

UCH-FC
Doc. BM@N
P579
C.I

**"PAPEL DEL CANAL DE IONES TRPM8 EN LA RESPUESTA EXACERBADA
AL FRÍO POST LESIÓN EN TERMORRECEPTORES DE FRÍO CORNEALES"**

Tesis

**Entregada a la
Universidad de Chile**

En Cumplimiento Parcial de los Requisitos

Para Optar al Grado de

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular,
Celular y Neurociencias**

Facultad de Ciencias

Por

Ricardo Claudio Piña Muñoz

Agosto, 2015

Directores de Tesis:

Dr. Rodolfo Madrid Montecinos

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña



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

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Ricardo Claudio Piña Muñoz

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de Agosto de 2015.

Directores de Tesis:

Dr. Rodolfo Madrid Montecinos.....

Dr. Juan Bacigalupo Vicuña.....



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Alejandro Roth Metcalfe (Presidente).....

Dr. Sebastián Brauchi Ulloa.....

Dr. Patricio Rojas Montecinos.....

Dr. Elías Utreras Puratich.....

***"Todo mi amor está aquí y se ha quedado pegado a las rocas,
al mar, a las montañas..."***. Memorial del Detenido Desaparecido y
del Ejecutado Político, Cementerio General de Santiago de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos de financiamiento: CONICYT Anillo ACT-1113 y FONDECYT 1131064 (Dr. Rodolfo Madrid); FONDECYT 1140520 (Dr. Juan Bacigalupo); Beca de Doctorado CONICYT, Beca de Apoyo a la tesis doctoral CONICYT 21110327 y Beca de término de la tesis de Doctorado CONICYT (Ricardo Piña).

A mi familia: En primer lugar quisiera agradecer a toda mi familia por su infinita amistad. Me permito mencionar a las mujeres que me criaron, mi abuela Yolanda y mi mamá Juany, quienes han sacado adelante a nuestra familia sin importar los inconvenientes, son para nosotros un ejemplo de superación y tenacidad. También agradezco a mis dos hermanos, Maribel y Leandro y a su papá, Dagoberto, por todos los momentos compartidos a través de estos años. No puedo dejar de mencionar a mis tíos (as) Ester, Cristián, Inés, Jacqueline y Miguel por los afectos entregados. Finalmente agradecer la compañía de mis otros hermanos, mis primos, en especial a los miembros activos de los "Búfalos Mojados".

A mis tutores Rodolfo y Juan: Les doy las gracias a mis profesores por los consejos, paciencia y por toda la confianza depositada en mí. Su calidad científica y su trato gentil, fueron un constante incentivo para seguir adelante en todo momento, en especial en aquellos de incertidumbre y frustración. Sin su apoyo humano y académico esta tesis no hubiera sido posible. También agradezco los profesores integrantes de la comisión evaluadora por su disposición y participación activa, sugerencias realizadas y atención prestada en los avances.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Estoy seguro que he pasado más horas en el laboratorio que en mi casa, por eso durante estos años conocí a gente formidable con quienes he forjado una amistad. A Paulina (Jefardy), Carlos (PDI), Darwin (Darwin Maicol), Crisítan (Huaso) y Ximena (Ximonin), sempiternos amigos del mesón y de "cuentos cortos". A mi gran amigo Gonzalo (Tuti), miembro fundador de los "cuentos cortos" e incansable instructor científico. A mis "hermanots" Enrique (Enriquets) y Marcelo (El croata), por su compañerismo e infinita disposición de ayudar en todo momento. A mi amigo y compadre Matías (Er Mataias), por su humor crítico y su decisiva ayuda experimental. A mis amigos de juerga Jeremy (Don Jeremy), Richard (Co-pupilo) y Bastián (Perrito), por los buenos momentos vividos y por sus constantes críticas a mi trabajo científico; A Karina (Pradina) y Anita (Anitats) por tolerarme y consentirme; A Carola (Hello) por su alegría y trufas de chocolate. A la Dra. Pertusa y Alex por su constante apoyo y ayuda técnica. Al Dr. Morales (Socito), por esas largas horas de debate político. A los Drs. Ricardo Delgado y Casilda Mura por compartir conmigo su sabiduría experimental. Agradecer también a mis compañeros de doctorado, especialmente a Jorge Toledo por el tiempo y material facilitado y a Jorge Vera y Daniel Karmelic por enriquecer la discusión de mi trabajo. Por último mencionar al resto del personal, incluyendo a los alumnos vespertinos y media jornada. Todas las personas antes mencionadas, contribuyeron en el largo desarrollo de este proceso académico.

A los amigos de siempre: A mis amigas y colegas del Pedagógico y sus hermosas familias, a mi viejo amigo Josué, a mi amigo Seba (Mulein), a mis colegas del colegio y por último a mis ex-amigos.....a todas y a todos, muchas veces, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	v
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El sistema somatosensorial.....	1
1.1.1. Receptores somatosensoriales periféricos	3
1.1.1.1. Mecanorreceptores.....	3
1.1.1.2. Nociceptores.....	6
1.1.1.3. Termorreceptores	9
1.2. La superfamilia de los canales TRP.....	14
1.2.1. Determinantes moleculares de la termotransducción al frío	18
1.2.1.1. TRPM8	18
1.2.1.2. TRPA1.....	25
1.2.1.5. Canales de potasio tipo <i>shaker</i> K _v 1.2 y K _v 1.2	28
1.2.2. Principales canales iónicos presentes en las terminales periféricas de neuronas termorreceptoras de frío.....	30
1.3. Modificaciones en la expresión de canales iónicos en neuronas somatosensoriales primarias sometidas a daño axonal.....	31
1.4. La córnea como modelo para estudiar los receptores Somatosensoriales	40

1.4.1. Anatomía corneal y arquitectura de la inervación corneal.....	41
1.4.2. Clasificación funcional de los receptores corneales.....	46
1.4.2.1. Mecanonociceptores	47
1.4.2.2. Termorreceptores	47
1.4.2.3. Nociceptores polimodales	49
1.4.3. Lacrimación.....	51
1.4.4. La córnea como modelo de lesión periférica.....	52
2. HIPÓTESIS	54
3. OBJETIVO GENERAL	54
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
4.1. Animales	56
4.2. Lesión periférica de axones de neuronas trigeminales que inervan la córnea del ratón	57
4.3. Marcación fluorescente retrógrada de las neuronas que inervan la córnea	58
4.4. Cultivo de neuronas sensoriales intactas y lesionadas del ganglio trigémico	58
4.5. Preparación, microscopia confocal y cuantificación de la inervación en corneas	59
4.6. Imagen de Calcio	60
4.7. Electrofisiología de las terminales de frío en la córnea de ratón.....	61
4.8. Electrofisiología de neuronas del ganglio trigémico en cultivo intactas y lesionadas	62
4.9. Control de temperatura y estímulos térmicos.....	64
4.10. Inmunohistoquímica	64
4.11. Prueba de lacrimación.....	66
4.12. Análisis de datos	66

5. RESULTADOS.....	67
5.1. Desarrollo de un modelo de lesión en la córnea de ratones y marcaje retrógrado de neuronas corneales	67
5.2. La lesión corneal genera pérdida en la inervación y posterior regeneración	69
5.3. Las neuronas somatosensoriales primarias de animales lesionados presentan una respuesta individual y poblacional al frío de mayor magnitud que las neuronas de animales control.....	70
5.4. El umbral de las respuestas de frío de las NCSF control y lesionadas disminuye al bloquear la corriente de freno I_{KD}	74
5.5. La sensibilidad a mentol aumenta en las NCSF de los animales sometidos a lesión corneal.....	77
5.6. La sensibilidad a agonistas químicos de los canales de iones TRPA1 y TRPV1 no se ve modificada en las NCSF de los animales sometidos a lesión corneal respecto a los animales control	81
5.7. La densidad de la corriente de TRPM8 (I_{TRPM8}) está aumentada en las NCSF provenientes de animales lesionados.....	84
5.8. La expresión de TRPM8 revelada por inmunohistoquímica confirmó un aumento en la expresión de este canal a nivel de los ganglios trigéminos lesionados.....	88
5.9. La inmunotinción contra $K_v1.1$ y $K_v1.2$ no mostró cambios en la expresión de los canales responsables de la corriente I_{KD} en animales lesionados	89
5.10. Tanto la actividad eléctrica espontánea como aquella en respuesta a mentol están aumentadas en terminales corneales lesionadas	91
5.11. La tasa de lacrimación basal aumenta post lesión corneal	95
6. DISCUSIÓN.....	97
7. CONCLUSIONES.....	120
8. REFERENCIAS.....	122
9. ANEXO I.....	145
9.1 Otros determinantes moleculares relacionado con la termotransducción al frío.....	145
a) TRPC5.....	145

b) Canales de Potasio de <i>Background</i>	147
c) Canales HCN	150
d) Canales de Sodio sensibles a voltaje $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$	152
10. ANEXO II.....	155
10.1 Protocolo de seguimiento animal	155
10.2 Ficha Técnica Protocolo Morton y Griffiths.....	159

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización funcional y anatómica del sistema somatosensorial.....	2
Figura 2. Representación de los mecanorreceptores en la piel.....	5
Figura 3. Anatomía de los nociceptores.....	9
Figura 4. Características de los patrones de descarga de las fibras sensibles a frío.....	12
Figura 5. Árbol filogenético de los canales TRP.....	15
Figura 6. Efecto del frío sobre la corriente de TRPM8 en célula completa.....	19
Figura 7. La activación de TRPM8 por frío y mentol se explica por un desplazamiento de la curva de activación por voltaje hacia potenciales más negativos.....	21
Figura 8. Modulación de TRPM8.....	24
Figura 9. La supresión de la corriente I_{KD} induce sensibilidad a frío en neuronas de otras modalidades sensoriales en el ganglio trigémino.....	28
Figura 10. Representación esquemática de la inervación somatosensorial de la piel y los principales canales iónicos presentes en las terminales de las neuronas termorreceptoras de frío.....	32
Figura 11. Las capas de la córnea.....	42
Figura 12. Representación esquemática de la córnea y su inervación.....	44
Figura 13. Tipos de terminales que inervan la córnea.....	50

Figura 14. Papel de las terminales corneales sensibles a frío en la lacrimación.....	52
Figura 15. Lesión y marcaje retrógrado fluorescente de las neuronas trigeminales que inervan la córnea.....	68
Figura 16. Inervación y regeneración de las fibras corneales provenientes de ratones Thy-1 YFP tras la lesión.....	70
Figura 17. Sensibilidad al frío de las neuronas trigeminales que inervan la córnea provenientes de animales control y lesionadas.....	73
Figura 18. Efecto de la supresión farmacológica de la corriente I_{KD} sobre el umbral térmico de la respuesta al frío en NCSF control y lesionadas.....	76
Figura 19. Evaluación de la sensibilidad térmica y química de las neuronas corneales en cultivo mediante imagen de calcio.....	77
Figura 20. Sensibilidad química a mentol de las neuronas corneales sensibles a frío provenientes de animales controles y lesionados.....	80
Figura 21. Sensibilidad a AITC y capsaicina en las NCSF provenientes de animales control y lesionados.....	83
Figura 22. Densidad de corriente TRPM8 en NCSF provenientes de animales control y lesionados.....	86
Figura 23. Propiedades electrofisiológicas de las NCSF provenientes de animales control y lesionados.....	87
Figura 24. Inmunohistoquímica de TRPM8, $K_v1.1$ y $K_v1.2$ en ganglios trigeminos de animales control y lesionados.....	90

Figura 25. Respuestas a frío y mentol en una terminal corneal control.....	93
Figura 26. Cuantificación de la actividad eléctrica espontánea y en presencia de mentol más frío de terminales corneales de frío controles y lesionadas.....	94
Figura 27. Tasa de lacrimación en animales control y lesionados.....	96
Figura 28. Representación esquemática del modelo propuesto.....	119

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades pasivas y activas de las neuronas de frío corneales control y lesionadas en cultivo.....	87
Tabla 2. Temperatura ambiental y temperatura corneal en los experimentos de lacrimación.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados Celsius.

Ca²⁺: Ión calcio.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EGTA: Etileno glicol-bis (aminoetil eter)- N,N,N',N'- ácido tetracético.

HEPES: Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico.

Hz: Hertz.

I: Corriente eléctrica.

K⁺: Ión potasio.

M: molar.

Mg⁺²: Ión magnesio.

MΩ: mega Ohm.

mN: mili Newton.

pF: pico faradio.

pA: pico amperio.

ARN: Ácido ribonucleico.

s: Segundos.

V: Voltaje.

RESUMEN

En la córnea, la actividad eléctrica de las neuronas termorreceptoras de frío depende de la expresión funcional del canal iónico termosensible TRPM8. Estas neuronas termosensibles no sólo actúan como termorreceptores de frío, sino también como detectores de humedad de la superficie ocular. La lesión de las fibras sensoriales que inervan la córnea suele estar acompañada de disestesias, alteración en la tasa de lacrimación y cambios en la sensibilidad térmica y química. Sin embargo los mecanismos moleculares y celulares detrás de estas alteraciones en respuesta al daño axonal no se conocen en su totalidad. El objetivo de esta tesis fue estudiar los mecanismos moleculares y neurales involucrados en las alteraciones sensoriales inducidas por una lesión corneal. Para evaluar los cambios post daño axonal desarrollamos un modelo de lesión en la córnea de ratones. Utilizando las técnicas de imagen de calcio y *patch clamp* en neuronas corneales del ganglio trigémino marcadas retrógradamente, estudiamos las modificaciones en la sensibilidad térmica y química en neuronas sensibles al frío que resultan de la lesión de axones corneales en ratones. Nuestros resultados muestran que tras la lesión se produce un aumento en el porcentaje de neuronas corneales sensibles a frío, las cuales además presentan una mayor sensibilidad al frío y a mentol (agonista de TRPM8).

Cuantificamos la expresión de TRPM8 mediante inmunohistoquímica, encontrando que tras la lesión hay un mayor porcentaje de neuronas TRPM8(+) en la región oftálmica del ganglio trigémino. Para relacionar estos resultados con lo que ocurriría en las terminales corneales, registramos directamente su actividad eléctrica. Nuestros resultados muestran que la lesión induce un aumento tanto en su actividad espontánea como en su sensibilidad a mentol. También evaluamos la recuperación de las fibras sensoriales después de la lesión utilizando el ratón transgénico fluorescente Thy-1 YFP, y encontramos una reinervación parcial después de 21 días. Finalmente, complementamos nuestro estudio con la cuantificación de la tasa de lacrimación basal en animales control y lesionados, y encontramos que los animales lesionados incrementaron significativamente su tasa de lacrimación basal. Nuestros resultados sugieren que TRPM8 tiene un papel crítico en el desarrollo de una respuesta exacerbada al frío de los termorreceptores corneales en respuesta a lesión; además, sugieren que este canal termoTRP podría estar implicado en las alteraciones sensoriales y de tasa de lacrimación que ocurren en pacientes sometidos a cirugías corneales fotocorrectivas.

ABSTRACT

In the cornea, the electrical activity of cold thermoreceptors depends on the functional expression of thermosensitive ion channel TRPM8. These cold-sensitive neurons function not only as cold thermoreceptors, but also as the humidity detectors of the ocular surface. Injury of the sensory fibers innervating the cornea is frequently followed by dysesthesias, disturbance in the lacrimation rate and changes in thermal and chemical sensitivity. The molecular and cellular mechanisms underlying the alterations in response to axonal damage are not entirely understood. The aim of this thesis was to study these mechanisms. To evaluate the effects of axonal injury, we developed a model of corneal injury in mice. We studied the modifications in thermal and chemical sensitivity of cold sensitive neurons that result from the injury of corneal sensory axons in mice with calcium imaging and patch clamp techniques in retrograde-labeled corneal neurons from trigeminal ganglia. Our results show that injury leads to an increase in the percentage of corneal cold sensitive neurons and in their sensitivity to cold and menthol (a TRPM8 agonist). Using immunohistochemistry we show an increment in the percentage TRPM8-expressing neurons after injury in the ophthalmic region in trigeminal ganglion. To examine whether these results were related to the changes in the corneal terminals, we directly recorded the electrical activity of the neurons. Our results show that injury

induces an increase in the spontaneous firing rate and in menthol sensitivity. We evaluated the recovery of corneal sensory fibers after injury by making use of the Thy-1 YFP transgenic mice, and show a partial reinnervation 21 days after injury. Finally, we investigated the effect of injury in the basal tearing. We found that the basal tear flow increased significantly in the injured animals. Our results suggest that TRPM8 has a critical role in the development of exacerbated response to cold in the corneal thermoreceptors caused by corneal injury. They also suggest that this thermoTRP channel might be implicated in the sensory disturbances and increased tearing rate occurring in patients undergoing corneal photorefractive surgeries.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sistema somatosensorial

El sistema somatosensorial está constituido por fibras nerviosas cuyas terminaciones transducen la información física y química del medio en señales eléctricas, las cuales son transmitidas al sistema nervioso central. El punto de entrada de dichas señales al sistema somatosensorial son las terminales nerviosas de las neuronas sensoriales primarias que forman parte del sistema nervioso periférico. Por su morfología, las neuronas somatosensoriales primarias se clasifican como neuronas pseudounipolares, cuyo soma se encuentra ubicado en los ganglios raquídeos (GR) y trigeminales (GT). (Figura 1).

Los receptores somatosensoriales periféricos pueden clasificarse según distintos criterios que pueden abarcar el origen embrionario de los tejidos inervados (receptores somáticos y viscerales), su localización (exteroceptores e interoceptores), tipo de respuesta (tónico y fásico), etcétera. Otra clasificación ampliamente utilizada en la literatura dice relación con el tipo de estímulo que los receptores somatosensoriales son capaces de transducir: mecanorreceptores, nociceptores y termorreceptores.

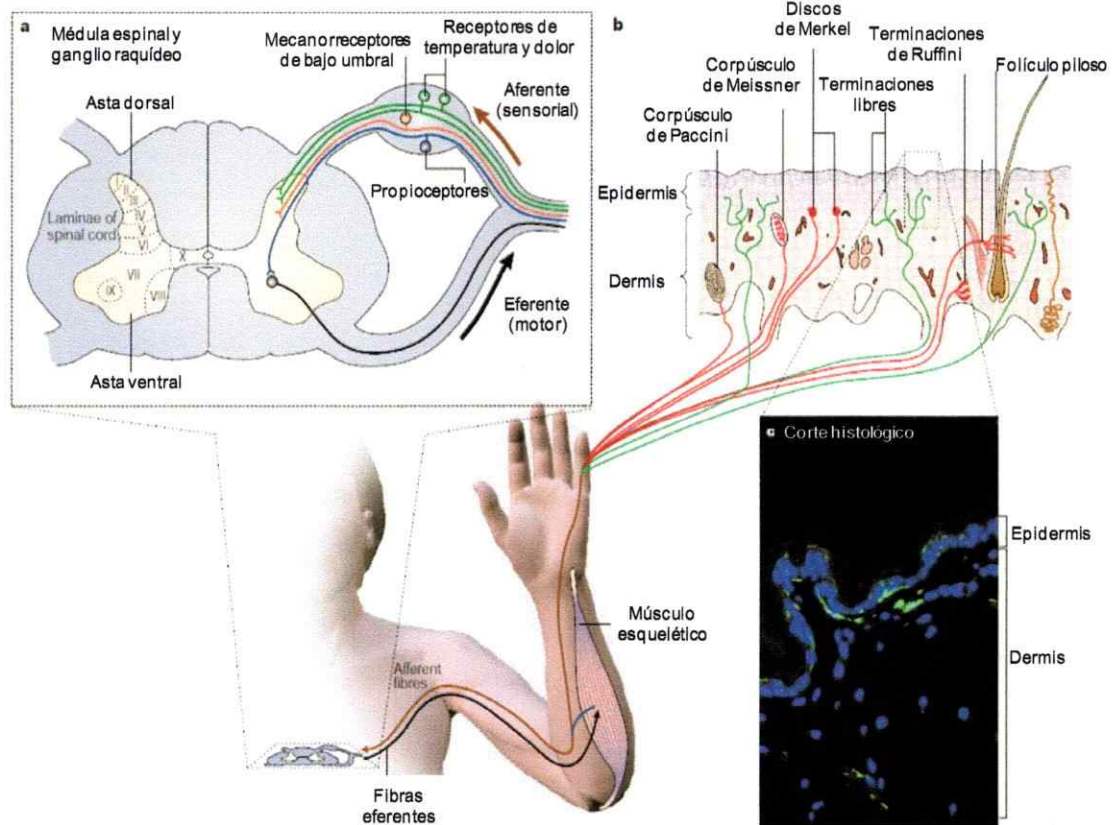


Figura 1. Organización funcional y anatómica del sistema somatosensorial. (A) Los nervios espinales son formados por la unión de raíces aferentes (sensoriales) y eferentes (motoras) y son los responsables de la inervación periférica de la piel, músculo esquelético, vísceras y glándulas. Las flechas indican la dirección de entrada sensorial (café) y salida de impulsos motores (negra). Los cuerpos celulares de las neuronas motoras se encuentran en el asta ventral de la médula espinal. Los cuerpos celulares de las neuronas somatosensoriales se localizan en los ganglios raquídeos. Dentro de los ganglios existen subclases de neuronas sensoriales conocidas como propioceptivas (azul), mecanosensores de bajo umbral (rojo) y neuronas sensibles a temperatura y estímulos potencialmente dolorosos (verde). Estas neuronas se proyectan centralmente a las interneuronas del asta dorsal y periféricamente a los tejidos blancos. **(B)** Las neuronas sensibles a temperatura y nociceptores (verde) presentan terminaciones libres y se encuentran en todas las capas de la piel, vasos sanguíneos y cerca de folículos pilosos. **(C)** Inmunofluorescencia para el marcador neuronal PGP9.5 (en verde) en sección transversal de piel que muestra las terminaciones nerviosas libres de las neuronas termorreceptoras y nociceptores. Adaptado (Patapoutian et al., 2003).

En una clasificación basada en la intensidad del estímulo necesario para iniciar una señal sensorial, las neuronas somatosensoriales primarias pueden ser separadas en neuronas de bajo umbral y de alto umbral. Bajo esta clasificación general, las neuronas receptoras de bajo umbral corresponden a termorreceptores (de frío y calor) y mecanorreceptores de bajo umbral, mientras que las neuronas receptoras de alto umbral corresponden a nociceptores, que incluyen nociceptores polimodales y mecanonociceptores. En este trabajo se seguirá la clasificación según Mountcastle (1957), la cual se basa en las modalidades de estímulos que son capaces de transducir, clasificándose así en mecanorreceptores, nociceptores y termorreceptores.

1.1.1. Receptores somatosensoriales periféricos

1.1.1.1. Mecanorreceptores

El sistema somatosensorial contiene varios tipos de mecanorreceptores, que son sensibles a la compresión, extensión y flexión de los tejidos. Estos mecanorreceptores se encuentran a través del cuerpo transduciendo energía mecánica en impulsos nerviosos (Bear M et al., 2007). Entre los mecanorreceptores podemos encontrar a los corpúsculos de Paccini, los corpúsculos de Meissner, las terminaciones nerviosas de Merkel y los corpúsculos de Ruffini (Figura 2).

Los corpúsculos de Paccini ubicados en la piel responden a vibraciones y presión mecánica. Se encuentran en capas profundas de la piel y sus campos receptivos son relativamente amplios. Cada corpúsculo recibe una fibra nerviosa gruesa mielínica, que pierde su vaina de mielina penetran en el espacio central, donde también pierde su célula de Schwann. El axón desnudo recorre el espacio central sin ramificarse hasta formar un engrosamiento terminal. Los corpúsculos de Pacini tienen respuestas de adaptación rápida (Purves et al., 2001).

Los corpúsculos de Meissner están ubicados entre las papilas dérmicas justo debajo de la epidermis de los dedos, las palmas y plantas de los pies. A diferencia de los corpúsculos de Paccini, éstos presentan campos receptivos pequeños. Son receptores de forma alargada formados por una cápsula de tejido conectivo que comprende varias láminas de células de Schwann. Los corpúsculos de Meissner son aproximadamente diez veces más pequeños que los de Paccini, midiendo 30-140 μm de longitud y 40-60 μm de diámetro. Estos mecanorreceptores se relacionan con el tacto y la vibración de baja frecuencia (30 a 40 Hz) de la piel sin pelo, sobretodo en la palma de las manos (Purves et al., 2001).

Las terminaciones nerviosas de Merkel se localizan en la epidermis y cuentan con campos receptivos pequeños. Estas terminaciones detectan cambios de presión y textura. Cada disco de Merkel consta de una terminal nerviosa y una célula epitelial aplanada. Una única fibra de un nervio aferente se ramifica para inervar hasta 90 terminaciones de discos. Es una estructura rígida no encapsulada, siendo más sensible a vibraciones de baja frecuencia, entre 5 y 15 Hz. Son clasificados mecanorreceptores de adaptación lenta (Iggo A. and Muir A., 1969).

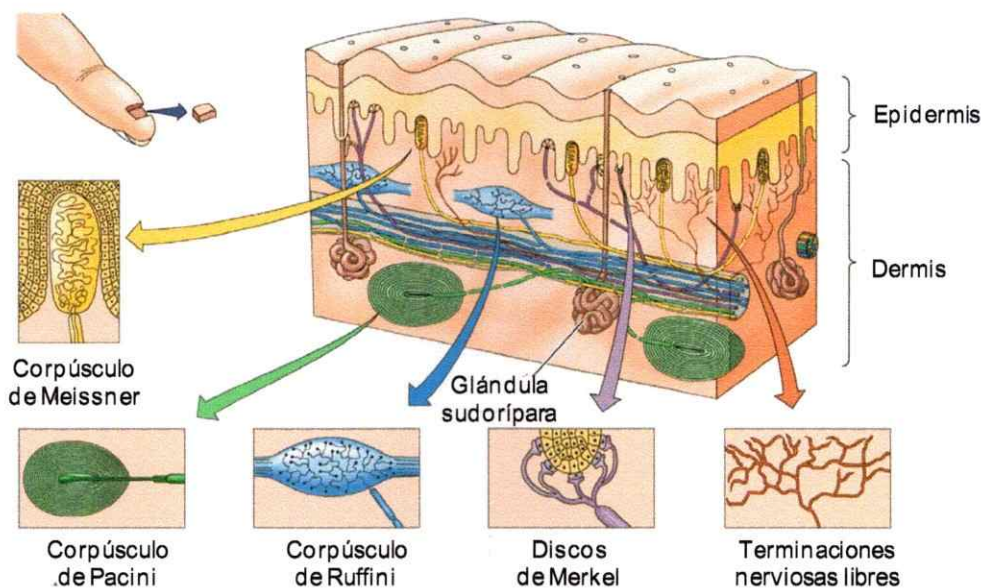


Figura 2. Representación de los mecanorreceptores en la piel. Amplificación de un trozo de la piel tomada de la punta del dedo. Se distingue la forma, distribución y profundidad de los diferentes tipos de mecanorreceptores en las capas de la piel (epidermis y dermis). Adaptado (Purves et al., 2001).

Las Terminaciones de Ruffini se ubican en la dermis y presentan campos receptivos amplios. Son ligeramente más pequeñas que los corpúsculos de Paccini y presentan una forma ovalada. Las terminaciones nerviosas están encapsuladas y se encuentran entre la dermis y el tejido subcutáneo. Los corpúsculos de Ruffini consisten en vainas de tejido conectivo con abundantes ramas que terminan en pequeñas protuberancias. Se cree que están implicados en el deslizamiento de los objetos a lo largo de la superficie de la piel, y también participan en la modulación de pinzamiento de un objeto (Pare et al., 2003; Purves et al., 2001).

1.1.1.2. Nociceptores

Los nociceptores son neuronas de alto umbral que responden a estímulos físicos y químicos potencialmente peligrosos, gatillando una sensación de dolor. De este modo, el papel fisiológico de los nociceptores radica en alertarnos de la presencia de un estímulo potencialmente dañino, detectando temperaturas y presiones extremas, así como también de agentes químicos nocivos. La activación funcional de distintos tipos o subpoblaciones de nociceptores cutáneos y su posterior procesamiento en los centros superiores provee de una amplia diversidad en el tipo de dolor percibido (Dubin and Patapoutian, 2010).

Los nociceptores polimodales responden a productos químicos irritantes, presión en exceso, frío extremo y a moduladores endógenos como la histamina. Por otro lado, los mecanonociceptores responden principalmente a estímulos mecánicos de alta energía y a temperaturas extremas. Los nociceptores representan alrededor del 60% de los receptores sensoriales totales (Adriaensen et al., 1980; Hagbarth and Vallbo, 1967; Vallbo et al., 1979), convirtiéndose en la inervación sensorial más densa del sistema somatosensorial. Se encuentran en todo el cuerpo, pero están más extensamente localizados en el periostio, la pared arterial, los dientes, la superficie articular y la bóveda craneana. Al igual que los otros receptores sensoriales, nacen de los ganglios trigéminos y raquídeos que envían una prolongación axónica a la periferia y la otra a la médula espinal o tronco encefálico (Purves et al., 2001).

Dado que los axones nociceptivos periféricos tienen terminaciones libres carentes de otras estructuras especializadas, por convención se categoriza las fibras nociceptivas según el grado de mielinización. Por otro lado, los axones de los nociceptores conducen a velocidades relativamente lentas y son escasamente mielinados o más comúnmente amielínicos (Purves et al., 2001). Según lo anterior, la información nociceptiva es transmitida por dos tipos de fibras nerviosas (Figura 3) (Dubin and Patapoutian, 2010)

a) Fibras C, las cuales corresponden a fibras amielínicas de menos de 1.5 μm de diámetro y con una velocidad de conducción de 0.5 a 2 m/s.

b) Fibras A δ , las cuales corresponden a fibras mielinizadas delgadas, con un diámetro de 1 a 5 μm y con una velocidad de conducción de 5 a 30 m/s.

Una proporción de la población de los nociceptores mecanosensibles también responden a temperaturas cercanas a los niveles dañinos (más de 40-42°C en la piel). Un aumento de la temperatura en la superficie de la piel es a menudo más eficaz que el frío para inducir una respuesta de estos receptores (Belmonte and Giraldez, 1981; Kumazawa and Mizumura, 1980). A diferencia de los receptores térmicos, los nociceptores no tienen una descarga eléctrica basal, respondiendo solo a aquellas temperaturas capaces generar lesiones.

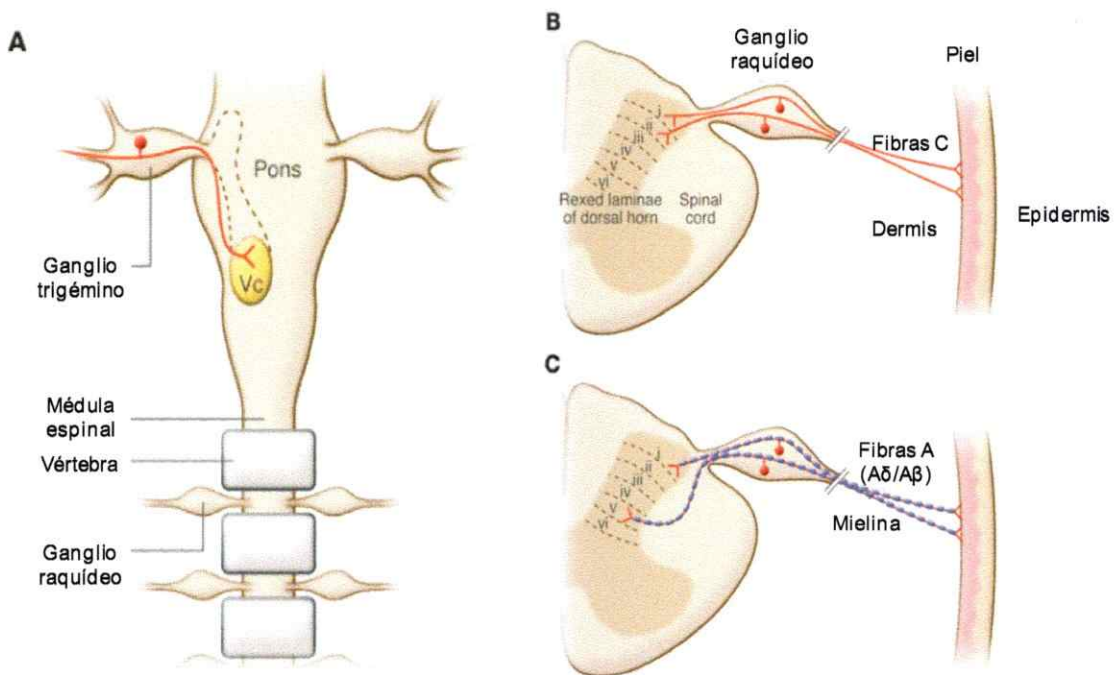


Figura 3. Anatomía de los nociceptores. (A) Las neuronas somatosensoriales están localizadas en los ganglios periféricos (ganglios trigéminos y raquídeos). Las neuronas aferentes proyectan centralmente al tronco encefálico (Vc) y al asta dorsal de la médula espinal y periféricamente hacia la piel y otros órganos. (B-C) La mayor parte de los nociceptores que inervan las piel (dermis y epidermis) corresponden a fibras C amielínicas y se encuentran representadas en rojo. Se observa la zona de sinapsis en el hasta dorsal de la medula espinal la cual corresponde a la lámina I y II. Las fibras A, se encuentran representadas en azul. La sinapsis de ellas ocurre a nivel de la lámina I y V en el hasta dorsal de la medula espinal. Por la presencia de mielina ellas presentan una velocidad de conducción mayor. Adaptado (Dubin and Patapoutian, 2010).

1.1.1.3. Termorreceptores

La presencia en la piel de sectores que pueden detectar frío y calor fue la primera evidencia de la existencia de estructuras periféricas sensoriales activadas por cambios de temperatura (Goldscheider A., 1883; Blix, 1882; Donaldson HH., 1885). Registros extracelulares llevados a cabo en fibras aferentes de ganglios cefálicos y raquídeos evidenciaron la existencia de una población de receptores con una prominente sensibilidad a estímulos térmicos.

Estas neuronas se denominaron termorreceptores y fueron subdivididos en termorreceptores de frío y termorreceptores de calor (Zotterman, 1935; Zotterman, 1936). Los termorreceptores de frío que responden a pequeños cambios de temperatura están relacionada con la detección del frío inocuo (Hensel and Iggo A., 1971; Hensel, 1981) y son el centro de este trabajo de tesis.

La distribución de los termorreceptores periféricos en la piel es irregular, ubicándose las terminales nerviosas libres en la dermis y la epidermis, siendo más numerosos los termorreceptores de frío que los de calor (Blix, 1882). La densidad de los termorreceptores varían en función del tejido innervado, tal como otros receptores; por ejemplo, los labios poseen el doble de terminales termorreceptoras que el antebrazo (Theodore C.Ruch, 1979). En condiciones fisiológicas normales, la exposición de la piel y las mucosas a bajas temperaturas puede evocar una amplia variedad de sensaciones térmicas, que va desde el confort refrescante hasta el dolor intenso (Acosta et al., 2001b; Chen et al., 1996; Craig et al., 2000; Yarnitsky and Ochoa, 1991), dependiendo de la intensidad del estímulo. El frío es detectado por termorreceptores cutáneos específicos, que incluyen las fibras aferentes primarias C amielínicas y las fibras poco mielinizadas A δ (Hensel and Zotterman, 1951; Hensel, 1981; Heppelmann et al., 1990; Iriuchijima and Zotterman, 1960).

Los primeros termorreceptores identificados mediante métodos electrofisiológicos fueron los receptores de frío localizados en la lengua de gatos (Zotterman, 1936). Los termorreceptores de frío mantienen una descarga constante de impulsos nerviosos a la temperatura basal de la piel (33°C). Frente a descensos de la temperatura incluso menores a 1°C el frío induce un aumento en la descarga de potenciales de acción, que alcanza un máximo de frecuencia (respuesta dinámica al frío) seguido de un descenso de la frecuencia aún en presencia del estímulo (respuesta estática al frío) (Hensel et al., 1960). Tanto la amplitud como la tasa de cambio de la descarga son proporcionales a la magnitud del descenso de la temperatura (Figura 4).

En los últimos años se ha determinado que estas neuronas sensibles a frío expresan una amplia variedad de canales de iones, tanto de transducción como dependientes de potencial, que determinan su excitabilidad. En las terminales nerviosas carentes de estas células termosensibles, el canal de iones TRPM8 es la principal entidad molecular encargada del desarrollo del potencial de receptor en respuesta a descensos de la temperatura (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002).

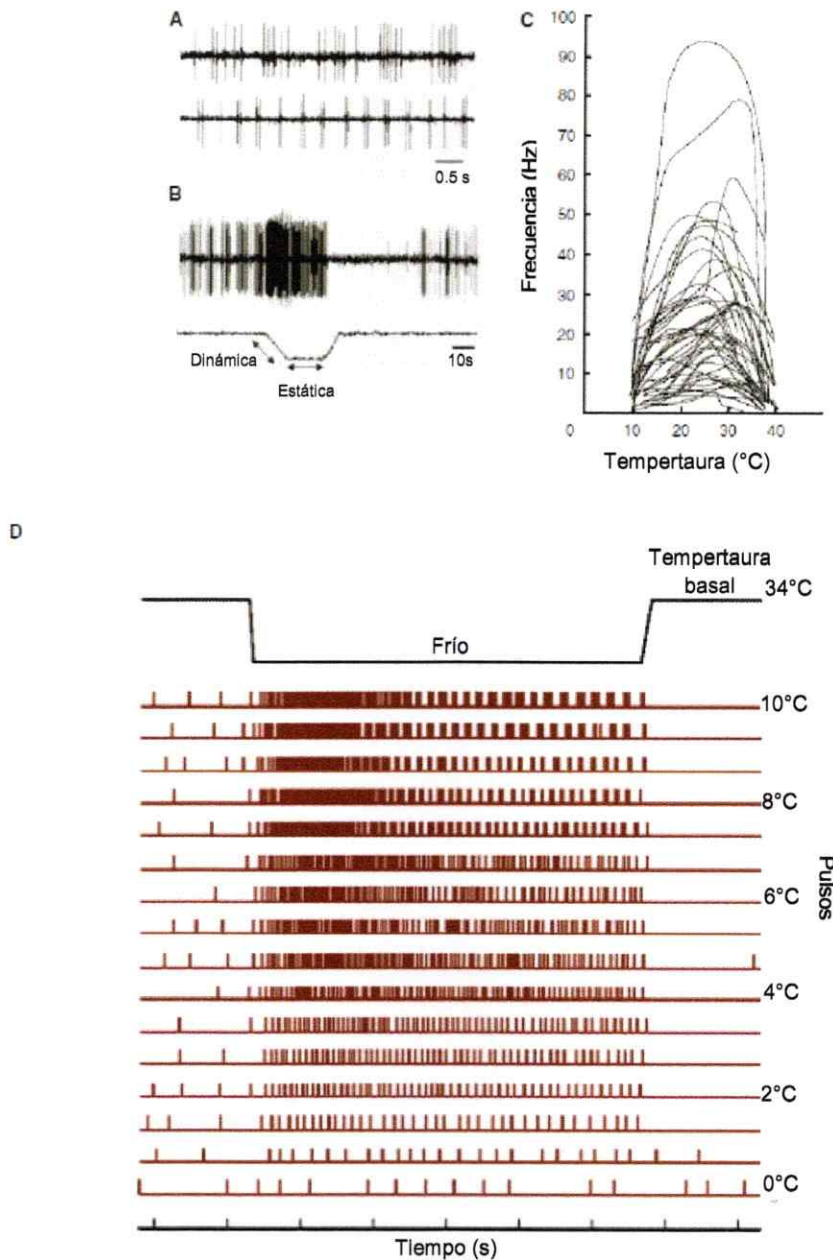


Figura 4. Características de los patrones de descarga de las fibras sensibles a frío. (A) Registro de la actividad eléctrica basal de dos fibras diferentes sensibles a frío en la esclera de gato a 32°C (B) Registro de la actividad eléctrica de terminales sensibles a frío adaptadas a una rampa de temperatura desde 35°C hasta 21°C (Gallar et al., 2003) (C) Respuesta estática de 44 fibras receptoras de frío en función de un rango de temperatura aplicado en una preparación de lengua gato (Belmonte et al., 2009; Benzing et al., 1969) (D) Frecuencia de descarga de una fibra sensible a frío en mono que aumenta con el progresivo descenso de la temperatura. Adaptado de (Darian-Smith et al., 1972).

La demostración más sólida del papel crítico de TRPM8 en el proceso de transducción del frío en los rangos inocuo y lesivo se obtuvo tras el desarrollo de ratones *knockout* (K.O.) para esta proteína. Los resultados obtenidos en los diversos estudios conductuales llevados a cabo con estos ratones muestran que, a pesar de leves discrepancias en los rangos de sensibilidad, en todos los casos la carencia de este canal se traduce en una clara deficiencia en su capacidad de responder a estímulos de frío (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007).

Los terminales de las neuronas termorreceptoras se encuentran rodeados de múltiples capas de otros tipos celulares y además presentan un pequeño tamaño, lo que hace muy difícil obtener registros eléctricos directamente desde estas estructuras. Es por esto que la gran mayoría del trabajo destinado a esclarecer los mecanismos de transducción involucrados en la respuesta a frío de las neuronas del sistema somatosensorial se ha llevado a cabo en el soma de estas células, utilizándolo como modelo de sus terminales. Esta aproximación presenta claras ventajas, como la accesibilidad de los cuerpos neuronales para el registro mediante *patch-clamp* o la posibilidad de medir la concentración intracelular de iones mediante sondas fluorescentes con relativa facilidad. Sin embargo, la relevancia de la información que se obtiene con esta estrategia está supeditada a la ausencia de eventuales modificaciones



funcionales en las proteínas destinadas a la membrana del terminal producto del proceso de aislamiento y cultivo de estas neuronas.

Hasta hoy sigue siendo la estrategia más utilizada en el estudio de las propiedades funcionales de las neuronas del sistema somatosensorial.

1.2. La superfamilia de los canales TRP

El primer miembro de la superfamilia de canales TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*) fue identificado en el ojo de la mosca *Drosophila melanogaster* como una proteína involucrada en la fototransducción. La caracterización inicial se realizó a partir de un mutante que, a diferencia del fenotipo silvestre, presentaba una respuesta despolarizante transitoria frente a un estímulo luminoso mantenido en vez de la respuesta sostenida del fenotipo silvestre. Los mutantes *trp* se conocen desde 1969 (Cosens and Manning, 1969), pero sólo décadas más tarde se describió el papel de estos receptores en la transducción de las distintas modalidades somatosensoriales (Montell, 2011).

A lo largo de los años, la superfamilia de los canales TRP se ha convertido en una de las más extensas, con representantes en una gran diversidad de especies que van desde las levaduras hasta los humanos (Huang, 2004; Montell, 2005; Pedersen et al., 2005; Ramsey et al., 2006) (Figura 5).

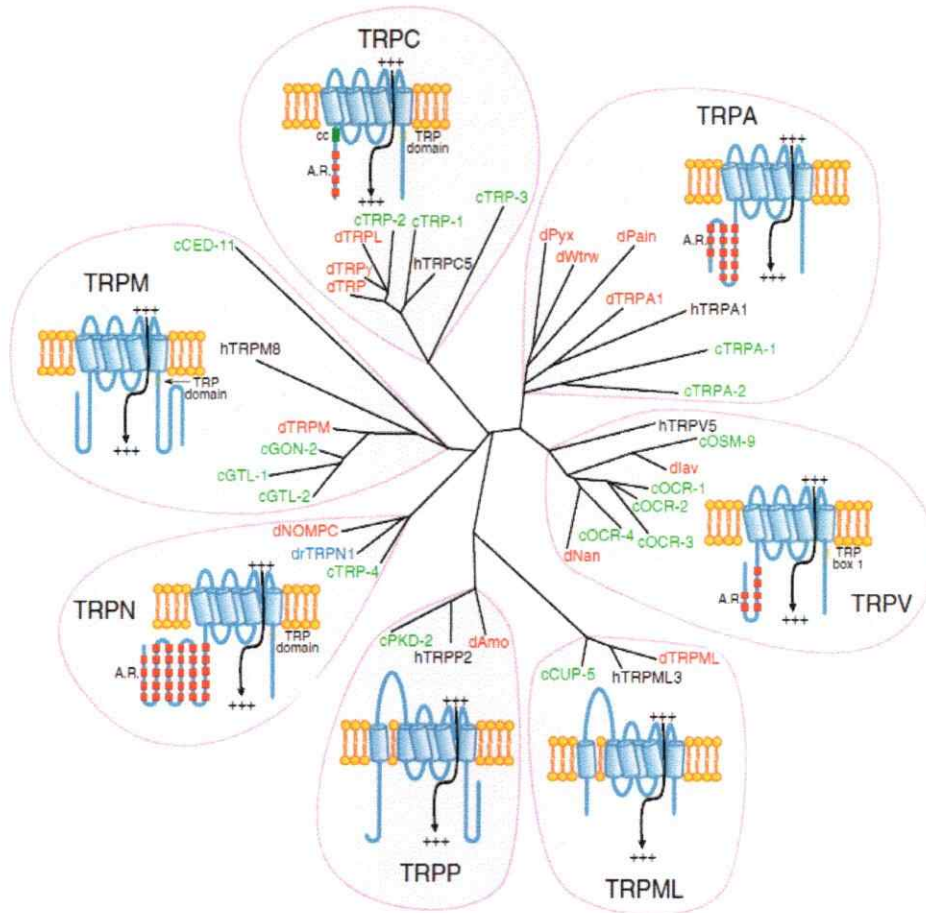


Figura 5. Árbol filogenético de los canales TRP. La figura muestra los canales TRP de *C. elegans* (c; verde), *D. melanogaster* (d; rojo), *D. rerio* (dr; azul) y *H. sapiens* (h; negro). Se indican las repeticiones de anquirina (A.R.), dominios *coiled coil* (cc) y los dominios TRP los cuales incluyen las cajas TRP 1 y 2. Al lado de cada familia, a modo de ejemplo, aparece una representación esquemática de uno de sus miembros. En el esquema se muestran los dominios transmembrana en azul. Los extremos C y N-terminales se ubican hacia el lado citoplasmático de la membrana celular. Adaptado de (Nilius and Flockerzi, 2014).

Una de las características más importantes de estos canales iónicos es que, tanto en organismos unicelulares como en pluricelulares, se encuentran mediando la interacción con el entorno. De hecho, los canales TRP participan en la detección de la temperatura, del gusto y de las feromonas, y en la generación de procesos sensoriales complejos como la visión, y el dolor (Nilius and Flockerzi, 2014).

Debido a la enorme variabilidad que presentan estos canales en cuanto a sus mecanismos de activación, regulación, función e incluso selectividad iónica, su clasificación está basada en un criterio filogenético. Como se muestra en la Figura 5, los canales TRP se dividen en 7 subfamilias según la homología de su composición aminoacídica (Venkatachalam and Montell, 2007): TRPC por *Canonical* (TRPC1-7), TRPV por *Vanilloid* (TRPV1-6), TRPM por *Melastatin* (TRPM1-8), TRPP por *Polycystin* (TRPP2, TRPP3, TRPP5), TRPA por *Ankyrin* (TRPA1), TRPML por *Mucolipin* (TRPML1-3) y TRPN (NOMPC de *no mechanoreceptor potential C*), este último presente únicamente en moscas y gusanos (Clapham, 2003).

Los canales TRP son en su mayoría catiónicos no selectivos, permitiendo un flujo de entrada de Ca^{2+} y Na^+ mayoritariamente (Venkatachalam and Montell, 2007). Así, el Ca^{2+} y Na^+ del medio extracelular ingresan a la célula a favor de su gradiente electroquímico, lo que genera un

incremento de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) y un cambio del potencial de la membrana plasmática (V_m) hacia valores más despolarizados. De manera particular, TRPM4 y TRPM5 son los únicos canales TRP activados por Ca^{2+} , pero con limitada o nula permeabilidad para este ión (Hofmann et al., 2003; Launay et al., 2002).

Desde un punto de vista estructural, los canales TRP exhiben una notable diversidad, aunque tienen algunas características en común que los une bajo la misma superfamilia. El grueso de la evidencia estructural de los canales TRP es indirecta, puesto que la reconstrucción estructural de los miembros de esta familia aún es escasa (Liao et al., 2013; Mio et al., 2007; Moiseenkova-Bell et al., 2008; Shigematsu et al., 2010). No obstante lo anterior, la evidencia actual indica que desde un punto de vista funcional los canales TRP consisten en tetrámeros con seis segmentos transmembrana (S1-S6) similares a las subunidades alfa de los canales de potasio activados por voltaje (K_v). Además el lazo hidrofílico entre los segmentos S5-S6 de cada subunidad constituye el poro de conducción (Mickle et al., 2015).

1.2.1. Determinantes moleculares de la termotransducción al frío

En fisiología el término transducción es la conversión de un estímulo en un cambio del potencial de membrana. La especificidad presentada por las terminales de las neuronas sensoriales primarias se debe a la expresión de diversos canales de iones, entre los cuales se encuentran miembros de la superfamilia TRP. Por esta razón, estos canales han sido estudiados buscando establecer su contribución a los procesos de transducción sensorial en que están envueltos (Clapham, 2003)

1.2.1.1. TRPM8

En humanos, el gen *Trpm8* está ubicado en la región 2q37.1 del cromosoma 2. Este gen abarca 102.124 bases y contiene 25 exones. *Trpm8* es transcrito en RNA mensajero, que a su vez codifica para 1.104 aminoácidos (Nilius and Flockerzi, 2014). TRPM8 es un canal catiónico no selectivo permeable al ión calcio, con una permeabilidad relativa a Ca^{2+} por sobre Na^+ ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) que ha sido estimada entre 1 y 3.3 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Al igual que ocurre con otros canales TRP, TRPM8 funciona como receptor polimodal, integrando diferentes tipos de señales (Almaraz et al., 2014; Latorre et al., 2011; Madrid and Pertusa, 2014).

Este canal termosensible se activa directamente por disminuciones de la temperatura (Figura 6). Su umbral de activación varía en un amplio rango que abarca desde los 17 a los 25°C, extendiéndose incluso hasta los 33°C en neuronas somatosensoriales primarias (de la Peña et al., 2005; Madrid et al., 2006; Malkia et al., 2007; Viana et al., 2002).

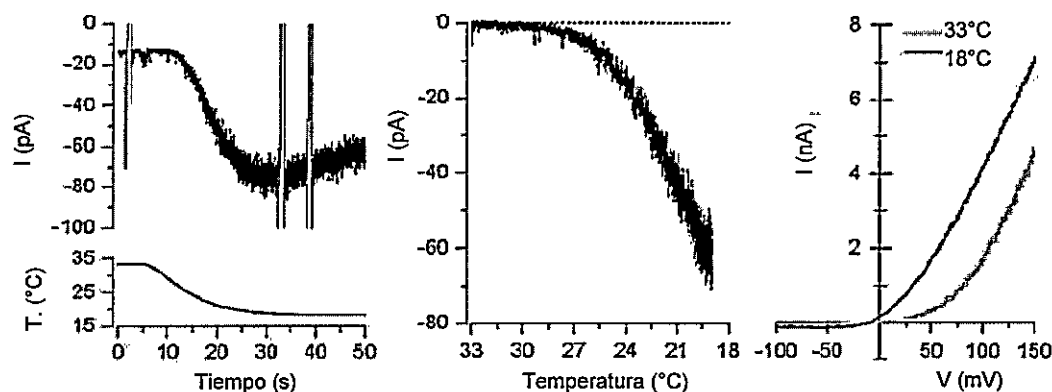


Figura 6. Efecto del frío sobre la corriente de TRPM8 en célula completa. (Izquierda) Corriente al potencial de reposo -60 mV en células HEK293 que expresan el ortólogo de rata TRPM8 durante una rampa de temperatura desde 34 a 19°C. **(Centro).** Desarrollo de una corriente de entrada en función del descenso de temperatura. **(Derecha).** Curvas I-V a 33°C y 18°C. Notar la marcada rectificación de salida. Adaptado de (Almaraz et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, algunas sustancias de origen natural (mentol) o sintéticas (icilina) que evocan sensaciones de frescor activan directamente al canal TRPM8 (McKemy et al., 2002). Este canal también es activado por voltaje, con una marcada rectificación de salida en su relación corriente-voltaje.

A temperaturas equivalentes a la temperatura basal de la piel (~33°C) y en ausencia de agonistas, se requiere un voltaje fuertemente despolarizado para conseguir una activación significativa del canal (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Tanto la disminución de la temperatura como la aplicación de agonistas resultan en un desplazamiento de la curva de activación por voltaje del canal, permitiendo que éste se abra a valores de potencial de membrana más negativos y fisiológicamente relevantes (Figura 7). El análisis termodinámico del proceso de apertura y cierre del canal revela que ocurre un importante cambio entrópico asociado al proceso de apertura del canal que da cuenta de su elevado Q_{10} .

El cambio entrópico asociado a la transición hacia el estado abierto es compensado por un cambio de entalpía equivalente que facilita la reversibilidad del proceso (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004). El mecanismo molecular que da cuenta de la activación de TRPM8 y otros canales termoTRPs por estímulos térmicos no ha sido esclarecido.

Como ya se indicó, la demostración más sólida de la participación de TRPM8 en el proceso de transducción del frío en los rangos inocuo y lesivo se obtuvo tras el desarrollo de ratones *knockout* para este canal. Por su parte, los estudios funcionales de imagen de calcio en los somas de neuronas somatosensoriales primarias y el registro directo de fibras intactas del nervio

safero de estos animales, muestran también una disminución del porcentaje de neuronas sensibles a frío y a mentol y de la magnitud de las respuestas a estos estímulos (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007), aportando un marco molecular para explicar las deficiencias sensoriales en respuesta a la estimulación con frío.

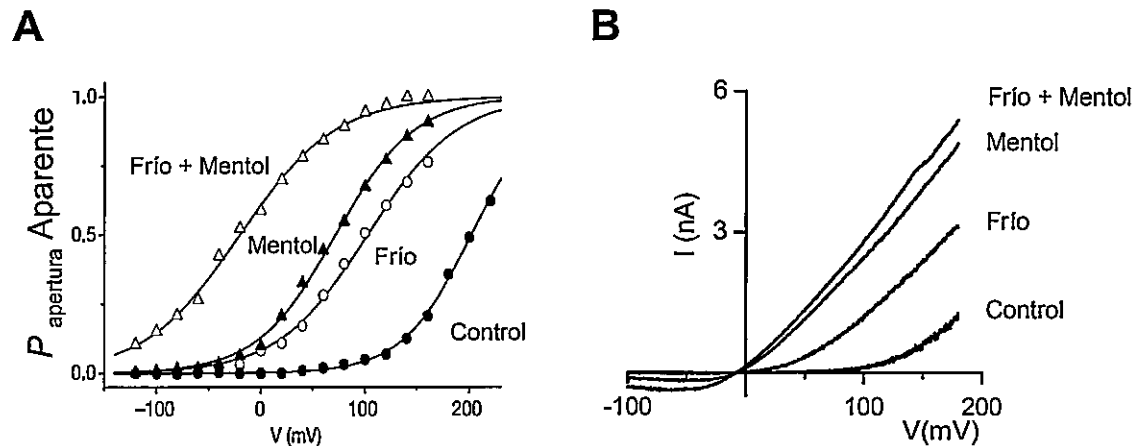


Figura 7. La activación de TRPM8 por frío y mentol se explica por un desplazamiento de la curva de activación por voltaje hacia potenciales más negativos. (A) Curvas de activación del canal TRPM8. Al representar la probabilidad de apertura del canal en función del voltaje se observa que tanto el frío como el mentol desplazan esta curva hacia valores más negativos o fisiológicamente relevantes. **(B)** Corriente de TRPM8 registrada en un sistema de expresión heteróloga (célula HEK293), en configuración de célula completa, en respuesta a rampas de -100 a +180 mV, en presencia de un estímulo de frío (20°C) (azul), mentol 100 μ M (verde), y frío (20°C) más mentol 100 μ M (rojo). El trazo en negro representa la corriente total de la célula a 32°C (condición control) en respuesta a la misma rampa. Adaptado de (Voets et al., 2004).

Se han descrito diversos mecanismos de señalización celular que están involucrados en la regulación de TRPM8 en neuronas sensoriales. Éstas incluyen interacciones lípido-proteína, proteína-proteína, cascadas de señalización intracelular y modificaciones postransduccionales (Almaraz et al., 2014; Madrid and Pertusa, 2014).

En particular se ha descrito que la activación de TRPM8 se ve disminuida por la asociación de este canal con balsas lipídicas en la membrana celular (Morenilla-Palao et al., 2009). Así mismo, el PI(4,5)P₂ (del inglés *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) es un mensajero importante en la activación de TRPM8, el cual posee dentro de su dominio TRP sitios de unión a este fosfolípido (Rohacs et al., 2005). El PI(4,5)P₂ puede activar a TRPM8 incluso en ausencia de estimulación por frío o cualquier estímulo químico (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005). Así mismo, la adaptación de TRPM8 frente a estímulos térmicos o químicos sostenidos depende del Ca²⁺ extracelular (McKemy et al., 2002). El ingreso de Ca²⁺ a través de TRPM8 activa la enzima dependiente de Ca²⁺ PLC (del inglés *Phospholipase C*), la cual reduce la actividad del canal al hidrolizar PI(4,5)P₂ (Daniels et al., 2009). TRPM8 también es regulado por proteínas quinasas. En particular la bradiquidina reduce las respuestas a mentol y frío de TRPM8 a través de mecanismos moleculares que implican la activación de una proteína G (Gq) y de la PKC (del inglés *Protein Kinase C*) (Linte et al., 2007; Premkumar et al., 2005) (Figura 8).

Por otro lado, la participación de TRPM8 en la respuesta dolorosa post lesión a la estimulación por frío inocuo ha sido confirmada mediante el uso de herramientas tanto moleculares como farmacológicas. Como ya se ha comentado, los ratones K.O. de TRPM8 presentan una reducción severa de la sensibilidad al frío en el rango de temperaturas inocuo y lesivo.

Resulta interesante que estos animales también presentan una disminución en la hipersensibilidad dolorosa al frío, tanto en modelos de respuesta inflamatoria por inyección con adyuvante completo de Freund, como en modelos de dolor neuropático inducido por ligación crónica del nervio ciático (Colburn et al., 2007). En una aproximación complementaria, el bloqueo farmacológico de TRPM8 *in vivo* ha demostrado ser también eficiente en la disminución, al menos parcial, de la hipersensibilidad al frío resultante del daño axonal periférico (Knowlton et al., 2010). La generación de animales que carecen por completo de la inervación por fibras que expresan el canal TRPM8 también ha aportado evidencias que apuntan a la implicación de estas neuronas en el desarrollo de hipersensibilidad dolorosa al frío. En este caso, se ha observado una importante reducción de la respuesta nociceptiva asociada a la estimulación por frío en los mismos modelos de respuesta inflamatoria y dolor neuropático (Knowlton et al., 2013).

Paradójicamente, algunos estudios también apuntan a la participación de estas fibras en la generación del fenómeno de analgesia asociada a la aplicación de estímulos de frío inocuo y compuestos refrescantes en condiciones fisiológicas (Knowlton et al., 2013; Proudfoot et al., 2006), aunque los mecanismos asociados a este proceso analgésico mediado por TRPM8 no han sido aclarados.

1.2.1.2. TRPA1

TRPA1 es un canal catiónico no selectivo identificado y clonado en 2003 (Story et al., 2003). Estructuralmente, TRPA1 es un tetrámero y cada una de sus subunidades poseen seis segmentos transmembrana con un poro ubicado entre las regiones S5 y S6 (Latorre, 2009). Posee en su extremo N-terminal una región conformada por 14 repeticiones de ankirina que actúan como región de interacción con elementos del citoesqueleto y como también blanco de modificaciones postraduccionales. En sistemas de expresión heteróloga, este canal responde al frío a temperaturas cercanas a los 17°C, muy por debajo del umbral de TRPM8. TRPA1 es activado tanto por sustancias irritantes como la alicina y el cinamaldehído (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Macpherson et al., 2005) como por agentes oxidantes (Andersson et al., 2008; Bessac et al., 2008; Sawada et al., 2008).

Este canal se expresa en un subgrupo de neuronas termorreceptoras que no expresan TRPM8 (Story et al., 2003). El canal TRPA1 se coexpresa con TRPV1 en una subpoblación de neuronas nociceptoras, sugiriendo que tendría un papel en la activación de los nociceptores por frío intenso (Sawada et al., 2007). Sobre la base de estas evidencias, se propuso inicialmente que TRPM8 sería el responsable de la respuesta a frío inocuo, mientras TRPA1 se expresaría en las neuronas nociceptoras y sería responsable de las respuesta a frío lesivo (Clapham, 2003). Sin embargo, esta hipótesis no toma en cuenta las

fuertes diferencias en los umbrales de activación entre los canales presentes en las terminales sensoriales intactas y los canales recombinantes. Por otro lado, tampoco considera la interrelación entre las diversas conductancias sensibles e insensibles a temperatura que están presentes en una neurona termorreceptora nativa y que dan forma a su excitabilidad.

La termosensibilidad a frío de TRPA1 ha sido tema de debate. Las posturas discordantes al respecto son por un lado que TRPA1 respondería a frío intenso y tendría un papel en la sensibilidad a frío lesivo en el sistema somatosensorial (Kwan et al., 2006; Sawada et al., 2007; Story et al., 2003). La otra visión (Zurborg et al., 2007; Doerner et al., 2007) sostiene que TRPA1 sería un canal catiónico activado por Ca^{2+} y cuya sensibilidad al frío es la equivalente a la de cualquier canal iónico "insensible" a temperatura (esto es, con un Q_{10} de ~ 2 , ver (Hille, 2001)).

Así, TRPA1 funcionaría más bien como receptor molecular de sustancias irritantes en las neuronas nociceptoras somáticas (Andersson et al., 2008; Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006; Bessac et al., 2008; Jordt et al., 2004; Sawada et al., 2008), además de tener una posible función mecanosensora (Bautista et al., 2006; Corey et al., 2004; Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007). y en contraste con las neuronas viscerales, donde TRPA1 sería el principal determinante de la sensibilidad a frío (Fajardo et al., 2008).

No obstante lo anterior, se ha descrito que la respuesta al frío es independiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Karashima et al., 2009; Sawada et al., 2007), sin excluir un papel regulador del Ca^{2+} sobre este canal (Strubing et al., 2003). Experimentos *in vitro* utilizando el ortólogo TRPA1 de humanos mantiene el debate sobre el papel de este canal en torno a su termosensibilidad (Bandell et al., 2004; Chen et al., 2013; Cordero-Morales et al., 2011; Jordt et al., 2004; Klionsky et al., 2007; Wang et al., 2013). Chen y colaboradores concluyeron que existen diferencias entre las variantes de TRPA1 de roedores versus humanos, ya que éstos últimos son incapaces de responder a frío (Chen et al., 2013).

Resultados obtenidos por Madrid y colaboradores sostienen la hipótesis que la coexpresión diferencial de canales iónicos con efectos opuestos sobre la excitabilidad neuronal puede explicar la sensibilidad a frío extremo de las neuronas sensoriales trigeminales, sin una participación significativa de TRPA1 (Madrid et al., 2009). Estos resultados fortalecen la visión que diversos mecanismos moleculares son necesarios para el desarrollo de la respuesta fisiológica a los cambios de temperatura del ambiente en la terminales sensoriales somáticas, abriendo la posibilidad que otros efectores moleculares puedan tener un papel determinante en el desarrollo de neuropatías como la sensibilidad exacerbada a estímulos térmicos.

1.2.1.5. Canales de potasio tipo shaker $K_v1.2$ y $K_v1.2$

Diversos canales de K^+ sensibles a voltaje juegan un rol en la excitabilidad de las neuronas somatosensoriales primarias. En 2002, Viana y colaboradores realizaron una caracterización más detallada de las neuronas sensibles a frío que se encuentran en los ganglios trigéminos, descubriendo que existía una correlación negativa entre la densidad de corriente I_{KD} y la sensibilidad al frío de las neuronas sensoriales primarias. Además, demostraron que frente a la aplicación de un bloqueante de canales de potasio (K_v) de amplio espectro, la 4-aminopiridina (4-AP), una subpoblación de neuronas que resultaron ser insensibles a los descensos de temperatura se transformaron en neuronas sensibles a frío (Viana et al., 2002) (Figura 9).

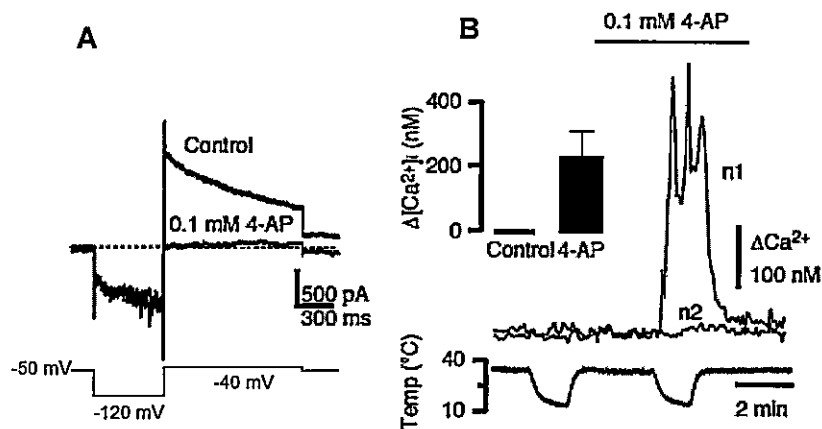


Figura 9. La supresión de la corriente I_{KD} induce sensibilidad a frío en neuronas de otras modalidades sensoriales en el ganglio trigémino. (A) Corriente de célula completa en una neurona durante un pulso de voltaje desde -50 a -120 y a -40 mV en solución control y en presencia de 4-AP (100 μ M). **(B)** Respuesta a frío inducida por bloqueo de la I_{KD} por 4-AP en una neurona insensible a frío, medida por imagen de calcio. La gráfica de barras en panel superior muestra la cuantificación de la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas transformadas, en ambas condiciones (Viana et al., 2002).

El papel fisiológico de esta corriente en el ajuste fino de la sensibilidad térmica de los termorreceptores de frío fue descrito en detalle por Madrid y colaboradores (2009). Como se indicó anteriormente, sus resultados sugieren que las neuronas sensibles al frío que presentan un umbral más bajo poseen una alta densidad de corriente mediada por TRPM8 y una baja densidad de corriente I_{KD} . Por el contrario, las neuronas que poseen un alto umbral de activación, esto es que responden a frío a temperaturas más bajas, tienen relativamente una alta expresión de I_{KD} y una menor densidad de corriente dependiente del canal TRPM8. Adicionalmente, estas neuronas de alto umbral señalizan frío doloroso al activarse (Madrid et al., 2009). La corriente de freno I_{KD} amortigua al aumento del valor del potencial de membrana en respuesta al frío desde el valor de potencial de reposo de estas neuronas (entre -50 y -60 mV), manteniéndolo por debajo del valor umbral del potencial de disparo de potenciales de acción (~-38 mV en las neuronas sensibles al frío) (Madrid et al., 2009). En la caracterización farmacológica de la corriente I_{KD} los autores utilizaron una batería de bloqueantes específicos de los canales de potasio sensibles a voltaje, llegando a la conclusión de que la entidad molecular que da cuenta de esta corriente corresponde a canales tipo *Shaker* de la familia K_v1 , coincidentes con $K_v1.1$ y $K_v1.2$. Como estos canales suelen formar heteromultímeros en membranas nativas, es muy probable que sean heteromultímeros de estos canales los responsables de esta corriente de freno (Madrid et al., 2009).

Es interesante que el bloqueo farmacológico específico de esta conductancia por 4-AP induzca una sensibilidad a frío en el soma y axones periféricos en una subpoblación de neuronas insensibles a frío (Cabanés et al., 2003; Roza et al., 2006; Viana et al., 2002). Esto sugiere que la I_{KD} es un efectivo freno de excitabilidad para estos estímulos térmicos, previniendo la activación inespecífica por enfriamiento de neuronas de otras modalidades sensoriales. Esta propiedad podría tener importantes implicancias en alteraciones sensoriales que involucren una reducción en la expresión funcional de los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$ responsables de esta corriente (González et al., 2015b; Restrepo, 2013).

1.2.2. Principales canales iónicos presentes en las terminales periféricas de neuronas termorreceptoras de frío

Junto con TRPM8, han sido señalados como elementos moleculares relevantes en la generación de la respuesta al frío en neuronas sensibles a frío el canal termosensible TRPA1, canales de Na^+ dependientes de voltaje, canales de K^+ dependientes de voltaje, canales de K^+ de fuga, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y canales HCN (Figura 10). En esta tesis, se incluye un anexo con un resumen del papel de estos canales en la termotransducción del frío (Anexo I).

Sin embargo, el cómo estos canales en conjunto con TRPM8 están organizados funcionalmente para dar forma a la respuesta al frío en estas neuronas, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas es aún materia de estudio, independiente de los grandes avances hasta ahora conseguidos (Caspani et al., 2009; Restrepo, 2013; Xing et al., 2007).

1.3. Modificaciones en la expresión de canales iónicos en neuronas somatosensoriales primarias sometidas a daño axonal

En fibras aferentes intactas la generación de impulsos nerviosos ocurre exclusivamente en las terminales sensoriales y el daño post traumatismo de estas terminales modifica drásticamente su capacidad de respuesta a estímulos físicos y/o químicos según el tipo sensorial. Las neuronas sensoriales dañadas presentan cambios en la expresión de canales iónicos involucrados en la generación y transmisión de impulsos nerviosos; entre estos canales, se incluyen varios tipos de canales de Na⁺, canales de K⁺, canales de Ca²⁺, canales HCN y canales TRP (Dray, 2008; Waxman and Zamponi, 2014).

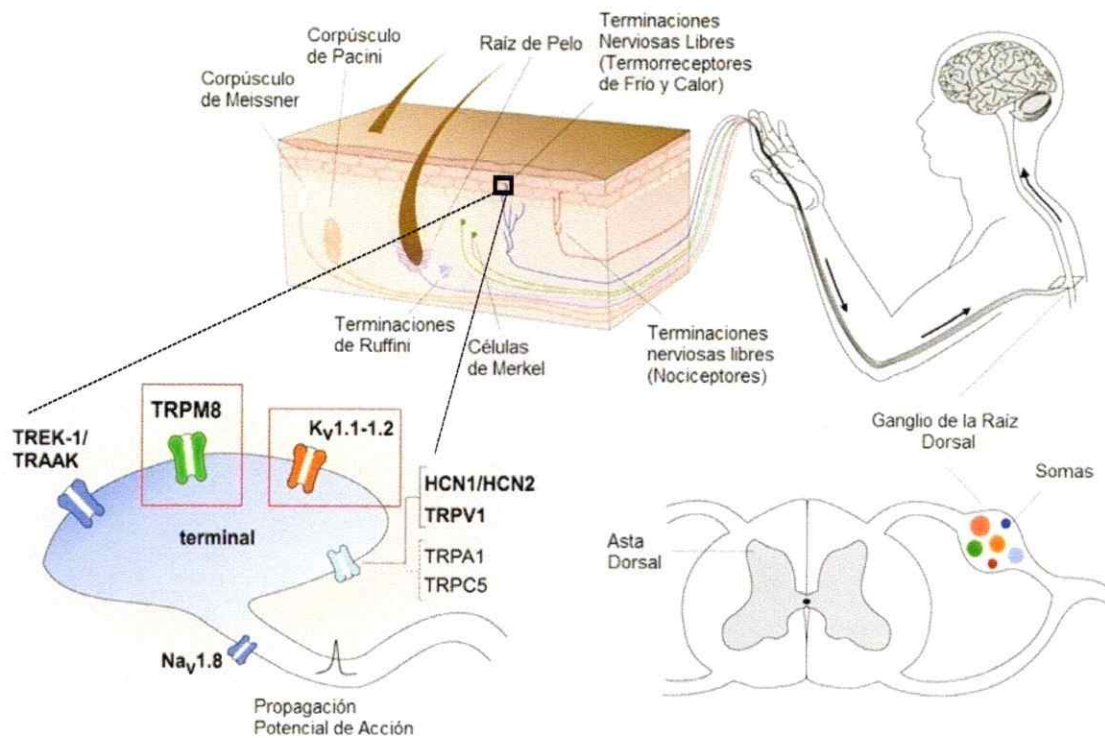


Figura 10. Representación esquemática de la inervación somatosensorial de la piel y los principales canales iónicos presentes en las terminales de las neuronas termorreceptoras de frío. La piel del tronco y las extremidades se encuentra inervada por neuronas somatosensoriales primarias cuyos somas se encuentran en los ganglios raquídeos. La transducción del estímulo térmico en un potencial de receptor ocurre en las terminaciones libres de las neuronas sensibles al frío. TRPM8 es el principal detector molecular del frío en estas neuronas. La coexpresión del canal TRPM8 con el canal activado por calor y por capsaicina TRPV1, o con el canal sensible a frío lesivo y a sustancias irritantes TRPA1 ocurre en un porcentaje variable de fibras termorreceptoras de frío de alto y de bajo umbral. Los canales $K_v1.1-1.2$ (responsables de la corriente de freno I_{KD}), TREK-1/TRAAK (responsables de la corriente de potasio de fuga termosensible) y HCN1/HCN2 (responsables de la corriente I_h) contribuyen a configurar la respuesta eléctrica neta al estímulo de frío (Modificado de González et al., 2015a).



El daño axonal produce un aumento en la expresión de un canal de Na^+ antes silente, $\text{Na}_v1.3$, y una reducción en la expresión de los genes que expresan los canales $\text{Na}_v1.8$ y $\text{Na}_v1.9$ (Waxman, 1999). Esto determina una modificación funcional en las corrientes de Na^+ , las que se desarrollan a potenciales más negativos favoreciendo el desarrollo de descargas ectópicas, típicas de los neuromas (crecimiento anómalo de una terminal nerviosa con actividad eléctrica ectópica), que se forman en las zonas lesionadas (Matzner and Devor, 1994). Un caso particular es la expresión del canal $\text{Na}_v1.7$ en terminales periféricas del ganglio trigémino en humanos sometidos a exodoncia. La extracción de piezas dentales genera una lesión en las terminales periféricas de las neuronas que inervan esa zona y que además en algunos pacientes está acompañada de dolor crónico post extracción. En 2007, un estudio llevado a cabo en neuromas provenientes de la rama mandibular del trigémino de pacientes sometidos a extracción del tercer molar reveló un aumento en la expresión del canal $\text{Na}_v1.7$ en aquellos neuromas provenientes de individuos que acusaron síntomas de dolor crónico post extracción (Bird et al., 2007). Otro ejemplo es la lesión controlada de fibras motoras en ganglios raquídeos L5, donde se ha reportado que existe un aumento post lesión en los RNA mensajeros y en la cantidad de proteínas, tanto de $\text{Na}_v1.3$ como de $\text{Na}_v1.8$ (He et al., 2010).

Algunos canales de Ca^{2+} también participarían en la regulación del dolor neuropático. Los canales de Ca^{2+} de tipo N ($\text{Ca}_v2.2$) se expresan sólo en neuronas y son críticos en la neurotransmisión del dolor. La ablación del gen que codifica para los canales de Ca^{2+} tipo N reduce el dolor inflamatorio y el dolor neuropático (Saegusa et al., 2001). El bloqueo de la liberación de neurotransmisores regulada por canales de calcio tipo N es determinante en la supresión del dolor neuropático en estos modelos.

Los canales de Ca^{2+} tipo R ($\text{Ca}_v2.3$) también tendrían un papel importante en la transmisión del dolor en neuronas sensoriales periféricas (Fang et al., 2007). En el caso de los canales de Ca^{2+} tipo T, que se expresan principalmente en la lámina superficial de la médula espinal y en los ganglios raquídeos, parecen tener un papel prominente en la regulación de la excitabilidad espinal que sigue a la estimulación repetitiva de las fibras C (Ikeda et al., 2003). Más aún, la hipersensibilidad neuronal inducida por daño se reduce en presencia de ethosuximida (Flatters and Bennett, 2004), un bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo T, el que también inhibe la alodinia (dolor causado por un estímulo de frío inocuo) en algunos modelos de dolor neuropático. Además, se ha relacionado otros canales de Ca^{2+} tipo T ($\text{Ca}_v3.2$) con el desarrollo de dolor neuropático.

La evidencia del papel de $Ca_v3.2$ proviene de estudios realizados en ganglios raquídeos de ratas con neuropatía diabética y en ganglios raquídeos provenientes de ratas sometidas a lesión constrictiva crónica del nervio ciático, evidenciándose en ambos modelos un incremento significativo de la corriente dependiente de estos canales de Ca^{2+} tipo T (Jagodic et al., 2007; Jagodic et al., 2008). Por otro lado, ratones *knockout* de $Ca_v3.2$ sometidos a pruebas conductuales en presencia de estímulos agudos de tipo mecánico, químico y térmico, mostraron una marcada disminución de sus respuestas en comparación con individuos silvestres (Choi et al., 2007).

Varios tipos de canales selectivos a K^+ relacionados con la fisiología de las neuronas sensoriales primarias tienen alterados sus patrones de expresión post lesión en nervios periféricos (Chien et al., 2007; Ishikawa et al., 1999; Kim et al., 2002; Rasband et al., 2001; Tan et al., 2006; Yang et al., 2004). En particular, el daño en terminales periféricas induce una reducción importante en los niveles de las subunidades de los canales de K^+ $K_v1.1$ y $K_v1.4$ (Yang et al., 2004). También la corriente I_{KD} podría sufrir una reducción funcional, lo que induciría respuestas exacerbadas al frío en neuronas de alto umbral y la aparición de sensibilidad al frío inocuo en nociceptores polimodales.

En un estudio reciente, Fan y colaboradores (2014) demostraron que el daño periférico causado por la ligación espinal del ganglio raquídeo lumbar L5 produce una reducción en el porcentaje de neuronas $K_v1.2(+)$ del ganglio raquídeo ipsilateral a la lesión, pero no a nivel contralateral. El rescate en los niveles de expresión de $K_v1.2$ en neuronas de este ganglio raquídeo sometidas a lesión constrictiva disminuye la aparición y mantención de la hipersensibilidad térmica y mecánica inducida por la lesión. Estos resultados sugieren que $K_v1.2$ podría ser un nuevo blanco en la elaboración de tratamientos para prevenir cuadros de dolor neuropático (Fan et al., 2014).

Existen diversos estudios que utilizando diferentes modelos de dolor neuropático han reportado cambios en la expresión de varios canales termoTRP, incluyendo TRPA1, TRPM8 y TRPV. Los ensayos conductuales llevados a cabo en estos modelos revelan la aparición de cuadros de alodinia o hiperalgesia (sensibilidad aumentada a un estímulo de frío potencialmente doloroso) post lesión. Sin embargo, los detalles moleculares de estos mecanismos son escasos e incluso muchas veces inconsistentes con otros reportes. La prueba de la acetona, es una prueba conductual sencilla, que permite evaluar la sensibilidad al frío. Utilizando esta prueba, se ha descrito que animales sometidos a una lesión constrictiva del nervio ciático aumentan su conducta nocifensiva frente estímulos de frío producidos por la evaporación de la acetona, dando cuenta de un cuadro de hipersensibilidad térmica.

Es interesante que en animales TRPM8^{-/-} esta conducta está fuertemente reducida (Colburn et al., 2007). El dolor neuropático corresponde a un tipo de dolor crónico surgido post lesión axonal que suele estar acompañado por hipersensibilidad. Mediante la lesión constrictiva a nivel de la rama espinal, como modelo de dolor neuropático, los niveles de TRPA1 aumentan en L4 y disminuyen en L5 (Ji et al., 2008; Obata et al., 2005). Utilizando el mismo modelo constrictivo a nivel espinal, Katsura y colaboradores evaluaron la incidencia de hiperalgesia al frío y los cambios de expresión de TRPA1 y TRPM8 post lesión en los ganglios raquídeos L4 y L5 de la rata (Katsura et al., 2006). Estos autores observaron un aumento en la expresión del mensajero de TRPA1 en el ganglio L4 intacto (vecino a la lesión). Esta sobreexpresión se correlacionaría directamente con la aparición y desarrollo de la hipersensibilidad al frío sin cambios aparentes en la expresión de TRPM8, tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína. A su vez, tanto TRPM8 como TRPA1 redujeron su expresión en el ganglio L5 lesionado después de la lesión. Además, estos autores reportaron que la administración de oligonucleótidos antisentido para TRPA1 suprimía considerablemente la hiperlagesia, lo que no ocurrió con la administración de oligonucleótidos antisentido para TRPM8. Los resultados de ese trabajo sugieren una contribución importante de TRPA1 pero no de TRPM8 a la hipersensibilidad al frío en este modelo de dolor neuropático (Katsura et al., 2006).

En contra de estos resultados, Persson y colaboradores (2010) encontraron que tanto los niveles de TRPA1 como de TRPM8 en ganglios raquídeos disminuyen en respuesta a lesión (Persson et al., 2010) en el mismo modelo de lesión.

Un modelo ampliamente utilizado en el estudio del dolor neuropático es la ligación constrictiva del nervio ciático (LCC). Utilizando este modelo de lesión en ratas, se encontró que los niveles de RNA mensajero de TRPM8 aumentan post daño constrictivo en neuronas de los ganglios raquídeos (Frederick et al., 2007). En el mismo modelo, se encontró mediante inmunohistoquímica un aumento en el porcentaje de neuronas TRPM8(+), en comparación a aquellas neuronas pertenecientes al grupo control (Frederick et al., 2007; Xing et al., 2007). Sin embargo, utilizando el mismo modelo de LCC en ratones se encontraron resultados opuestos a los obtenidos en ratas, esto es, una disminución en los niveles de RNA mensajero de TRPM8 y TRPA1 post lesión, a pesar que la hipersensibilidad a mentol y frío se mantuvieron (Caspani et al., 2009; Frederick et al., 2007). Sumado a lo anterior, estos autores también observaron, por medio de hibridaciones *in situ*, que el porcentaje de neuronas que expresaron TRPM8 y TRPA1 también disminuyó significativamente luego del daño axonal (Caspani et al., 2009).

Otro modelo de dolor neuropático consiste en la ligación constrictiva de alguna de las ramas del ganglio trigémino. Los resultados obtenidos utilizando este otro modelo de lesión mostraron la aparición de un cuadro de hipersensibilidad al frío en modelos de lesión de la rama maxilar del ganglio trigémino (Kernisant et al., 2008; Rossi et al., 2012; Schmid et al., 2011; Xu et al., 2008).

Siguiendo esta línea, Rossi y colaboradores (2012), por medio de una lesión constrictiva de la rama infraorbital del ganglio trigémino, generaron un cuadro de hipersensibilidad térmica reportado a través de un ensayo conductual. Este ensayo conductual consistió en suministrar líquidos a los animales obligándolos a tener contacto facial con placas termoreguladas, midiendo su respuesta aversiva frente a los cambios de temperatura. Estos autores relacionaron estos cambios conductuales con la expresión de los canales TRPM8 y TRPV1 mediante inmunohistoquímica, reportando que post lesión había un aumento porcentual en las células TRPV1(+) y un incremento en la intensidad de inmunomarcación de TRPM8, sugiriendo un posible papel de estos canales TRP en la alteración térmica descrita (Rossi et al., 2012).

1.4. La córnea como modelo para estudiar los receptores Somatosensoriales

La córnea es el lente externo transparente en la parte frontal del ojo y corresponde al tejido más densamente innervado del cuerpo (Marfurt and Ellis, 1993). En humanos, la mayoría de los nervios corneales se originan de la rama oftálmica del ganglio trigémino. La mayoría de las neuronas trigeminales destinadas a la región ocular están innervando la córnea y representa alrededor del 1.5% de las neuronas totales del ganglio (Felipe et al., 1999). La córnea presenta muchas características que la hacen un tejido único. Su transparencia es una característica esencial en su papel en el sistema visual, reflejando menos del 1% de la luz incidente (Trygve Saude, 1993). Este fenómeno se debe a una organización anatómica simple estructurada a partir de cinco capas, la ausencia de vasos sanguíneos y la ausencia de nervios mielinados (Nishida T., 2008; Trygve Saude, 1993). Por otro lado, la exposición de las terminales de estas neuronas en las capas superficiales de la cornea permite registrar directamente su actividad eléctrica (Brock et al., 1998).

También la córnea cumple otros papeles, actuando como una barrera física al ingreso de sustancias extrañas desde el ambiente (Nichols et al., 1983). Provee además una barrera inmunogénica contra la invasión de microorganismos y su innervación forma parte fundamental de los circuitos neurales que regulan la lacrimación (Stern et al., 1998).

1.4.1. Anatomía corneal y arquitectura de la inervación corneal

En humanos, la curvatura de la córnea no es uniforme. Su zona central (óptica) tiene un radio de curvatura menor que el de la periferia, y la curvatura de la cara posterior es más pronunciada que la de la anterior. Por lo tanto es más delgada en el centro (~0.8 mm) que en los bordes (~1 mm). El poder de refracción de la córnea, en función de su índice de refracción y de su radio de curvatura, es mayor que el del cristalino (Lesson et al., 1998).

La cornea se divide en cinco capas desde el interior hacia la superficie: epitelio, membrana de Bowman, estroma, capa de Descemet y endotelio (Trygve Saude, 1993) (Figura 11). El epitelio es la capa externa de la córnea (~50 μm grosor) y se clasifica como un epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Presenta una profundidad aproximada de cinco a seis capas celulares, formadas por tres tipos de células: superficiales planas, alares poligonales y basales columnares. Además, el epitelio corneal presenta una alta tasa regenerativa, por la mitosis que tiene lugar en la capa basal (Lesson et al., 1998). Este epitelio es altamente sensible por la numerosa presencia de terminales nerviosos intraepiteliales. La membrana de Bowman (~8 μm de grosor) es la siguiente capa entre el epitelio y el estroma y corresponde a una estructura acelular conformada por fibras de colágeno dispuestas irregularmente (Trygve Saude, 1993).

El estroma representa el 90% del espesor corneal, siendo su principal función mantener las características estructurales y ópticas de la córnea, que son determinadas principalmente por su estructura y composición rica en fibras de colágeno y proteoglicanos (Lesson et al., 1998). A su vez, la membrana de Descemet es una capa fina acelular formada por fibras de colágeno, que actúa como la membrana basal del endotelio corneal (Trygve Saude, 1993). El endotelio es una capa simple de células cúbicas que reviste la superficie interna de la córnea y está encargada del transporte de líquido desde la cámara anterior al estroma (Lesson et al., 1998). Al ser la córnea un tejido avascular, el endotelio se comporta como una membrana semipermeable que permite el paso del humor acuoso, el cual nutre a la cornea aportando glucosa y otros nutrientes (Meeney and Mudhar, 2013).

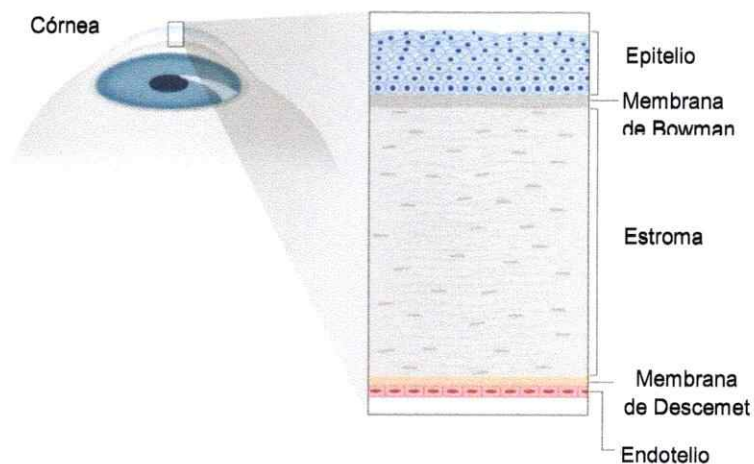


Figura 11. Las capas de la córnea. El epitelio superficial está compuesto por un tejido estratificado no secretor, que suele ser la capa más delgada. La capa de Bowman consiste en una región acelular conformada por un estroma rico en colágeno. El endotelio se comporta como una membrana semipermeable que permite el paso del humor acuoso. Adaptado de (Meeney and Mudhar, 2013).

La inervación sensorial de la córnea está anatómicamente organizada en cuatro niveles: nervios estromales, plexo subepitelial, plexo sub-basal y terminales intraepiteliales (Figura 12). Los manojos de nervios estromales penetran radialmente el estroma y sus ramas más distales se anastomosan extensamente formando una densa red de nervios denominado plexo subepitelial. Las ramas de este plexo ascienden hacia el epitelio atravesando la capa de Bowman, constituyendo el plexo sub basal. Desde este plexo los nervios se ubican horizontalmente a través del epitelio basal, ascendiendo hacia las capas más superficiales del epitelio corneal.

Las terminales libres están localizadas a través de toda la superficie del ojo a pocos micrones de distancia de la superficie. Esta cercanía de las terminales corneales con la superficie ocular permite a las terminales detectar cambios en la forma de las células epiteliales que resultan de estímulos mecánicos, cambios de temperatura o de volumen de la película lacrimal producida por desecación (frío y estímulos hiperosmóticos) (Belmonte et al., 2011).

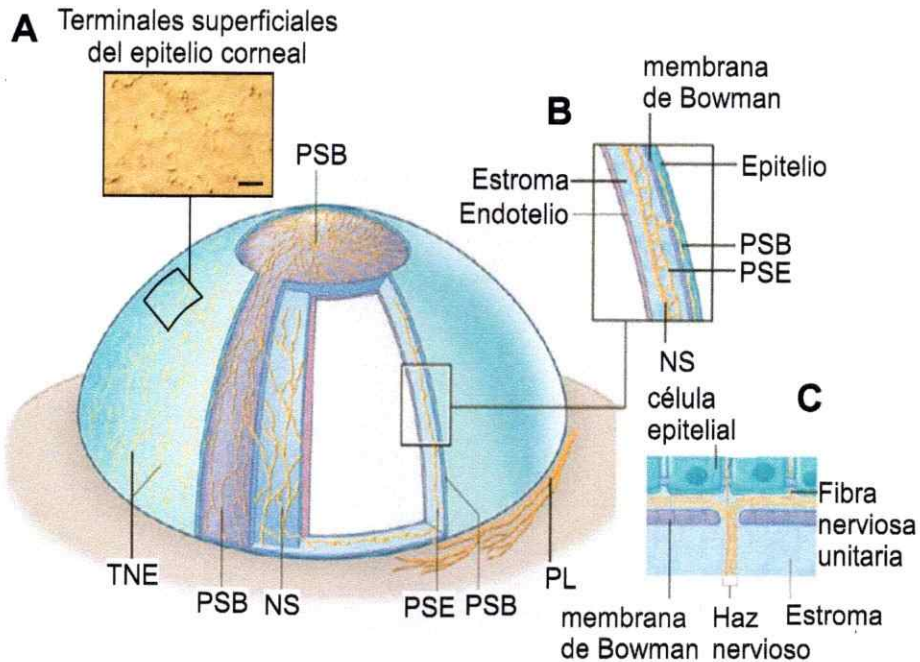


Figura 12. Representación esquemática de la córnea y su inervación. (A) El estroma es invadido radialmente desde el plexo límbico (PL) por las raíces nerviosas estromales (NS) que se dividen para formar el plexo subepitelial (PSE). Las ramas del PSE ascienden a través del epitelio, atraviesan la membrana de Bowman y forman el plexo sub basal (PSB). El inserto en la esquina superior izquierda muestra una inmunotinción contra beta tubulina clase III donde es posible apreciar las terminales sensoriales más superficiales en el epitelio corneal. La barra en negro corresponde a 5 μm . (B) Detalle de las capas e inervación de la zona media de la córnea, donde se pueden observar las ramas nerviosas estromales que forman el PSE y los haces nerviosos que atraviesan la membrana de Bowman y forman el PSB. (C) Detalle de los haces nerviosos que atraviesan la membrana de Bowman para formar el PSB. Se puede observar cómo las fibras nerviosas unitarias pasan entre las células del epitelio hacia la superficie para formar los terminales nerviosos epiteliales (TNE) (ver inserto en B). Adaptado de (Belmonte et al., 2011; Parra et al., 2010).

Como ya se mencionó, la córnea es el tejido más densamente inervado del cuerpo. Considerando que cada fibra sub basal origina al menos 10 a 20 terminales intraepiteliales, es razonable estimar que la córnea humana contiene aproximadamente 3.500 a 7.000 terminales/ mm^2 (Belmonte et al., 2011).

La densidad de terminales nerviosas, y por tanto la sensibilidad, es más alta en el centro de la córnea, decreciendo hacia la periferia. Esta densa inervación transforma a la córnea en una estructura altamente sensible, lo que implica que en principio cualquier pequeña lesión sería suficiente para gatillar una alteración sensorial (Marfurt, 2000). Tanto la sensibilidad corneal como la densidad de terminales nerviosas disminuyen en presencia de algunas patologías oculares, tras una lesión o con la edad (Dvorscak and Marfurt, 2008; Erie et al., 2005). Los nervios corneales están sujetos a un continuo remodelamiento. El seguimiento *in vivo* de ojos humanos mediante microscopia confocal ha demostrado que el plexo sub basal es una estructura dinámica, de movimientos lentos, pero continuos (5 a 15 micrones por día), que cambian su forma de espiral cada seis semanas (Marfurt, 2000). Los mecanismos moleculares responsables de estos continuos reordenamientos de los nervios corneales se desconocen (Belmonte et al., 2011).

La córnea está sujeta a daños que pueden implicar la sección de fibras nerviosas que la inervan. La capacidad de reinervación corneal depende del alcance de la lesión provocada (Shaheen et al., 2014). Independientemente del curso temporal de la reinervación, se ha comprobado que la estructura y composición de las fibras que reinervan la córnea no son un fiel reflejo del estado nativo pre lesión (Namavari et al., 2011; Patel and McGhee, 2009; Ritchey et al., 2011).

El proceso de reinervación consta de varias etapas. Una vez ocurrida la pérdida de inervación, el área denervada es invadida por brotes de fibras nerviosas vecinas intactas. Después, las fibras dañadas inician su regeneración formando microneuromas, a partir de los cuales comienzan a desarrollarse nuevos brotes, a la vez que los brotes vecinos que inicialmente habían ocupado la zona afectada comienzan a degenerar (Muller et al., 2003; Rozsa et al., 1983). No obstante lo anterior, estudios clínicos han reportado que aún dos años post cirugía LASIK (del inglés *L*aser *A*ssisted in *S*itu *K*eratomileusis) la reinervación corneal no supera el 64% de recuperación (Moilanen et al., 2008).

1.4.2. Clasificación funcional de los receptores corneales

La inervación de la superficie corneal está formada por terminales libres pertenecientes a diversos tipos de neuronas, cuyos somas se encuentran en el ganglio trigémino. Estas terminales periféricas están especializadas en la detección de varias modalidades de estímulos físicos (térmicos y mecánicos) y químicos (irritantes exógenos y mediadores endógenos). La información espacial y temporal relacionada con dichos estímulos es codificada como un patrón de disparo de impulsos característico para cada tipo de terminal (Belmonte et al., 2011) (Figura 13). Estas distintas clases funcionales de receptores sensoriales de la córnea son similares a las que se han descrito en la piel, y en analogía con estos se puede establecer una relación entre el tipo de terminal, su tamaño y grado de mielinización.

La mayor parte de las neuronas trigeminales corneales pertenecen al grupo de los nociceptores polimodales que son activados por diferentes tipos de estímulos lesivos. El resto de la inervación corneal corresponde a mecanonociceptores y termorreceptores, que en el caso de este tejido corresponden sólo a termorreceptores de frío (Belmonte et al., 2011).

1.4.2.1. Mecanonociceptores

Los mecanonociceptores constituyen aproximadamente al 20% de las neuronas sensoriales de la córnea. Éstos corresponden a fibras de tipo A δ poco mielinizadas, las cuales poseen la mayor velocidad de conducción entre las fibras que inervan la córnea (Belmonte et al., 2011). Estas terminales no presentan actividad eléctrica en condiciones de reposo, responden con una descarga fásica de potenciales de acción en respuesta a estímulos mecánicos mantenidos (Belmonte and Giraldez, 1981; Mosso and Kruger, 1973), presentan un tiempo de latencia inversamente proporcional a la amplitud del estímulo que los activa y son ligeramente menos sensibles a estímulos mecánicos que los nociceptores polimodales (Belmonte and Giraldez, 1981) (Figura 13).

1.4.2.2. Termorreceptores

Los termorreceptores de frío representan el 10 a 15% de las neuronas corneales y corresponden principalmente a fibras tipo C amielínicas, con una contribución porcentual de fibras tipo A δ que varía en función de la especie

(Acosta et al., 2001a; Hirata and Meng, 2010). Estos termorreceptores presentan actividad eléctrica espontánea, principalmente con un patrón de descargas cíclicas de impulsos nerviosos que aumenta en respuesta a descensos de temperatura incluso menores a 1°C (Brock et al., 1998). Esta respuesta es inhibida por calentamiento y sensibilizada por mentol (Brock et al., 2001; Parra et al., 2010). Responden diferencialmente a disminuciones dinámicas y estacionarias de la temperatura de la superficie corneal con incrementos acordes de la frecuencia de disparo (Acosta et al., 2001a; Brock et al., 2006; Gallar et al., 1993; Hirata and Meng, 2010; Parra et al., 2010) (Figura 13). Sus campos receptivos son más pequeños que los de los receptores polimodales, y usualmente no responden a estímulos mecánicos o de hiperosmolaridad del medio. Por otro lado, los termorreceptores de frío responden también a aumentos en la osmolaridad de la película lacrimal, con un incremento en su frecuencia de disparo (Hirata and Meng, 2010; Parra et al., 2010).

La hiperosmolaridad de la película lagrimal es una característica ubicua del síndrome del ojo seco (SOS) o DED (del inglés *Dry Eye Disease*); esta alteración sensorial de la córnea afecta alrededor del 20% de la población mundial, dependiendo de su edad y sexo (Moss et al., 2000; Schaumberg et al., 2009). Se ha descrito que el SOS modifica las respuestas a frío y mentol en neuronas sensibles a frío (Kurose and Meng, 2013). Otros reportes dan cuenta de la existencia de un tipo particular de terminales corneales sensibles a frío, que se

encuentran silentes en condiciones normales (33°C) que sólo se activan con fuertes descensos de temperatura (de alrededor de 4°C en promedio). Estas terminales corneales de alto umbral, denominadas HC-CS+DS (del inglés *High-threshold Cold Sensitive Plus Dry Sensitive*), se han relacionado con la sensación de malestar ocular (Hirata et al., 2012; Hirata and Rosenblatt, 2014). En este escenario, Hirata y colaboradores (2014) demostraron que mediante aplicación de lágrimas de alta osmolaridad se reducía el umbral de frío de estas terminales HC-CS+DS, es decir se sensibilizan, pudiendo activarse con pequeños cambios de temperatura sobre la superficie corneal (Hirata and Rosenblatt, 2014).

1.4.2.3. Nociceptores polimodales

Los nociceptores polimodales son los receptores más abundantes en la superficie de la córnea (cerca del 70% de las neuronas corneales) (Belmonte et al., 2004) y corresponden a fibras tipo C amielínicas y A δ poco mielinizadas (Belmonte and Giraldez, 1981; Giraldez et al., 1979). Estos receptores responden a diferentes tipos de estímulos. Los nociceptores están eléctricamente silentes en reposo, o presentan actividad eléctrica espontánea de muy baja frecuencia (Figura 13), la que incluso baja al disminuir la temperatura. Su umbral para estímulos mecánicos es menor que el de los mecanociceptores corneales y presentan un grado de adaptación también menor en respuesta a un estímulo mantenido (Belmonte and Giraldez, 1981; Belmonte et al., 1991; Chen et al., 1995; Gallar et al., 1993; Giraldez et al., 1979; Parra et al., 2014).

En estas neuronas, la elevación de la temperatura de la superficie corneal por encima de los 38-39°C induce el disparo de un tren de impulsos de frecuencia creciente, que alcanza un máximo y decae hasta una frecuencia menor y estable (Belmonte and Giraldez, 1981; Belmonte et al., 1991; Chen et al., 1995; Gallar et al., 1993) (Figura 13). En el caso de la disminución de la temperatura, normalmente son insensibles a estímulos en el rango de temperaturas considerado como frío inocuo, y presentan una respuesta ampliamente variable en el rango nocivo (Belmonte and Giraldez, 1981). Los nociceptores corneales responden también incrementando su frecuencia de disparo en presencia de múltiples sustancias químicas irritantes (Figura 13) y a mediadores asociados con respuestas inflamatorias como la bradiquinina (Belmonte et al., 2011).

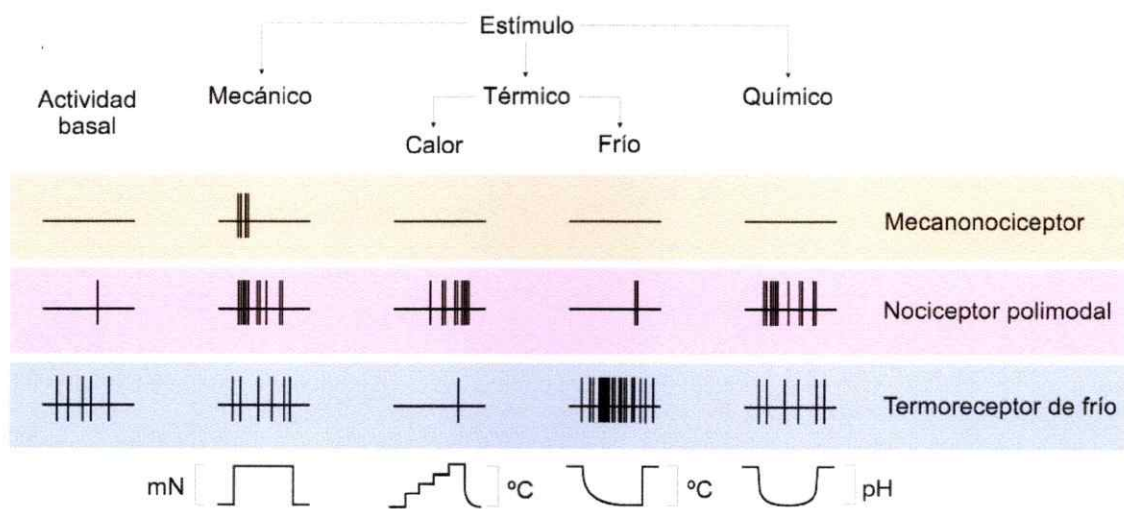


Figura 13. Tipos de terminales que inervan la córnea. Representación esquemática de la descarga de impulsos nerviosos característica de cada tipo funcional de receptor corneal en ausencia (actividad basal) y en presencia de diferentes estímulos. Adaptado de (Belmonte et al., 2011).

1.4.3. Lacrimación

La superficie corneal está cubierta por una capa lagrimal que cumple un papel fundamental en la protección, humidificación y nutrición de la superficie de este tejido. La película lagrimal es producida por un grupo especializado de glándulas y epitelios secretores y consiste de cuatro capas (glicocálix, mucosa, acuosa y lipídica) (Belmonte et al., 2011). El volumen y composición lacrimal cambian dependiendo de las condiciones ambientales, en un proceso que involucra la modulación de receptores corneales, entre los que los termorreceptores y nociceptores juegan un papel central (Acosta et al., 2004; Dartt, 2009). Los termorreceptores de frío corneales presentan una exquisita sensibilidad a descensos en la temperatura, hasta el punto que más del 50% de las terminales responde a descensos de 1°C o menos (Acosta et al., 2004; Parra et al., 2010). Este tipo de estimulación térmica inocua es equivalente a la que ocurre durante la evaporación del líquido lacrimal entre parpadeos. Su actividad eléctrica tónica es responsable del mantenimiento de la lacrimación basal por un mecanismo dependiente de neuronas sensibles al frío que expresan el canal termosensible (Acosta et al., 2004; Hirata and Oshinsky, 2012; Parra et al., 2010) (Figura 14).

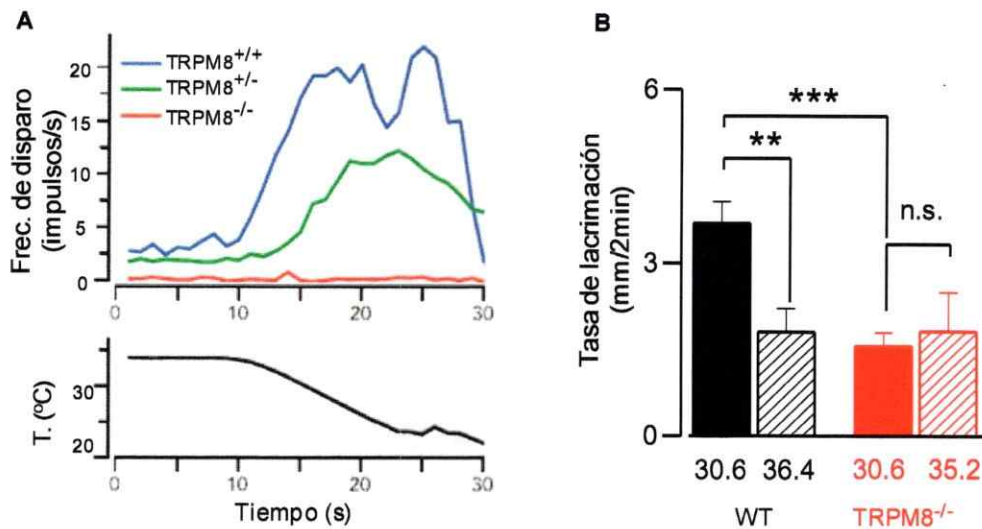


Figura 14. Papel de las terminales corneales sensibles a frío en la lacrimación. (A) Frecuencia de disparo de terminales de frío corneales provenientes de animales TRPM8^{+/+}, TRPM8^{+/-} y TRPM8^{-/-} (panel superior) durante una rampa de frío (panel inferior) (B) Tasa de lacrimación basal expresada como el promedio de impregnación de lágrimas en cintas de rojo fenol medida en milímetros para ratones silvestres (WT del inglés *Wild type*) y TRPM8^{-/-} en un lapso de dos minutos. Como indica el gráfico de barras, la ausencia de TRPM8 reduce significativamente la tasa lacrimación basal respecto al control. Adaptado de (Latorre et al., 2011; Parra et al., 2010).

1.4.4. La córnea como modelo de lesión periférica

Como ya se mencionó, diversos modelos de lesión periférica han sido utilizados en los últimos años en el estudio de los cambios de excitabilidad de las neuronas sensoriales primarias post lesión. La lesión controlada en la córnea es un modelo hasta ahora poco explorado. Cambios en la excitabilidad de las neuronas dañadas que inervan la córnea pueden ser la causa de la sensibilidad térmica y mecánica alterada y malestar local descritos por los pacientes sometidos a cirugía fotocorrectiva, las cuales persisten semanas e incluso meses después del daño sensorial durante la cirugía corneal (Acosta et al., 2004; Hovanesian et al., 2001; McCarty et al., 1996).

En esta tesis se exploraron los cambios funcionales en respuesta a lesión de las neuronas trigeminales que inervan la córnea, con el fin de establecer las bases moleculares que subyacen a los cambios de sensibilidad térmica producto del daño axonal periférico. Para este propósito utilizamos un modelo de lesión controlada en la córnea de ratón y la marcación retrógrada fluorescente de estas neuronas, donde examinamos los cambios en la sensibilidad térmica tanto de las terminales sensoriales periféricas como del soma de las neuronas trigeminales corneales en cultivo, y su relación con los cambios en la expresión del canal iónico termosensible TRPM8.

También evaluamos la expresión de los canales termoTRP TRPA1 y TRPV1 y de los canales de potasio $K_v1.1$ y $K_v1.2$. Utilizamos el ratón fluorescente Thy-1YFP para estimar la reinervación corneal post lesión y finalmente utilizamos una prueba que nos permitió medir la tasa de lacrimación basal *in vivo* para evaluar el impacto de la lesión de estas terminales a nivel funcional.

2. HIPÓTESIS

Las alteraciones sensoriales producto de cambios en la transducción del frío en neuronas corneales tras una lesión, son el resultado de un aumento en la expresión funcional de los canales de iones TRPM8 y una disminución en la expresión de los canales responsables de la corriente I_{KD} en neuronas termorreceptoras de frío.

3. OBJETIVO GENERAL

Profundizar en las bases celulares y moleculares de la termotransducción al frío post lesión en neuronas corneales, con énfasis en los cambios de expresión de los canales TRPM8 y $K_v1.1$ y $K_v1.2$, responsables de la corriente de freno I_{KD} .

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un modelo de lesión controlada en la córnea de ratón y la marcación fluorescente retrógrada de las neuronas corneales.
2. Determinar, por imagen de calcio en neuronas trigeminales en cultivo, la proporción de neuronas sensibles al frío, los cambios en sus umbrales de activación térmica y en su sensibilidad química, tanto en condiciones control como de lesión.
3. Describir en los somas de las neuronas corneales, las modificaciones en las propiedades activas y pasivas que resultan tras la lesión periférica.
4. Evaluar, mediante inmunohistoquímica, el nivel de expresión del canal termosensible TRPM8 y de los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$ en la región oftálmica de ganglios trigéminos lesionados e intactos.
5. Establecer *ex vivo*, las modificaciones en el patrón de descarga que resultan post lesión periférica de las terminales nerviosas que inervan la córnea.
6. Determinar los posibles cambios en la tasa de lacrimación basal en ratones en respuesta a la lesión de las neuronas corneales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

El manejo y cuidado de los animales se realizó siguiendo las normas bioéticas de CONICYT y de los comités de bioética de la Universidad de Santiago de Chile y de la Universidad de Chile. Los animales fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos con un régimen de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad con temperatura regulada. Los ratones fueron cruzados y luego de la aparición del tapón vaginal; las hembras preñadas se mantuvieron en jaulas separadas. Para los experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* se utilizaron machos adultos de 21 días de la cepa Balb/c. En el seguimiento de la reinervación corneal se utilizaron ratones transgénicos Thy-1 YFP adquiridos a The Jackson Laboratory (cepa B6Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J). Estos ratones expresan la proteína fluorescente YFP (Yellow Fluorescent Protein) en neuronas sensoriales y motoras, así como en sub poblaciones de neuronas del sistema nervioso central. Sus axones presentan fluorescencia hasta el final de las terminales. No hay expresión detectable de YFP en células no neuronales.

4.2. Lesión periférica de axones de neuronas trigeminales que inervan la córnea del ratón

Previo a la lesión, los animales se anestesiaron utilizando una mezcla de ketamina y xilazina (mezcla intraperitoneal, 80 mg/Kg para ketamina y 10 mg/Kg para xilazina), en suero salino con la correspondiente dosis calculada a partir de la masa corporal de cada animal. Una vez anestesiados, la lesión controlada, de ~1.5 mm de diámetro y 200 µm de profundidad se realizó mediante un corte transversal parcial en la superficie de la córnea (ojo derecho), utilizando material de disección (bisturíes oftálmicos y tijeras de precisión). Una vez finalizada la cirugía, los animales fueron mantenidos en una superficie termorregulada hasta su recuperación de la anestesia. Luego los animales se trataron con el analgésico buprenorfina, la que se aplicó el día cero cada ocho horas, los días uno y dos cada 12 horas, el día tres una vez y desde el día cuatro cada 48 horas, siempre en una dosis de 0.02-0.05 mg/Kg SC. Los animales fueron vigilados con respecto a una correcta ganancia de masa y conducta. El seguimiento post operatorio se realizó de acuerdo al Protocolo de Morton y Griffiths 1985 (Morton and Griffiths, 1985) (Anexo II).



4.3. Marcación fluorescente retrógrada de las neuronas que inervan la córnea

Para este procedimiento los animales fueron anestesiados como se describió previamente. El epitelio de la córnea del ojo derecho se removió aplicando 1-heptanol por un segundo a través de una esponja absorbente. Inmediatamente se aplicó sobre el área desepiteliada durante una hora un volumen total de 32 μ l del marcador retrógrado fluorescente FM 1-43 (5 mM en suero salino; Molecular Probes), tanto en individuos sometidos a lesión como en animales control.

4.4. Cultivo de neuronas sensoriales intactas y lesionadas del ganglio trigémino

Se llevó a cabo el cultivo de los ganglios trigéminos del mismo individuo, siguiendo el protocolo descrito por Madrid y colaboradores (Madrid et al., 2009). Una vez extraídos, los ganglios fueron incubados con una mezcla de colagenasa tipo XI (0,66 mg/ml) y dispasa (3 mg/ml) en solución INC-mix (en mM: 155 NaCl; 1,5 K₂HPO₄; 10 HEPES; 5 glucosa; pH ajustado a 7.4). La digestión enzimática se realizó a 37°C y 5% de CO₂ durante 40 minutos. Posteriormente, los ganglios se disociaron mecánicamente y las células se cultivaron en medio MEM (*Minimum Essential Medium*) (Gibco) suplementado con MEM-Vit, (MEM *Vitamin*), suero fetal bovino (Gibco) y antibióticos (penicilina/estreptomina) (Gibco). Las células posteriormente se sembraron en

cubreobjetos de 6 mm de diámetro cubiertos con poli-L-lisina. Luego de un período de reposo de 4 horas para asegurar la adhesión de las neuronas al sustrato, éstas se utilizaron durante las siguientes 24 horas para registro electrofisiológico y de imagen de $[Ca^{2+}]_i$.

4.5. Preparación, microscopia confocal y cuantificación de la inervación en corneas

Para la visualización y cuantificación de la reinervación corneal post lesión, se utilizaron ratones adultos transgénicos Thy-1 YFP. Se sacrificaron tres ratones controles, un par tres días post lesión corneal, otros dos 17 días post lesión y un tercer par 21 días post lesión. Se extrajeron sólo las córneas derechas (ipsilaterales a la lesión) las cuales fueron fijadas en tampón de fosfato salino-paraformaldehído 4% (PBS-PFA) por 30 minutos a 4°C y luego por otros 30 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados en agitación de 15 minutos con PBS. A continuación se realizaron cuatro incisiones pequeñas en los márgenes laterales de las córneas (simulando una cruz de malta) para facilitar su montaje sobre el portaobjetos. Las córneas fueron embebidas en Fluoromount G (SouthernBiotech) para luego ser recubiertas por un cubreobjetos. Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio confocal 710 (Zeiss) usando un aumento 10x y la reconstrucción de las córneas se llevó a cabo usando el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Se midió la el largo total de la inervación corneal

usando un algoritmo de medición de distancias en MATLAB, el cual contó el número de píxeles que superaron en intensidad el umbral establecido realizando la conversión de píxeles a distancia. La conversión a milímetros se realizó de acuerdo a la calibración del microscopio confocal.

4.6. Imagen de Calcio

Esta técnica no invasiva permitió el registro simultáneo de varias neuronas en cultivo a la vez. En el estudio de las neuronas sensoriales intactas y lesionadas por imagen de calcio, éstas fueron incubadas en 5 μM Fura-2AM (Molecular probes) disuelto en solución extracelular estándar suplementada con 0.02% de ácido plurónico (Invitrogen) durante 45 a 60 minutos a 37°C, en un incubador. Las mediciones de fluorescencia fueron hechas con un microscopio invertido Nikon Ti suplementado con una cámara CCD (Orca-03G, Hamamatsu). El Fura fue excitado a 340 y 380 nm con un monocromador Polychrome V de TillPhotonics, y la fluorescencia emitida se filtró a 510 nm. La señal de 340/380 fue calibrada y registrada en línea con el programa HCLImage v2.01 (Hamamatsu). La temperatura del baño fue monitoreada simultáneamente y el umbral de temperatura de las respuestas al frío se estimó como el punto medio entre el último punto de la línea base y el primero en que la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fuera 4 veces la desviación estándar de la línea base.

Se utilizó mentol (activador de TRPM8), capsaicina (activador de TRPV1), AITC (Alil Isotiocianato o aceite de mostaza, activador de TRPA1) y 4-AP (inhibidor de la corriente I_{KD}) para evaluar la expresión funcional de los canales iónicos de interés.

La conversión de la razón de fluorescencia del fura 340/380 nm a concentración de calcio (en nM), se realizó de acuerdo a la siguiente relación:

$$[Ca^{2+}] = K_d * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

Donde: $[Ca^{2+}]$: concentración de calcio; K_d : Constante de disociación aparente para el fura; R: ratio medido; R_{min} : ratio medido en ausencia de calcio ($0 Ca^{2+}$) R_{max} : ratio medido bajo condición saturante de calcio ($38 \mu M$). La K_d fue calculada determinando el ratio mínimo, el ratio máximo y el ratio a 225 nM utilizando el *kit* de calibración (Invitrogen).

4.7. Electrofisiología de las terminales de frío en la córnea de ratón

Se utilizó la preparación de ojo entero para el registro de la actividad eléctrica de terminales de frío corneales en ratones según lo descrito por Parra et al., 2010. El registro extracelular de la actividad eléctrica de neuronas corneales termosensibles, y la acción de los diferentes moduladores de los canales iónicos involucrados en su respuesta a frío y a estímulos químicos fue realizado siempre en terminales unitarias. La solución de registro fue mantenida a una temperatura basal de $34 \pm 1^\circ C$. Las pipetas de registro llenadas con solución extracelular normal ($50 \mu m$ de diámetro y pulidas) se adhirieron a la

córnea con una leve succión para lograr un sello de baja resistencia. La actividad eléctrica se registró a través de un amplificador AC, utilizando un electrodo de referencia de Ag/AgCl ubicado en la cámara de registro. La señal eléctrica fue digitalizada utilizando una interfase (Digidata 1322A, Molecular Devices) y capturada y analizada mediante el programa Clampex 10.2, acoplada a un computador. El protocolo experimental que se utilizó consistió en obtener un registro inicial de la actividad eléctrica basal en forma de potenciales de acción durante tres minutos seguido de una rampa de descenso de la temperatura desde $33 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta $23 \pm 1^\circ\text{C}$ en 50 segundos. Con estas rampas de temperatura se determinaron los umbrales térmicos utilizando como criterio el punto de temperatura en la cual la frecuencia aumentó siete veces por sobre la desviación estándar de la actividad basal. Una vez recuperada la actividad basal, se repitió este protocolo haciendo uso de mentol en distintas concentraciones micromolares por tres minutos. La respuesta máxima se obtuvo mediante la aplicación de frío más mentol.

4.8. Electrofisiología de neuronas del ganglio trigémino en cultivo intactas y lesionadas

Los registros de potencial o corriente de membrana en neuronas corneales en cultivo se llevaron a cabo con la técnica de *patch-clamp*, simultáneamente con el registro de imagen de Ca^{2+} intracelular, monitoreando la temperatura. Se utilizó la configuración de célula completa convencional. Las

pipetas de registro (4-5 M Ω) fueron hechas de vidrio capilar de borosilicato (Harvard Apparatus Ltd, UK). La solución estándar del baño contenía (en mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1.3 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, pH 7.4. La solución de la pipeta contenía (en mM): 105 gluconato de K⁺, 35 KCl, 8.8 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 4 NaATP, 0.4 NaGTP (300 mOsm/kg y pH 7.4, ajustado con KOH). Las señales de corriente y voltaje se registraron con un amplificador Axopatch 200B. La estimulación eléctrica y la adquisición de datos fueron controladas con el programa pClamp 10.2 (de Molecular Devices). Una vez identificadas las NCSF por imagen de Ca²⁺, se estudió la corriente de las neuronas sensibles a frío en respuesta a los descensos de temperatura, bajo potencial controlado y en configuración de célula completa. Las neuronas fueron mantenidas a -50 mV; mediante un pulso de 500 ms a -120 mV se removió la inactivación de la corriente de freno. Posteriormente, las células mantenidas a -50 mV se enfriaron desde la temperatura de referencia (34 \pm 1°C) hasta 19 \pm 1°C. La diferencia entre la corriente de membrana a ambas temperaturas corresponde a la corriente activada por frío ($I_{\text{frío}}$). Durante el pulso de frío se prefundió mentol sobre las neuronas en cultivo para determinar la máxima corriente dependiente de TRPM8 ($I_{\text{frío+mentol}}$). Bajo la condición de corriente controlada se determinaron las propiedades eléctricas de la membrana para caracterizar el fenotipo de los potenciales de acción de las neuronas sensibles a frío.

4.9. Control de temperatura y estímulos térmicos

Tanto las células de cultivo como los ojos *ex vivo* de ratón fueron ubicados en una microcámara de perfusión continua por gravedad con solución extracelular a $34 \pm 1^\circ\text{C}$. La temperatura basal del baño se ajustó con un termorregulador diseñado y adaptado a partir del modelo comercial RDTC-1 (ReidDan Electronics). La salida de la solución del controlador de temperatura se ubicó en la entrada de la cámara, en el caso del registro en córnea, o directamente sobre el campo de células en los registros con neuronas en cultivo. El sistema fue manejado por computador y el control de temperatura se reguló por un sistema de retroalimentación. Un termistor se ubicó en la cámara a menos de 1 mm de la zona de registro. La sensibilidad al frío fue investigada con rampas de frío de 30 segundos, que consistían en una disminución de la temperatura de referencia de $34 \pm 1^\circ\text{C}$ a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, para luego volver al valor basal.

4.10. Inmunohistoquímica

Para identificar los somas de las neuronas que inervan la córnea, 17 días post lesión se procedió al marcaje retrógrado de las terminales corneales con un marcador fluorescente. Para ello, los animales fueron anestesiados y se aplicó directamente sobre la córnea el marcador fluorescente FM 1-43 FX (5 mM; Molecular Probes) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de 4 días post marcaje (21 días post lesión) los animales controles y lesionados fueron

sacrificados y los ganglios trigéminos respectivos fueron fijados en PBS-paraformaldehído 4% por 30 minutos a 4°C y luego por otros 30 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados de 15 minutos con PBS. Posteriormente, los ganglios fueron transferidos a una solución de PBS-sacarosa 30% e incubados durante 12 horas a 4°C para preservar la integridad del tejido. Al día siguiente se procedió a la inclusión de los ganglios en OCT (Tissue Tek) enfriados en hielo seco y almacenados a -80°C. Las criosecciones (de 20 µm de espesor) se obtuvieron en un criostato MICROM HM 550, y se seleccionaron aquellas secciones que presentaron marca positiva de FM 1-43 FX para realizar los ensayos de inmunofluorescencia. Estos ensayos consistieron en una etapa de bloqueo en que las secciones fueron incubadas en PBS 1% BSA 0.2% Triton X-100 por una hora y posteriormente con 10% de suero de cabra en PBS por 30 minutos.

A continuación, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios por 12 horas a 4°C en las siguientes diluciones: anti TRPM8 (1:400), anti K_v1.1 (1:200) y anti K_v1.2 (1:200). Todos los anticuerpos primarios fueron adquiridos de Alomone Labs. Luego las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS por 10 minutos para luego ser incubadas con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) diluido 1:2000 en PBS por 5 minutos y se lavó una vez con PBS por 10 minutos. Las secciones fueron montadas empleando Fluoromount-G (SouthernBiotech) y almacenadas a 4°C.

Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio confocal 710 (Zeiss) usando un aumento 40x. La intensidad de fluorescencia asociada a la inmunodetección de TRPM8, K_v1.1 y K_v1.2 fue cuantificada con el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) y el porcentaje de neuronas positivas fue estimado según el método descrito por Rasband y colaboradores (Rasband et al., 2001).

4.11. Prueba de lacrimación

La lacrimación basal fue medida usando una hebra impregnada con rojo fenol (Zone-Quick, Menicon). Esta prueba sencilla permite medir la producción de lágrimas en un tiempo determinado. Se ubicó la hebra en el borde del párpado inferior en el ojo de interés. Para esta prueba los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (75 mg/Kg) y xilazina (10 mg/Kg). El hilo se mantuvo en el párpado inferior por dos minutos y luego de ser removido se estableció la longitud de la tinción.

4.12. Análisis de datos

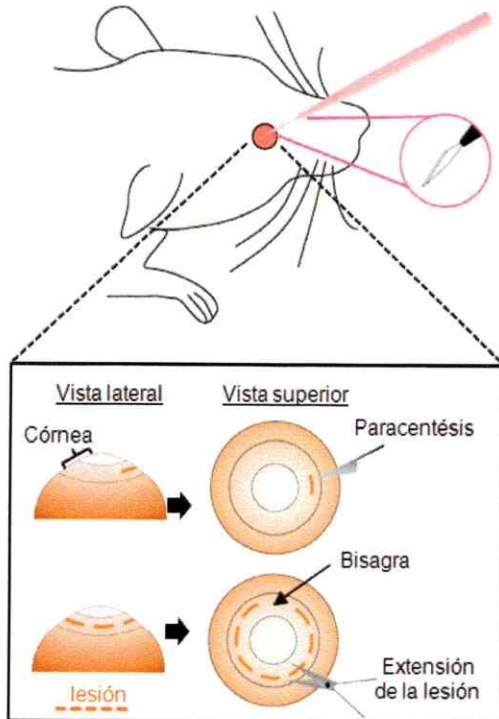
Los datos fueron reportados como media \pm error estándar de la media. La significancia estadística fue fijada en * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. El tipo de prueba estadística utilizada se señala en cada figura.

5. RESULTADOS

5.1. Desarrollo de un modelo de lesión en la córnea de ratones y marcaje retrógrado de neuronas corneales

Esta cirugía consiste en una lesión controlada capaz de penetrar el estroma corneal (parentésis) por medio de un bisturí oftálmico recto (15°), generando así un corte superficial el cual a continuación es extendido con tijeras de precisión hasta conseguir una semicircunferencia (~330°) (Figura 15A). Este procedimiento superficial evitó el vaciamiento de la cámara anterior y el traumatismo del cristalino responsable de la opacidad corneal provocada en algunos casos con una cirugía más invasiva. Para estudiar exclusivamente las neuronas trigeminales que inervan la región corneal utilizamos el marcador retrógrado soluble en agua FM 1-43 (Figura 15B). Aplicamos el marcador FM 1-43 (5 mM) en animales anestesiados, tres días antes de realizar cultivo celular. Esta ventana temporal aseguró la permanencia del marcador fluorescente en los somas neuronales. Mediante imagen de Ca^{2+} identificamos aquellas neuronas FM 1-43(+) sensibles a frío (según lo descrito en materiales y métodos), las que denominamos como **Neuronas Corneales Sensibles a Frío, o **NCSF**. Este procedimiento nos permitió caracterizar exclusivamente las NCSF corneales, tanto en condiciones control como en los animales sometidos a lesión.**

A. Representación esquemática de la lesión corneal



B. Representación esquemática de la inervación corneal

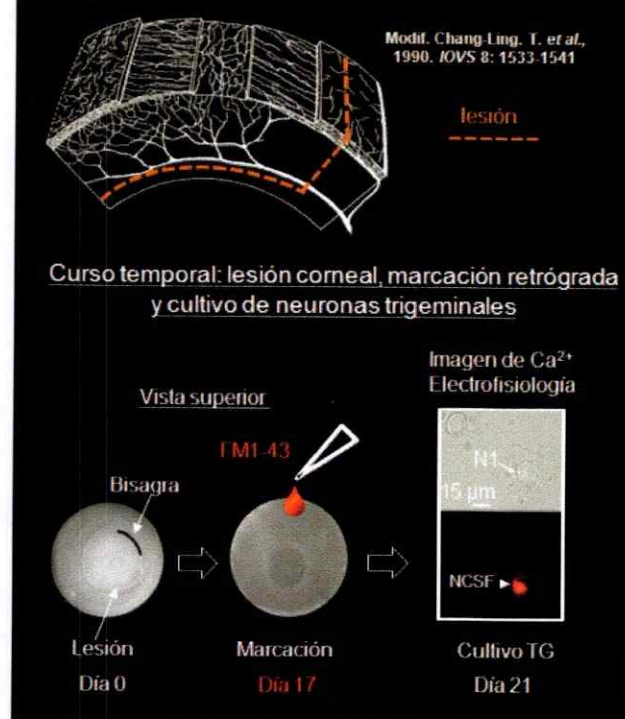


Figura 15. Lesión y marcaje retrógado fluorescente de las neuronas trigeminales que inervan la córnea. (A) La figura representa la lesión corneal detallando el bisel del cuchillo oftálmico utilizado (panel superior). También se indica la lesión sobre la córnea en vista lateral y superior. Nótese la región bisagra o zona intacta que previene el desprendimiento del segmento cortado (panel inferior). (B) Se indica la profundidad de la lesión sobre las distintas capas del tejido corneal (panel superior) y línea temporal desde la lesión hasta el día del cultivo (panel inferior).

5.2. La lesión corneal genera pérdida en la inervación y posterior regeneración

Evaluamos el impacto de la lesión, estimando la recuperación que sigue al daño tanto en las fibras totales (estromales más sub basales), como sólo en las sub basales (Figura 16E). Utilizando córneas procedentes de animales Thy-1 YFP controles y lesionados (Figura 16A-D), cuantificamos la longitud total de la inervación en córneas controles, donde el promedio fue 42.5 ± 8.4 mm (n=3) versus 1.9 ± 0.3 mm (n=2), 11.4 ± 4.2 mm (n=2) y 13.4 ± 8.8 mm (n=2) a 3, 17 y 21 días post lesión respectivamente (Figura 16F). No obstante lo anterior, las terminales corneales, cuya actividad eléctrica registramos, se originan de las fibras más superficiales o sub basales, por ello también cuantificamos por separado la longitud de éstas. En córneas intactas, la longitud promedio de las fibras sub basales fue 34.0 ± 8.0 mm (n=3), mientras que a los días post lesión 3, 17 y 21 las longitudes promedio fueron de 0.05 ± 0.05 mm (n=2), 9.4 ± 3.3 mm (n=2) y 10.2 ± 6.7 mm (n=2) para cada caso (Figura 17G). Estos resultados muestran que la lesión realizada trae consigo una pérdida importante la inervación corneal. Por otro lado, dentro de la ventana temporal propuesta en nuestro diseño experimental, hay cabida para una regeneración importante de las fibras, lo que permite obtener un marcaje retrógrado eficiente y registrar la actividad eléctrica en las terminales de los termorreceptores de frío corneales, tanto en animales control como lesionados (ver más adelante).

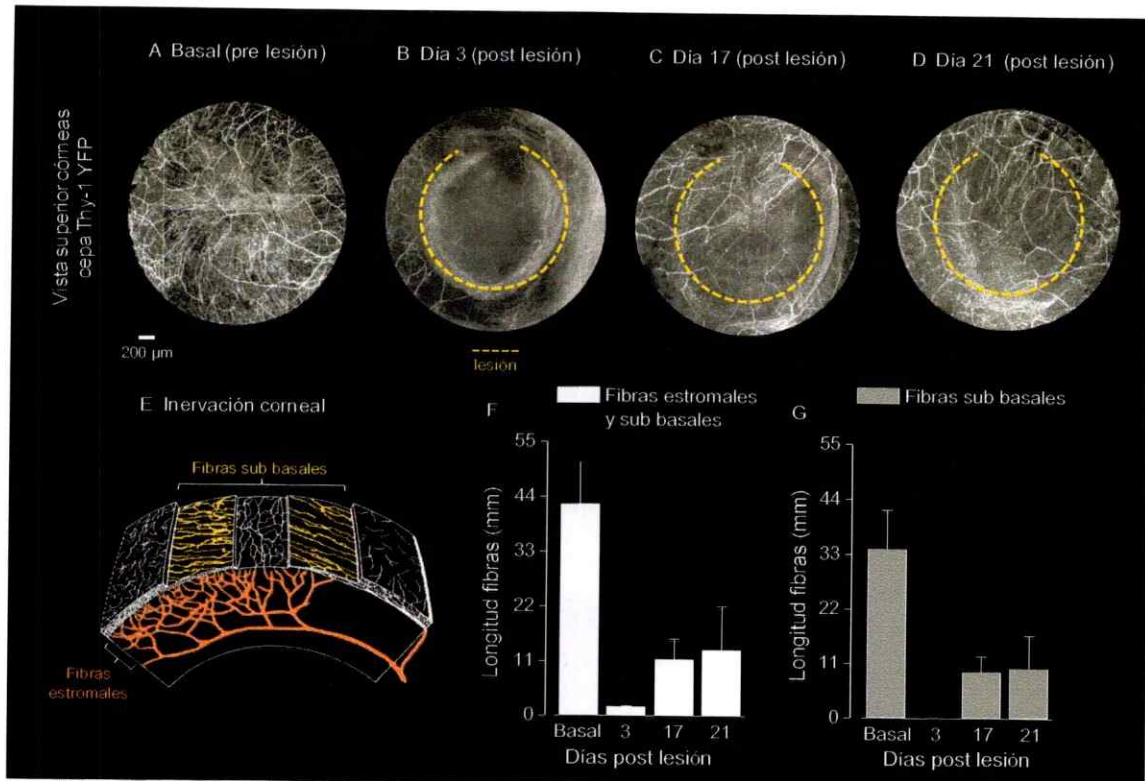


Figura 16. Inervación y regeneración de las fibras corneales provenientes de ratones Thy-1 YFP tras la lesión. (A-D) Fotografías representativas de una córnea control (basal) y de córneas 3, 17 y 21 días post lesión (barra 200 μ m). La línea segmentada amarilla indica el margen del área lesionada. **(E)** Detalle de la córnea donde se aprecian las fibras estromales y las sub basales **(F-G)**. Gráfico de barras que muestran la longitud promedio de las fibras totales (estromales y sub basales) y sub basales que inervan la córnea (número de córneas analizadas por condición: basal n=3; días post lesión 3, 17 y 21 n=2 para cada día).

5.3. Las neuronas somatosensoriales primarias de animales lesionados presentan una respuesta individual y poblacional al frío de mayor magnitud que las neuronas de animales control

Con el fin de caracterizar la respuesta al frío de las neuronas corneales (Figura 17A) provenientes de animales control y lesionados, utilizamos la metodología de imagen de calcio. Usamos el indicador de Ca^{2+} Fura-2 en cultivos primarios de neuronas trigeminales.

Como ya se dijo, esta técnica permite identificar de manera poco invasiva un amplio número de NCSF a la vez, pudiendo caracterizar su umbral térmico y su respuesta ante la aplicación de agonistas o antagonistas de los canales iónicos de interés. El incremento en la concentración intracelular de calcio es coincidente en el tiempo y proporcional a la frecuencia de descarga de la neurona termorreceptora (Madrid et al., 2006). En el panel superior de la Figura 17B se aprecia la imagen en pseudocolor que da cuenta del incremento en los niveles de calcio intracelular en respuesta al frío de neuronas en cultivo. En el panel inferior se muestra una respuesta al frío típica de una neurona termorreceptora en cultivo proveniente de un ganglio trigeminal control. En el trazo superior se puede observar que la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta ante el descenso en la temperatura del baño (representado en el trazo inferior) y que se recupera a niveles basales luego de unos segundos (Figura 17B). Para evaluar posibles cambios en la fracción de NCSF presentes en los cultivos de neuronas trigeminales provenientes de los dos grupos experimentales, se cuantificó el número de NCSF respecto al número total de neuronas corneales marcadas con FM 1-43. La Figura 17C muestra que en condiciones control un 12.2% (60/491) fueron NCSF versus un 18.7% (58/310) de NCSF lesionadas, es decir, hubo un aumento del 6.5% en el número de neuronas que responden a frío, lo cual es estadísticamente significativo (* $p < 0.05$ prueba *F*).

Estos resultados sugieren que habría una transformación de una subpoblación de neuronas corneales insensibles a frío en sensibles al frío como resultado del daño. Posteriormente, se analizó la amplitud de las respuestas al frío en ambos grupos de NCSF, evaluadas por la diferencia entre la $[Ca^{2+}]_i$ basal y la $[Ca^{2+}]_i$ en el punto máximo de las respuestas al frío, como se ejemplifica en la Figura 17B (círculos en verde). Encontramos que la respuesta promedio en las NCSF provenientes de animales lesionados es mayor, con un valor de 216 ± 20 nM Ca^{2+} (n=60) en las neuronas control versus 312 ± 32 nM Ca^{2+} (n=58) en las neuronas de animales lesionados (**p<0.01 prueba t; Figura 17D). También medimos la temperatura umbral de ambos grupos experimentales para evaluar posibles desplazamientos en el umbral de activación al frío con la lesión. En la Figura 17E se representa el porcentaje de la población activa de neuronas de frío corneales reclutadas durante una rampa de frío en los grupos control y lesionado. La temperatura umbral promedio de respuesta al frío en las NCSF del grupo control fue de $26.1 \pm 0.4^\circ C$ (n= 60), mientras que en las NCSF lesionadas fue de $27.0 \pm 0.5^\circ C$ (n= 58) (p>0.05 prueba t). Este resultado sugiere que la lesión no va acompañada de un cambios significativo en la temperatura umbral promedio (Figura 17F). Estos resultados sugieren que, a nivel individual, las NCSF provenientes de animales sometidos a lesión corneal presentan un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular mayor en su respuesta a frío que las neuronas control.

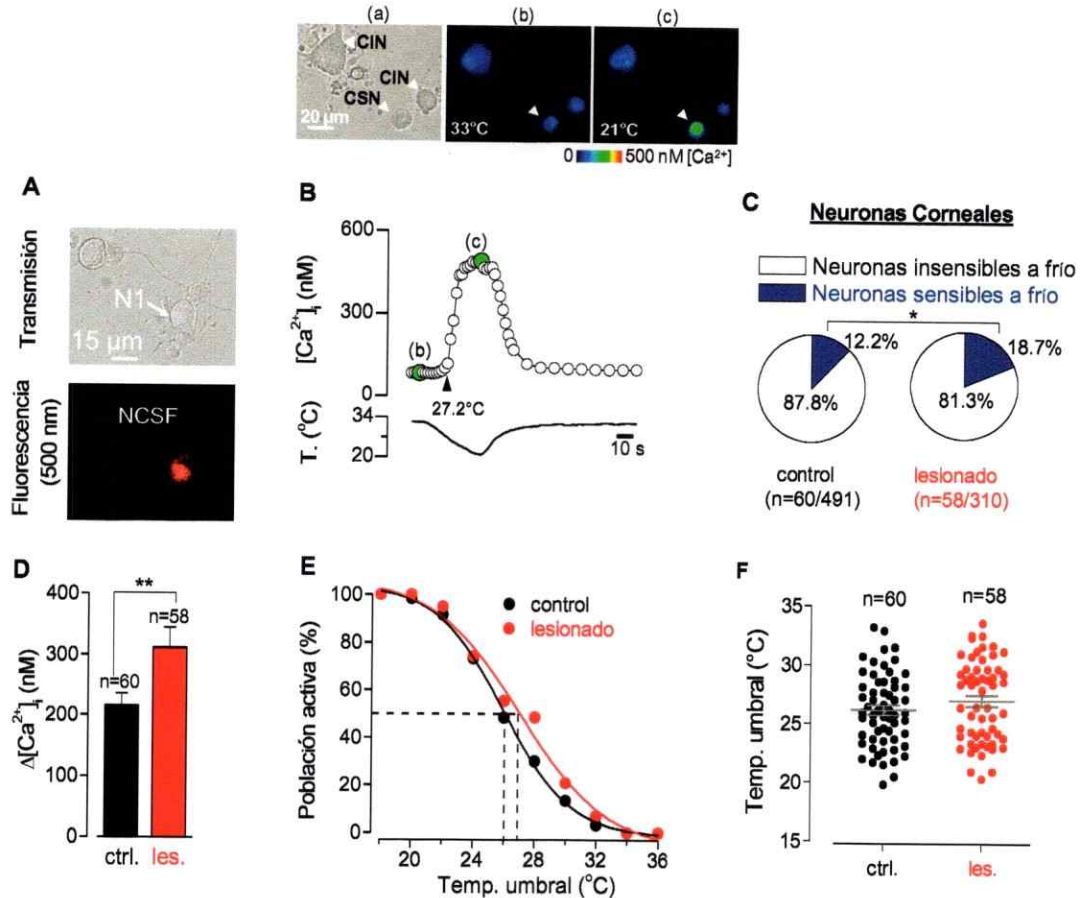


Figura 17. Sensibilidad al frío de las neuronas trigeminales que inervan la córnea provenientes de animales control y lesionadas. (A) Imagen de transmisión (panel superior) y de fluorescencia a 500 nm (panel inferior) de una neurona corneal en cultivo identificada por marcación retrógrada con FM 1-43. **(B)** Señal de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a enfriamiento (trazo superior) en una NCSF control; el trazo inferior muestra la temperatura del baño. En el panel superior se muestra la imagen de transmisión en (a) y las imágenes en pseudocolor que muestran un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ a temperatura basal (b) y en respuesta a un descenso en la temperatura (c). **(C)** Gráfica circular que presenta los porcentajes de de NCSF sobre el total de neuronas corneales en ambas condiciones (* $p < 0.05$ prueba *t*). **(D)** Gráfica de barras que representa la magnitud promedio de la respuesta inducida por frío en el grupo control (barra negra, $n=60$) y el grupo lesionado (barra roja, $n=58$), (** $p < 0.01$ prueba *t*). **(E)** Distribución acumulativa del umbral de temperatura de las neuronas sensibles al frío activadas durante el descenso de la temperatura. En línea y círculos negros el grupo control ($n=60$), en línea y círculos rojos el grupo lesionado ($n=58$). **(F)** Gráfica de puntos que muestra el umbral medio (barra horizontal gris) de la respuesta al frío obtenido mediante imagen de Ca^{2+} en las neuronas trigeminales en cultivo, control (círculos negros) y lesionadas (círculos rojos). Se indica el número total de neuronas en cada condición ($p > 0.05$, prueba *t*).

5.4. El umbral de las respuestas de frío de las NCSF control y lesionadas disminuye al bloquear la corriente de freno I_{KD}

El umbral de temperatura de las neuronas sensibles al frío es determinado en gran medida por la actividad de la corriente de freno I_{KD} (Madrid et al., 2009). Esta corriente, de activación rápida e inactivación lenta, sensible a 4-Aminopiridina (4-AP), actúa reduciendo la excitabilidad en las neuronas sensoriales primarias durante una despolarización. Con el fin de establecer la contribución de la corriente I_{KD} en la determinación del umbral de respuesta al frío en las NCSF control y lesionadas, se evaluó el efecto de la aplicación extracelular de 100 μ M 4-AP; a esta concentración, el 4-AP bloquea de manera específica la corriente I_{KD} por sobre las otras corrientes de potasio de estas neuronas (Madrid et al., 2009; Viana et al., 2002). En la Figura 18A se muestra un registro de célula completa, en la modalidad de voltaje controlado, donde se aprecia la supresión farmacológica de la corriente de freno I_{KD} por 4-AP. Luego evaluamos, mediante un protocolo en imagen de calcio, la respuesta al frío en ambas condiciones experimentales, en presencia de 4-AP y una vez removido este bloqueador (Figura 18B). En presencia de 4-AP, el umbral promedio de respuesta al frío se desplazó de $26.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ a $30 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ en el grupo control ($n=25$; $***p<0.001$ prueba t) y de $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ a $30 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ en el grupo de lesión ($n=23$; $**p<0.05$ prueba t).

Además no hubo diferencias significativas en el umbral promedio de activación por frío entre ambas condiciones en presencia de 4-AP que sugieran un tipo de respuesta diferencial en relación al bloqueo de la I_{KD} . (Figura 18C).

Para visualizar el efecto de 4-AP a nivel individual, graficamos el desplazamiento del umbral de respuesta al frío en todas las NCSF control y lesionadas evaluadas. En la condición control, el 100% (25/25) de las NCSF tratadas con 4-AP desplazaron su umbral de respuesta al frío hacia temperaturas más altas (Figura 18D) versus un 87% (20/23) de las NCSF lesionadas ($p > 0.05$, prueba F ; Figura 18E). La magnitud promedio de la respuesta al frío fue 184 ± 26 nM Ca^{2+} en neuronas control ($n = 25$), mientras que en neuronas lesionadas fue significativamente mayor con un valor de 315 ± 66 nM Ca^{2+} ($n=23$; $*p < 0.05$ prueba t). Sin embargo, la magnitud promedio de la respuesta al frío en presencia de 4-AP no mostró diferencias significativas entre los grupos control y lesión, siendo 204 ± 25 nM Ca^{2+} ($n=25$) y 289 ± 65 nM Ca^{2+} ($n=23$), respectivamente ($p > 0.05$ prueba t ; Figura 18F).

Estos resultados sugieren que los canales iónicos $K_v1.1$ y $K_v1.2$, responsables de la corriente I_{KD} , no tienen incidencia en el fenotipo post lesión de las NCSF sometidas a lesión periférica.

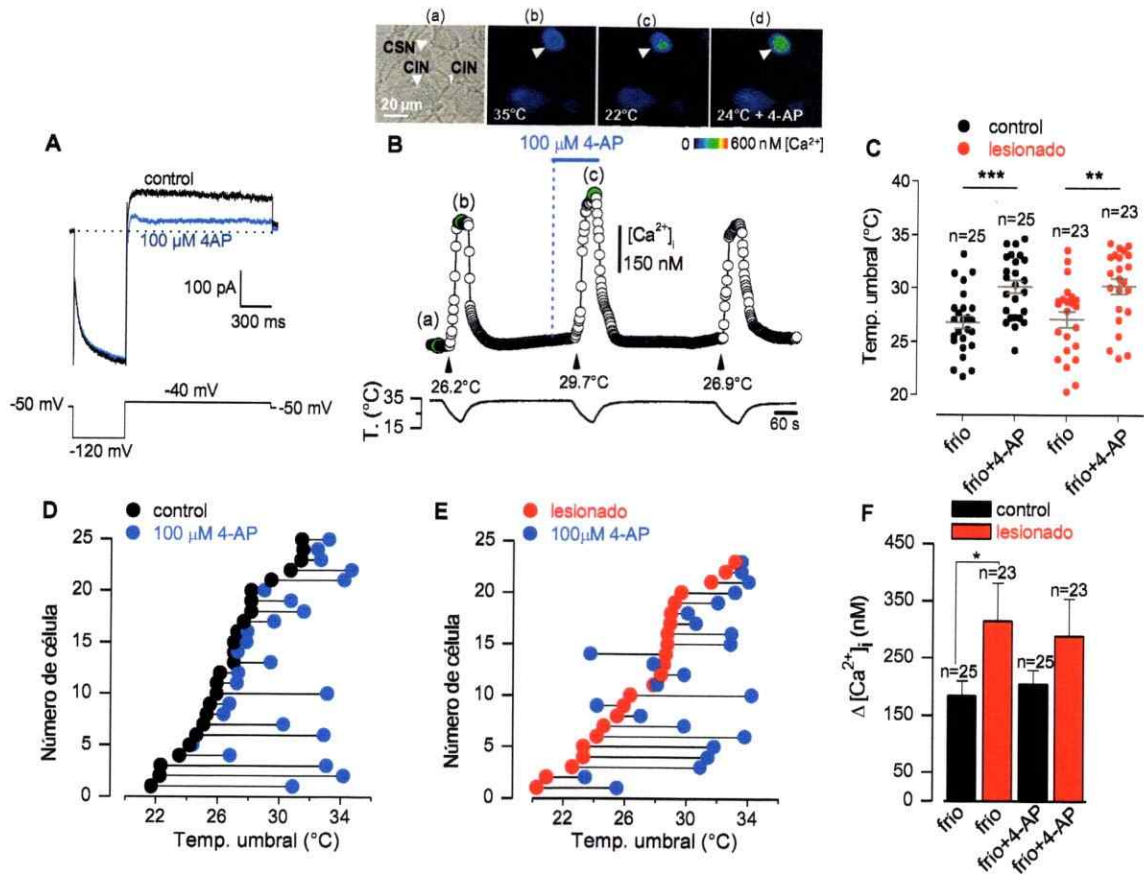


Figura 18. Efecto de la supresión farmacológica con 4-AP de la corriente I_{KD} sobre el umbral térmico de la respuesta al frío en NCSF control y lesionadas. (A) Registro de la corriente I_{KD} en una neurona trigeminal sensible al frío ($V_{mant.} = -50$ mV), revelada por un pulso de voltaje a -40 mV desde un potencial prepulso a -120 mV. (B) Registro en imagen de calcio que muestra la elevación en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en una NCSF control durante tres descensos consecutivos en la temperatura, el primero con solución control, el segundo en presencia de 100μ M de 4-AP y el tercero nuevamente con solución control, con el fin de evaluar la recuperación de la respuesta. En esta neurona, el umbral de respuesta a frío fue desplazado hacia temperaturas más altas, de 26.2 a 29.7°C (puntas de flecha negras). En el panel superior se observa la imagen transmitida (a) y en pseudocolor (b-d) de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. (C) Gráfico de puntos que representa el umbral medio (barra gris horizontal) de respuesta al frío en NCSF control en presencia de 4-AP (círculos negros, $n=25$) y de las NCSF lesionadas en presencia de 4-AP (círculos rojos, $n=23$). Nótese que en presencia del inhibidor de la corriente I_{KD} el umbral medio de temperatura en respuesta a frío de las NCSF del grupo lesionadas se altera de manera similar al grupo control (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ prueba t). (D) Efecto de 100μ M de 4-AP en el umbral de temperatura para 25 NCSF del grupo control. (E) Efecto de 100μ M de 4-AP en el umbral de temperatura para 23 NCSF del grupo lesionado. (F) Gráfico de barras que representa la magnitud promedio de la respuesta inducida por frío en el grupo control en presencia de 4-AP (barra negra, $n=25$) y en el grupo lesionado en presencia de 4-AP (barra roja, $n=23$; $p > 0.05$, * $p < 0.05$ prueba t).

5.5. La sensibilidad a mentol aumenta en las NCSF de los animales sometidos a lesión corneal

La sensibilidad química de las neuronas corneales, tanto control como lesionadas, fue estudiada inmediatamente después de la recuperación del estímulo térmico. Con este fin, las neuronas trigeminales que inervan la cornea (FM 1-43(+)), tanto en animales lesionados como control, fueron estimuladas con una rampa de frío, seguida del protocolo de estimulación química y térmica combinadas que se muestra en la Figura 19 (A-B).

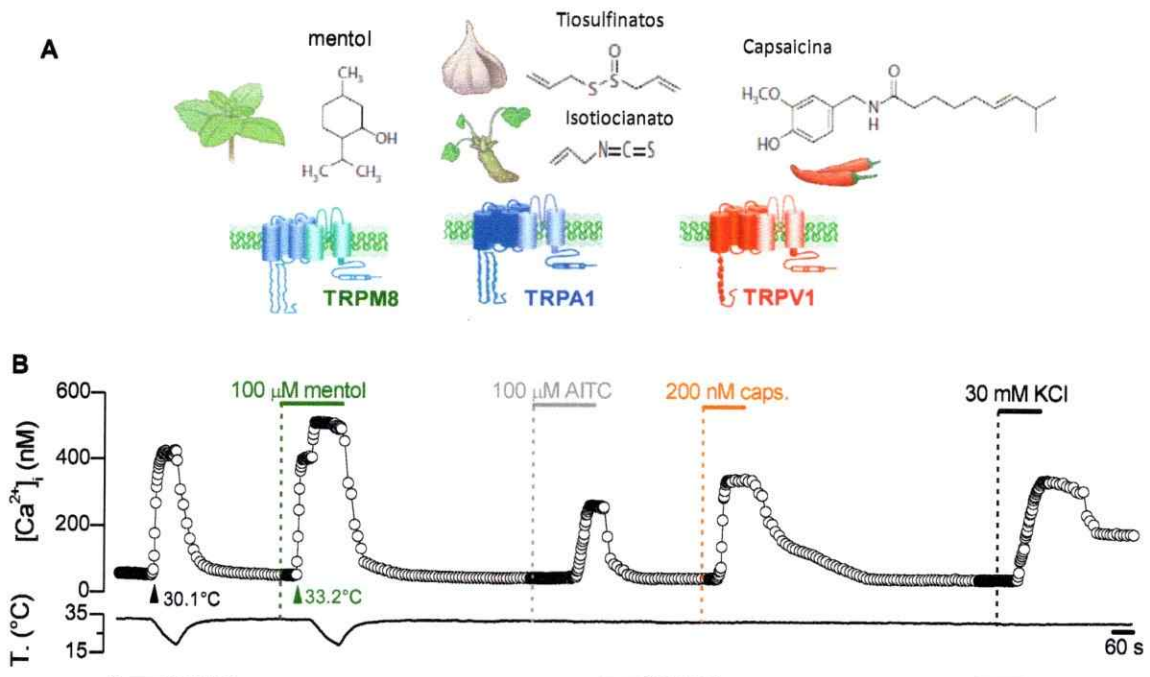


Figura 19. Evaluación de la sensibilidad térmica y química de las neuronas corneales en cultivo mediante imagen de calcio. (A) Se muestra una subunidad de los canales termoTRP de interés en este estudio, la estructura de los agonistas químicos para cada canal y de los vegetales que presentan naturalmente estos compuestos (de izquierda a derecha: menta, ajo, wasabi y ají, para TRPM8, TRPA1 y TRPV1, respectivamente). **(B)** Registro simultáneo de la variación de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y la temperatura en una NCSF control en cultivo, durante un pulso de frío seguido de otro pulso de frío en presencia de mentol. También se aplicó AITC (agonista de TRPA1) y capsaicina (agonista de TRPV1). Finalmente se aplicó estímulo alto en K⁺ (solución extracelular 30mM KCl) para estimar la capacidad de respuesta a una despolarización inespecífica en la totalidad de neuronas presentes en el campo estudiado.

Clasificamos a las neuronas según el tipo de umbral, alto o bajo, según el criterio utilizado por Madrid y colaboradores (2009). Se consideraron como neuronas corneales sensibles a frío de (NCSF-BU) aquellas con un umbral de temperatura $>26.5^{\circ}\text{C}$. Estas NCSF-BU representaron el 43.3% de la población total del grupo control (umbral promedio $29.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) y un 50% en el grupo lesionado (umbral promedio $30 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$). Las neuronas corneales sensibles a frío de alto umbral (NCSF-AU) representaron un 56.7% en el grupo control (umbral promedio $23.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) y un 50% en el grupo lesionado (umbral promedio $23.8 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) (Figura 20A-B). Es interesante que sólo el umbral promedio de las NCSF-BU presentó diferencias significativas ($*p<0.05$ prueba *t*). Estos resultados sugieren una mayor sensibilidad al frío en la subpoblación de NCSF-BU que señalizan frío inocuo en aquellas neuronas del grupo lesionado.

Para evaluar el papel del canal de iones TRPM8 en NCSF lesionadas y control, estudiamos mediante imagen de calcio tanto la magnitud de la respuesta como la sensibilidad a nivel poblacional frente a la aplicación de mentol ($100 \mu\text{M}$). Los resultados obtenidos con esta estrategia experimental se muestran en la Figura 20C. Se pueden observar diferencias significativas en la magnitud de la respuesta a mentol, siendo de $88 \pm 17 \text{ nM Ca}^{2+}$ ($n=22$) en el grupo control y $185 \pm 40 \text{ nM Ca}^{2+}$ ($n=29$) en el lesionado ($*p<0.05$ prueba *t*). Para complementar estos resultados, decidimos cuantificar el promedio de la

respuesta máxima de este canal, esto es, a un pulso de frío y en presencia de mentol. Encontramos que la magnitud de la respuesta ante la aplicación de ambos estímulos fue significativamente mayor en las neuronas lesionadas: $415 \pm 63 \text{ nM Ca}^{2+}$ (n=28) versus $211 \pm 28 \text{ nM Ca}^{2+}$ (n=22) (* $p < 0.05$ prueba *t*, Figura 20C). La magnitud de la respuesta al frío en estas NCSF-mentol(+) también fue significativamente mayor en el grupo lesionado, con $342 \pm 58 \text{ nM Ca}^{2+}$ (n=29) versus $181 \pm 25 \text{ nM Ca}^{2+}$ (n=22) del grupo control (* $p < 0.05$ prueba *t*, Figura 20C).

A continuación estimamos la fracción de neuronas que estarían expresando TRMP8, en función de su respuesta a la aplicación del agonista mentol. Se consideraron como respuestas positivas a mentol aquellas donde hubo un incremento en la concentración intracelular de calcio a temperatura basal o aquellas donde en presencia de mentol más frío hubo un desplazamiento del umbral de al menos 1°C hacia temperaturas más altas. En la Figura 20D se puede apreciar que las NCSF-mentol(+) en condiciones control fueron el 85% (22/26) versus un 100% (29/29) de las lesionadas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$ prueba *F*). El aumento en la magnitud de estas respuestas y en la sensibilidad poblacional a mentol sugiere que TRPM8 tiene un papel central en los cambios en la respuesta térmica descritos en las NCSF sometidas a lesión axonal.

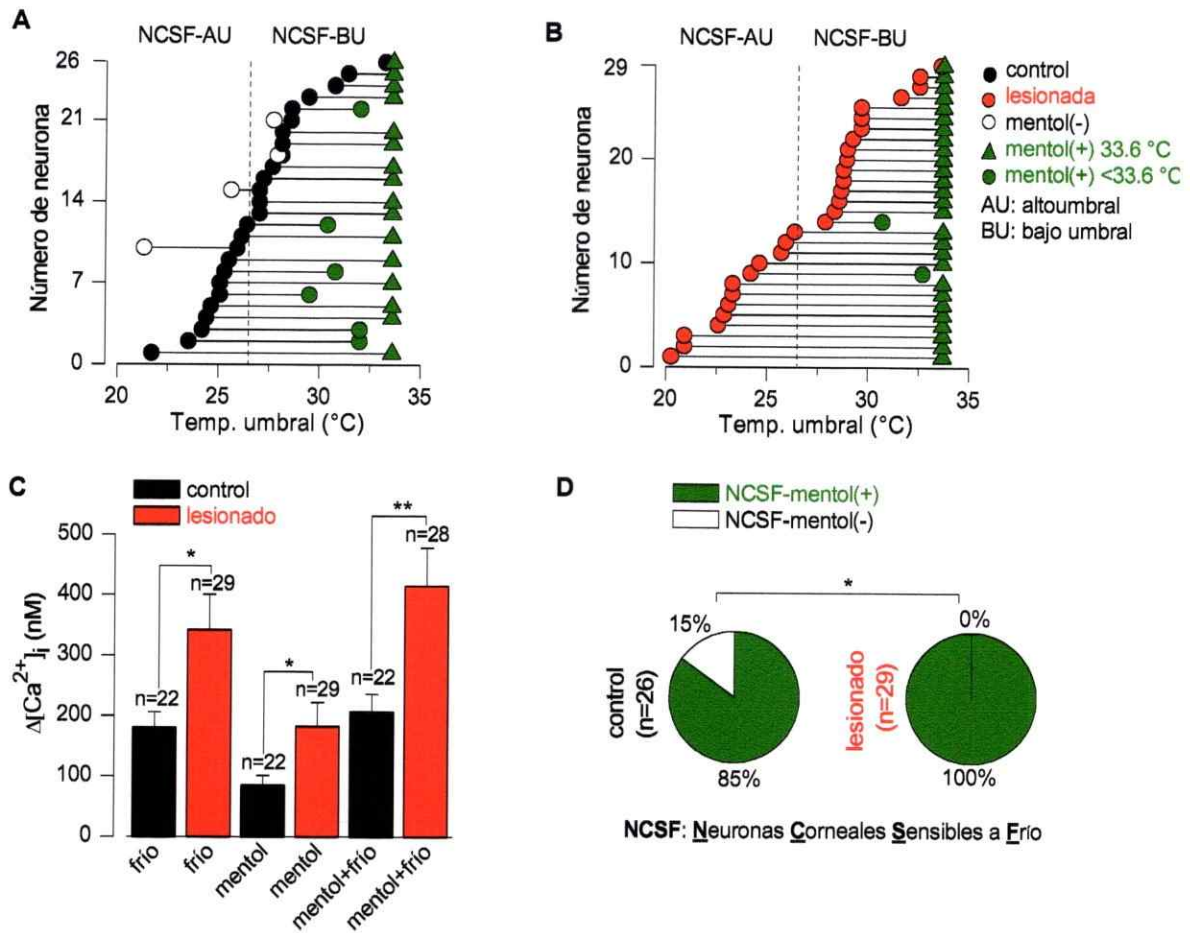


Figura 20. Sensibilidad a mentol de las neuronas corneales sensibles a frío provenientes de animales controles y lesionados. (A-B) Efecto del mentol en el umbral de frío de las neuronas corneales sensibles a frío de alto (NCSF-AU) y bajo umbral (NCSF-BU) en los grupos control (círculos negros) y lesionados (círculos rojos). En ambas poblaciones los círculos verdes representan aquellas neuronas que presentaron un desplazamiento en su umbral al estimular con frío más mentol, contrario a la mayoría de las cuales lo hizo sólo en presencia de mentol a una temperatura basal promedio de 33.6°C (triángulos verdes). Nótese que en la población lesionada todas las NCSF presentaron un desplazamiento en su umbral hacia temperaturas más altas. **(C)** Gráfico de barras que resume la magnitud promedio de las respuestas a frío, mentol (100 μ M) y mentol más frío en neuronas control (barra negra) y lesionadas (barra roja) (* $p < 0.05$ prueba *t*). Sobre cada barra se señala en número de neuronas estudiadas. **(D)** Gráfico circular que resume el tamaño relativo de la población de NCSF-mentol(+) (* $p < 0.05$ prueba *F*).

5.6. La sensibilidad a agonistas químicos de los canales de iones TRPA1 y TRPV1 no se ve modificada en las NCSF de los animales sometidos a lesión corneal respecto a los animales control

Una subpoblación de nociceptores polimodales expresa los canales termosensibles TRPV1 y TRPA1 (ambos o al menos uno de los dos), los que pueden ser usados como marcadores moleculares de este subtipo de neuronas somatosensoriales primarias que señalizan dolor (Kobayashi et al., 2005). Por otro lado, el 7% y 67% de las neuronas corneales expresa TRPA1 y TRPV1, respectivamente (Parra et al., 2010). Utilizando el protocolo de imagen de calcio descrito en la Figura 19B, evaluamos las respuestas de las NCSF de ambos grupos experimentales frente a la aplicación de los activadores químicos de TRPA1 y TRPV1, AITC (100 μ M) y capsaicina (200 nM), respectivamente. Las respuestas positivas de dichos canales correspondieron a un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ de las neuronas a $34 \pm 1^\circ C$. El efecto de todos estos compuestos químicos fue reversible en su totalidad y permitió la utilización de protocolos múltiples de estimulación.

La magnitud promedio de respuesta al frío de las NCSF-AITC(+) controles fue 173 ± 37 nM Ca^{2+} (n=6), contra 331 ± 40 nM Ca^{2+} (n=7) en las neuronas lesionadas (* $p < 0.05$ prueba *t*; Figura 21A). No obstante lo anterior, no encontramos diferencias significativas en la magnitud de la respuesta promedio frente a AITC entre el grupo control y lesionado cuyos valores fueron 113 ± 34

nM Ca^{2+} (n=6) y 127 ± 25 nM Ca^{2+} (n=7), respectivamente ($p > 0.05$ prueba *t*; Figura 21A). Para estimar la fracción de neuronas sensibles al frío que expresaron TRPA1, se analizaron las respuestas al aplicar AITC. En la Figura 21B se muestra que en el grupo control un 26.1 % (6/23) de las neuronas fueron NCSF-AITC(+) versus un 28% (7/25) en el grupo lesionado ($p > 0.05$ prueba *F*).

Con el fin de evaluar la población de neuronas que expresaron TRPV1, se estudiaron las respuestas a capsaicina. La magnitud de la respuesta promedio a capsaicina no difirió entre ambos grupos de NCSF-capsaicina(+), siendo 212 ± 46 nM Ca^{2+} (n=10) en las neuronas control y 281 ± 40 nM Ca^{2+} (n=17) en las lesionadas ($p > 0.05$ prueba *t*; Figura 21C). Cabe destacar que la magnitud promedio de la respuesta al frío en esta subpoblación de neuronas mantuvo las diferencias entre el grupo control y lesionado, siendo estas de 208 ± 48 nM Ca^{2+} (n=10) y 379 ± 52 nM Ca^{2+} (n=17), respectivamente ($*p < 0.05$ prueba *t*; Figura 21C). A nivel poblacional, encontramos que el 52.6% (10/19) correspondieron a NCSF-capsaicina(+), mientras que post lesión, un 73.9% (17/23) fueron NCSF-capsaicina(+) ($p > 0.05$ prueba *F*; Figura 21D). Estos resultados sugieren que la lesión corneal no produce cambios significativos en la expresión funcional de los canales TRPA1 y TRPV1 en las NCSF.

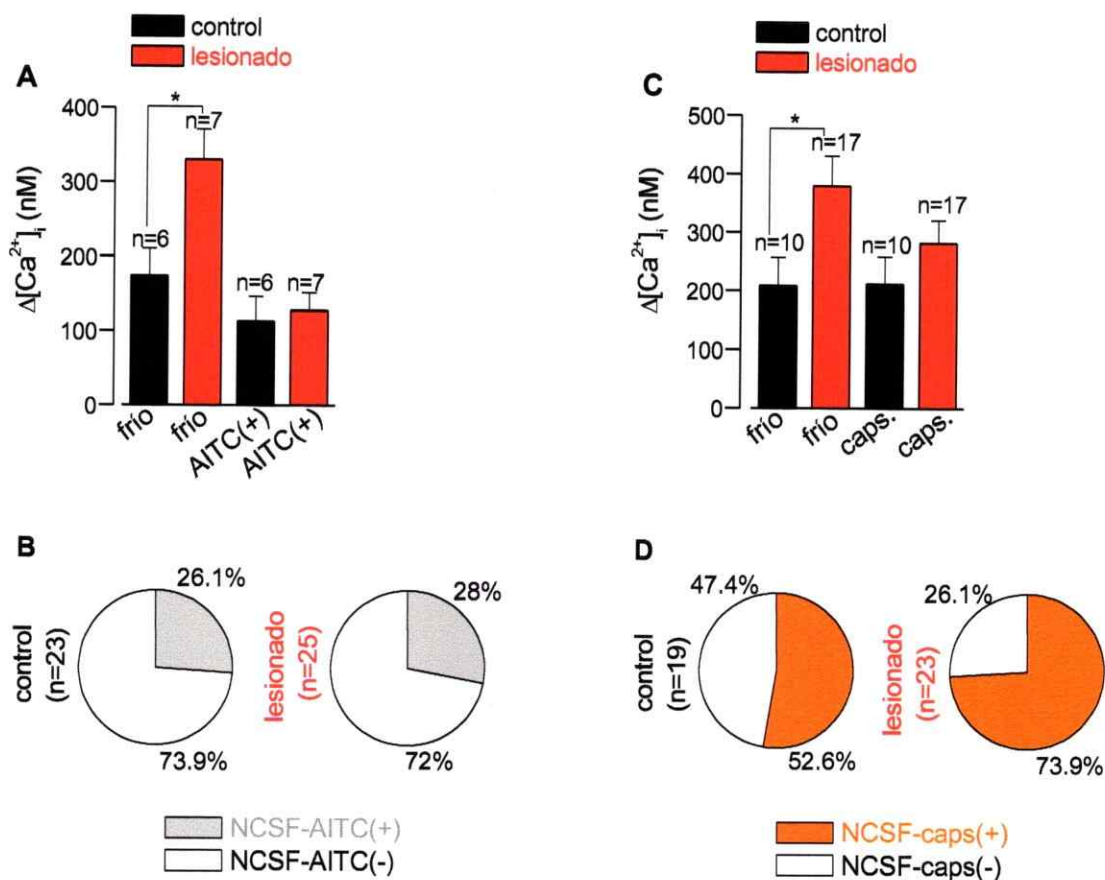


Figura 21. Sensibilidad a AITC y capsaicina en las NCSF provenientes de animales control y lesionados. (A y C) Gráfico de barras que resume la magnitud promedio de las respuestas AITC (100 μ M) y capsaicina (200 nM) en neuronas que mostraron respuesta a estos agonistas de canales termoTRPs en el grupo control (barra negra) y el grupo lesionado (barra roja) (* $p < 0.05$, prueba *t*). Sobre cada barra se señala en número de neuronas estudiadas (B y D) Gráficos circulares que resumen el tamaño relativo de las distintas poblaciones de las NCSF-AITC(+) y NCSF-Capsaicina(+) ($p > 0.05$ prueba *F*).

5.7. La densidad de la corriente de TRPM8 (I_{TRPM8}) está aumentada en las NCSF provenientes de animales lesionados

Los resultados descritos anteriormente sugieren que TRPM8 podría estar sobrepresado funcionalmente post lesión. Con el fin de aportar evidencias más directas que soporten esta idea, decidimos medir la densidad de corriente I_{TRPM8} en NCSF en cultivo por la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa. La Figura 22 muestran un registro representativo de corriente de una neurona corneal control (A) y una lesionada (B) que fueron estimuladas con un pulso mantenido de frío y durante la perfusión con 100 μ M mentol, para determinar la amplitud de la corriente máxima dependiente de canales TRPM8 (Madrid et al., 2009). Normalizando la amplitud de las corrientes dependientes de frío en ausencia y presencia de mentol por la capacidad de la membrana de cada neurona, se determinó la densidad de corriente en neuronas control y lesionadas que presentaron el mismo umbral de respuesta al frío. La densidad de corriente de frío ($I_{frío}$) promedio en el grupo control fue de 0.7 ± 0.2 pA/pF ($n=11$) mientras que en las NCSF del grupo lesionado fue de 2.9 ± 0.9 pA/pF ($n=13$) (* $p<0.05$ prueba t). Así mismo, la densidad de corriente promedio en respuesta a frío más mentol ($I_{frío+mentol}$) de las NCSF lesionadas fue significativamente mayor que en NCSF control. Esta densidad $I_{frío+mentol}$ para el grupo control fue 6.0 ± 0.9 pA/pF ($n=11$), frente a los 15.1 ± 2.6 pA/pF ($n=13$) en las NCSF provenientes de animales lesionados (* $p<0.05$ prueba t ; Figura 22C).

La temperatura umbral promedio de estas NCSF no presentó diferencias significativas, siendo de $26.3 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$ ($n=11$) para los controles y de $27.3 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ ($n=13$) para los lesionados (Figura 22D). Estos resultados son acordes a los que obtuvimos por imagen de Ca^{2+} , ya que la magnitud de respuesta al frío y a frío más mentol en las NCSF lesionadas es mayor que en las neuronas provenientes de animales control, apoyando la idea del aumento en la expresión funcional de TRPM8 post daño corneal.

También nos preguntamos si los cambios observados en las respuestas química y térmica de las neuronas de frío corneales están asociados a modificaciones en las propiedades activas y pasivas de membrana. Esto nos permitió determinar si las neuronas sensibles a frío correspondían sólo a termorreceptores de frío canónicos, o si ocurría la aparición de nociceptores polimodales con sensibilidad a frío inocuo producto de la lesión. Registramos las NCSFs en configuración de célula completa bajo corriente controlada provenientes de ambos grupos de animales (Figura 23A-B). No encontramos diferencias en las propiedades electrofisiológicas (propiedades pasivas y activas) entre ambas poblaciones, de esta manera la totalidad de las NCSF control y lesionadas presentaron potenciales de acción de corta duración (0.7 ± 0.1 ms y 0.6 ± 1 ms, respectivamente), con el ancho y forma propias de las neuronas termorreceptoras de frío trigeminales canónicas (Viana et al., 2002; Madrid et al., 2006) (Figura 23C; Tabla 1).

Estos resultados sugieren que la lesión no modificó significativamente las propiedades electrofisiológicas de las NCSF, ni trajo consigo el reclutamiento de una subpoblación de neuronas nociceptoras dentro de este grupo de neuronas.

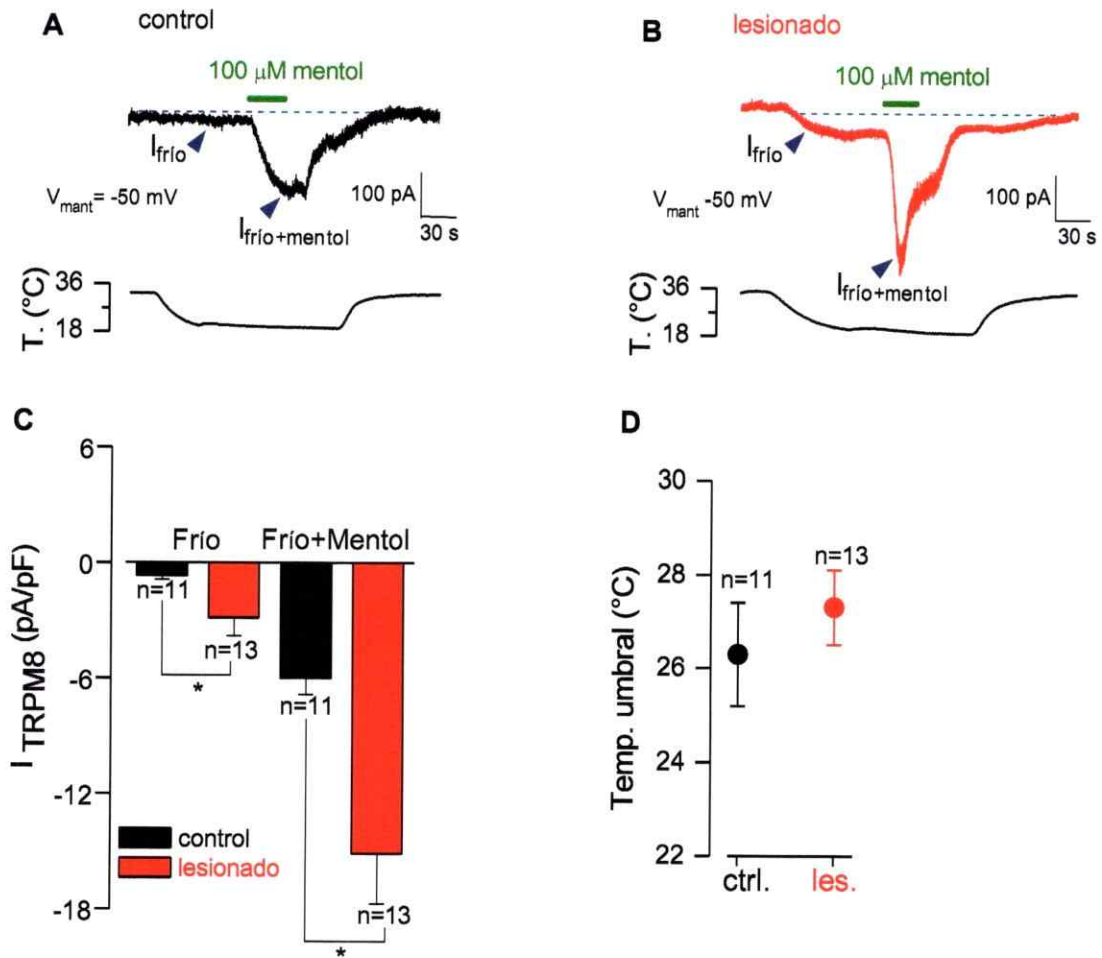


Figura 22. Densidad de corriente TRPM8 en NCSF provenientes de animales control y lesionados. (A-B) Registro simultáneo de la corriente de membrana (trazo superior) y la temperatura del baño (trazo inferior) durante un descenso de la temperatura desde 34 $^{\circ}$ C hasta 20 $^{\circ}$ C, en combinación con mentol de una NCSF control (en negro) y lesionada (en rojo). Las flechas muestran la corriente de frío (I_{frio}) y la corriente máxima de TRPM8 ($I_{frio+mentol}$). La línea punteada indica el nivel cero de corriente ($V_{mantención} = -50$ mV). **(C)** Gráfico de barras que representa la densidad promedio de corriente I_{frio} y en $I_{frio+mentol}$ en NCSF del grupo control (barra negra) y del grupo lesionado ($V_{mantención} = -50$ mV) (* $p < 0.05$ prueba t). **(D)** Gráfico de puntos que muestra la temperatura umbral promedio al frío en el grupo control (círculo negro) y el lesionado (círculo rojo). Sobre cada barra se señala en número de neuronas analizadas ($p > 0.05$ prueba t).

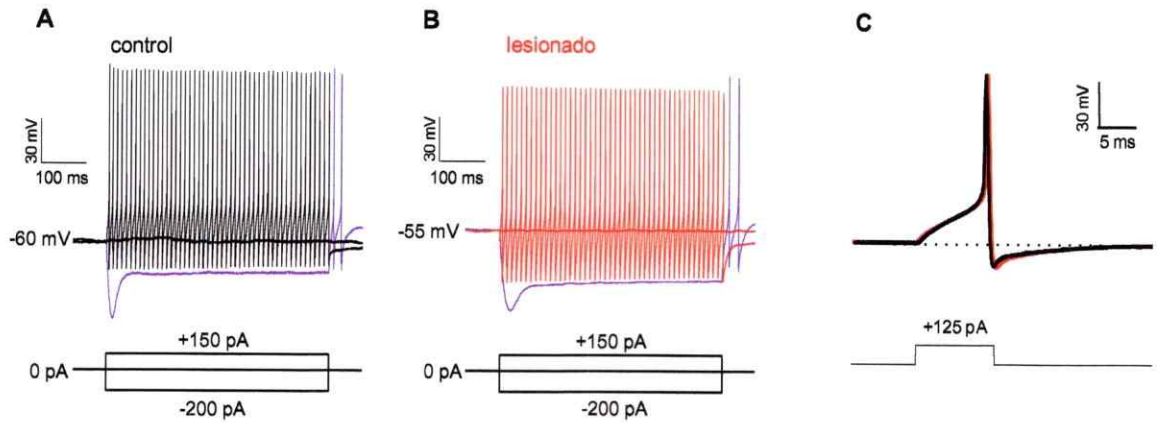


Figura 23. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas NCSF provenientes de animales control y lesionados. (A-B) Respuestas típicas a pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de 500 ms de una neurona termorreceptora de frío corneal control y lesionada, obtenidos por la técnica de *patch clamp* en configuración de célula completa, bajo corriente controlada. Nótese la descarga rápida repetitiva de potenciales de acción (trazos negro y rojo), el fuerte sag a valores hiperpolarizantes producto de la activación de la corriente I_h , y la presencia de disparo a la vuelta del pulso hiperpolarizante, o rebote, (trazo morado) ($I_{hold} = 0$ pA). **(C)** Se muestra la superposición de dos potenciales de acción característicos de una NCSF del grupo control (negro) y de una NCSF del grupo lesionado (rojo).

Tabla 1. Propiedades pasivas y activas de las neuronas de frío corneales control y lesionadas en cultivo

Neuronas sensibles a frío	Temp. umbral (°C)	Potencial de reposo (mV)	Resistencia de entrada (MΩ)	Corriente rebase (pA)	Duración P.A. (ms)	Índice de rectificación (%)	Frecuencia de disparo (Hz) (2x rebase)	Patrón de descarga tónica (%)
control (n=18)	27 ± 0.7	-48 ± 2	372 ± 41	79 ± 9	0.7 ± 0.1	53 ± 4	46 ± 13	56 (10/18)
lesionado (n=22)	27 ± 0.7	-49 ± 2	345 ± 44	86 ± 12	0.6 ± 0.1	52 ± 3	45 ± 8	45 (10/22)
prueba-t	p = 0.8	p = 0.8	p = 0.6	p = 0.6	p = 0.4	p = 0.8	p = 0.9	p = 0.7(#)

(#) Prueba- F

La resistencia de entrada se midió de la pendiente de la curva construida del pico de la respuesta de potencial a una serie de pulsos de corrientes hiperpolarizantes. El ancho del potencial de acción se midió a la mitad de su amplitud. El índice de rectificación fue medido usando la relación $100 \times (V_{peak} - V_{steady-state}) / V_{peak}$, durante las respuestas a pulsos hiperpolarizantes de corriente donde el potencial de membrana alcanzó los -120mV. La frecuencia de disparo (en Hz) se calculó mediante un pulso de corriente de dos veces la corriente rebase. Los potenciales de acción fueron contados en una ventana de tiempo de 500 ms desde el inicio del pulso despolarizante.

5.8. La expresión de TRPM8 revelada por inmunohistoquímica confirmó un aumento en la expresión de este canal a nivel de los ganglios trigéminos lesionados

En orden de proveer evidencia celular que soporte la idea que los cambios post lesión observados en cultivo están relacionados con alteraciones en la expresión del canal TRPM8, examinamos la inmunoreactividad a este canal en secciones del ganglio trigémino, específicamente en el área corneal, tal como se describe en la sección de materiales y métodos (Figura 24A). La Figura 24B muestra dos imágenes representativas de una sección trigeminal proveniente de un animal control y uno lesionado, donde se aprecia un mayor número de neuronas TRPM8(+) tras la lesión. La cuantificación total de la inmunoreactividad promedio poblacional arrojó un $9.4 \pm 4.0\%$ (36/469; n=12 campos) de neuronas TRPM8(+) en los ganglios trigéminos obtenidos de animales control. En contraste, la inmunoreactividad promedio en secciones trigeminales obtenidas de animales sometidos a lesión fue $26.1 \pm 5.4\%$ (119/471; n=10 campos) de neuronas TRPM8(+) (Figura 24E), es decir, casi tres veces mayor que en animales no lesionados (*p<0.05 prueba t). Estos resultados sugieren un incremento en la expresión proteica de TRPM8 en ganglios trigeminales de animales sometidos a lesión corneal, y son coincidentes con aquellos obtenidos por imagen de calcio y electrofisiología.

5.9. La inmunotinción contra $K_v1.1$ y $K_v1.2$ no mostró cambios en la expresión de los canales responsables de la corriente I_{KD} en animales lesionados

Con el fin de obtener un correlato de los niveles de expresión proteica para los canales responsables de la corriente I_{KD} ($K_v1.1$ y $K_v1.2$), evaluamos mediante inmunohistoquímica los posibles cambios en la cantidad de estas proteínas expresadas en la región corneal del ganglio trigémino (Figura 24A). La Figura 24C muestra dos imágenes representativas de secciones trigeminales provenientes de un animal control y uno lesionado, donde puede apreciarse que el número de neuronas $K_v1.1(+)$ es similar en ambas condiciones. La cuantificación total de la inmunoreactividad para $K_v1.1$ arrojó que el $29.5 \pm 4.8\%$ de las neuronas en animales control (143/485; n=10 campos) y el $28.3 \pm 5.4\%$ en lesionados (135/448; n=10 campos) presentan marca para este canal ($p > 0.05$ prueba *t*; Figura 24F). También evaluamos la inmunoreactividad para los canales $K_v1.2$. La Figura 24D muestra dos secciones representativas de ambas condiciones experimentales donde es posible apreciar que, tras la lesión, el número de neuronas $K_v1.2(+)$ se mantiene similar al grupo control. La inmunoreactividad $K_v1.2$ promedio estimada en secciones trigeminales de animales control fue $29.9 \pm 8.8\%$ (145/485; n=10 campos) versus $25.5 \pm 4.3\%$ en secciones provenientes de animales lesionados (122/448; n=10 campos) ($p > 0.05$ prueba *t*; Figura 24G).

Estos resultados están en línea con los hallazgos obtenidos mediante imagen de calcio, en términos que tras el daño corneal la expresión de los canales de potasio K_v1 no se vio alterada en este modelo de lesión axonal.

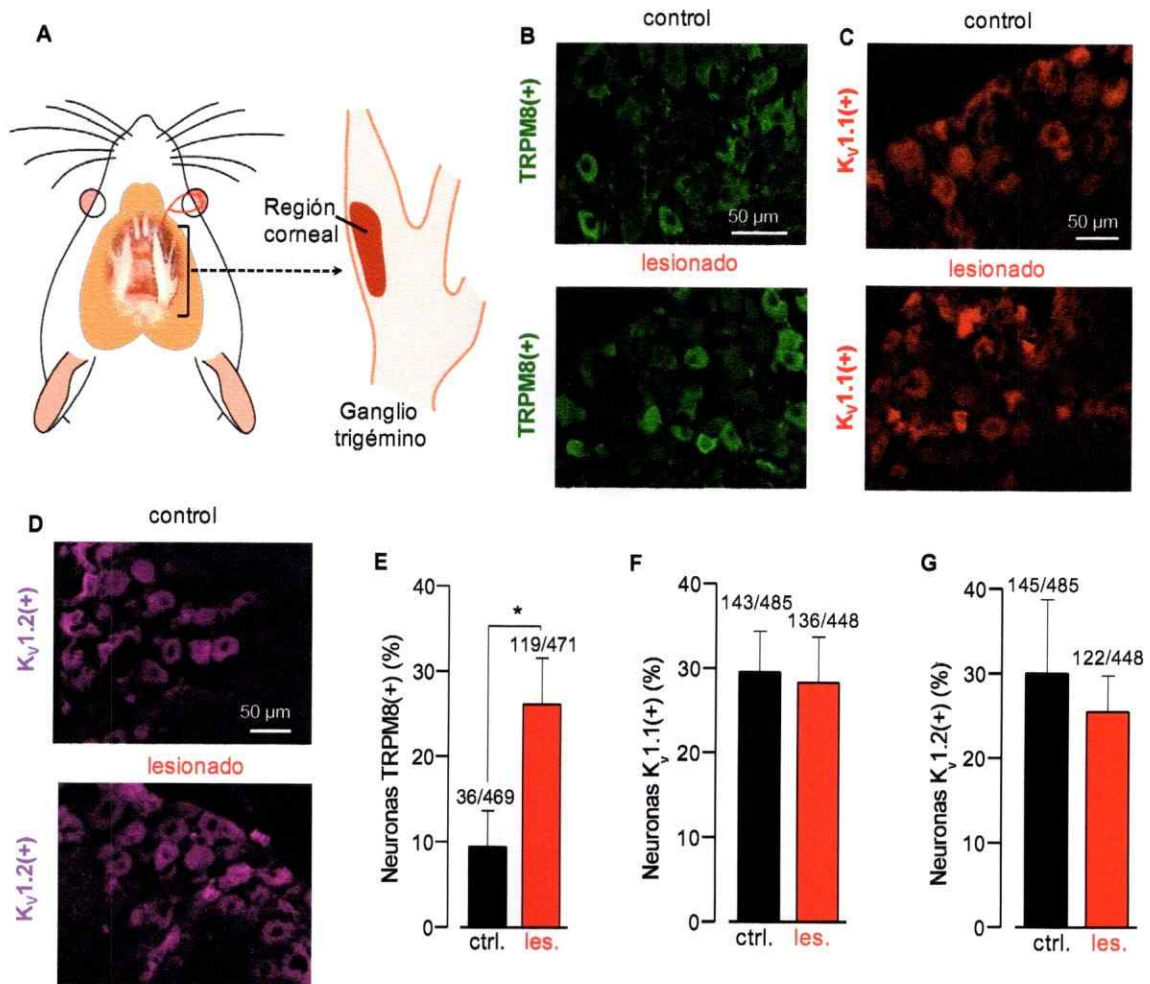


Figura 24. Inmunohistoquímica de TRPM8, $K_v1.1$ y $K_v1.2$ en ganglios trigéminos de animales control y lesionados. (A) Esquema del ganglio trigémino en el cual se puede apreciar las tres ramas trigeminales y la región donde se ubican las somas cuyas terminales proyectan hacia la córnea (marca corneal) (B, C y D) Imágenes representativas de la inmunotinción en secciones de ganglios trigéminos control y lesionados para TRPM8, $K_v1.1$ y $K_v1.2$ (barra, 50 μ m). (E, F y G) Gráficos de barras que muestran el porcentaje promedio de neuronas trigeminales TRPM8(+), $K_v1.1(+)$ y $K_v1.2(+)$ en condiciones control (barra negra) y lesionado (barra roja). Sobre cada barra se señala en número de neuronas analizadas (* $p < 0.05$ prueba *t*).

5.10. Tanto la actividad eléctrica espontánea como aquella en respuesta a mentol están aumentadas en terminales corneales lesionadas

El registro de la actividad eléctrica de las terminales corneales nos permitió establecer un correlato con los resultados obtenidos *in vitro*. Para desarrollar estos registros seguimos el diseño experimental descrito por Parra y colaboradores en 2010 (Figura 25A). Utilizamos un protocolo que nos permitió evaluar la actividad espontánea (a $33 \pm 1^\circ\text{C}$), durante un descenso de temperatura, en presencia de mentol y con frío más mentol (Figura 25B-C). En ojos sometidos a lesión, la frecuencia espontánea fue significativamente mayor, con un valor promedio de 5.6 ± 0.5 Hz ($n=18$), versus 3.7 ± 0.3 Hz ($n=35$) en los ojos controles (** $p<0.01$ prueba *t*; Figura 26A-B). Como se muestra en la Figura 26C, la temperatura umbral promedio entre terminales corneales controles y lesionadas no presentó diferencias estadísticamente significativas siendo $32.8 \pm 0.03^\circ\text{C}$ ($n=35$) y $32.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($n=18$), respectivamente ($p>0.05$ prueba *t*). Tampoco encontramos diferencias en la descarga en respuesta a frío, cuyo valor de frecuencia en la condición control fue de 34.8 ± 2.3 Hz ($n=35$) versus 31.6 ± 2.7 Hz ($n=18$) en los lesionados ($p>0.05$ prueba *t*; Figura 26D). También quisimos evaluar la influencia del mentol sobre la frecuencia de descarga en ambos grupos experimentales. Así reportamos que a $20 \mu\text{M}$ mentol la frecuencia del grupo control fue de 9.7 ± 1.1 Hz ($n=16$), versus 10.9 ± 1.9 ($n=8$) en los lesionados ($p>0.05$; Figura 26E).

Pensando que quizá a esa concentración la respuesta podría estar ya saturada, decidimos evaluar una concentración más baja de mentol. De esta manera, al utilizar 10 μM mentol encontramos una respuesta significativamente mayor en ojos lesionados que en controles, esto es 10.5 ± 0.8 Hz (n=7) versus 7.3 ± 0.7 Hz (n= 19) respectivamente (* $p < 0.05$ prueba *t*; Figura 26E). Por otro lado, al evaluar la respuesta máxima, esto es, en respuesta a un estímulo de frío más mentol (20 μM), no hubo diferencias entre controles y lesionados tal como muestra la Figura 26F, con valores de 55.1 ± 6.8 Hz (n=10) y de 53 ± 8.7 (n=4), respectivamente ($p > 0.05$ prueba *t*). Tampoco encontramos diferencias al estimular con frío más mentol 10 μM , donde la frecuencia del grupo control fue de 43.2 ± 5.1 (n=18) y la del lesionado de 52.7 ± 5 (n=7) ($p > 0.05$ prueba *t*; Figura 26F). Estos resultados apuntan a un importante correlato entre los resultados *in vitro* y los obtenidos con esta preparación *ex vivo*, en términos de una respuesta térmica y química exacerbada en las terminales corneales sensibles al frío en animales lesionados.

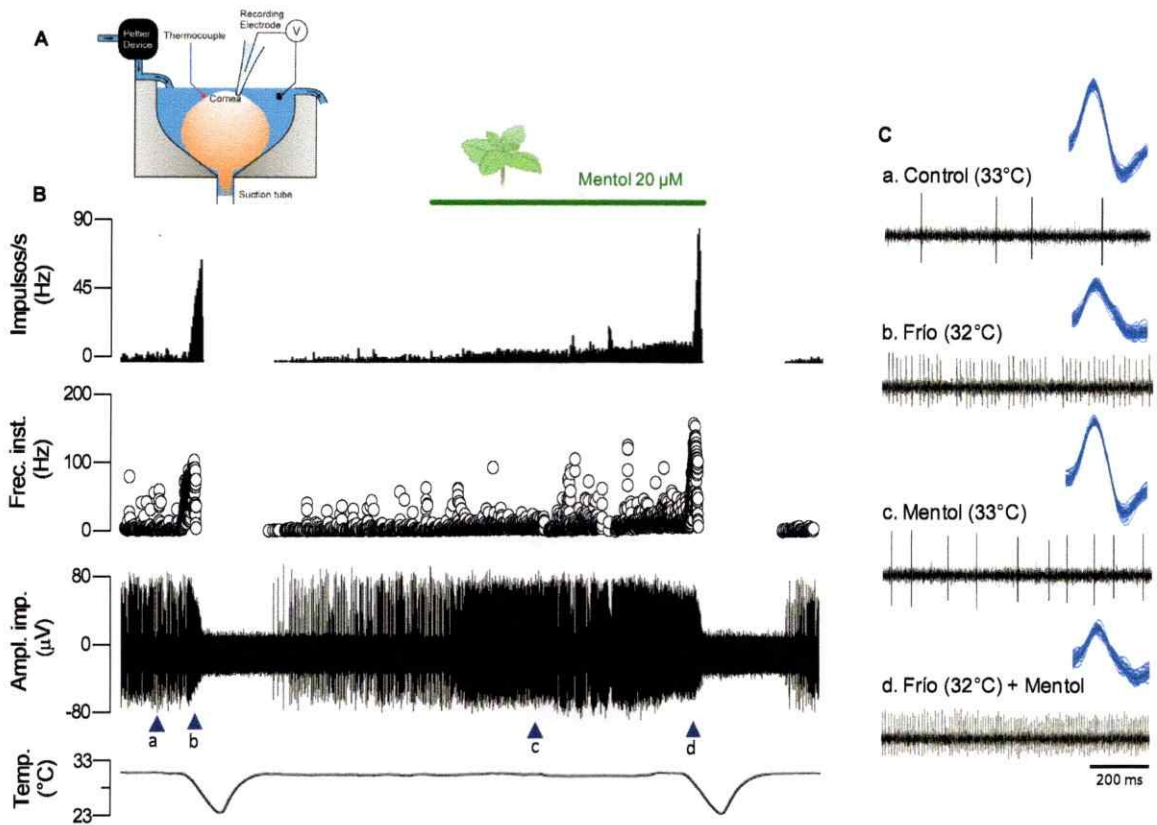


Figura 25. Respuestas a frío y mentol en una terminal corneal control. (A) Representación esquemática de la cámara usada para registrar la actividad de las terminales eléctricas en ojos de ratón **(B)** Actividad eléctrica en un receptor de frío unitario durante dos rampas consecutivas de frío en solución control y en presencia de 20 μM mentol (temperatura del baño $33 \pm 1^\circ\text{C}$). En **(C)** se detallan segmentos de los trazos a, b c y d del registro en **(A)** a una mayor resolución temporal. Nótese que en cada trazo expandido se observa como cambia el fenotipo de las espigas en presencia de frío (trazos azules).

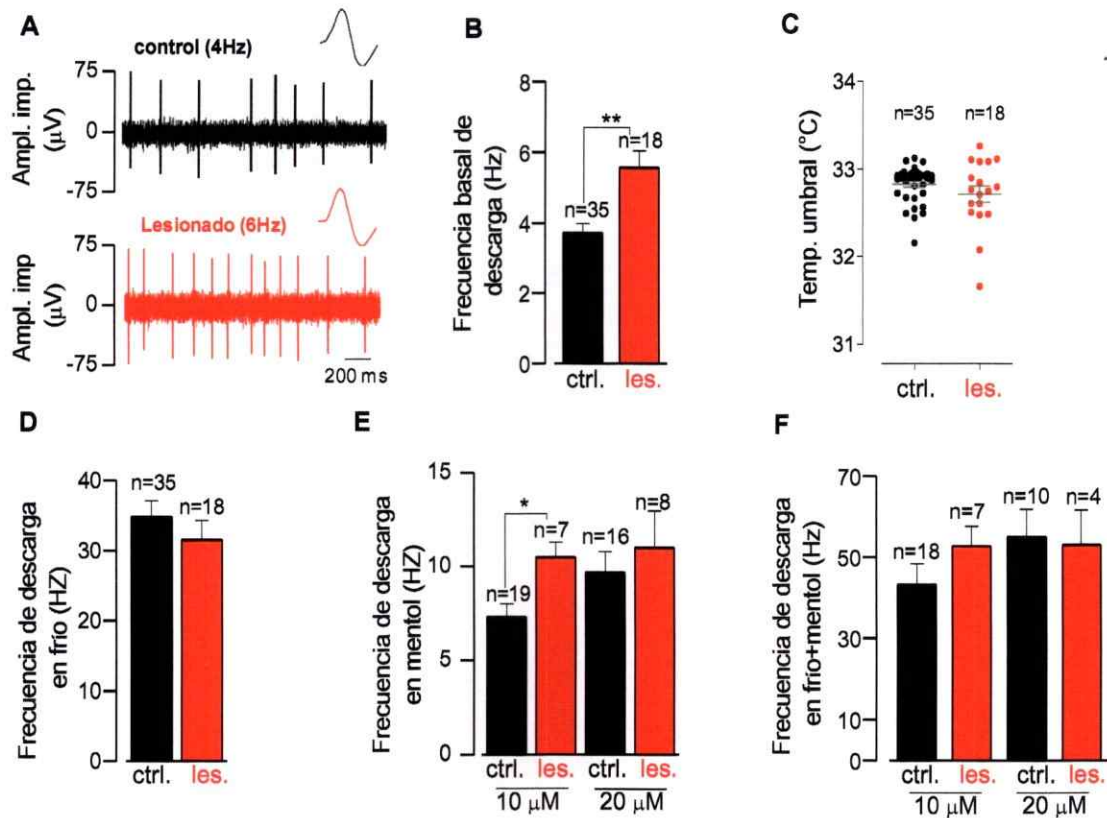


Figura 26. Cuantificación de la actividad eléctrica espontánea y en presencia de mentol más frío de terminales corneales de frío controles y lesionadas. (A) Trazos representativos de una terminal corneal control (negro) y lesionada (rojo). Se aprecia la mayor frecuencia de descarga en el registro lesionado. Sobre cada trazo se muestra una de las espigas registradas **(B)** Gráfico de barras de la frecuencia espontánea promedio de terminales controles (barra negra) y lesionadas (barra roja) a $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (** $p < 0.001$ prueba t). **(C)** Gráfico de puntos que muestra el umbral promedio de las terminales controles (barra gris horizontal). Las umbrales controles se muestran en círculos negros y los lesionados en círculos rojos ($p > 0.05$ prueba t). **(D-F)** Gráficos de barra que muestran la frecuencia de descarga de las terminales controles (barras negras) y lesionadas (barras rojas) en presencia de frío, mentol y mentol más frío respectivamente. Se evaluaron dos concentraciones de mentol a 10 y 20 μM tal como se indica en la parte inferior de cada gráfico **(E y F)** (* $p < 0.05$ prueba t). Sobre cada barra se indica el número total de terminales analizadas para cada caso.

5.11. La tasa de lacrimación basal aumenta post lesión corneal

Como se mencionó en la Introducción, las neuronas termorreceptoras de la córnea que expresan TRPM8 también actúan como detectores de humedad en la superficie ocular, y constituyen un componente importante en la tasa de lacrimación basal. Teniendo en consideración los resultados descritos previamente, decidimos medir la tasa de lacrimación basal para evaluar el efecto de la lesión y la expresión funcional de TRPM8 en la córnea. Para medir la lacrimación basal, utilizamos hebras oftálmicas de algodón impregnadas en rojo fenol (Zone-Quick, Menicon), las cuales se tiñen de rojo en contacto con el fluido lacrimal. Para esta prueba, los animales control y lesionados fueron anestesiados para luego colocarles la hebra oftálmica (5 mm de longitud) en el párpado inferior por dos minutos, tiempo tras el cual fue retirada para establecer la longitud de la tinción, tal como se muestra en la Figura 27A. Durante todos estos experimentos se midió tanto la temperatura ambiente como la temperatura de la superficie corneal, estos valores promedio se resumen en la Tabla 2. Nuestros resultados muestran que el promedio de la tasa de lacrimación basal fue en animales controles igual a 1.75 ± 0.2 mm en dos minutos ($n=22$) contra 1.82 ± 0.2 mm en animales lesionados ($n=22$) al día cero, es decir, previo a la cirugía. El promedio de la tasa de lacrimación basal 17 días después de la lesión fue de 1.8 ± 0.4 mm en dos minutos en animales control ($n=22$) y 2.8 ± 0.3 mm en animales lesionados ($n=22$), dando cuenta de un aumento significativo en la lacrimación basal.

En el día 21 post lesión este incremento en la tasa de lacrimación siguió siendo significativamente mayor en animales lesionados, con 3.3 ± 0.4 mm en dos minutos ($n=22$) respecto a los animales controles que promediaron 1.9 ± 0.3 mm ($n=23$) ($*p<0.05$ prueba t , Figura 27B). Esta aproximación nos permitió evaluar de forma indirecta las alteraciones en la funcionalidad de los receptores corneales producto de la lesión, la cual da cuenta de cambios en la lacrimación basal en respuesta a esta forma de daño axonal en ratones.

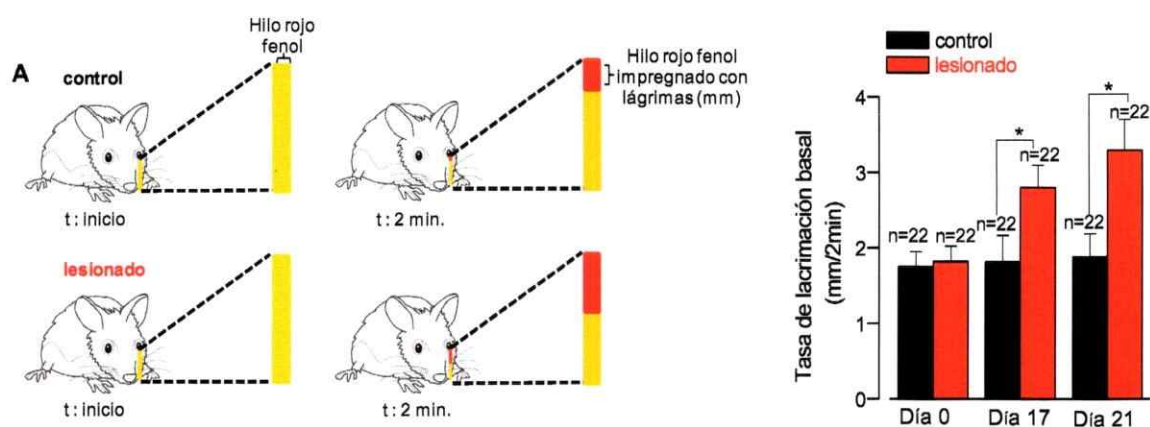


Figura 27. Tasa de lacrimación en animales control y lesionados. (A) Se indica la ubicación de la hebra de rojo fenol (color amarillo) sobre el ojo del ratón a dos tiempos (minutos: 0 y 2). En el esquema se puede apreciar como avanza las lágrimas a través de la hebra (color rojo). **(B)** Gráfico de barras que resume la tasa basal de lacrimación promedio en milímetros (mm) durante dos minutos, el día previo a la lesión (día 0), el día del marcaje (día 17) y el día del cultivo (día 21) en animales control y lesionados ($*p<0.05$ prueba t).

Tabla 2. Temperatura ambiental y corneal en los experimentos de lacrimación.

	Día 0		Día 17		Día 21	
	control	lesionado	control	lesionado	control	lesionado
Temp. ambiente ($n=22$)	25.0 ± 0.3 °C	25.0 ± 0.3 °C	24.3 ± 0.5 °C	25.0 ± 0.4 °C	24.3 ± 0.4 °C	24.4 ± 0.5 °C
Temp. Córnea ($n=22$)	29.5 ± 0.2 °C	29.5 ± 0.3 °C	29.5 ± 0.3 °C	29.5 ± 0.4 °C	29.0 ± 0.3 °C	29.1 ± 0.3 °C
prueba-t	$p = 0.8$		$p = 0.9$		$p = 0.7$	

6. DISCUSIÓN

La córnea es un tejido altamente innervado por diferentes tipos de neuronas sensoriales. Varios procedimientos quirúrgicos como cirugías del tipo LASIK (del inglés *L*aser *A*ssisted in *S*itu *K*eratome*l*esis), PRK (del inglés *P*hotorefractive *k*eratectomy) o LASEK (del inglés *L*aser *A*ssisted *S*ubepithelial *K*eratome*l*esis) involucran un grado importante de daño en las terminales de estas neuronas. Cuando se estimulan estas terminales sensoriales se pueden evocar sensaciones que incluyen sequedad ocular, disestesias y dolor, entre otras. El principal hallazgo de esta tesis doctoral fue reportar el papel crítico del canal de iones TRPM8 en la respuesta aumentada al frío de neuronas corneales sometidas a lesión periférica, y en la lacrimación basal exacerbada producto del daño quirúrgico de sus terminales.

El modelo de lesión corneal en ratones y marcaje retrógrado de neuronas trigeminales que inervan la cornea

En esta tesis desarrollamos un procedimiento quirúrgico de lesión controlada en la córnea, consistente en un corte superficial en forma de semicircunferencia (~330°) dejando una pequeña zona intacta (región bisagra). Este procedimiento nos permitió tener una recuperación total de la región lesionada sin efectos secundarios tales como el vaciamiento de la cámara

anterior, inflamación ocular u opacidad corneal. Este procedimiento de lesión continua difiere de otras formas de daño quirúrgico que se han utilizado, donde la lesión se generó a través de cortes segmentados sobre la córnea (Namavari et al., 2011; Namavari et al., 2012), mediante el daño mecánico de la superficie corneal (Yu et al., 2008) o por medio de la aplicación tópica de productos neurotóxicos (Sarkar et al., 2012). Así, nuestro modelo de lesión aseguró ser más ventajoso respecto a los antes mencionados toda vez que logramos conseguir un daño sobre un área amplia del tejido corneal, tal como lo evidencian nuestros resultados obtenidos con los ratones transgénicos Thy-1 YFP. Nuestro modelo de lesión se asemeja a los procedimientos quirúrgicos del tipo LASIK y LASEK, puesto que al igual que estas cirugías llevadas a cabo en humanos, nosotros generamos una lámina o *flap* corneal. A su vez, estos dos tipos de cirugías difieren entre sí en el grosor de la lámina corneal generada, siendo la de tipo LASIK más profunda. Cualitativamente, nuestra lesión abarca gran parte del grosor total de la córnea por lo que nuestro modelo se asemejaría al procedimiento tipo LASIK. Precisamente los datos provenientes de la clínica, muestran que esta cirugía Lasik trae consigo una notoria pérdida en la reinervación corneal, con una alta incidencia del fenotipo de sensación de sequedad ocular (Levitt et al., 2015; Shaheen and Bakir, 2013). Así, nuestros resultados podrían reflejar, al menos en parte, los cambios que podrían ocurrir en humanos sometidos a cirugías corneales.



Con el fin de caracterizar exclusivamente aquellas neuronas provenientes de la córnea, realizamos una marcación retrógrada de las terminales mediante un colorante fluorescente. Inicialmente utilizamos el marcador Dil (1,1'-Diocetyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('Dil'; DiIC18(3))) que es soluble en DMSO (dimetilsulfóxido). Este marcador lipofílico no sólo resultó poco efectivo en términos del número de neuronas marcadas (8 ± 4 neuronas/ganglio), sino que además afectó la recuperación post cirugía corneal promoviendo procesos inflamatorios en el área lesionada. Ante esta situación, decidimos incorporar el marcador retrógrado soluble en agua FM 1-43 (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium Dibromide).

Conjuntamente con este cambio de colorante fluorescente, incorporamos un paso adicional de eliminación parcial del epitelio corneal con 1-heptanol. Esta remoción epitelial no fue capaz de generar un daño adicional en la córnea, tal como se ha descrito previamente (Cintron et al., 1979). Estas estrategias combinadas nos permitieron aumentar el número de neuronas marcadas (38 ± 9 neuronas/ganglio), reduciendo además los efectos secundarios de la aplicación de solventes no acuosos sobre el epitelio corneal. Es importante señalar que durante la marcación hubo particular cuidado en circunscribir el FM 1-43 a la zona más apical de la córnea que es coincidente con el área de lesión, de modo de evitar el marcaje de tejidos aledaños que también son

inervados por la rama oftálmica del trigémino (conjuntiva y párpados). La estricta restricción del área marcada evitó tener que lavar los ojos post marcaje retrógrado, en contraste con los reportes de otros autores (Veira Moreira et al., 2007), permitiendo reducir las posibilidades de marcación fuera de la región de interés. Los días transcurridos entre la marcación y el sacrificio de los animales los estimamos de acuerdo al tiempo de permanencia del FM 1-43 en el soma de las neuronas corneales. Según nuestras observaciones el tiempo adecuado de permanencia fueron cuatro días, por tanto el cultivo de neuronas trigeminales se realizó cuatro días post marcaje. Esta ventana temporal entre la marcación retrógrada y el cultivo neuronal es muy similar a la descrita por otros autores, las cuales rondan entre los 4 a 5 días (De Felipe et al., 1999; Lopez de et al., 2000; Veira Moreira et al., 2007). Los experimentos *in vitro* e *in vivo* en ratones silvestres fueron realizados utilizando la cepa de ratones Balb/c. En los experimentos en que se cuantificó la regeneración axonal, utilizamos los ratones transgénicos Thy-1, que pertenecen a la cepa C57BL/6. Se ha reportado que los ratones C57BL/6 presentan una regeneración axonal más lenta que otras cepas (Xin et al., 1990; Xin et al., 1994), lo que eventualmente podría incorporar una subestimación en nuestros resultados de la tasa de reinervación corneal. Sin embargo, como se discutirá más adelante, la menor tasa de éxito de los registros extracelulares en terminales corneales de animales lesionados es coincidente con una reinervación parcial como la descrita en este trabajo.

La expresión del canal de iones TRPM8 aumenta post lesión sin cambios aparentes en los niveles de expresión de los canales $K_v1.1$, $K_v1.2$, TRPA1 y TRPV1

Por medio de experimentos en imagen de Ca^{2+} encontramos que en animales sometidos a lesión corneal se produce un aumento significativo en el porcentaje de neuronas corneales sensibles a frío (NCSF), las que además presentaron una respuesta de mayor magnitud al descenso de la temperatura. Estos resultados sugieren que dentro del total de neuronas corneales hubo un porcentaje de neuronas que tras la lesión desarrollaron sensibilidad al frío. La aparición de esta nueva subpoblación de neuronas sensibles al frío posiblemente sea mediada por TRPM8, puesto que estas neuronas también incrementaron su sensibilidad a mentol. Junto con lo anterior, los resultados que obtuvimos mediante inmunohistoquímica a nivel de ganglios trigéminos también dan cuenta de un incremento significativo en el número de neuronas corneales que presentaron inmunoreactividad al anticuerpo anti TRPM8.

Xing y colaboradores sugirieron que las poblaciones de neuronas sensibles al frío y capsaicina (agonista de TRPV1) corresponderían a neuronas del tipo nociceptores (Xing et al., 2006). Más aún, estos mismos autores (2007), utilizando un modelo de lesión periférica consistente en la ligación constrictiva del nervio ciático, reportaron la aparición de hipersensibilidad dolorosa al frío inocuo acompañado de un incremento en la expresión de TRPM8.

Estos autores relacionaron este aumento de expresión de TRPM8 con la aparición de una subpoblación de neuronas de frío que además de ser sensibles a mentol lo eran también a capsaicina. Ellos concluyeron que esa población de neuronas mentol-capsaicina positivas correspondían a neuronas del tipo nociceptores, explicando así el cuadro de dolor neuropático post lesión (Xing et al., 2007). Sin embargo, Xing y colaboradores no estudiaron aspectos cruciales que pudieran hacer inequívoca la interpretación de sus resultados, tales como la descripción de la distribución de los umbrales de temperatura de la población de neuronas de frío o sus propiedades electrofisiológicas, que permitieran determinar si las neuronas que sobreexpresaban TRPM8 de hecho correspondían a neuronas sensibles al frío de alto umbral (que coexpresaban TRPV1), o si se trataba de receptores polimodales, como ellos concluyeron.

Tomando en consideración estos antecedentes, nosotros evaluamos en detalle el fenotipo de las NCSF surgidas tras la lesión mediante la caracterización de su umbral térmico de activación y de su sensibilidad a AITC (agonista de TRPA1) y a capsaicina. Determinamos los umbrales térmicos en ambas poblaciones de neuronas de frío y no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, pese a existir una tendencia en la disminución del umbral de 0.9°C. Debido al tamaño total de la muestra analizada (60 neuronas corneales de frío control versus 58 provenientes de ratones lesionados), posiblemente un número mayor de neuronas corneales

podría consolidar esta tendencia como significativa. Como se ha publicado, los umbrales térmicos de las neuronas sensibles a frío presentan una notoria dispersión de valores (Madrid et al., 2009), lo que podría estar enmascarando una diferencia entre los umbrales de frío entre las poblaciones de neuronas corneales analizadas. En esta misma línea, cabe destacar que al separar las neuronas entre aquellas de alto (NCSF-AU) y bajo umbral (NCSF-BU) encontramos diferencias significativas en el umbral térmico en estas últimas, precisamente aquellas que expresan mayores niveles de TRPM8 (González et al., 2015a; Madrid et al., 2009).

Como ya se mencionó, la expresión del canal TRPV1 se ha relacionado principalmente con una subpoblación de neuronas nociceptoras. Para evaluar la respuesta funcional de aquellas neuronas que expresan este canal nosotros utilizamos capsaicina, para determinar sensibilidad de las NCSF a este agonista. No encontramos diferencias significativas entre ambas poblaciones de NCSF post daño corneal. Es importante destacar que en ambas poblaciones de NCSF, el porcentaje promedio de respuesta a capsaicina *in vitro* fue del 63%, valor muy similar al reportado por Parra y colaboradores (65%) en terminales corneales de frío *ex vivo* en ratones (Parra et al., 2010).

De igual manera, caracterizamos la expresión del canal TRPA1, cuantificando la magnitud de la respuesta en presencia de AITC y la sensibilidad poblacional; no encontramos diferencias significativas que pudieran sugerir posibles cambios en los niveles de expresión de este canal en respuesta al daño periférico. Sin embargo, tanto para TRPV1 como para TRPA1 el número de experimentos no permite descartar en forma definitiva que estos canales sufran cambios en sus niveles de expresión funcional producto de una lesión de estas características. Un mayor tamaño muestral podría ayudar a definir este punto en el futuro.

El mentol tiene un efecto cruzado como antagonista tanto de TRPM8 como de TRPA1. Para evaluar una posible contribución de TRPA1 en la respuesta a mentol, examinamos la relación entre los niveles de expresión de TRPM8 y TRPA1. Nuestros datos, obtenidos mediante la aplicación de AITC, dieron cuenta de un bajo número de NCSF-AITC positivas en los grupos controles y lesionados (6 y 7 neuronas respectivamente), sugiriendo que ambos canales exhibían una muy baja o casi nula coexpresión, tal como se ha reportado diferentes autores (Karashima et al., 2007; Kobayashi et al., 2005; Parra et al., 2010; Story et al., 2003). Por tanto, la probabilidad que NCSF hubiese respondido a mentol vía TRPA1 fue baja.

Todo lo discutido hasta ahora ha sido en torno a la expresión funcional de los canales TRPA1, TRPV1, y especialmente, TRPM8. Sin embargo, es preciso considerar también a los canales de potasio tipo *shaker* $K_v1.1$ y $K_v1.2$, contraparte molecular de la corriente I_{KD} en las neuronas somatosensoriales primarias y que actúan como un freno al efecto despolarizante de los canales termoTRP (Madrid et al., 2009). Por tanto, una disminución en esta corriente de freno podría promover el reclutamiento de neuronas antes insensibles al rango de frío estudiado, lo que podría explicar el aumento porcentual de NCSF que hemos reportado. Nuestra hipótesis también incluye la idea que el daño axonal llevaría a una regulación a la baja (*downregulation*) de los niveles de expresión de estos canales responsables de la I_{KD} .

Esto podría explicar otra característica descrita por pacientes sometidos a cirugía corneal, que es la prevalencia de dolor espontáneo durante el post operatorio. Una disminución en la expresión de los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$ produciría un efecto similar sobre la sensibilidad térmica dolorosa al observado por la inhibición farmacológica selectiva de la I_{KD} *in vivo* (Madrid et al., 2009).

Con el objetivo de evaluar el papel de la corriente I_{KD} en ambos grupos experimentales, utilizamos la droga 4-AP a una concentración de 100 μ M, la cual resulta ser específica como bloqueador de los canales responsables de esta corriente en neuronas trigeminales (Madrid et al., 2009).

Nuestro razonamiento fue que si las neuronas sensibles al frío lesionadas tienen disminuida la I_{KD} , entonces el efecto de este bloqueador debería estar disminuido en estas células, a diferencia de lo esperado para las neuronas control. Sin embargo, el desplazamiento del umbral medio de respuesta al frío tanto en las NCSF del grupo control y lesionado fue similar, al igual que la magnitud de la respuesta al frío en presencia de 4-AP. Más aún, de existir una reducción en la corriente I_{KD} era de esperar también un aumento porcentual en la población total de NCSF a partir de NCSF-AU (puesto que son éstas las que expresan un alto nivel de I_{KD}). Es decir, una subpoblación de estas NCSF-AU, que señalizan frío intenso y doloroso, se transformaría en neuronas de bajo umbral sensibles a frío en el rango inocuo, tal como recientemente se ha descrito (González et al., 2015b; Restrepo, 2013)

Para poner a prueba esta predicción, cuantificamos a nivel poblacional el porcentaje de NCSF-AU entre ambos grupos de neuronas, sin encontrar diferencias significativas entre ambas poblaciones. Estos resultados sugieren que es poco probable hallar cambios en los niveles de expresión de los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$, y por extensión en la corriente I_{KD} , en las NCSF por efecto de la lesión.

Adicionalmente evaluamos por inmunotinción la expresión de las subunidades $K_v1.1$ y $K_v1.2$ a nivel celular, encontrando que en los grupos control y lesionados el porcentaje de inmunoreactividad rondó el 30% de las neuronas corneales, apoyando nuestra idea de la similitud en la expresión de los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$ entre ambos grupos experimentales. Un procedimiento experimental complementario sería evaluar la inmunoreactividad de ambos canales de potasio en NCSF, es decir, realizar un ensayo de inmunoreactividad contra TRPM8 y canales K_v1 en las mismas neuronas corneales. Lamentablemente, los anticuerpos contra TRPM8 disponibles en el mercado son deficientes, por lo cual es difícil conseguir una inmunoreactividad doble para TRPM8 y otro canal de interés. Por tanto las estrategias experimentales se han remitido a ensayos de inmunofluorescencia por separado (como en nuestro caso) o mediante hibridaciones *in situ* (Caspani et al., 2009; Peier et al., 2002; Rossi et al., 2006). Otra alternativa que podría abordarse en el futuro es utilizar alguna de las cepas de ratón transgénico TRPM8-GFP con el fin de simplificar la identificación de las neuronas que expresen este canal termosensible, lo que permitiría realizar experimentos de coexpresión con distintos canales de interés complementarios a los reportados en esta tesis. La conclusión que emerge a partir de nuestros resultados difiere a la obtenida por otros autores y por nosotros mismos en otros modelos de lesión axonal, los cuales sugieren una regulación a la baja de los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$. (Fan et al., 2014; González et al., 2015b; Yang et al., 2004; Zhao et al.,

2013). Esta discrepancia puede deberse a las diferencias entre los modelos de lesión utilizados y los diferentes territorios somáticos en los que se realiza el daño. Mientras nuestro modelo incluye la sección de terminales periféricas que inervan el tejido corneal, en los trabajos antes mencionados se utilizó una lesión de tipo constrictiva en axones de terminales que inervan la piel.

Todos los resultados obtenidos por medio de imagen de Ca^{2+} e inmunohistoquímica tendientes a evaluar posibles cambios en la expresión de los canales de iones TRPM8, TRPA1, TRPV1 y $\text{K}_v1.1\text{-K}_v1.2$, discutidos arriba, nos indican que principalmente TRPM8 tendría un cambio en su expresión y que tal cambio estaría ocurriendo exclusivamente en neuronas corneales de frío canónicas. Para detallar el fenotipo de estas NCSF realizamos experimentos electrofisiológicos, los cuales confirmaron un incremento funcional de TRPM8 medido como la densidad de corriente en respuesta a los agonistas frío y mentol mediante post lesión. Estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante imagen de calcio, apoyando nuestra idea que la lesión trae consigo una regulación al alza (*Upregulation*) de TRPM8 en las neuronas corneales de frío.

Nos preguntamos si los cambios observados en la sensibilidad térmica y química de las neuronas de frío corneales están asociados a modificaciones en las propiedades activas y pasivas de la membrana, lo que nos permitiría

corroborar nuestras observaciones iniciales en cuanto a que las nuevas NCSF que aparecen tras la cirugía correspondían sólo a termorreceptores de frío canónicos y no a nociceptores polimodales con sensibilidad a frío inocuo. Para estos fines usamos la técnica de *patch clamp* en configuración de célula completa bajo corriente controlada en NCSF. Los resultados (Tabla 1) muestran que no hubo diferencias entre ambas poblaciones, es decir, la totalidad de las NCSF controles y lesionadas mostraron una alta resistencia de entrada, baja corriente reobase, y descarga de potenciales de acción de corta duración con el ancho y forma canónicas de las neuronas termorreceptoras de frío trigeminales.

Por tanto, aquellas NCSF que aparecen tras la cirugía podrían corresponder a neuronas que previo a la lesión expresaban niveles indetectables de TRPM8, por lo cual se manifestaron como insensibles al frío. La lesión podría tener un efecto a nivel transcripcional que aumentaría la expresión del canal, otorgándole a estas neuronas un fenotipo termosensible. Un experimento que complementaría estos resultados sería realizar una caracterización de las propiedades biofísicas tales como conductancia máxima (G_{max}), valor de la pendiente (S) y el voltaje medio ($V_{1/2}$) de las NCSF, con el fin de robustecer nuestra conclusión sobre el aumento de canales TRPM8 en respuesta a la lesión, más que a un cambio en sus propiedades biofísicas.

Finalmente, es importante mencionar que una característica destacada de las neuronas termorreceptoras de frío por sobre otras neuronas sensoriales es la presencia de una amplia variedad de canales de iones (González et al., 2015a). Por lo anterior, queda abierta la opción de que también existan cambios de expresión relacionados con otros tipos de canales que no fueron considerados en esta tesis, lo que podría aportar nuevas pistas sobre los mecanismos moleculares alterados en la termotransducción de neuronas sometidas a daño periférico y su relación con distintos tipos de alteraciones sensoriales.

La actividad eléctrica de las terminales corneales y la tasa de lacrimación están aumentadas en animales lesionados

Parra y colaboradores demostraron que la humedad de la superficie corneal está regulada por termorreceptores de frío que expresan TRPM8. Estos autores reportaron que estos termorreceptores de frío presentan una actividad eléctrica espontánea a temperatura basal de la córnea (~33°C), siendo además extraordinariamente sensibles a pequeños cambios de temperatura, incluso menores a 1°C. Así mismo, reportaron que los canales TRPA1 no serían determinantes moleculares en esta actividad eléctrica basal, ni en la actividad eléctrica en respuesta a frío (Parra et al., 2010).

Teniendo en consideración esos resultados nosotros nos preguntamos si la regulación al alza de TRPM8 que observamos en cultivo se reproducía a nivel de las terminales. Siguiendo esta idea, era razonable esperar que tanto la actividad eléctrica basal como la respuesta a agonistas de TRPM8 se vieran incrementadas en ojos lesionados. En efecto, la actividad eléctrica espontánea de los termorreceptores de animales sometidos a lesión se incrementó significativamente en comparación con los controles.

Se podría especular que este aumento en las descargas podría ser en parte el resultado del efecto sensibilizador de mediadores inflamatorios tales como bradiquidina, histamina y prostaglandinas liberados en respuesta a la lesión. Sin embargo, esta opción es poco probable; en primer lugar, el tiempo transcurrido entre la lesión y los registros extracelulares (tanto en cultivo como en la córnea) asegura que la respuesta inflamatoria, de estar presente, al menos estaría atenuada. En este sentido, una publicación relacionada con el papel de la respuesta inflamatoria aguda en un modelo de lesión corneal similar al nuestro, sugiere que la mayor contribución de esta respuesta ocurre dentro de las primeras horas (12 a 24 horas) post daño, es decir, en una ventana de tiempo muy alejada de los 21 días post lesión de nuestro diseño experimental (Li et al., 2011). En segundo lugar, Zhang y colaboradores, utilizando una preparación de córnea *ex vivo* similar a la ocupada en esta tesis, demostraron que los mediadores inflamatorios inhiben la actividad de las terminales

corneales que expresan TRPM8 (Zhang et al., 2012a). Por lo tanto, en el hipotético caso de tener un efecto residual de estos mediadores inflamatorios, estaríamos subestimando una actividad eléctrica que ya se encontraría exacerbada. Un tercer escenario posible, que podría dar cuenta de esta actividad eléctrica incrementada, sería una reducción en la expresión de los canales de potasio $K_v1.1$ y $K_v1.2$. Este escenario es poco probable, pues nuestros resultados obtenidos en cultivo y por medio de inmunofluorescencia no sugieren cambios en la expresión de estos canales de potasio. Sumado a lo anterior, Parra y colaboradores tampoco encontraron un papel relevante de la corriente I_{KD} a nivel de las terminales de bajo umbral en base a los resultados obtenidos con 4-AP (Parra et al., 2010). En este escenario, podría llevarse a cabo un experimento complementario que evaluara posibles cambios en la expresión de canales de sodio resistentes a tetrodotoxina (TTX), sobre la base de las observaciones de Donovan y colaboradores en córneas de cobayo (datos no publicados). Estos autores indicaron que la aplicación de lidocaína (0.01%) era capaz de suprimir la actividad eléctrica espontánea de las terminales provenientes de córneas intactas, efecto que estaba reducido en aquellas provenientes de córneas lesionadas (Donovan-Rodriguez et al., 2006). No obstante lo anterior, podemos configurar un cuadro donde TRPM8 se posiciona como un actor central en la respuesta eléctrica alterada post lesión.

En cuanto a los resultados obtenidos con la aplicación del agonista mentol, si bien a concentraciones de 20 μM no detectamos diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, éstas si aparecieron al reducir la concentración a la mitad. Sin embargo, la respuesta máxima de los termorreceptores de frío, esto es, la respuesta al estímulo combinado de mentol más frío, no mostró diferencias significativas a ninguna de las concentraciones de mentol probadas. Una posible explicación para estos resultados es que la respuesta a ambos estímulos combinados ya haya estado saturada, lo que no permitiría revelar una frecuencia de descarga mayor en las terminales lesionadas. Por tanto, sería necesario ensayar concentraciones más bajas de mentol para comprobar esta interpretación de nuestros resultados. Otro punto a considerar es la disparidad del tamaño muestral entre los registros extracelulares provenientes de animales control y lesionados. Según nuestras observaciones, a los 21 días post lesión la reinervación corneal no es equivalente a los niveles iniciales, lo que aumenta la dificultad de encontrar terminales en córneas lesionadas. La interpretación más sencilla de estos resultados es que habría menos terminales inervando la córnea, pero que tendrían una descarga basal mayor.

Los umbrales promedio de frío que encontramos en las terminales corneales versus los obtenidos a nivel del soma presentan diferencias. Esta diferencia entre ambos umbrales fue de 5°C , es decir, el promedio de la

temperatura umbral de las terminales está situado a una temperatura 5°C más alta que en los somas. Esta marcada diferencia puede explicarse por el contexto subcelular en el que se expresa TRPM8, es decir, podrían existir interacciones con otras proteínas de membrana o modificaciones postraduccionales propias del canal (Madrid and Pertusa, 2014; Madrid et al., 2015) que no sean equivalentes entre la terminal y el soma que podrían dar cuenta de estas diferencias de umbral. Sin embargo, es posible que la mayor dificultad que tiene registrar las terminales de alto umbral en la córnea, producto del desplazamiento del punto de inicio del disparo de potenciales de acción producto del frío, generen una subestimación del tamaño poblacional de estas neuronas, influyendo sobre el umbral promedio. Más y nuevos experimentos son necesarios para dilucidar entre estas posibilidades.

Como se dijo anteriormente, el trabajo de Parra y colaboradores permitió revelar el papel de las terminales que expresan TRPM8 en la humedad de la superficie ocular. Este rol está referido a la regulación de la tasa de lacrimación basal dependiente de TRPM8 (Parra et al., 2010). Sumado a lo anterior, otros antecedentes provenientes de la clínica reportan alteraciones sensoriales surgidas durante el período post operatorio de cirugías corneales, las cuales incluyen disestesias, cambios en la tasa de lacrimación e hipersensibilidad al frío. Más aún, la densidad de las terminales nerviosas en la córnea decrecen con la edad (Niederer et al., 2007); así en individuos de mayor edad el número

total de terminales decrece en torno al 50%. Esta condición implica una reducción en el número total de inervaciones aferentes hacia los centros parasimpáticos (ubicados en el ganglio pterigopalatino), de cuya actividad depende en un porcentaje importante la lacrimación, lo que trae consigo una disminución en ésta (Belmonte et al., 2011). Teniendo presente estos antecedentes, decidimos explorar si había un correlato funcional de nuestros resultados *in vitro* con un ensayo de medición de la lacrimación basal en animales anestesiados. Nuestra línea de pensamiento fue que un aumento en la expresión de TRPM8 en las terminales corneales traería consigo cambios en la lacrimación basal. En efecto, la lacrimación de animales controles y lesionados bajo condiciones experimentales similares (Tabla 2) se encontraba aumentada post daño axonal. Ahora bien ¿cómo se relacionan estos resultados con los obtenidos *in vitro*? Recapitulando nuestras observaciones tenemos un alza en la expresión de TRPM8 en los somas de neuronas corneales, una actividad eléctrica basal aumentada en las terminales periféricas, una disminución en el número de terminales corneales y un aumento de la tasa de lacrimación. Todas estas características que emergen post lesión corneal parecen apuntar a la sensación descrita como "córnea fantasma", es decir, menos terminales corneales, pero con una mayor lacrimación basal lo que podría estar generando una errónea sensación de sequedad ocular (Belmonte, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no existía evidencia a nivel molecular que pudiera explicar esta sensación de córnea fantasma.

La síntesis de nuestros resultados se esquematiza en el modelo que proponemos en la Figura 28. Pero aún queda la pregunta no resuelta de cómo un incremento en la tasa de lacrimación puede implicar una sensación de malestar o sequedad ocular. Podemos argumentar que esta actividad exacerbada de las terminales podría ser decodificada a nivel central como la respuesta ante la pérdida de humedad en la superficie corneal, generando así una anómala sensación de sequedad ocular. Un antecedente relevante en este sentido es el reporte de Hirata y colaboradores, en que describieron una clase de neuronas trigeminales de segundo orden ubicadas a nivel del núcleo del tracto espinal (específicamente en la región de transición de los sub núcleos interpolar y caudal), las cuales participan en la regulación de la humedad corneal (Hirata et al., 2004). Estas neuronas de segundo orden podrían ser las responsables un componente importante de la sensación de sequedad ocular por sus conexiones con la corteza somatosensorial.

Los aspectos que quedan por abordar hacia el futuro son varios. Particular interés presenta el papel de los nociceptores post lesión axonal. Según la literatura, este tipo de terminales representa cerca del 60% del total de la inervación (Belmonte, 2007), convirtiendo a la córnea en uno de los tejidos con mayor potencial de generar dolor en el cuerpo humano (Rosenthal and Borsook, 2012). Si bien nuestros resultados *in vitro* no dan cuenta del reclutamiento de nociceptores post lesión, queda abierta la interrogante del

papel que podrían tener este tipo de terminales en el dolor que surge post daño corneal (Belmonte et al., 2015). Así mismo, queda abierto el desafío de idear algún ensayo conductual en roedores que permita establecer si existe una condición nocifensiva (por ejemplo hipersensibilidad al frío) en aquellos sometidos a lesión corneal. Por último, un ensayo conductual complementario a nuestros resultados obtenidos *in vivo*, podría ser evaluar la frecuencia de parpadeos. Esta propuesta surge a partir de una publicación reciente que revela el papel de las terminales corneales que expresan TRPM8 en la frecuencia de parpadeos en respuesta a cambios osmóticos de la lágrima, donde ratones *knockout* para este canal disminuyeron significativamente su parpadeos en condiciones basales (Quallo et al., 2015).

Finalmente, dentro de las proyecciones de esta tesis está evaluar si la lesión efectivamente provoca un aumento en el número de canales TRPM8 insertados en la membrana plasmática. Una de las técnicas que se podrían utilizar para abordar esta pregunta es un ensayo de biotilación, utilizando cultivos de neuronas procedentes de la rama oftálmica del ganglio. Tras el ensayo, y comparando muestras procedentes de cultivos lesionados y control, la técnica de *western blot* nos permitiría estimar tanto los niveles de expresión total de TRPM8, como la cantidad presente en la membrana plasmática. Una dificultad asociada al desarrollo de experimentos mediante *western blot*, es la baja cantidad de proteína TRPM8 que se puede obtener a partir de extractos de

sistema nativo, y la ausencia de buenos anticuerpos que nos ayuden a su detección. Ante esta limitación, la técnica de RT-qPCR surge como una opción factible para cuantificar bajos niveles de expresión de transcritos. Actualmente existen en el mercado *kit* capaces de detectar bajas concentraciones de RNA mensajero (hasta 25 ng). De esta manera, y siempre que el efecto de mayor expresión en la membrana sea un reflejo de un aumento en la expresión del transcrito, los resultados esperados con estas técnicas complementarían nuestras observaciones relativas al incremento funcional de TRPM8 tras la lesión periférica.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, las modificaciones funcionales de las neuronas de frío trigeminales que inervan la córnea en respuesta a lesión en ratones. Frente a una lesión quirúrgica controlada con recuperación de la estructura corneal post lesión, las NCSF lesionadas presentaron una mayor expresión funcional de TRPM8 y un aumento en la humedad ocular. Estos descubrimientos aportan nuevos antecedentes sobre los cambios ocurridos con TRPM8 en respuesta al daño y dejan abierta la interrogante sobre los efectos positivos que podría tener el uso de moduladores de estos canales en el tratamiento de patologías surgidas en pacientes sometidos a cirugías refractivas.

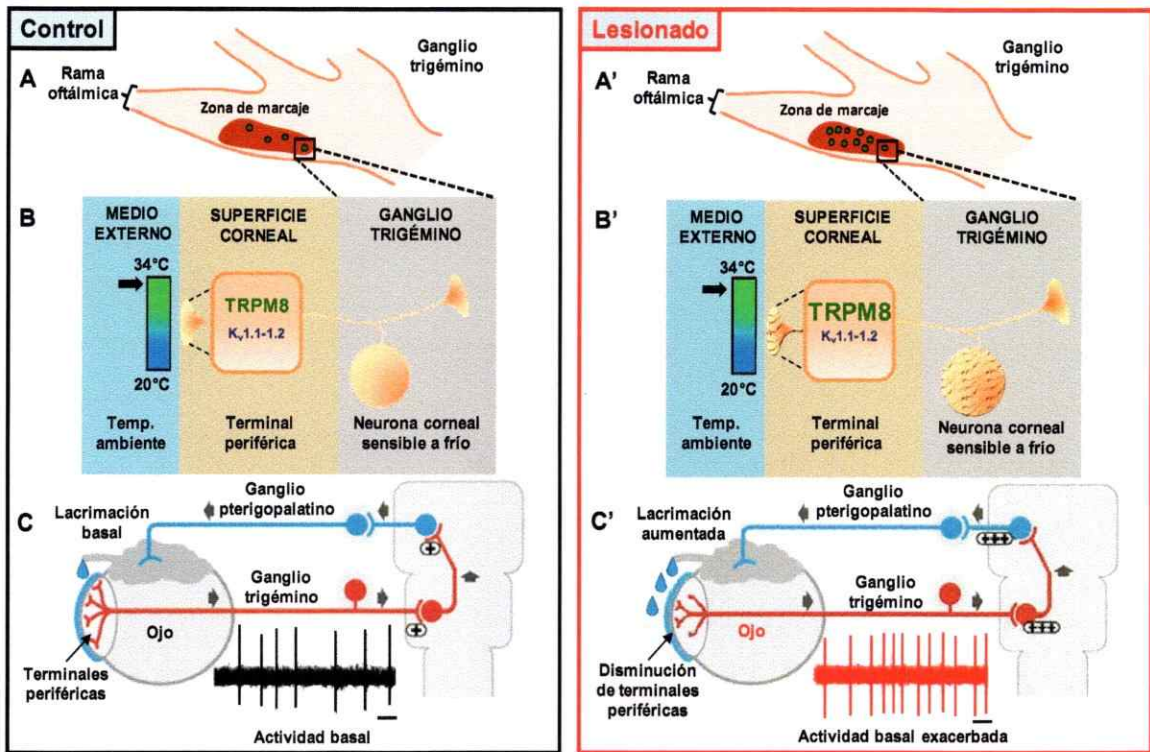


Figura 28: Representación esquemática del modelo propuesto. Diagrama de un ganglio trigémino control (A) y uno proveniente de un animal lesionado (A'). Nótese que el número de NCSF (círculos verdes) se ve incrementado post lesión. En (B) se muestra una NCSF control donde se muestra la expresión de los canales TRPM8 y $K_v1.1$ y $K_v1.2$ y la respuesta de estos canales a una temperatura corneal basal (barra que va de 20 a 34°C). En aquellas NCSF lesionadas y regeneradas (B') se aprecia un incremento en la expresión de TRPM8 (representado por un tamaño de letra mayor) sin cambios aparentes con los canales $K_v1.1$ y $K_v1.2$. Finalmente se representa un resumen de los circuitos relacionados con el papel de la actividad eléctrica de TRPM8 con la lacrimación basal. Bajo condiciones controles la actividad basal de TRPM8 funciona como un *input* para la actividad de las neuronas del ganglio pterigopalatino las cuales a su vez participan en la regulación de la lacrimación basal (C). En animales sometidos a lesión corneal, la mayor actividad eléctrica de las terminales que expresan TRPM8 incrementan su influencia sobre las neuronas del ganglio pterigopalatino, lo que aumentaría la lacrimación basal (C'). La barra negra horizontal representa 200 ms (C y C').

7. CONCLUSIONES

1. Hemos reportado por primera vez, las modificaciones funcionales de las neuronas de frío trigeminales que inervan la córnea en respuesta a lesión en ratones. Frente a un daño quirúrgico en la córnea, encontramos que las neuronas de frío corneales lesionadas presentaron una mayor expresión funcional de TRPM8, sin cambios detectables en los niveles de expresión de los canales de potasio $K_v1.1$ y $K_v1.2$ responsables de la corriente de freno I_{KD} ni en los canales termosensibles TRPA1 y TRPV1.
2. La totalidad de las neuronas corneales sensibles al frío mostraron propiedades activas y pasivas de membrana típicas de los termorreceptores de frío trigeminales, sin incluir el reclutamiento de nociceptores polimodales entre las neuronas sensibles al frío en respuesta a lesión.
3. Los resultados obtenidos mediante el registro extracelular de terminales corneales revelaron incremento en la descarga basal de los termorreceptores de frío.
4. Los ratones sometidos a lesión corneal presentaron de una mayor tasa de lacrimación basal en comparación a los animales controles.

5. Estos resultados sugieren que TRPM8 tendría un papel crítico en la respuesta electrofisiológica exacerbada en los termorreceptores de frío corneales en respuesta a lesión, lo que podría explicar en parte las sensaciones anómalas descritas por pacientes sometidos a diversos tipos de cirugía corneal. La descarga anómala de las terminales TRPM8-positivas podría ser crítica en el desarrollo a nivel central de la sensación de sequedad ocular anómala.

8. REFERENCIAS

Acosta,M.C., Belmonte,C., and Gallar,J. (2001a). Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J. Physiol* 534, 511-525.

Acosta,M.C., Peral,A., Luna,C., Pintor,J., Belmonte,C., and Gallar,J. (2004). Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2333-2336.

Acosta,M.C., Tan,M.E., Belmonte,C., and Gallar,J. (2001b). Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2063-2067.

Adriaensen,H., Gybels,J., Handwerker,H.O., and Van,H.J. (1980). Latencies of chemically evoked discharges in human cutaneous nociceptors and of the concurrent subjective sensations. *Neurosci. Lett.* 20, 55-59.

Aller,M.I. and Wisden,W. (2008). Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 151, 1154-1172.

Alloui,A., Zimmermann,K., Mamet,J., Duprat,F., Noel,J., Chemin,J., Guy,N., Blondeau,N., Voilley,N., Rubat-Coudert,C., Borsotto,M., Romey,G., Heurteaux,C., Reeh,P., Eschalier,A., and Lazdunski,M. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* 25, 2368-2376.

Almaraz,L., Manenschijn,J.A., de la,P.E., and Viana,F. (2014). TRPM8. *Handb. Exp. Pharmacol.* 222, 547-579.

Amaya,F., Wang,H., Costigan,M., Allchorne,A.J., Hatcher,J.P., Egerton,J., Stean,T., Morisset,V., Grose,D., Gunthorpe,M.J., Chessell,I.P., Tate,S., Green,P.J., and Woolf,C.J. (2006). The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J. Neurosci.* 26, 12852-12860.

Andersson,D.A., Gentry,C., Moss,S., and Bevan,S. (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci.* 28, 2485-2494.

Bagriantsev,S.N., Peyronnet,R., Clark,K.A., Honore,E., and Minor,D.L., Jr. (2011). Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *EMBO J.* 30, 3594-3606.

Bandell,M., Story,G.M., Hwang,S.W., Viswanath,V., Eid,S.R., Petrus,M.J., Earley,T.J., and Patapoutian,A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41, 849-857.

Bautista,D.M., Jordt,S.E., Nikai,T., Tsuruda,P.R., Read,A.J., Poblete,J., Yamoah,E.N., Basbaum,A.I., and Julius,D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-1282.

Bautista,D.M., Siemens,J., Glazer,J.M., Tsuruda,P.R., Basbaum,A.I., Stucky,C.L., Jordt,S.E., and Julius,D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204-208.

Bear M, Connors B, and Paradiso M (2007). In *Neuroscience: Exploring the Brain*, pp. 196-199.

Belmonte,C. (2007). Eye dryness sensations after refractive surgery: Impaired tear secretion or "Phantom" Cornea? *J. Refract. Surg.* 23, 598-602.

Belmonte,C., Acosta,M.C., and Gallar,J. (2004). Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp. Eye Res.* 78, 513-525.

Belmonte,C., Acosta,M.C., Merayo-Llodes,J., and Gallar,J. (2015). What Causes Eye Pain? *Curr. Ophthalmol. Rep.* 3, 111-121.

Belmonte,C., Brock,J.A., and Viana,F. (2009). Converting cold into pain. *Exp. Brain Res.* 196, 13-30.

Belmonte,C. and Giraldez,F. (1981). Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J. Physiol* 321, 355-368.

Belmonte,C., Pozo,MA., and Rebolledo,I. (1991). Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J. Physiol* 117-156.

Belmonte,C., Tervo,T., and Gallar,J. (2011). Sensory innervation of the eye. In *Adler's Physiology of the Eye*.

Benzing,H., Hensel,H., and Wurster,R. (1969). Integrated static activity of lingual cold receptors. *Pflugers Arch* 311, 50-54.

Bessac,B.F., Sivula,M., von Hehn,C.A., Escalera,J., Cohn,L., and Jordt,S.E. (2008). TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J. Clin. Invest* 118, 1899-1910.

Biel,M., Schneider,A., and Wahl,C. (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 206-212.

Binshtok,A.M., Wang,H., Zimmermann,K., Amaya,F., Vardeh,D., Shi,L., Brenner,G.J., Ji,R.R., Bean,B.P., Woolf,C.J., and Samad,T.A. (2008). Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J. Neurosci.* 28, 14062-14073.

Bird,E.V., Robinson,P.P., and Boissonade,F.M. (2007). Na(v)1.7 sodium channel expression in human lingual nerve neuromas. *Arch. Oral Biol.* 52, 494-502.

Blix (1882). Experimentelle Beiträge zur Lösung der Frage über die spezifische Energie der Hautnerven. *Zeitschr. F. Biologir* 21:145.

Brauchi,S., Orio,P., and Latorre,R. (2004). Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 15494-15499.

Brewster,A.L., Bernard,J.A., Gall,C.M., and Baram,T.Z. (2005). Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol. Dis.* 19, 200-207.

Brock,J., Acosta,M.C., Al,A.A., Pianova,S., and Belmonte,C. (2006). Barium ions inhibit the dynamic response of guinea-pig corneal cold receptors to heating but not to cooling. *J. Physiol* 575, 573-581.

Brock,J.A., McLachlan,E.M., and Belmonte,C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J. Physiol* 512 (Pt 1), 211-217.

Brock,J.A., Pianova,S., and Belmonte,C. (2001). Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *J. Physiol* 533, 493-501.

Cabanes,C., Viana,F., and Belmonte,C. (2003). Differential thermosensitivity of sensory neurons in the guinea pig trigeminal ganglion. *J. Neurophysiol.* 90, 2219-2231.

Caspani,O., Zurborg,S., Labuz,D., and Heppenstall,P.A. (2009). The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS. ONE.* 4, e7383.

Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.

Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

Chemin, J., Patel, A.J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., and Honore, E. (2005). A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J.* 24, 44-53.

Chen, C.C., Rainville, P., and Bushnell, M.C. (1996). Noxious and innocuous cold discrimination in humans: evidence for separate afferent channels. *Pain* 68, 33-43.

Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J.O., Sun, C., Walter, K., Yao, B., and Kim, D. (2013). Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nature*.

Chen, X., Gallar, J., Pozo, M.A., Baeza, M., and Belmonte, C. (1995). CO₂ stimulation of the cornea: a comparison between human sensation and nerve activity in polymodal nociceptive afferents of the cat. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1154-1163.

Chen, X., Sirois, J.E., Lei, Q., Talley, E.M., Lynch, C., III, and Bayliss, D.A. (2005). HCN subunit-specific and cAMP-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents. *J. Neurosci.* 25, 5803-5814.

Chien, L.Y., Cheng, J.K., Chu, D., Cheng, C.F., and Tsaur, M.L. (2007). Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J. Neurosci.* 27, 9855-9865.

Choi, S., Na, H.S., Kim, J., Lee, J., Lee, S., Kim, D., Park, J., Chen, C.C., Campbell, K.P., and Shin, H.S. (2007). Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)_{3.2} T-type channels. *Genes Brain Behav.* 6, 425-431.

Cintron, C., Hassinger, L., Kublin, C.L., and Friend, J. (1979). A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n-heptanol. *Ophthalmic Res.* 11:90-96.

Clapham,D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.

Colburn,R.W., Lubin,M.L., Stone,D.J., Jr., Wang,Y., Lawrence,D., D'Andrea,M.R., Brandt,M.R., Liu,Y., Flores,C.M., and Qin,N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54, 379-386.

Cordero-Morales,J.F., Gracheva,E.O., and Julius,D. (2011). Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, E1184-E1191.

Corey,D.P., Garcia-Anoveros,J., Holt,J.R., Kwan,K.Y., Lin,S.Y., Vollrath,M.A., Amalfitano,A., Cheung,E.L., Derfler,B.H., Duggan,A., Geleoc,G.S., Gray,P.A., Hoffman,M.P., Rehm,H.L., Tamasauskas,D., and Zhang,D.S. (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432, 723-730.

Cosens,D.J. and Manning,A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285-287.

Cox,J.J., Reimann,F., Nicholas,A.K., Thornton,G., Roberts,E., Springell,K., Karbani,G., Jafri,H., Mannan,J., Raashid,Y., Al-Gazali,L., Hamamy,H., Valente,E.M., Gorman,S., Williams,R., McHale,D.P., Wood,J.N., Gribble,F.M., and Woods,C.G. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444, 894-898.

Craig,A.D., Chen,K., Bandy,D., and Reiman,E.M. (2000). Thermosensory activation of insular cortex. *Nat. Neurosci.* 3, 184-190.

Craner,M.J., Klein,J.P., Renganathan,M., Black,J.A., and Waxman,S.G. (2002). Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. *Ann. Neurol.* 52, 786-792.

Daniels,R.L., Takashima,Y., and McKemy,D.D. (2009). Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 284, 1570-1582.

Darian-Smith,I., Johnson,KO., and Dykes,R. (1972). "Cold" Fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: Responses to cooling pulses. *J. Neurophysiol.* 36(2), 325-46.

Dartt,D.A. (2009). Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 155-177.

Davis,J.B., Gray,J., Gunthorpe,M.J., Hatcher,J.P., Davey,P.T., Overend,P., Harries,M.H., Latcham,J., Clapham,C., Atkinson,K., Hughes,S.A., Rance,K., Grau,E., Harper,A.J., Pugh,P.L., Rogers,D.C., Bingham,S., Randall,A., and

Sheardown,S.A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-187.

De Felipe,C., González,G., Gallar,J., and Belmonte,C. (1999). Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. *Eur. J. Pain* 31-39.

de la Peña,E., Malkia,A., Cabedo,H., Belmonte,C., and Viana,F. (2005). The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *J. Physiol* 567, 415-426.

Dedman,A., Sharif-Naeini,R., Folgering,J.H., Duprat,F., Patel,A., and Honore,E. (2009). The mechano-gated K(2P) channel TREK-1. *Eur. Biophys. J.* 38, 293-303.

Descoeur,J., Pereira,V., Pizzoccaro,A., Francois,A., Ling,B., Maffre,V., Couette,B., Busserolles,J., Courteix,C., Noel,J., Lazdunski,M., Eschalier,A., Authier,N., and Bourinet,E. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med.* 3, 266-278.

Dhaka,A., Murray,A.N., Mathur,J., Earley,T.J., Petrus,M.J., and Patapoutian,A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54, 371-378.

Dib-Hajj,S.D., Yang,Y., and Waxman,S.G. (2008). Genetics and molecular pathophysiology of Na(v)1.7-related pain syndromes. *Adv. Genet.* 63, 85-110.

Doerner,J.F., Gisselmann,G., Hatt,H., and Wetzel,C.H. (2007). Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J. Biol. Chem.* 282, 13180-13189.

Donaldson HH. (1885). On the temperature sense. *Mind* 10.

Donovan-Rodriguez, T, Luna, C., Acosta, M. C., Gallar, J., Viana, F, and Belmonte, C. Effects of injury on electrical activity of corneal cold sensory receptors. 2006 Neuroscience Meeting Planner. Atlanta. Society for Neuroscience 2006.
Ref Type: Abstract

Dray,A. (2008). Neuropathic pain: emerging treatments. *Br. J. Anaesth.*

Dubin,A.E. and Patapoutian,A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest* 120, 3760-3772.

Dvorscak,L. and Marfurt,C.F. (2008). Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 910-916.

Emery,E.C., Young,G.T., Berrocoso,E.M., Chen,L., and McNaughton,P.A. (2011). HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. *Science* 333, 1462-1466.

Erie,J.C., McLaren,J.W., Hodge,D.O., and Bourne,W.M. (2005). The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea* 24, 705-709.

Fajardo,O., Meseguer,V., Belmonte,C., and Viana,F. (2008). TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J. Neurosci.* 28, 7863-7875.

Fan,L., Guan,X., Wang,W., Zhao,J.Y., Zhang,H., Tiwari,V., Hoffman,P.N., Li,M., and Tao,Y.X. (2014). Impaired neuropathic pain and preserved acute pain in rats overexpressing voltage-gated potassium channel subunit Kv1.2 in primary afferent neurons. *Mol. Pain* 10, 8.

Fang,Z., Park,C.K., Li,H.Y., Kim,H.Y., Park,S.H., Jung,S.J., Kim,J.S., Monteil,A., Oh,S.B., and Miller,R.J. (2007). Molecular basis of Ca(v)2.3 calcium channels in rat nociceptive neurons. *J. Biol. Chem.* 282, 4757-4764.

Felipe,C.D., Gonzalez,G.G., Gallar,J., and Belmonte,C. (1999). Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. *Eur. J. Pain* 3, 31-39.

Fink,M., Duprat,F., Lesage,F., Heurteaux,C., Romey,G., Barhanin,J., and Lazdunski,M. (1996). A new K⁺ channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J. Biol. Chem.* 271, 26341-26348.

Fink,M., Lesage,F., Duprat,F., Heurteaux,C., Reyes,R., Fosset,M., and Lazdunski,M. (1998). A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* 17, 3297-3308.

Flatters,S.J. and Bennett,G.J. (2004). Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109, 150-161.

Frederick,J., Buck,M.E., Matson,D.J., and Cortright,D.N. (2007). Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 1058-1064.

Gallar,J., Acosta,M.C., and Belmonte,C. (2003). Activation of scleral cold thermoreceptors by temperature and blood flow changes. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 697-705.

Gallar,J., Pozo,M.A., Tuckett,R.P., and Belmonte,C. (1993). Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J. Physiol* 468, 609-622.

Giraldez,F., Geijo,E., and Belmonte,C. (1979). Response characteristics of corneal sensory fibers to mechanical and thermal stimulation. *Brain Res.* 177, 571-576.

Goldscheider A. (1883). *Physiologie der Hautsinnesnerven.* Johann Ambrosius Barth Leipzig.

Gomis,A., Soriano,S., Belmonte,C., and Viana,F. (2008). Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. *J. Physiol* 586, 5633-5649.

González,A., Ugarte,G., Piña,R., Pertusa,M., and Madrid,R. (2015a). TRP channels in cold transduction. In *TRP channels in Sensory Transduction*, R.Madrid and J.Bacigalupo, eds. (Springer NY).

González, A., Ugarte, G., Restrepo, C., Herrera, G., Piña, R., Gómez-Sánchez, J., Pertusa, M., and Madrid, R. Role of IKD current in hypersensitivity to cold by peripheral lesion in primary sensory neurons (En preparación). 2015b. Ref Type: Unpublished Work

Gu,W., Schlichthorl,G., Hirsch,J.R., Engels,H., Karschin,C., Karschin,A., Derst,C., Steinlein,O.K., and Daut,J. (2002). Expression pattern and functional characteristics of two novel splice variants of the two-pore-domain potassium channel TREK-2. *J. Physiol* 539, 657-668.

Hagbarth,K.E. and Vallbo,A.B. (1967). Mechanoreceptor activity recorded percutaneously with semi-microelectrodes in human peripheral nerves. *Acta Physiol Scand.* 69, 121-122.

Han,J., Truell,J., Gnatenco,C., and Kim,D. (2002). Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol* 542, 431-444.

He,X.H., Zang,Y., Chen,X., Pang,R.P., Xu,J.T., Zhou,X., Wei,X.H., Li,Y.Y., Xin,W.J., Qin,Z.H., and Liu,X.G. (2010). TNF-alpha contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain* 151, 266-279.

Hensel,H. (1981). Thermoreception and temperature regulation. *Monogr Physiol Soc.* 38, 1-321.

Hensel,H. and Iggo A. (1971). Analysis of cutaneous warm and cold fibres in primates. *Pflugers Arch.* 329, 1-8.

Hensel,H., IGGO,A., and WITT,I. (1960). A quantitative study of sensitive cutaneous thermoreceptors with C afferent fibres. *J. Physiol* 153, 113-126.

Hensel,H. and Zotterman,Y. (1951). The response of the cold receptors to constant cooling. *Acta Physiol Scand.* 22, 96-105.

Heppelmann,B., Messlinger,K., Neiss,W.F., and Schmidt,R.F. (1990). Ultrastructural three-dimensional reconstruction of group III and group IV sensory nerve endings ("free nerve endings") in the knee joint capsule of the cat: evidence for multiple receptive sites. *J. Comp Neurol.* 292, 103-116.

Hille,B. (2001). *Ionic channels of excitable membranes.* Sunderland, MA: Sinauer.

Hirata,H., Fried,N., and Oshinsky,M.L. (2012). Quantitative characterization reveals three types of dry-sensitive corneal afferents: pattern of discharge, receptive field, and thermal and chemical sensitivity. *J. Neurophysiol.* 108, 2481-2493.

Hirata,H. and Meng,I.D. (2010). Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: implications for dry eye disease. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 3969-3976.

Hirata,H., Okamoto,K., Tashiro,A., and Bereiter,D.A. (2004). A novel class of neurons at the trigeminal subnucleus interpolaris/caudalis transition region monitors ocular surface fluid status and modulates tear production. *J. Neurosci.* 24, 4224-4232.

Hirata,H. and 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. *J. Neurophysiol.* 107, 1199-1209.

Hirata,H. and Rosenblatt,M.I. (2014). Hyperosmolar tears enhance cooling sensitivity of the corneal nerves in rats: possible neural basis for cold-induced dry eye pain. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 5821-5833.

Hofmann,T., Chubanov,V., Gudermann,T., and Montell,C. (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr. Biol.* 13, 1153-1158.

Hovanesian,J.A., Shah,S.S., and Maloney,R.K. (2001). Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* 27, 577-584.

Huang,C.L. (2004). The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1690-1699.

Iggo A. and Muir A. (1969). The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairyskin. *J. Physiol* 763-796.

Ikeda,H., Heinke,B., Ruscheweyh,R., and Sandkuhler,J. (2003). Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* 299, 1237-1240.

Iriuchijima,J. and Zotterman,Y. (1960). The specificity of afferent cutaneous C fibres in mammals. *Acta Physiol Scand.* 49, 267-278.

Ishikawa,K., Tanaka,M., Black,J.A., and Waxman,S.G. (1999). Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Muscle Nerve* 22, 502-507.

Jagodic,M.M., Pathirathna,S., Joksovic,P.M., Lee,W., Nelson,M.T., Naik,A.K., Su,P., Jevtovic-Todorovic,V., and Todorovic,S.M. (2008). Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J. Neurophysiol.* 99, 3151-3156.

Jagodic,M.M., Pathirathna,S., Nelson,M.T., Mancuso,S., Joksovic,P.M., Rosenberg,E.R., Bayliss,D.A., Jevtovic-Todorovic,V., and Todorovic,S.M. (2007). Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *J. Neurosci.* 27, 3305-3316.

Ji,G., Zhou,S., and Carlton,S.M. (2008). Intact Adelta-fibers up-regulate transient receptor potential A1 and contribute to cold hypersensitivity in neuropathic rats. *Neuroscience* 154, 1054-1066.

Jordt,S.E., Bautista,D.M., Chuang,H.H., McKemy,D.D., Zygmunt,P.M., Hogestatt,E.D., Meng,I.D., and Julius,D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.*

Kang,D., Choe,C., and Kim,D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol* 564, 103-116.

Kang,D., Hogan,J.O., and Kim,D. (2014). THIK-1 (K2P13.1) is a small-conductance background K⁽⁺⁾ channel in rat trigeminal ganglion neurons. *Pflugers Arch* 466, 1289-1300.

Kang,D. and Kim,D. (2006). TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 291, C138-C146.

Karashima,Y., Damann,N., Prenen,J., Talavera,K., Segal,A., Voets,T., and Nilius,B. (2007). Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.* 27, 9874-9884.

Karashima,Y., Talavera,K., Everaerts,W., Janssens,A., Kwan,K.Y., Vennekens,R., Nilius,B., and Voets,T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 1273-1278.

Katsura,H., Obata,K., Mizushima,T., Yamanaka,H., Kobayashi,K., Dai,Y., Fukuoka,T., Tokunaga,A., Sakagami,M., and Noguchi,K. (2006). Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp. Neurol.*

Kaupp,U.B. and Seifert,R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol* 63, 235-257.

Kernisant,M., Gear,R.W., Jasmin,L., Vit,J.P., and Ohara,P.T. (2008). Chronic constriction injury of the infraorbital nerve in the rat using modified syringe needle. *J. Neurosci. Methods* 172, 43-47.

Kim,D.S., Choi,J.O., Rim,H.D., and Cho,H.J. (2002). Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 105, 146-152.

Klionsky,L., Tamir,R., Gao,B., Wang,W., Immke,D.C., Nishimura,N., and Gava,N.R. (2007). Species-specific pharmacology of Trichloro(sulfanyl)ethyl benzamides as transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists. *Mol. Pain* 3, 39.

Knowlton,W.M., Bifolck-Fisher,A., Bautista,D.M., and McKemy,D.D. (2010). TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150, 340-350.

Knowlton,W.M., Palkar,R., Lippoldt,E.K., McCoy,D.D., Baluch,F., Chen,J., and 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. *J. Neurosci.* 33, 2837-2848.

Kobayashi,K., Fukuoka,T., Obata,K., Yamanaka,H., Dai,Y., Tokunaga,A., and Noguchi,K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp Neurol.* 493, 596-606.

Kumazawa,T. and Mizumura,K. (1980). Mechanical and thermal responses of polymodal receptors recorded from the superior spermatic nerve of dogs. *J. Physiol* 299, 233-245.

Kurose,M. and Meng,I.D. (2013). Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *J. Neurophysiol.* 110, 495-504.

Kwan,K.Y., Allchorne,A.J., Vollrath,M.A., Christensen,A.P., Zhang,D.S., Woolf,C.J., and Corey,D.P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50, 277-289.

Latorre,R. (2009). Perspectives on TRP channel structure and the TRPA1 puzzle. *J. Gen. Physiol* 133, 227-229.

Latorre,R., Brauchi,S., Madrid,R., and Orio,P. (2011). A cool channel in cold transduction. *Physiology (Bethesda.)* 26, 273-285.

Launay,P., Fleig,A., Perraud,A.L., Scharenberg,A.M., Penner,R., and Kinet,J.P. (2002). TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109, 397-407.

Lesage,F., Terrenoire,C., Romey,G., and Lazdunski,M. (2000). Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 28398-28405.

Lesson,T., Lesson,R., and Paparo,A. (1998). Órganos de los sentidos especiales. En *Atlas de Histología*. Interamericana McGraw-Hill), pp. 675-678.

Levitt,A.E., Galor,A., Weiss,J.S., Felix,E.R., Martin,E.R., Patin,D.J., Sarantopoulos,K.D., and Levitt,R.C. (2015). Chronic dry eye symptoms after LASIK: parallels and lessons to be learned from other persistent post-operative pain disorders. *Mol. Pain* 11, 21.

Li,Z., Burns,A.R., Han,L., Rumbaut,R.E., and Smith,C.W. (2011). IL-17 and VEGF are necessary for efficient corneal nerve regeneration. *Am. J. Pathol.* 178, 1106-1116.

Liao,M., Cao,E., Julius,D., and Cheng,Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107-112.

Linte,R.M., Ciobanu,C., Reid,G., and Babes,A. (2007). Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurones by inflammatory mediators. *Exp. Brain Res.* 178, 89-98.

Liu,B. and Qin,F. (2005). Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25, 1674-1681.

Lopez de, A.M., Cabanes, C., and Belmonte, C. (2000). Electrophysiological properties of identified trigeminal ganglion neurons innervating the cornea of the mouse. *Neuroscience* 101, 1109-1115.

Macpherson, L.J., Geierstanger, B.H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S.R., Hwang, S., and Patapoutian, A. (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.* 15, 929-934.

Madrid, R., de la, P.E., Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C., and Viana, F. (2009). Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J. Neurosci.* 29, 3120-3131.

Madrid, R., Donovan-Rodriguez, T., Meseguer, V., Acosta, M.C., Belmonte, C., and Viana, F. (2006). Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *J. Neurosci.* 26, 12512-12525.

Madrid, R., González, A., Ugarte, G., Piña, R., and Pertusa, M. TRP channels in cold transduction (Book Chapter). In the book TRP channels in Sensory Transduction (Eds. R. Madrid and J. Bacigalupo). Springer NY . 2015. Ref Type: Abstract

Madrid, R. and Pertusa, M. (2014). Intimacies and physiological role of the polymodal cold-sensitive ion channel TRPM8. *Curr. Top. Membr.* 74, 293-324.

Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (1999). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.* 274, 26691-26696.

Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honore, E. (2000). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK 2. *J. Biol. Chem.* 275, 10128-10133.

Malkia, A., Madrid, R., Meseguer, V., de la, P.E., Valero, M., Belmonte, C., and Viana, F. (2007). Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *J. Physiol* 581, 155-174.

Marfurt, C.F. and Ellis, L.C. (1993). Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *J. Comp Neurol.* 336, 517-531.

Marfurt, C. (2000). Nervous control of the cornea. In: Burnstock G., Sillito AM., eds. *Nervous control of the eye*. Amsterdam: Harwood Academic.

Matzner,O. and Devor,M. (1994). Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J. Neurophysiol.* 72, 349-359.

McCarty,C.A., Garrett,S.K., Aldred,G.F., and Taylor,H.R. (1996). Assessment of subjective pain following photorefractive keratectomy. Melbourne Excimer Laser Group. *J. Refract. Surg.* 12, 365-369.

McCusker,E.C., Bagneris,C., Naylor,C.E., Cole,A.R., D'Avanzo,N., Nichols,C.G., and Wallace,B.A. (2012). Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat. Commun.* 3, 1102.

McKemy,D.D., Neuhausser,W.M., and Julius,D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.

Meadows,H.J., Benham,C.D., Cairns,W., Gloger,I., Jennings,C., Medhurst,A.D., Murdock,P., and Chapman,C.G. (2000). Cloning, localisation and functional expression of the human orthologue of the TREK-1 potassium channel. *Pflugers Arch* 439, 714-722.

Medhurst,A.D., Rennie,G., Chapman,C.G., Meadows,H., Duckworth,M.D., Kellsell,R.E., Gloger,I.I., and Pangalos,M.N. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 86, 101-114.

Meeney,A. and Mudhar,H.S. (2013). Histopathological reporting of corneal pathology by a biomedical scientist: the Sheffield Experience. *Eye (Lond)* 27, 272-276.

Mickle,A.D., Shepherd,A.J., and Mohapatra,D.P. (2015). Sensory TRP Channels: The Key Transducers of Nociception and Pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 131, 73-118.

Mio,K., Ogura,T., Kiyonaka,S., Hiroaki,Y., Tanimura,Y., Fujiyoshi,Y., Mori,Y., and Sato,C. (2007). The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas. *J. Mol. Biol.* 367, 373-383.

Moilanen,J.A., Holopainen,J.M., Vesaluoma,M.H., and Tervo,T.M. (2008). Corneal recovery after lasik for high myopia: a 2-year prospective confocal microscopic study. *Br. J. Ophthalmol.* 92, 1397-1402.

Moiseenkova-Bell,V.Y., Stanciu,L.A., Serysheva,I.I., Tobe,B.J., and Wensel,T.G. (2008). Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 7451-7455.

Momin,A. and Wood,J.N. (2008). Sensory neuron voltage-gated sodium channels as analgesic drug targets. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 383-388.

Monteggia,L.M., Eisch,A.J., Tang,M.D., Kaczmarek,L.K., and Nestler,E.J. (2000). Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81, 129-139.

Montell,C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE.* 2005, re3.

Montell,C. (2011). The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflugers Arch* 461, 499-506.

Moosmang,S., Biel,M., Hofmann,F., and Ludwig,A. (1999). Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* 380, 975-980.

Moosmang,S., Stieber,J., Zong,X., Biel,M., Hofmann,F., and Ludwig,A. (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem.* 268, 1646-1652.

Morenilla-Palao,C., Luis,E., Fernandez-Pena,C., Quintero,E., Weaver,J.L., Bayliss,D.A., and Viana,F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Rep.* 8, 1571-1582.

Morenilla-Palao,C., Pertusa,M., Meseguer,V., Cabedo,H., and Viana,F. (2009). Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *J. Biol. Chem.* 284, 9215-9224.

Morton,D.B. and Griffiths,P.H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 116, 431-436.

Moss,S.E., Klein,R., and Klein,B.E. (2000). Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol.* 118, 1264-1268.

Mosso,J.A. and Kruger,L. (1973). Receptor categories represented in spinal trigeminal nucleus caudalis. *J. Neurophysiol.* 36, 472-488.

Much,B., Wahl-Schott,C., Zong,X., Schneider,A., Baumann,L., Moosmang,S., Ludwig,A., and Biel,M. (2003). Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 278, 43781-43786.

Muller,L.J., Marfurt,C.F., Kruse,F., and Tervo,T.M. (2003). Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76, 521-542.

Namavari,A., Chaudhary,S., Ozturk,O., Chang,J.H., Yco,L., Sonawane,S., Katam,N., Khanolkar,V., Hallak,J., Sarkar,J., and Jain,S. (2012). Semaphorin 7a links nerve regeneration and inflammation in the cornea. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 4575-4585.

Namavari,A., Chaudhary,S., Sarkar,J., Yco,L., Patel,K., Han,K.Y., Yue,B.Y., Chang,J.H., and Jain,S. (2011). In vivo serial imaging of regenerating corneal nerves after surgical transection in transgenic thy1-YFP mice. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 8025-8032.

Nassar,M.A., Stirling,L.C., Forlani,G., Baker,M.D., Matthews,E.A., Dickenson,A.H., and Wood,J.N. (2004). Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 12706-12711.

Nichols,B., Dawson,C.R., and Togni,B. (1983). Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 570-576.

Niederer,R.L., Perumal,D., Sherwin,T., and McGhee,C.N. (2007). Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br. J. Ophthalmol.* 91, 1165-1169.

Nilius,B. and Flockerzi,V. (2014). Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface. *Handb. Exp. Pharmacol.* 223, v-vi.

Nishida T. (2008). The cornea: stasis and dynamics. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 179-212.

Noel,J., Sandoz,G., and Lesage,F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin.)* 5, 402-409.

Noel,J., Zimmermann,K., Busserolles,J., Deval,E., Alloui,A., Diochot,S., Guy,N., Borsotto,M., Reeh,P., Eschalier,A., and Lazdunski,M. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 28, 1308-1318.

Obata,K., Katsura,H., Mizushima,T., Yamanaka,H., Kobayashi,K., Dai,Y., Fukuoka,T., Tokunaga,A., Tominaga,M., and Noguchi,K. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest* 115, 2393-2401.

Okada,T., Shimizu,S., Wakamori,M., Maeda,A., Kurosaki,T., Takada,N., Imoto,K., and Mori,Y. (1998). Molecular cloning and functional characterization

of a novel receptor-activated TRP Ca²⁺ channel from mouse brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 10279-10287.

Orio,P., Madrid,R., de la,P.E., Parra,A., Meseguer,V., Bayliss,D.A., Belmonte,C., and Viana,F. (2009). Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *J. Physiol* **587**, 1961-1976.

Owsianik,G., Talavera,K., Voets,T., and Nilius,B. (2006). Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu. Rev. Physiol* **68**, 685-717.

Pare,M., Behets,C., and Cornu,O. (2003). Paucity of presumptive ruffini corpuscles in the index finger pad of humans. *J. Comp Neurol.* **456**, 260-266.

Park,U., Vastani,N., Guan,Y., Raja,S.N., Koltzenburg,M., and Caterina,M.J. (2011). TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J. Neurosci.* **31**, 11425-11436.

Parra,A., Gonzalez-Gonzalez,O., Gallar,J., and Belmonte,C. (2014). Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain* **155**, 1481-1491.

Parra,A., Madrid,R., Echevarria,D., Del,O.S., Morenilla-Palao,C., Acosta,M.C., Gallar,J., Dhaka,A., Viana,F., and Belmonte,C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat. Med.* **16**, 1396-1399.

Patapoutian,A., Peier,A.M., Story,G.M., and Viswanath,V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 529-539.

Patel,D.V. and McGhee,C.N. (2009). In vivo confocal microscopy of corneal stromal nerves in patients with peripheral neuropathy. *Arch Neurol.* **66**, 1179-1180.

Payandeh,J., Gamal El-Din,T.M., Scheuer,T., Zheng,N., and Catterall,W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* **486**, 135-139.

Payandeh,J., Scheuer,T., Zheng,N., and Catterall,W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353-358.

Pedersen,S.F., Owsianik,G., and Nilius,B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**, 233-252.

Peier,A.M., Moqrich,A., Hergarden,A.C., Reeve,A.J., Andersson,D.A., Story,G.M., Earley,T.J., Dragoni,I., McIntyre,P., Bevan,S., and Patapoutian,A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-715.

Persson,A.K., Xu,X.J., Wiesenfeld-Hallin,Z., Devor,M., and Fried,K. (2010). Expression of DRG candidate pain molecules after nerve injury—a comparative study among five inbred mouse strains with contrasting pain phenotypes. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 15, 26-39.

Philipp,S., Hambrecht,J., Braslavski,L., Schroth,G., Freichel,M., Murakami,M., Cavalie,A., and Flockerzi,V. (1998). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J.* 17, 4274-4282.

Pogorzala,L.A., Mishra,S.K., and Hoon,M.A. (2013). The cellular code for mammalian thermosensation. *J. Neurosci.* 33, 5533-5541.

Premkumar,L.S., Raisinghani,M., Pingle,S.C., Long,C., and Pimentel,F. (2005). Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J. Neurosci.* 25, 11322-11329.

Priest,B.T., Murphy,B.A., Lindia,J.A., Diaz,C., Abbadie,C., Ritter,A.M., Liberator,P., Iyer,L.M., Kash,S.F., Kohler,M.G., Kaczorowski,G.J., MacIntyre,D.E., and Martin,W.J. (2005). Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 9382-9387.

Proudfoot,C.J., Garry,E.M., Cottrell,D.F., Rosie,R., Anderson,H., Robertson,D.C., Fleetwood-Walker,S.M., and Mitchell,R. (2006). Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.* 16, 1591-1605.

Purves,D., Augustine,G., Fitzpatrick,D., Katz,L., LaMantia,A.S., McNamara,J., and Williams,M. (2001). *Neuroscience*. Sunderland (MA): Sinauer Associates).

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

Rajan,S., Wischmeyer,E., Karschin,C., Preisig-Muller,R., Grzeschik,K.H., Daut,J., Karschin,A., and Derst,C. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 276, 7302-7311.

Ramsey,I.S., Delling,M., and Clapham,D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol* 68, 619-647.

Rasband,M.N., Park,E.W., Vanderah,T.W., Lai,J., Porreca,F., and Trimmer,J.S. (2001). Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 13373-13378.

Renganathan,M., Cummins,T.R., and Waxman,S.G. (2001). Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 629-640.

Restrepo,C. (2013). Papel de la corriente de freno I_{KD} en la hipersensibilidad dolorosa al frío inducida por lesión en neuronas sensoriales primarias. Tesis de Magíster en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Ritchey,E.R., Code,K., Zelinka,C.P., Scott,M.A., and Fischer,A.J. (2011). The chicken cornea as a model of wound healing and neuronal re-innervation. *Mol. Vis.* 17, 2440-2454.

Rohacs,T., Lopes,C.M., Michailidis,I., and Logothetis,D.E. (2005). PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8, 626-634.

Rosenthal,P. and Borsook,D. (2012). The corneal pain system. Part I: the missing piece of dry eye puzzle. *The Ocular Surface* 10 (1), 2-14.

Rossi,H.L., Jenkins,A.C., Kaufman,J., Bhattacharyya,I., Caudle,R.M., and Neubert,J.K. (2012). Characterization of bilateral trigeminal constriction injury using an operant facial pain assay. *Neuroscience* 224, 294-306.

Rossi,H.L., Vierck,C.J., Jr., Caudle,R.M., and Neubert,J.K. (2006). Characterization of cold sensitivity and thermal preference using an operant orofacial assay. *Mol. Pain* 2, 37.

Roza,C., Belmonte,C., and Viana,F. (2006). Cold sensitivity in axotomized fibers of experimental neuromas in mice. *Pain* 120, 24-35.

Rozsa,A.J., Guss,R.B., and Beuerman,R.W. (1983). Neural remodeling following experimental surgery of the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 1033-1051.

Saegusa,H., Kurihara,T., Zong,S., Kazuno,A., Matsuda,Y., Nonaka,T., Han,W., Toriyama,H., and Tanabe,T. (2001). Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca^{2+} channel 4. *EMBO J.* 20, 2349-2356.

Sarkar,J., Chaudhary,S., Namavari,A., Ozturk,O., Chang,J.H., Yco,L., Sonawane,S., Khanolkar,V., Hallak,J., and Jain,S. (2012). Corneal neurotoxicity due to topical Benzalkonium chloride. *Cornea* 31, 1792-1802.

Sawada,Y., Hosokawa,H., Hori,A., Matsumura,K., and Kobayashi,S. (2007). Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res.* 1160, 39-46.

Sawada,Y., Hosokawa,H., Matsumura,K., and Kobayashi,S. (2008). Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1131-1142.

Schaumberg,D.A., Dana,R., Buring,J.E., and Sullivan,D.A. (2009). Prevalence of dry eye disease among US men: estimates from the Physicians' Health Studies. *Arch Ophthalmol.* 127, 763-768.

Schmid,D., Messlinger,K., Belmonte,C., and Fischer,M.J. (2011). Altered thermal sensitivity in neurons injured by infraorbital nerve lesion. *Neurosci. Lett.* 488, 168-172.

Semtner,M., Schaefer,M., Pinkenburg,O., and Plant,T.D. (2007). Potentiation of TRPC5 by protons. *J. Biol. Chem.* 282, 33868-33878.

Shaheen,B. and Bakir,M.S.J. (2013). Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 1-23.

Shaheen,B.S., Bakir,M., and Jain,S. (2014). Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 59, 263-285.

Shigematsu,H., Sokabe,T., Danev,R., Tominaga,M., and Nagayama,K. (2010). A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* 285, 11210-11218.

Stern,M.E., Beuerman,R.W., Fox,R.I., Gao,J., Mircheff,A.K., and Pflugfelder,S.C. (1998). The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 17, 584-589.

Story,G.M., Peier,A.M., Reeve,A.J., Eid,S.R., Mosbacher,J., Hricik,T.R., Earley,T.J., Hergarden,A.C., Andersson,D.A., Hwang,S.W., McIntyre,P., Jegla,T., Bevan,S., and Patapoutian,A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819-829.

Strubing,C., Krapivinsky,G., Krapivinsky,L., and Clapham,D.E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J. Biol. Chem.* 278, 39014-39019.

Sukumar,P. and Beech,D.J. (2010). Stimulation of TRPC5 cationic channels by low micromolar concentrations of lead ions (Pb²⁺). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 50-54.

Talley,E.M., Solorzano,G., Lei,Q., Kim,D., and Bayliss,D.A. (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci.* 21, 7491-7505.

Tan,Z.Y., Donnelly,D.F., and LaMotte,R.H. (2006). Effects of a chronic compression of the dorsal root ganglion on voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents in cutaneous afferent neurons. *J. Neurophysiol.* 95, 1115-1123.

Theodore C.Ruch (1979). Somatic sensation: Receptors and their axons. In *PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS*, pp. 176-183.

Trygve Saude (1993). The outer coats of the eye. Ocular anatomy and physiology. Blackwell Science Ltd).

Vallbo,A.B., Hagbarth,K.E., Torebjork,H.E., and Wallin,B.G. (1979). Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves. *Physiol Rev.* 59, 919-957.

Vazquez,G., Wedel,B.J., Aziz,O., Trebak,M., and Putney,J.W., Jr. (2004). The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1742, 21-36.

Veira Moreira,TH., Gover,TD., and Weinreich,D. (2007). Electrophysiological properties and chemosensitivity of acutely dissociated trigeminal somata innervating the cornea. *Neuroscience* 148, 766-774.

Venkatachalam,K. and Montell,C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387-417.

Viana,F., de la,P.E., and Belmonte,C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat. Neurosci.* 5, 254-260.

Voets,T., Droogmans,G., Wissenbach,U., Janssens,A., Flockerzi,V., and Nilius,B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748-754.

Wang,H., Schupp,M., Zurborg,S., and Heppenstall,P.A. (2013). Residues in the pore region of *Drosophila* transient receptor potential A1 dictate sensitivity to thermal stimuli. *J. Physiol* 591, 185-201.

Waxman,S.G. (1999). The molecular pathophysiology of pain: abnormal expression of sodium channel genes and its contributions to hyperexcitability of primary sensory neurons. *Pain Suppl* 6, S133-S140.

- Waxman,S.G. and Zamponi,G.W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat. Neurosci.* 17, 153-163.
- Wu,L.J., Sweet,T.B., and Clapham,D.E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62, 381-404.
- Xin,L., Richardson,P.M., Gervais,F., and Skamene,E. (1990). A deficiency of axonal regeneration in C57BL/6J mice. *Brain Res.* 510, 144-146.
- Xin, L., Skamene, E., and Richardson, P. M. Studies of axonal regeneration in C57BL/6J and A/J mice. *Brain Res.* [652], 174-176. 1994. Ref Type: Abstract
- Xing,H., Chen,M., Ling,J., Tan,W., and Gu,J.G. (2007). TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *J. Neurosci.* 27, 13680-13690.
- Xing,H., Ling,J., Chen,M., and Gu,J.G. (2006). Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *J. Neurophysiol.* 95, 1221-1230.
- Xu,M., Aita,M., and Chavkin,C. (2008). Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. *J. Pain* 9, 1036-1048.
- Yamamoto,Y., Hatakeyama,T., and Taniguchi,K. (2009). Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 454, 129-133.
- Yang,E.K., Takimoto,K., Hayashi,Y., de Groat,W.C., and Yoshimura,N. (2004). Altered expression of potassium channel subunit mRNA and alpha-dendrotoxin sensitivity of potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy. *Neuroscience* 123, 867-874.
- Yarnitsky,D. and Ochoa,J.L. (1991). Warm and cold specific somatosensory systems. Psychophysical thresholds, reaction times and peripheral conduction velocities. *Brain* 114 (Pt 4), 1819-1826.
- Yu,C., Zhang,M., Matis,K., Kim,C., and Rosenblatt,M. (2008). Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3870-3878.
- Zhang,X., Mak,S., Li,L., Parra,A., Denlinger,B., Belmonte,C., and McNaughton,P.A. (2012a). Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by Galphaq. *Nat. Cell Biol.* 14, 851-858.

Zhang,X., Ren,W., DeCaen,P., Yan,C., Tao,X., Tang,L., Wang,J., Hasegawa,K., Kumasaka,T., He,J., Wang,J., Clapham,D.E., and Yan,N. (2012b). Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486, 130-134.

Zhao,X., Tang,Z., Zhang,H., Atianjoh,F.E., Zhao,J.Y., Liang,L., Wang,W., Guan,X., Kao,S.C., Tiwari,V., Gao,Y.J., Hoffman,P.N., Cui,H., Li,M., Dong,X., and Tao,Y.X. (2013). A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing *Kcna2* in primary afferent neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1024-1031.

Zimmermann,K., Leffler,A., Babes,A., Cendan,C.M., Carr,R.W., Kobayashi,J., Nau,C., Wood,J.N., and Reeh,P.W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447, 855-858.

Zimmermann,K., Lennerz,J.K., Hein,A., Link,A.S., Kaczmarek,J.S., Delling,M., Uysal,S., Pfeifer,J.D., Riccio,A., and Clapham,D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 18114-18119.

Zotterman,Y. (1935). Action potentials in the glossopharyngeal nerve and in the chorda tympani. *Skand Arch Physiol* 72, 73-75.

Zotterman,Y. (1936). Specific action potentials from the lingual nerve of the cat. *Skand Arch Physiol* 75, 105-119.

Zurborg,S., Yurgionas,B., Jira,J.A., Caspani,O., and Heppenstall,P.A. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca^{2+} . *Nat. Neurosci.* 10, 277-279.

9. ANEXO I

9.1 Otros determinantes moleculares relacionados con la termotransducción al frío.

a) TRPC5

TRPC5 es un canal catiónico permeable a Ca^{2+} expresado predominantemente en el sistema nervioso central incluyendo hipocampo, cerebelo, amígdala, retina y neuronas sensoriales. Más baja es la expresión de este canal detectada en riñones, hígado, testículos y útero (Okada et al., 1998; Philipp et al., 1998). TRPC5 comparte varias características con otros miembros de la superfamilia TRP, como su topología y elevada selectividad a cationes por sobre aniones (Owsianik et al., 2006; Ramsey et al., 2006; Venkatachalam and Montell, 2007; Wu et al., 2010). Este canal funciona como un homotretámero, y cada subunidad está formada por seis segmentos transmembrana. La región putativa del poro se encuentra entre los segmentos S5 y S6, esta región contiene la secuencia altamente conservada LWF (Leu-Trp-Phe). El reemplazo de la alanina en el motivo LWF genera un dominante negativo de TRPC5 (Strubing et al., 2003).

La región N-terminal contiene 1-4 repeticiones de ankirina y es región es un punto de interacción con diversas proteínas de andamiaje (Vazquez et al., 2004). El principal mecanismo de activación de TRPC5 involucra receptores acoplados a proteína G y receptores tirosina quinasa. Los activadores extracelulares que actúan en los mismos sitios de unión incluyen lantánidos, Ca^{2+} , H^+ y Pb^{2+} (Semtner et al., 2007; Sukumar and Beech, 2010). TRPC5 también puede ser activado por estímulos hiposmóticos y por estiramientos de la membrana inducidos por presión (Gomis et al., 2008). Los canales TRPC5 son altamente sensibles a frío no lesivo, en un rango de temperatura de 37 a 25°C en neuronas sensoriales primarias del sistema somatosensorial (Zimmermann et al., 2011). En ratones TRPC5 *knockout* ocurre una disminución de la población de neuronas TRPM8 en ganglios sensoriales. Este resultado se relaciona además con una pérdida significativa en la sensibilidad a frío en la población de neuronas de los ganglios raquídeos estudiadas mediante imagen de calcio. Por otro lado, los registros extracelulares de las terminales que inervan la piel llevados a cabo en esta cepa TRPC5 KO sugieren que los nociceptores polimodales sensibles a frío son reemplazados por una subpoblación de nociceptores de frío hiperexcitables. Sumado a lo anterior, la población de fibras sensibles a mentol aumentó del 38% al 84%. Con estos resultados, los autores sugieren un posible mecanismo compensatorio en estos animales *knockout* que involucraría una sobreexpresión del canal TRPM8 inducida por la pérdida de TRPC5 (Zimmermann et al., 2011). Sin embargo, los

ensayos conductuales en estos ratones carentes del canal TRPC5 indican que estos animales no se vieron afectados de manera significativa en su sensibilidad a frío inocuo y lesivo, sugiriendo que la contribución de TRPC5 en la detección del frío en condiciones fisiológicas sería más bien menor.

b) Canales de Potasio de *Background*

Los canales de potasio de doble poro (K_{2P}) forman una larga familia de canales hiperpolarizantes. Estos canales son responsables del desarrollo de una corriente de fuga o *background* que se opone a la despolarización de la membrana (Talley et al., 2001). Cada subunidad del canal K_{2P} posee cuatro segmentos de transmembrana y dos poros en los dominios P que se encuentran dispuestos en tándem. Estos canales se pueden encontrar como homodímeros o heterodímeros (Figura 11) (Dedman et al., 2009). Miembros de la familia K_{2P} como TASK-3 (*TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channel*) y TRESK-2 (*TWIK-RELATED Spinal cord K^+ channel*) son insensibles o débilmente afectados por el calor (Bagriantsev et al., 2011; Kang et al., 2005) al que igual THIK-1 (*Tandem pore domain Halothane Inhibited K^+ channel*) (Kang et al., 2014; Rajan et al., 2001). En una publicación reciente, Morenilla-Palao y colaboradores (2014) entregaron evidencias del papel de TASK-3 en la termotransducción del frío. Estos autores demostraron que el umbral de respuesta al frío se reduce tanto en animales TASK-3^{-/-} respecto a los animales silvestres, como en condiciones control durante el bloqueo con Zn²⁺. Más aún

estos animales K.O. presentaron hiperensibilidad al frío (Morenilla-Palao et al., 2014). A su vez los canales TREK (*TWIK-RElated K⁺ channel*) y TRAAK (*TWIK Related Arachidonic acid Activated K⁺ channel*) se caracterizan por la activación directa por variaciones de temperatura (Kang et al., 2005; Maingret et al., 2000). TREK-1 es principalmente expresado en la corteza, cuerpo estriado, hipotálamo y en estructuras corticolímbicas que incluyen el hipocampo y la amígdala (Aller and Wisden, 2008; Fink et al., 1996; Meadows et al., 2000; Talley et al., 2001).

La expresión de TREK-2 es escasa en la corteza, pero alta en el hipocampo, el cuerpo estriado y el bulbo olfatorio (Gu et al., 2002; Han et al., 2002; Lesage et al., 2000; Talley et al., 2001). TREK-2 también es altamente expresado en la capa de las células granulares del cerebelo. Por otro lado, la expresión de TRAAK se ha reportado a nivel de la corteza, médula y retina (Fink et al., 1998). Pero TREK y TRAAK también tienen una amplia distribución en el sistema nervioso periférico. Su elevada expresión en neuronas somatosensoriales primarias los hace candidatos a tener un papel importante en fenómenos de termosensación (Alloui et al., 2006; Descoeur et al., 2011; Noel et al., 2009; Alloui et al., 2006; Descoeur et al., 2011; Noel et al., 2009).

En particular, la distribución de estos canales en el sistema nervioso periférico está asociada tanto a neuronas de gran diámetro como a aquellas de diámetro pequeño en los ganglios trigéminos y raquídeos, las que a su vez

están relacionadas en la detección de estímulos térmicos, mecánicos y químicos (Alloui et al., 2006; Kang et al., 2005; Kang and Kim, 2006; Medhurst et al., 2001; Noel et al., 2009). Como ya se mencionó, los canales TREK-1 y TRAAK son activados por cambios graduales de temperatura (Alloui et al., 2006; Kang et al., 2005; Maingret et al., 2000; Noel et al., 2009). TREK-1 muestra un incremento de hasta veinte veces su probabilidad de apertura cuando la temperatura sube desde 22 a 42°C (Chemin et al., 2005; Maingret et al., 1999; Maingret et al., 2000). Por su parte TRAAK muestra también un incremento en su actividad al aumentar la temperatura desde 17 a 40°C (Kang et al., 2005). Para ambos canales la temperatura de activación máxima está en el rango de los 30 a 42°C, por lo tanto a la temperatura corporal fisiológica ambos canales están activos, ejerciendo su influencia sobre el potencial de membrana (Noel et al., 2011). Por otro lado, al disminuir la temperatura bajo los 24°C su actividad es prácticamente nula (Figura 12) (Noel et al., 2009). Existe una coexpresión significativa de TREK-1/TRAAK con el canal catiónico no selectivo TRPV1 (Yamamoto et al., 2009), el cual es activado por temperaturas sobre 42°C y por agonistas químicos como la capasaicina (Caterina et al., 1997; Caterina et al., 1999; Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Park et al., 2011; Pogorzala et al., 2013). En las subpoblaciones de neuronas somatosensoriales primarias involucradas en la detección del calor, el efecto despolarizante producto de la activación de TRPV1 tiene como contrapeso inicial el efecto hiperpolarizante de los canales TREK-1/TRAAK. Además, los ratones TRAAK^{-/-}

así como también el doble *knockout* TREK-1/TRAAK presentan cuadros de hiperalgesia al calor (Alloui et al., 2006; Noel et al., 2009). La coexpresión de TREK-1/TRAAK con TRPM8 es significativa (Yamamoto et al., 2009). El K.O. de TREK-1 no afecta significativamente las respuestas a frío en neuronas en cultivo, mientras que los K.O. TRAAK⁻ y K.O TREK-1/TRAAK presentan una respuesta exacerbada al frío tanto en neuronas en cultivo como en ensayos conductuales (Descœur et al., 2011; Noel et al., 2009). Estas características sugieren que los canales TREK-1 y TRAAK podrían tener un papel en cuadros de dolor neuropático, posicionando a estos canales como blancos potenciales para su tratamiento.

c) Canales HCN

Los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos, o HCN (del inglés *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels*), presentan cuatro isoformas y se ensamblan con cuatro subunidades similares (homotetramero) o con diferentes subunidades (heterotetramero) (Figura 14) (Brewster et al., 2005; Chen et al., 2005; Much et al., 2003). Entre el S6 y el C-terminal hay un dominio de unión de nucleótidos cíclicos o CNBD (del inglés *Cyclic Nucleotide Binding Domain*). La mayoría de los dominios transmembrana, incluyendo el sensor de voltaje S4, región del poro y CNBD son altamente conservados (80-90%) entre las cuatro subunidades de los canales HCN, mientras que las secuencias N-terminal y C-

terminal son más variables (Biel et al., 2002; Kaupp and Seifert, 2001). Los canales HCN se han encontrado en el sistema cardiovascular y en los sistemas sensorial y motor (Monteggia et al., 2000; Moosmang et al., 1999; Moosmang et al., 2001). Estos canales son responsables de una corriente de entrada de cationes llamada I_h , la cual es activada por potenciales hiperpolarizantes en un rango de entre -60 a -90 mV (Kaupp and Seifert, 2001). El umbral de activación de los canales HCN2 y HCN4 puede desplazarse hacia potenciales más positivos cuando el AMPc se une al extremo C-terminal, pero HCN1 y HCN3 son relativamente insensibles al AMPc (Biel et al., 2002; Kaupp and Seifert, 2001). En las neuronas somatosensoriales primarias, la corriente I_h de activación rápida depende principalmente por las subunidades HCN1 y tiene un papel central en la oscilación del potencial de membrana. Así mismo, el bloqueo de esta corriente causa una hiperpolarización en las neuronas sensibles a frío en cultivo cercano a 5 mV. A nivel, conductual tanto animales HCN1^{-/-} como animales silvestres inyectados con el inhibidor específico de la I_h ZD7288 presentan una reducción en su respuesta al frío sugiriendo el papel de esta corriente en la sensibilidad térmica (Orio et al., 2009). Por otro lado, se ha descrito un papel directo de HCN2 en el desarrollo de hiperalgesia después de procesos inflamatorios y de cuadros de dolor neuropático post lesión axonal (Emery et al., 2011).

d) Canales de Sodio sensibles a voltaje Na_v1.7, Na_v1.8 y Na_v1.9

Los canales de sodio activados por voltaje o VGSC (del inglés *Voltage-Gated Sodium Channels*) son determinantes cruciales de la excitabilidad y señalización neuronal (Momin and Wood, 2008). Estos canales están formados por cuatro dominios homólogos, cada uno de los cuales consta de seis segmentos transmembrana (S1-S6). Los primeros cuatro segmentos forman parte del dominio sensor de voltaje, mientras que los segmentos S5, S6 y el lazo que los une forman el dominio del poro. Estas características estructurales han sido descritas a partir de la cristalización de canales VGSC provenientes de bacterias (McCusker et al., 2012; Payandeh et al., 2011; Payandeh et al., 2012; Zhang et al., 2012b), pero la estructura de los VGSC en eucariotas aún se desconoce.

Las neuronas somatosensoriales primarias expresan varios tipos de VGSC y entre los más relevantes destacan los subtipos Na_v1.7, Na_v1.8 y Na_v1.9 (Waxman and Zamponi, 2014). Las características biofísicas de Na_v1.7 sugieren un papel en el inicio de los potenciales de acción en respuesta a estímulos nocivos (Cox et al., 2006; Dib-Hajj et al., 2008). La delección selectiva de Na_v1.7 en nociceptores Na_v1.8(+) en ratón, se traduce en la pérdida del dolor inflamatorio y de la mecanosensibilidad aguda (Nassar et al., 2004). A su vez, Na_v1.8 es el principal VGSC que contribuye a la generación y mantención del disparo de potenciales de acción en neuronas sensoriales provenientes de los ganglios raquídeos (Renganathan et al., 2001). Por otro lado, los mediadores

inflamatorios incrementan la corriente mediada por Na_v1.9 en neuronas de estos ganglios sensoriales, sugiriendo así una contribución de estos canales en cuadros de dolor inflamatorio (Binshtok et al., 2008). Los ratones Na_v1.9 *knockout* desarrollan dolor inflamatorio atenuado, apoyando el papel de estos canales en el dolor inflamatorio (Amaya et al., 2006; Priest et al., 2005).

Utilizando un modelo de neuropatía diabética en ratas, se encontró que una desregulación en la expresión de los canales de Na_v1.3, Na_v1.6, Na_v1.8 y Na_v1.9 a nivel de los ganglios raquídeos, que contribuiría con el dolor neuropático asociado a esta patología (Craner et al., 2002). El papel de los VGSC en la señalización del frío ha sido estudiado en detalle entre otros por Zimmermann y colaboradores (2011). Estos autores determinaron que en neuronas de ganglios raquídeos en cultivo como en terminales libres de la piel el canal Na_v1.8 (insensible a TTX) es necesario para la transducción de estímulos nocivos. El análisis biofísico de este canal mostró que, a diferencia de Na_v1.7, Na_v1.8 es resistente al frío, permitiendo así las respuestas frente a estímulos mecánicos nocivos y la generación de potenciales de acción a bajas temperaturas. De acuerdo con esta observación, las terminales de piel provenientes de animales Na_v1.8^{-/-} no fueron excitables a pulsos de corriente ni a estímulos mecánicos a 10°C en presencia de TTX.

A su vez, en estos animales $\text{Na}_v1.8^{-/-}$ las respuestas a mentol de sus terminales se vieron significativamente afectadas al igual que las respuestas conductuales en respuesta al frío lesivo, indicando el importante papel de los canales $\text{Na}_v1.8$ en la transducción del frío lesivo. Todos estos resultados sugieren que $\text{Na}_v1.8$ (preferentemente expresado en nociceptores) es requerido en la respuesta eléctrica de estas neuronas a estímulos mecánicos a bajas temperaturas y a frío lesivo (Zimmermann et al., 2007).

10. ANEXO II

10.1 Protocolo de seguimiento animal

Se aplicó un protocolo de supervisión modificado a partir de Morton y Griffiths (Morton and Griffiths, 1985), con especial atención a los cambios de aspecto local y conducta general relacionados al procedimiento realizado. Esto se hizo con el fin de detectar y cuantificar el dolor secundario como resultado del procedimiento experimental utilizado en esta tesis y aplicar las medidas paliativas correspondientes, como la utilización de analgésicos o el sacrificio del animal. Todos los animales utilizados en esta Tesis fueron anestesiados durante el procedimiento y recibieron analgésicos durante los días sucesivos.

	Variables a considerar	Puntuación
Masa. (0-3)	- Normal (no se produce pérdida de peso, o crece y gana peso normalmente).	0
	- Pérdida de peso inferior al 10%	1
	- Pérdida de peso entre el 10% y el 20%. Posible alteración en el aspecto o la cantidad de las heces.	2
	- Pérdida de peso superior al 20%	3

Apariencia general del animal y aspecto específico de la córnea. (0-3)	- Normales (pelaje normal, córnea translúcida y sin alteraciones).	0
	- Pelo en regular estado, pero córnea sin alteraciones aparentes que sugieran irritación o inflamación.	1
	- Pelo en mal estado, piloerección parcial y/o presencia de secreciones nasales y/o oculares anormales y opacidad corneal parcial.	2
	- Pelo en mal estado y/o postura anormal, piloerección, inflamación local, irritación y/o ulceración corneal, secreción nasal y ocular anormal y copiosa, opacidad corneal (*).	3
Comportamiento espontáneo (especial atención a la sintomatología específica de estados de dolor agudo y dolor crónico) (0-3)	- Normal (conducta general y de desplazamiento normal, bebe y come normalmente).	0
	- Manipulación/protección de la región lesionada de forma esporádica.	1
	- Manipulación/protección frecuente de la región lesionada (>10 veces por hora). Inactividad prolongada; no se alimenta adecuadamente (40-75% de reducción en el consumo de agua y alimentos por 72 hrs). - Vocalización anormal, ojos y abdomen hundidos, animal muy inquieto o inmóvil por más de una hora, automutilación o autolesión en la región intervenida (*)	2 3
Comportamiento en respuesta a manipulación (0-3)	- Normal.	0
	- Cambios pequeños, protección esporádica de la región intervenida.	1
	- Cambios moderados, protección del área intervenida, tendencia a morder, huída,	2

	vocalización anormal. - Animal agresivo o sin capacidad de respuesta.	3
Signos vitales (0-3)	- Normales. - Cambios de temperatura corporal menores a 1°C, cambios menores en la frecuencia respiratoria. - Cambios en la temperatura corporal de 1-2°C, incremento del 30% en frecuencia respiratoria y/o presencia patrones respiratorios anormales (intermitentes). - Cambios en la temperatura corporal de >2°C, incremento del 50% en frecuencia respiratoria o respiración dificultosa.	0 1 2 3

Escala de evaluación:

- 1) La puntuación total va de 0 a 20.
- 2) Cuando un animal obtiene notación de 3 en más de 1 parámetro, todos los valores 3 pasan a valor 4.
- 3) Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida en cada animal son:

Puntuación	Interpretación	Medida
0-2	Normal	Los animales no serán sometidos a tratamientos especiales.
3-9	Sufrimiento leve a moderado	(a) Supervisar cuidadosamente por 24 horas, si persiste pasar a (b). (b) Se aplicarán medidas extra de analgesia (buprenorfina 0.02-0.05 mg/Kg sid SC) y se seguirá su progreso a las 24 y 48 horas.
10-14	Sufrimiento moderado a intenso	Eutanasia
15-20	Sufrimiento intenso	Eutanasia

(*) En casos de autolesiones, ulceración u opacidad corneal completa (debida a keratitis u otras complicaciones) y alteraciones severas en el comportamiento espontáneo asociados a dolor crónico se procedió al sacrificio del animal, aunque la puntuación fuera menor a 10.

10.2 Ficha Técnica Protocolo Morton y Griffiths

Fecha inicio Procedimiento	
Identificación del animal: R__	Cepa y origen: Edad y peso: Inv. Responsable: Procedimiento realizado:

Fecha									
Peso									
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Parámetros									
	Puntajes								
Variación del peso corporal									
Apariencia general del animal									
Cicatrización y estado de la córnea									

Comportamiento espontáneo (especial atención a la sintomatología específica de estados de dolor agudo y crónico)									
Comportamiento en respuesta a manipulación									
Signos vitales									
Sumatoria									

Observaciones: Todos los animales utilizados en el desarrollo de esta tesis presentaron una puntuación de entre 0 a 2, es decir, no mostraron signos de dolor asociados a la cirugía corneal. Por lo anterior, no fue necesario administrar medidas adicionales de analgesia, salvo la detallada en la sección de materiales y métodos.