9 ± 3.1 pF, and mean fluorescence = 60.3 ± 5.1% and 8.8 ± 2.5% for IF and WF neurons, respectively).

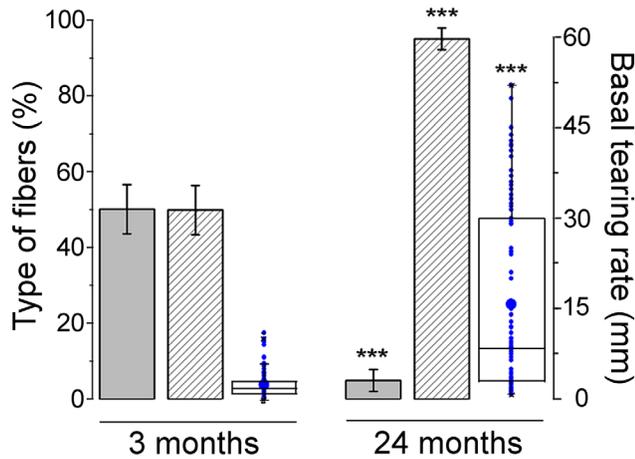
#### 3.4.2 | Peripheral terminals

In 24M mice corneas, terminals displaying an ongoing activity >2 imp·s<sup>−1</sup> at 34°C, characteristic of HB-LT cold terminals of young

**TABLE 4** Functional characteristics of corneal cold-sensitive nerve endings

Cold terminal type		Background activity (imp·s <sup>−1</sup> )	Cooling threshold (°C)	Cooling response (imp·s <sup>−1</sup> )	Successrate (%)
3-month-old mice	HB-LT	6.8 ± 1.1 (n = 12)	32.5 ± 0.2 (n = 12)	33 ± 2.2 (n = 12)	5.7
	LB-HT	0.5 ± 0.1 (n = 8)	28.1 ± 0.5 (n = 8)	6.6 ± 1.3 (n = 8)	2.6
24-month-old mice	HB-LT	4.7 ± 0.8 (n = 20)	32 ± 0.2 (n = 20)	24.6 ± 2.3 (n = 20)	4.6
	HB-HT	5.3 ± 1.2 (n = 3)	27.7 ± 0.8 (n = 3)	28.2 ± 1.0 (n = 3)	0.6
	LB-HT	0.6 ± 0.1 (n = 17)	27.1 ± 0.5 (n = 17)	6.3 ± 1.2 (n = 17)	4.0
	LB-LT	0.5 ± 0.1 (n = 11)	32.1 ± 0.3 (n = 11)	13 ± 2.6 (n = 11)	1.8

Note. Success rate percentage indicates the percentage of successful attempts of recording a terminal from each group referred to the total number of attempts. HB, high-background activity; HT, high threshold; LB, low-background activity; LT, low-threshold; *n* = number of endings.



**FIGURE 5** Change of basal tearing rate and TRPM8-EYFP<sup>+</sup> subbasal nerve fiber density with aging. Bars represent the percentage of IF fibers (gray) and WF (stripped) in 3M and 24M mice (\*\**p* < .001, *t* test). In the same age groups, individual values of basal tearing measured in mm of wet phenol red thread (small blue dots) and their mean value (large blue dot), median (horizontal line), 25th and 75th percentiles (white box limits), and 1st and 99th percentiles (×) are also represented (\*\**p* < .001, Mann–Whitney *U* test)

animals were found in  $5.1 \pm 1.1\%$  of the total recording attempts. As shown in Table 4, most of these terminals had a cooling threshold similar to HB-LT terminals of young animals, although they showed on the average lower mean values of background NTI frequency and weaker firing responses to cooling pulses. They also responded to 20  $\mu\text{M}$  menthol and to 397  $\text{mOsm}\cdot\text{L}^{-1}$  solutions with a rise in background frequency and an enhancement of the maximum NTI firing response to cooling ramps. In aged mice, we also frequently encountered (5.8% of recording sites) corneal cold terminals with very low-background activity and a weak response to cold that resembled the LB-HT units found in young animals (Table 4). Noteworthy, in 24M mice, we detected a small fraction of the spontaneously firing cold-sensitive terminals had distinctly higher thresholds for activation during cooling (HB-HT terminals in Figure 4 and Table 4). Moreover, in 24M mice, a large proportion of the terminals with very low-basal activity at 34°C exhibited a remarkable sensitivity to cold, showing cold threshold values within the range observed in the canonical HB-LT cold thermoreceptor endings, although their impulse response to cooling ramps was significantly weaker (LB-LT cold terminals of Figure 4 and Table 4). Another notable observation made in aged mice was that the probability of detecting cold-sensitive terminals either with high or low background activity at 34°C was overall higher in comparison with young mice (Table 4).

In Figure 4b, we plotted all units recorded in young and old mice according to the values of the three parameters used for their functional characterization. This representation highlights the appearance in old mice of new, functionally distinct endings (drawn in light red in the horizontal plane) exhibiting a mixture of the firing characteristics of the two classes of cold-sensitive fibers typical of younger animals.

### 3.5 | Aging alters tear's basal flow and osmolarity

Mean basal tearing flow in anesthetized 3M TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP and C57BL/6 mice was  $2.4 \pm 0.2$  mm ( $n = 66$ ). In 24M mice, tearing rate values were more variable and significantly higher than in young animals ( $15.7 \pm 1.6$  mm,  $n = 44$ ;  $p < .001$ , *t* test) (Figure 5). Notably, the values of basal tearing flow augmented in parallel with the higher proportion of WF fibers, suggesting that basal tearing rate increased in parallel with the increase of WF and the decrease of IF corneal nerve fibers observed with aging (Figure 5). Finally, we measured mean tear osmolarity in 24M, awake mice obtaining a mean value of  $354.0 \pm 2.8$   $\text{mOsm}\cdot\text{L}^{-1}$ , ( $n = 22$ ). This value was significantly higher than in young adult awake mice ( $346.3 \pm 2.4$   $\text{mOsm}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $n = 19$ ,  $p = .008$ , Mann–Whitney *U* test).

## 4 | DISCUSSION

We quantified EYFP-labeled, TRPM8-expressing TG neurons and axons in the mouse cornea, in combination with electrophysiological recordings and measures of tearing to follow their alterations with age. To our knowledge, this is the first description of aging related alterations in the morphology and function of cold thermoreceptor endings of any species.

### 4.1 | Cold-sensitive neurons and corneal nerve endings are morphologically and functionally heterogeneous

TRPM8 channels are the main molecular transducers for cold temperature sensing in mammalian thermoreceptors (Knowlton et al., 2013; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Previous studies reported marked differences in menthol sensitivity and cold threshold of individual TG and DRG neurons (Babes et al., 2004; Viana et al., 2002), which were directly associated to the amplitude of their cold-evoked TRPM8 currents (Madrid et al., 2009).

Here, we found that somatic fluorescence intensity in TRPM8-EYFP TG neurons of young adult mice correlated with the amplitude of cold- and menthol-evoked depolarizations, strongly suggesting that TRPM8 channel density is one determinant of cold sensitivity (de la Peña et al., 2005; Madrid et al., 2009; Morenilla-Palao et al., 2014; Xing et al., 2006). Other factors influencing cold sensitivity, including the variable expression of different potassium channels, were not explored in the present study (Madrid et al., 2006, 2009; Morenilla-Palao et al., 2014; Viana et al., 2002). We also found differences in EYFP fluorescence intensity and cold sensitivity among TRPM8<sup>+</sup> peripheral sensory axons of the cornea, suggesting that their functional differences are linked to TRPM8 expression as well. Small and medium-size, nonpeptidergic IF-EYFP TG neurons are the likely origin of the strongly fluorescent, beaded axons which terminate in the corneal epithelium predominantly as CGRP-negative, complex nerve endings (Alamri et al., 2015; Ivanusic et al., 2013). The remarkable high-thermal sensitivity to cold of IF-EYFP neurons are expected considering their high density of TRPM8 channels and low-Kv1 expression (Madrid

et al., 2009). Furthermore, TRPM8 likely contributes to the ongoing activity of corneal cold thermoreceptors (Parra et al., 2010). Together, these findings suggest a high expression of TRPM8 in the strongly fluorescent, beaded axons; their predominately complex endings are possibly a biophysical reason for their characteristic spontaneous firing, low threshold and vigorous response to cooling typical of HB-LT cold thermoreceptors (Carr et al., 2009; González-González et al., 2017; Madrid et al., 2009; Olivares et al., 2015; Parra et al., 2010; Teichert et al., 2012).

WF neurons represent a second population of TRPM8-expressing TG neurons and are presumably the origin of corneal TRPM8-EYFP axons characterized by fainter fluorescence, smooth surface and thin diameter, terminating as simple or ramifying endings. In all likelihood, they correspond to the LB-HT corneal cold thermoreceptors (González-González et al., 2017). WF-TRPM8<sup>+</sup> neurons are TrkA and CGRP positive, a phenotype observed in peptidergic polymodal nociceptors of other tissues (Abe et al., 2005; Knowlton et al., 2013; Takashima et al., 2007). It is worth noting that genetic deletion of TRPM8 channels or conditioned ablation of TRPM8-expressing neurons reduces markedly behavioral responses to innocuous but also to noxious cold, supporting the view that a part of the peripheral neurons expressing TRPM8 are connected to pain-labeled lines (Palkar et al., 2015). According to this interpretation, TRPM8<sup>+</sup> TG neurons are the origin of labeled sensory lines both for sensing innocuous ocular surface cooling chiefly involved in basal tearing regulation (HB-LT cold thermoreceptors) and for sensing of potentially injuring dryness, evoking discomfort, reflex tearing and blink responses (LB-HT cold thermoreceptors) (Belmonte et al., 2015, 2017; Kovács et al., 2016; Parra et al., 2010; Quallo et al., 2015).

#### 4.2 | Morphological and functional changes in TRPM8-expressing neurons and corneal endings with age

In spite of the quantitative differences in human life span, survival curves in mice resemble notably those seen in humans (Comfort, 1964). Indeed, mice have been used extensively to study the biological effects of aging (Wang & Albers, 2009). This justifies the use of TRPM8<sup>BAC</sup>-EYFP transgenic mice to analyze the morphological and functional changes in the ocular surface innervation produced by aging.

Earlier morphological studies on age-induced variations in corneal innervation yielded conflicting results. In humans, nerve density measured *in vivo* (Parissi et al., 2013) or in stained corneas (He et al., 2010) decreases with age. Notably, in rats, density of subbasal corneal nerve fibers apparently rises with aging but is accompanied by a simultaneous, progressive decline of epithelial nerve endings (Dvorscak & Marfurt, 2008). In mice, where subbasal corneal nerve density varies hugely among different strains, an overall reduction was reported in old animals (Reichard et al., 2016).

In our study, the number of TG neurons in old mice was not significantly different from younger animals suggesting that aging has a more pronounced effect on the architecture and density of peripheral sensory nerve terminal axons than on cell bodies. Nonetheless, the

percentage of TRPM8<sup>+</sup> neurons was larger, an increment that occurred mainly in the subpopulation of WF-EYFP TG neurons expressing peripherin, TrkA, and CGRP, a polymodal nociceptor immunoreactive phenotype, whereas the population of canonical low-threshold cold thermoreceptor neurons, represented by low-threshold, IF-EYFP neurons, with strongly fluorescent beaded corneal axons, remained relatively stable. Electrophysiologically, cell bodies of both IF- and WF-TRPM8<sup>+</sup> neurons of 24-month-old mice maintained the correspondence between amplitude of cold-induced depolarization and somatic fluorescence intensity seen in young animals. Moreover, they exhibit responses to cooling and menthol very similar to those shown by the corresponding neuron types of young mice, with the sole difference of a weaker response of old IF neurons to menthol. The change in the proportion of neurons with different fluorescence intensity may reflect a phenotypic change in the expression of TRPM8 by TG neurons, in parallel or combined with a higher vulnerability of IF TRPM8<sup>+</sup> neurons to aging.

In contrast with the relatively discrete changes observed in cell bodies, the morphological and functional characteristics of corneal TRPM8-EYFP axons and terminals appeared markedly altered in aged mice. The total density of subbasal corneal TRPM8-EYFP axons was significantly lower, primarily at the expenses of a very large reduction of TRPM8-EYFP beaded axons, which was partially compensated by an increased density of TRPM8-EYFP axons with smooth, thin axons. HB-LT cold-sensitive endings were still present in aged animals but generally exhibited a lower background activity and weaker responses to cooling. We interpret these changes as caused by the sharp reduction with aging of the characteristic complex branching associated to cold thermoreceptors (Ivanusic et al., 2013) leading to a smaller membrane area available for the generation of cold-induced depolarization at the terminals branches where TRPM8 channels are located (Brock et al., 2001; Carr et al., 2009; Olivares et al., 2015). In young adult mice, we attribute the distinct firing characteristics of LB-HT cold terminals to a comparatively low-TRPM8 channel density. The presence in old animals of a larger number of this type of neurons and terminals supports the tenet that they correspond to functionally impaired axons that give rise to sparser terminal branching.

Altogether, our data indicate that the morphological and functional consequences of aging appear earlier in the peripheral branches than in the soma of cold sensory neurons and vary depending on the functional subtype of neuron. Such differential effects of senescence on the distinct subclasses of sensory neurons are not entirely surprising. In other somatosensory and visceral tissues of rodents and humans, age-induced cellular and molecular changes are not reflected in simultaneous and general disturbances of all modalities of sensory innervation (Fundin et al., 1997; Namer et al., 2009; Nolano et al., 2013).

The morphological and functional modifications of corneal cold-sensitive innervation with age are part of the general, senescence-induced degenerative processes affecting primary sensory neurons, associated with DNA damage and oxidative stress (for review see Long et al., 2014). These changes are likely reflected in morphometric, ultrastructural, and functional alterations of peripheral axons that, in the case of peripheral corneal nerves, may be accelerated by the slowdown

in regeneration and remodeling of the nerve terminals that are needed to maintain the innervation of the rapidly turning over surface layers of the corneal epithelium.

#### 4.3 | Role of TRPM8-expressing endings in the altered basal tearing of aged mice

There is growing evidence that modulation of basal tearing involves TRPM8<sup>+</sup> cold fibers activated by evaporation-induced temperature and osmolality changes of the tear film (Belmonte et al., 2015, 2017). Notably, an enhancement of tearing rate developed in mice when aging progressed; tear osmolality was also slightly higher, in spite of the augmented aqueous tear flow. Paradoxically, this effect appears in parallel with a reduction in density of beaded, IF subbasal axons, whose tonic activity is expected to maintain the basal tearing of young animals (Parra et al., 2010). However, such decline in density is accompanied by an increase of WF axons and endings phenotypically associated with polymodal nociceptors, whose abnormal ongoing and cold-evoked activity could explain an irritative, augmented tear flow.

In old people diagnosed with DED, an increased tearing (epiphora) accompanying irritation and discomfort is often observed. Discomfort sensations and augmented tearing are experimentally evoked in humans by selective, strong cold receptor stimulation (Acosta et al., 2004; Kovács et al., 2016). Although epiphora in elderly people has been primarily attributed to partial or complete occlusion of the tear drainage pathways (Sousa et al., 1993), it is possible that in these patients, as in aged mice, abnormal activity of functionally impaired cold-sensitive neurons contribute to the overflow of tears. In these subjects, it is also possible that sensory signaling by cold-sensitive fibers connected to nociceptive pathways produce the unpleasant “dry eye” sensations paradoxically reported by epiphora patients.

Taken together, our study shows that aging causes a reduction of the number and functional activity of canonical low-threshold cold receptor neurons of the eye surface which contribute to maintenance tonic basal tearing and also provokes a disturbed responsiveness of high-threshold cold thermoreceptor neurons, making some of them sensitive to moderate cooling, thereby favoring the appearance of unpleasant ocular dryness sensations and irritative tearing. The disturbed equilibrium between TRPM8-expressing endings ultimately determine the changes in the quality and amount of tears observed in aged DED patients and the development of accompanying unpleasant dryness sensations.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants FC-15-GRUPIN14-141 (Consejería de Economía y Empleo, Asturias, Spain), Fundación Ramón Areces, Caja Rural de Asturias, SAF2014-54518-C3-2-R, SAF2014-54518-C3-1-R, SAF2017-83674-C2-2-R, SAF2017-83674-C2-1-R, and SAF2016-77233-R (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spain and European Regional Development Funds, European Union), and “Severo Ochoa” Program for Centers of Excellence in R&D (SEV-2013-0317). Authors thank Dr. James Brock for

critical reading of the manuscript and Paola Braga for technical assistance.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

#### ORCID

Ignacio Alcalde  <http://orcid.org/0000-0001-6051-9240>

Almudena Íñigo-Portugués  <https://orcid.org/0000-0003-4368-5495>

Juana Gallar  <https://orcid.org/0000-0002-3559-3649>

Félix Viana  <https://orcid.org/0000-0003-1439-949X>

Jesús Merayo-Llodes  <https://orcid.org/0000-0001-8168-478X>

Carlos Belmonte  <http://orcid.org/0000-0001-6891-5942>

#### REFERENCES

- Abe, J., Hosokawa, H., Okazawa, M., Kandachi, M., Sawada, Y., Yamana, K., ... Kobayashi, S. (2005). TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Molecular Brain Research*, 136(1-2), 91-98.
- Acosta, M. C., Alfaro, M. L., Borrás, F., Belmonte, C., & Gallar, J. (2006). Influence of age, gender and iris color on mechanical and chemical sensitivity of the cornea and conjunctiva. *Experimental Eye Research*, 83(4), 932-938.
- Acosta, M. C., Peral, A., Luna, C., Pintor, J., Belmonte, C., & Gallar, J. (2004). Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(7), 2333-2336.
- Alamri, A., Bron, R., Brock, J. A., & Ivanusic, J. J. (2015). Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 71.
- 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. *European Journal of Neuroscience*, 20(9), 2276-2282.
- Belmonte, C., Acosta, M. C., Merayo-Llodes, J., & Gallar, J. (2015). What causes eye pain? *Current Ophthalmology Reports*, 3(2), 111-121.
- Belmonte, C., & Gallar, J. (2011). Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(6), 3888-3892.
- Belmonte, C., Nichols, J. J., Cox, S. M., Brock, J. A., Begley, C. G., Bereiter, D. A., ... Wolffsohn, J. S. (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocular Surface*, 15(3), 404-437.
- Bergman, E., & Ulfhake, B. (1998). Loss of primary sensory neurons in the very old rat: Neuron number estimates using the disector method and confocal optical sectioning. *Journal of Comparative Neurology*, 396(2), 211-222.
- Brock, J. A., McLachlan, E. M., & Belmonte, C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *Journal of Physiology*, 512(Pt 1), 211-217.
- Brock, J. A., Pianova, S., & Belmonte, C. (2001). Differences between nerve ending impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *Journal of Physiology*, 533(Pt 2), 493-501.
- Carr, R. W., Pianova, S., McKemy, D. D., & Brock, J. A. (2009). Action potential initiation in the peripheral endings of cold-sensitive

- neurons innervating the guinea-pig cornea. *Journal of Physiology*, 587(Pt 6), 1249–1264.
- Comfort, A. (1964). *Aging: The biology of senescence*. New York, NY: Holt, Rinehart and Winston.
- Craig, J. P., Nelson, J. D., Azar, D. T., Belmonte, C., Bron, A. J., Chauhan, S. K., ... Sullivan, D. A. (2017). TFOS DEWS II report executive summary. *Ocular Surface*, 15(4), 802–812.
- de la Peña, E., Malkia, A., Cabedo, H., Belmonte, C., & Viana, F. (2005). The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurons. *Journal of Physiology*, 567(Pt 2), 415–426.
- Dvorscak, L., & Marfurt, C. F. (2008). Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(3), 910–916.
- Fundin, B. T., Bergman, E., & Ulfhake, B. (1997). Alterations in mystacial pad innervation in the aged rat. *Experimental Brain Research*, 117(2), 324–340.
- Furukawa, R. E., & Polse, K. A. (1978). Changes in tear flow accompanying aging. *American Journal of Optometry and Physiological Optics*, 55(2), 69–74.
- Gallar, J., Pozo, M. A., Tuckett, R. P., & Belmonte, C. (1993). Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *Journal of Physiology*, 468, 609–622.
- Gipson, I. K. (2013). Age-related changes and diseases of the ocular surface and cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(14), ORSF48–ORSF53.
- González-González, O., Bech, F., Gallar, J., Merayo-Llodes, J., & Belmonte, C. (2017). Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(1), 404–415.
- He, J., Bazan, N. G., & Bazan, H. E. (2010). Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Experimental Eye Research*, 91(4), 513–523.
- Hirata, H., & Meng, I. D. (2010). Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: Implications for dry eye disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(8), 3969–3976.
- Hirata, H., & Oshinsky, M. L. (2012). Ocular dryness excites two classes of corneal afferent neurons implicated in basal tearing in rats: Involvement of transient receptor potential channels. *Journal of Neurophysiology*, 107(4), 1199–1209.
- Ivanusic, J. J., Wood, R. J., & Brock, J. A. (2013). Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 521(4), 877–893.
- Knowlton, W. M., Palkar, R., Lippoldt, E. K., McCoy, D. D., Baluch, F., Chen, J., & McKemy, D. D. (2013). A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *Journal of Neuroscience: Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(7), 2837–2848.
- Kovács, I., Luna, C., Quirce, S., Mizerska, K., Callejo, G., Riestra, A., ... Gallar, J. (2016). Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain*, 157(2), 399–417.
- Lamberts, D. W., Foster, C. S., & Perry, H. D. (1979). Schirmer test after topical anesthesia and the tear meniscus height in normal eyes. *Archives of Ophthalmology*, 97(6), 1082–1085.
- Long, Y. C., Tan, T. M., Takao, I., & Tang, B. L. (2014). The biochemistry and cell biology of aging: Metabolic regulation through mitochondrial signaling. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 306(6), E581–E591.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 29(10), 3120–3131.
- Madrid, R., Donovan-Rodríguez, T., Meseguer, V., Acosta, M. C., Belmonte, C., & Viana, F. (2006). Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Journal of Neuroscience: Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(48), 12512–12525.
- Marfurt, D. F., Cox, J., Deek, S., & Dvorscak, L. (2010). Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental Eye Research*, 90(4), 478–492.
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58.
- Meng, I. D., & Kurose, M. (2013). The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. *Experimental Eye Research*, 117, 79–87.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernandez-Pena, C., Quintero, E., Weaver, J. L., Bayliss, D. A., & Viana, F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Reports*, 8(5), 1571–1582.
- Namer, B., Barta, B., Orstavik, K., Schmidt, R., Carr, R., Schmelz, M., & Handwerker, H. O. (2009). Microneurographic assessment of C-fibre function in aged healthy subjects. *Journal of Physiology*, 587(2), 419–428.
- Nolano, M., Provitera, V., Caporaso, G., Stancanelli, A., Leandri, M., Biasiotta, A., ... Truini, A. (2013). Cutaneous innervation of the human face as assessed by skin biopsy. *Journal of Anatomy*, 222(2), 161–169.
- Olivares, E., Salgado, S., Maidana, J. P., Herrera, G., Campos, M., Madrid, R., & Orio, P. (2015). TRPM8-dependent dynamic response in a mathematical model of cold thermoreceptor. *PLoS One*, 10, e0139314.
- Palkar, R., Lippoldt, E. K., & McKemy, D. D. (2015). The molecular and cellular basis of thermosensation in mammals. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 14–19.
- Parissi, M., Karanis, G., Randjelovic, S., Germundsson, J., Poletti, E., Ruggeri, A., ... Lagali, N. (2013). Standardized baseline human corneal subbasal nerve density for clinical investigations with laser-scanning in vivo confocal microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(10), 7091–7102.
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M. C., ... Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature Medicine*, 16(12), 1396–1399.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., ... Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108(5), 705–715.
- Qallo, T., Vastani, N., Horridge, E., Gentry, C., Parra, A., Moss, S., ... Bevan, S. (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature Communications*, 6, 7150.
- Reichard, M., Weiss, H., Poletti, E., Ruggeri, A., Guthoff, R. F., Stachs, O., & Baltrusch, S. (2016). Age-related changes in murine corneal nerves. *Current Eye Research*, 41(8), 1021–1028.
- Robbins, A., Kurose, M., Winterson, B. J., & Meng, I. D. (2012). Menthol activation of corneal cool cells induces TRPM8-mediated lacrimation but not nociceptive responses in rodents. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(11), 7034–7042.
- Stern, M. E., Gao, J., Siemasko, K. F., Beuerman, R. W., & Pflugfelder, S. C. (2004). The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Experimental Eye Research*, 78(3), 409–416.
- Sousa, P. C., Pinto, P., Leite, E., & Cunha-Vaz, J. G. (1993). Morphological and/or functional imagiology diagnosis of epiphora. *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 83(4), 337–348.
- Takashima, Y., Daniels, R. L., Knowlton, W., Teng, J., Liman, E. R., & McKemy, D. D. (2007). Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential

- melastatin 8 neurons. *Journal of Neuroscience: Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(51), 14147–14157.
- Teichert, R. W., Raghuraman, S., Memon, T., Cox, J. L., Foulkes, T., Rivier, J. E., & Olivera, B. M. (2012). Characterization of two neuronal subclasses through constellation pharmacology. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 109(31), 12758–12763.
- Viana, F., de la Pena, E., & Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nature Neuroscience*, 5(3), 254–260.
- Wang, S., & Albers, K. M. (2009). Behavioral and cellular level changes in the aging somatosensory system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 745–749.
- Xing, H., Ling, J., Chen, M., & Gu, J. G. (2006). Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *Journal of Neurophysiology*, 95(2), 1221–1230.

**How to cite this article:** 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. *J Comp Neurol*. 2018;526:1859–1874. <https://doi.org/10.1002/cne.24454>

## **Agradecimientos**

---

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis: Carlos, Juana y Víctor, por todo su apoyo durante estos años. Ha sido, es y será un placer aprender cada día con vosotros tanto a nivel científico como personal. Sois geniales en todos los aspectos.

Gracias a todos los compañeros de trabajo que he tenido a lo largo de estos años, muchos de ellos amigos, por hacer la ciencia más fácil y divertida y por estar siempre cerca.

Especialmente quiero dar gracias a mi madre y a mi hermana. Gracias por vuestro apoyo, por creer en mí y por quererme de manera incondicional. Por supuesto, gracias a mi pequeño Coco, por acompañarme y ser una fuente inagotable de amor. Sin vosotros no soy.

A Fernando, por estar a mi lado incluso cuando ni yo misma quiero, por ayudarme a ser mejor y por hacerme reír tanto.

No quiero olvidarme de mi familia y amigos, con los que mejor me lo paso, que siempre me recuerdan quien soy.

¡Gracias a todos!

Os quiero mucho.

