



**"ACTIVIDAD DE LOS NERVIOS
SENSORIALES DE LA CÓRNEA DURANTE
LA DEFICIENCIA LAGRIMAL CRÓNICA Y SU
MODULACIÓN FARMACOLÓGICA"**

Programa de Doctorado en Neurociencias

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández de Elche

Tesis Doctoral presentada por

Susana Quirce Vázquez

Directora:

Prof^a Juana Gallar Martínez

Codirectora:

Prof^a M^a del Carmen Acosta Boj

- 2019 -

Dña. Susana Quirce Vázquez, autora de la presente Tesis Doctoral, INFORMA:

- 1- Que la presente Tesis Doctoral se presenta en **formato convencional**.
- 2- Que la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Neurociencias ha reconocido como indicios de calidad las siguientes publicaciones previas:
 - Kovács I, Luna C, **Quirce S**, Mizerska K, Callejo G, Riestra A, Fernández-Sánchez L, Meseguer VM, Cuenca N, Merayo-Lloves J, Acosta MC, Gasull X, Belmonte C, Gallar J. *Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease*. Pain. 2016 Feb;157(2):399-417. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000455.
 - Kovács I, Dienes L, Perényi K, **Quirce S**, Luna C, Mizerska K, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. *Lacosamide diminishes dryness-induced hyperexcitability of corneal cold sensitive nerve terminals*. Eur J Pharmacol. 2016 Sep 15;787:2-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.05.044.
- 3- Que el presente trabajo ha sido realizado gracias a la financiación en forma de contrato predoctoral para la formación de doctores (FPI) convocatoria 2015, referencia BES-2015-072638, del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, asignado a la doctoranda.

Fdo: SUSANA QUIRCE VÁZQUEZ

Sant Joan d'Alacant, 30 de Octubre de 2019



Sant Joan d'Alacant, 15 de julio de 2019

Las Dras. JUANA GALLAR MARTÍNEZ, Catedrática de Universidad del Departamento de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández e investigadora del Instituto de Neurociencias, centro mixto UMH-CSIC, y M^a del CARMEN ACOSTA BOJ, Catedrática de Universidad del Departamento de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández e investigadora del Instituto de Neurociencias, centro mixto UMH-CSIC,

INFORMAN:

Que D^a SUSANA QUIRCE VÁZQUEZ, Licenciada en Biología y Bioquímica y estudiante del Programa de Doctorado en Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge su Tesis Doctoral “**Actividad de los nervios sensoriales de la córnea durante la deficiencia lagrimal crónica y su modulación farmacológica**”, que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo, y que dan su conformidad para su presentación y defensa pública para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, y a los efectos oportunos firman el presente informe.

Fdo: Dra. Juana Gallar Martínez

Fdo: M^a del Carmen Acosta Boj



Sant Joan d'Alacant 15 de julio de 2019

El Dr. Miguel Valdeolmillos López, Catedrático y Coordinador del Programa de Doctorado en Neurociencias impartido por el Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral “**Actividad de los nervios sensoriales de la córnea durante la deficiencia lagrimal crónica y su modulación farmacológica**” ha sido realizada por Dña. Susana Quirce Vázquez, licenciada en Biología y Bioquímica, bajo la dirección de la Dra. Juana Gallar Martínez y de la Dra. M^a del Carmen Acosta Boj, y doy mi conformidad para que sea leída y defendida como Tesis Doctoral ante el correspondiente tribunal en la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente informe.

Dr. Miguel Valdeolmillos López

— A Javier, Pablo y Alejandro —

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a todos los que han hecho posible que presente esta memoria.

Empezando por mi “familia científica”. En primer lugar a mis directoras de Tesis, las doctoras Juana Gallar y M^a del Carmen Acosta, por confiar en mí y guiarme en el día a día de la vida científica. A Carolina y Fito, mis hermanos de laboratorio, por estar siempre ahí. Sin vosotros, este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a toda la gente del laboratorio Gallar/Acosta/Belmonte, los de antes (Kamila, Manolo, Ángeles) y los de ahora (Laura, Ari, David, Víctor, Almudena, Jose, Quique, Fernando, Omar, Fede y Deli), por hacer más familiar el ambiente de trabajo y alegrar los días en el laboratorio. Sois todos estupendos.

Gracias a todos los investigadores con los que he podido trabajar y aprender y con los que he podido publicar artículos.

Un agradecimiento especial al Dr. Carlos Belmonte, porque me abrió las puertas de su laboratorio y del Instituto de Neurociencias.

No me quiero olvidar de mi familia, mis padres y mis hermanos, que me han apoyado durante años para estudiar Biología y Bioquímica, carreras que me han abierto la puerta al mundo de la investigación, y que me han seguido animando hasta completar este trabajo. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

Contenido

ABREVIATURAS.....	19
LISTADO DE FIGURAS	23
LISTADO DE TABLAS	29
RESUMEN	33
ABSTRACT	35
1 INTRODUCCIÓN.....	39
1.1 LA CÓRNEA, ESTRUCTURA E INERVACIÓN SENSORIAL.	39
1.1.1 Estructura general de la córnea	39
1.1.2 Película lagrimal precorneal.....	42
1.1.3 Inervación sensorial	43
1.1.3.1 Inervación periférica.	43
1.1.3.2 Vías centrales	50
1.1.3.3 Caracterización funcional de la inervación corneal	51
a) Mecano-nociceptores	53
b) Nociceptores polimodales.....	53
c) Termorreceptores de frío.....	54
1.2 CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA TRANSDUCCIÓN Y LA CODIFICACIÓN SENSORIAL.....	57
1.2.1 Canales implicados en la excitabilidad de las neuronas sensoriales.....	58
1.2.1.1 Canales de sodio dependientes de voltaje: Na_v	58
Na_v 1.7	60
Na_v 1.8	61
Na_v 1.9	62
1.2.1.2 Canales activados por hiperpolarización modulados por nucleótidos (HCN). 63	
1.2.1.3 Canales de potasio dependientes de voltaje: K_v	64
1.2.1.4 Canales de calcio dependientes de voltaje: Ca_v	67
1.2.2 Canales implicados en la transducción sensorial	68
1.2.2.1 Canales TRP	68
TRPV1	69
TRPA1	70
TRPM8	71
1.2.2.2 ASICs	72
1.2.2.3 Piezo2	73
1.2.2.4 Canales de K^+ de 2 poros	74

1.3	ALTERACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA INERVACIÓN SENSORIAL CON LA INFLAMACIÓN Y LA LESIÓN.	76
1.4	LA ENFERMEDAD DE OJO SECO.....	80
1.5	LA CÓRNEA DE COBAYA COMO MODELO DE ESTUDIO.	84
2	OBJETIVOS.....	89
3	MATERIAL Y MÉTODOS.	93
3.1	Animales.....	93
3.2	Procedimiento quirúrgico para la inducción de deficiencia lagrimal crónica.	93
3.3	Frecuencia de parpadeo.....	95
3.4	Medida de la tasa de lagrimación.	96
3.5	Registro electrofisiológico de la actividad de los receptores sensoriales corneales. .	97
3.5.1	Registro electrofisiológico de la actividad de las terminaciones nerviosas intraepiteliales en la córnea aislada.....	97
3.5.2	Análisis de la actividad eléctrica de las terminaciones nerviosas registradas en la córnea aislada.	99
3.5.3	Registro extracelular de la actividad de fibras nerviosas corneales en los nervios ciliares.....	101
3.6	Fármacos.....	104
3.6.1	Bloqueantes de canales de sodio.....	105
3.6.1.1	Lidocaína.....	105
3.6.1.2	Lacosamida.....	105
3.6.1.3	Hainantoxina IV.....	105
3.6.2	Bloqueantes de canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos (HCN).	106
3.6.2.1	Ivabradina.....	106
3.6.2.2	Cilobradina.....	106
3.6.2.3	Zatebradina.....	106
3.7	Análisis estadístico.	107
4	RESULTADOS.....	111
4.1	Efectos de la deficiencia lagrimal crónica.	111
4.1.1	Cambios en la tasa de lagrimación y la frecuencia de parpadeo.	111
4.1.2	Cambios en la actividad de los nervios sensoriales corneales.	112
4.1.2.1	Nociceptores.....	112
4.1.2.2	Termorreceptores de frío.....	115
4.2	Modulación farmacológica de la actividad de los termorreceptores de frío corneales en la deficiencia lagrimal crónica.	119
4.2.1	Efectos de los bloqueantes de canales de Na ⁺	120

4.2.1.1	Lidocaína	120
4.2.1.2	Lacosamida	121
4.2.1.3	Hainantoxina IV	122
4.2.2	Efectos de los bloqueantes de canales HCN	124
4.2.2.1	Ivabradina	124
4.2.2.2	Cilobradina	132
4.2.2.3	Zatebradina	141
4.2.2.4	Comparación entre los efectos de los diferentes fármacos bloqueantes de HCN en córneas control y con deficiencia lagrimal crónica	151
5	DISCUSIÓN	155
6	CONCLUSIONES	173
7	BIBLIOGRAFÍA	175
8	ANEXO: PUBLICACIONES	211





ABREVIATURAS

Área SI: área somatosensorial primaria.

Área SII: área somatosensorial secundaria.

ASIC: “Acid Sensing Ion Channel”. Canal iónico activado por ácido.

AP: Potencial de acción.

AITC: Alilisotiocianato. Activador del canal TRPA1.

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico.

Ag/AgCl: Plata/cloruro de plata.

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

Ca_v: Canales de calcio dependientes de voltaje.

Ca²⁺: Ión calcio.

CO₂: Dióxido de carbono.

CaCl₂: Cloruro de calcio.

CCK: Colecistoquinina.

CHO: “Chinese Hamster Ovary”. Línea celular estable de ovario de hámster.

DED: “Dry Eye Disease”. Enfermedad del ojo seco.

DRG: “Dorsal Root Ganglia”.Ganglio de la raíz dorsal o ganglio raquídeo.

ENaC/DEG: Canales de sodio epiteliales/degenerina.

FAK/Src: “Focal Adhesión Kinase and steroid receptor coactivator”.

FDA: “Food and Drug Administration”.

GMQ: Agonista específico de ASIC3.

HEK-293: “Human Embryonic Kidney” 293. Línea celular humana de riñón humano.

HB-LT: “High Background- Low Threshold”.

H⁺: Protones.

HCN: “Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated”. Canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos.

I_{KD}: “Delayed potassium current”.

I_h: “Hyperpolarization current”. Corriente de potasio activada por hiperpolarización.

JNK: “c-Jun N-terminal kinase”.Quinasa de c-Jun N-terminal.

K⁺: Ión potasio.

KCl: Cloruro de potasio.

K_v: Canales de potasio dependientes de voltaje.

K2P: Canales de potasio de dominio de 2 poros.

KCN: Genes codificantes para canales de potasio K_v.

LB-HT: “Low background-high threshold”.

MEKK: “Mitogen Extracelular signal-related Kinase”.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

MMP: “Matrix MetalProteinase”. Metaloproteínasa de matriz extracelular.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.

Na⁺: Ión sodio.

Na⁺ y K⁺ ATPasa: Bombas de transporte iónico de sodio y potasio.

NaCl: Cloruro de sodio.

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio.

NaH₂PO₄: Fosfato de monosodio.

Na_v o VGSC: “Voltage Gated Sodium Channels”. Canales de sodio activados por voltaje.

NMDA: n-metil d-aspartato.

NK1: Receptor de neurokinina 1.

nNOS: Sintasa de óxido nítrico.

NPY: Neuropeptido Y.

NTI: “Nerve Terminal Impulse”. Impulsos nerviosos de las terminaciones.

O₂: Oxígeno.

PACAP: Péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria.

PGE₂: Prostaglandina E₂.

PIP₂: Fosfatidil Inositol 4,5 bifosfato.

PLC: Fosfolipasa C.

6TM: 6 Segmentos Transmembrana.

SCN: genes de los canales de sodio.

SEM: “Standard Error of the Mean”. Error estándar de la media.

SP: Sustancia P.

TALK: “TWIK-RElated Alkaline pH-Activated K⁺ Channel” activado por alcalinización.

TASK: “TWIK-RElated Acid-sensitive K⁺ channel” activado por ácido.

TBNC: Complejo nuclear trigeminal del tronco del encéfalo.

TG: “Trigeminal Ganglia”. Ganglio trigémino.

THIK: “Tandem pore domain Halothane-Inhibited K⁺ channel”. Canal de potasio inhibido por halotano.

TRAAK: “Arachidonic Acid-sensitive tandem-pore domain potassium channels”.

TREK: “TWIK RElated K⁺ channel”.

TRESK: “TWIK-RElated Spinal cord channel”; modulado por Ca²⁺.

TRPM8: “Transient Receptor Potential Melastatin” 8.

TRPV1 o VR1: “Transient Receptor Potential Vanilloid” 1 o receptor vaniloide.

TRPA1: “Transient Receptor Potential Ankyrin” 1.

TRPC: “Transient Receptor Potential Canonical”.

TRPP: “Transient Receptor Potential Polycistin”.

TRPML: “Transient Receptor Potential Mucolipin”.

TTX: Tetrodotoxina.

TTX-R: Tetrodotoxina resistente.

TTX-S: Tetrodotoxina sensible.

TWIK: Tandem “of pore domains in a Weak Inward Rectifying K⁺ channel”- Canal de potasio rectificador de corriente interna débil.

UV: Ultravioleta.

Vi/Vc: Subnúcleo interpolar/caudal en el núcleo trigeminal del troncoencéfalo.

Vc/C1: Subnúcleo caudal/cervical superior en el núcleo trigeminal del troncoencéfalo.

VIP: Péptido Intestinal Vasoactivo.



LISTADO DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1	Esquema del globo ocular.....	40
Figura 1.2	Sección histológica de la córnea humana.....	42
Figura 1.3	Inervación del ojo.....	45
Figura 1.4	Esquema de la inervación corneal.....	47
Figura 1.5	Recorrido de una fibra nerviosa en el estroma y en el epitelio corneal humano.....	49
Figura 1.6	Tipos funcionales de receptores sensoriales corneales.....	52
Figura 1.7	Representación esquemática de los tipos funcionales de neuronas sensoriales que inervan la superficie ocular y los principales canales transductores expresados en sus terminaciones nerviosas periféricas.....	56
Figura 1.8	Representación de los diferentes canales iónicos y receptores de membrana.....	57
Figura 1.9	Representación esquemática de la influencia hipotética de la lesión nerviosa y la inflamación sobre las terminaciones sensoriales de las neuronas del ganglio trigémino.....	80
Figura 1.10	Representación esquemática de la unidad funcional lagrimal.....	84

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 3.1	Representación esquemática del procedimiento experimental.....	94
Figura 3.2	Colocación del hilo de rojo fenol empleado para medir la tasa de lagrimación en el cobaya.....	96
Figura 3.3	Esquema de la configuración empleada para el registro electrofisiológico de la actividad de las terminaciones sensoriales en la córnea aislada.....	99
Figura 3.4	Parámetros de respuesta al enfriamiento medidos en los termorreceptores de frío.....	101
Figura 3.5	Esquema de la configuración empleada para el registro de la actividad eléctrica de los nervios ciliares del cobaya.....	102
Figura 3.6	Ejemplo de registro de un receptor polimodal en un nervio ciliar de cobaya en respuesta a un estímulo químico con un pulso de CO ₂ , mostrando los diferentes parámetros analizados.....	103

RESULTADOS

Figura 4.1	Tasa de lagrimación medida en el cobaya.....	111
Figura 4.2	Frecuencia de parpadeo antes y a diferentes tiempos tras la extirpación unilateral de la glándula lagrimal principal en el cobaya.....	112
Figura 4.3	Sensibilidad química de las fibras nerviosas nociceptoras polimodales registradas en córneas control y con deficiencia lagrimal.....	114
Figura 4.4	Ejemplo de la actividad basal y evocada por una rampa de frío en terminaciones nerviosas sensibles al frío registradas en una córnea intacta y en una córnea con deficiencia lagrimal.....	115
Figura 4.5	Actividad espontánea de disparo de las terminaciones sensibles al frío a la temperatura basal de 34° en córneas control y con deficiencia lagrimal a diferentes tiempos tras la cirugía.....	116
Figura 4.6	Umbral de respuesta a frío de las terminaciones sensibles al frío en córneas control y con deficiencia lagrimal.....	117
Figura 4.7	Respuesta máxima a frío de las terminaciones sensibles al frío en córneas control y con deficiencia lagrimal.....	117
Figura 4.8	Actividad media de las terminaciones de frío de córneas control y córneas con deficiencia lagrimal a lo largo de una rampa de enfriamiento de 34°C a 20°C.....	118
Figura 4.9	Ejemplo de la actividad basal a 34°C y evocada por rampas de frío de una terminación sensible al frío registrada en una córnea con deficiencia lagrimal, antes y durante la perfusión con solución conteniendo lidocaína.....	120
Figura 4.10	Ejemplo de la actividad basal a 34°C y la evocada por rampas de frío desde 34°C a 20°C de una terminación sensible al frío registrada en una córnea con deficiencia lagrimal antes y durante la perfusión con solución conteniendo lacosamida.....	121
Figura 4.11	Ejemplo del efecto de la lacosamida 100µM sobre la actividad basal a 34°C y la evocada por una rampa de frío de una terminación sensible al frío registrada en una córnea control.....	122
Figura 4.12	Efecto de la perfusión con hainantoxina IV 100nM sobre la actividad espontánea y la evocada por frío de las terminaciones nerviosas de frío en córneas control y en córneas con deficiencia lagrimal.....	123
Figura 4.13	Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible al frío de una córnea control, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo ivabradina 300µM.....	124
Figura 4.14	Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30µM, 100µM y 300µM).....	125

Figura 4.15	Curva dosis-respuesta del efecto de la perfusión con ivabradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas intactas.....	125
Figura 4.16	Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal control en la que la ivabradina 300µM produjo cambios en el patrón de disparo.....	126
Figura 4.17	Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30µM, 100µM y 300µM).....	127
Figura 4.18	Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible a frío de una córnea con deficiencia lagrimal, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo ivabradina 100µM.....	128
Figura 4.19	Efectos sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30µM, 100µM y 300µM).....	129
Figura 4.20	Curva dosis-respuesta del efecto de la perfusión con ivabradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas.....	129
Figura 4.21	Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal con deficiencia lagrimal en la que la ivabradina 300µM produjo cambios en el patrón de disparo.....	130
Figura 4.22	Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30µM, 100µM y 300µM).....	132
Figura 4.23	Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible al frío de una córnea control, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo cilobradina 100µM.....	133
Figura 4.24	Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes (30µM, 100µM y 300µM).....	134
Figura 4.25	Curva dosis-respuesta del efecto de la perfusión con cilobradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas intactas.....	134
Figura 4.26	Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal control en el que la cilobradina 100µM produjo cambios en el patrón de disparo.....	135
Figura 4.27	Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes (30µM, 100µM y 300µM).....	136
Figura 4.28	Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación sensible al frío de una córnea con deficiencia lagrimal, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo cilobradina 300µM.....	137

Figura 4.29	Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M).....	138
Figura 4.30	Curva dosis-respuesta del efecto de la perfusión con cilobradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas.....	138
Figura 4.31	Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal con deficiencia lagrimal en el que la cilobradina 100 μ M produjo cambios en el patrón de disparo.....	139
Figura 4.32	Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M).....	141
Figura 4.33	Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación sensible al frío de una córnea control, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo zatebradina 100 μ M.....	142
Figura 4.34	Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M).....	143
Figura 4.35	Curva dosis-respuesta del efecto de la perfusión con zatebradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas intactas.....	143
Figura 4.36	Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal control en el que la zatebradina 300 μ M produjo cambios en el patrón de disparo.....	144
Figura 4.37	Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M).....	145
Figura 4.38	Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación sensible al frío de una córnea con deficiencia lagrimal, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo zatebradina 300 μ M.....	146
Figura 4.39	Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M).....	147
Figura 4.40	Curva dosis-respuesta del efecto de la perfusión con zatebradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas.....	147
Figura 4.41	Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal con deficiencia lagrimal en la que la zatebradina 300 μ M produjo cambios en el patrón de disparo.....	148

Figura 4.42	Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M).....	150
Figura 4.43	Comparación del % de bloqueo de la actividad espontánea a temperatura basal (34°C) de los termorreceptores de frío de córneas intactas (control) y córneas con deficiencia lagrimal (ojo seco).....	151
Figura 4.44	Comparación del % de bloqueo de la máxima respuesta al frío de los termorreceptores de frío de córneas intactas (control) y córneas con deficiencia lagrimal (ojo seco).....	152

DISCUSIÓN

Figura 5.1	Representación esquemática del posible efecto de la inflamación y la lesión sobre la actividad de los receptores sensoriales de la córnea.....	169
------------	--	-----





LISTADO DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1	Principales proteínas de membrana o canales iónicos implicados en la transducción y codificación de los estímulos.....	58
Tabla 1.2	Principales canales implicados en la excitabilidad neuronal y sus principales funciones.....	67
Tabla 1.3	Principales canales implicados en la transducción sensorial y sus funciones más importantes.....	76
Tabla 1.4	Principales efectos de la inflamación sobre la actividad y la expresión de los canales que participan en la codificación y transducción sensorial en las neuronas sensoriales primarias.....	77
Tabla 1.5	Efectos de la lesión de las neuronas sensoriales primarias y/o sus terminaciones periféricas sobre la actividad y la expresión de los canales que participan en la transducción sensorial y la codificación del estímulo.....	79

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3.1	Bloqueantes de canales de Na ⁺ y de canales HCN empleados en este trabajo y concentraciones ensayadas.....	104
-----------	---	-----

RESULTADOS

Tabla 4.1	Propiedades generales de las fibras mecano-nociceptoras y nociceptoras polimodales registradas en córneas control y en córneas de animales con deficiencia lagrimal.....	113
Tabla 4.2	Características de la respuesta a un pulso de CO ₂ de los nociceptores polimodales corneales registrados en córneas intactas y con deficiencia lagrimal.....	114
Tabla 4.3	Características de la actividad espontánea a 34°C y la evocada por una rampa de frío de los termorreceptores de frío corneales en córneas control y con deficiencia lagrimal.....	115
Tabla 4.4	Efectos de la deficiencia lagrimal crónica sobre la actividad espontánea a 34°C y las características de la respuesta evocada por una rampa de frío de las terminaciones termorreceptoras de la córnea comparadas con una córnea control.....	120
Tabla 4.5	Efectos de la lidocaína a 100 µM sobre la actividad espontánea a temperatura basal de 34°C y las características de la respuesta a una rampa de frío de las terminaciones sensoriales de frío registradas en córneas con deficiencia lagrimal.....	121

Tabla 4.6	Efectos de la lacosamida a 100 μ M sobre la actividad espontánea a 34°C y las características de la respuesta evocada por una rampa de frío de las terminaciones termorreceptoras de las córneas con deficiencia lagrimal.....	122
Tabla 4.7	Efectos de la perfusión con hainantoxina IV a 100nM sobre la actividad espontánea a temperatura basal de 34°C y las características de la respuesta evocada por una rampa de frío de terminaciones de córneas control y con deficiencia lagrimal.....	123
Tabla 4.8	Número de terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas de cobayas control que desarrollaron disparo en ráfagas tras la perfusión con ivabradina a diferentes concentraciones.....	126
Tabla 4.9	Umbrales de frío determinados en terminales de córneas control, antes, durante y después de la perfusión con ivabradina a diferentes concentraciones.....	127
Tabla 4.10	Número de terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas de cobaya con ojo seco que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con ivabradina a diferentes concentraciones.....	130
Tabla 4.11	Umbrales de frío determinados en terminales de córneas con deficiencia lagrimal, antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con ivabradina a diferentes concentraciones.....	131
Tabla 4.12	Número de terminaciones corneales sensibles al frío registradas en córneas de cobayas control que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con cilobradina a diferentes concentraciones.....	135
Tabla 4.13	Umbrales de frío determinados en terminales de córneas control, antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con cilobradina a diferentes concentraciones.....	136
Tabla 4.14	Número de terminaciones corneales sensibles al frío registradas en córneas de cobayas con deficiencia lagrimal que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con cilobradina a diferentes concentraciones.....	140
Tabla 4.15	Umbrales de frío determinados en terminales de córneas con deficiencia lagrimal, antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con cilobradina a diferentes concentraciones.....	140
Tabla 4.16	Número de terminaciones corneales sensibles al frío registradas en córneas de cobayas control que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con zatebradina a diferentes concentraciones.....	144
Tabla 4.17	Umbrales de frío determinados en córneas control, antes, durante y a diferentes tiempos de finalizar la perfusión con zatebradina a diferentes concentraciones.....	145
Tabla 4.18	Número de terminaciones corneales sensibles al frío registradas en córneas de cobayas con deficiencia lagrimal que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con zatebradina a diferentes concentraciones.....	149

Tabla 4.19	Umbral de frío determinados en terminales de córneas con deficiencia lagrimal, antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con zatebradina a diferentes concentraciones.....	149
------------	--	-----

DISCUSIÓN

Tabla 5.1	Resumen de los principales efectos sobre la actividad basal y la respuesta al frío de los fármacos bloqueantes de canales de Na ⁺ y canales HCN probados en este trabajo.....	167
-----------	--	-----





RESUMEN

La córnea es la estructura más expuesta del ojo y está densamente innervada por terminaciones nerviosas sensoriales que detectan los estímulos físicos, químicos y térmicos. La sensibilidad de estas terminaciones sensoriales, entre las que se encuentran los mecano-nociceptores, los nociceptores polimodales y los termorreceptores de frío, depende de la expresión diferencial de canales iónicos en su membrana, que determina la capacidad de transducir y codificar un estímulo externo en una señal transmisible que acabará interpretándose como una sensación en centros nerviosos superiores.

La enfermedad de ojo seco es una patología muy común, derivada de una alteración crónica de la homeostasis de la película lagrimal, que cursa con inflamación y lesión del tejido corneal y conjuntival, siendo una de las causas más frecuentes de malestar y dolor evocado desde la superficie ocular. Tanto la inflamación crónica como la lesión producen una alteración de la actividad de las terminaciones sensoriales corneales debido a un aumento de la excitabilidad nerviosa, cuya base molecular está más relacionada con cambios en la actividad y/o la expresión de los canales relacionados con la codificación del estímulo (aumento de las corrientes de Na^+ y disminución de las corrientes de K^+) que con cambios en los canales responsables de la transducción sensorial.

El objetivo de esta Tesis es definir los cambios en la actividad de los nervios sensoriales de la córnea durante la deficiencia lagrimal crónica y estudiar su modulación farmacológica por algunos compuestos bloqueantes de los canales de Na^+ o de K^+ .

Para ello, se desarrolló un procedimiento experimental consistente en la extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal en el cobaya, induciendo la deficiencia lagrimal crónica, tras lo que se estudió el curso temporal de los cambios en la actividad nerviosa de los diferentes receptores corneales durante un mes tras la cirugía, tiempo al que esos cambios están plenamente establecidos. A continuación, se exploró la modulación farmacológica de esa actividad nerviosa alterada tras 4 semanas de deficiencia lagrimal, utilizando diferentes compuestos bloqueantes de los canales de Na^+ , como la lidocaína, la lacosamida o la hainantoxina IV, y compuestos bloqueantes de los canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN), como la ivabradina, la cilobradina o la zatebradina.

En esta Memoria se describe que la deficiencia lagrimal experimental induce una sensibilización transitoria de las fibras nociceptoras de la córnea, aumentando la actividad espontánea y la respuesta a la estimulación natural sólo durante la primera semana en la que la producción lagrimal está reducida. Por otro lado, en los termorreceptores de frío corneales (receptores sensoriales implicados en proveer al sistema nervioso central de la información necesaria para la regulación de la lagrimación y parpadeo basal y los responsables de la génesis de las sensaciones de sequedad y malestar ocular evocadas desde la superficie ocular) se produce un incremento de la actividad espontánea a la temperatura basal y de la respuesta al enfriamiento, que se instaura de manera progresiva tras la extirpación de la glándula lagrimal principal y se mantiene a largo plazo.

Los resultados obtenidos también muestran que los bloqueantes de los canales de Na^+ , sobre todo los que afectan a los canales sensibles a la TTX, reducen de manera significativa la actividad espontánea y la respuesta al enfriamiento de los termorreceptores de frío, siendo en algunas ocasiones diferente el efecto obtenido en las córneas con deficiencia lagrimal y en las intactas. Por su parte, los fármacos que bloquean los canales HCN reducen la actividad espontánea y la respuesta al enfriamiento de los termorreceptores de frío de manera dosis-dependiente y modifican su patrón de disparo, tanto en córneas intactas como en córneas de cobayas con deficiencia lagrimal.

En conclusión, esta tesis muestra que la inducción de deficiencia lagrimal crónica por extirpación de la glándula lagrimal principal en el cobaya es un buen modelo para estudiar sus efectos sobre la actividad de los nervios sensoriales de la córnea, así como para el estudio de su modulación farmacológica. Los resultados sugieren que las sensaciones anómalas experimentadas en la enfermedad de ojo seco se deben inicialmente a cambios transitorios en la actividad de los nociceptores polimodales (posiblemente asociados a la inflamación), si bien a más largo plazo se produce una afectación permanente de la excitabilidad de los termorreceptores de frío. Esa actividad alterada, que sería la responsable última de las sensaciones anómalas experimentadas por los pacientes, puede revertirse con diferentes bloqueantes de canales de Na^+ y HCN, por lo que estos canales serían una nueva diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

ABSTRACT

The cornea is the most exposed layer of the eye and is densely innervated by sensory nerve terminals that detect physical, chemical and thermal stimuli. Sensitivity of these corneal sensory nerves, that are classified as mechano-nociceptors, polymodal nociceptors and cold thermoreceptors, depends on the ionic channels expressed in their cell membranes, which transduce and codify the external stimuli into a transmissible signal that will be interpreted as a sensation at higher levels of the central nervous system.

Dry Eye Disease (DED) is a common pathology derived from the chronic alteration of tear film homeostasis that leads with inflammation and lesion of the corneal and conjunctival tissue, being one of the most common causes of discomfort and pain evoked from the ocular surface. Both chronic inflammation and lesion alter corneal sensory nerve activity due to an increase of nerve excitability, whose molecular bases are related to a greater extent with changes in the activity and/or expression of codifying channels (increase of Na⁺ currents and decrease of K⁺ currents) than with changes in channels involved in sensory transduction.

The objective of this thesis is to define the changes in corneal sensory nerve activity during chronic tear deficiency and to study its pharmacological modulation by several Na⁺ and K⁺ channel blockers.

An experimental procedure consisting of the surgical ablation of the main lacrimal gland was developed to induce chronic tear deficiency in the guinea pig, and the temporal course of the changes in neural activity of the different types of corneal sensory nerves was studied during one month after surgery (time when the changes were fully established). Next, their pharmacological modulation was explored after 4 weeks of tear deficiency, using different Na⁺ channel blockers as lidocaine, lacosamide or hainantoxin IV, and different hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN) blockers as ivabradine, cilobradine or zatebradine.

This work describes that the experimental tear deficiency induces a transient sensitization of corneal nociceptors, increasing their spontaneous and stimulus-evoked activity only during the first week after tear reduction. On the other hand, spontaneous and cooling-evoked activity of corneal cold thermoreceptors (the sensory receptors

involved in providing the central nervous system the information used for the regulation of basal tearing and blinking rate, and being also responsible of the genesis of ocular discomfort and dryness sensations evoked from the ocular surface) increase progressively with time after lacrimal gland removal, and remain altered at long term.

The present results also show that Na⁺ channel blockers, in particular those blocking TTX sensitive channels, reduce significantly the spontaneous activity and the response to cooling of cold thermoreceptors, having sometimes a different effect in intact and tear deficiency corneas. HCN blockers reduce the spontaneous and cold-evoked activity of cold thermoreceptors in a dose-dependent manner, and also modify its firing pattern, both in intact and tear deficient corneas.

In conclusion, this Thesis shows that chronic tear deficiency induced by excision of the main lacrimal gland in the guinea pig is a good model to study effects of chronic tear deficiency on corneal sensory nerve activity and its pharmacological modulation. Results suggest that the anomalous sensations experienced in DED are initially due to transient changes in the activity of polymodal nociceptors (probably associated to inflammation), although at long term seems to be due to a permanent alteration of cold thermoreceptors' excitability. This altered activity, which would be at last responsible of the abnormal sensations experienced by DED patients, can be reversed by treatment with different Na⁺ and HCN channel blockers, making these channels new therapeutic targets for the treatment of DED.



INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA CÓRNEA, ESTRUCTURA E INERVACIÓN SENSORIAL.

El ojo es el órgano desarrollado para la visión, uno de los sentidos especiales más importantes para la interacción del ser humano con su entorno. Para realizar este cometido, el ojo consta de diferentes estructuras, cada una de ellas con unas funciones concretas. La córnea es la capa más externa y cumple dos funciones principales, por una parte es la barrera protectora de potenciales agentes dañinos externos (físicos o químicos) y por otra, ayuda a la convergencia de la luz sobre la retina (la capa que contiene los fotorreceptores y las células nerviosas responsables del proceso de transducción de la visión), siendo la estructura con mayor índice de refracción del ojo. Para llevar a cabo estas funciones, la córnea tiene una serie de características especiales que le hacen ser transparente (es avascular), resistente, con privilegio inmune y con una alta sensibilidad a los estímulos proporcionada por la alta densidad de nervios sensoriales que posee (Rózsa & Beuerman, 1982, Müller et al, 2003; Belmonte et al, 2011).

1.1.1 Estructura general de la córnea

La córnea en el adulto humano es una estructura oval convexa, que mide alrededor de 11-12 mm de diámetro horizontalmente y 9-11 mm verticalmente, variando entre sexos. Hay un incremento gradual en el grosor desde la córnea central a la periferia (Fares et al, 2012) debido al incremento en la cantidad de colágeno en el estroma periférico. El grosor corneal varía en sujetos sanos entre 551 a 565 μm en la córnea central y entre 612 y 640 μm la córnea periférica (Feizi et al, 2014).

La córnea sana es avascular, llegándole el aporte de oxígeno y nutrientes desde los finos vasos en el límite exterior de la córnea (limbo) o desde las ramas terminales de las arterias oftálmica y facial a través del humor acuoso, y también directamente desde el exterior, gracias a la película lagrimal. Está formada por tres tipos principales de células (células epiteliales, queratocitos y células endoteliales), colágeno y glucosaminoglicanos y está estructurada en 3 capas, siendo de más externa a más interna: epitelio, estroma, y endotelio (**Figuras 1.1 y 1.2**).

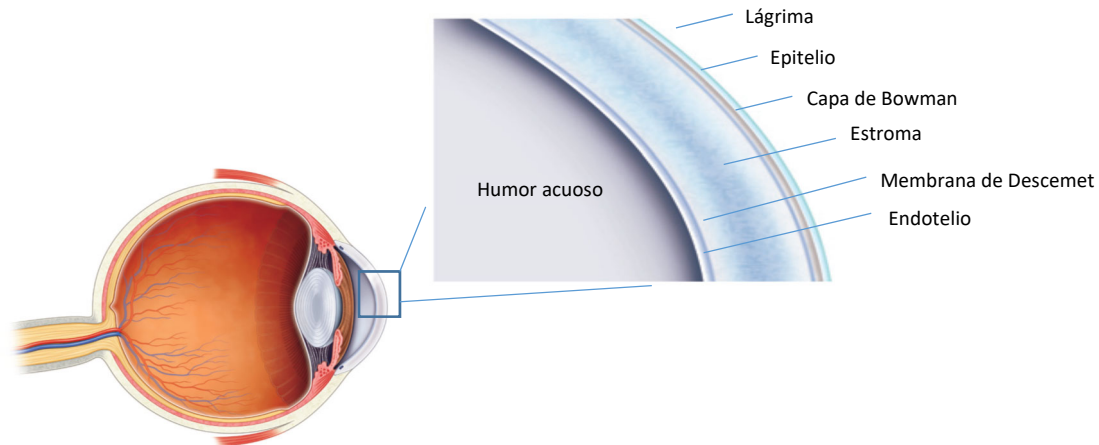


Figura 1.1. Esquema del globo ocular con detalle de las estructuras corneales. Adaptado de Dawson et al. (Levin et al.; Adler's Physiology of the Eye, 2011).

Epitelio.

El epitelio corneal está compuesto por 5-7 capas de células dispuestas uniformemente, con un grosor aproximado de 50 μm . Mantiene una relación muy estrecha con la película lagrimal que lo recubre. La capa de mucina de la película lagrimal, que está en contacto directo con el epitelio corneal, está producida por las células caliciformes conjuntivales e interactúa íntimamente con el glicocáliz de las células epiteliales corneales para permitir el esparcimiento hidrofílico de la película lagrimal con cada parpadeo.

Las células epiteliales corneales tienen una vida media de 7 a 10 días sufriendo involución, apoptosis y descamación. Durante ese periodo, las células del epitelio corneal adoptan tres morfologías diferentes: células superficiales, células aladas (“wing cells”) y células basales. En el ser humano, las células superficiales están dispuestas en 2-3 capas de células poligonales escamosas planas superpuestas, no queratinizadas, con un diámetro de 40-60 μm y un grosor de 2-6 μm , microvellosidades en su superficie y desmosomas entre ellas formando uniones “tight-junctions”. Las células basales están dispuestas en una capa única y tienen forma cuboidal o columnar, tienen abundantes organelas y son activas mitóticamente por lo que son las únicas células corneales capaces de dividirse, siendo la fuente de las células aladas y superficiales.

Estroma.

Inmediatamente por debajo del epitelio se encuentra el estroma. En los humanos y otros mamíferos superiores, la zona más externa del estroma corneal, de

aproximadamente unos 12 μm de espesor, recibe el nombre de capa de Bowman y está compuesta por colágeno y proteoglicanos que componen una capa lisa que ayuda a la córnea a mantener su forma, pero que no tiene capacidad de regeneración.

El estroma corneal forma el grueso de la estructura corneal y comprende aproximadamente el 80-85% de su grosor. Una de sus características fundamentales es su transparencia, resultado de la organización precisa de las fibras estromales y la matriz extracelular. Las fibras de colágeno son predominantemente de tipo I aunque también se han encontrado de tipo IV y XII (Meek & Boote, 2004). Las fibras de colágeno se organizan en haces paralelos llamados fibrillas, que a su vez se empaquetan en capas o lamelas. Estas fibrillas son más finas que las de otros tejidos conectivos y esto es importante para mantener la transparencia de la córnea. Las capas más profundas están más estrictamente organizadas que las superficiales (DelMonte & Kim, 2011). La matriz extracelular del estroma está compuesta también por colágeno (tipo I, III, V, VI) y glucosaminoglicanos (keratán sulfato, condroitín sulfato y dermatán sulfato). El glucosaminoglicano más abundante es el keratán sulfato. Los queratocitos son las células más abundantes del estroma y están implicadas en mantener el medio de la matriz extracelular, sintetizando moléculas de colágeno y glucosaminoglicanos, junto con metaloproteinasas de matriz (MMPs) que son importantes para mantener la homeostasis estromal.

Entre el estroma y el endotelio corneal se encuentra la membrana de Descemet, una estructura de 7 μm , compuesta de colágeno tipo IV y laminina. Las células del endotelio secretan continuamente los componentes para mantener esta membrana elástica.

Endotelio.

El endotelio corneal es una estructura de capa única con un espesor de 5 μm . Sus células son hexagonales y metabólicamente muy activas, ya que tienen una bomba endotelial que, trabajando de manera continua, regula el contenido de agua y mantiene el estroma corneal relativamente deshidratado. Estas células están comunicadas por uniones “gap junctions” y “tight junctions”, y presentan una densidad alta de bombas de Na^+ y K^+ ATPasa para el transporte iónico desde el estroma al humor acuoso.

La densidad de las células endoteliales varía a lo largo de la vida, descendiendo una media del 0.6% al año (Bourne et al., 1997) ya que no regeneran.



Figura 1.2. Sección histológica de la córnea humana mostrando las capas celulares y la matriz extracelular (azul de toluidina x25). (Adaptado de Dawson et al. *Adler's Physiology of the Eye*, 2011).

1.1.2 Película lagrimal precorneal.

El epitelio corneal está recubierto por la película lagrimal. Su función es la de lubricar e hidratar la superficie ocular. También es una fuente de oxígeno, glucosa, inmunoglobulinas, lisozimas, lactoferrina y α y β -defensinas. Tradicionalmente se ha descrito que la película lagrimal está compuesta por tres capas diferentes. La capa más superficial está compuesta fundamentalmente por secreciones oleosas de las glándulas de Meibomio. Debido a que los lípidos son menos densos que el agua, estas secreciones flotan hacia la parte superior de la película lagrimal para formar una superficie lisa, homogénea desde el punto de vista refractivo. Esta capa lipídica también proporciona una importante barrera contra la evaporación del contenido acuoso de la película lagrimal. Inmediatamente después se encuentra una capa acuosa que está producida principalmente por la secreción de la glándula lagrimal principal, localizada en humanos en la zona lateral superior de la órbita, aunque también contribuyen las glándulas lagrimales accesorias. La capa de mucina es la más interna y está compuesta por sustancias mucoides producidas principalmente por las células caliciformes de la conjuntiva, aunque también contribuyen las células epiteliales de la córnea y de la conjuntiva (Gipson IK, 2007).

1.1.3 Inervación sensorial

La inervación sensorial de la córnea corre a cargo de los axones periféricos de neuronas sensoriales primarias localizadas en el ganglio trigémino. Los nervios sensoriales entran al globo ocular principalmente a través de los nervios ciliares y llegan a todos los tejidos oculares a excepción del cristalino y la retina. La inervación sensorial es particularmente rica en la córnea, aunque todos los tejidos del segmento anterior del ojo tienen una densa inervación sensorial. Aunque comparten semejanzas morfológicas, por ejemplo acabar todas ellas como terminaciones libre indiferenciadas entre las células del epitelio corneal, los axones que inervan la córnea son funcionalmente heterogéneos e incluyen unidades nociceptoras y termorreceptoras de frío, que responden a gran variedad de estímulos físicos y químicos. Los axones centrales de las neuronas sensoriales primarias que inervan la córnea hacen sinapsis con unas neuronas de 2º orden localizadas, principalmente, en el núcleo caudal del trigémino en la base del tronco encéfalo. A su vez, los axones de estas neuronas secundarias viajan hasta el núcleo ventral posteromedial del lado contralateral, donde hacen sinapsis con neuronas sensoriales de 3º orden cuyos axones viajan a la corteza somatosensorial primaria, entre otros lugares superiores (Belmonte, Tervo and Gallar, 2011, Adler's Physiology of the Eye).

El dolor es la principal sensación desencadenada por la estimulación de las terminaciones sensoriales corneales, aunque desde la conjuntiva se pueden evocar también sensaciones táctiles y térmicas. Por otra parte, puede evocarse sensación de frío (frescor) por enfriamiento leve de la superficie corneal, si bien generalmente asociado a un componente de irritación o desagrado (Acosta, Belmonte, & Gallar, 2001; Acosta, Tan, Belmonte, & Gallar, 2001).

1.1.3.1 Inervación periférica.

La inervación sensorial del ojo la proporcionan neuronas sensoriales primarias que en general son de pequeño o mediano tamaño, agrupadas en la región oftálmica (medial) del ganglio trigémino (TG) ipsilateral. La mayoría de las neuronas sensoriales oculares inervan la córnea y representan alrededor del 1.5% del número total de

neuronas del TG (Felipe et al, 1999). Los axones de estas neuronas trigeminales son pseudounipolares dividiéndose en una rama periférica que proyecta a los tejidos diana periféricos y una rama central que entra al tronco encéfalo para alcanzar el complejo de los núcleos trigeminales.

Las neuronas del trigémino que inervan el globo ocular contienen diversos neuropéptidos, incluyendo CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina, presente en alrededor del 50% de las neuronas corneales), la sustancia P (presente en cerca del 20%), colecistoquinina (CCK), gastrina, somatostatina, péptidos opioides, péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), galanina y neuropéptido Y (NPY), como también la sintasa de óxido nítrico (nNOS) (Felipe et al., 1999; Müller et al., 2003; Tervo et al, 1982).

La rama axonal periférica de la mayoría de las neuronas sensoriales oculares en humanos sale del TG a través de la división oftálmica del V par craneal, que atraviesa la fisura orbital superior y se ramifica en los nervios nasociliar, frontal y lacrimal. El nervio nasociliar, a su vez, da varias ramas sensoriales: 1) dos nervios ciliares largos que alcanzan el globo ocular y atraviesan la esclera, constituyendo el mayor output sensorial del ojo; 2) el nervio infracocular que inerva la parte media de los párpados, nariz y saco lagrimal; 3) los nervios nasales externos; y 4) una rama que comunica con el ganglio ciliar. El ganglio ciliar es un ganglio parasimpático localizado dentro de la órbita, adyacente al nervio óptico, que proyecta 5-10 nervios ciliares cortos que contienen fibras postganglionares parasimpáticas, axones simpáticos postganglionares originados en el ganglio cervical superior y las fibras nerviosas sensoriales trigeminales que llegan desde la rama comunicante del nervio nasociliar, atravesando el ganglio ciliar, hasta el ojo. Estos nervios ciliares cortos son mixtos y entran al globo ocular alrededor del nervio óptico. La segunda rama del nervio oftálmico es el nervio frontal, el cual se bifurca en el nervio supraorbitario, para inervar el párpado superior y el seno frontal, y el nervio supratroclear, que proporciona inervación a la frente y al párpado superior. Finalmente la tercera rama del nervio oftálmico, el nervio lacrimal, inerva la glándula lagrimal y algunas áreas de la conjuntiva (**Figura 1.3**).

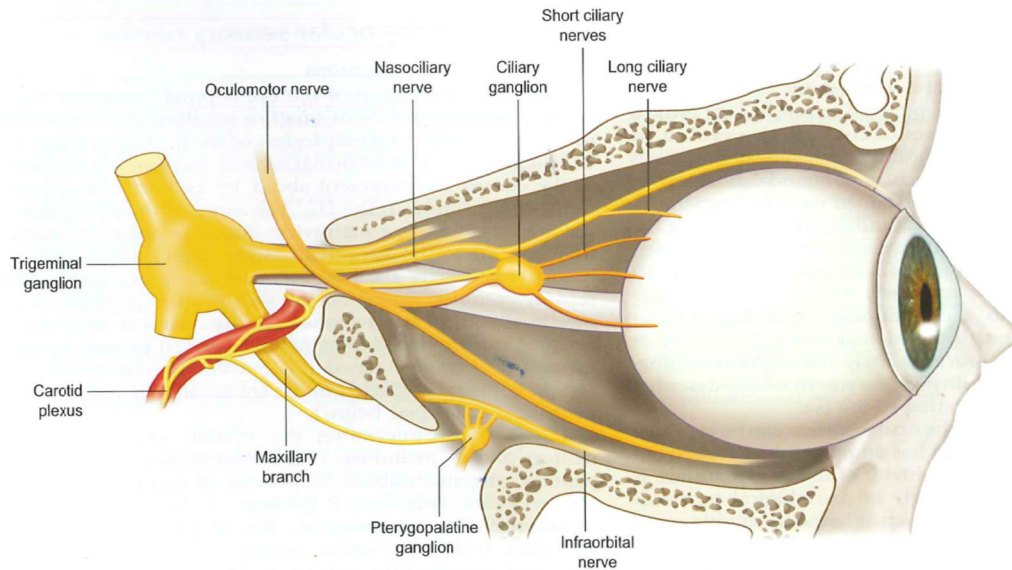


Figura 1.3. Inervación del ojo. Vista medial de la órbita mostrando los nervios autonómicos y sensoriales dirigidos al ojo. La rama oftálmica del ganglio trigémino da el nervio nasociliar que envía nervios ciliares cortos y largos al globo ocular, los últimos desde del ganglio ciliar. Los nervios frontales y lacrimales no están representados en este dibujo. La rama trigémino maxilar origina el nervio infraorbitario que inerva parte del ojo y del párpado inferior. Fibras simpáticas desde el ganglio cervical superior, viajando en el plexo carotídeo, y ramas parasimpáticas del ganglio ciliar se unen a los nervios ciliares cortos (De Belmonte et al. Adler's Physiology of the Eye, 2011).

Una pequeña proporción de los nervios que recogen la sensibilidad del ojo y los tejidos periorbitales, principalmente de la conjuntiva y la piel del párpado inferior, viaja por el nervio infraorbitario, una rama del nervio maxilar, la segunda mayor rama del V par craneal.

Los axones periféricos de estas neuronas del trigémino recogen información sensorial de epitelios, tejido conectivo y vasos sanguíneos de los párpados, así como de la órbita, los músculos extraoculares, el cuerpo ciliar, coroides, esclera, córnea y conjuntiva, siendo la retina y el cristalino los únicos tejidos oculares que no reciben inervación sensorial directa del ganglio trigémino (Belmonte, Tervo and Gallar, 2011, Adler's Physiology of the Eye).

Los nervios ciliares cortos y largos penetran al globo ocular por su parte posterior, formando un anillo alrededor del nervio óptico. Desde allí, los fascículos nerviosos ciliares viajan hacia el polo anterior por el espacio supracoroidal, dando algunas ramas colaterales que proporcionan una inervación dispersa a la parte posterior del ojo. Estos filamentos nerviosos que entran a la coroides están compuestos de axones

sensoriales, simpáticos y parasimpáticos, y se ramifican formando una extensa red. (Lütjen-Drecoll, 2006).

Durante su trayectoria hacia la córnea, los fascículos nerviosos se ramifican y entrecruzan repetidamente. Si bien algunas fibras nerviosas inervan la esclera, la mayoría de los filamentos nerviosos continúan para inervar el cuerpo ciliar, el iris y la córnea. La mayoría de estas fibras nerviosas finalmente forman una serie de redes nerviosas circulares en el limbo esclero-corneal, el plexo limbal o pericorneal y el plexo iridiano. (Belmonte, Tervo and Gallar, 2011, Adler's Physiology of the Eye). El plexo circular ubicado en la raíz del iris origina la inervación iridiana, tanto sensorial como simpática y parasimpática. Por su parte, los nervios del plexo limbal proporcionan inervación sensorial y autónoma de los vasos limbales, así como a la red trabecular y, finalmente, forman un número variable de troncos nerviosos que surgiendo desde el plexo limbal entran al estoma corneal, formando los nervios estromales corneales. A pesar de su pequeño tamaño, la córnea recibe una porción significativa de la inervación sensorial del trigémino, presentando una densidad nerviosa que está estimada en 300-400 veces superior a la pulpa dental o de estructuras densamente inervadas como la yema de los dedos (Rózsa & Beuerman, 1982; Müller et al., 2003).

La mayoría de los nervios dirigidos al ojo, están compuestos por fibras nerviosas finas amielínicas a menudo incompletamente rodeadas de células de Schwann, mientras que el 30% presenta bandas de mielina. Todos se ramifican extensivamente e, independientemente de que se trate de fibras mielínicas o amielínicas, todas ellas pierden la mielina una vez que penetran en la córnea y acaban como terminaciones nerviosas libres, a veces mostrando pequeños engrosamientos o varicosidades (Müller et al., 2003).

La inervación corneal está organizada anatómicamente en cuatro niveles desde los haces nerviosos estromales que penetran desde el plexo limbal hasta las terminaciones nerviosas intraepiteliales (**Figura 1.4**).

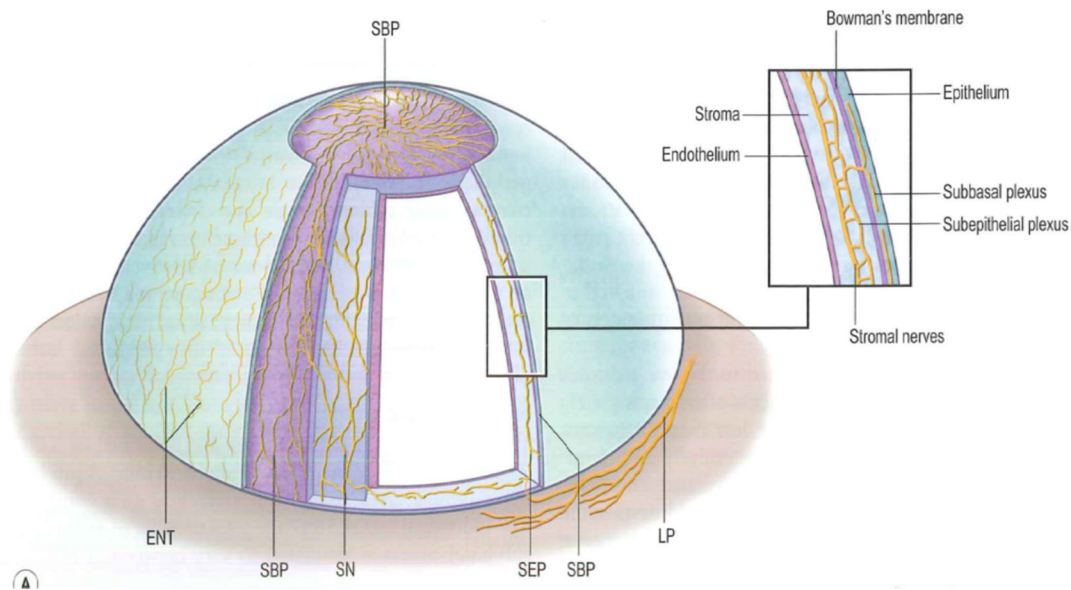


Figura 1.4 Esquema de la Inervación corneal. Desde el plexo limbal (LP) los troncos nerviosos estromales (SN) penetran al estroma radialmente y se ramifican formando el plexo subepitelial (SEP). Ramas de este plexo ascienden hacia el epitelio, atravesando la membrana de Bowman y forman el plexo subbasal (SBP) entre la capa del epitelio basal y su lámina basal, donde las ramas nerviosas corren en paralelo como cadenas nerviosas de las que surgen las terminaciones nerviosas intraepiteliales (ENT). (Tomado de Belmonte et al. Adler's Physiology of the Eye 2011).

La anatomía de los troncos nerviosos que entran radialmente al estroma corneal es bastante similar entre mamíferos, variando sólo en su número (6-8 en rata, 15-40 en gato o perro, cerca de 60 en humano) (Zander & Weddell, 1951; Müller et al, 1996). Los nervios estromales se ramifican inmediatamente después de entrar en la córnea y corren por el estroma como fascículos cubiertos por una lámina basal y células de Schawnn. Los axones miélinicos incluidos en los nervios estromales pierden su envoltura de mielina tras haber penetrado al estroma, lo que contribuye a la transparencia de la córnea. Las ramas distales de esta arborización se entrecruzan extensivamente formando el plexo nervioso estromal anterior. Por el contrario, la parte posterior del estroma corneal y el endotelio corneal están prácticamente desprovistos de fibras nerviosas sensoriales. A pesar de su considerable ramificación, la mayoría de los haces nerviosos estromales atraviesan el estroma hasta alcanzar el epitelio corneal y aparentemente no proporcionan inervación funcional al tejido estromal.

En humanos y mamíferos superiores, la capa más superficial del plexo estromal anterior, localizada en una banda estrecha del estroma justo por debajo de la capa de Bowman, es especialmente densa y se conoce como plexo nervioso subepitelial, cuya densidad nerviosa generalmente es mayor en la córnea periférica que en la central. Se

distinguen anatómicamente dos tipos de haces nerviosos. Uno forma una red trabecular de axones individuales y fascículos nerviosos finos localizados justo por debajo de la membrana de Bowman sin penetrar en el epitelio. El segundo tipo consiste en 400-500 haces curvilíneos de medio tamaño que penetran la membrana de Bowman, se curvan en un ángulo de 90° y se dividen, cada uno en 2-20 fascículos nerviosos finos que continúan en el epitelio corneal constituyendo el plexo nervioso subbasal. (Belmonte, Tervo and Gallar, 2011).

El plexo nervioso subbasal en humanos está formado por 5000-7000 fascículos nerviosos que ocupan un área de apenas 90 mm². Desde el punto de penetración, cada haz nervioso subbasal da varios fascículos laterales, cada uno conteniendo 3-7 axones individuales, que viajan en paralelo entre sí, aunque con anastomosis ocasionales. Considerando las cifras anteriores, se estima que el número total de axones en el plexo subbasal humano pueda variar entre 20000 y 44000 (Müller et al., 2003).

Los fascículos nerviosos subbasales pueden viajar hasta 6 mm entre las células basales del epitelio y su lámina basal, en paralelo unos a otros. La disposición de un haz nervioso estromal ramificándose en múltiples fascículos paralelos constituye una estructura nerviosa única, denominada en base a su aspecto de traílla múltiple (“subbasal leash”). Cada una de estas traíllas está constituida por hasta 40 fibras nerviosas individuales amielínicas, a veces lisas y otras con engrosamientos, de un diámetro variable (0.05-2.5µm), presumiblemente constituidas por un número variable de axones. Las fibras nerviosas de traíllas adyacentes se interconectan de forma repetida formando un plexo nervioso homogéneo que, cerca del centro del ápex corneal forma un patrón en espiral de fibras nerviosas, cuyo centro se ha llamado “vórtex”. El plexo subbasal es visible mediante técnicas de microscopía confocal *in vivo*, lo que permite su estudio y seguimiento en la práctica clínica.

Desde los nervios subbasales que corren en horizontal por el epitelio basal, algunas fibras aisladas se separan en un ángulo de 90°, como axones terminales finos, cortos y con engrosamientos ascendiendo entre las células epiteliales, a menudo con ramificaciones, hasta llegar a las capas más superficiales del epitelio corneal (Müller et al., 2003; Marfurt et al., 2010) (**Figura 1.5**).

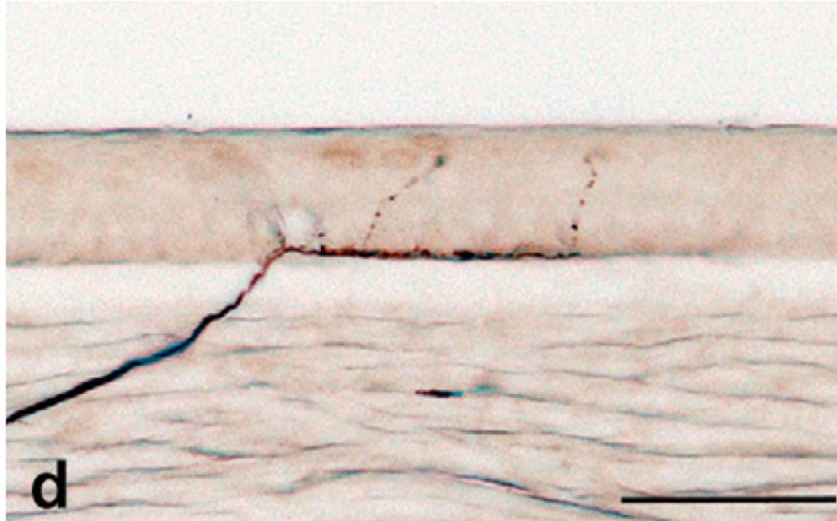


Figura 1.5. Recorrido de una fibra nerviosa en el estroma y el epitelio corneal humano. Desde el estroma, la fibra atraviesa la capa de Bowman (más clara), formando parte del plexo subbasal antes de avanzar hacia las capas más superficiales del epitelio corneal (Tomado de Marfurt et al., 2010).

Las fibras intraepiteliales acaban como terminaciones libres, apareciendo unas expansiones bulbosas prominentes que parecen homogéneas morfológicamente cuando se visualizan mediante microscopia óptica o electrónica, aunque el marcaje inmunohistoquímico revela diferencias entre ellas en cuanto a la expresión de neuropéptidos y otros neurotransmisores, lo que sugiere una heterogeneidad funcional (Müller et al., 2003). A nivel ultraestructural, las terminaciones nerviosas corneales contienen abundantes vesículas claras pequeñas, quizás llenas de aminoácidos excitatorios, y vesículas grandes densas que contienen neuropéptidos como el CGRP, la sustancia P y otros neuropéptidos. También contienen mitocondrias, partículas de glucógeno, neurotúbulos y neurofilamentos (Tervo et al., 1982; Müller et al., 2003). Las terminaciones nerviosas están localizadas a través de todas las capas del epitelio corneal, extendiéndose hasta unas pocas micras de la superficie y siendo especialmente numerosas en las capas de las células aladas y basales. La densidad de inervación del epitelio corneal es probablemente la más alta de cualquiera de los epitelios superficiales. Aunque el número real de terminaciones nerviosas corneales sigue siendo objeto de especulación, considerando que de cada fibra subbasal surgen, al menos, 10-20 terminaciones intraepiteliales, es razonable especular que la córnea central humana contiene aproximadamente 3500-7000 terminaciones/mm². Esta rica inervación proporciona a la córnea una gran sensibilidad, habiéndose propuesto que el daño a una única célula epitelial podría ser suficiente para activar un número suficiente de

terminaciones nociceptivas y desencadenar una sensación de dolor (Marfurt CF, 2000; Marfurt et al., 2010). La densidad de terminaciones nerviosas intraepiteliales y, por consiguiente, la sensibilidad corneal, es más alta en la córnea central y desciende progresivamente hacia la periferia corneal (Marfurt CF, 2000; Dvorscak & Marfurt, 2008). De forma similar la sensibilidad corneal y la densidad nerviosa descienden progresivamente en función de la edad (Acosta et al., 2006; Dvorscak & Marfurt, 2008) y en diversas patologías oculares como el ojo seco o sistémicas, como la diabetes (De Cillà et al., 2009).

Desde que un axón sensorial penetra en el estroma por el limbo esclero-corneal sufre numerosas ramificaciones y, como resultado, el campo receptor de esa neurona puede variar en tamaño desde menos de 1 mm² hasta 50 mm², y puede cubrir hasta el 25% de la superficie corneal e, incluso, parte de la esclera o la conjuntiva adyacentes. La extensa ramificación también explica el solapamiento significativo de los campos receptivos encontrados en los estudios electrofisiológicos de las fibras nerviosas corneales (Belmonte et al., 1991; Gallar et al., 1993; Acosta, Tan et al., 2001).

Las terminaciones nerviosas sensoriales, particularmente en el epitelio corneal, no son estructuras estáticas, sino que están sujetas a una continua remodelación (Harris & Purves, 1989; Iñigo-Portugués et al., 2017). Igualmente, los nervios sensoriales oculares dañados por lesiones accidentales o quirúrgicas, o debido a procesos patológicos, experimentan procesos de regeneración y también pueden experimentar cambios duraderos en su morfología y excitabilidad, originando disestesias oculares o dolor neuropático ocular (Rosenthal et al., 2009).

1.1.3.2 Vías centrales

La información somatosensorial que proviene del ojo es llevada por las neuronas del TG ipsilateral a la porción ventral del complejo nuclear trigeminal del tronco del encéfalo (en inglés, TBNC), donde se transmite a neuronas oculares sensoriales de segundo orden localizadas principalmente en la zona intermedia entre los subnúcleos interpolar y caudal (Vi/Vc), en la lámina I-II del subnúcleo caudal y la médula espinal cervical superior (Vc/C1), y en la formación reticular lateral bulbar adyacente (Marfurt, 1981; Martinez & Belmonte, 1996; Meng et al., 2000). Adicionalmente, unas pocas

neuronas trigeminales que inervan los tejidos oculares y perioculares proyectan al núcleo principal del TBNC (Belmonte et al., 2017). Las neuronas oculares de segundo orden localizadas en el área Vi/Vc proyectan a diferentes lugares en el sistema nervioso central incluyendo otras áreas del tronco-encéfalo como los núcleos motores salivar superior/facial, del tracto solitario y de Edinger-Westphal, aunque la mayoría de ellas envían sus axones al tálamo posterior contralateral, núcleo posteromedial ventral, así como a la corteza insular (Pellegrini et al., 1995; Tóth et al., 1999; Hirata et al., 2004), participando esta información en el procesamiento de los aspectos sensorio-discriminativos del estímulo. Estas neuronas talámicas proyectan a su vez a áreas corticales somatosensoriales primarias (SI) y secundarias (SII) del mismo hemisferio, completándose el proceso que generará la sensación y percepción de los estímulos. Además, las proyecciones desde el TBNC a otros centros superiores como la sustancia gris periacueductal, el hipotálamo lateral y posterior y la amígdala contribuyen a los aspectos afectivos y moduladores de la sensación de dolor ocular, que se completa con proyecciones a la ínsula y al córtex cingulado y prefrontal, que proporcionan el sustrato neural para los componentes afectivos y cognitivos de las sensaciones evocadas por la estimulación del ojo.

1.1.3.3 Caracterización funcional de la inervación corneal

La inervación sensorial de la córnea es la responsable de las sensaciones evocables desde dicha estructura y de la iniciación de reflejos protectores del globo ocular (parpadeo y lagrimación). Igualmente tiene un papel trófico importante que permite el mantenimiento de la integridad del tejido corneal, principalmente el epitelio, y su regeneración tras una lesión.

Al igual que en otros tejidos, en la córnea se han identificado terminales periféricas de diferentes tipos de neuronas sensoriales, clasificadas funcionalmente según responden a diferentes modalidades de estímulos en: a) mecano-nociceptores, b) nociceptores polimodales y c) termorreceptores de frío (**Figura 1.6**).

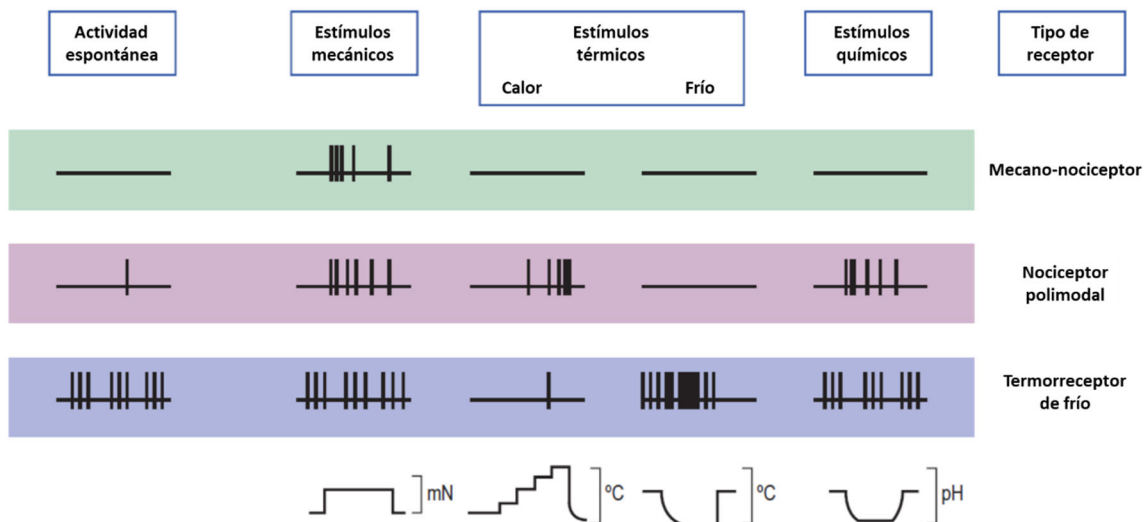


Figura 1.6. Tipos funcionales de receptores sensoriales corneales con su patrón de disparo en ausencia de estimulación (actividad espontánea) y en respuesta a estímulos de diferente naturaleza (Adaptado de Belmonte et al., Adler's Physiology of the Eye 2011).

La capacidad de respuesta de las terminales sensoriales a estímulos de diferente cualidad viene proporcionada por la expresión en dicha neurona de diferentes canales de membrana (ver apartado 1.2. y **Figura 1.7**). La información sensorial procedente de estos distintos tipos de fibras sensoriales es utilizada por el sistema nervioso central para regular funciones protectoras como el parpadeo y la lagrimación, habiéndose demostrado que la activación de los nociceptores polimodales de la córnea es la responsable de la lagrimación refleja (Acosta et al., 2006) y que la actividad tónica de los termorreceptores de frío contribuye al mantenimiento de la lagrimación basal (Parra et al., 2010) y a la regulación de la frecuencia de parpadeo (Acosta et al., 1999; Quallo et al., 2015). A su vez, existen evidencias de que la activación selectiva de cada uno de estos tipos de receptores sensoriales da lugar a sensaciones con diferentes cualidades (**Figura 1.7**) (Acosta, Belmonte & Gallar, 2001).

Todas aquellas patologías que afectan a la inervación sensorial de la superficie ocular, tanto las propias de dicho tejido como algunas enfermedades sistémicas, provocan alteraciones en su papel sensorial, es decir, en las sensaciones evocadas en la superficie del ojo, y también afectan a la activación de reflejos protectores como la lagrimación y el parpadeo. Asimismo, las alteraciones de la inervación corneal provocan cambios sustanciales en su papel trófico, habiendo numerosas evidencias de la alteración del trofismo corneal y de la capacidad de reparación de dicho tejido consecutiva a su denervación sensorial (Belmonte, Acosta, & Gallar, 2004). Nuestro

grupo de investigación ha contribuido a demostrar las alteraciones en la sensibilidad corneal en pacientes con varias de esas patologías como el herpes simple corneal (Gallar et al., 2010), la diabetes (Neira-Zalentein et al., 2011), la enfermedad de ojo seco (Bourcier et al., 2005; Benítez-del-Castillo et al., 2007), enfermedades del desarrollo como la córnea plana (Vesaluoma et al., 2000), o la amiloidosis familiar (Rosenberg et al., 2001), así como tras la cirugía refractiva (Gallar et al., 2004).

a) Mecano-nociceptores

Representan el 15-20% de las fibras nerviosas que inervan la córnea y se caracterizan por responder exclusivamente a fuerzas mecánicas de intensidad moderada-alta (rango lesivo o potencialmente lesivo para el epitelio corneal). Son axones débilmente mielinizados y, consecuentemente, tienen velocidades de conducción en el rango A δ . Estas fibras sensoriales tienen campos receptivos circulares u ovalados que cubren alrededor del 10% de la superficie corneal (Belmonte et al., 1991; Belmonte et al., 1997; Belmonte, Aracil et al., 2004). La fuerza requerida para activarlos, es decir, su umbral mecánico, está en torno a 0.6mN (unas 10 veces menor que la fuerza que se requiere para activar los mecano-nociceptores de la piel). Los mecano-nociceptores sólo disparan algunos impulsos nerviosos en respuesta a un estímulo mecánico, breve o mantenido, por lo que tienen una capacidad limitada para codificar la intensidad y duración del estímulo (Belmonte et al., 1991; Belmonte et al., 1997; Belmonte, Aracil et al., 2004).

b) Nociceptores polimodales

Representan aproximadamente dos tercios (66%) de las fibras sensoriales que inervan la córnea. Son activados por estímulos físicos o químicos de intensidad nociva o cercana al rango nocivo, incluyendo fuerzas mecánicas, calor, frío intenso, irritantes químicos exógenos y una larga variedad de moléculas endógenas, como las liberadas durante la inflamación o la lesión tisular (Belmonte & Giraldez, 1981; Belmonte et al., 1991; Gallar et al., 1993). La mayoría de estas fibras son amielínicas y sus campos receptores son redondos u ovals y normalmente grandes, ya que pueden cubrir hasta la cuarta parte de la superficie de la córnea e incluso abarcar algunos milímetros de la esclera o la conjuntiva adyacentes.

Los nociceptores polimodales corneales responden a la estimulación con una descarga continua e irregular de impulsos nerviosos cuya frecuencia es proporcional a la magnitud del estímulo, codificando así su intensidad y su duración. Ocasionalmente, la descarga de impulsos sobrepasa la duración del estímulo que la provocó, fenómeno conocido como post-descarga. Como se ha mencionado, los nociceptores polimodales responden a estímulos mecánicos y al calor (temperaturas por encima de 39-40°C) (Belmonte & Giraldez, 1981; Belmonte et al., 1991; Gallar et al., 1993; Acosta, Belmonte & Gallar, 2001). Al ser también excitados por muchos agentes químicos como soluciones ácidas ($\text{pH} < 6.5$) (Belmonte et al., 1991; Gallar et al., 1993), en nuestro grupo se propuso el empleo de un chorro de gas conteniendo concentraciones crecientes de CO_2 , que producirá protones al interaccionar con el agua de la película lagrimal o de la solución que baña el ojo, como un estímulo controlado para activar los nociceptores polimodales (Chen et al., 1995; Acosta, Tan, et al., 2001). Asimismo, los nociceptores polimodales se activan en respuesta a un gran número de agentes químicos endógenos (mediadores inflamatorios). Es más, la estimulación repetida o el daño tisular, que inducirán la liberación de mediadores de la inflamación, producen una modificación de la actividad espontánea y de la respuesta de los nociceptores polimodales a la inflamación, un fenómeno denominado **sensibilización** que es la base del dolor mantenido, la hiperalgesia y, ocasionalmente, la alodinia que se producen durante los procesos inflamatorios. A su vez, los nociceptores polimodales también contribuyen a la inflamación local ya que, al ser excitados, liberan localmente los neuropéptidos almacenados en sus terminaciones periféricas (inflamación neurogénica).

c) Termorreceptores de frío

Los termorreceptores de frío representan el 10-15% de las fibras nerviosas corneales. Se caracterizan por presentar una descarga espontánea de impulsos a la temperatura basal de la superficie corneal (alrededor de 34°C) y un aumento de la frecuencia de disparo en respuesta al descenso de temperatura, así como por una disminución de la frecuencia e incluso un silencio transitorio al elevar la temperatura (Tanelian & Beuerman, 1984; Gallar et al., 1993; Brock et al., 1998). Las fibras receptoras de frío que inervan la córnea tienen generalmente campos receptores pequeños (alrededor de 1mm de diámetro) localizados por toda la superficie corneal, aunque son más abundantes en la córnea periférica. Los termorreceptores sensibles a

frío de la córnea aumentan su frecuencia de disparo tan rápido como la temperatura de la córnea cae, lo que ocurre por ejemplo al aplicar intencionalmente un estímulo frío sobre la córnea (gotas de una solución fresca, un soplo de aire, etc.) pero también ocurre espontáneamente como resultado de la evaporación de la película lagrimal precorneal entre parpadeos. En mamíferos, las fibras sensibles a frío son capaces de detectar y codificar pequeños (0.1°C o menos) y grandes (descensos de hasta 20°C) cambios de la temperatura (Gallar et al., 1993). Estas reducciones de temperatura en la córnea se perciben como enfriamiento inocuo (Acosta, Belmonte & Gallar, 2001), aunque con un componente de desagrado variable.

En base a la frecuencia de su actividad espontánea a temperatura basal y del umbral de respuesta durante el enfriamiento, se han descrito dos tipos funcionales de termorreceptores de frío corneales (Gallar et al., 1993; González-González et al., 2017). Un primer tipo de termorreceptores de frío corneales está asociado generalmente a fibras con velocidades de conducción en el rango C, es decir, amielínicas (Gallar et al., 1993) y se caracteriza por presentar un disparo espontáneo de baja frecuencia y un umbral de respuesta al enfriamiento relativamente alto, por lo que en lo sucesivo los denominaremos con las siglas LB-HT derivadas de su definición en inglés (Low Background- High Threshold). El segundo tipo se asocia a fibras con velocidades de conducción en el rango de las fibras amielínicas y el de las débilmente mielinizadas, C y A δ (Belmonte et al., 1991; Gallar et al., 1993), y se caracteriza por disparar espontáneamente a una frecuencia alta (entre 3 y 8 imp/s, dependiendo de la especie) y tener un bajo umbral de respuesta al enfriamiento, por lo que en lo sucesivo los denominaremos con las siglas HB-LT derivadas de su definición en inglés (High Background- Low Threshold).

Una parte de los termorreceptores de frío aumentan su frecuencia de disparo durante el calentamiento intenso (Acosta et al., 2013; 2014), un fenómeno conocido como respuesta paradójica al calor cuyo mecanismo sigue sin conocerse. Por el contrario, está establecido que la sensibilidad al frío de estas fibras depende de forma crítica de la expresión de canales iónicos TRPM8 (ver apartado 1.2. y **Figura 1.7**) (Parra et al., 2010). Recientemente se ha descrito la existencia de dos niveles de expresión de TRPM8 tanto en las fibras nerviosas periféricas que inervan la córnea como en el soma de las neuronas termorreceptoras de frío del ganglio trigémino, empleando un ratón que expresa una proteína fluorescente asociada al canal TRPM8.

Aproximadamente la mitad de los nervios corneales que contienen TRPM8 presentan una intensa fluorescencia y acaban como terminaciones intraepiteliales complejas con una actividad basal elevada a 34°C y un bajo umbral (HB-LT) y robusta respuesta al enfriamiento. La otra mitad de los axones TRPM8+ de la córnea tienen una débil fluorescencia y terminaciones nerviosas poco ramificadas, y presentan una actividad basal de baja frecuencia que se incrementa moderadamente y con umbral más alto en respuesta al enfriamiento (LB-HT) (Alcalde et al., 2018).

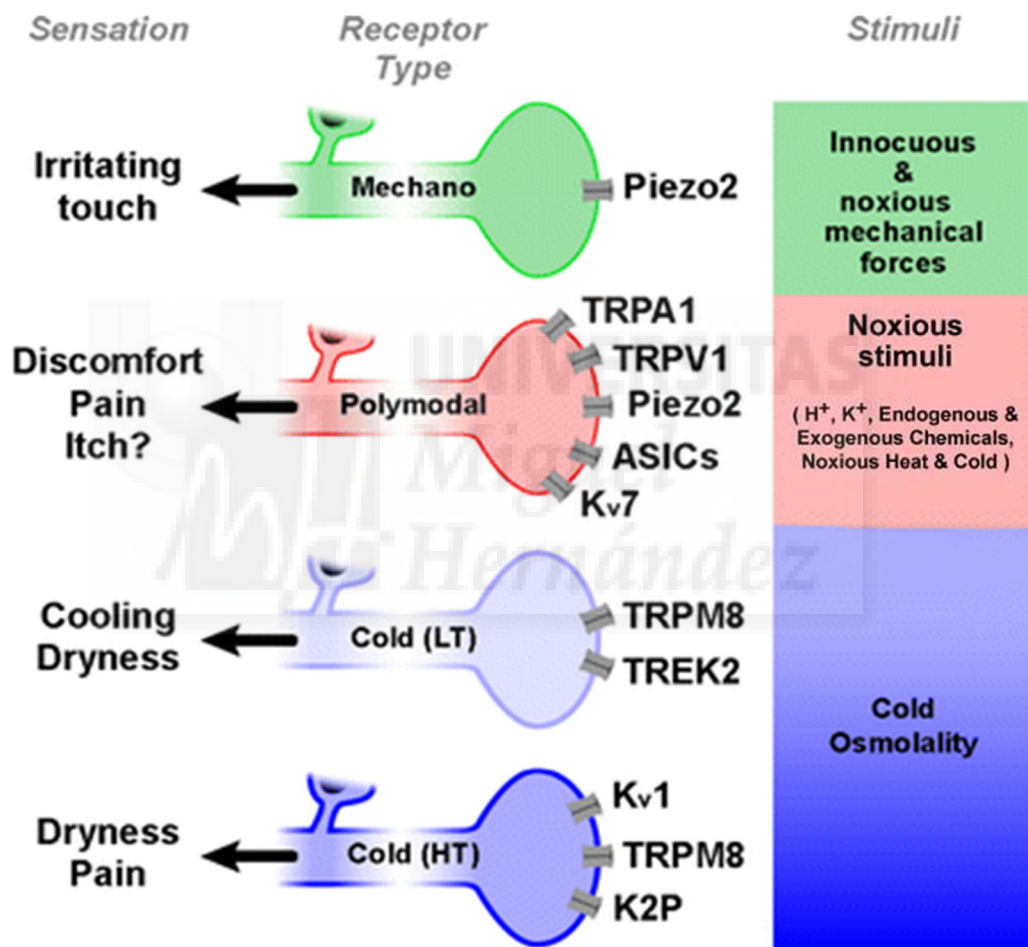


Figura 1.7. Representación esquemática de los tipos funcionales de neuronas sensoriales que inervan la superficie ocular y los principales canales transductores expresados en sus terminaciones nerviosas periféricas. En la parte de la derecha se representa el estímulo específico que activa cada clase neuronal. En la parte de la izquierda se indica la modalidad de la sensación evocada por cada clase neuronal. (Adaptada de Belmonte et al., 2015).

1.2 CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA TRANSDUCCIÓN Y LA CODIFICACIÓN SENSORIAL.

Las terminaciones nerviosas sensoriales que inervan la superficie del ojo expresan diferentes proteínas de membrana y/o canales iónicos que les confieren sensibilidad a estímulos de diferente naturaleza y que les permiten propagar la señal nerviosa hacia los centros superiores del sistema nervioso central, algunos de los cuales se resumen en la **Figura 1.7**.

Sin embargo, las neuronas sensoriales primarias y sus terminaciones periféricas poseen más tipos de canales iónicos que contribuyen a su función. En la **Figura 1.8** se representa esquemáticamente, a modo de ejemplo, la gran variedad de canales iónicos que puede expresar una neurona nociceptora. Por su parte, las neuronas termorreceptoras de frío están provistas de la mayoría de esos mismos canales, aunque también expresan TRPM8.

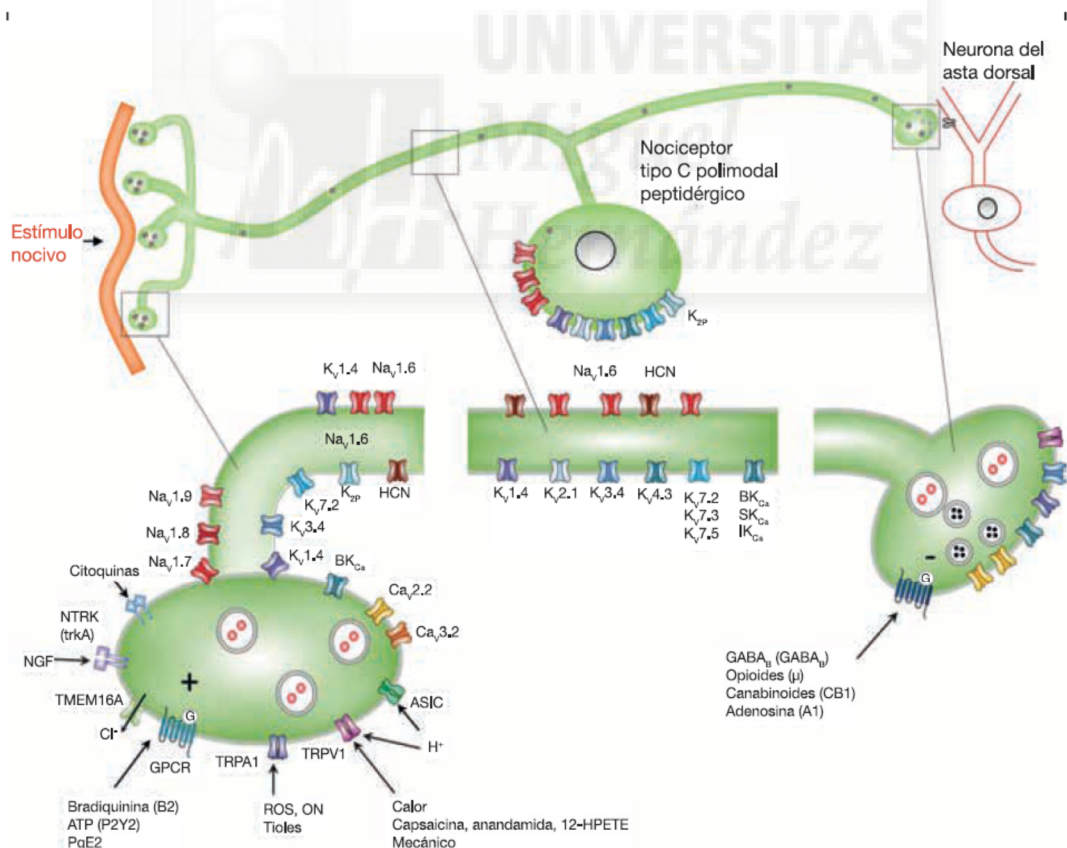


Figura 1.8. Representación de los diferentes canales iónicos y receptores de membrana expresados por un nociceptor de tipo C peptidérgico. Entre los diferentes marcadores, se expresan canales TRP (TRPV1 y TRPA1), canales catiónicos sensibles a ácido (ASIC), canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v 1.6, Na_v 1.7, Na_v 1.8) y canales activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN). (Tomada de Benarroch E., 2015)

A fin de centrar esta Introducción, la limitaremos a sólo algunos de los canales implicados, identificándolos en base a su función y distinguiendo entre canales que contribuyen a la transducción de los estímulos (canales de transducción) y los que contribuyen a codificar el estímulo modificando la excitabilidad neuronal (canales de codificación) (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Principales proteínas de membrana o canales iónicos implicadas en la transducción y codificación de los estímulos mecánicos, térmicos y químicos. TRPV1: Canal catiónico “Transient Receptor Potential Vanilloid” 1. TRPA1: “Transient Receptor Potential Ankyrin” 1. TRPM8: “Transient Receptor Potential Melastatin” 8. ASIC: “Acid -Sensing Ion Channels”. Na_v: Canales de sodio dependientes de voltaje. K_v: Canales de potasio dependientes de voltaje. Ca_v: Canales de calcio dependientes de voltaje. HCN: “Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel”.

Canales iónicos			
Transducción		Codificación	
TRPV1	ASICs	Na _v	HCN
TRPA1	K+ Dominio2P	K _v	
TRPM8	PIEZO2	Ca _v	

1.2.1 Canales implicados en la excitabilidad de las neuronas sensoriales

Las neuronas del ganglio trigémino, al igual que otras neuronas sensoriales, expresan a lo largo de sus axones diferentes proteínas de membrana que contribuyen a determinar la excitabilidad neuronal y son críticos en la modulación del patrón de disparo y de la frecuencia de los impulsos nerviosos generados en las terminaciones sensoriales periféricas en los tejidos oculares (Belmonte et al., 2009). Entre otros, se encuentran varios canales voltaje-dependientes de sodio (Na_v), de potasio (K_v) y de calcio (Ca_v), así como algunos canales regulados por ligando como los canales regulados por nucleótidos y activados por hiperpolarización (HCN). Las principales características de estos canales se resumen en la **Tabla 1.2**, al final de este apartado.

1.2.1.1 Canales de sodio dependientes de voltaje: Na_v

Los canales de sodio (Na⁺) dependientes de voltaje (Na_v o VGSCs) son proteínas transmembrana que permean iones Na⁺ hacia el citosol y juegan un papel central en la generación y propagación del potencial de acción (AP) en las células excitables

(neuronas, miocitos cardíacos y fibras musculares esqueléticas, entre otras) (Catterall et al., 2005; Catterall WA., 2012). Se activan, desactivan e inactivan en un ciclo, en respuesta a cambios acaecidos a lo largo del potencial de membrana. Tienen una estructura de 24 segmentos transmembrana organizados en 4 dominios formando un poro central. Debido a su amplia distribución en el cuerpo, los cambios en su expresión y funcionamiento, están implicados en gran variedad de enfermedades, entre las que se incluyen la epilepsia, las arritmias cardíacas y el dolor neuropático (Peters & Ruben, 2014).

La cinética de los canales Nav fue estudiada, de forma pionera, por Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar, siendo en 1952 los primeros en formular el modelo de generación del potencial de acción (Hodgkin & Huxley, 1952). La familia de los Nav comprende 10 genes SCN (1A-11A) que codifican las 9 isoformas, desde Nav1.1 hasta Nav1.9 (Goldin, 1999; Catterall et al., 2005), que se expresan de manera distinta en los diferentes tipos de tejido del organismo. Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 se expresan principalmente en el sistema nervioso central; Nav1.4 se encuentra principalmente en músculo esquelético; Nav1.5 es la principal variante en el músculo cardíaco, y Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9 se expresan en el sistema nervioso periférico y están asociados con la regulación autonómica y la sensación del dolor (Goldin, 1999; Catterall et al., 2005).

Los Nav eucarióticos están formados por un complejo de una subunidad α que forma el poro, y una o dos subunidades β (Catterall WA, 2012; Catterall & Zheng, 2015; Ahern et al., 2016). La subunidad α es suficiente para formar un canal funcional mientras que las subunidades β modulan la cinética y la dependencia del voltaje de la activación e inactivación del mismo (Isom et al., 1995; Qu et al., 1995). Hay nueve isoformas de subunidades α (1-9) y 4 tipos de subunidades β (Catterall et al., 2005).

Clásicamente los Nav se han clasificado en base a su sensibilidad a la tetrodotoxina (TTX), agrupándose en sensibles a TTX o TTX-S (Nav1.1–1.4, Nav1.6, y Nav1.7) o resistentes a TTX o TTX-R (Nav1.5, Nav1.8, and Nav1.9) (Catterall WA, 2012; Zhang et al., 2013; de Lera Ruiz & Kraus, 2015).

Se describen a continuación los principales canales Na_v que se expresan en el sistema nervioso periférico, que están implicados en las vías del dolor y que son de interés en nuestro estudio al ser, presumiblemente, los que se expresan en las terminaciones periféricas de las neuronas sensoriales oculares.

Na_v 1.7

El canal TTX-S Na_v 1.7 está principalmente expresado en nociceptores periféricos (de Lera Ruiz & Kraus, 2015; Waxman & Zamponi, 2014). La cinética de la activación e inactivación del canal es rápida y la inactivación del estado cerrado es lenta permitiendo que se amplifiquen las despolarizaciones subumbrales (Dib-Hajj et al., 2010). Na_v 1.7 está considerado como un canal umbral que produce las corrientes para el disparo de potenciales de acción (Cummins et al., 1998). Su patrón de expresión y su papel en la generación del potencial de acción han hecho de él una diana farmacológica para el desarrollo de compuestos para combatir el dolor (Dib-Hajj et al., 2010; Black & Waxman, 2013).

Se ha demostrado en humanos la implicación del canal Na_v 1.7, generalmente asociada a un aumento de expresión y/o función, en diferentes desórdenes dolorosos como el dolor paroxístico extremo (Fertleman et al., 2006), la neuropatía de fibra pequeña (de Lera Ruiz & Kraus, 2015) y la eritromelalgia hereditaria familiar (Yang et al., 2004). En estas patologías se han observado un aumento de las corrientes de Na^+ y unos umbrales de activación menores, lo que se traduce en una respuesta aumentada a estímulos supraumbrales (Dib-Hajj et al., 2013). Por el contrario, las mutaciones del canal que dan lugar a pérdida de su función se asocian con patologías como la insensibilidad congénita al dolor (Cox et al., 2006).

La manipulación genética de la expresión de Na_v 1.7 en modelos de roedores ha aportado más datos. Los ratones *knock-down* globales del canal mejoran el dolor en diabetes (Chattopadhyay et al., 2012) y la hiperalgesia térmica inducida por la administración del adyuvante completo de Freund (Yeomans et al., 2005). En neuronas del ganglio raquídeo (DRG) de ratones *knockout* condicionales para Na_v 1.7 se normalizó el dolor inflamatorio y la hiperalgesia térmica inducida por un estímulo de

calor en el rango lesivo, sin afectarse el dolor neuropático (Nassar et al., 2004; Dib-Hajj et al., 2013). Una población del 30% de neuronas de DRG de animales *knockout* para Nav 1.7 no generaban potenciales de acción (Vetter et al., 2017). Por todo esto, el canal Nav1.7 es una de las dianas terapéuticas más prometedoras para el desarrollo de analgésicos (de Lera Ruiz & Kraus, 2015; England & de Groot, 2009).

Nav 1.8

De forma análoga a Nav1.7, el canal TTX-R Nav1.8 está principalmente expresado en nociceptores del sistema nervioso periférico incluyendo neuronas de DRG de pequeño diámetro, neuronas del ganglio nodoso y del TG (Akopian et al., 1996). Muestra activación e inactivación más lenta que otros Nav (Akopian et al., 1996, 1999) y es responsable de la mayoría de la corriente de entrada de Na⁺ (*inward Na⁺ current*) contribuyendo a la fase de despolarización del potencial de acción y a su amplitud, ayudando al disparo repetitivo de las neuronas despolarizadas (Renganathan et al., 2001; Waxman & Zamponi, 2014). Nav1.8 también es responsable de las oscilaciones de membrana subumbrales (Choi & Waxman, 2011) que contribuyen de forma significativa a la hiperexcitabilidad tras la lesión en neuronas sensoriales.

Las mutaciones de ganancia de función en las que se sobre-expresa el canal Nav1.8 provocan hiperexcitabilidad y disparo espontáneo en neuronas. Se piensa que estas mutaciones son la causa etiológica de algunas neuropatías dolorosas periféricas observadas en humanos (Faber et al., 2012; J. Huang et al., 2013). Se ha confirmado la implicación de Nav1.8 en el dolor inflamatorio y neuropático y en el dolor causado por frío (alodinia al frío) gracias a modelos de animales *knockout* (Akopian et al., 1999; Zimmermann et al., 2007) y *knock-down* (Gold et al., 2003; Dong et al., 2007). En modelos neuropáticos e inflamatorios se ha comprobado que algunas moléculas con efecto inhibitorio potente y selectivo sobre Nav 1.8 tienen un efecto antinociceptivo (Jarvis et al., 2007; Payne et al., 2015). En general aunque la relación entre la expresión de Nav 1.8 y el dolor neuropático no es tan clara como en el caso del Nav 1.7, sus propiedades electrofisiológicas y su expresión en neuronas sensoriales primarias sugieren que el canal Nav 1.8 es crucial en la señalización nociceptiva.

Nav 1.9

El canal TTX-R Nav1.9 se expresa principalmente en las neuronas nociceptoras del plexo mientérico y en las neuronas nociceptoras de DRG y TG de pequeño diámetro (<30 μ m) (Dib-Hajj et al., 2002; Rugiero et al., 2003).

Nav1.9 produce una corriente persistente de Na⁺ de cinética de activación e inactivación lenta, que posiblemente no contribuye a la fase de generación del potencial de acción. Sin embargo Nav1.9 se activa a potenciales de membrana relativamente hiperpolarizados (-80 mV), lo cual probablemente aumenta y prolonga la respuesta a los estímulos despolarizantes, aumentando así la excitabilidad neuronal (Dib-Hajj et al., 2002; Fang et al., 2002).

Se ha comprobado su implicación en varios modelos de dolor, aunque el efecto de las mutaciones de ganancia o pérdida del canal no está totalmente esclarecido. Aunque se ha demostrado que las mutaciones de ganancia de función de Nav1.9 inducen dolor (Zhang et al., 2013; Huang et al., 2014; Han et al., 2015), otro estudio ha identificado una mutación específica de ganancia de función de este canal en pacientes insensibles al dolor (Leipold et al., 2013). Además se han encontrado niveles aumentados de mRNA y de proteína del canal Nav1.9 en neuronas de DRG de ratas con neuropatía diabética (Craner et al., 2002), aunque, curiosamente, en otros modelos de dolor neuropático, los niveles de mRNA y proteína del canal están reducidos (Cummins & Waxman, 1997; D. Dib-Hajj et al., 1998).

En la inflamación, Nav1.9 contribuye a la sensibilización periférica, resultando hipersensibles las terminaciones nociceptivas periféricas (Amaya et al., 2006). Además se ha demostrado que diferentes mediadores inflamatorios, como las interleucinas, sensibilizan el canal Nav1.9, contribuyendo a la generación de potenciales de acción y al aumento de frecuencia en respuesta a estímulos despolarizantes (Binshtok et al., 2008; Maingret et al., 2008). Igualmente, los ratones *knockout* para Nav1.9 mostraron una hiperalgesia atenuada en respuesta a mediadores inflamatorios (Priest et al., 2005; Amaya et al., 2006). Lo expuesto anteriormente sugiere que el papel del canal Nav 1.9 está mucho más claro en el dolor inflamatorio que en el dolor neuropático.

1.2.1.2 Canales activados por hiperpolarización modulados por nucleótidos (HCN)

Los canales HCN se expresan ampliamente en neuronas sensoriales periféricas y del sistema nervioso central y en el tejido cardíaco (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Moosmang et al., 1999; Moosmang et al., 2001; Notomi & Shigemoto, 2004). Los canales HCN generan una corriente, conocida como I_h , de entrada de Na^+/K^+ cuando el potencial de membrana está hiperpolarizado, produciendo actividad eléctrica rítmica en neuronas especializadas del cerebro (Santoro et al., 2000; Moosmang et al., 2001; Notomi & Shigemoto, 2004) y en células del nodo sinoatrial del corazón (Ludwig et al., 1999). La corriente I_h tiene diversas funciones, que incluyen la determinación del potencial de membrana, la tasa de disparo del potencial de acción, la integración dendrítica y la transmisión sináptica (He et al., 2014).

La actividad de los canales HCN juega un papel importante en procesos fisiológicos y comportamentales como el sueño y la vigilia, aprendizaje y memoria y en los efectos que se producen bajo anestesia (Nolan et al., 2003; Chen et al., 2005; Ying et al., 2006; Ding et al., 2016). Se ha visto que la desregulación de la actividad de los canales HCN contribuye a desórdenes psicológicos y neurológicos, incluyendo, dolor, epilepsia, adicción y ansiedad (Shin et al., 2006; Okamoto et al., 2006; Kim et al., 2012; Du et al., 2013; Koga et al., 2015).

También se ha demostrado que los canales HCN participan en el procesamiento del dolor (Chaplan et al., 2003; Wahl-Schott & Biel, 2009; Baruscotti et al., 2010; Emery et al., 2011; Emery et al., 2012; Weng et al., 2012; Young et al., 2014), donde la corriente I_h puede inducir el disparo repetitivo de neuronas nociceptivas primarias (Tu et al., 2004; Luo et al., 2007; Momin et al., 2008), aunque no se conoce el papel específico de los distintos tipos de canales HCN en la percepción del dolor. Por ejemplo, las neuronas del DRG expresan de forma consistente canales tipo HCN1, siendo menos abundantes los tipo HCN2 (Moosmang et al., 2001; Chaplan et al., 2003; Tu et al., 2004). Existen evidencias de que los nociceptores de mayor tamaño expresan HCN1 mientras que las neuronas somatosensoriales pequeñas expresan HCN2 o HCN4 (Momin et al., 2008). Eso sugiere que los nociceptores expresan de forma consistente HCN2, que sería responsable del aumento de la frecuencia de disparo durante el dolor neuropático y el inflamatorio (Emery et al., 2011; Emery et al., 2012; Young et al.,

2014). En concordancia con estas observaciones acerca de la expresión de HCN2 en los nociceptores, el ratón *knockout* para HCN2 no muestra hiperalgesia en respuesta a estímulos mecánicos o térmicos (Emery et al., 2011), mientras que los signos de dolor neuropático e inflamatorio no se atenúan en los ratones *knockout* para HCN1 (Momin et al., 2008). Dada la importancia de los canales HCN en el procesamiento del dolor, hay un especial interés en su modulación como posible tratamiento terapéutico y se buscan bloqueantes selectivos de las subunidades HCN1 y, sobre todo, HCN2.

También se ha estudiado el papel de los canales HCN en la sensibilidad al frío de las neuronas termorreceptoras de frío del ratón (Orio et al., 2009; Orio et al., 2012). Los resultados de estos trabajos sugieren que la corriente I_h participa en la sensibilidad al frío de las neuronas termorreceptoras. Aunque su actividad no es esencial en la transducción de la temperatura, sí tiene un papel importante en el comportamiento eléctrico característico de dichas neuronas sensibles a frío, manteniendo su patrón de disparo espontáneo. Igualmente, las respuestas comportamentales al enfriamiento están reducidas en los ratones *knockout* HCN1^{-/-} y tras el bloqueo farmacológico de la corriente I_h , lo que sugiere que estos canales tienen un papel importante en el establecimiento de la sensibilidad periférica al frío.

1.2.1.3 Canales de potasio dependientes de voltaje: K_v

Los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) regulan el potencial de membrana en reposo y participan en el umbral, la forma y la frecuencia de descarga y la adaptación del potencial de acción. Además de participar en el funcionamiento de las células excitables (Hoshi et al., 1990; Bosma & Hille, 1992; Yellen G., 2002), estas proteínas también tienen un papel en la regulación de la apoptosis (Pal et al., 2006) y en el crecimiento y diferenciación celular (Deutsch & Chen, 1993). Además, el correcto funcionamiento de los canales K_v es necesario para la liberación de neurotransmisores (Singer-Lahat et al., 2007) y hormonas (MacDonald et al., 2002; Kim et al., 2012), y para el mantenimiento de la actividad cardíaca (Q. Wang et al., 1996), entre otras funciones.

Las mutaciones en los genes que dan lugar a estos canales ocasionan varios desórdenes hereditarios severos (Wray D., 2009), que incluye ceguera, epilepsia

(Watanabe et al., 2000), y ciertos tipos de desórdenes del ritmo cardíaco (Wang et al., 1996). Los canales K_v también están implicados en la patogénesis de la esclerosis múltiple y en síndromes de dolor crónico (Beekwilder et al., 2003) y en el proceso de establecimiento y desarrollo tumoral (Camacho J., 2006).

El funcionamiento de los canales K_v puede ser modulado usando activadores y bloqueantes (Milescu et al., 2013), y teniendo en cuenta los numerosos procesos en los que están implicados, representan una diana farmacológica muy importante en varios campos de la medicina (Thomas et al., 2004; Ikeda et al., 2010).

En el ser humano, los canales K_v están codificados por 40 genes, divididos en 12 subfamilias que incluyen: K_v1 (KCNA), K_v2 (KCNB), K_v3 (KCNC), K_v4 (KCND), K_v7 (KCNQ, también llamado KQT), K_v10 , K_v11 (KCNH, también llamado EAG) y K_v12 . Los canales K_v5 , K_v6 , K_v8 , y K_v9 no son funcionales por sí solos y se ensamblan con subunidades K_v2 . Los miembros de esta familia tienen una estructura de seis segmentos transmembrana (6TM), estando reguladas por voltaje. Los canales K_v de mamíferos son similares al primer canal K_v clonado en *Drosophila*, “el canal *shaker*” (Papazian et al., 1987), y todos consisten en cuatro subunidades α (cada una con 6TM con estructura α -hélice, S1-S6, y un segmento P-loop) dispuestas como homotetrámeros o heterotetrámeros con un poro central.

Dependiendo de la especie de mamíferos, incluyendo la humana, se han descrito varios tipos de canales de K^+ en las células de las capas basales y de las superficiales del epitelio corneal. Estos canales participan en las funciones esenciales de dicho epitelio, necesarias para el mantenimiento de la homeostasis tisular, por ejemplo la regulación del volumen celular y del equilibrio hídrico y contenido acuoso tisular, importante para mantener la transparencia corneal.

Además, los cambios en la actividad de los canales de K^+ se ha relacionado con respuestas mitogénicas y con apoptosis inducida por factores de crecimiento, citoquinas y estimulación por estrés (Lu L., 2006). Cuando el tejido corneal es expuesto a irradiación UV, la actividad de los canales de K_v parece ser estimulada. Esta actividad aumentada lleva a la retracción de las células epiteliales debido a la pérdida del potasio

intracelular, resultando en la activación de diversos efectores intracelulares como FAK/Src, MEKK4, JNK y p53, lo que lleva finalmente a la apoptosis celular (Lu et al., 2003; Wang et al., 2005; Lu L., 2006; Singleton et al., 2009; Ubels et al., 2010). Los mecanismos moleculares implicados en estos efectos no han sido caracterizados completamente, si bien la identificación de los subtipos de canales de K⁺ implicados podría proporcionar nuevas dianas para prevenir el daño inducido por luz UV en el tejido corneal.

En las neuronas del TG, los K_v se expresan junto a otros canales, como Nav, Cav y HCN, contribuyendo a determinar la excitabilidad neuronal final, y siendo críticos en la modulación del patrón de disparo y la frecuencia de los impulsos nerviosos generados en las terminaciones sensoriales periféricas en los tejidos oculares (Belmonte et al., 2009).

Varios estudios indican que los canales K_{v1} se mantienen abiertos a la temperatura basal del tejido, actuando como canales termosensibles ya que se cierran con el enfriamiento, induciendo así la despolarización y el disparo de impulsos nerviosos en determinadas neuronas termorreceptoras de frío (Reid & Flonta, 2001; Viana et al., 2002). Como regla general, las neuronas sensoriales responden a otras modalidades de estímulo además del frío, contrarrestando los efectos despolarizantes inespecíficos a la exposición a las bajas temperaturas a través de la expresión del canal de potasio sensible al frío (K_{v1}) cuya corriente iónica, llamada I_{KD}, se opone a la despolarización, haciéndolas insensibles a las reducciones de temperatura (Madrid et al., 2006; Morenilla-Palao et al., 2014). La expresión variable de estos canales K_{v1} serviría en neuronas termorreceptoras de frío canónicas para ajustar finamente su umbral. Los termorreceptores de frío HB-LT, que expresan de forma abundante el TRPM8 (Alcalde et al., 2018) tienen una baja expresión de canales K_{v1}, mientras que los termorreceptores de frío de tipo LB-HT, que exhiben menores niveles de TRPM8, tienen una elevada expresión de canales K_{v1} y del canal de potasio K_{2P} TASK-3, requiriéndose por tanto un mayor enfriamiento para ser activados (Viana & Belmonte, 2008; Belmonte et al., 2009; Madrid et al., 2009; Morenilla-Palao et al., 2014).

1.2.1.4 Canales de calcio dependientes de voltaje: Ca_v

Los canales de calcio regulados por voltaje (Ca_v) se clasifican en tres grupos según los genes que codifican la subunidad que forma el poro: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 (Catterall et al., 2005; Furukawa T., 2013). La subfamilia Ca_v3 da lugar a la corriente tipo “T” activada por bajo voltaje, presente en las neuronas sensoriales primarias de los DRG (Carbone & Lux, 1984; Bossu et al., 1985; Fedulova et al., 1985; Nowycky et al., 1985). Este patrón de expresión sugiere que los canales Ca_v3 podrían contribuir al procesamiento sensorial del dolor (François et al., 2015), siendo por tanto también potenciales dianas para el tratamiento terapéutico.

Las neuronas del TG también expresan Ca_v que, junto a los canales Na_v , K_v y HCN, contribuyen a determinar la excitabilidad neuronal final, siendo también críticos en la modulación del patrón de disparo y de la frecuencia de los impulsos nerviosos generados en las terminaciones sensoriales periféricas en los tejidos oculares (Belmonte et al., 2009).

Tabla 1.2. Principales canales implicados en la excitabilidad neuronal y sus principales funciones. Se muestran los canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje y los canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN). TTX-S: sensible a tetrodotoxina. TTX-R: resistente a tetrodotoxina.

CANAL	FUNCIÓN	COMENTARIOS
$Na_v 1.7$	Generación del potencial de acción (PA)	TTX-S ↑ función: ↑ desórdenes dolorosos ↓ función: ↓ dolor
$Na_v 1.8$	Despolarización del PA Oscilaciones del PA (excitabilidad)	TTX-R ↑ función: hiperexcitabilidad neuronal, dolor inflamatorio y neuropático
$Na_v 1.9$	Aumento de la excitabilidad neuronal (se activa a potenciales hiperpolarizantes)	TTX-R Implicado en dolor, aunque hay resultados contradictorios En inflamación, produce sensibilización
HCN	Oscilación del potencial de membrana y la tasa de disparo del PA Integración dendrítica, transmisión sináptica	HCN1: sensibilidad periférica al frío HCN2: implicado en el dolor inflamatorio y neuropático
K_v	Potencial de membrana en reposo. Umbral, forma y frecuencia de descarga del PA	K_v1 : cierre sensible al frío, ajustando el umbral de respuesta a este estímulo
Ca_v	Excitabilidad neuronal	Ca_v3 : contribuye al procesamiento sensorial del dolor

1.2.2 Canales implicados en la transducción sensorial

En las terminaciones periféricas de las neuronas sensoriales, incluidas las del TG, se expresan diferentes canales que se abren cuando son estimulados por una forma de energía específica, causando, de este modo, una despolarización de la membrana. Este proceso se conoce como transducción sensorial y a los canales implicados se les llama “canales transductores”. La sensibilidad específica a un cambio de energía químico o físico dado de cada neurona sensorial está determinado, a nivel molecular, por la expresión de diferentes canales iónicos (Belmonte et al., 2015). Las principales características de los canales implicados en la transducción sensorial con relevancia en el caso de las neuronas somatosensoriales de la córnea se resumen al final de este apartado (**Tabla 1.3**).

1.2.2.1 Canales TRP

Su nombre viene del inglés “Transient Receptor Potential” y son canales catiónicos homotetraméricos no selectivos con alta permeabilidad al Ca^{2+} y que actúan como receptores multimodales (Julius D., 2013).

Los canales TRP son intrínsecamente sensibles a los lípidos fosfoinosítidos, particularmente al fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) y, por lo tanto, son modulados por receptores acoplados a una proteína G asociados a la vía Gq-fosfolipasa C (PLC), con diferentes efectos de acuerdo con el tipo de canal TRP (Benarroch E., 2015).

Se clasifican en 6 subfamilias diferentes según su homología de secuencia: los receptores canónicos (TRPC1–6), los receptores vaniloides (TRPV1–7), los receptores de melastatina (TRPM1–8), el receptor ankirina (TRPA1), los receptores de policistinas (TRPP1–5) y los de mucolipinas (TRPML1–3). Los diferentes miembros de esta familia de canales iónicos pueden ser activados por estímulos químicos, mecánicos o térmicos, detectando estímulos externos o internos en diferentes partes del cuerpo, estando presentes en la práctica totalidad de las células que constituyen el primer escalón, la transducción sensorial, de todos los sentidos corporales (Nilius & Szallasi, 2014).

En definitiva, los canales TRPs son canales transductores de estímulos físicos, químicos y térmicos, detallándose a continuación los más estudiados y relacionados con el tema de la tesis.

TRPV1

Conocido inicialmente como VR1 o receptor de capsaicina (componente de los pimientos picantes), fue clonado hace más de 20 años en neuronas de DRG de rata (Caterina et al., 1997). Hasta la fecha se han identificado ortólogos del TRPV1 en tejidos de varios mamíferos, incluyendo el hombre, rata, cobaya, conejo, perro y cerdo (Venkatachalam & Montell, 2007). En mamíferos el TRPV1 tiene una amplia distribución celular y de tejidos incluyendo el sistema nervioso central y el periférico, el tracto gastrointestinal, el epitelio de la vejiga urinaria, epitelio del oído interno y los folículos pilosos (Myers & Julius, 2007; Planells-Cases & Ferrer-Montiel, 2007; Voight & Kort, 2010; Planells-Cases et al., 2011; Moran et al., 2011). El TRPV1 está expresado en neuronas sensoriales nociceptivas de DRG y del TG.

Además de activarse por compuestos vaniloides como la capsaicina y la resiniferatoxina, el TRPV1 se activa también por voltaje, temperaturas en el rango nocivo ($> 42^{\circ}\text{C}$) y pH ácido (< 5.9). También se sabe que otros compuestos como la anandamida, los eicosanoides o el etanol activan este receptor (Ferrer-Montiel et al., 2012).

En el ojo, las terminaciones nociceptoras polimodales se activan con capsaicina (Belmonte et al., 1991; Chen et al., 1997), encontrándose fibras nerviosas inmunoreactivas para TRPV1 en la córnea de rata y en neuronas sensoriales trigeminales de pequeño y mediano tamaño que inervan la córnea (Murata & Masuko, 2006), las cuales también coexpresan sustancia P o CGRP. El canal TRPV1 juega, además, un papel importante durante la inflamación ya que muchas de las sustancias liberadas durante el proceso inflamatorio o de daño tisular activan y potencian su actividad (Basbaum et al., 2009; Julius D., 2013).

TRPA1

Originalmente conocido como AKTM1, se identificó en las neuronas nociceptivas (Story et al., 2003). Se expresa en células sensoriales del oído interno y en neuronas sensoriales del TG y del DRG y co-localiza con el canal TRPV1 en un subgrupo de neuronas sensoriales (Story et al., 2003; Fajardo et al., 2008).

El canal TRPA1 es el receptor para múltiples estímulos nocivos como contaminantes ambientales y oxidantes (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Bautista et al., 2005; Peterlin et al., 2007). Se activa por muchas sustancias picantes como el aceite de mostaza (AITC), componentes de la canela (cinamaldehído) o el ajo (alicina) entre otros (Julius D., 2013). Algunos estudios indican que el TRPA1 contribuye a la sensibilidad al frío, siendo activado a temperaturas cercanas al rango lesivo (Abrahamsen et al., 2008; Karashima et al., 2009). Algunos trabajos sugieren que este canal actúa como detector de estímulos mecánicos, aunque hay controversia al respecto (Kwan et al., 2009). Hay evidencia de que el TRPA1 es el efector de la activación neuronal sensorial que desencadena la mayoría de los reflejos respiratorios provocados por irritantes pulmonares (Bessac & Jordt, 2008), por sí solo o por interacción con el receptor nicotínico de la acetilcolina (Talavera et al., 2009), estando relacionado con la tos crónica (Brooks SM., 2008).

El TRPA1 contribuye al dolor inflamatorio, promueve la inflamación neurogénica y es diana de sustancias endógenas derivadas del estrés oxidativo. Está expresado en las fibras C peptidérgicas, que inician la inflamación neurogénica cuando el TRPA1 es activado por los neuropéptidos liberados localmente, produciendo las sensaciones de quemazón y dolor punzante de la hiperalgesia térmica (Julius D., 2013).

La población de neuronas sensoriales que inervan la córnea de cobaya contiene una subpoblación que es activada por el AITC, un agonista de TRPA1 (Kovács, Luna, et al., 2016), por lo que es posible que este canal también se exprese en las terminaciones nerviosas periféricas de dichas neuronas que inervan la córnea.

TRPM8

El canal TRPM8 se clonó originariamente como marcador de células de cáncer de próstata (Tsavaler et al., 2001), pero posteriormente se identificó como un canal iónico sensorial sensible a compuestos refrescantes como el mentol y la icilina, así como un sensor de temperatura en el rango de frío inocuo (15-28°C) (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Actualmente, el papel del TRPM8 en la generación de la sensación de frío y la regulación de la temperatura está ampliamente aceptado (Bautista et al., 2007).

Existen evidencias de que la expresión aumentada del canal TRPM8 en las neuronas sensoriales tras el daño nervioso o la inflamación constituye el sustrato de la sensibilidad aumentada que origina la hiperalgesia y la alodinia al frío (Proudfoot et al., 2006; Xing et al., 2007). Por otro lado, la activación del canal TRPM8 parece que atenúa la transducción dolorosa en ciertas condiciones inflamatorias (B. Liu et al., 2013). Por su implicación en estos procesos, el TRPM8 está considerado como una diana terapéutica atractiva para el desarrollo de nuevos analgésicos, además del de agentes antitumorales (Mckemy D., 2010; Malkia et al., 2011; Moran et al., 2011).

El TRPM8 está expresado en el 10–15% de las neuronas somatosensoriales (fibras C amielínicas de pequeño diámetro) en DRG y TG, y tiene funciones importantes en los tejidos oculares. En la córnea y la conjuntiva, una proporción significativa (10–15%) de las fibras sensoriales responden a la aplicación de mentol o a descensos de temperatura, actuando así como termorreceptores de frío (Belmonte & Gallar, 2011).

En el caso de la córnea, un papel relevante de los termorreceptores de frío que expresan TRPM8 es detectar la humedad de la superficie ocular y regular la tasa de lagrimación basal (Parra et al., 2010). Otros datos también muestran que el canal TRPM8 confiere sensibilidad a pequeños cambios en la osmolaridad (Parra et al., 2014), que modularía la sensibilidad del canal a la temperatura, lo que es relevante en la superficie ocular porque la activación osmótica del TRPM8 proporcionaría la base neuronal que mantiene la frecuencia de parpadeo (Quallo et al., 2015). En resumen, el

canal TRPM8 en la superficie ocular es clave para la activación de los mecanismos protectores de lagrimación y parpadeo.

1.2.2.2 ASICs

Estos canales, que reciben su nombre de las siglas en inglés “Acid Sensing Ion Channel”, son canales catiónicos homo- o heterotriméricos activados por acidosis extracelular (protones, H^+) y están expresados en tejidos neuronales, particularmente en las vías del dolor, incluyendo neuronas periféricas y centrales. Los ASIC son miembros de la superfamilia de canales de sodio epiteliales (ENaC)/DEG (degenerina) y en roedores se han clonado, al menos, 6 subunidades (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 y ASIC4). En humanos, el mRNA del ASIC1b no ha sido descrito hasta la fecha, y ASIC3 y ASIC4 tienen tres y dos variantes, respectivamente. Los ASIC están implicados en muchos procesos fisiológicos y patológicos entre los que se incluyen la plasticidad sináptica y el aprendizaje, el miedo y la ansiedad, la mecanorrecepción, el dolor, la migraña, los ataques epilépticos, el infarto isquémico y varias enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y el Parkinson (Deval et al., 2010; Wemmie et al., 2013; Kellenberger & Schild, 2014; Deval & Lingueglia, 2015).

Han sido caracterizados funcionalmente en las neuronas sensoriales que inervan la córnea (Callejo et al., 2015). Las neuronas sensoriales corneales en cultivo expresan todas las subunidades ASIC, de manera que al ser estimuladas con un pH ácido, se despolarizan y disparan potenciales de acción. En las neuronas sensoriales corneales, los protones activan corrientes tipo ASIC con las características biofísicas y farmacológicas de canales homoméricos ASIC1a y ASIC3, así como de canales heteroméricos ASIC1/3. Además, los canales ASIC3 también están presentes en las terminaciones periféricas de esas neuronas corneales, de manera que la aplicación de una solución moderadamente ácida sobre la córnea de la rata despierta produce un comportamiento nocifensivo (parpadeo y rascado del ojo) que es bloqueado por el pretratamiento con bloqueantes selectivos y no selectivos del ASIC3 (Callejo et al., 2015). De forma similar, la aplicación tópica de un agonista específico del ASIC3 (GMQ), que abre los ASIC3 incluso a pH neutro, activa las fibras nerviosas sensoriales corneales y produce un aumento reflejo de la frecuencia de parpadeo y la tasa de lagrimación.

La presencia de canales ASIC en los tejidos de la superficie ocular es particularmente relevante porque la mayor parte de los fármacos disponibles comercialmente para su aplicación tópica ocular están formulados en soluciones ácidas, por lo que estos canales capaces de detectar las acidificaciones moderadas de la superficie ocular, serían los responsables de evocar las sensaciones dolorosas e irritativas que experimentan los pacientes cuando reciben tratamiento con un colirio.

Los ASICs también juegan un papel relevante en la generación de la inflamación ocular en un modelo de queratoconjuntivitis alérgica, ya que el bloqueo del ASIC3 con toxinas específicas puede prevenir, al menos parcialmente, la generación de respuestas dolorosas asociadas a la inflamación alérgica en animales despiertos (Callejo et al., 2015). Estas observaciones sugieren que los canales ASIC detectan la acidificación moderada de la superficie, especialmente la asociada a procesos inflamatorios, por lo que son posibles dianas terapéuticas para tratar el dolor ocular.

1.2.2.3 Piezo2

El canal Piezo2 (Fam38B) forma, junto a Piezo1 (Fam38A), una nueva clase de canales iónicos recientemente descritos que están modulados por presión mecánica. Fueron inicialmente identificados en células de neuroblastoma N2A (Coste et al., 2010; Kim et al., 2012) y propuestos como piezas clave en mecanotransducción tanto en mamíferos como en *Drosophila*, donde su homólogo Dmpiezo o CG8486 está implicado en la nocicepción mecánica (S. E. Kim et al., 2012). El canal Piezo2 responde a estímulos mecánicos produciendo las corrientes adaptativas lentas descritas en un subgrupo de neuronas sensoriales de DRG y en los mecanorreceptores cutáneos conocidos como complejos neurita-célula de Merkel. La delección del canal Piezo2 empeora la mecanosensibilidad de la célula de Merkel (Woo et al., 2014) y su expresión en estas células, así como en neuronas mecanorreceptoras de bajo umbral, es crítica para la sensación táctil inocua ya que los ratones *knockout* para Piezo2 muestran un completo déficit en la sensación de tacto ligero (Ranade et al., 2014). Sin embargo, no se conoce con exactitud si el canal Piezo2 es responsable del inicio de la señal sensorial responsable de la mecanosensación nociva en los nociceptores, aunque se ha sugerido que está implicado en la alodinia inducida por la sección nerviosa espinal (Eijkelkamp

et al., 2013) y en la hiperalgesia mecánica presente durante la inflamación (Dubin et al., 2012).

Piezo2 ha sido descrito en las neuronas sensoriales corneales (Bron et al., 2014), estando presente en aproximadamente el 30% de las neuronas sensoriales corneales y en el 26% de todas las neuronas sensoriales del TG en el cobaya. Curiosamente, parece que la expresión de Piezo2 se da específicamente en un subgrupo de neuronas sensoriales que presentan inmunoreactividad a NF200 (un neurofilamento), a diferencia de los nociceptores polimodales (que presentan preferentemente inmunoreactividad al neuropéptido CGRP) y de los termorreceptores de frío (que presentan expresión de mRNA de TRPM8), lo que sugiere que el canal Piezo2 está exclusivamente expresado en la población de mecano-nociceptores previamente caracterizados en la córnea (Belmonte, Acosta, et al., 2004).

1.2.2.4 *Canales de K⁺ de 2 poros*

Estos canales son miembros de la superfamilia de los canales iónicos modulados por voltaje (Yu et al., 2005) pero tienen una tipología única: el canal está formado por dímeros de subunidades que tienen cada una 4 segmentos transmembrana y dos dominios extracelulares, entre los segmentos S1/S2 y S3/S4 que conforman dos poros, de ahí su nombre de canales de dominio de dos poros K2P (o KCNK) (Goldstein et al., 2005).

A diferencia de otros canales, estos se encuentran abiertos y producen las denominadas corrientes de fuga (“leak”) que estabilizan el potencial de membrana en reposo y que tienen un papel crítico en el control de la excitabilidad neuronal (Bayliss & Barrett, 2008; Enyedi & Czirják, 2010). Aunque se conocen como canales de fuga por estar constitutivamente abiertos en reposo, muchos K2Ps son polimodales y responden a un amplio rango de estímulos físicos (temperatura, estiramiento de membrana, etc.) y químicos (pH intracelular y extracelular, ácidos grasos poliinsaturados, anestésicos volátiles y químicos nocivos) (Honoré E., 2007; Enyedi & Czirják, 2010), motivo por el cual han sido incluidos en este apartado de canales que participan en la transducción. Numerosos estudios han establecido que los canales K2P tienen papeles importantes en el cerebro, en el sistema cardiovascular y en neuronas somatosensoriales (Duprat et al., 2007; Honoré E., 2007; Bayliss & Barrett, 2008; Folgering et al., 2008; Sabbadini & Yost, 2009; Enyedi & Czirják, 2010).

La familia de canales K2P en mamíferos, está formada por los productos de 15 genes clasificados en seis subfamilias: TWIK (sigla derivada del inglés “Tandem of pore domains in a Weak Inward Rectifying K⁺” canal; rectificador de corriente interna débiles), TREK (TWIK RElated K⁺ canal; sensible a lípidos y mecanosensibles), TASK (TWIK RElated Acid-Sensitive K⁺ canal; inhibido por acidificación), TALK (TWIK-RElated Alkaline pH-Activated K⁺ canal; activado por alcalinización), THIK (Tandem pore domain Halothane-Inhibited K⁺ canal; inhibido por halotano) y TRESK (TWIK-RElated Spinal cord canal; modulado por Ca²⁺). Sus características han sido estudiadas por diferentes grupos (Enyedi & Czirják, 2010; Lesage & Barhanin, 2011; Feliciangeli et al., 2015; Renigunta et al., 2015; Sepúlveda et al., 2015).

Los canales TREK-1 y TRAAK, ambos de la subfamilia TREK, se han descrito como potenciales transductores del frío, ya que están activos al potencial de membrana en reposo, tienen una fuerte dependencia de la temperatura (se sensibilizan con el calentamiento y se inhiben por enfriamiento) y están altamente expresados en neuronas sensoriales del DRG (F. Maingret et al., 2000; Talley et al., 2001; Kang et al., 2005).

También hay evidencias que indican que los canales K2P están sujetos a modulación por mediadores inflamatorios. El TREK-1 es inhibido por pH extracelular bajo y por el ácido lisofosfatídico, vía estimulación de PLC, y por la PGE2 vía AMPc, lo que puede contribuir a la excitabilidad aumentada y la sensibilización de las terminaciones nerviosas periféricas en la inflamación (Alloui et al., 2006; Cohen et al., 2009). Curiosamente, tanto TREK-1 como TRAAK se coexpresan con canales termosensibles TRP, incluyendo el TRPM8 (Yamamoto et al., 2009). Algunos estudios comportamentales muestran que la sensibilidad al frío no está modificada en ratones modificados genéticamente que no expresan TREK-1 y TRAAK, si bien otros estudios muestran que la sensibilidad al frío está aumentada en esas condiciones (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009). Las evidencias sugieren que los canales de potasio de fuga se oponen a la acción excitatoria del enfriamiento y contribuyen al ajuste fino de la sensibilidad térmica de los receptores de frío.

Otro canal iónico de la familia K2P expresado en las neuronas sensoriales oculares y que también modula la respuesta de los termorreceptores de frío al oponerse

a la activación neuronal, es el canal TASK-3, descrito en neuronas sensoriales de frío que expresan TRPM8 (Morenilla-Palao et al., 2014).

Tabla 1.3. Principales canales implicados en la transducción sensorial y sus funciones más importantes.

Canal	Función	Comentarios
TRPV1	Activado por capsaicina, ↓pH, >42°C, mediadores inflamatorios	Implicado en el dolor inflamatorio
TRPA1	Activado por sustancias químicas e irritantes (ej. canela, ajo, aceite de mostaza), frío nocivo; estímulo mecánico (?)	Implicado en el dolor inflamatorio y la inflamación neurogénica. Coexpresado con TRPV1 en un subgrupo de nociceptores.
TRPM8	Activado por frío inocuo y por sustancias como el mentol y la icilina	Proporciona la sensibilidad al frío. Contribuye a la alodinia y la hiperalgesia por frío. Disminuye su actividad bajo inflamación. Implicado en la regulación de la lagrimación y parpadeo basales
ASIC	Activados por H ⁺	Implicados en dolor y procesos inflamatorios
PIEZO2	Activado por presión mecánica, evocando sensación de tacto	Posiblemente implicados en la alodinia y la hiperalgesia mecánica durante la inflamación
K2P	Controlan la excitabilidad neuronal. Responden a estímulos físicos y químicos. TREK-1, TRAAK y TASK-3, implicados en la sensibilidad al frío	La inhibición de TREK-1, TRAAK y TASK-3 aumenta la sensibilidad al frío

1.3 ALTERACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA INERVACIÓN SENSORIAL CON LA INFLAMACIÓN Y LA LESIÓN.

Tanto la inflamación como la lesión producen alteraciones morfológicas y funcionales de los nervios sensoriales. En muchos casos es complejo separar los efectos de ambos procesos, ya que la lesión de un tejido y de su inervación va a provocar inflamación y, a su vez, la inflamación prolongada de un tejido va a provocar daño en la inervación sensorial, por lo que las consecuencias genéticas, moleculares y funcionales de ambas se superponen para producir una actividad aumentada de las fibras nerviosas sensoriales periféricas y la generación de sensaciones de dolor.

Los procesos inflamatorios producen la liberación local de mediadores inflamatorios que actúan sobre las terminaciones libres de los nociceptores polimodales a través de receptores de membrana específicos (Handwerker and Reeh, 1992),

activando el canal TRPV1 y, en menor medida, los canales TRPA1 y ASIC, despolarizando la membrana y produciendo sensibilización (Pethő & Reeh, 2012). A diferencia de estos, el efecto de los mediadores inflamatorios en las terminaciones libres de los termorreceptores es la inhibición del canal TRPM8, al actuar los mediadores sobre la subunidad Gq α de la proteína G acoplada al canal (Zhang et al., 2012). Como consecuencia, durante la inflamación disminuye la actividad basal y la evocada por el frío en estos termorreceptores.

Además de este efecto inmediato, los mediadores inflamatorios también producen efectos a más largo plazo, al modificar el tipo, número y distribución de los canales iónicos de la membrana de la neurona. Por ejemplo, los activadores de la PKA promueven el tráfico y la inserción incrementada de canales de sodio Nav1.8 y Nav1.9 en la membrana plasmática, alterando el umbral y las propiedades de la membrana de las terminaciones sensoriales. Además, los cambios en la expresión de canales de potasio K_v, de calcio Ca_v y HCN contribuyen aún más a la alteración de la excitabilidad de las terminaciones nerviosas nociceptoras (Everill & Kocsis, 1999; Dib-Hajj et al., 2010; Cruz et al., 2011; Liu et al., 2015). La alteración de la expresión de estos canales iónicos es la causante del dolor persistente, la alodinia y la hiperalgesia que aparecen en la inflamación crónica.

Tabla 1.4 Principales efectos de la inflamación sobre la actividad y la expresión de los canales que participan en la codificación y transducción sensorial en las neuronas sensoriales primarias.

Efectos de la <u>inflamación</u> sobre la actividad y la expresión de los canales que participan en la codificación y transducción sensorial en las neuronas sensoriales primarias.	
↑ actividad TRPV1, TRPA1, ASIC	Sensibilización nociceptores polimodales
↓ actividad TRPM8	Desensibilización termorreceptores de frío
↑ expresión Na _v 1.8, Na _v 1.9, Ca _v , HCN	Alteración umbral y aumento de la excitabilidad
↓ expresión K _v , K2P	Aumento de la excitabilidad

El aumento prolongado en el tiempo de la actividad de las neuronas sensoriales primarias, en concreto de las nociceptoras, también puede provocar cambios a nivel superior a lo largo de la vía central de transmisión del dolor, llegando a producir el

fenómeno conocido como “sensibilización central” (Woolf CJ., 2011), definida, en el caso de la sensibilidad de la cabeza y la cara, como una facilitación duradera homo y heterosináptica de la transmisión entre las ramas axonales centrales de las neuronas del ganglio trigémino y las neuronas de proyección en el complejo trigeminal del tronco encéfalo (Woolf CJ., 1983; Bereiter et al., 2005; Kohno et al., 2008). La sensibilización central está provocada por los nociceptores, al liberar conjuntamente neuropéptidos y glutamato que actúan sobre varios receptores postsinápticos (NMDA, AMPA, NK1, etc.) liberando suficiente calcio para aumentar la excitabilidad neuronal de la neurona postsináptica del troncoencéfalo (Basbaum et al., 2009). Esta sensibilización central causa hiperalgesia secundaria y alodinia, contribuyendo así a aumentar y expandir el dolor inflamatorio.

Cuando se produce lesión de la inervación sensorial periférica, se produce también una inflamación local transitoria. Además, a más largo plazo el daño de los axones periféricos provoca cambios en su patrón de disparo espontáneo y en la respuesta evocada por la estimulación (Devor, M., 2013), como consecuencia de la alteración de las propiedades de los canales iónicos de membrana que regulan dicha actividad eléctrica y los canales de transducción. Se ha demostrado la expresión alterada de los canales TRPV1, TRPA1 y TRPM8 (Jordt et al., 2003; Jordt et al., 2004; Xing et al., 2007; Staaf et al., 2009) y el aumento de la densidad y distribución de canales implicados en la generación y propagación del potencial de acción como los canales de Na^+ (Nav 1.3, Nav 1.6 y Nav 1.9), los Ca_v (Waxman et al., 2014; Habib et al., 2015; Tibbs et al., 2016) y los HCN, así como una disminución de la expresión de varios tipos de canales de K^+ (K2P , K_v) (Everill & Kocsis, 1999; Dib-Hajj et al., 2010; Cruz et al., 2011; Liu et al., 2015). De forma conjunta, estas alteraciones provocan en las neuronas sensoriales una respuesta aumentada a la estimulación natural y la aparición de actividad ectópica (iniciación de potenciales de acción espontáneos en zonas de la neurona -soma o axón periférico- en las que normalmente no se genera el impulso nervioso). Esta actividad ectópica descrita en varios modelos animales de daño nervioso periférico (Devor, 2013; Rivera et al., 2000) sería la responsable del dolor sostenido y del desarrollo de sensibilización central (Sessle BJ, 2011).

Tabla 1.5. Efectos de la lesión de las neuronas sensoriales primarias y/o sus terminaciones periféricas sobre la actividad y la expresión de los canales que participan en la transducción sensorial y la codificación del estímulo.

Efectos de la <u>lesión</u> de las neuronas sensoriales primarias y/o sus terminaciones periféricas sobre la actividad y la expresión de los canales que participan en la transducción sensorial y la codificación del estímulo.	
↑ actividad y expresión TRPV1, TRPA1, TRPM8, Na _v , Ca _v , HCN	Sensibilización y aumento de la excitabilidad
↓ actividad y expresión K2P, K _v	Aumento de la excitabilidad

Cuando la lesión periférica cura, la sensibilización central habitualmente desaparece, excepto si se produce una alteración fenotípica permanente de las neuronas sensoriales primarias, incluyendo también los mecanorreceptores de bajo umbral y los termorreceptores de frío, que puede perpetuar la sensibilización central, manteniéndose las disestesias, la alodinia y el dolor neuropático (Rosenthal & Borsook, 2012; Galor et al., 2015).

La mayoría de las patologías oculares y numerosas enfermedades sistémicas producen inflamación y/o lesión de la innervación sensorial de la superficie ocular, lo que se traduce, al igual que en otros tejidos, en alteraciones en su morfología y en su actividad y por lo tanto en su función. En el caso de la córnea, la lesión de las ramas nerviosas periféricas de las neuronas del TG puede ocurrir directamente, por daño físico, metabólico, tóxico, neuropatía viral, o con las incisiones quirúrgicas (cirugía de cataratas, intervenciones de desprendimientos de retina o cirugía fotorrefractiva, etc.). En diversos modelos animales que imitan situaciones comunes en la clínica de inflamación y de lesión corneal, como es el caso de la queratoconjuntivitis alérgica (Acosta et al., 2013), la fotoqueratitis por radiación UV (Acosta et al., 2014), se ha demostrado el desarrollo agudo de sensibilización de los nociceptores y desensibilización de los termorreceptores de frío, también presentes en las terminaciones que inervan zonas periféricas a la lesión tras la cirugía fotorrefractiva (Gallar et al., 2007). Varios estudios recientes, muchos de ellos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, han permitido avanzar en el conocimiento de la contribución de cada uno de los tipos funcionales de nervios sensoriales de la córnea a las sensaciones evocadas, tras la lesión y/o inflamación de la superficie ocular (Belmonte et al., 2015), cuya principal conclusión se presenta esquemáticamente en la **Figura 1.9**.

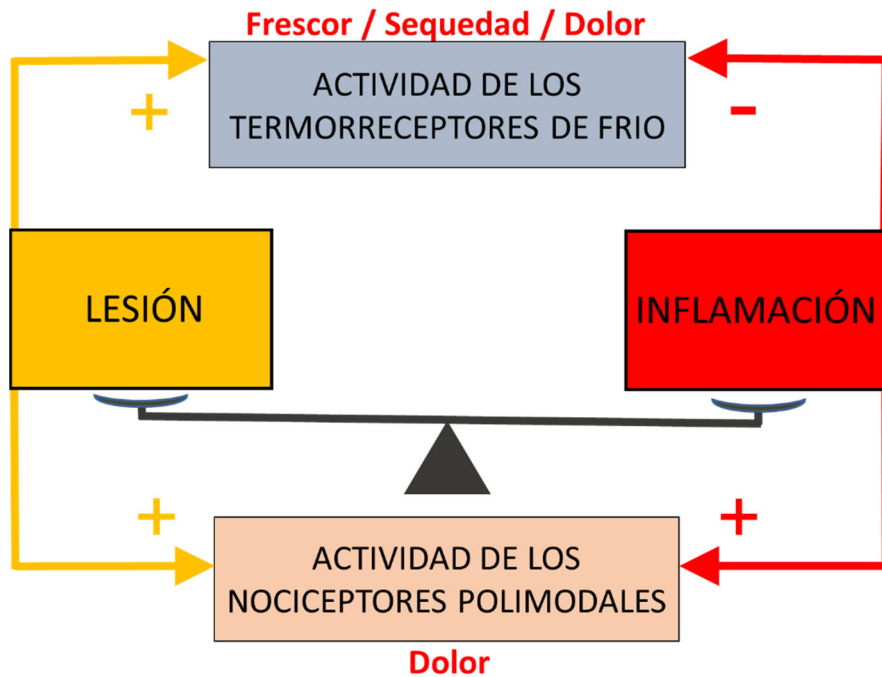


Figura 1.9. Representación esquemática de la influencia hipotética de la lesión nerviosa y la inflamación sobre las terminaciones sensoriales de las neuronas del ganglio trigémino que inervan la superficie ocular. La inflamación activa directamente y/o sensibiliza las fibras nociceptoras polimodales, causando dolor inflamatorio, mientras que el daño directo de las mismas, produce una actividad basal ectópica que evoca dolor neuropático. En el caso de los termorreceptores de frío, el daño nervioso induce una actividad basal anormal de los termorreceptores de frío que produce sensaciones de sequedad con componentes de frescor (sensación probablemente iniciada por la actividad de los receptores tipo HB-LT), aunque puede llegar a evocarse una sensación de sequedad dolorosa y desagradable, probablemente consecutiva a la activación de los termorreceptores de frío de tipo LB-HT. Por su parte, la inflamación, por sí sola, tiende a silenciar la actividad de los termorreceptores de frío.

1.4 LA ENFERMEDAD DE OJO SECO.

La enfermedad de ojo seco (DED por su denominación en inglés) es una de las enfermedades oculares actualmente más comunes, en la que clásicamente se ha contemplado la presencia de inflamación en el segmento anterior del ojo, si bien existe asimismo una clara lesión de su inervación. De hecho, la microscopía confocal en humanos reveló el desarrollo de cambios en el número, tortuosidad y patrón de ramificación de los nervios del plexo subbasal (Tuominen et al., 2003; Benítez-del-Castillo et al., 2007). La DED afecta entre el 5% y el 30% de la población mundial a cualquier edad, y tiene unos costes socioeconómicos muy altos para el sistema de salud (Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop, 2007).

La definición establecida en 2017 para esta patología ya reconoce el papel que juegan las alteraciones neurosensoriales en el desarrollo de la enfermedad: “*El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por la pérdida de la homeostasis de la película lagrimal, acompañada por síntomas oculares, en los cuales la inestabilidad de la película lagrimal y la hiperosmolaridad, la inflamación y el daño de la superficie ocular y las alteraciones neurosensoriales juegan papeles etiológicos*” (Belmonte et al., 2017).

Esta patología se clasifica de forma general como acuo-deficiente y evaporativa, teniendo en cuenta también si tiene carácter autoinmune. Así, el ojo seco aparece en un amplio espectro de enfermedades sistémicas que incluyen el síndrome de Sjögren, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Stevens Johnson, la fibromialgia, la diabetes o la enfermedad tiroidea, entre otras. Asimismo está presente en numerosas patologías oculares de diversa etiología como la alteración las glándulas de Meibomio, la blefaritis, la rosácea ocular, la lesión del globo ocular accidental o quirúrgica, las alteraciones accidentales, quirúrgicas o degenerativas de los párpados (blefaroplastia, lagofalmo, entropión/ectropión, etc.), siendo a veces secundaria al tratamiento con diversos fármacos (antihistamínicos, diuréticos, beta-bloqueantes, quimioterapia, etc.).

La principal característica del ojo seco es la alteración de la película lagrimal que puede darse por una disminución de la producción o por una pérdida de estabilidad por cambios en su composición. La *disminución de la producción* puede ocurrir por el bloqueo del reflejo de producción lagrimal, por infiltraciones de células inflamatorias en la glándula lagrimal y por la reducción del número de células caliciformes conjuntivales (Dry eye Workshop, 2007). La *disminución de la estabilidad* de la película lagrimal puede producirse por la disfunción en los agentes encargados de la producción de cualquiera de las capas mucosa, acuosa y lipídica que componen la película lagrimal (Mantelli et al., 2007). Disminuye la estabilidad de la película lagrimal si lo hacen los lípidos, producidos principalmente por las glándulas de Meibomio y responsables de retrasar la evaporación del contenido acuoso mientras que el ojo permanece abierto. Igualmente es inestable si varía la composición de las mucinas de la capa mucosa, que juegan un papel importante estabilizando la película lagrimal al facilitar su unión al

glicocálix de la capa más externa de células del epitelio corneal (Andrianifahanana et al., 2006; Blalock et al., 2007).

La secreción reducida de lágrima o la alteración de su estabilidad exponen al epitelio corneal a condiciones ambientales adversas. Cuando la película es inestable, la excesiva evaporación provoca un enfriamiento rápido de la superficie ocular así como un aumento de la osmolaridad de la lágrima en contacto con el epitelio corneal. El estrés producido por la desecación de la superficie del ojo estimula la liberación local de mediadores de la inflamación por las células epiteliales, los queratocitos y las células inmunes residentes de la córnea. La inflamación de la glándula lagrimal, propiamente dicha, también contribuye a la liberación de mediadores inflamatorios, que alcanzan la superficie del ojo con su secreción (Lam et al., 2009; VanDerMeid et al., 2012). En los primeros estadios de la enfermedad de ojo seco hay una resolución de la inflamación y de la alteración de los nervios oculares, pero es común que se cronifique el proceso inflamatorio y que la hipersensibilidad sensorial pueda hacerse persistente (von Hehn et al., 2012).

Como consecuencia del mantenimiento de la inflamación corneal durante un periodo de tiempo largo, se acaba produciendo una serie de pequeñas lesiones epiteliales que alteran la barrera epitelial, un proceso que aparece asimismo en la conjuntiva, donde se ha observado un aumento de la proliferación del epitelio y un descenso del número de células caliciformes y, en casos severos de DED, queratinización debida a una diferenciación anormal del epitelio. Este fenómeno de queratinización, aunque poco frecuente, también puede producirse en el epitelio de la córnea, por lo que algunos casos severos de DED acaban con pérdida de la transparencia corneal.

El mecanismo compensatorio inicial en respuesta a la inflamación ocular producida por el daño epitelial, es el aumento del reflejo de secreción lagrimal, pero con el tiempo, la inflamación que acompaña a la disfunción secretora crónica empeora y empiezan a producirse descensos en la sensación corneal que acaba influenciando la respuesta del reflejo y resultando en un empeoramiento de la película lagrimal (Stevenson et al., 2012). Esto se produce porque la inflamación crónica altera la

inervación tanto sensorial como autónoma que mantienen la homeostasis del tejido, alteraciones que conllevan a una disminución de la sensibilidad corneal y en consecuencia a una reducción del reflejo de secreción lagrimal (Lambiase et al., 2011). Resultados de nuestro grupo demostraron que como consecuencia de la deficiencia lagrimal crónica inducida por la extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal, los animales desarrollan cambios morfológicos de los nervios corneales, similares a los que cabría esperar tras la lesión nerviosa (Kovács, Luna, et al., 2016). Asimismo se producen cambios en la actividad basal y en la evocada por la estimulación natural en los distintos tipos de receptores sensoriales del ojo, que son transitorios (1-2 semanas) en los nociceptores y aparentemente permanentes en los termorreceptores de frío. Los cambios en las corrientes de Na^+ y K^+ encontrados en esta situación de deficiencia lagrimal crónica se asemejan a los descritos en el dolor neuropático (Kovács et al., 2016). Eso nos ha llevado a concluir que las alteraciones nerviosas que se dan como consecuencia de la deficiencia crónica de lágrimas se parece más a los esperados tras la lesión nerviosa que durante la inflamación de la superficie ocular.

Por otra parte, la alteración de los nervios sensoriales provocada por el ojo seco puede desencadenar la “*inflamación neurogénica*” (Beuerman & Stern, 2005; Mantelli et al., 2010) de la superficie ocular, principalmente derivada de la liberación local de varios neuropéptidos entre los que cabe destacar la SP y el CGRP, dos neuropéptidos que modulan varias funciones de las células epiteliales e inmunes de la córnea cuya concentración está alterada en la lágrima de los pacientes con ojo seco (Lambiase et al., 2011). El CGRP liberado por los nervios sensoriales activados y por las células inmunes, participa en la vasodilatación y la estimulación de extravasación de leucocitos (Springer et al., 2003). La sustancia P liberada por las terminaciones sensoriales actúa sobre células epiteliales e inmunes (mastocitos, macrófagos y células-T), lo que conlleva a su vez la liberación de citoquinas y quimiocinas (Mosimann et al., 1993). Se conoce además la presencia en la córnea del NPY, un neuropéptido con papel antiinflamatorio que es co-liberado por los nervios simpáticos de la córnea de mamíferos, especialmente en la zona limbal (Dartt et al., 1995).

En definitiva, las glándulas lagrimales, las estructuras que conforman la superficie ocular y los párpados, junto con su innervación sensorial y motora, tanto

somática como autónoma, forman un sistema integrado que se ha definido como “Unidad Lagrimal Funcional Integrada” (Mantelli et al., 2013) (**Figura 1.10**). Cualquier alteración que afecte a alguno de los elementos de esta unidad, bien sea por factores locales, sistémicos o ambientales, puede tener un papel importante en su trabajo integrado y, por tanto, en el desarrollo de la enfermedad de ojo seco.

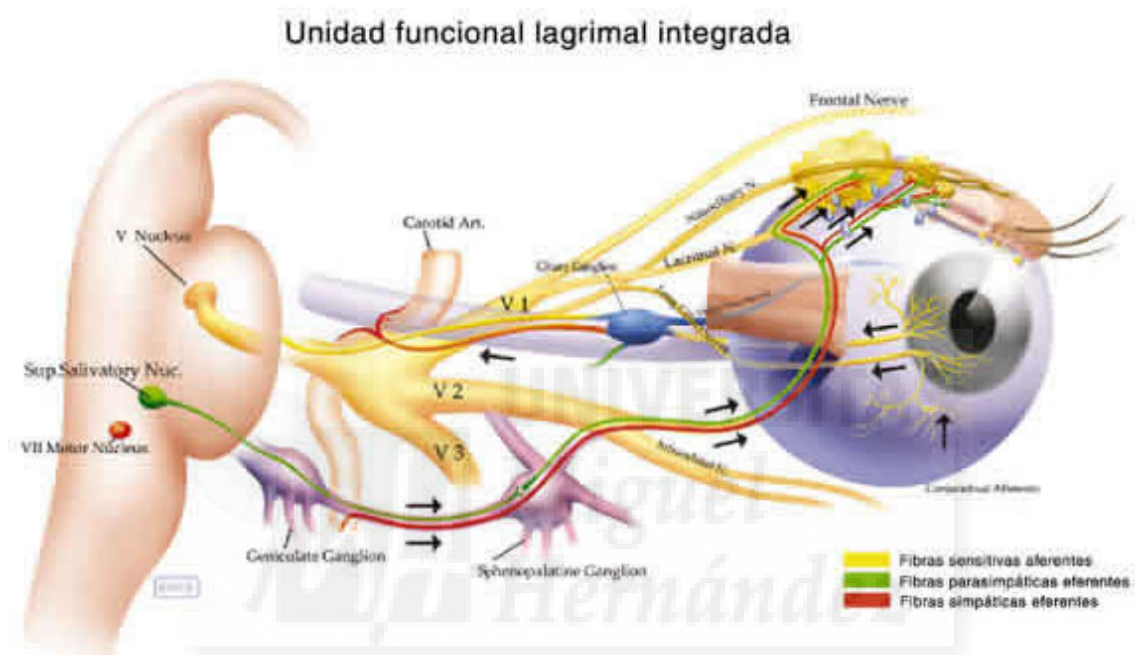


Figura 1.10. Representación esquemática de la unidad funcional lagrimal. En estado de vigilia, el flujo de lagrimación está modulado por impulsos reflejos procedentes de la superficie ocular y, en parte, de las fosas nasales que viajan por el nervio trigémino, cuyas neuronas envían sus axones centrales al complejo trigeminal del tronco-encéfalo. A su vez, estas neuronas hacen sinapsis sobre las del núcleo salivador superior, cuyos axones viajan hasta el ganglio esfenoopalatino, siendo estas neuronas postganglionares parasimpáticas las encargadas de incrementar la secreción de la glándula lagrimal (tomado de (Stern et al., 2004)).

1.5 LA CÓRNEA DE COBAYA COMO MODELO DE ESTUDIO.

Si bien no es un animal de uso muy extendido en el campo de la investigación ocular, el cobaya se ha usado para estudiar diferentes anomalías oculares, habiéndose obtenido gran cantidad de datos relevantes en el campo de diversas patologías y alteraciones oculares como la miopía, las cataratas, las enfermedades

retinianas y, especialmente, los procesos de cicatrización corneal (Bantseev et al., 2004; Giblin et al., 2002; Loeliger et al., 2004; McFadden et al., 2004).

La microscopia confocal *in vivo* en humanos ha servido durante años para evaluar la córnea en condiciones normales y patológicas (Ruggeri & Pajaro, 2002; Jalbert et al., 2003; Tervo & Moilanen, 2003; Kobayashi et al., 2006). También ha servido para explorar modelos animales que imitan esas patologías, por lo que actualmente se dispone de datos de córneas procedentes de conejos, ratas o ratón. (Grupcheva, Laux Fenton, Green, & McGhee, 2002; Jester et al., 2001; Petroll, Cavanagh, & Jester, 1993). Un trabajo de Cafaro y colaboradores (Cafaro et al., 2009) realizó estudios estructurales de la córnea de cobaya encontrando similitudes anatómicas con las córneas de conejo y algunas diferencias respecto a las córneas de rata o ratón (Labbé et al., 2006).

Los primeros registros electrofisiológicos focales de la actividad de las terminaciones nerviosas en la córnea, incluyendo la descripción de la existencia de los distintos tipos funcionales de receptores sensoriales corneales, se realizaron en el cobaya (Brock et al., 1998). Esta técnica electrofisiológica permite, mediante la aplicación de un electrodo de registro sobre la superficie corneal, registrar impulsos nerviosos generados en las terminaciones nerviosas intraepiteliales. Esta técnica ha servido para estudiar en profundidad los mecanoreceptores, los nociceptores polimodales y los termorreceptores de frío, inicialmente en la córnea de cobaya (Brock et al., 2001; Carr et al., 2003) y, posteriormente, en la de ratón (Parra et al., 2010; González-González et al., 2017). También es posible registrar la actividad eléctrica en los nervios ciliares de cobaya, una vez que abandonan el globo ocular, de manera que la combinación de ambas técnicas ha permitido el estudio completo de la actividad de los distintos tipos funcionales de nervios corneales y de su modificación durante la inflamación (Acosta et al., 2013; Acosta et al., 2014) y tras la lesión (Gallar et al., 2007; Acosta et al., 2007; Belmonte et al., 2007), así como de su modulación farmacológica (Quirce-Vázquez et al., 2008; Belmonte et al., 2009).

Junto con los estudios electrofisiológicos, se han llevado a cabo estudios histológicos para esclarecer la morfología de los nervios corneales y de sus terminaciones intraepiteliales. Si bien no existe una clara y simple correlación entre un determinado tipo morfológico y un determinado tipo funcional, al haberse descrito en el

ratón cómo tanto el fenotipo morfológico como el funcional no evolucionan a lo largo de la vida (Alcalde et al., 2018), el grupo liderado por James Brock propuso, usando de forma combinada técnicas electrofisiológicas y de inmunohistoquímica, la posible correlación entre morfología y tipo funcional de estas terminaciones sensoriales corneales en ratón y en cobaya (Ivanusic et al., 2013; Alamri et al., 2018). La existencia de abundantes datos bibliográficos, unido a la amplia experiencia de nuestro grupo de investigación en el registro electrofisiológico y en estudios de comportamiento en el cobaya, ha sido razón principal para utilizarlo como animal de experimentación en el presente trabajo.





OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que durante la inflamación y la lesión de la inervación corneal, los diferentes tipos de nervios sensoriales corneales presentan una actividad funcional alterada, presente también en la enfermedad de ojo seco, un proceso que cuenta con un bien conocido componente inflamatorio pero en el que, a medio-largo plazo, también parece producirse una lesión de los nervios corneales, al menos de los del plexo subbasal. En base a esto, nuestra hipótesis de partida es que durante la deficiencia lagrimal crónica se producen cambios en la actividad de todos los tipos de nervios sensoriales corneales (nociceptores mecánicos y polimodales, y termorreceptores de frío), siendo esta actividad alterada responsable de las alteraciones funcionales en la regulación de la lagrimación y el parpadeo, así como de las sensaciones anómalas evocadas desde la superficie ocular en la enfermedad de ojo seco.

Esas alteraciones de la actividad serían debidas a un aumento de la excitabilidad nerviosa, afectándose el umbral y la amplitud de la respuesta a la estimulación, y apareciendo actividad espontánea. La base molecular del aumento de excitabilidad estaría relacionada, preferentemente, con cambios en la funcionalidad y/o en la expresión de canales de Na^+ y de K^+ , por lo que el empleo de determinados bloqueantes de dichos canales permitiría revertir el incremento de excitabilidad de los nervios sensoriales alterados como consecuencia de la deficiencia lagrimal prolongada.

Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis es el definir los cambios en la actividad de los nervios sensoriales de la córnea durante la deficiencia lagrimal crónica y su modulación farmacológica por bloqueantes de canales de Na^+ y K^+ . A partir de este objetivo general, se establecen los objetivos específicos siguientes:

1. Definir los cambios en la frecuencia de parpadeo y la tasa de lagrimación basal consecutivos a la extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal en el cobaya, a fin de provocar una deficiencia lagrimal crónica experimental.

2. Describir los cambios en la actividad neural de los diferentes tipos de fibras nerviosas sensoriales que inervan la córnea (nociceptores mecánicos, nociceptores polimodales y termorreceptores de frío) en cobayas intactos (control) y en animales con deficiencia lagrimal crónica experimental.

3. Definir el efecto de varias moléculas que actúan como bloqueantes de la actividad de los canales de Na^+ o los de K^+ , sobre la actividad alterada de los nervios corneales en cobayas con deficiencia lagrimal crónica experimental.





MATERIAL Y MÉTODOS



3 MATERIAL Y MÉTODOS.

Los procedimientos utilizados para la realización de esta tesis están descritos con detalle en varios artículos del grupo de investigación (Acosta et al., 2013, 2014; Kovács, Luna et al., 2016; Kovács, Dienes, et al., 2016) en los que ha participado activamente la autora de la presente Memoria de Tesis Doctoral. Se resumen a continuación.

3.1 Animales.

Se usaron cobayas de la cepa Dunkin Hartley de ambos sexos (criados en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández o procedentes de ENVIGO, www.envigo.com) de edades comprendidas entre los 2 y 5 meses (200-1029g). Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales con acceso libre a la comida y bebida, y bajo ciclos controlados de luz-oscuridad de 12 horas.

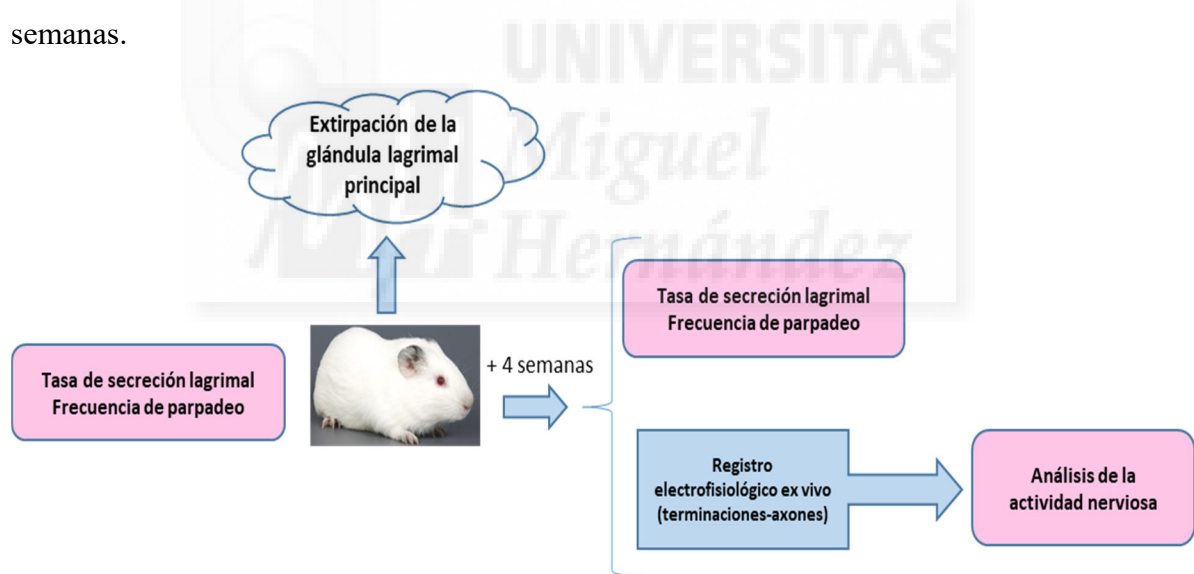
El estudio se realizó de acuerdo a la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, a la Directiva 2010/63/EU de protección del uso de animales de experimentación y a la Regulación Española, especialmente al *RD 53/2013 sobre normas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos*, y siguió los protocolos experimentales aprobados por la Consejería de Agricultura de la Generalidad Valenciana, como órgano competente. Además, los protocolos fueron aprobados y supervisados por el Órgano Evaluador de Proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

3.2 Procedimiento quirúrgico para la inducción de deficiencia lagrimal crónica.

Los cobayas con un mes de edad (200-300g) fueron anestesiados con ketamina (90mg/kg) y xilacina (5-10mg/kg) intraperitoneal y lidocaína tópica como refuerzo. Una vez anestesiados, fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico en el que se extrajeron las glándulas lagrimales principales. Para ello, tras realizar una incisión de 8-10 mm en la piel de la cara, por delante de la oreja, se expuso la cápsula fibrosa de la glándula lagrimal exorbitaria, que fue disecada y extraída cuidadosamente tras

cauterizar los vasos sanguíneos. A continuación, se aplicó una gota de antibiótico (tobramicina, 3mg/ml) y se suturó la incisión de la piel con hilo trenzado de seda (6.0). Tras recuperarse completamente de la anestesia, los animales se devolvieron a su jaula en la sala de estabulación, recibiendo tratamiento analgésico preventivo y tratamiento antibiótico en caso necesario. De acuerdo con el protocolo aprobado, la zona quirúrgica y la superficie ocular se valoraron regularmente para detectar la posible aparición de lesión o inflamación y actuar en consecuencia. La morfología palpebral y el reflejo de parpadeo en respuesta a la estimulación corneal se comprobaron postquirúrgicamente, aunque ninguno de ellos se afectó en ninguno de los animales operados.

Cuatro semanas después de la cirugía, se determinaron la frecuencia de parpadeo y la tasa de secreción lagrimal en condiciones basales. Posteriormente, los animales fueron sacrificados para proceder al registro electrofisiológico de las terminaciones o de las fibras (nervios ciliares) sensoriales corneales (**Figura 3.1**) en sendas preparaciones *ex vivo*. En algún caso excepcional, el tiempo de estudio tras la cirugía fueron 6 semanas.



*Figura 3.1. Representación esquemática del procedimiento experimental. Los cobayas de un mes de edad se sometieron a un procedimiento quirúrgico para la extirpación de la glándula lagrimal principal, situada fuera de la órbita en esta especie. Antes y transcurrido un mes desde la cirugía, se realizaron los procedimientos experimentales de medida de la tasa secreción lagrimal y de la frecuencia de parpadeo. Posteriormente se analizó la actividad nerviosa mediante técnicas de registro electrofisiológico convencional en preparaciones *ex vivo*.*

3.3 Frecuencia de parpadeo.

La frecuencia de parpadeo fue determinada antes y a diferentes tiempos tras la cirugía (1 y 4 semanas). Se contaron los parpadeos realizados por el animal durante un periodo de 5 minutos, mientras éste se movía libremente en una jaula de techo abierto de dimensiones 80x60x60 cm. El contaje se realizó de forma independiente por dos observadores diferentes (un ojo cada observador) que conocían la asignación del animal a un determinado grupo experimental.

De la misma manera que es posible encontrar una correlación entre la intensidad de un estímulo aplicado sobre la superficie ocular en los seres humanos y la magnitud subjetiva de la sensación de dolor evocada, medida por ejemplo con una escala analógica visual (Acosta, Belmonte & Gallar, 2001), se ha encontrado una correlación entre la intensidad del estímulo aplicado y el número de parpadeos o el de movimientos de rascado con la pata posterior realizados por los animales de experimentación como respuesta a la estimulación de la superficie ocular (Acosta et al, 2013, 2014; Aracil, 2019), por lo que podemos considerar que la medida de cualquiera de esos parámetros, el número de parpadeos o el de rascados con la pata posterior dirigidos al ojo, constituye una manera indirecta de la intensidad de la sensación de irritación o dolor evocada en los animales de experimentación. A diferencia de éstos, se ha sugerido que la realización de movimientos de lavado con las patas delanteras está asociada con las sensaciones de picor.

Como parte del presente trabajo, también se contaron los movimientos espontáneos de rascado (con las patas traseras) y de lavado (con las patas delanteras) del ojo en situación control y a 1 y 4 semanas de la extirpación de la glándula lagrimal. Sin embargo, los datos no se muestran ya que no se produjeron ninguno de estos movimientos de rascado con las patas posteriores o de lavado con las patas delanteras dirigidas hacia cualquiera de los ojos durante el periodo de 5 minutos en los que se realizaba el contaje, lo que sugiere la ausencia o un bajo nivel de irritación o dolor en los animales sometidos a deficiencia lagrimal crónica.

3.4 Medida de la tasa de lagrimación.

Inmediatamente después de valorar la tasa de parpadeo y los movimientos de rascado y lavado, se midió la tasa de secreción lagrimal en ambos ojos usando hilos comerciales de rojo fenol (Zone-Quick, Menicon, Tokio, Japón) sin anestesia tópica (Acosta et al., 2013; Acosta et al., 2014; Trost et al., 2007). Para colocar los hilos, el párpado inferior se retiraba suavemente y el extremo plegado del hilo se colocaba cuidadosamente en la zona nasal del saco conjuntival inferior, recolocando posteriormente el párpado (**Figura 3.2**). Después de un periodo de 30 segundos, el párpado inferior se volvía a separar con cuidado y se extraía el hilo suavemente. Los hilos, que son amarillos cuando están secos, cambian a un color anaranjado rojizo cuando se humedecen en contacto con la lágrima, ya que ésta tiene un pH superior a 6.8; de esta forma, la longitud del hilo (en mm) que se humedece y se tiñe de color naranja/rojo refleja la cantidad de lágrima recogida. En este trabajo se ha considerado la tasa de lagrimación como la longitud completa de la porción del hilo en mm, medida con una regla bajo un estereomicroscopio con una precisión de $\pm 0.5\text{mm}$. Los datos obtenidos en situación control y a diferentes tiempos tras la extirpación de la glándula lagrimal se tabularon para su posterior comparación estadística.

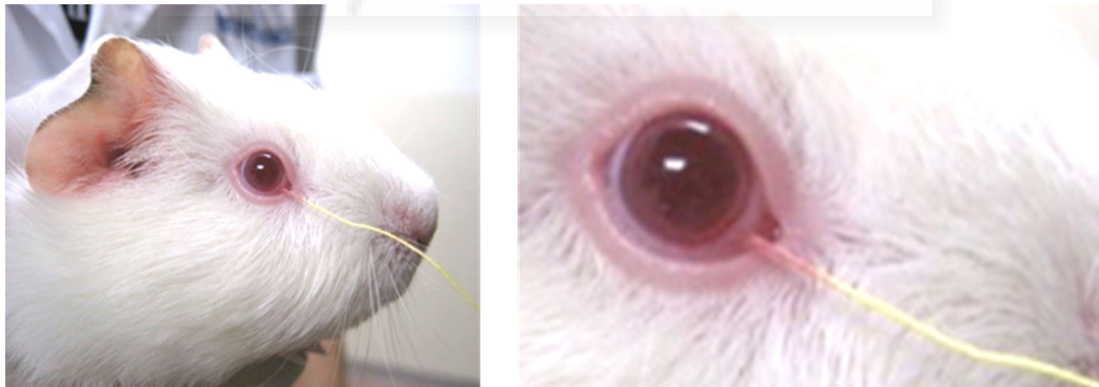


Figura 3.2. Colocación del hilo de rojo fenol empleado para medir la tasa de lagrimación en el cobaya. Los hilos se colocaron en la conjuntiva palpebral nasal (ver detalle en la ampliación de la imagen, a la derecha) para recoger la lágrima producida durante 30 segundos. El hilo de rojo fenol cambia del amarillo al rojo al contacto con la lágrima, al ser esta molécula un indicador de pH.

3.5 Registro electrofisiológico de la actividad de los receptores sensoriales corneales.

Mediante el registro extracelular de los impulsos de las terminaciones nerviosas con una micropipeta aplicada sobre la superficie de la córnea del cobaya ex vivo (Brock et al., 1998) se detecta con mayor facilidad la actividad de las terminales nerviosas receptoras de frío, mientras que con el registro extracelular de unidades en filetes diseccionados de los nervios ciliares, es más elevada la probabilidad de registrar la actividad de nociceptores polimodales y mecánicos (Brock et al., 1998; Brock et al., 2001; Acosta et al., 2013, 2014). Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizaron ambas preparaciones, de córnea aislada y de ojo entero con los nervios ciliares, para definir mejor la actividad neural de todos los diferentes tipos funcionales de los receptores sensoriales corneales.

El registro electrofisiológico se realizó en córneas de un grupo de animales control y en animales que habían sido sometidos a cirugía para extirpar la glándula lagrimal 1 o 4 semanas antes. A tal fin, los animales fueron sacrificados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (120mg/kg) y ambos ojos fueron inmediatamente enucleados junto con la conjuntiva bulbar y tarsal, el nervio óptico y los nervios ciliares, y se colocaron en la solución salina empleada para el registro a temperatura ambiente hasta su colocación en la cámara de registro.

3.5.1 Registro electrofisiológico de la actividad de las terminaciones nerviosas intraepiteliales en la córnea aislada.

Para este tipo de experimentos, las córneas fueron recortadas circularmente por el limbo con unas tijeras de iris, colocadas en una cámara de perfusión y sujetadas con pines entomológicos a la silicona (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) del fondo de la cámara de registro. Las córneas fueron perfundidas de forma continua a un flujo de 2.5ml/min con una solución fisiológica con pH ajustado a pH=7.4 mediante burbujeo con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) y con la siguiente composición (en mM): 133.4 NaCl; 4.7 KCl; 2 CaCl₂; 1.2 MgCl₂; 16.3 NaHCO₃; 1.3 NaH₂PO₄ y 9.8 glucosa. La temperatura de la solución con la que se perfundía el baño fue mantenida a 34°C (temperatura basal) gracias a una célula de Peltier. La actividad de las terminaciones

corneales fue registrada basándonos en la técnica descrita por Brock y colaboradores (Brock et al., 1998) para el registro de la actividad de las terminales corneales en una preparación de ojo entero de cobaya *ex vivo*, usando micropipetas de vidrio de aproximadamente 50 μ M de diámetro rellenas con la mencionada solución salina que se aplicaban sobre la superficie de la córnea con la ayuda de un micromanipulador y ejerciendo luego una ligera succión (Brock et al., 1998). Las señales eléctricas fueron registradas con respecto a una tierra de Ag/AgCl colocada en la cámara de registro, amplificadas (1000x, amplificador NL 103 AC, Digitimer, Welwyn, UK), filtradas (high pass 1 Hz, low pass 5 KHz; NL 125/NL 126 filter, Digitimer) y almacenadas en un ordenador para su posterior análisis, usando una interfaz CED (CED micro1401 MK II, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) y el software Spike2 (v7.0, también de CED).

Protocolo experimental. La actividad eléctrica de los termorreceptores de frío se identificaba al comenzar el registro por su disparo espontáneo, a veces de relativa alta frecuencia y ocasionalmente en ráfagas, que se incrementaba con el enfriamiento y disminuía o incluso se silenciaba al completo al calentar la solución de perfusión (Gallar et al., 1993; Brock et al., 1998; Parra et al., 2010; Acosta et al., 2013) . Se registraba la actividad a temperatura basal (34°C) durante, al menos, 2 minutos antes de aplicar una rampa de enfriamiento desde 34° hasta 20°C de unos 30 segundos de duración, obtenida al descender la temperatura de la solución del baño con el sistema Peltier (tasa media de enfriamiento $\approx -0.5^\circ\text{C/s}$). Seguidamente, se recuperaba la temperatura basal de 34° mediante el recalentamiento de la solución y, tras un periodo de 2 minutos, la temperatura del baño se incrementaba hasta 50°C durante unos 30 segundos (tasa media de calentamiento $\approx +0.5^\circ\text{C}$).

En la **Figura 3.3** se muestra un esquema de la configuración empleada para el registro extracelular de la actividad de las terminaciones en la córnea aislada de cobaya.

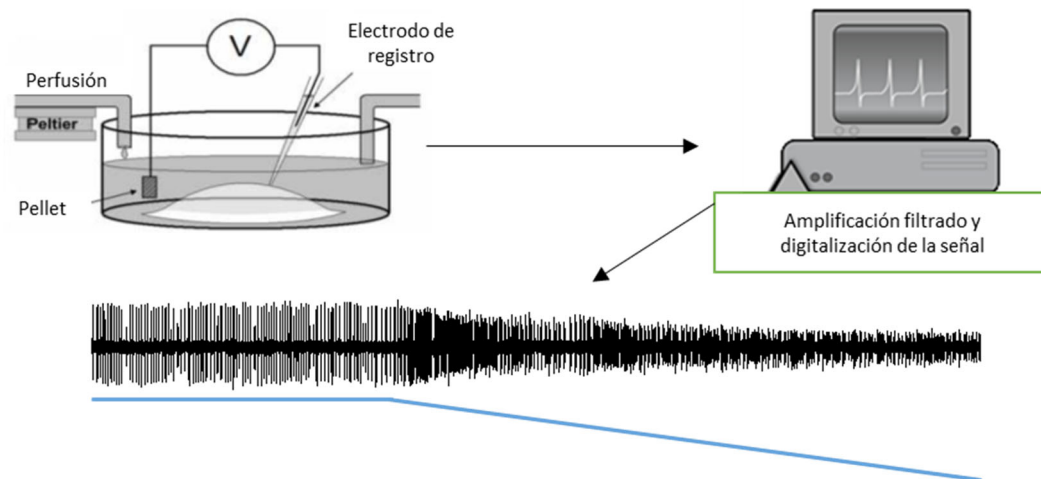


Figura 3.3. Esquema de la configuración empleada para el registro electrofisiológico de la actividad de las terminaciones sensoriales en la córnea aislada. La actividad eléctrica de la superficie corneal se registró aplicando una micropipeta de vidrio, en referencia a una pieza de Ag/AgCl (pellet) colocada en el fondo de la cámara de registro. La señal eléctrica, junto con el registro de la temperatura de la solución de perfusión (línea azul) se amplificaba y filtraba, y a continuación se digitalizaba usando una interfaz y el software adecuados, hasta su análisis off-line. En la parte inferior de la figura se muestra un ejemplo de la actividad de un termorreceptor de frío en respuesta al enfriamiento de la solución de perfusión.

Para establecer el efecto de los diferentes fármacos bloqueantes de canales de Na^+ y K^+ , tras caracterizar la actividad espontánea y evocada de la unidad en condiciones basales, se cambiaba la solución de perfusión por otra conteniendo la molécula objeto de estudio, a la concentración deseada. Se perfundía con la solución conteniendo el fármaco durante un periodo de tiempo determinado (entre 8 y 10 minutos, ver apartado 3.6), periodo durante el que se aplicaba de nuevo una rampa de enfriamiento. Se volvía a perfundir de nuevo con la solución control, hasta el final del experimento. Para determinar el curso temporal de los posibles efectos de los bloqueantes estudiados, se repetía el registro de la actividad basal y la evocada en respuesta al enfriamiento cada 15 minutos durante periodos entre 15 min y una hora tras al final de la perfusión con el fármaco (ver detalles en el apartado 3.6).

3.5.2 Análisis de la actividad eléctrica de las terminaciones nerviosas registradas en la córnea aislada.

Aunque los impulsos nerviosos fueron identificados durante la realización del registro, el análisis se realizó off-line. Como se ha indicado en el apartado anterior, las señales eléctricas se grabaron, junto con la temperatura del baño, en un ordenador. Las señales almacenadas, se analizaron posteriormente empleando el software Spike2, que

permite diferenciar las unidades grabadas en base a su amplitud y morfología. Si bien en el presente trabajo sólo se consideraron los registros con una única unidad activa, esta capacidad del programa nos habría permitido analizar separadamente la actividad de varias unidades, en su caso.

Para describir la actividad basal y evocada por la estimulación térmica con una rampa de frío, así como para establecer el efecto de los diferentes bloqueantes de canales estudiados sobre las mismas, se calcularon numerosos parámetros. No obstante, en base a los resultados de otros trabajos de nuestro grupo (Acosta et al, 2013, 2014), finalmente para definir la actividad espontánea y la respuesta al frío de cada terminación termosensible registrada, en el presente trabajo sólo se han analizado los siguientes parámetros (**Figura 3.4**):

- a) *Actividad basal (o actividad espontánea)*: número medio de impulsos de la terminal nerviosa (NTI) registrados durante los 30s inmediatamente anteriores a la realización de la rampa de enfriamiento (en impulsos/s).
- b) *Umbral de frío*: valor de la temperatura (en °C) durante la rampa de enfriamiento a la que se producía un aumento de al menos el 25% de la frecuencia media basal a 34°C. En ocasiones este parámetro no se muestra como el valor absoluto de la temperatura a la que aumenta la actividad, sino como el cambio de temperatura necesario para ello, en $\Delta^{\circ}\text{C}$.
- c) *Respuesta máxima al frío (o frecuencia pico)*: máximo valor de frecuencia (en Hz) alcanzado durante la rampa de enfriamiento.
- d) *Temperatura a la que se alcanza la respuesta máxima al frío (temperatura en la frecuencia pico)*: valor de temperatura (en °C) a la cual se alcanza la respuesta pico durante una rampa de enfriamiento.

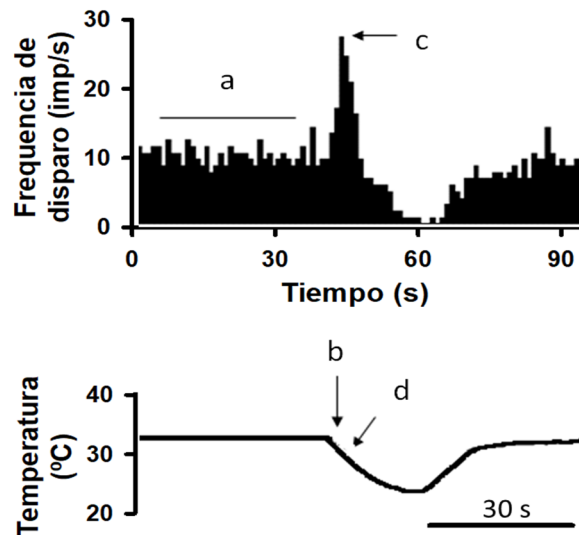


Figura 3.4. Parámetros de respuesta al enfriamiento medidos en los termorreceptores de frío. En el trazo superior se representa la frecuencia por segundo de la actividad eléctrica de los impulsos eléctricos y en el trazo inferior, la temperatura del baño. Los parámetros analizados fueron: la actividad basal o frecuencia media a la temperatura basal (a), el umbral de respuesta a frío (b), respuesta máxima al frío o frecuencia pico (c) y la temperatura a la que se alcanza la respuesta máxima (d).

3.5.3 Registro extracelular de la actividad de fibras nerviosas corneales en los nervios ciliares.

El tejido conectivo y los músculos extraoculares fueron cuidadosamente retirados para exponer la parte posterior del ojo con los nervios ciliares alrededor del nervio óptico. A continuación, el ojo fue colocado en una cámara doble especialmente diseñada para poder perfundir de manera separada el segmento anterior del ojo (córnea y conjuntiva) y el polo posterior del ojo con los nervios ciliares. En la parte frontal de la cámara, la conjuntiva se fijó con pines entomológicos a la placa que separa ambos compartimentos. El compartimento anterior fue perfundido continuamente con solución salina fisiológica a 34°C empleando una bomba de perfusión (Masterflex peristaltic pump, Cole-Parmer). En el compartimento trasero de la cámara se rellenó con aceite mineral, colocando filamentos diseccionados de los nervios ciliares sobre un electrodo de Ag-AgCl para el registro monopolar de la actividad de unidad única, usando un equipo de electrofisiología convencional (ganancia x10000, *high pass* 300 Hz, *low pass* 3 KHz; amplificador DAM50, WPI, Sarasota, FL, USA). Las señales eléctricas fueron transferidas a un ordenador con una interfaz CED y el software Spike2, hasta su posterior análisis (**Figura 3.5**).

Protocolo experimental. La actividad basal de la unidad seleccionada fue registrada durante 1 minuto antes de cualquier estimulación. Se localizaba el campo receptor de la fibra aferente corneal registrada mediante la estimulación mecánica con un pincel fino primero y después se determinaba el umbral mecánico usando pelos de von Frey calibrados (rango 0.25-4.00mN, Bioseb Vitrolles, Francia). Para la estimulación química, se aplicaba durante 30 segundos un pulso de gas con CO₂ al 98.5% (0.1 atmósferas de presión) mediante una pipeta de vidrio colocada a 5 mm del campo receptor corneal y perpendicular al mismo. La estimulación térmica se realizó calentando (hasta 45°C) o enfriando (hasta 20°C) la solución de perfusión de la parte anterior desde la temperatura basal de 34°C, utilizando un Peltier construido al efecto.

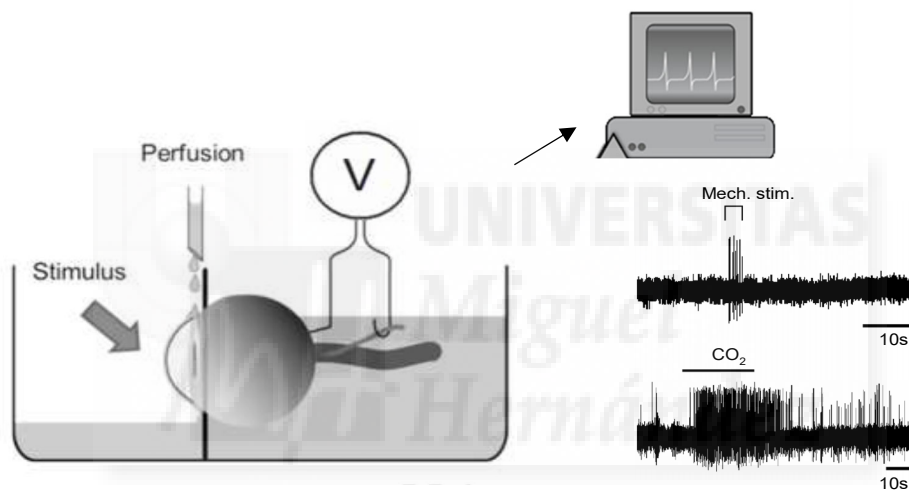


Figura 3.5. Esquema de la configuración empleada para el registro de la actividad eléctrica de los nervios ciliares del cobaya. El ojo se colocaba en una cámara compuesta por dos compartimentos separados. Se disecaba un filamento de los nervios ciliares y se colocaba sobre un electrodo de Ag-AgCl para el registro monopolar en relación con una tierra colocada en la cámara. Tras identificar una unidad activa en el filamento nervioso, se registraba su actividad eléctrica. La señal se amplificaba, filtraba, digitalizaba y almacenaba para su análisis off-line. Se muestra un ejemplo de la respuesta de un nociceptor polimodal corneal a la estimulación mecánica con un pincel (registro superior) y a la estimulación con CO₂ (registro inferior).

Las unidades individuales fueron discriminadas off-line de acuerdo con su amplitud y forma, empleando el software Spike2. De entre los parámetros cuantificables, en base a la experiencia de estudios similares, para describir la actividad espontánea y evocada por la estimulación, así como para establecer el efecto de los diferentes bloqueantes de canales iónicos, finalmente se han analizado solo los siguientes parámetros (Acosta et al., 2013; 2014):

- a) *Umbral mecánico*: intensidad (en mN) del menor estímulo mecánico, realizado con pelos de von Frey calibrados, que evoca una respuesta al menos la mitad de las veces que se aplica sobre el campo receptor de la unidad con sensibilidad a la estimulación mecánica.
- b) *Actividad espontánea*, expresada como la frecuencia media de disparo (en impulsos/s) medida durante 30s al inicio del registro y, posteriormente, durante los periodos entre estímulos.
- c) En las respuestas a CO₂:
 - *Latencia*: tiempo (en segundos) transcurrido desde el inicio del pulso de CO₂ y el primer impulso disparado por la unidad.
 - *Respuesta media al CO₂*: frecuencia media de disparo (en impulsos por segundo) desde el inicio hasta el fin del pulso de CO₂.
 - *Postdescarga*: frecuencia media de disparo (imp/s) durante los 30s inmediatamente posteriores a la finalización del pulso de CO₂.

En la **Figura 3.6** se representan los diferentes parámetros analizados en un receptor polimodal registrado en el ojo de cobaya en respuesta a la estimulación química con CO₂.

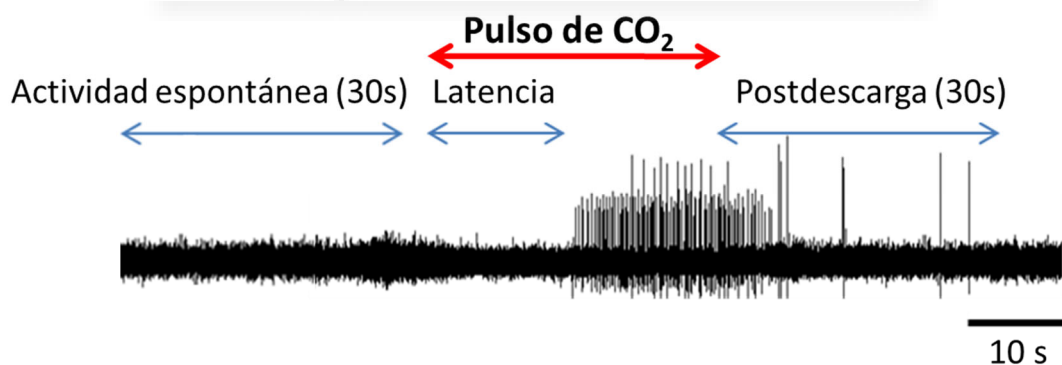


Figura 3.6. Ejemplo de registro de un receptor polimodal en un nervio ciliar de cobaya en respuesta a un estímulo químico con un pulso de CO₂, mostrando los diferentes parámetros analizados: actividad espontánea previa, latencia, respuesta media durante la aplicación del estímulo y postdescarga.

3.6 Fármacos

En diversos experimentos de registro de terminales en córnea aislada, se probaron diferentes fármacos moduladores de la actividad de los canales iónicos permeables a Na^+ y K^+ para evaluar su efecto sobre la actividad de los termorreceptores de frío registrados en córneas de animales control y de animales con deficiencia lagrimal crónica durante 4 semanas.

De manera general, los fármacos se disolvieron según las indicaciones de solubilidad del proveedor, realizando un stock concentrado. A partir de ese stock, el día del experimento se preparaba un volumen determinado de solución de registro conteniendo el fármaco a la concentración que se necesitase. En la **Tabla 3.1** se resumen las moléculas empleadas en el presente trabajo, con indicación de las dosis estudiadas en cada caso.

Tabla 3.1. Bloqueantes de canales de Na^+ y de canales HCN empleados en este trabajo, con indicación de la/las concentraciones ensayadas.

	FÁRMACO	CONCENTRACIÓN
Bloqueantes de canales de Na^+	Lidocaína	100 μM
	Lacosamida	100 μM
	Hainantoxin-IV	100nM
Bloqueantes de canales HCN	Ivabradina	30-100-300 μM
	Cilobradina	30-100-300 μM
	Zatebradina	30-100-300 μM

3.6.1 Bloqueantes de canales de sodio.

3.6.1.1 Lidocaína

La lidocaína es un bloqueante no selectivo de canales de Na⁺ que se supone facilita la terminación del potencial de acción. Fue adquirida de la casa comercial Sigma-Aldrich y, en base a experimentos previos (Belmonte et al, 2007, 2008; Quirce et al, 2008), se probó a 100 µM añadiéndola a la solución del baño. Se perfundió en períodos de 10 minutos durante los que se exploró también la respuesta al enfriamiento. La perfusión con el fármaco fue seguida de un lavado con la solución control durante 15-30 minutos.

3.6.1.2 Lacosamida

La lacosamida, bloqueante selectivo de canales de Na⁺, inactiva lentamente el canal aumentando el periodo refractario del potencial de acción y disminuyendo la excitabilidad neuronal (Beyreuther, Callizot, et al., 2007; Beyreuther, Freitag, et al., 2007). Se probó también a 100 µM añadiéndola a la solución del baño durante un tiempo de 10 minutos durante los que se exploró también la respuesta al enfriamiento. La perfusión con el fármaco fue seguida de un lavado con la solución control durante 15-30 minutos.

3.6.1.3 Hainantoxina IV

La Hainantoxina IV es un veneno procedente de una araña que bloquea de manera selectiva los canales de sodio sensibles a TTX (TTX-S) (Liu et al., 2003; Li et al., 2004). Fue adquirida de la casa comercial Smartox Biotechnoloy y resuspendida a una concentración stock de 50.2 µM en agua destilada. El día del experimento, se preparó a 100 nM en la solución de registro. Para estudiar su efecto, el fármaco fue añadido a la solución salina fisiológica y perfundido durante 90 segundos. La actividad espontánea y la respuesta al enfriamiento se exploraron de nuevo a los 15 y 30 min de la exposición a la toxina.

3.6.2 Bloqueantes de canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos (HCN).

3.6.2.1 *Ivabradina*

Este agente antirrítmico fue adquirido de la casa comercial Sigma-Aldrich en forma de clorhidrato de ivabradina, con la que se preparó una solución stock de 33 mM en agua destilada. El día del experimento, se preparó solución de registro conteniendo el fármaco a 30, 100 o 300 μM , con la que se perfundió durante 8 minutos, periodo durante el que se exploró la respuesta a una rampa de frío. La respuesta a la estimulación térmica se repitió a diferentes tiempos de lavado tras la aplicación del fármaco (30 y 60 minutos).

3.6.2.2 *Cilobradina*

Este bloqueante de canales HCN fue adquirido en la casa comercial Sigma-Aldrich en forma de clorhidrato de cilobradina (DK-AH-269), con el que se preparó una solución stock de 24.1 mM en agua destilada. El día del experimento se preparó el fármaco a 30, 100 ó 300 μM diluyéndolo en solución salina de registro. El protocolo experimental para valorar su efecto fue el mismo que el descrito para la ivabradina.

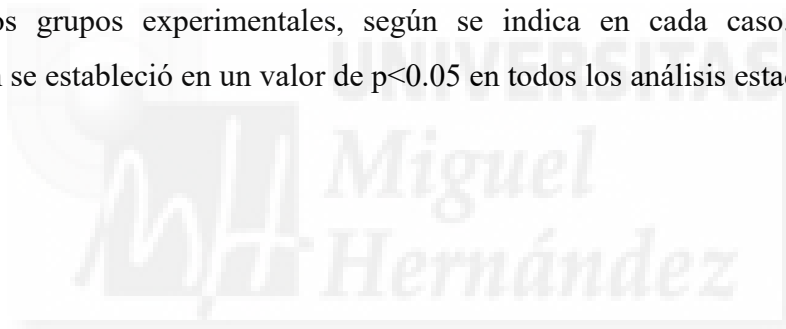
3.6.2.3 *Zatebradina*

La Zatebradina fue comprada también a la casa comercial Sigma-Aldrich en forma de clohidrato de zatebradina, resuspendida en una solución stock de 10.14 mM en agua destilada. El día del experimento se preparó el fármaco a 30, 100 ó 300 μM diluyéndolo en solución salina de registro. El protocolo experimental para valorar su efecto fue el mismo que el descrito para los otros dos fármacos bloqueantes de canales HCN.

3.7 Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos para determinar la normalidad, el tamaño muestral y la sensibilidad de los diseños experimentales y el grado de significación se hicieron empleando en software de análisis de datos SigmaStat 3.5 (Systat Software, Erkrath, Germany). El análisis previo del tamaño muestral y la potencia del test es requerido por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández, como requisito para aprobar los procedimientos en los que se usan animales en investigación.

En la presente memoria, tras el análisis de la normalidad de los datos, la mayoría de los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM), siendo “n” el número de terminaciones nerviosas, fibras, córneas o animales explorados, según se indique. Los datos fueron comparados usando el test paramétrico (ocasionalmente, su equivalente no paramétrico) más adecuado para realizar la comparación deseada entre uno o varios grupos experimentales, según se indica en cada caso. El nivel de significación se estableció en un valor de $p < 0.05$ en todos los análisis estadísticos.







RESULTADOS



4 RESULTADOS

4.1 Efectos de la deficiencia lagrimal crónica.

4.1.1 Cambios en la tasa de lagrimación y la frecuencia de parpadeo.

Mediante la extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal se desarrolló el modelo de deficiencia lagrimal crónica en cobaya, confirmándose, una semana tras la operación, la reducción de un 30% de la tasa de lagrimación. Ésta se mantuvo disminuida hasta la última medición, realizada un mes después de la intervención ($p < 0.001$, one way-ANOVA de medidas repetidas; **Figura 4.1A**). En el ojo contralateral también se observó una disminución significativa de la tasa de lagrimación tras cuatro semanas (**Figura 4.1B**)

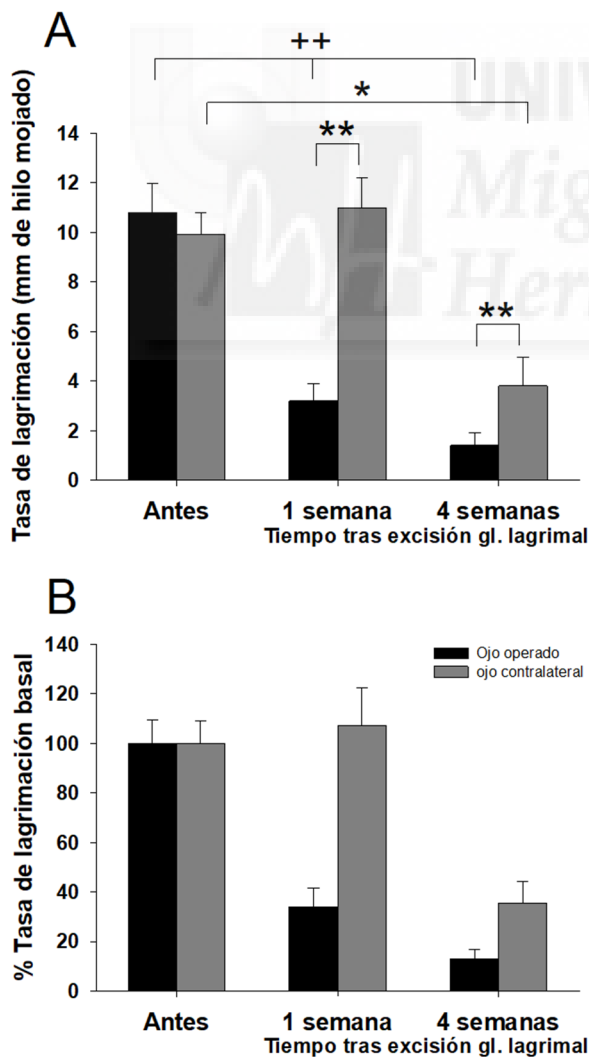


Figura 4.1. Tasa de lagrimación expresada en valores absolutos (A) y como porcentaje de la tasa de lagrimación basal (B), determinada antes y a diferentes tiempos (1 y 4 semanas) tras la extirpación unilateral de la glándula lagrimal principal en el cobaya ($n=5$). Se muestran los valores obtenidos en el ojo operado (color negro) y en el ojo contralateral (color gris). ++ $p < 0.001$, One-way ANOVA de medidas repetidas, con test de rango post-hoc de Dunnett (**). * $p < 0.05$, test de pares, diferencias en la tasa de lagrimación antes y después de la cirugía.

La frecuencia de parpadeo basal, medida en ambos ojos, aumentó ligeramente con respecto a los controles, una semana después de la cirugía (2.4 ± 0.6 vs 1.6 ± 0.3 parpadeos/minuto. $P=0.208$, t-test de pares) aunque este parámetro volvió a los valores basales a las 4 semanas tras la cirugía (**Figura 4.2**).

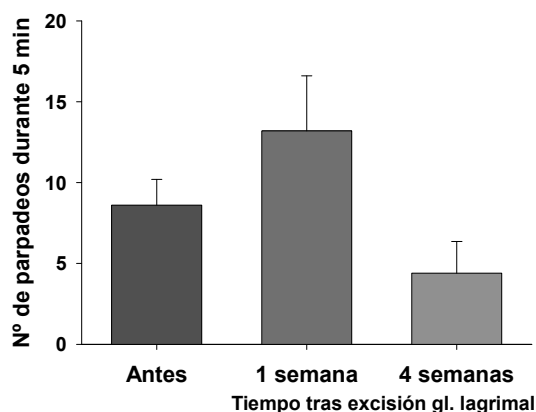


Figura 4.2. Frecuencia de parpadeo (determinada como el número de parpadeos durante 5 minutos) antes y a diferentes tiempos (1 y 4 semanas) tras la extirpación unilateral de la glándula lagrimal principal en el cobaya ($n=5$).

4.1.2 Cambios en la actividad de los nervios sensoriales corneales.

4.1.2.1 Nociceptores

Las fibras nociceptoras corneales fueron registradas utilizando la preparación *ex vivo* de los nervios ciliares. En base a la ausencia o presencia de respuesta a la estimulación química con CO_2 al 98.5%, las unidades registradas se clasificaron como mecano-nociceptores o nociceptores polimodales (Belmonte et al., 1991; Belmonte & Giraldez, 1981; Gallar et al., 1993; Chen et al., 1995). Las características funcionales de ambos tipos de receptores sensoriales están resumidas en la **Tabla 4.1**.

Una semana después de la extirpación de la glándula lagrimal, los umbrales mecánicos de los nociceptores mecánicos y polimodales no se modificaron significativamente respecto al control. Sin embargo, aumentó el número de fibras con actividad espontánea, tanto en el caso de los mecano-nociceptores (38% vs 7%; $p<0.05$, Z-test) como en el de los nociceptores polimodales (33% vs 9%; $p<0.05$, Z-test). Igualmente, la frecuencia media de actividad espontánea de los mecano-nociceptores que presentaban disparo espontáneo fue significativamente más alta que en el caso de las córneas control (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Propiedades generales de las fibras mecano-nociceptoras y nociceptoras polimodales registradas en córneas control y en córneas de animales sometidos durante diferentes tiempos a deficiencia lagrimal experimental por extirpación de la glándula lagrimal principal. Los datos son media \pm SEM. n= número de fibras. Cifras entre paréntesis: número de fibras con actividad espontánea/número de fibras registradas. * $p < 0.05$, t-test.

	Control	Tiempo con deficiencia lagrimal	
		1 semana	4 semanas
Mecano-nociceptores	n=55	n=17	n=12
Diámetro del campo receptor (mm)	3.85 \pm 0.08	3.19 \pm 0.17	2.70 \pm 0.26
Actividad espontánea (imp/s)	0.02 \pm 0.02 (4/55)	0.30 \pm 0.22 * (6/16)	0.00 \pm 0.00 (0/12)
Umbral mecánico (mN)	0.89 \pm 0.13	0.52 \pm 0.11	0.61 \pm 0.15
Nociceptores polimodales	n=34	n=27	n=8
Diámetro del campo receptor (mm)	3.65 \pm 0.12	3.19 \pm 0.17	2.88 \pm 0.30
Actividad espontánea (imp/s)	0.09 \pm 0.09 (3/34)	0.36 \pm 0.31 (9/27)	0.00 \pm 0.00 (0/8)
Umbral mecánico (mN)	0.32 \pm 0.02	0.45 \pm 0.10	0.29 \pm 0.0

También se observó que los nociceptores polimodales de las córneas sometidas a deficiencia lagrimal durante una semana presentaban una mayor frecuencia de disparo en imp/s ($p < 0.05$) en respuesta a la estimulación química con CO₂ (Tabla 4.2) e, incluso, en alguno de los nociceptores polimodales se produjeron descargas paroxísticas ocasionales tras la aplicación del pulso de CO₂. Además, la latencia de la respuesta fue más corta ($p < 0.001$), aunque, en contraste, la postdescarga sólo aumentó ligeramente ($p = 0.113$, Tabla 4.2). Estos cambios parecen reflejar el desarrollo de sensibilización de los nociceptores polimodales corneales en los días siguientes a la extirpación de la glándula lagrimal si bien en principio no parece deberse al desarrollo de inflamación ocular, ya que los ojos de los animales operados no presentaron ningún signo clínico de inflamación en este periodo.

Cuatro semanas después de la cirugía, la proporción de fibras mecano-nociceptoras y polimodales con actividad espontánea retornaron a niveles normales (Tabla 4.2). También presentaron valores similares al control los umbrales mecánicos. Por el contrario, la respuesta a la estimulación con CO₂ de los nociceptores polimodales

permaneció incrementada y comenzaba con una latencia menor que en las córneas control (Tabla 4.2, Figura 4.3).

Tabla 4.2. Características de la respuesta a un pulso de CO₂ de los nociceptores polimodales corneales registrados en córneas intactas (control) y sometidas a deficiencia lagrimal durante diferentes tiempos mediante la extirpación de la glándula lagrimal principal. Los datos son media ± SEM, n= número de fibras. *p<0.05, ***p<0.001, One way-ANOVA con test de Dunnett.

	Control	Tiempo con deficiencia lagrimal	
		1 semana	4 semanas
Nociceptores polimodales	n=18	n=25	n=8
Actividad previa (imp/s)	0.07 ± 0.07	0.23 ± 0.06***	0.06 ± 0.01
Latencia (s)	18.3 ± 1.8	9.4 ± 1.6 ***	9.8 ± 3.9 *
Tasa media de disparo (imp/s)	1.34 ± 0.23	2.93 ± 0.50 *	3.01 ± 1.02 *
Postdescarga (imp/s)	0.81 ± 0.19	3.17 ± 0.86	1.40 ± 0.38

Cornea control

Pulso de CO₂



Cornea con deficiencia lagrimal

Pulso de CO₂

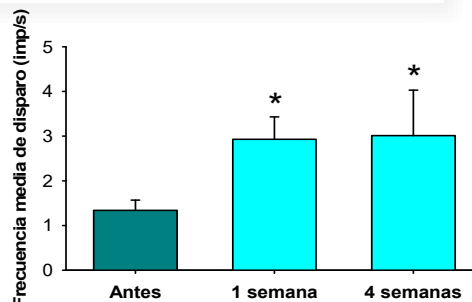


Figura 4.3. Sensibilidad química de las fibras nerviosas nociceptoras polimodales registradas en córneas control y con deficiencia lagrimal durante 1 o 4 semanas por extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal. Izquierda: Ejemplos de registro de la respuesta de fibras nociceptoras polimodales corneales a un pulso de CO₂ de 30 s de duración aplicado sobre su campo receptor, registradas en un ojo control (arriba) y en un ojo sometido a 4 semanas de deficiencia lagrimal (abajo). Las barras indican la duración del estímulo. Destaca que la actividad evocada por el CO₂ sobrepasa en ambos casos la duración del estímulo (postdescarga). Derecha: Frecuencia media de disparo de las fibras nociceptoras polimodales en respuesta a un pulso de CO₂ en córneas control (n=18) y córneas con deficiencia lagrimal durante 1 semana (n=25) o 4 semanas (n=8). Los datos son media ± SEM; p<0.001, One-way ANOVA con test de Dunnett (*p<0.05).

4.1.2.2 Termorreceptores de frío.

En córneas intactas, los termorreceptores de frío mostraron, de manera característica, un disparo espontáneo a la temperatura basal de 34°C que aumentó marcadamente al enfriar la solución de perfusión. Cuatro semanas tras la extirpación de la glándula lagrimal principal, se encontró un aumento significativo de esa frecuencia basal de disparo a 34°C, y también de su respuesta al enfriamiento, en comparación con los datos de animales control, como se muestra en los ejemplos de la **Figura 4.4**.

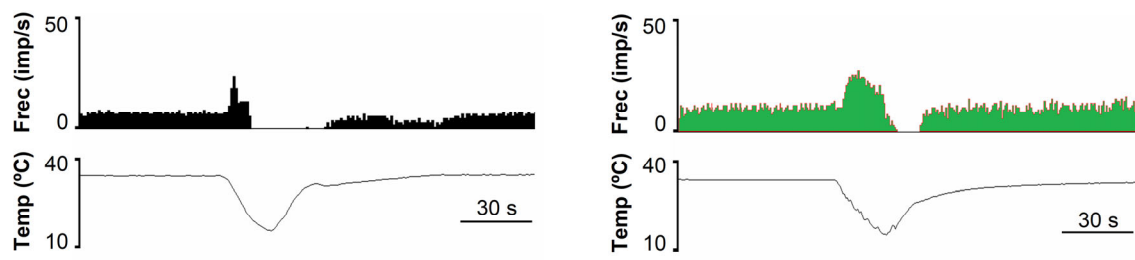


Figura 4.4. Ejemplo de la actividad basal y evocada por una rampa de frío en terminaciones nerviosas sensibles a frío registradas en una córnea intacta (izquierda) y en una córnea con deficiencia lagrimal experimental durante 4 semanas (derecha). Se muestra la actividad en frecuencia por segundo (trazados superiores) y la temperatura de la solución de perfusión (trazados inferiores).

Los efectos de la deficiencia lagrimal durante 4 semanas sobre los diferentes parámetros analizados (actividad a temperatura basal, umbral de respuesta al enfriamiento, respuesta máxima al frío y temperatura a la frecuencia pico) están resumidos en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3. Características de la actividad espontánea a 34°C y la evocada por una rampa de frío (de 34° a 20°C) de los termorreceptores de frío corneales de córneas control y con deficiencia lagrimal, a diferentes tiempos (1 y 4 semanas) después de la extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal. Los datos son media \pm SEM, n= número de terminaciones nerviosas. * $p < 0.05$, one-way ANOVA con test de Dunnett.

	Control	Tiempo con deficiencia lagrimal	
		1 semana	4 semanas
Actividad basal (imp/s)	10.27 \pm 0.78	10.50 \pm 0.59	13.22 \pm 1.00*
Umbral de frío (°C)	29.87 \pm 0.35	32.37 \pm 0.13*	32.42 \pm 0.14*
Frecuencia pico (Hz)	25.29 \pm 1.79	28.51 \pm 1.37	31.12 \pm 1.80*
Temperatura en la frecuencia pico (°C)	27.46 \pm 0.53	28.28 \pm 0.33	28.68 \pm 0.28
	n=45	n=93	n=57

La *actividad basal*, es decir la frecuencia media de impulsos nerviosos de las terminales a la temperatura basal de 34°C, no mostró diferencias significativas después de una semana de deficiencia lagrimal, pero fue significativamente más alta a las 4 semanas de la cirugía (**Figura 4.5**).

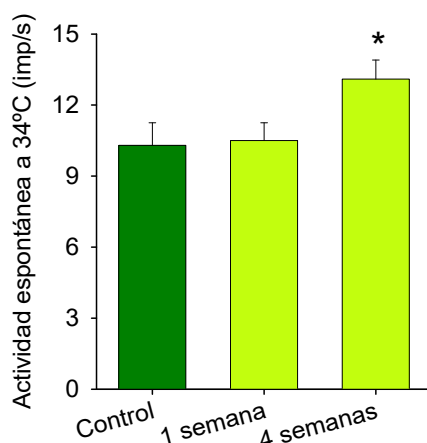


Figura 4.5. Actividad espontánea de disparo de las terminaciones sensibles a frío a la temperatura basal de 34°C (frecuencia media de disparo, en imp/s) en córneas control y con deficiencia lagrimal a diferentes tiempos tras la cirugía. Los datos son media \pm SEM.; control, n=45; 1 semana, n=93; 4 semanas, n=57. * $p < 0.05$, One Way ANOVA con test de Dunnet.

En cuanto al *umbral de respuesta al enfriamiento*, se encontró una reducción del umbral tras la extirpación de la glándula lagrimal, tanto a la semana como a las 4 semanas. A diferencia de la actividad basal, el umbral de frío ya estaba disminuido tan sólo una semana después de inducir la deficiencia lagrimal (**Figura 4.6**).

Por el contrario, la respuesta máxima de respuesta al enfriamiento (*frecuencia pico*) fue aumentando conforme aumentó el tiempo transcurrido tras la cirugía, siendo significativo el aumento a las 4 semanas (**Figura 4.7**). Además, la deficiencia lagrimal modificó ligeramente, aunque no de manera estadísticamente significativa, la temperatura a la que se obtenía la respuesta máxima al frío, se dio a temperaturas más elevadas, es decir, con enfriamientos menores que en las córneas control (**Tabla 4.3**).

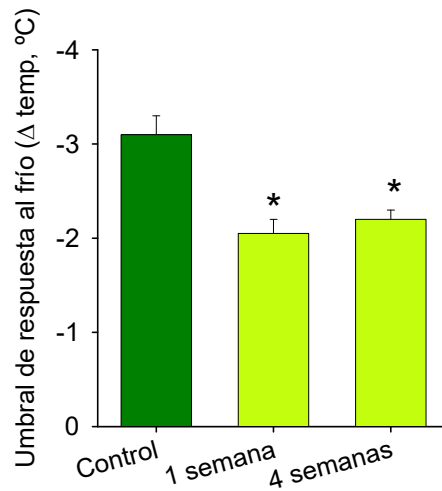


Figura 4.6. Umbral de respuesta al frío de las terminaciones sensibles al frío en córneas control y con deficiencia lagrimal durante 1 o 4 semanas. Los datos son media \pm SEM.; control, n=45; 1 semana, n=93 y 4 semanas, n=57. * $p < 0.05$, One Way ANOVA con test de Dunnet.

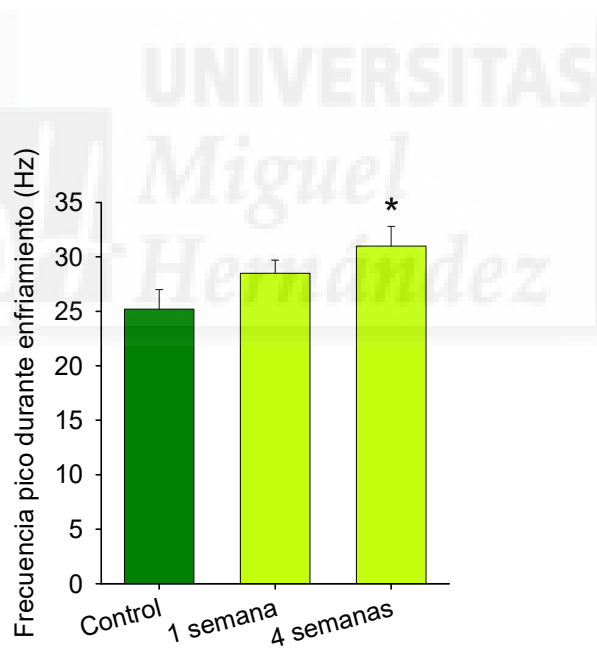


Figura 4.7. Respuesta máxima al frío (frecuencia pico) de las terminaciones sensibles al frío en córneas control y con deficiencia lagrimal durante 1 o 4 semanas. Los datos son media \pm SEM.; control, n=45; 1 semana, n=93; 4 semanas, n=57. * $p < 0.05$, One Way ANOVA con test de Dunnet.

La frecuencia de disparo de las terminaciones de frío a lo largo de los 30 s de la rampa de enfriamiento de 34° a 20°C, se determinó en córneas control y con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, encontrándose que tanto la frecuencia media de disparo inmediatamente antes de comenzar la rampa (34°C) como la frecuencia media a lo largo de la rampa hasta 20°C fue significativamente más alta en las terminaciones termorreceptoras de frío de córneas con deficiencia lagrimal (n=57) que en las de córneas control (n=45) ($p < 0.005$, ANOVA de medidas repetidas con comparaciones post-hoc usando la corrección de Bonferroni) (**Figura 4.8**).

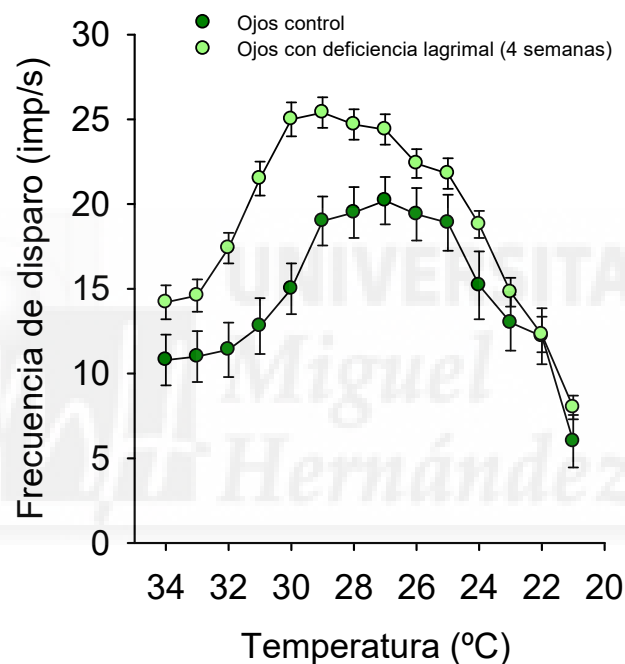


Figura 4.8. Actividad media de las terminaciones de frío de córneas control (n=45) y córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas (n=57) a lo largo de una rampa de enfriamiento desde 34°C a 20°C. Los datos son media \pm SEM de la frecuencia de disparo para cada valor de temperatura a lo largo de la rampa. El análisis estadístico con ANOVA de medidas repetidas, con comparaciones post-hoc usando t-test con las correcciones de Bonferroni, mostró diferencias significativas entre ambas curvas, $p < 0.005$.

4.2 Modulación farmacológica de la actividad de los termorreceptores de frío corneales en la deficiencia lagrimal crónica.

Los resultados mostrados en el apartado anterior sugieren que los cambios inducidos por la deficiencia lagrimal en los nociceptores corneales fueron transitorios, ya que aparecían tras una semana, pero habían revertido a las cuatro semanas de la extirpación de la glándula lagrimal. Por el contrario, el curso temporal de los cambios en la actividad espontánea y evocada observados en los termorreceptores de frío fue diferente. Los resultados sugieren que algunas de las alteraciones de la excitabilidad de las terminaciones de frío ya aparecían tras una sola semana de deficiencia lagrimal (por ejemplo, la disminución del umbral de respuesta al frío) mientras que otros cambios aparecían progresivamente, alcanzando significatividad estadística a las cuatro semanas tras la extirpación de la glándula lagrimal principal (entre ellos, la actividad basal y la magnitud de la respuesta al frío).

Para dilucidar las bases moleculares de esos cambios provocados por la deficiencia lagrimal en la actividad de los nociceptores y los termorreceptores de frío, nuestro grupo de investigación realizó en paralelo una serie de experimentos en los que se estudiaron la señal intracelular de calcio y las corrientes de Na^+ , K^+ y evocadas por frío en neuronas del TG en cultivo, procedentes de cobayas control y de cobayas con deficiencia lagrimal. Los resultados obtenidos, publicados en la revista Pain en 2016 en un artículo con co-autoría por parte de quien presenta esta Memoria, mostraron que la deficiencia lagrimal crónica no parecía afectar la actividad (y probablemente en la expresión) de los canales implicados en la transducción sensorial (TRPV1, TRPA1 y TRPM8), aunque sí se encontraron alteraciones en las corrientes de Na^+ y K^+ , al haber en las neuronas termosensibles al frío procedentes de animales con deficiencia lagrimal de 4 semanas un aumento significativo de las corrientes de Na^+ (tanto TTX-S como TTX-R) y una disminución significativa de las corrientes de K^+ (tanto las de rectificación lenta y como las rápidas), mientras que sólo las corrientes de Na^+ TTX-S de las neuronas polimodales aparecían afectadas (Kovács, Luna et al., 2016).

En base a esos resultados, se consideró que sería interesante estudiar el efecto de varios fármacos bloqueantes de canales de Na^+ y de K^+ en los termorreceptores de frío corneales.

4.2.1 Efectos de los bloqueantes de canales de Na⁺.

4.2.1.1 Lidocaína

Como se ha expuesto en el apartado 4.1.2.2, la extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal inducía un aumento de la actividad espontánea y evocada de las terminales termorreceptoras de frío, también observable en las unidades en las que se ensayaron los bloqueantes de canales de Na⁺ (**Tabla 4.4**).

Tabla 4.4. Efectos de la deficiencia lagrimal crónica sobre la actividad espontánea a 34°C y las características de la respuesta evocada por una rampa de frío de las terminaciones termorreceptoras de la córnea. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, comparado con el control.

	Control (n=58)	Deficiencia Lagrimal (n=34)
Actividad espontánea a 34°C (imp/s)	5.2 ± 1.6	8.0 ± 0.6 *
Umbral de frío (°C)	29.9 ± 0.4	32.5 ± 0.1**
Respuesta pico (imp/s)	16.8 ± 9.8	21.2 ± 0.9 *

La perfusión con lidocaína 100µM de las córneas de animales con deficiencia lagrimal de 4 semanas de duración resultó en una disminución marcada de la actividad basal de las terminaciones de frío (n=8) (**Figura 4.9**; **Tabla 4.5**). Esa disminución de la actividad también afectó a la respuesta al enfriamiento, que fue abolida en 7 de las 8 terminaciones termorreceptoras de frío registradas (**Figura 4.9**).

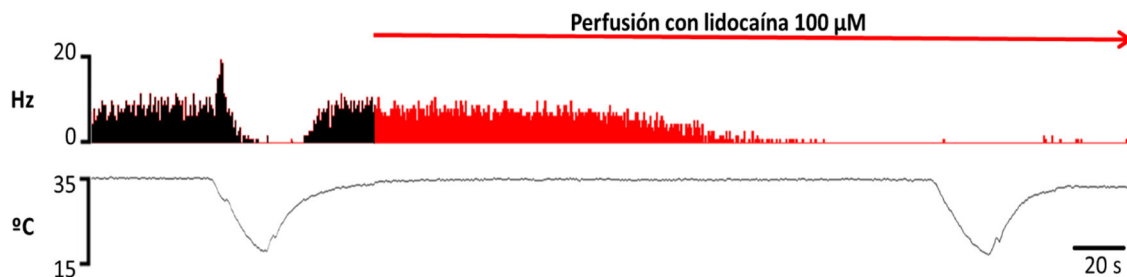


Figura 4.9. Ejemplo de la actividad basal a 34°C y evocada por rampas de frío desde 34°C a 20°C de una terminación corneal sensible al frío registrada en una córnea con deficiencia lagrimal, antes y durante la perfusión con solución conteniendo lidocaína 100µM (barra roja). Trazo superior: histograma de frecuencia de disparo en imp/s. Trazo inferior: temperatura de la solución del baño.

Tabla 4.5. Efectos de la lidocaína (100µM) sobre la actividad espontánea a temperatura basal (34°C) y las características de la respuesta a una rampa de frío de las terminaciones nerviosas de frío registradas en córneas con deficiencia lagrimal. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, test de pares.

	Lidocaína 100 µM (n=8)	
	Antes	Durante
Actividad espontánea a 34°C (imp/s)	6.1 ± 0.4	1.1 ± 0.3 **
Umbral de frío (°C)	32.6 ± 0.2	31.3 ± 0.5 *
Respuesta pico (imp/s)	23.1 ± 2.2	4.7 ± 1.3 *

4.2.1.2 Lacosamida

En los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal de 4 semanas (n=21), la perfusión con lacosamida a 100µM disminuyó la actividad basal (Tabla 4.6; Figura 4.10), alcanzando valores de frecuencia media estadísticamente similares a los obtenidos en córneas control.

La lacosamida a 100µM también redujo significativamente la frecuencia pico, aunque no modificó el umbral de frío (Tabla 4.6). Hay que tener en cuenta que, aunque se produjo una reducción significativa del valor absoluto de la frecuencia pico en respuesta a la rampa de enfriamiento durante la perfusión con lacosamida, todos los termorreceptores de frío incrementaron su frecuencia de disparo durante la rampa de frío. Al analizar no los valores absolutos, sino el aumento de la frecuencia de disparo durante la rampa en relación con la frecuencia previa a su inicio, aunque se encontró una ligera reducción durante la perfusión con el fármaco (13.1 ± 1.2 imp/s vs. 9.6 ± 1.2 imp/s, antes y durante la perfusión con lacosamida, respectivamente; $p=0.064$, test de pares), la diferencia no fue significativa, lo que sugiere que probablemente la capacidad de las terminaciones nerviosas para la transducción sensorial no se vio afectada por la lacosamida. Los efectos de la lacosamida se mantuvieron tras 30 minutos de lavado (datos no mostrados).

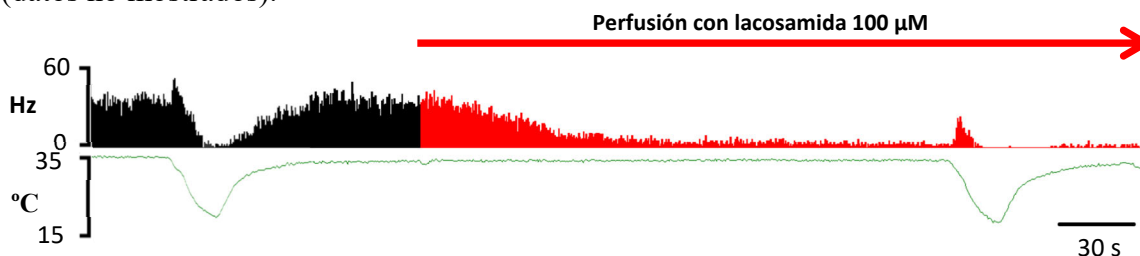


Figura 4.10. Ejemplo de la actividad basal a 34°C y la evocada por rampas de frío desde 34°C a 20°C de una terminación corneal sensible al frío registrada en una córnea con deficiencia lagrimal, antes y durante la perfusión con solución conteniendo lacosamida 100µM (barra roja). Trazo superior: histograma de frecuencia de disparo en imp/s. Trazo inferior: temperatura de la solución del baño.

Tabla 4.6. Efectos de la lacosamida (100 μ M) sobre la actividad espontánea a 34°C y las características de la respuesta evocada por una rampa de frío de las terminaciones termorreceptoras de las córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas. ** $p < 0.001$, test de Wilcoxon. + $p < 0.01$, test de pares.

	Lacosamida 100 μ M (n=21)	
	Antes	Durante
Actividad espontánea a 34°C (imp/s)	8.5 \pm 0.9	4.2 \pm 0.4 **
Umbral de frío (°C)	32.4 \pm 0.2	32.1 \pm 0.3
Respuesta pico (imp/s)	20.7 \pm 1.9	14.0 \pm 1.7 +

A diferencia de lo observado en el caso de los ojos con deficiencia lagrimal, en las córneas control, de animales intactos, la lacosamida 100 μ M no afectó significativamente ni a la actividad basal espontánea a 34°C ni a la respuesta a la rampa de frío en termorreceptores de frío de córneas intactas (n=4) (**Figura 4.11**).

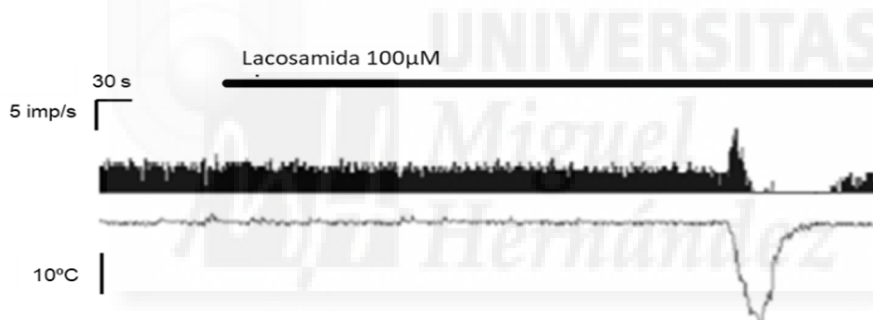


Figura 4.11. Ejemplo del efecto de la lacosamida (100 μ M; barra negra) sobre la actividad basal a 34°C y la evocada por una rampa de frío desde 34°C a 20°C de una terminación corneal sensible al frío registrada en una córnea control. Trazo superior: histograma de frecuencia de disparo en imp/s. Trazo inferior: temperatura de la solución del baño.

4.2.1.3 Hainantoxina IV

Los efectos de la hainantoxina IV sobre las terminaciones de frío fueron parecidos en las córneas control y en las córneas con deficiencia lagrimal, reduciéndose significativamente tanto la actividad basal como la frecuencia pico de la respuesta al frío (**Figura 4.12; Tabla 4.7**).

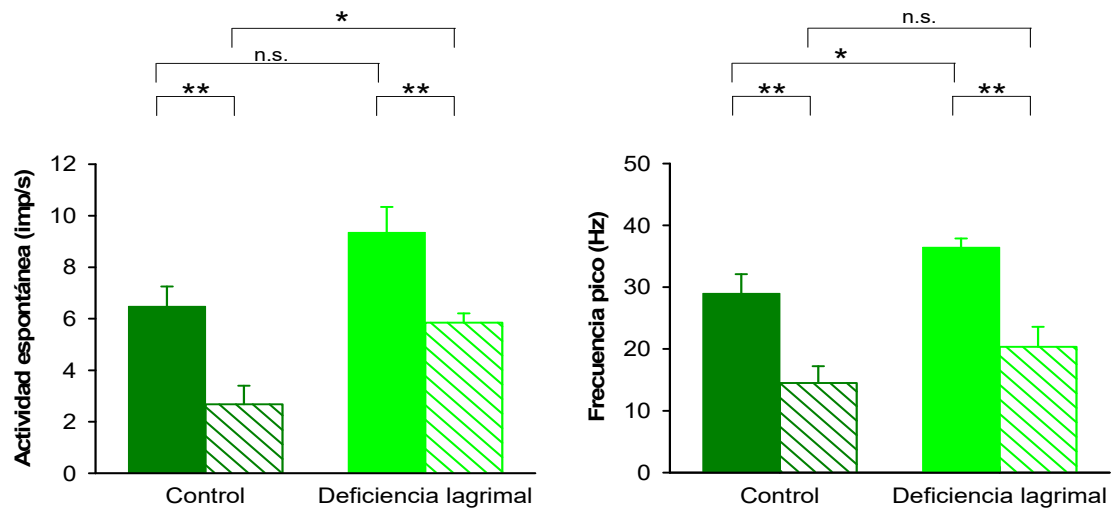


Figura 4.12. Efecto de la perfusión con hainantoxina IV (100 nM) sobre la actividad espontánea y la evocada por frío de las terminaciones nerviosas de frío en córneas control y en córneas con deficiencia lagrimal. Izquierda: Efecto sobre la actividad espontánea a temperatura basal. Derecha: Efecto sobre la frecuencia pico alcanzada durante la rampa de enfriamiento. Las barras llenas representan los valores antes de la perfusión y las barras rayadas, los valores obtenidos después de perfundir con hainantoxina IV 100 nM. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n=6$, córneas control; $n=4$, córneas con deficiencia lagrimal). * $p<0.05$, ** $p<0.001$, t-test pareado o no pareado, según necesidad.

Tabla 4.7. Efectos de la perfusión con hainantoxina IV a 100nM sobre la actividad espontánea a temperatura basal (34°C) y las características de la respuesta evocada por una rampa de frío de terminaciones de córneas control y con deficiencia lagrimal durante 4 semanas. * $p=0.020$, ** $p<0.001$, One Way ANOVA, con post-hoc test Holm-Sidak (+, diferente del valor antes de la perfusión). § $p<0.05$, ¥ $p<0.001$, test de pares.

	Perfusión con hainantoxina IV 100 nM			
	Antes	Durante	15 min de lavado	30 min de lavado
Control	(n=6)			
Actividad espontánea a 34°C (imp/s) **	8.2 \pm 1.2	8.1 \pm 1.1	5.5 \pm 0.7	2.8 \pm 0.6 +
Frecuencia pico (Hz) ¥	30.0 \pm 2.1			16.2 \pm 2.0
Deficiencia lagrimal durante 4 semanas	(n=5)			
Actividad espontánea a 34°C (imp/s) *	9.4 \pm 0.7	9.3 \pm 1.0	7.6 \pm 0.5	5.9 \pm 0.4 +
Frecuencia pico (Hz) §	6.5 \pm 1.4			20.4 \pm 3.2

El efecto de reducción de la actividad espontánea no se apreció durante la perfusión con la hainantoxina IV, probablemente porque sólo se perfundió durante 90 s, sino que apareció con el tiempo, empezando a apreciarse a los 15 minutos de la perfusión. A los 30 minutos de haber finalizado la perfusión con solución conteniendo la toxina fue cuando se observó un mayor efecto, que afectó también significativamente a la frecuencia pico (Tabla 4.7), mientras que el umbral de frío no se modificó (datos no mostrados).

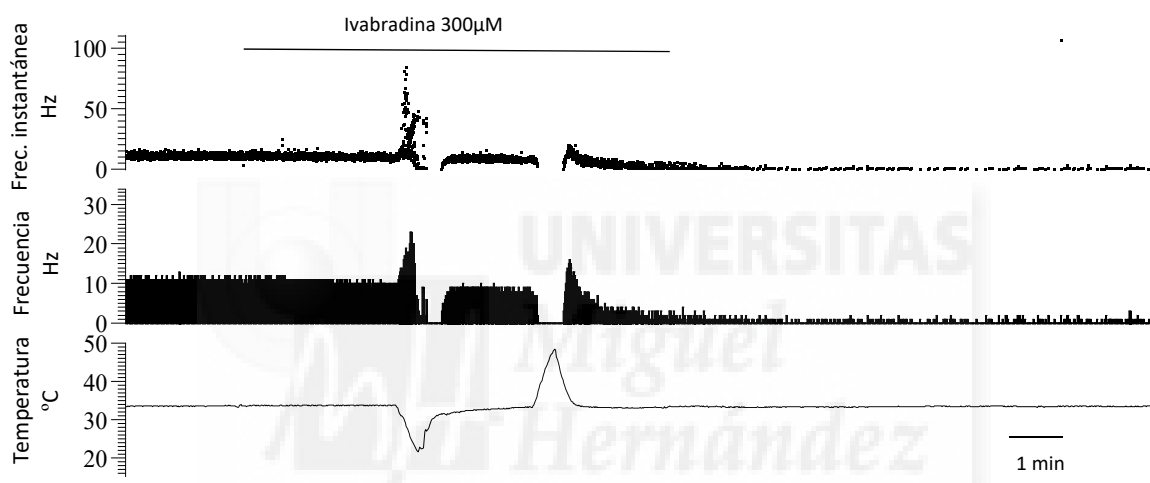
4.2.2 Efectos de los bloqueantes de canales HCN

4.2.2.1 Ivabradina

Córneas control

A. Efectos sobre la frecuencia basal de disparo.

La perfusión con ivabradina a cualquiera de las tres concentraciones probadas (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M) provocó en todas las terminaciones registradas en córneas intactas una disminución de la actividad basal, como se puede observar en el ejemplo de la **Figura 4.13**.



El efecto de la ivabradina fue dosis-dependiente, observándose mayor disminución de la actividad basal cuanto más elevada era la concentración utilizada, siendo la concentración de 30 μ M no sólo la menos efectiva sino también la que más tiempo tardó en hacer efecto, ya que comenzó a observarse la disminución de la actividad después del tiempo de perfusión del fármaco, es decir, después de haber comenzado la perfusión con solución sin el fármaco (periodo de lavado) (**Figuras 4.14** y **4.15**).

EFFECTO DE LA IVABRADINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CONTROL

% DE REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA A 34°C

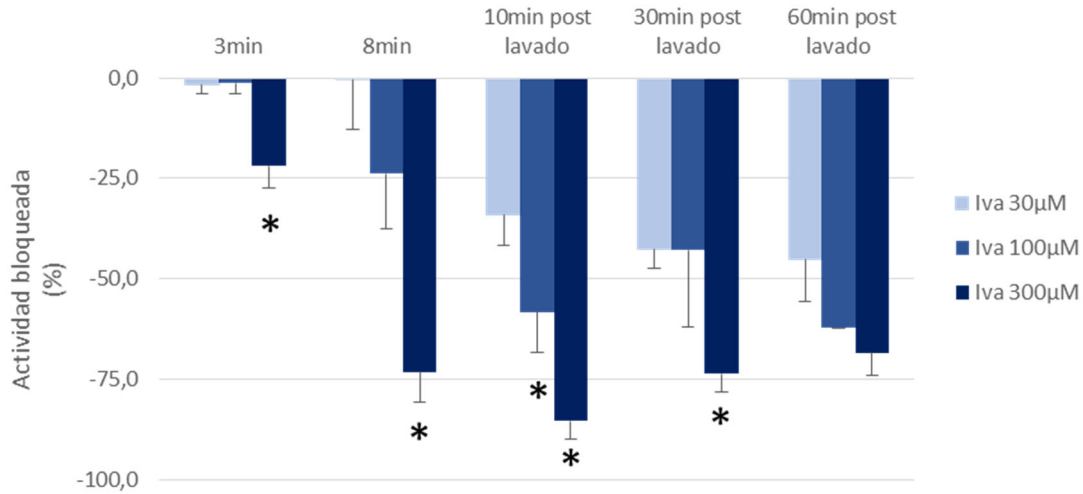


Figura 4.14. Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30µM, n=6; 100µM, n=5; 300µM, n=6). Los valores son media ± SEM del cambio (en %) de la actividad medida a los 3 y a los 8 minutos de la perfusión con el fármaco, y a los 10, 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la actividad espontánea medido antes de perfundir con ivabradina. *p<0.05, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

CURVA DOSIS/RESPUESTA

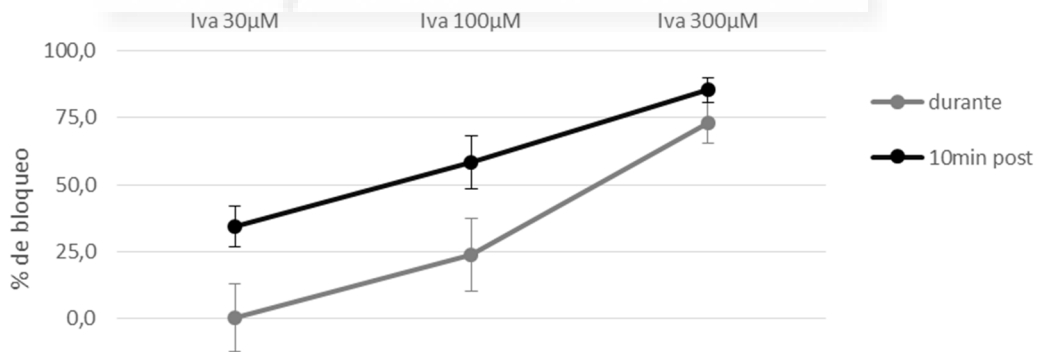


Figura 4.15. Curva dosis/respuesta del efecto de la perfusión con ivabradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas intactas, calculado en el último minuto de perfusión con el fármaco (durante) y 10 minutos después del cese de ésta. Se ha representado la media ± SEM del bloqueo (en %) de la actividad previa a la perfusión. Las curvas muestran que el efecto es dependiente de la concentración y del tiempo tras la exposición al fármaco.

La ivabradina a 100 µM comenzó a tener efecto antes, viéndose el inicio del efecto al final de la perfusión con el fármaco. La concentración más efectiva y la más rápida fue la de 300 µM, ya que la reducción de la actividad espontánea a temperatura basal

empezaba a observarse a partir de los 3 minutos de perfusión con el fármaco (**Figuras 4.13 y 4.14**). Este efecto inhibitorio se mantuvo a largo plazo, de manera que la actividad eléctrica seguía disminuida hasta una hora después de finalizar la perfusión con el fármaco.

B. Efectos sobre el patrón de disparo

Aunque el efecto principal de la ivabradina sobre las terminaciones corneales sensibles a frío fue el de reducir su frecuencia de disparo a temperatura basal, en algunos casos (**Tabla 4.8**) se observó además una modificación de su patrón de disparo, provocando que se pasase de un disparo regular a un disparo en ráfaga (**Figura 4.16**).

Tabla 4.8. Número de terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas de cobayas control que desarrollan disparo en ráfagas tras la perfusión con ivabradina a distintas concentraciones.

Nº de unidades	Concentración de ivabradina		
	30 μ M	100 μ M	300 μ M
	1/6	0/5	2/6

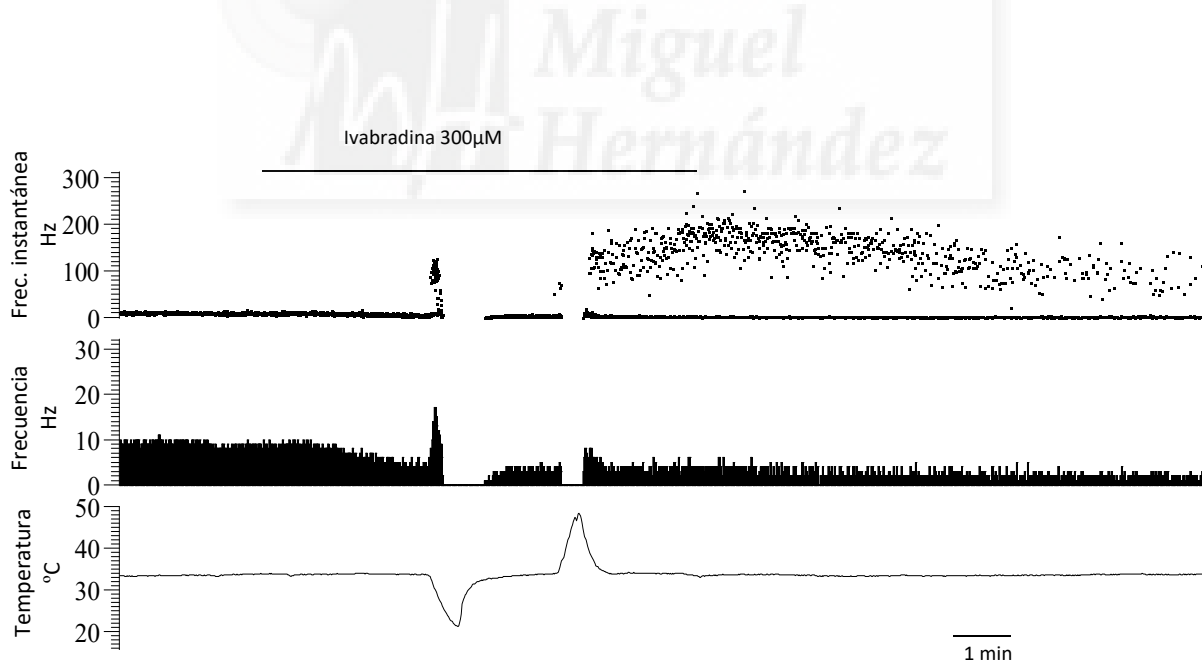


Figura 4.16. Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal control en el que la ivabradina (300 μ M) produjo cambios en el patrón de disparo, además de disminuir la frecuencia media de disparo. Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

C. Efecto sobre la respuesta al enfriamiento.

- Umbral de frío

La perfusión con ivabradina no produjo cambios significativos en el umbral de respuesta al enfriamiento a ninguna de las concentraciones probadas (**Tabla 4.9**).

Tabla 4.9. Umbrales de frío determinados en terminales de córneas control antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con ivabradina a distintas concentraciones. No se encontraron diferencias significativas (One way ANOVA medidas repetidas). Los datos son media \pm SEM.

		Umbral de frío (Δ temperatura, $^{\circ}$ C)			
		Antes	Durante	30 min de lavado	60 min de lavado
Ivabradina (μ M)	30 (n=6)	-4.1 \pm 0.8	-3.4 \pm 0.8	-2.9 \pm 0.4	-2.7 \pm 0.1
	100 (n=5)	-3.2 \pm 0.7	-4.0 \pm 1.0	-2.5 \pm 0.4	-4.2 (n=1)
	300 (n=6)	-2.1 \pm 0.4	-2.6 \pm 0.5	-2.1 \pm 0.5	-2.0 \pm 0.9

EFFECTO DE LA IVABRADINA SOBRE LA RESPUESTA MÁXIMA AL FRÍO DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CONTROL

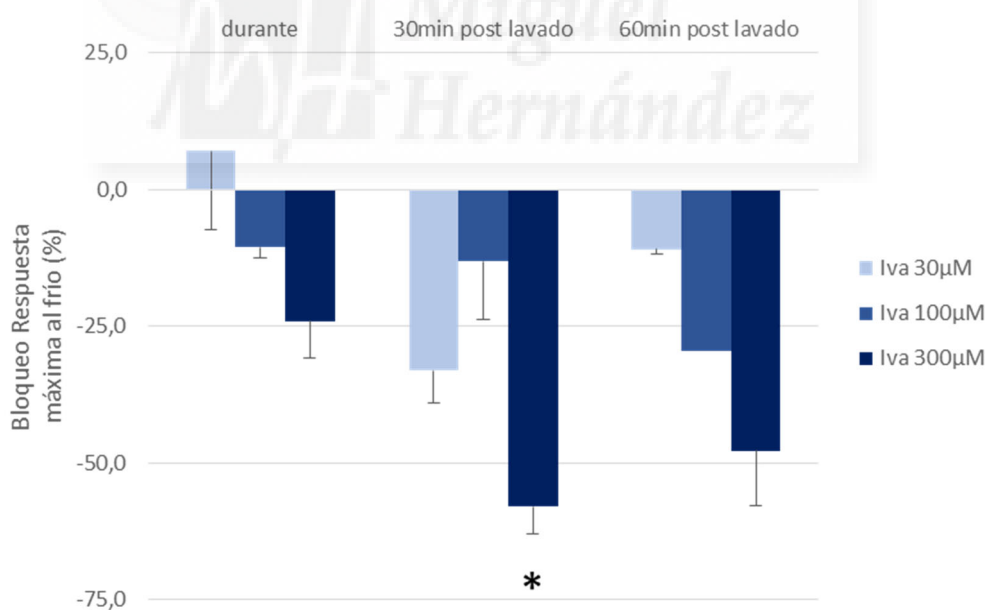


Figura 4.17. Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico) de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30 μ M, n=6; 100 μ M, n=5; 300 μ M, n=6). Los valores son media \pm SEM del cambio (en %) de la frecuencia pico alcanzada durante una rampa de frío (de 34 $^{\circ}$ a 20 $^{\circ}$ C) realizada durante la perfusión con el fármaco, y a los 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la frecuencia pico obtenido en una rampa de frío aplicada antes de perfundir con ivabradina. * p <0.05, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

- Respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico)

En cuanto al efecto de la ivabradina sobre la frecuencia máxima alcanzada durante la rampa de frío, el mayor efecto se observó con la concentración 300 μ M, manteniéndose un bloqueo de la respuesta al frío de un 50% aproximadamente hasta 60 minutos tras la aplicación del fármaco (**Figura 4.17**).

Córneas con deficiencia lagrimal de 4 semanas de duración.

A. Efectos sobre la frecuencia basal de disparo.

Al igual que en el grupo control, la ivabradina produjo en las terminales de córneas con deficiencia lagrimal una disminución de la actividad basal a 34°C con las tres concentraciones probadas. Igualmente, en muchas ocasiones el efecto comenzó a observarse cuando estaba finalizando la perfusión con el fármaco. Un ejemplo del efecto de la ivabradina, a 100 μ M, se muestra en la **Figura 4.18**. El efecto inhibitorio de la ivabradina, calculado como porcentaje de actividad basal bloqueada, se representa en la **Figura 4.19**.

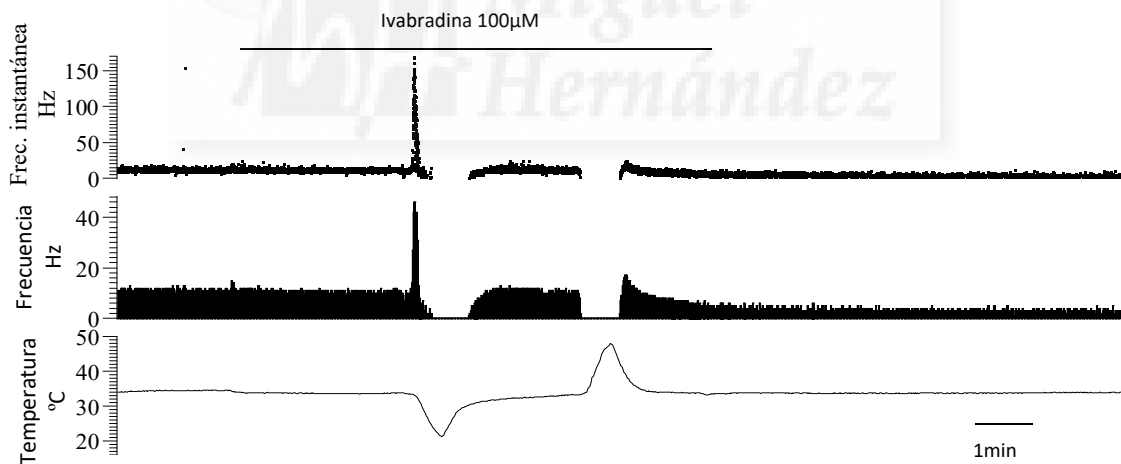


Figura 4.18. Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible al frío de una córnea con deficiencia lagrimal, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo ivabradina (100 μ M). Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

EFFECTO DE LA IVABRADINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CON DEFICIENCIA LAGRIMAL

% DE REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA A 34°C

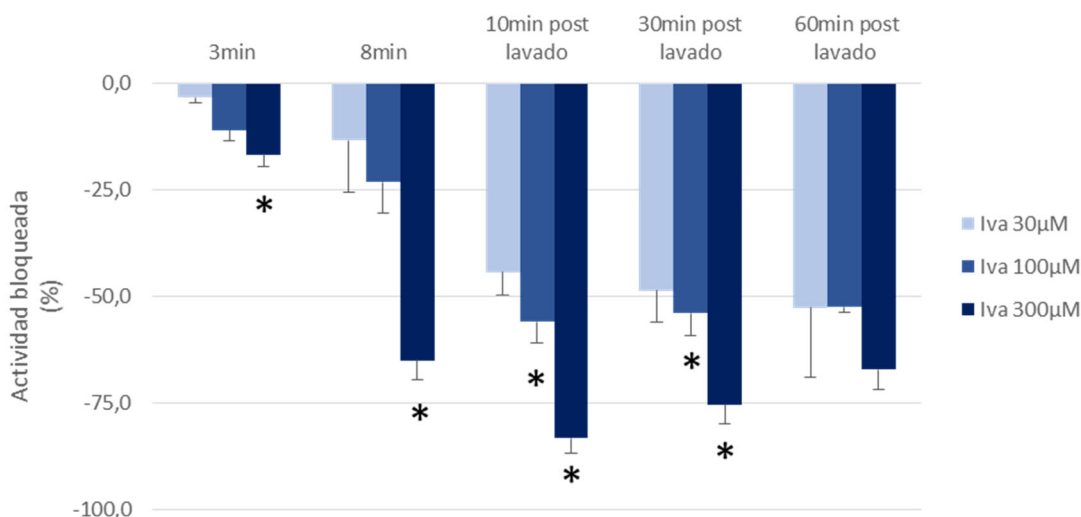


Figura 4.19. Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30μM, n=7; 100μM, n=6; 300μM, n=8). Los valores son media ± SEM del cambio (en %) de la actividad medida a los 3 y a los 8 minutos de la perfusión con el fármaco, y a los 10, 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la actividad espontánea medido antes de perfundir con ivabradina. * $p < 0.05$, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

CURVA DOSIS/RESPUESTA

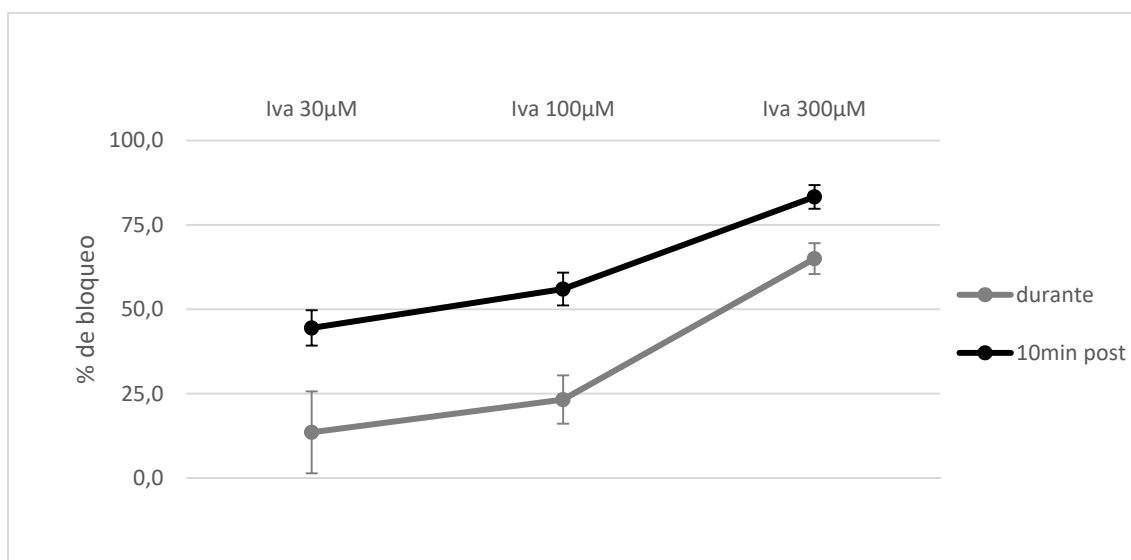


Figura 4.20. Curva dosis/respuesta del efecto de la perfusión con ivabradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, calculado en el último minuto de perfusión con el fármaco (durante) y 10 minutos después del cese de ésta. Se ha representado la media ± SEM del bloqueo (en %) de la actividad previa a la perfusión. Las curvas muestran que el efecto es dependiente de la concentración así como del tiempo tras la exposición al fármaco.

La ivabradina, a concentración de 30 μM , bloqueó la actividad basal con menor eficacia que las concentraciones mayores, con las que se obtuvieron porcentajes de bloqueo cercanos al 80%. A las dos concentraciones más altas, la ivabradina hizo efecto más rápidamente. El bloqueo se mantuvo hasta una hora después de iniciar el lavado en aproximadamente la mitad de las terminales exploradas (**Figuras 4.19 y 4.20**).

B. Efectos sobre el patrón de disparo

Una parte de las terminaciones registradas en córneas con deficiencia lagrimal mostraron un cambio en su patrón de disparo, aumentando el número de terminaciones con un patrón de disparo en ráfagas después de la perfusión con ivabradina. Un ejemplo de este cambio de patrón de disparo se muestra en la **Figura 4.21**. En la **Tabla 4.10** se refleja la proporción de terminaciones que mostraron este comportamiento, respecto al total de unidades registradas.

Tabla 4.10. Número de terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas de cobayas con ojo seco que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con ivabradina a distintas concentraciones.

Nº de unidades	Concentración de ivabradina		
	30 μM	100 μM	300 μM
	3/7	4/6	1/8

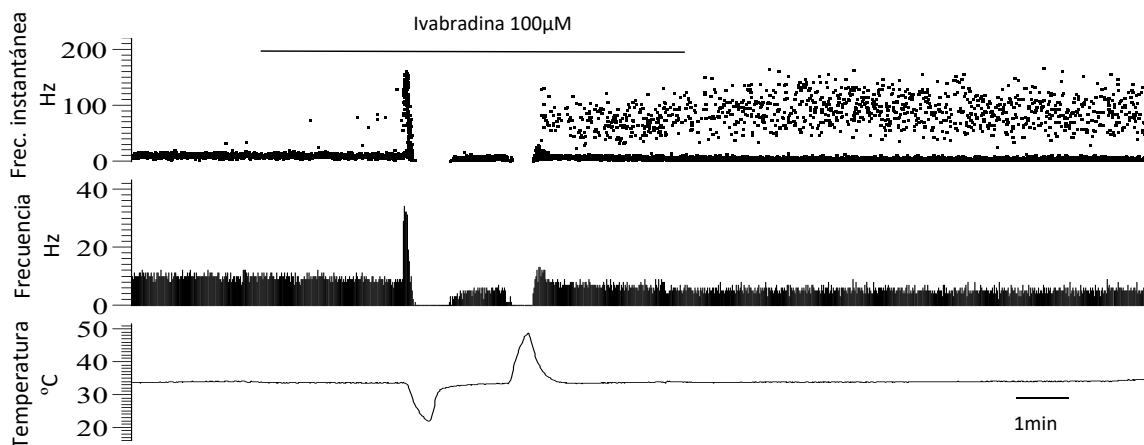


Figura 4.21. Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal con deficiencia lagrimal durante 4 semanas en la que la ivabradina (300 μM) produjo cambios en el patrón de disparo, además de disminuir la frecuencia media de disparo. Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

C. Efecto sobre la respuesta al enfriamiento.

- Umbral de frío

El umbral de respuesta al enfriamiento de las terminaciones corneales sensibles a frío de animales con deficiencia lagrimal disminuyó significativamente tras la perfusión con la mayor concentración de ivabradina utilizada (300 μ M) (**Tabla 4.11**).

Tabla 4.11. Umbrales de frío determinados en terminales de córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con ivabradina a distintas concentraciones. Los datos son media \pm SEM. * $p < 0.05$, One way ANOVA medidas repetidas, con Holm.Sidak test.

		Umbral de frío (Δ temperatura, $^{\circ}$ C)			
		Antes	Durante	30 min de lavado	60 min de lavado
Ivabradina (μ M)	30 (n=7)	-3.2 \pm 0.6	-3.2 \pm 0.5	-2.7 \pm 0.5	-3.2 \pm 0.3
	100 (n=6)	-1.8 \pm 0.4	-1.6 \pm 0.4	-3.3 \pm 1.2	-2.3 \pm 0 (n=2)
	300 (n=8)	-3.9 \pm 0.6	-3.5 \pm 0.6	-2.1 \pm 0.4*	-2.6 \pm 0.6*

- Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico)

La respuesta máxima al enfriamiento de las terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas de cobayas sometidos a cirugía disminuyó significativamente con la aplicación de la ivabradina a todas las concentraciones probadas, 30 μ M, 100 μ M y 300 μ M ($p < 0.05$, ANOVA). En la **Figura 4.22** se representa la evolución del efecto de las diferentes dosis de ivabradina empleadas, observándose una reducción de la respuesta máxima en todos los casos incluso durante la perfusión con el fármaco. Esta reducción fue similar para las tres concentraciones y se mantiene en el tiempo, ya que se siguen observando valores disminuidos a distintos tiempos después del lavado del fármaco, 30 minutos y 60 minutos.

EFFECTO DE LA IVABRADINA SOBRE LA RESPUESTA MÁXIMA AL FRÍO DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CON DEFICIENCIA LAGRIMAL

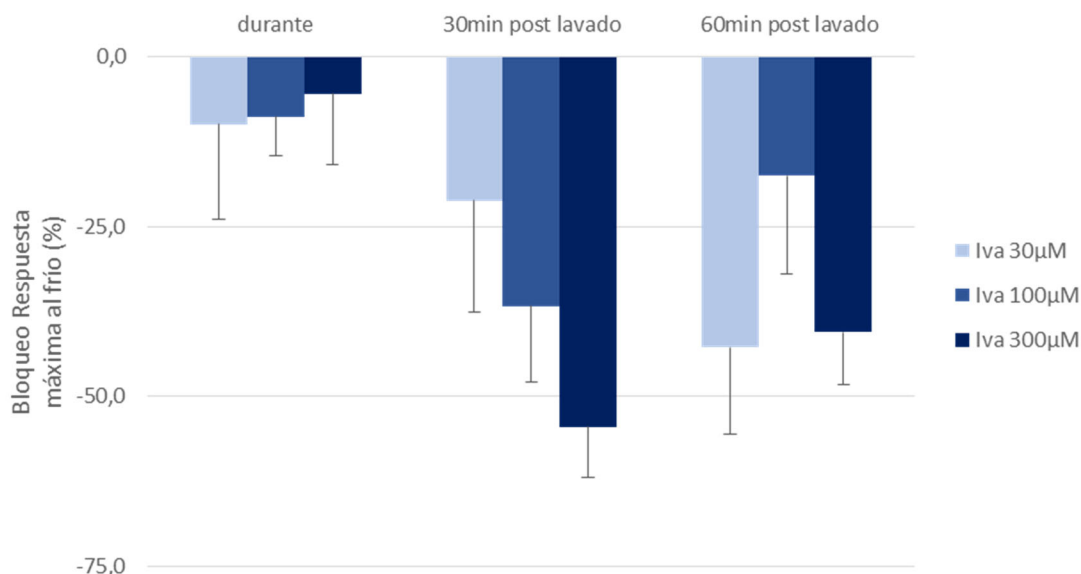


Figura 4.22. Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico) de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con ivabradina a tres concentraciones diferentes (30µM, n=7; 100µM, n=6; 300µM, n=8). Los valores son media \pm SEM del cambio (en %) de la frecuencia pico alcanzada durante una rampa de frío (de 34° a 20°C) realizada durante la perfusión con el fármaco, y a los 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la frecuencia pico obtenido en una rampa de frío aplicada antes de perfundir con ivabradina. No existen diferencias significativas entre los efectos de las distintas concentraciones a cada uno de los tiempos estudiados.

4.2.2.2 Cilobradina

Córneas control

A. Efecto sobre la frecuencia basal de disparo

La cilobradina disminuyó la actividad basal a 34°C (**Figura 4.23**), con las tres concentraciones probadas (**Figura 4.24**).

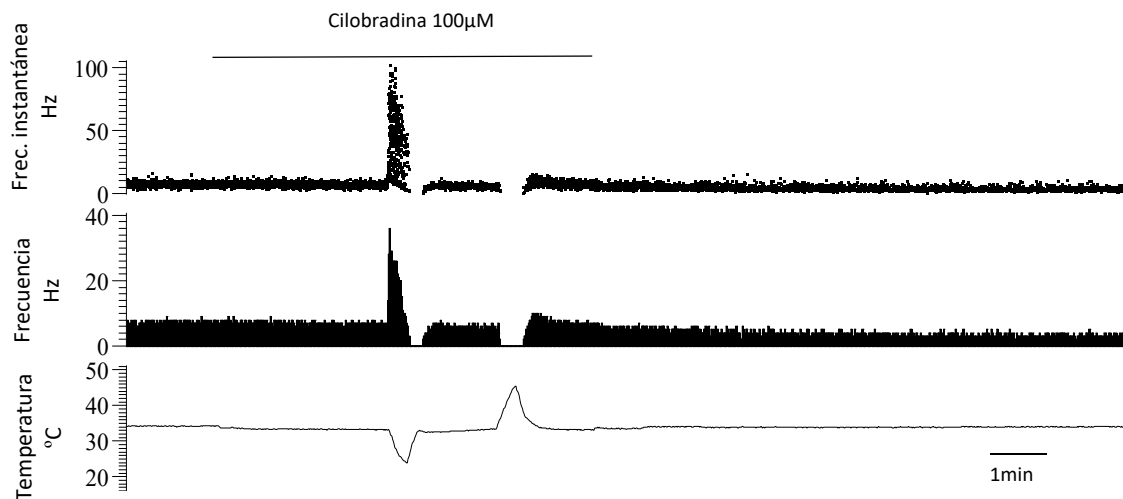


Figura 4.23. Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible al frío de una córnea control, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo cilobradina ($100\mu\text{M}$). Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

Se observó una relación dosis-respuesta en la reducción de la actividad espontánea, viéndose un bloqueo menor cuando se perfundió con cilobradina a $30\mu\text{M}$, que cuando se hizo a $300\mu\text{M}$ (Figuras 4.24 y 4.25). Además, la reducción de la actividad fue duradera en el tiempo, manteniéndose hasta una hora después de la exposición al fármaco (Figuras 4.24 y 4.25).

EFFECTO DE LA CILOBRADINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CONTROL

% DE REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA A 34°C

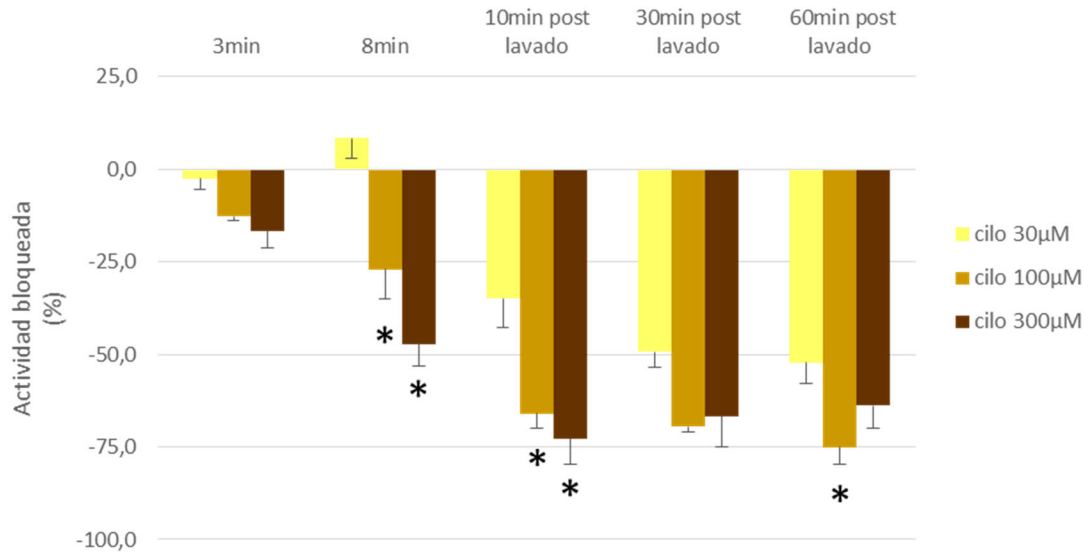


Figura 4.24. Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes (30μM, n=6; 100μM, n=6; 300μM, n=6). Los valores son media ± SEM del cambio (en %) de la actividad medida a los 3 y a los 8 minutos de la perfusión con el fármaco, y a los 10, 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la actividad espontánea medido antes de perfundir con cilobradina. *p<0.05, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

CURVA DOSIS/RESPUESTA

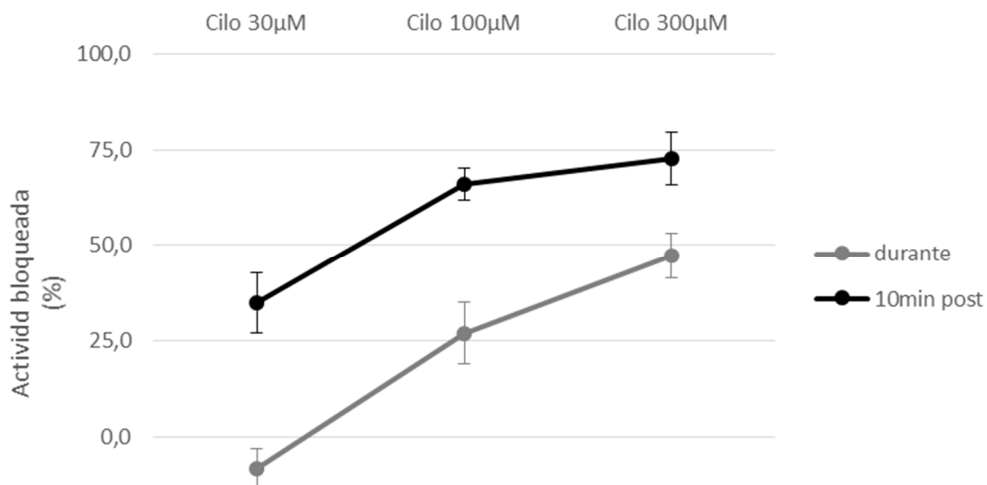


Figura 4.25. Curva dosis/respuesta del efecto de la perfusión con cilobradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas intactas, calculado en el último minuto de perfusión con el fármaco (durante) y 10 minutos después del cese de ésta. Se ha representado la media ± SEM del bloqueo (en %) de la actividad previa a la perfusión. Las curvas muestran que el efecto es dependiente de la concentración y del tiempo tras la exposición al fármaco.

B. Cambios en el patrón de disparo

El efecto principal que produjo la perfusión con cilobradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío fue la de reducirla parcialmente. En paralelo a este efecto, también se observó que una parte de las terminaciones encontradas cambió su patrón de disparo (**Tabla 4.12**), apareciendo un disparo en ráfagas que se aprecia especialmente al representar los valores de frecuencia instantánea (**Figura 4.26**).

Tabla 4.12. Número de terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas de cobayas control que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con cilobradina a distintas concentraciones.

Nº de unidades	Concentración de cilobradina		
	30 μ M	100 μ M	300 μ M
	1/6	1/6	4/6

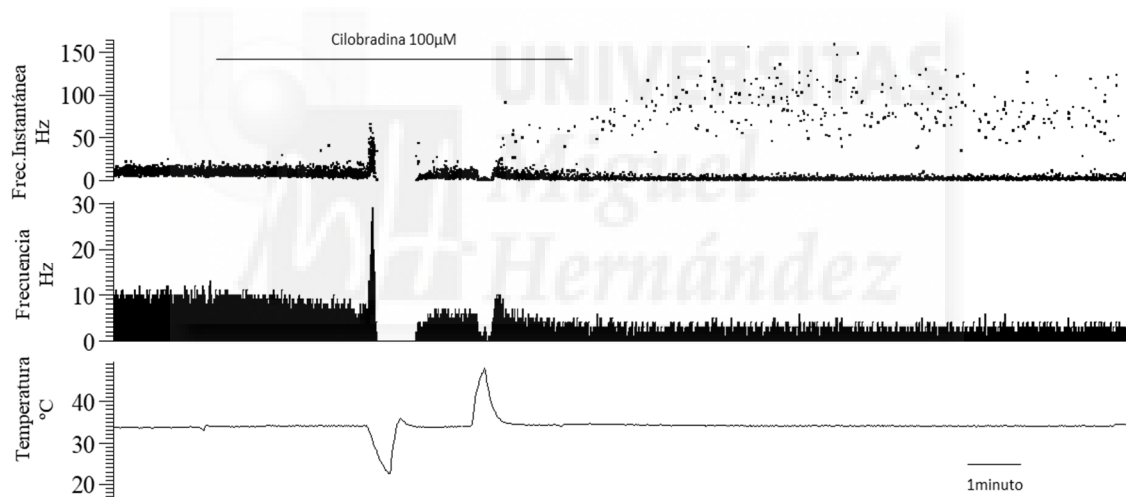


Figura 4.26. Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal control en el que la cilobradina (100 μ M) produjo cambios en el patrón de disparo, además de disminuir la frecuencia media de disparo. Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

C. Efecto sobre la respuesta al enfriamiento

- Umbral de frío

El efecto de la cilobradina sobre el umbral de respuesta al enfriamiento de las terminaciones registradas en corneas control no fue significativo para ninguna de las concentraciones probadas (**Tabla 4.13**).

Tabla 4.13. Umbrales de frío determinados en terminales de córneas control, antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con cilobradina a distintas concentraciones. Los datos son media \pm SEM. No se encontraron diferencias significativas, One way ANOVA medidas repetidas.

		Umbral de frío (Δ temperatura, °C)			
		Antes	Durante	30 min de lavado	60 min de lavado
Cilobradina (μ M)	30 (n=6)	-3.9 \pm 0.6	-5.4 \pm 1.3	-4.7 \pm 1.4	-4.8 \pm 1.2
	100 (n=6)	-3.7 \pm 0.7	-4.4 \pm 0.7	-3.7 \pm 0.9	-4.1 \pm 0.6
	300 (n=6)	-3.6 \pm 0.7	-3.6 \pm 1.1	-4.8 \pm 1.3	-4.1 \pm 0.7

- Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico)

EFFECTO DE LA CILOBRADINA SOBRE LA RESPUESTA MÁXIMA AL FRÍO DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CONTROL

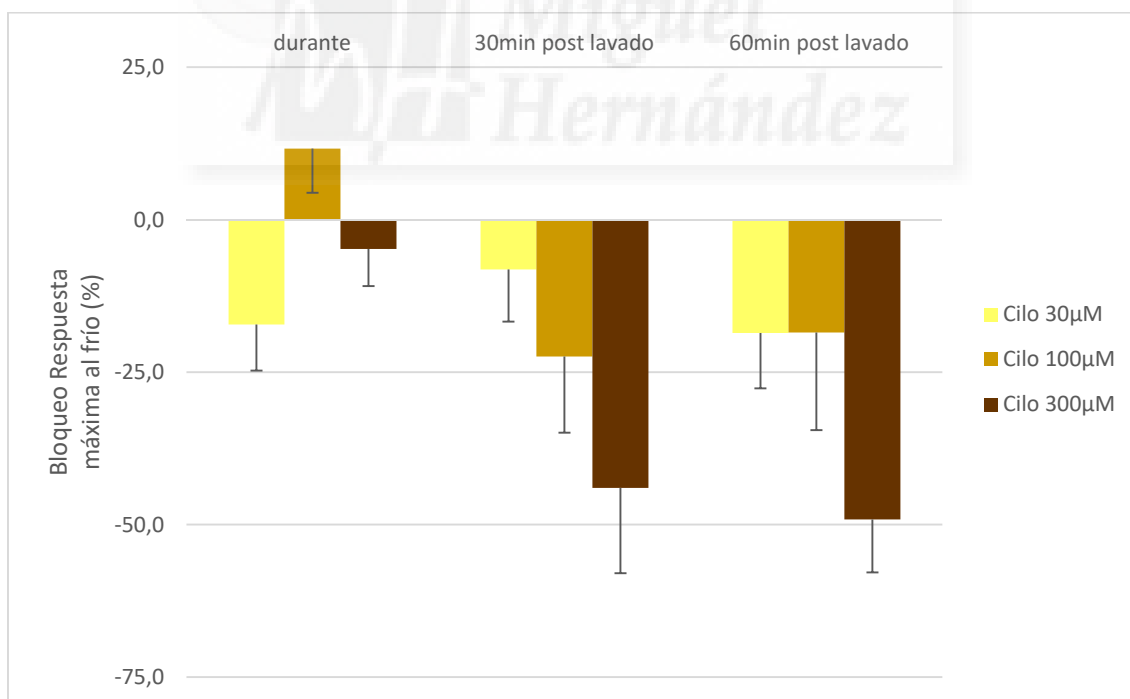


Figura 4.27. Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico) de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes. Los valores son media \pm SEM (n=6 para las tres concentraciones) del cambio (en %) de la frecuencia pico alcanzada durante una rampa de frío (de 34° a 20°C) realizada durante la perfusión con el fármaco, y a los 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la frecuencia pico obtenido en una rampa de frío aplicada antes de perfundir con cilobradina.

La respuesta máxima al enfriamiento de las terminaciones de frío tendió a disminuir con la perfusión de cilobradina a las tres concentraciones probadas, aunque sólo fue significativa con la concentración más alta. Perfundiendo con el fármaco, la actividad espontánea disminuyó ligeramente, efecto que se mantuvo en el tiempo (Figura 4.27). El efecto sobre la frecuencia máxima de disparo aparecía más tarde en el tiempo que la reducción de la actividad espontánea, apareciendo al acabar la perfusión.

Córneas con deficiencia lagrimal de 4 semanas de duración.

A. Efecto sobre la frecuencia basal de disparo

De forma similar a lo encontrado en el grupo de cobayas control, el efecto principal de la cilobradina en el caso de las córneas con deficiencia lagrimal fue el de producir una disminución en la actividad basal de las terminaciones corneales sensibles al frío (Un ejemplo gráfico se muestra en la Figura 4.28), efecto que se dio con todas las concentraciones probadas (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M), aunque en menor medida cuando se probó el fármaco a 30 μ M y en mayor medida con el fármaco a 300 μ M.

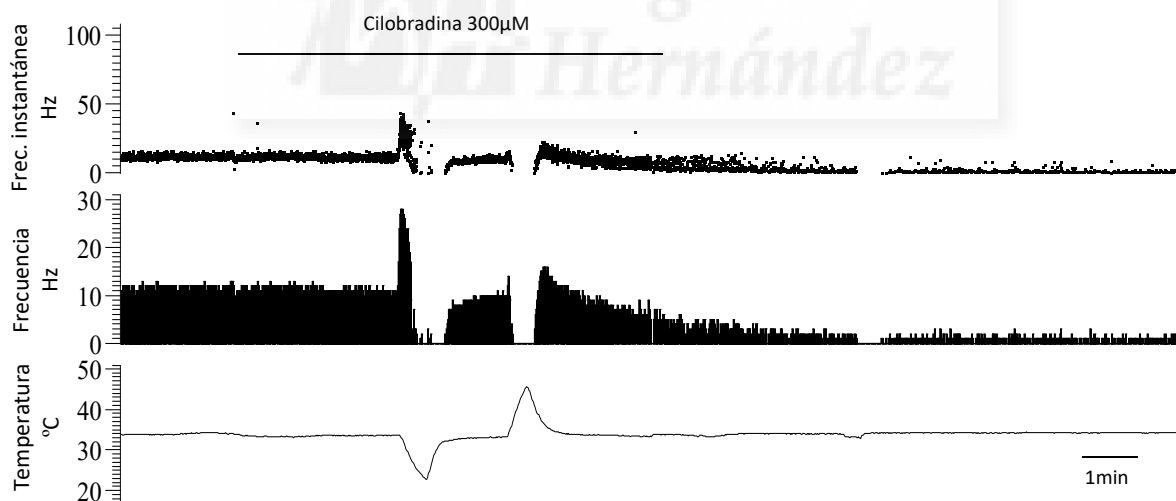


Figura 4.28. Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible al frío de una córnea con deficiencia lagrimal, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo cilobradina (300 μ M). Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

EFFECTO DE LA CILOBRADINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CON DEFICIENCIA LAGRIMAL

% DE REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA A 34°C

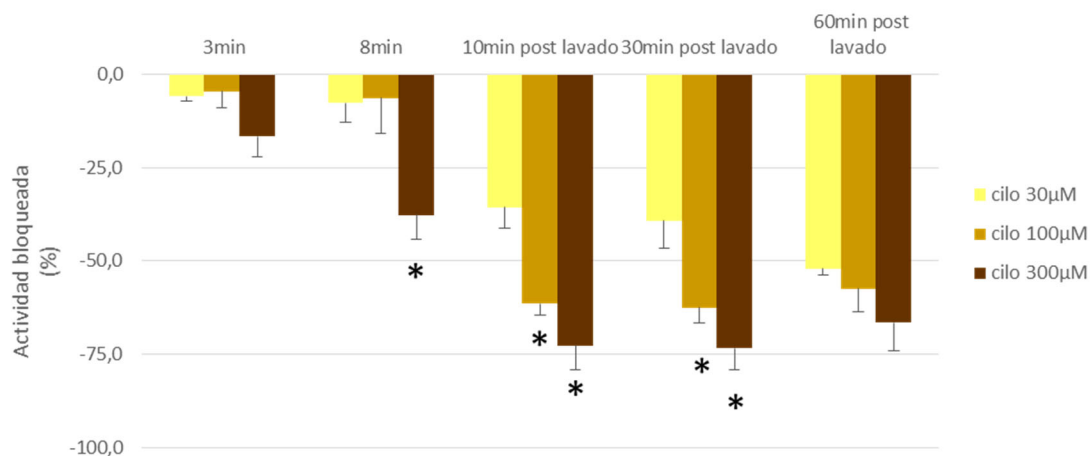


Figura 4.29. Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes (30 μM, n=7; 100 μM, n=6; 300 μM, n=8). Los valores son media ± SEM del cambio (en %) de la actividad medida a los 3 y a los 8 minutos de la perfusión con el fármaco, y a los 10, 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la actividad espontánea medido antes de perfundir con cilobradina. *p<0.05, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

CURVA DOSIS/RESPUESTA

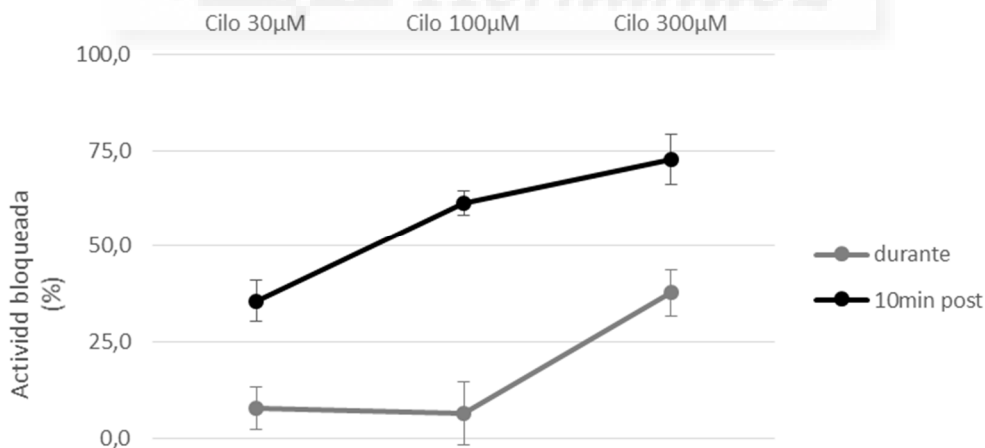


Figura 4.30. Curva dosis/respuesta del efecto de la perfusión con cilobradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, calculado en el último minuto de perfusión con el fármaco (durante) y 10 minutos después del cese de ésta. Se ha representado la media ± SEM del bloqueo (en %) de la actividad previa a la perfusión. Las curvas muestran que el efecto es dependiente de la concentración así como del tiempo tras la exposición al fármaco.

Este efecto inhibitorio se iniciaba en algunos casos durante la perfusión con cilobradina y aumentaba con el tiempo, para todas las concentraciones de cilobradina empleadas (**Figuras 4.29 y 4.30**). La inhibición de la actividad basal de las terminaciones corneales de frío fue dosis-dependiente, siendo la cilobradina a 30 μ M menos efectiva y a 300 μ M, la más efectiva y más rápida en inducir ese efecto de reducción de la actividad espontánea a temperatura basal.

B. Efectos sobre el patrón de disparo

En el grupo de animales operados de ojo seco también se encontraron terminaciones corneales de frío que alteraron su patrón de disparo tras perfundir con cilobradina. En este caso, el efecto fue variable, ya que varias de las terminaciones estudiadas ya presentaban un patrón de disparo espontáneo en ráfagas antes de perfundir con cilobradina y el efecto del fármaco fue reducir la frecuencia de disparo. Por el contrario, algunas de las terminaciones sin disparo en ráfagas en condiciones basales, desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas en presencia del fármaco (**Tabla 4.14 y Figura 4.31**) o a lo largo de los 60 minutos posteriores.

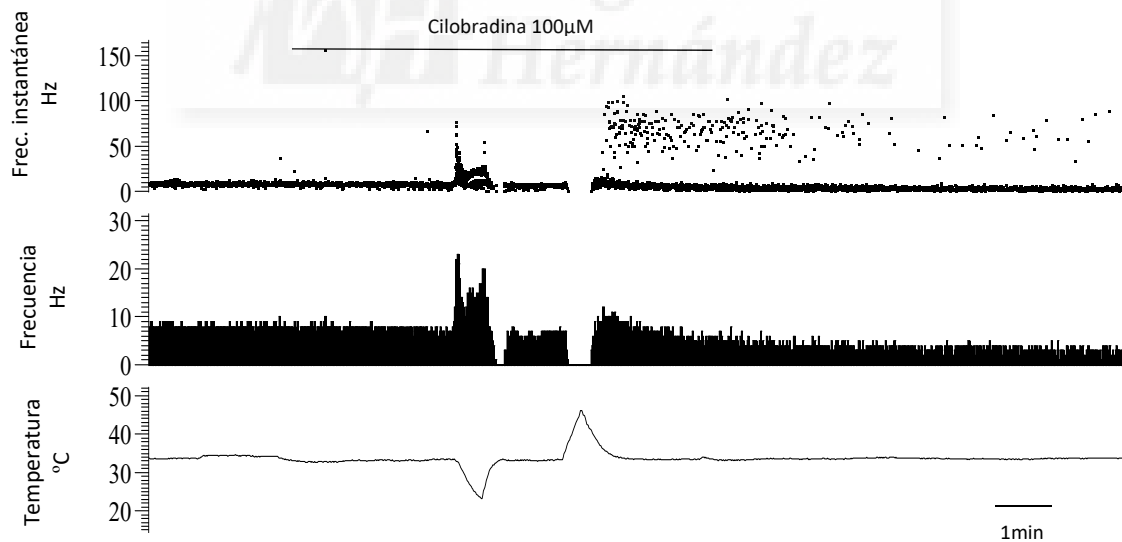


Figura 4.31. Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal con deficiencia lagrimal durante 4 semanas en la que la cilobradina (100 μ M) produjo cambios en el patrón de disparo, además de disminuir la frecuencia media de disparo. Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

Tabla 4.14. Número de terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas de cobayas con deficiencia lagrimal que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con cilobradina a distintas concentraciones.

	Concentración de cilobradina		
	30 μ M	100 μ M	300 μ M
Nº de unidades	2/6	3/6	3/5

C. Efecto sobre la respuesta al enfriamiento

- Umbral de frío

Los cambios sobre el umbral de respuesta a una rampa de frío no se modificaron significativamente tras la perfusión con ninguna de las concentraciones de cilobradina probadas (**Tabla 4.15**).

Tabla 4.15. Umbrales de frío determinados en terminales de córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con cilobradina a distintas concentraciones. Los datos son media \pm SEM. No se encontraron diferencias significativas, One way ANOVA medidas repetidas.

		Umbral de frío (Δ temperatura, $^{\circ}$ C)			
		Antes	Durante	30 min de lavado	60 min de lavado
Cilobradina (μ M)	30 (n=6)	-3.2 \pm 0.8	-2.3 \pm 0.4	-3.8 \pm 0.7	-2.5 \pm 0.6
	100 (n=6)	-3.6 \pm 0.6	-3.2 \pm 0.6	-3.0 \pm 0.3	-2.5 \pm 0.6
	300 (n=5)	-2.5 \pm 0.5	-3.4 \pm 0.8	-3.0 \pm 0.6	-3.1 \pm 0.5

- Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico)

La respuesta máxima al enfriamiento de las terminaciones corneales sensibles a frío registradas en córneas con deficiencia lagrimal de 4 semanas disminuyó con la perfusión con cilobradina, para las tres concentraciones empleadas (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M) (**Figura 4.32**). La cilobradina a 30 μ M redujo ligeramente la respuesta máxima al frío; mientras que a concentraciones mayores, la disminución de la respuesta máxima a la rampa de frío fue de mayor magnitud, siendo significativa para la cilobradina 300 μ M a los 30 minutos y a los 60 minutos de lavado ($p < 0.01$, One Way ANOVA), indicando un efecto duradero en el tiempo.

EFFECTO DE LA CILOBRADINA SOBRE LA RESPUESTA MÁXIMA AL FRÍO DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CON DEFICIENCIA LAGRIMAL

% DE LA REDUCCIÓN DE LA FRECUENCIA PICO DURANTE UNA RAMPA DE FRÍO

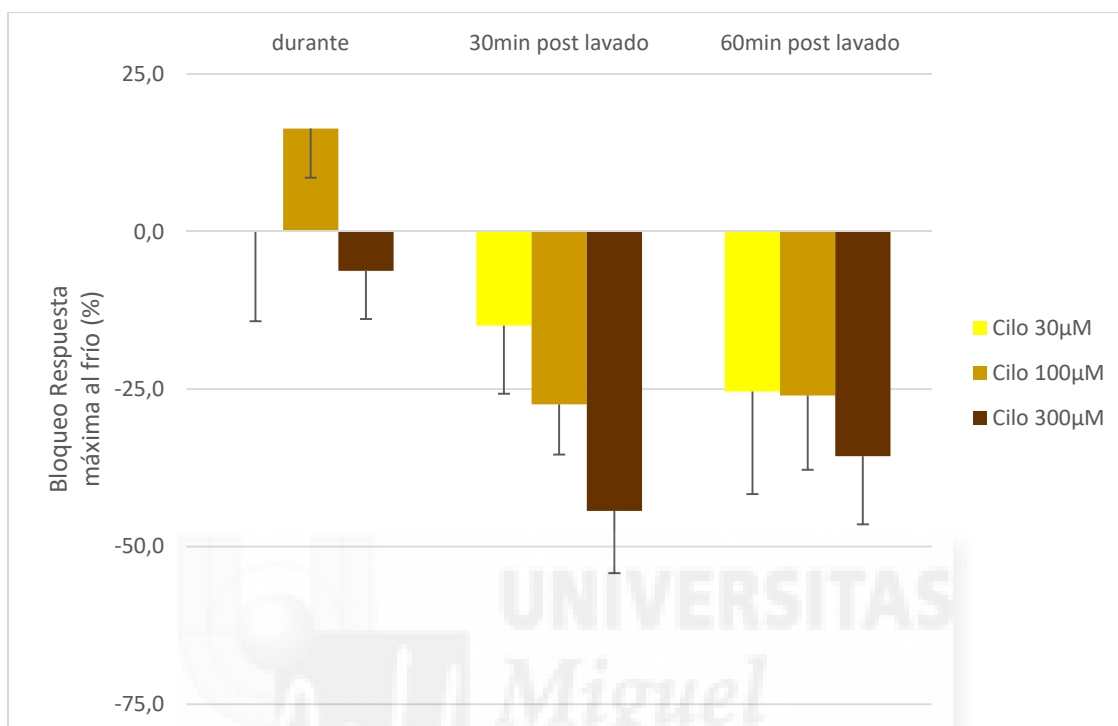


Figura 4.32. Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico) de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con cilobradina a tres concentraciones diferentes (30 μM, n=6; 100 μM, n=6; 300 μM, n=5). Los valores son media ± SEM del cambio (en %) de la frecuencia pico alcanzada durante una rampa de frío (de 34° a 20°C) realizada durante la perfusión con el fármaco, y a los 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la frecuencia pico obtenido en una rampa de frío aplicada antes de perfundir con cilobradina. No existen diferencias significativas entre los efectos de las distintas concentraciones a cada uno de los tiempos estudiados.

4.2.2.3 Zatebradina

Córneas intactas.

A. Efecto sobre la frecuencia basal de disparo

El efecto más evidente observado tras la perfusión con zatebradina fue la disminución de la actividad espontánea de forma gradual. Un ejemplo de este efecto se muestra gráficamente en la **Figura 4.33**.

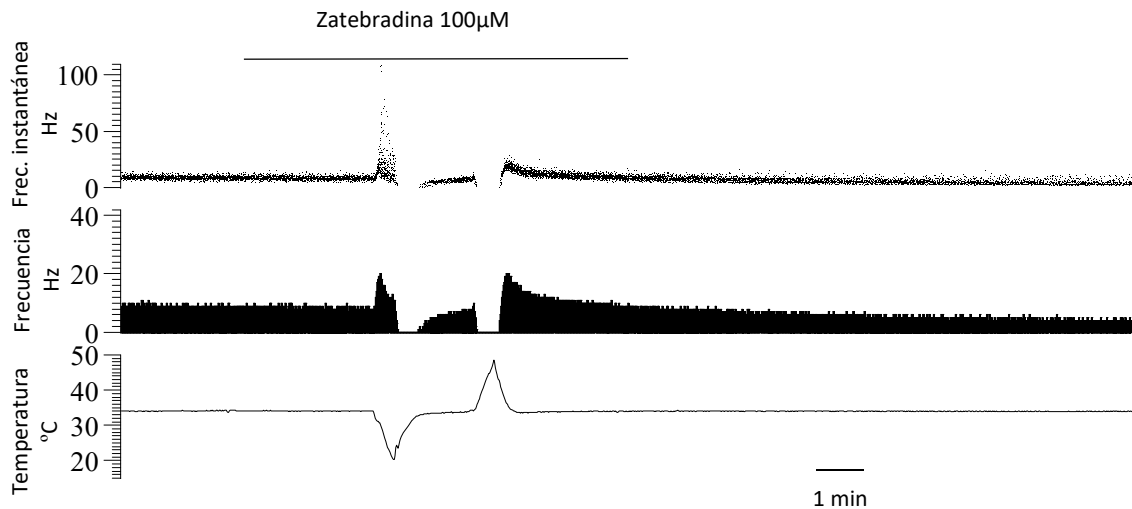


Figura 4.33. Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible al frío de una córnea control, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo zatebradina ($100\mu\text{M}$). Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

Se observó una disminución gradual de la actividad basal a lo largo del tiempo tras exponer la córnea al fármaco a cualquiera de las concentraciones probadas ($30\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ y $300\mu\text{M}$) (**Figuras 4.34** y **4.35**). También se observó que cuánto mayor fue la concentración empleada, más rápido empezaba a reducirse la actividad espontánea de la terminación, siendo el fármaco a $30\mu\text{M}$ más lento en actuar y a $300\mu\text{M}$ más rápido (**Figuras 4.34** y **4.35**).

EFFECTO DE LA ZATEBRADINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CONTROL

% DE REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA A 34°C

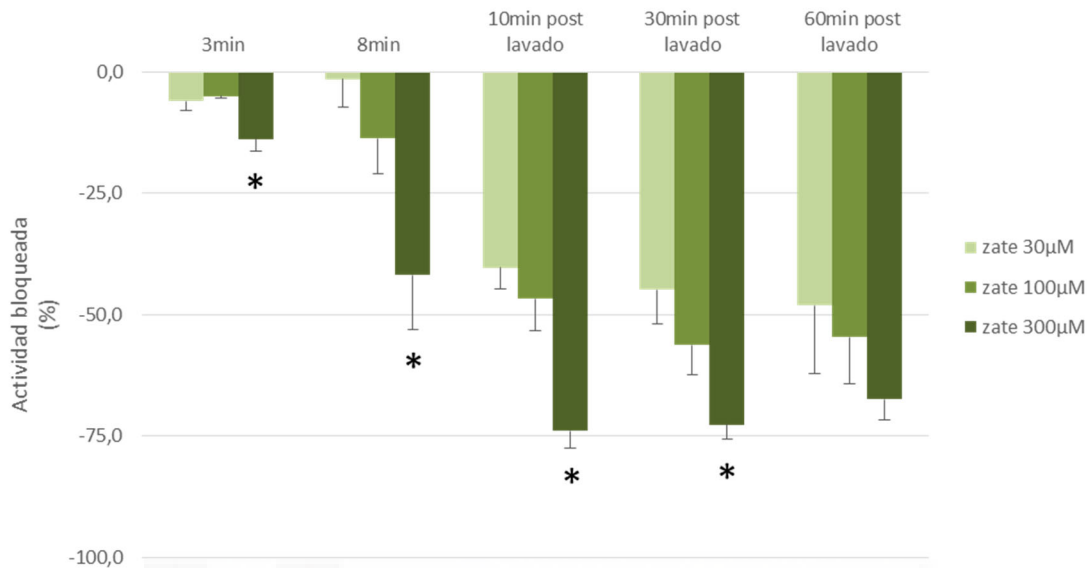


Figura 4.34. Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes. Los valores son media \pm SEM ($n=6$ para todas las concentraciones) del cambio (en %) de la actividad medida a los 3 y a los 8 minutos de la perfusión con el fármaco, y a los 10, 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la actividad espontánea medido antes de perfundir con zatebradina. * $p < 0.05$, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

CURVA DOSIS/RESPUESTA

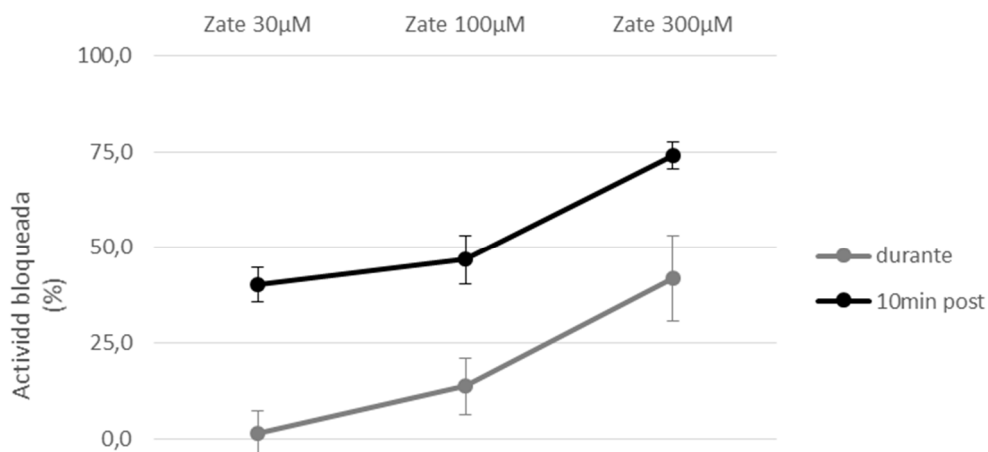


Figura 4.35. Curva dosis/respuesta del efecto de la perfusión con zatebradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas intactas, calculado en el último minuto de perfusión con el fármaco (durante) y 10 minutos después del cese de ésta. Se ha representado la media \pm SEM del bloqueo (en %) de la actividad previa a la perfusión. Las curvas muestran que el efecto es dependiente de la concentración y del tiempo tras la exposición al fármaco.

B. Cambios en el patrón de disparo

De forma similar a lo observado con los otros bloqueantes de canales HCN, junto a su efecto inhibitorio sobre la actividad espontánea de las terminaciones de frío, la zatebradina modificó en algunos casos el patrón de disparo de dichas terminaciones (**Tabla 4.16**). La **Figura 4.36** ilustra un ejemplo de este cambio de patrón de disparo inducido por la perfusión con zatebradina.

Tabla 4.16. Número de terminaciones corneales sensibles al frío registradas en córneas de cobayas control que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con zatebradina a distintas concentraciones.

	Concentración de zatebradina		
	30 μ M	100 μ M	300 μ M
Nº de unidades	3/6	2/6	5/6

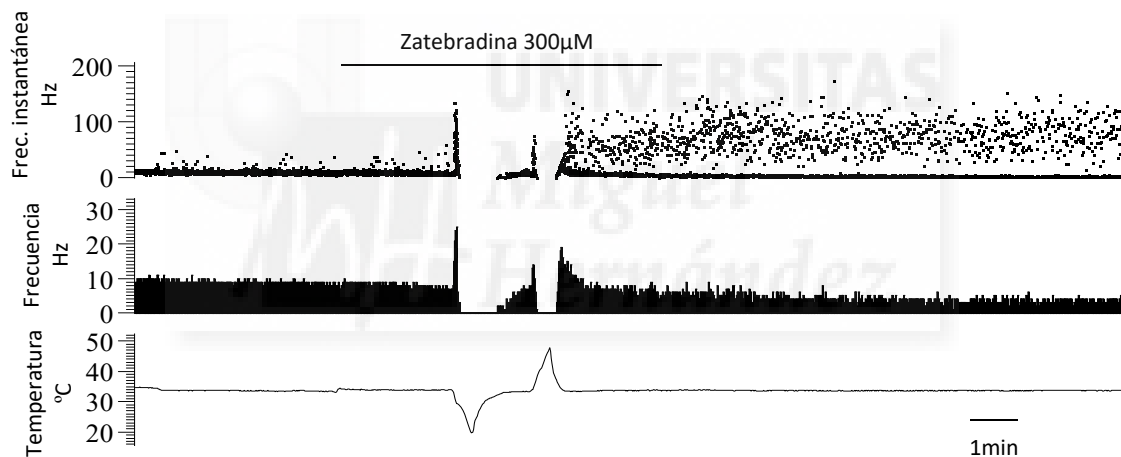


Figura 4.36. Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal control en el que la zatebradina (300 μ M) produjo cambios en el patrón de disparo, además de disminuir la frecuencia media de disparo. Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

C. Efecto sobre la respuesta al enfriamiento

- Umbral de frío

La zatebradina probada no produjo cambios significativos en el umbral de respuesta al enfriamiento a ninguna de las concentraciones ensayadas (**Tabla 4.17**).

Tabla 4.17. Umbrales de frío determinados en terminales de córneas control, antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con zatebradina a distintas concentraciones. Los datos son media \pm SEM. No se encontraron diferencias significativas, One way ANOVA medidas repetidas.

		Umbral de frío (Δ temperatura, $^{\circ}$ C)			
		Antes	Durante	30 min de lavado	60 min de lavado
Zatebradina (μ M)	30 (n=6)	-3.1 \pm 0.3	-2.6 \pm 0.3	-2.9 \pm 0.5	-3.3 \pm 0.6 (n=3)
	100 (n=6)	-3.3 \pm 0.3	-3.0 \pm 0.5	-3.5 \pm 0.6	-3.2 \pm 0.5
	300 (n=6)	-3.8 \pm 0.5	-3.6 \pm 0.4	-3.4 \pm 0.6	-2.7 \pm 0.5

- Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico)

EFFECTO DE LA ZATEBRADINA SOBRE LA RESPUESTA MÁXIMA AL FRÍO DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CONTROL

% DE LA REDUCCIÓN DE LA FRECUENCIA PICO DURANTE UNA RAMPA DE FRÍO

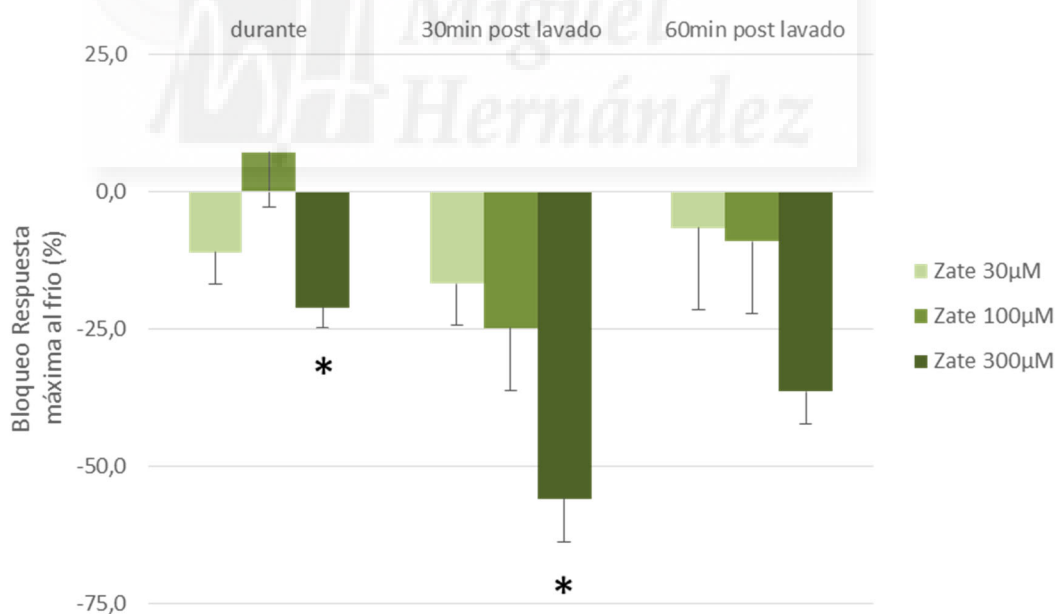


Figura 4.37. Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico) de los termorreceptores de frío registrados en córneas intactas, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes. Los valores son media \pm SEM (n=6 para las tres concentraciones) del cambio (en %) de la frecuencia pico alcanzada durante una rampa de frío (de 34 $^{\circ}$ a 20 $^{\circ}$ C) realizada durante la perfusión con el fármaco, y a los 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la frecuencia pico obtenido en una rampa de frío aplicada antes de perfundir con zatebradina. *p<0.05, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

La perfusión con zatebradina 30 μ M y 100 μ M no modificó la frecuencia pico en respuesta a las rampas de frío. Sin embargo, durante la perfusión con zatebradina 300 μ M se observó una disminución de la respuesta máxima al frío que se mantuvo a los 30 minutos de lavado y empezaba a recuperar los valores normales a los 60 minutos (Figura 4.37).

Córneas con deficiencia lagrimal de 4 semanas de duración.

A. Efectos sobre la frecuencia basal de disparo

De forma similar a lo que ocurre en las córneas control, las terminaciones sensibles a frío de las córneas con ojo seco redujeron su actividad espontánea basal, de manera gradual en el tiempo, por efecto de la perfusión con zatebradina a cualquiera de las concentraciones probadas, 30 μ M, 100 μ M y 300 μ M. Un ejemplo de este efecto se muestra en la Figura 4.38.

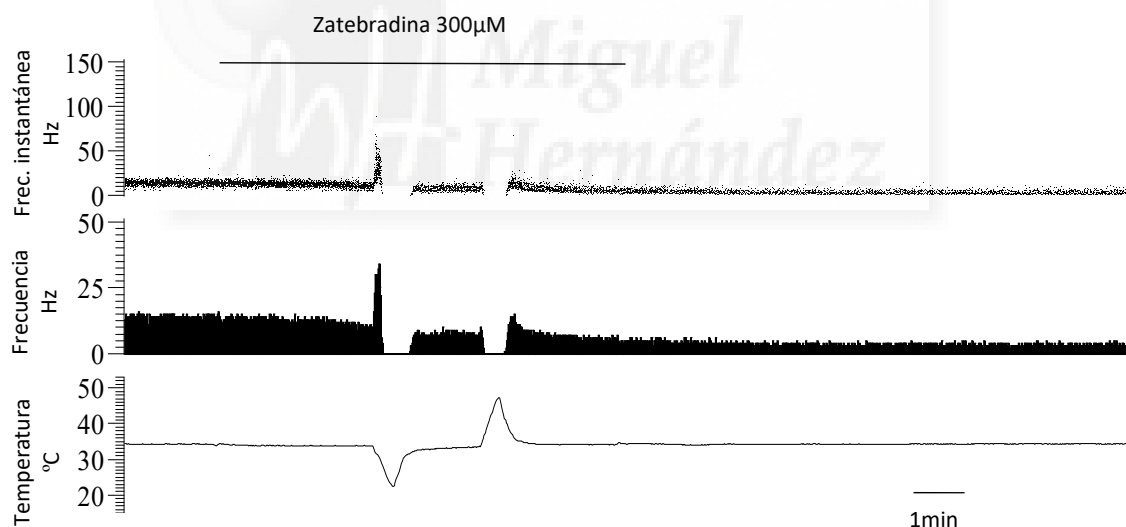


Figura 4.38. Ejemplo del análisis del registro electrofisiológico de una terminación corneal sensible a frío de una córnea con deficiencia lagrimal, antes, durante y después de perfundir con solución conteniendo zatebradina (300 μ M). Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

EFECTO DE LA ZATEBRADINA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CON DEFICIENCIA LAGRIMAL

% DE REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA A 34°C

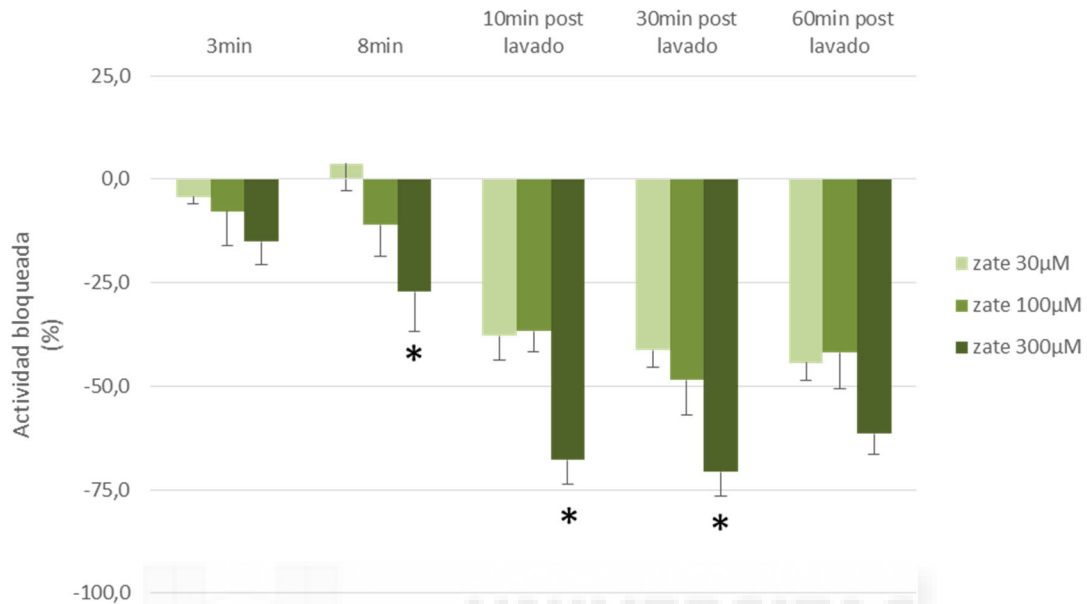


Figura 4.39. Efecto sobre la actividad basal de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes. Los valores son media \pm SEM del cambio (en %) de la actividad medida a los 3 y a los 8 minutos de la perfusión con el fármaco, y a los 10, 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la actividad espontánea medido antes de perfundir con cilobradina. N=6 para las tres concentraciones. * $p < 0.05$, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, diferencias entre concentraciones.

CURVA DOSIS/RESPUESTA

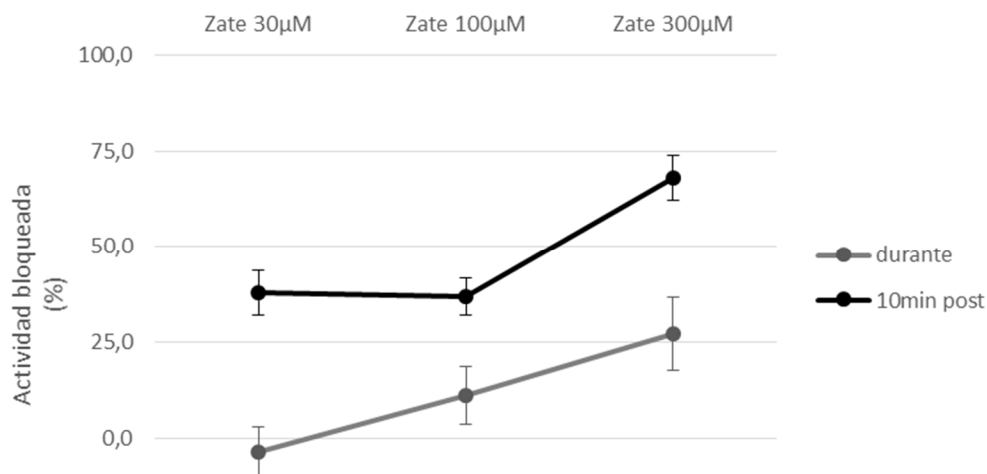


Figura 4.40. Curva dosis/respuesta del efecto de la perfusión con zatebradina sobre la actividad basal de las terminaciones de frío en córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, calculado en el último minuto de perfusión con el fármaco (durante) y 10 minutos después del cese de ésta. Se ha representado la media \pm SEM del bloqueo (en %) de la actividad previa a la perfusión. Las curvas muestran que el efecto es dependiente de la concentración así como del tiempo tras la exposición al fármaco.

Se vio un efecto de inhibición de la actividad de las terminaciones con las tres concentraciones probadas, siendo éste un efecto dependiente de la concentración de zatebradina, ya que cuando probamos el fármaco a las concentraciones más bajas (30 μ M y 100 μ M) la reducción de la actividad fue menor (valores máximos del 45-50%) que cuando usamos zatebradina a 300 μ M, que reduce aproximadamente un 70% la actividad (**Figura 4.39**). Si representamos el efecto inhibitorio como porcentaje de reducción de la actividad espontánea respecto a la que presenta cada terminal en condiciones basales (antes de perfundir con el fármaco) se observa que la intensidad del efecto es dosis-dependiente (**Figura 4.40**).

B. Efectos sobre el patrón de disparo

De forma similar a lo encontrado en el grupo de animales control, encontramos una parte de las terminaciones que mostraron cambios en su patrón de disparo (**Figura 4.41**). En la **Tabla 4.18** se muestra la proporción de terminaciones que desarrollaron cambios en su patrón de disparo, pasando a presentar un disparo en ráfagas a temperatura basal de 34°C.

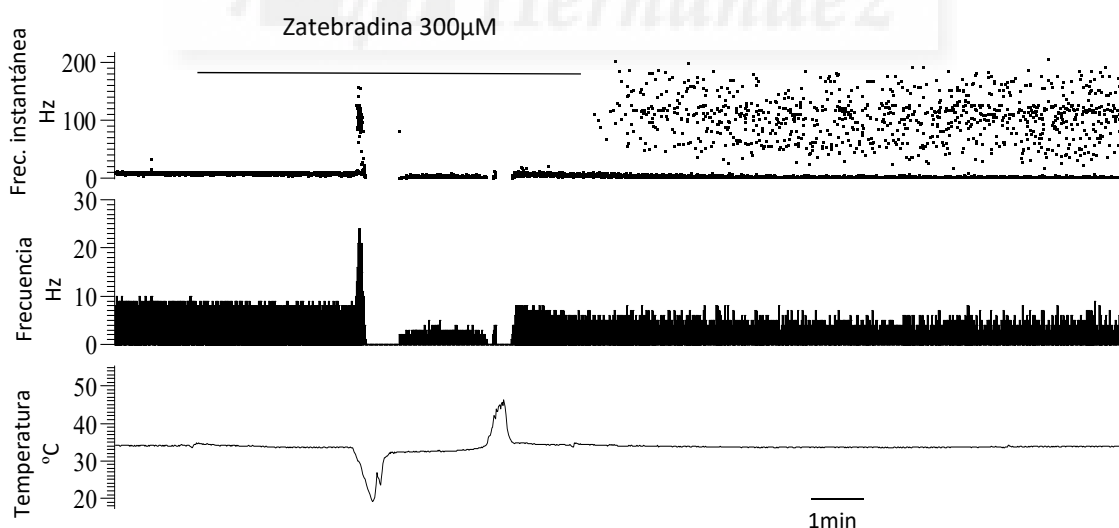


Figura 4.41. Ejemplo del análisis del registro de la actividad de una terminación sensible al frío de una córnea de un animal con deficiencia lagrimal durante 4 semanas en la que la zatebradina (300 μ M) produjo cambios en el patrón de disparo, además de disminuir la frecuencia media de disparo. Se muestran la frecuencia instantánea (es decir, la inversa del intervalo entre dos impulsos consecutivos), la frecuencia de disparo por segundo y la temperatura de la solución de perfusión.

Tabla 4.18. Número de terminaciones corneales sensibles al frío registradas en córneas de cobayas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas que desarrollaron un patrón de disparo en ráfagas tras la perfusión con zatebradina a distintas concentraciones.

	Concentración de zatebradina		
	30 μ M	100 μ M	300 μ M
Nº de unidades	1/6	2/6	4/6

C. Efecto sobre la respuesta al enfriamiento.

Umbral de frío

Los umbrales de respuesta al frío no se modificaron de forma significativa con la zatebradina, a las concentraciones probadas (**Tabla 4.19**).

Tabla 4.19. Umbrales de frío determinados en terminales de córneas con deficiencia lagrimal, antes, durante y diferentes tiempos después de finalizar la perfusión con zatebradina a distintas concentraciones. Los datos son media \pm SEM. No se encontraron diferencias significativas, One way ANOVA medidas repetidas.

		Umbral de frío (Δ temperatura, $^{\circ}$ C)			
		Antes	Durante	30 min de lavado	60 min de lavado
Zatebradina (μ M)	30 (n=6)	-3.0 \pm 0.4	-2.8 \pm 0.4	-4.0 \pm 0.7	-3.0 \pm 1.5
	100 (n=6)	-3.6 \pm 0.6	-4.2 \pm 0.9	-4.1 \pm 0.6	-3.8 \pm 0.5
	300 (n=6)	-3.1 \pm 0.4	-3.2 \pm 0.5	-2.9 \pm 0.5	-2.8 \pm 0.5

- Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico)

La zatebradina a concentraciones de 30 μ M o 100 μ M apenas produjo cambios en la respuesta máxima al frío. Sólo cuando se probó el fármaco a 300 μ M se observó una reducción significativa de la respuesta máxima a la rampa de frío, que se mantuvo en el tiempo, estando presente a los 30 y 60 min de lavado (**Figura 4.42**).

EFFECTO DE LA ZATEBRADINA SOBRE LA RESPUESTA MÁXIMA AL FRÍO DE RECEPTORES DE FRÍO EN CÓRNEAS CON DEFICIENCIA LAGRIMAL

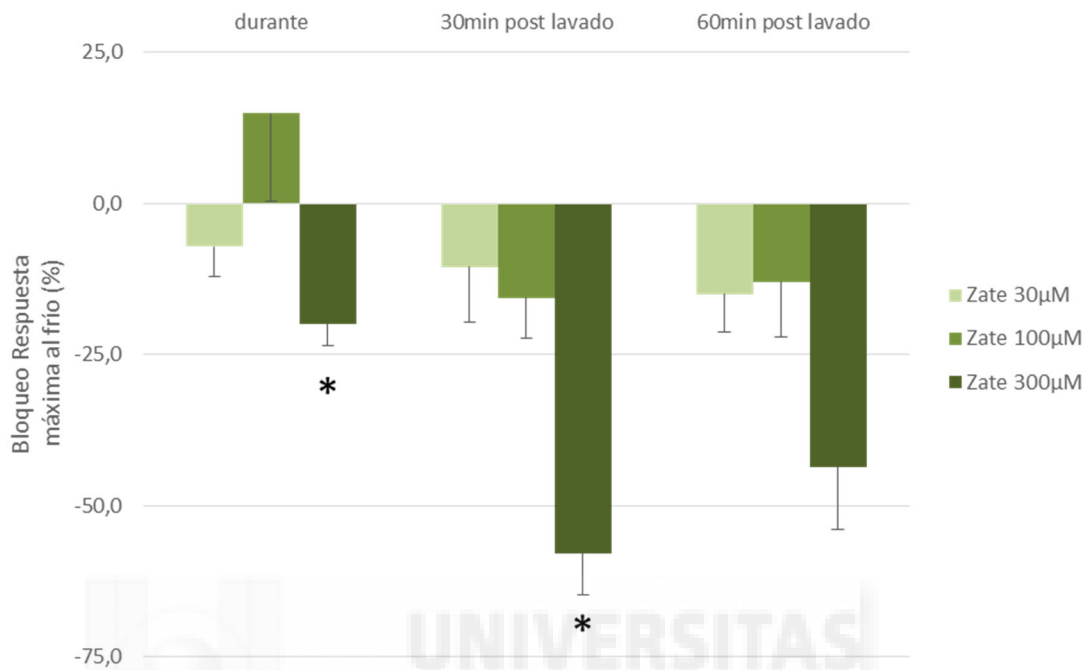


Figura 4.42. Efecto sobre la respuesta máxima al enfriamiento (frecuencia pico) de los termorreceptores de frío registrados en córneas con deficiencia lagrimal, de la perfusión con zatebradina a tres concentraciones diferentes (30µM, n=6; 100µM, n=6; 300µM, n=6). Los valores son media ± SEM del cambio (en %) de la frecuencia pico alcanzada durante una rampa de frío (de 34° a 20°C) realizada durante la perfusión con el fármaco, y a los 30 y 60 minutos de finalizar dicha perfusión, respecto al valor de la frecuencia pico obtenido en una rampa de frío aplicada antes de perfundir con zatebradina. *p<0.05, One Way ANOVA con Holm-Sidak test, comparación del efecto entre concentraciones.

4.2.2.4 Comparación entre los efectos de los diferentes fármacos bloqueantes de HCN en córneas control y con deficiencia lagrimal crónica.

Córneas intactas vs. córneas con deficiencia lagrimal crónica.

El efecto de los tres fármacos bloqueantes de canales HCN estudiados fue similar en los termorreceptores de frío de córneas intactas y en los de córneas con deficiencia lagrimal durante 4 semanas, tanto en el caso de la reducción de la actividad espontánea a temperatura basal (estando el momento del efecto máximo a los 10 minutos de iniciar el lavado), como en el caso de la respuesta máxima durante la rampa de frío o frecuencia pico (encontrándose en este caso la reducción máxima en la respuesta a la rampa realizada a los 30 minutos de iniciar el lavado del fármaco). Para ilustrar esa similitud en la acción de los tres bloqueantes de canales HCN en las córneas control y en las córneas sometidas a deficiencia lagrimal, en las **Figuras 4.43** y **4.44** se ha representado el porcentaje de bloqueo de la actividad espontánea y de la frecuencia pico obtenidos en terminales de córneas intactas (control) y con deficiencia lagrimal (Ojo seco) perfundidas con los tres fármacos a la máxima concentración (300 μ M).

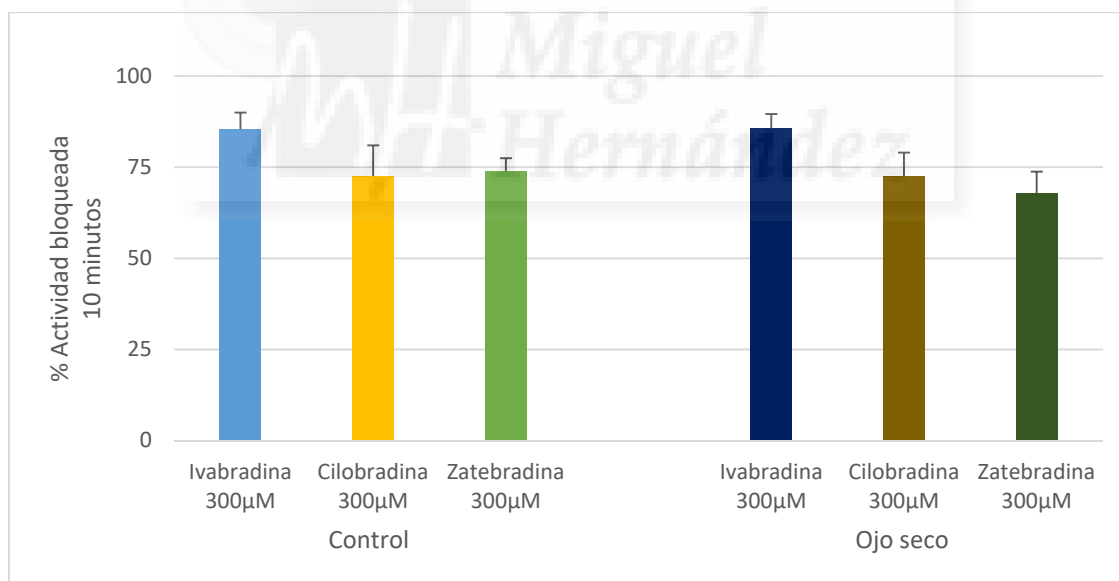


Figura 4.43. Comparación del porcentaje de bloqueo de la actividad espontánea a temperatura basal (34°C) de los termorreceptores de frío de córneas intactas (control) y córneas con deficiencia lagrimal (ojo seco) en el momento de máximo efecto sobre este parámetro, que se observó a los 10 minutos de iniciar el lavado del fármaco. No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos (ANOVA).

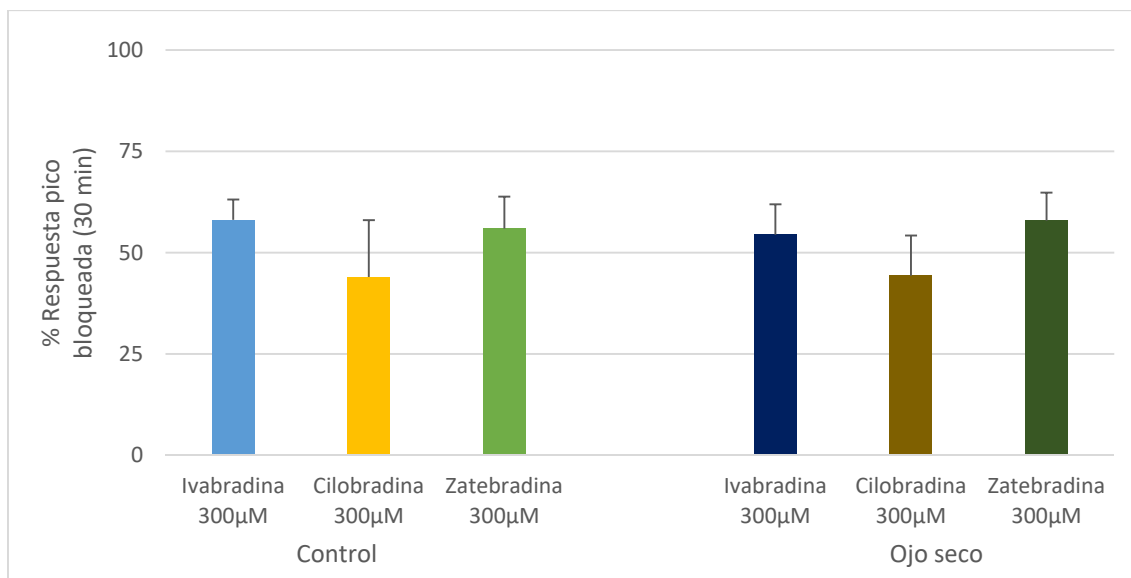


Figura 4.44. Comparación del porcentaje de bloqueo de la máxima respuesta al frío (frecuencia pico durante una rampa de frío de 34°C a 20°C) de los termorreceptores de frío de córneas intactas (control) y córneas con deficiencia lagrimal (ojo seco) en el momento de máximo efecto que se observó a los 30 minutos de iniciar el lavado del fármaco. No se encontraron diferencias significativas (ANOVA).

Ivabradina vs. cilobradina vs. zatebradina.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el efecto bloqueante de los diferentes fármacos, ni sobre la actividad basal, ni sobre la respuesta máxima al frío, por lo que puede concluirse que, a pesar de existir algunas diferencias en cuanto al curso temporal de su efecto, los tres fármacos fueron igual de efectivos (**Figura 4.43 y 4.44**).



DISCUSIÓN



5 DISCUSIÓN

En la presente Tesis se muestra que la inducción de deficiencia lagrimal crónica por extirpación de la glándula lagrimal principal en el cobaya es un buen modelo para estudiar sus efectos sobre la actividad de los nervios sensoriales de la córnea, así como para el estudio de su modulación farmacológica. Se trata de un modelo de realización relativamente sencilla, ya que en esta especie, al igual que en los murinos, la glándula lagrimal principal está ubicada fuera de la órbita. Esta localización extraorbitaria ofrece un beneficio adicional, ya que el acto quirúrgico se realiza lejos del globo ocular y sus anejos, por lo que no se ven afectados directamente por la intervención. En esta Memoria se describen, en primer lugar, las alteraciones que se producen en la actividad de los nervios nociceptores y termorreceptores corneales, encontrándose que los cambios más significativos y a más largo plazo se dan en los termorreceptores de frío, aumentando su excitabilidad y, por tanto, su actividad basal y su respuesta al frío. Estos termorreceptores son precisamente los receptores sensoriales implicados en proveer al sistema nervioso central de la información necesaria para la regulación de la lagrimación y parpadeo basal, y los responsables de la génesis de las sensaciones de sequedad y malestar ocular evocadas desde la superficie ocular en respuesta a cambios ambientales o en determinadas situaciones patológicas. Los resultados de esta tesis también muestran que varias moléculas bloqueantes de canales de Na^+ o de K^+ (entre estos últimos, en concreto los bloqueantes de los canales HCN) son capaces de disminuir el incremento de excitabilidad de los termorreceptores provocada por la deficiencia lagrimal crónica experimental, lo que sugiere que estos canales podrían ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco.

1. Modelo de deficiencia lagrimal crónica por extirpación de la glándula lagrimal principal en el cobaya.

Existe gran variedad de modelos experimentales, en varias especies animales, que intentan imitar los diferentes mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo del ojo seco. También se pueden encontrar modelos animales “espontáneos” de ojo seco, como ocurre con ciertas razas de perro (Kaswan et al., 1989). Actualmente el ratón es el modelo más comúnmente usado, debido a la posibilidad de usar diferentes

cepas modificadas genéticamente y a la disponibilidad de buenos anticuerpos (Schrader et al., 2008).

En algunos modelos experimentales se controlan y modifican las condiciones ambientales para producir una desecación de la superficie ocular (Barabino et al., 2005; Chen et al., 2008), mientras que en otros, además de modificar el ambiente, se aumenta la evaporación de la película lagrimal manteniendo un flujo continuo de aire dirigido a los ojos. Este método de aplicar una corriente de aire a veces se combina con el tratamiento sistémico con escopolamina, un antagonista de los receptores muscarínicos de la acetilcolina que inhibe la secreción de las glándulas lagrimales bloqueando la acción del sistema nervioso parasimpático sobre dicho tejido glandular (Dursun et al., 2002). A la complejidad de mantener las condiciones ambientales y al estrés añadido que sufren los animales al estar expuestos a corrientes de aire, en el caso del modelo que utiliza la escopolamina, se unen todos aquellos efectos secundarios no deseados consecutivos a la administración sistémica de un parasimpaticolítico, con afectación de numerosas glándulas de secreción exocrina, vasos sanguíneos, frecuencia cardíaca, etc.

Otro modelo descrito en la literatura con el que producir “ojo seco” experimental es la instilación ocular de cloruro de benzalconio a altas concentraciones (Lin et al., 2011; Xiong et al., 2008). El cloruro de benzalconio es una molécula ampliamente utilizada como antiséptico y desinfectante que se utiliza habitualmente como conservante en la industria farmacéutica, especialmente en los colirios. Los efectos sobre la superficie ocular del cloruro de benzalconio dependen de la concentración empleada, pero cuando se instila repetidamente a una concentración de 0.02% (cercana a las empleadas en los colirios), provoca una alteración significativa de la integridad del epitelio corneal y el desarrollo de hiperalgesia, resultado de la sensibilización de los nervios de la superficie ocular (Joubert et al., 2018). La aplicación tópica de cloruro de benzalconio por encima de esa concentración ciertamente provoca las alteraciones del epitelio corneal características del ojo seco y una reducción de la tasa de secreción lagrimal, pero además induce una intensa reacción inflamatoria de la superficie del ojo y de los párpados de larga duración, con numerosos efectos adicionales adversos, por lo que no puede considerarse un buen modelo experimental para inducir la enfermedad de ojo seco.

Para la inducción de ojo seco lácrimo-deficiente, otro método empleado en la literatura es la ablación o extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal. Este procedimiento fue inicialmente desarrollado en el perro (Gelatt et al., 1975; Helper et al., 1974), el conejo (Gilbard et al., 1987; Gilbard et al., 1988) o el gato (Johnson et al., 1990; McLaughlin et al., 1988), y posteriormente se utilizó en otras especies como el ratón (Stevenson et al., 2014), la rata (Hirata et al., 2018; Meng et al., 2015) o incluso el mono-ardilla (Maitchouk et al., 2000). La severidad de los signos que produce son variables según se realice únicamente la ablación de la glándula lagrimal principal o se combine con la ablación de las glándulas accesorias, e incluso algunos autores indican que el nivel de severidad pueden ser distinto según el sexo de los animales estudiados (Skrzypecki et al., 2019), siendo los síntomas más severos en las hembras.

En nuestro caso, se eligió el cobaya como animal de experimentación, ya que es el animal que se utiliza de manera estandarizada en nuestro laboratorio tanto para realizar estudios de comportamiento nocifensivo en respuesta a la instilación ocular de sustancias, como para la medición de la producción lagrimal, frecuencia de parpadeo y, especialmente, para el registro electrofisiológico de la actividad de los receptores sensoriales de la córnea, registrando tanto sus terminaciones, como los axones que abandonan el ojo con los nervios ciliares largos y cortos (Acosta et al., 2013, 2014). Para la realización de esta tesis se utilizaron animales albinos (cepa Dunkin), jóvenes (2-5 meses) y de ambos sexos. Estudios previos de nuestro grupo muestran que en ese rango de edad no existen diferencias en la actividad de la inervación sensorial corneal debido a la edad y tampoco entre sexos (Gallar et al., 2018). La extirpación quirúrgica de la glándula lagrimal principal en el cobaya se mostró un modelo efectivo al provocar la reducción de la tasa lagrimal significativa y mantenida a lo largo del tiempo, acompañada de una serie de cambios tanto morfológicos como funcionales de la inervación corneal, si bien los signos clínicos se limitan a una ligera hiperemia conjuntival y la aparición ocasional de punteado epitelial al teñir con fluoresceína (Kovács, Luna et al., 2016). La disminución significativa de la tasa lagrimal se produjo de manera inmediata tras la cirugía, obteniéndose a la semana tras la cirugía valores de aproximadamente el 30% de la tasa de lagrimación en condiciones control. Esa reducción de aproximadamente un 70% de los valores basales se mantuvo hasta las 8 semanas tras la cirugía (datos no mostrados). Los datos obtenidos con nuestro modelo, en cuanto a disminución de tasa de lagrimación, son consistentes con los encontrados en

otros modelos de ojo seco lácrimo-deficiente por extirpación de la glándula lagrimal principal mencionados en los párrafos anteriores (Callejo et al, 2015).

La reducción de la producción lagrimal se produjo, obviamente, en el ojo ipsilateral a la cirugía, aunque en el ojo contralateral también se vio afectado, observándose una disminución gradual de la producción de lágrima que alcanzó niveles significativos a las 4 semanas tras la extirpación de la glándula. Los cambios en la tasa de lagrimación del ojo contralateral a la cirugía se produjeron de forma más lenta, empezando a apreciarse a partir de la segunda semana de la cirugía, y se mantuvieron también a largo plazo (datos no mostrados). No es la primera descripción de la presencia de efectos contralaterales tras intervenciones experimentales realizados de manera unilateral o en patologías que afectan a un solo ojo, circunstancias en las que el ojo contralateral también se ve alterado, aunque en menor medida, probablemente debido a una respuesta generalizada del sistema inmune que afecta a ambos ojos (Gallar Martínez, 2010; Cruzat et al., 2015; Gallar et al., 2016; Lee et al., 2019).

La deficiencia lagrimal crónica inducida por extirpación de la glándula lagrimal principal también provoca cambios morfológicos en la inervación corneal a partir de las 4 semanas, consistentes en una menor densidad de las terminaciones intraepiteliales corneales y de los nervios del plexo subbasal, acompañadas de un aumento del grosor y tortuosidad de dichos nervios (Kovács, Luna et al., 2016), cambios similares a los que se han encontrado en otros modelos de ojo seco (Simsek et al., 2019). Estos cambios morfológicos se deben probablemente a la puesta en marcha por las neuronas sensoriales primarias de una respuesta a la agresión que supone la disminución de su humedad, que se desarrollaría en paralelo a los cambios en la expresión de canales iónicos que lleva a la alteración de la actividad eléctrica y la funcionalidad de los nervios corneales durante la deficiencia lagrimal crónica (Belmonte et al., 2017; Kovács, Luna, et al., 2016).

2. Los nociceptores corneales se sensibilizan al inicio de la deficiencia lagrimal crónica.

La deficiencia lagrimal crónica parece provocar la sensibilización de los nociceptores corneales de manera transitoria. Aunque durante la primera semana tras la extirpación de la glándula lagrimal principal se produce un aumento del porcentaje de

mecano-nociceptores con actividad espontánea y una pequeña disminución del umbral mecánico, ambos parámetros vuelven a valores normales cuatro semanas tras la cirugía. Los nociceptores polimodales, muestran también mayor actividad espontánea una semana tras la cirugía, que se ha revertido tres semanas después, momento en el que, sin embargo, todavía está elevada su respuesta a la estimulación química con CO₂. Es probable que los cambios de osmolaridad lagrimal que se producen al disminuir la producción de lágrima estén afectando a la actividad de los nociceptores polimodales (Parra et al., 2014; González-González et al., 2017). Aunque en este modelo los cambios de la actividad espontánea y la respuesta a la estimulación natural de los nociceptores parecen transitorios y poco significativos, los resultados obtenidos concuerdan con numerosos trabajos previos publicados en los que, como consecuencia de la lesión tisular, se produce una inflamación del tejido que provoca la sensibilización de las terminaciones nerviosas nociceptivas, fundamentalmente las de los nociceptores polimodales (Olausson, 1998), principales responsables de la sensación de dolor en todos los tejidos corporales. En el caso concreto de la córnea, resultados similares de sensibilización transitoria de los nociceptores se obtuvieron por nuestro grupo en varios modelos inflamatorios en el cobaya como la inducción de queratoconjuntivitis alérgica (Acosta et al., 2013) o la fotoqueratitis por exposición a la radiación ultravioleta intensa (Acosta et al., 2014), o tras la lesión quirúrgica de la córnea en el gato, el cobaya o el ratón (Gallar et al., 2007; Acosta et al., 2007; Bech et al., 2018).

3. La excitabilidad de los termorreceptores de frío corneales aumenta durante la deficiencia lagrimal crónica.

Tras la deficiencia lagrimal crónica inducida, los cambios observados en la actividad de los termorreceptores de frío fueron más destacables que los de los nociceptores, ya que todos los parámetros analizados para describir la actividad espontánea y la respuesta a la estimulación natural se vieron alterados en situación de sequedad ocular. Así, el umbral de respuesta al frío disminuyó significativamente ya a la semana tras la cirugía, mientras que la actividad basal y la respuesta máxima al frío se incrementaron gradualmente, llegando a ser significativamente más altos tras cuatro semanas (momento en el que eran un 28% y un 23% más altos, respectivamente, que en los termorreceptores de córneas intactas). Tanto el curso temporal como el incremento encontrado fueron similares a los descritos por otros autores en animales de otras

especies sometidos a extirpación de la glándula lagrimal principal (Kurose & Meng, 2013).

Este incremento de actividad espontánea a la temperatura basal de la córnea, y de su sensibilidad de respuesta al frío presente en los termorreceptores de frío durante la deficiencia lagrimal crónica, es radicalmente distinto al cambio en la actividad neural observada en los termorreceptores de frío cuando se induce inflamación de la superficie ocular, bien provocando una reacción alérgica local acompañada de evidentes signos de inflamación ocular (hiperemia y enrojecimiento conjuntival, incremento de tasa de lagrimación, aumento de la frecuencia basal de parpadeo, etc) (Acosta et al., 2013), bien induciendo con radiación UV una inflamación de la córnea y la conjuntiva con menor desarrollo de signos clínicos (Acosta et al., 2014), o incluso lesionando la córnea con un láser excimer (Bech et al., 2018). En dichos casos se ha descrito una reducción significativa de la actividad de los termorreceptores de frío, tanto la espontánea como la evocada por el enfriamiento, cuya base molecular es una inhibición de los canales TRPM8 de las terminaciones termorreceptoras de la córnea inducido por los mediadores de la inflamación, entre ellos la bradiquinina, que inhiben la activación del canal TRPM8 tras formar un complejo entre éste y una proteína $G\alpha_q$ (Zhang et al 2012).

Se ha establecido que la frecuencia basal de parpadeo está gobernada por el sistema nervioso central en base a la actividad tónica de los termorreceptores de frío, generada al activarse, en éstos, los canales TRPM8 y, sobre todo, en base al aumento de esa actividad en respuesta al incremento de osmolaridad de la lágrima (Parra et al., 2014; Belmonte et al., 2015; Quallo et al., 2015). En el presente trabajo, la frecuencia basal de parpadeo no aumentó significativamente con la deficiencia lagrimal crónica inducida. Sólo se observó un pequeño aumento de la frecuencia espontánea de parpadeo la primera semana tras la cirugía, que fue transitorio y desapareció a las cuatro semanas; de hecho, a este tiempo la frecuencia de parpadeo basal había incluso disminuido ligeramente con respecto a la frecuencia de parpadeo que presentaban los animales antes de la cirugía. Esto podría indicar que, o bien se produce una adaptación de los termorreceptores corneales al incremento de la osmolaridad lagrimal, presumiblemente asociada a la reducción de la producción lagrimal (aunque el desarrollo de hiperosmolaridad lagrimal tras la extirpación de la glándula lagrimal principal todavía no se ha confirmado experimentalmente en el cobaya), o bien que, en nuestras condiciones experimentales, los cambios observados en la alteración de la actividad de

los termorreceptores de frío (en particular su aumento de actividad) no son suficientes para causar un cambio significativo en la frecuencia basal de parpadeo. Más aún, puesto que se ha descrito una dependencia directa entre la actividad del canal TRPM8 y la frecuencia basal de parpadeo y, al parecer, no se producen alteraciones en la expresión o en la actividad del canal TRPM8 al extirpar la glándula lagrimal principal (Kovács, Luna, et al., 2016; Bereiter et al., 2018), esta ausencia de cambios en la actividad del TRPM8 podría explicar que no se observe una alteración de la frecuencia de parpadeo basal.

4. Canales de membrana implicados en las alteraciones de la actividad neural de los receptores sensoriales corneales durante la deficiencia lagrimal crónica.

Tal y como se comenta en la introducción, existen varios estudios que relacionan la alteración de la actividad de los receptores sensoriales como consecuencia de la lesión tisular y la inflamación, con la expresión alterada de algunos canales directamente implicados en la transducción sensorial, entre ellos varios canales de la familia TRP (Jordt et al., 2003 y 2004; Xing et al., 2007; Staaf et al., 2009). Sin embargo, en un trabajo realizado por nuestro grupo estudiando las neuronas trigeminales del cobaya que inervan específicamente la córnea, previamente marcadas retrógradamente para su correcta identificación, no se encontraron evidencias de cambios en la actividad de ninguno de ellos tras someter a los animales a deficiencia lagrimal al extirpar la glándula principal. En ese estudio no se encontraron diferencias en el incremento de la señal de Ca^{2+} intracelular inducido por capsaicina (agonista del canal TRPV1), cinamaldehído (agonista del canal TRPA1) o mentol (agonista del canal TRPM8), ni por la disminución de la temperatura (que activa de forma natural el canal TRPM8) entre las neuronas de animales con ojo seco comparadas con las de animales naïve (Kovács, Luna et al., 2016). Otros autores tampoco han encontrado gran participación del TRPM8 en los cambios de la actividad de las neuronas del trigémino consecutivos a la extirpación de la glándula lagrimal, aunque sí del TRPV1 (Bereiter et al., 2018), éste último presente fundamentalmente en las neuronas nociceptoras. Todos estos datos indican que en este tipo de deficiencia lagrimal experimental no se aprecia un aumento de funcionalidad de estos canales, marcando una clara diferencia con respecto a lo que sucede durante la inflamación ocular, en la que sí se ha descrito

incremento de la actividad de algunos de ellos, en particular de TRPA1, TRPV1 y ASIC (Acosta et al., 2013 y 2014; Callejo et al, 2015).

A diferencia de lo que sucede con los canales implicados en la transducción sensorial, la deficiencia lagrimal sí modifica la actividad de varios canales iónicos que participan en la codificación del estímulo y en la génesis de los impulsos nerviosos, tal y como ha puesto también en evidencia nuestro grupo registrando en neuronas corneales marcadas retrógradamente de animales control y con ojo seco (Kovács, Luna et al., 2016; Callejo et al., 2015). Cuando se registraron las corrientes de Na⁺ y las de K⁺ en las neuronas nociceptoras polimodales, se observó un aumento de las corrientes de Na⁺ TTX-S, mientras que en las neuronas que sólo presentaban sensibilidad mecánica, no se observaron diferencias significativas de estas corrientes. Por otro lado, en las neuronas corneales termosensibles al frío se encontró un incremento significativo de las corrientes de Na⁺, sobre todo las TTX-S, y una disminución significativa de las corrientes de K⁺, tanto las de inactivación rápida como las de inactivación lenta. Ambos efectos combinados serían los responsables de provocar el aumento de la excitabilidad, la disminución del umbral y el aumento de la respuesta al frío de las terminaciones nerviosas de dichas neuronas cuando se registran *ex vivo*, tal y como se ha hecho en el presente trabajo.

Las alteraciones en las corrientes de Na⁺ y de K⁺ son características de la respuesta de las neuronas sensoriales primarias a la lesión periférica, y se deben a un cambio, aumento o disminución, en la expresión de los canales iónicos que las originan (Dib-Hajj et al., 2010; Everill and Kocsis, 1999). Esos cambios en la expresión de canales, y en particular el aumento de la expresión de tipos determinados de canales de Na⁺ como los Nav1.7 (de Greef et al., 2019), son responsables del aumento de la excitabilidad que desarrollan las neuronas mientras regeneran tras la lesión de sus axones y constituyen la base del dolor neuropático.

Por tanto, podría concluirse que los cambios de la actividad de los termorreceptores de frío que ha encontrado nuestro grupo en la deficiencia lagrimal crónica se asemejan más a los cambios que se dan en situaciones de neuropatía periférica que a los que aparecen durante la inflamación tisular. En otras palabras, aportan evidencias de que la alteración de la actividad de las neuronas que inervan córneas expuestas durante periodos prolongados a sequedad de la superficie ocular y,

consecuentemente, las sensaciones y el dolor ocular que se experimentan en esas circunstancias, estarían más cerca de ser sensaciones neuropáticas que sensaciones nociceptivas de carácter inflamatorio. El dolor neuropático ha sido definido por la International Association for the Study of Pain, IASP (www.iasp-pain.org) como el dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial y en el modelo de ojo seco experimental aquí empleado sabemos que se producen alteraciones morfológicas que sugieren degeneración y regeneración de los nervios corneales durante la disminución crónica de la producción lagrimal.

El aumento de excitabilidad que aparece en los termorreceptores de frío con la deficiencia lagrimal crónica presenta ciertas similitudes con la que se desarrolla tras el uso de oxaliplatino, un agente quimioterápico con elevada neurotoxicidad que produce lesión de los nervios periféricos cutáneos y provoca la aparición de alodinia al frío. El oxaliplatino aumenta la expresión de los canales de Na⁺-TTX-S, mientras que la expresión de TRPM8 no se ve afectada (Descoeur et al., 2011; Sittl et al., 2012).

4.1. Efecto de los bloqueantes de canales de Na⁺ sobre la actividad de los termorreceptores de frío.

La lidocaína, bloqueante inespecífico de canales de Na⁺, abolió prácticamente de manera completa la actividad basal de los termorreceptores de frío de córneas de ojo seco y su respuesta al enfriamiento (un 82 y 80 % respectivamente de la respuesta en condiciones basales, antes de la exposición a la lidocaína). Esta disminución de la actividad también ocurre en termorreceptores de córneas intactas e incluso en los nociceptores polimodales (Wymer et al., 2009; Belmonte et al., 2009; Belmonte et al., 2015). Aunque en esta memoria sólo se ha mostrado los resultados obtenidos con una única concentración de lidocaína, 100 µM, resultados previos del grupo muestran que la lidocaína a concentraciones menores, 10-50 µM, es igualmente eficaz para abolir casi completamente la actividad de los termorreceptores de frío de la córnea y reducir la respuesta al CO₂ de los nociceptores polimodales, aunque en este último caso, sin alterar su umbral mecánico (Acosta et al, 2007; Belmonte et al, 2009). El elevado porcentaje de bloqueo de la actividad que se aprecia en los termorreceptores de frío también puede deberse a que la lidocaína puede modificar las corrientes a través de

canales HCN (Meng et al., 2011; Zhou et al., 2015), presentes en estos receptores sensoriales.

Por su parte, con la perfusión con lacosamida se consiguió una disminución de la actividad basal y evocada de los termorreceptores de frío de córneas con ojo seco menor que con la lidocaína (bloqueando un 51% la actividad basal y un 33% la respuesta máxima al frío), si bien el efecto fue suficiente para devolver dichos parámetros a valores similares a los obtenidos en termorreceptores de córneas intactas. El mecanismo de acción de la lacosamida es potenciar la inactivación lenta de los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v), aumentando por tanto el periodo refractario del potencial de acción y disminuyendo la excitabilidad neuronal (Beyreuther et al., 2006; Beyreuther et al., 2007). Aunque no se conocen los mecanismos por los que la lacosamida produce una disminución de la actividad espontánea y de la respuesta al frío en las terminaciones termosensibles de las córneas con deficiencia lagrimal crónica pero no modifica la de las terminaciones de córneas control, podría deberse a que actuaría sobre los canales Na_v 1.7 (de Greef et al., 2019), cuya expresión está aumentada tras la lesión de la innervación. Esta diferencia abre una oportunidad terapéutica para utilizar este fármaco tópicamente para el tratamiento del dolor y otras sensaciones de malestar ocular que se deriven del aumento de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular, como es la enfermedad de ojo seco.

Para confirmar la contribución de los canales de Na^+ sensibles a TTX al aumento de la actividad de los termorreceptores de frío, en un grupo de experimentos se ha empleado la hainantoxina IV, una toxina que selectivamente inhibe los canales de Na^+ TTX-S (Xiao y Liang, 2003). Experimentos preliminares, no mostrados en esta memoria, mostraron que la hainantoxina IV reducía la actividad de los termorreceptores de frío de manera dosis-dependiente, con una IC_{50} cercana a 100 nM que ha sido la usada en el presente estudio. La perfusión durante apenas un minuto y medio con hainantoxina IV 100 nM redujo significativamente tanto la actividad basal como la respuesta al frío de los termorreceptores de frío tanto de córneas intactas como de ojo seco, aunque en el caso del ojo seco su efecto fue algo menor (un 44% y 41%, respectivamente), lo que podría reflejar, de manera indirecta, un aumento de la expresión de canales de Na^+ TTX-S, que tienen un papel importante en el incremento de la excitabilidad y la sensibilidad de los termorreceptores de frío durante la deficiencia lagrimal crónica.

4.2. Efecto de los bloqueantes de canales HCN sobre la actividad de los termorreceptores de frío.

La actividad y sensibilidad al frío de los termorreceptores de frío corneales depende de la expresión de TRPM8, aunque su capacidad para codificar el estímulo está modulada por la actividad de otros canales expresados en sus terminaciones periféricas como son los canales K_v y HCN (Viana et al., 2002; Madrid et al., 2009; Orio et al., 2012). Dado que trabajos previos del grupo mostraron que hay una importancia relativa de los canales de potasio dependientes de voltaje en la respuesta dinámica al frío de los termorreceptores de frío (Brock et al., 2006), en el presente trabajo se ha estudiado el efecto de varios fármacos que son conocidos bloqueantes de los canales HCN, a fin de determinar si revertían el aumento de excitabilidad producido por la deficiencia lagrimal crónica. Los bloqueantes estudiados en esta tesis fueron la ivabradina (único fármaco aprobado por la Agencia Médica Europea para la angina de pecho en 2005 y por la FDA en 2015) y dos de sus derivados estructurales, la zatebradina y la cilobradina.

Las concentraciones de los bloqueantes de HCN probadas en la preparación de córnea aislada (30 μ M, 100 μ M y 300 μ M) fueron superiores a la IC50 de bloqueo descritas para células HEK-293 o CHO, o en ovocitos de *Xenopus* (Bucchi et al., 2006; Bucchi et al., 2002; Fan et al., 2012; Lee et al., 2008; Stieber et al., 2006), pero similares a las utilizadas en trabajos previos en los que se ha registrado la actividad de terminaciones corneales de ratón *ex vivo* (Orio et al., 2012). Aunque la concentración más alta que probamos, 300 μ M, es la que presentó un mayor efecto bloqueante, con concentraciones de 30 μ M también se observan reducciones de la actividad de las terminaciones sensoriales corneales tanto en córneas intactas como en las que presentan deficiencia lagrimal.

En los termorreceptores de frío registrados, tanto en córneas intactas como tras la deficiencia lagrimal crónica, los tres fármacos tuvieron su efecto máximo con la mayor concentración probada (300 μ M). Aunque la disminución de la actividad espontánea empezaba a darse al final de los 8 minutos de perfusión con el fármaco en estudio, el efecto bloqueante máximo se obtuvo a los 10 minutos de finalizar la perfusión. A ese tiempo, la actividad espontánea a temperatura basal se reducía aproximadamente en un 75%, disminuyendo también en un 50% la respuesta máxima (frecuencia pico) a la rampa de frío. Esta disminución de la respuesta al enfriamiento

estaría relacionada con la disminución general observada de la actividad de estas terminaciones sensoriales, y no tanto con la transducción del estímulo, ya que ninguno de los fármacos bloqueantes de canales HCN abolió la respuesta a las rampas de frío.

En un porcentaje de termorreceptores de frío se observó también un cambio de su patrón de disparo, generalmente consistente en la aparición de un disparo en ráfagas en terminales que presentaban un disparo regular, al igual que se ha visto registrando en terminaciones termorreceptoras de frío en el ratón (Orio et al 2012), si bien en este caso el bloqueo de la corriente I_h de la que son responsables los canales HCN indujo un cambio en el patrón de disparo sin disminución de la frecuencia media de los termorreceptores corneales. En cuanto al umbral de la respuesta al frío, en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas tras el bloqueo de los canales HCN.

En conjunto, los resultados confirman que, efectivamente, los canales HCN tienen un papel importante en la tasa de disparo de potenciales de acción en los termorreceptores de frío, así como en la codificación de la disminución de temperatura (Orio et al., 2009, 2012). Por tanto, los bloqueantes de los canales HCN serían una buena diana terapéutica para el tratamiento de condiciones patológicas en las que se produzca un aumento de la actividad basal de los termorreceptores de frío y sea necesario reducir su hiperexcitabilidad, como es el caso de la enfermedad de ojo seco. Sin embargo, las moléculas bloqueantes de canales HCN disponibles actualmente no son selectivas, teniendo importantes efectos secundarios sistémicos derivados del bloqueo de la isoforma HCN4, expresada principalmente en el nodo sinoauricular del corazón. Sería necesario desarrollar bloqueantes selectivos para las isoformas del canal implicadas específicamente en la nocicepción y el dolor neuropático e inflamatorio, así como en la codificación del frío por los termorreceptores corneales, que son la HCN1 y la HCN2 (Young et al., 2014; Momin et al 2008, Emery et al 2011; Orio et al 2009, Orio et al 2012).

En resumen, como resultado de la deficiencia lagrimal mantenida de manera crónica durante al menos 4 semanas, los termorreceptores de frío que inervan la córnea presentan un incremento de su actividad espontánea y de la respuesta al frío, con disminución del umbral y aumento de la respuesta máxima, lo que parece deberse a cambios en la actividad de canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, entre otros, pero no a cambios en la actividad de canales TRP. La exposición de esos

termorreceptores de frío con actividad aumentada a bloqueantes más o menos específicos de los canales Na_v y los canales HCN reduce ese aumento de la actividad, en algunos casos en proporciones diferentes al de la reducción de la actividad que se produce en córneas sanas. Los principales efectos se recogen en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Resumen de los principales efectos sobre la actividad basal y la respuesta al frío (expresado como el % medio de bloqueo) de los fármacos bloqueantes de canales de Na^+ y HCN probados en este trabajo.

Efecto sobre la actividad de los termorreceptores de frío					
	Deficiencia lagrimal	Bloqueantes de canales de Na^+			Bloqueantes de canales HCN
		Lidocaína	Lacosamida	Hainantoxina IV	
Actividad espontánea	↑ 28%	↓ 82%	↓ 51%	↓ 44%	↓ 75%
Máxima respuesta al frío	↑ 23%	↓ 80%	↓ 33%	↓ 41%	↓ 50%
		Durante la perfusión	Durante la perfusión	30 min después de la perfusión	10-30 min después de la perfusión

5. Influencia de la lesión y la inflamación en las corrientes iónicas de los receptores sensoriales de la córnea y en las sensaciones evocadas por su activación.

Los datos obtenidos en este trabajo corroboran la teoría de que, en condiciones ambientales adecuadas, la actividad de disparo de potenciales de acción de los termorreceptores de frío (y más concretamente la de los de tipo HB-LT) mantiene la tasa de lagrimación basal (Parra et al., 2010) y de parpadeo espontáneo (Quallo et al., 2015), a pesar de que no se evoquen sensaciones conscientes. Por el contrario, en condiciones ambientales adversas (como las bajas temperaturas o la disminución de la humedad de la superficie ocular por exposición a ambientes secos) se produce un aumento de esa frecuencia de disparo, a la vez que aumenta el reclutamiento progresivo de los termorreceptores de frío de alto umbral (LB-HT). Esta actividad combinada de los termorreceptores HB-LT y LB-HT induciría cambios en la tasa de lagrimación y la frecuencia de parpadeo y, además, evocaría sensaciones conscientes de sequedad, irritación o incluso dolor (Begley et al., 2013). Esto mismo ocurriría en los pacientes con ojo seco, en los que se produce una disminución de la película lagrimal y las alteraciones de su composición llevarían a un aumento de la osmolaridad lagrimal y a un enfriamiento rápido de la superficie de la córnea, dos factores que, combinados,

incrementan de manera importante la actividad de los termorreceptores corneales (Benjamin & Hill, 1983; Hirata & Rosenblatt, 2014; Liu et al., 2009; Parra et al., 2014).

Además, cuando la deficiencia lagrimal se mantiene de manera crónica, la reducción de la humedad de la superficie ocular acaba produciendo asimismo un daño en los nervios del epitelio corneal, adquiriendo características neuropáticas y perpetuando la génesis de sensaciones de sequedad y dolor (Devor M., 2013; Rosenthal & Borsook, 2012). A estos cambios de la actividad de los termorreceptores de la superficie del ojo se unen los inducidos en los nociceptores polimodales por la lesión y la inflamación, cuya respuesta se sensibiliza, contribuyendo a aumentar la sensación de dolor (Belmonte et al., 2015).

Los datos obtenidos en esta Tesis, unidos a los de los estudios previos del grupo de investigación (Acosta et al., 2007; Belmonte et al., 2007; 2009; Quirce et al., 2008; Kovács, Luna et al., 2016) sugieren que los canales TRP estarían poco implicados en el desarrollo de las alteraciones registradas en la actividad de los receptores sensoriales corneales tras la deficiencia lagrimal crónica, a diferencia de lo que sucede durante procesos exclusivamente inflamatorios (Acosta et al., 2013, 2014) o incluso de lesión nerviosa (Bech et al., 2018). Por el contrario, serían los cambios en corrientes de Na^+ y de K^+ (posiblemente debidos a alteraciones en la expresión de los canales correspondientes), los que justificarían las modificaciones de la actividad observados, explicando la sensibilización débil de los nociceptores y los cambios más prominentes, y a largo plazo, de los termorreceptores de frío de las córneas de cobayas con deficiencia lagrimal crónica. Poniendo toda esta información en conjunto, y desarrollando la hipótesis general propuesta por Belmonte et al., 2015, se propone la **Figura 5.1**, en la que se ha representado cómo, dependiendo del grado de lesión o de inflamación presente en una patología ocular, se va a producir un aumento o una disminución de la expresión y/o de la actividad de determinados canales de membrana, resultando en un incremento o una disminución de la actividad de los nociceptores y de los termorreceptores de la córnea y, consecuentemente, en una alteración de las sensaciones evocadas.





CONCLUSIONES



6 CONCLUSIONES

- 1- La extirpación de la glándula lagrimal principal en el cobaya produce una reducción significativa y permanente de la tasa de secreción lagrimal, siendo un buen modelo para estudiar las alteraciones de la inervación corneal en situaciones de deficiencia lagrimal crónica como la enfermedad de ojo seco.
- 2- La deficiencia lagrimal crónica induce una sensibilización de las fibras nociceptoras de la córnea de carácter transitorio, aumentando la actividad espontánea y la respuesta a la estimulación natural (puesta de manifiesto sobre todo por la disminución del umbral mecánico) sólo durante la primera semana en la que la producción lagrimal está reducida.
- 3- La disminución de la tasa de lagrimación durante periodos prolongados provoca en los termorreceptores de frío corneales un incremento de la actividad espontánea a la temperatura basal y de la respuesta al enfriamiento, que se instaura de manera progresiva y se mantiene a largo plazo, sugiriendo que esa actividad alterada de los termorreceptores de frío corneales constituye el sustrato de las sensaciones anómalas experimentadas en la enfermedad de ojo seco.
- 4- Los bloqueantes de los canales de Na^+ , sobre todo los que afectan a los canales sensibles a la TTX, reducen de manera significativa la actividad espontánea a temperatura basal y la respuesta al enfriamiento de los termorreceptores de frío de las córneas intactas y, algunos de ellos, también en las de animales con deficiencia lagrimal. Estos resultados confirman no sólo la importante contribución de los canales Na^+ TTX-S en la determinación de la excitabilidad de estos receptores sensoriales y en la codificación del estímulo, sino también su expresión/actividad alterada en las situaciones de deficiencia lagrimal crónica.
- 5- Los fármacos que bloquean los canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) reducen, de manera dosis-dependiente, la actividad espontánea y el patrón de disparo de los receptores de frío, tanto en córneas intactas como en córneas de cobayas con deficiencia lagrimal. También reducen, aunque en menor medida y sin llegar a

abolirla, la respuesta evocada por el enfriamiento, confirmándose en esta especie la implicación de la corriente I_h en la definición del patrón de disparo y la codificación del estímulo de frío por los termorreceptores de frío corneales.

- 6- Los resultados obtenidos sugieren que algunas moléculas con capacidad de bloquear los canales de Na^+ sensibles a TTX o los canales HCN podrían ser empleadas como agentes terapéuticos para el tratamiento tópico ocular de la enfermedad de ojo seco.

- 7- Las sensaciones anómalas evocadas por la sequedad ocular, descritas por los pacientes a veces como frescor/sequedad y a veces como sequedad/dolor, dependen del grado de lesión y/o de inflamación ocular que la enfermedad produzca, factores que determinan la alteración en la expresión de los canales implicados en la transducción sensorial y, sobre todo, en la codificación de estímulos por las terminaciones periféricas de las neuronas sensoriales primarias (termorreceptoras de frío y polimodales) y, por lo tanto, responsables de los cambios en su excitabilidad. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las sensaciones anómalas experimentadas en la enfermedad de ojo seco se deben inicialmente a cambios transitorios en la actividad de los nociceptores polimodales, posiblemente asociados a la inflamación inicial. A más largo plazo se produciría una afectación permanente de la excitabilidad los termorreceptores de frío, cuya actividad alterada sería la responsable última de las sensaciones anómalas experimentadas por los pacientes y, por tanto, constituiría la más importante diana terapéutica en la enfermedad de ojo seco.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C. O., Cendan, C. M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J. P., ... Wood, J. N. (2008). The Cell and Molecular Basis of Mechanical, Cold, and Inflammatory Pain. *Science*, 321(5889), 702–705. <https://doi.org/10.1126/science.1156916>
- Acosta, M. C., Alfaro, M. L., Borrás, F., Belmonte, C., & Gallar, J. (2006). Influence of age, gender and iris color on mechanical and chemical sensitivity of the cornea and conjunctiva. *Experimental Eye Research*, 83(4), 932–938. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.04.018>
- Acosta, M. C., Belmonte, C., & Gallar, J. (2001). Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *The Journal of Physiology*, 534(2), 511–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00511.x>
- ACOSTA, M. C., GALLAR, J., & BELMONTE, C. (1999). The Influence of Eye Solutions on Blinking and Ocular Comfort at Rest and During Work at Video Display Terminals. *Experimental Eye Research*, 68(6), 663–669. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0656>
- Acosta, M. C., Luna, C., Quirce, S., Belmonte, C., & Gallar, J. (2013). Changes in sensory activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain*, 154(11), 2353–2362. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.012>
- Acosta, M. C., Luna, C., Quirce, S., Belmonte, C., & Gallar, J. (2014). Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(6), 3403–3412. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13774>
- Acosta, M. C., Tan, M. E., Belmonte, C., & Gallar, J. (2001). Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(9), 2063–2067. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481273>
- Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F., & Chanda, B. (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *The Journal of General Physiology*, 147(1), 1–24. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511492>
- Akopian, A. N., Sivilotti, L., & Wood, J. N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, 379(6562), 257–262. <https://doi.org/10.1038/379257a0>

- Akopian, A. N., Souslova, V., England, S., Okuse, K., Ogata, N., Ure, J., ... Wood, J. N. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature Neuroscience*, 2(6), 541–548. <https://doi.org/10.1038/9195>
- Alamri, A. S., Wood, R. J., Ivanusic, J. J., & Brock, J. A. (2018). The neurochemistry and morphology of functionally identified corneal polymodal nociceptors and cold thermoreceptors. *PLoS ONE*, 13(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195108>
- Alcalde, I., Íñigo-Portugués, A., González-González, O., Almaraz, L., Artime, E., Morenilla-Palao, C., ... Belmonte, C. (2018). Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 526(11), 1859–1874. <https://doi.org/10.1002/cne.24454>
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., ... Lazdunski, M. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *The EMBO Journal*, 25(11), 2368–2376. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601116>
- Amaya, F., Wang, H., Costigan, M., Allchorne, A. J., Hatcher, J. P., Egerton, J., ... Woolf, C. J. (2006). The Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.9 Is an Effector of Peripheral Inflammatory Pain Hypersensitivity. *Journal of Neuroscience*, 26(50), 12852–12860. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4015-06.2006>
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., & Batra, S. K. (2006). Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1765(2), 189–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.01.002>
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., ... Patapoutian, A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41(6), 849–857. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15046718>
- Bantsev, V., Oriowo, O. M., Giblin, F. J., Leverenz, V. R., Trevithick, J. R., & Sivak, J. G. (2004). Effect of hyperbaric oxygen on guinea pig lens optical quality and on the refractive state of the eye. *Experimental Eye Research*, 78(5), 925–931. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.01.002>
- Barabino, S., Shen, L., Chen, L., Rashid, S., Rolando, M., & Dana, M. R. (2005). The Controlled-Environment Chamber: A New Mouse Model of Dry Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(8), 2766. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-1326>
- Baruscotti, M., Bottelli, G., Milanese, R., DiFrancesco, J. C., & DiFrancesco, D. (2010). HCN-related

- channelopathies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 460(2), 405–415.
<https://doi.org/10.1007/s00424-010-0810-8>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Bautista, D. M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H. E., Sterner, O., Högestätt, E. D., ... Zygmunt, P. M. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12248–12252.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505356102>
- Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., ... Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150), 204–208. <https://doi.org/10.1038/nature05910>
- Bayliss, D. A., & Barrett, P. Q. (2008). Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(11), 566–575.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.07.013>
- Bech, F., González-González, O., Artime, E., Serrano, J., Alcalde, I., Gallar, J., ... Belmonte, C. (2018). Functional and morphologic alterations in mechanical, polymodal, and cold sensory nerve fibers of the cornea following photorefractive keratectomy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(6), 2281–2292. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24007>
- Beekwilder, J. P., O'Leary, M. E., van den Broek, L. P., van Kempen, G. T. H., Ypey, D. L., & van den Berg, R. J. (2003). Kv1.1 Channels of Dorsal Root Ganglion Neurons Are Inhibited by n-Butyl-p-aminobenzoate, a Promising Anesthetic for the Treatment of Chronic Pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(2), 531–538.
<https://doi.org/10.1124/jpet.102.042135>
- Begley, C., Simpson, T., Liu, H., Salvo, E., Wu, Z., Bradley, A., & Situ, P. (2013). Quantitative Analysis of Tear Film Fluorescence and Discomfort During Tear Film Instability and Thinning. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(4), 2645. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11299>
- Belmonte, C.; Donovan-Rodríguez, T.; Luna, C.; Quirce, S.; Parra, A.; Acosta, MC.; Gallar, J. (2009). Sodium channel blockers modulate abnormal activity of regenerating corneal sensory nerves. In *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (p. 50(13):908).
- Belmonte, C.; Tervo, T.; Gallar, J. (2011). Sensory innervation of the eye. In *Adler's Physiology of the Eye 11th Edition*. (pp. 363–385).

- Belmonte, C., Acosta, M. C., & Gallar, J. (2004). Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Experimental Eye Research*, 78(3), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.023>
- Belmonte, C., Acosta, M. C., Merayo-Llodes, J., & Gallar, J. (2015). What Causes Eye Pain? *Current Ophthalmology Reports*, 3(2), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s40135-015-0073-9>
- Belmonte, C., Aracil, A., Acosta, M. C., Luna, C., & Gallar, J. (2004). Nerves and sensations from the eye surface. *Ocular Surface*, 2(4), 248–253. [https://doi.org/10.1016/S1542-0124\(12\)70112-X](https://doi.org/10.1016/S1542-0124(12)70112-X)
- Belmonte, C., Brock, J. A., & Viana, F. (2009). Converting cold into pain. *Experimental Brain Research*, 196(1), 13–30. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-1797-2>
- Belmonte, C., & Gallar, J. (2011). Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(6), 3888–3892. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5119>
- Belmonte, C., Gallar, J., Pozo, M. A., & Rebollo, I. (1991). Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *The Journal of Physiology*, 437, 709–725. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1890657>
- Belmonte, C., Garcia-Hirschfeld, J., & Gallar, J. (1997). Neurobiology of ocular pain. *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(1), 117–156. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(96\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(96)00027-4)
- Belmonte, C., & Giraldez, F. (1981). Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *The Journal of Physiology*, 321, 355–368. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7338816>
- Belmonte, C., Nichols, J. J., Cox, S. M., Brock, J. A., Begley, C. G., Bereiter, D. A., ... Wolffsohn, J. S. (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. *The Ocular Surface*, 15(3), 404–437. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.002>
- Benarroch, E. E. (2015). Ion channels in nociceptors: Recent developments. *Neurology*, 84(11), 1153–1164. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001382>
- Benítez-del-Castillo, J. M., Acosta, M. C., Wassfi, M. A., Díaz-Valle, D., Geguñdez, J. A., Fernandez, C., & García-Sánchez, J. (2007). Relation between Corneal Innervation with Confocal Microscopy and Corneal Sensitivity with Noncontact Esthesiometry in Patients with Dry Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(1), 173. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0127>
- Benjamin, W. J., & Hill, R. M. (1983). Human tears: osmotic characteristics. *Investigative*

- Ophthalmology & Visual Science*, 24(12), 1624–1626. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6686220>
- Bereiter, D. A., Okamoto, K., Tashiro, A., & Hirata, H. (2005). Endotoxin-induced uveitis causes long-term changes in trigeminal subnucleus caudalis neurons. *Journal of Neurophysiology*, 94(6), 3815–3825. <https://doi.org/10.1152/jn.00616.2005>
- Bereiter, D. A., Rahman, M., Thompson, R., & Stephenson, P. (2018). Rat Model for Dry Eye, 3739–3746.
- Bessac, B. F., & Jordt, S.-E. (2008). Breathtaking TRP Channels: TRPA1 and TRPV1 in Airway Chemosensation and Reflex Control. *Physiology*, 23(6), 360–370. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2008>
- Beuerman, R. W., & Stern, M. E. (2005). Neurogenic inflammation: a first line of defense for the ocular surface. *The Ocular Surface*, 3(4 Suppl), S203-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17216120>
- Beyreuther, B., Callizot, N., & Stöhr, T. (2006). Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. *European Journal of Pharmacology*, 539(1–2), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.04.009>
- Beyreuther, B. K., Callizot, N., Brot, M. D., Feldman, R., Bain, S. C., & Stöhr, T. (2007). Antinociceptive efficacy of lacosamide in rat models for tumor- and chemotherapy-induced cancer pain. *European Journal of Pharmacology*, 565(1–3), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.041>
- Beyreuther, B. K., Freitag, J., Heers, C., Krebsfänger, N., Scharfenecker, U., & Stöhr, T. (2007). Lacosamide: A Review of Preclinical Properties. *CNS Drug Reviews*, 13(1), 21–42. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2007.00001.x>
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., ... Samad, T. A. (2008). Nociceptors Are Interleukin-1 Sensors. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14062–14073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008>
- Black, J. A., & Waxman, S. G. (2013). Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, 80(2), 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.012>
- Blalock, T. D., Spurr-Michaud, S. J., Tisdale, A. S., Heimer, S. R., Gilmore, M. S., Ramesh, V., & Gipson, I. K. (2007). Functions of MUC16 in Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual*

- Science*, 48(10), 4509. <https://doi.org/10.1167/iavs.07-0430>
- Bosma, M. M., & Hille, B. (1992). Electrophysiological properties of a cell line of the gonadotrope lineage. *Endocrinology*, 130(6), 3411–3420. <https://doi.org/10.1210/endo.130.6.1317783>
- Bossu, J. L., Feltz, A., & Thomann, J. M. (1985). Depolarization elicits two distinct calcium currents in vertebrate sensory neurones. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 403(4), 360–368. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2409515>
- Bourcier, T., Acosta, M. C., Borderie, V., Borra's, F., Gallar, J., Bury, T., ... Belmonte, C. (2005). Decreased Corneal Sensitivity in Patients with Dry Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(7), 2341. <https://doi.org/10.1167/iavs.04-1426>
- Bourne, W. M., Nelson, L. R., & Hodge, D. O. (1997). Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38(3), 779–782. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9071233>
- Brock, J. A., McLachlan, E. M., & Belmonte, C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *The Journal of Physiology*, 512 (Pt 1), 211–217. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729630>
- Brock, J. A., Pianova, S., & Belmonte, C. (2001). Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *Journal of Physiology*, 533(2), 493–501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0493a.x>
- Brock, J., Acosta, M. C., Al Abed, A., Pianova, S., & Belmonte, C. (2006). Barium ions inhibit the dynamic response of guinea-pig corneal cold receptors to heating but not to cooling. *The Journal of Physiology*, 575(Pt 2), 573–581. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.110130>
- Bron, R., Wood, R. J., Brock, J. A., & Ivanusic, J. J. (2014). Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 522(13), 2967–2979. <https://doi.org/10.1002/cne.23560>
- Brooks, S. M. (2008). Irritant-Induced Chronic Cough: Irritant-Induced TRPpathy. *Lung*, 186(S1), 88–93. <https://doi.org/10.1007/s00408-007-9068-0>
- Bucchi, A., Baruscotti, M., & DiFrancesco, D. (2002). Current-dependent Block of Rabbit Sino-Atrial Node I_f Channels by Ivabradine. *The Journal of General Physiology*, 120(1), 1–13. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028593>
- Bucchi, A., Tognati, A., Milanesi, R., Baruscotti, M., & DiFrancesco, D. (2006). Properties of

- ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *Journal of Physiology*, 572(2), 335–346. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.100776>
- Cafaro, T. A., Ortiz, S. G., Maldonado, C., Espósito, F. A., Croxatto, J. O., Berra, A., ... Serra, H. M. (2009). The cornea of Guinea pig: Structural and functional studies. *Veterinary Ophthalmology*, 12(4), 234–241. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00708.x>
- Callejo, G., Castellanos, A., Castany, M., Gual, A., Luna, C., Acosta, M. C., ... Gasull, X. (2015). Acid-sensing ion channels detect moderate acidifications to induce ocular pain. *PAIN*, 156(3), 483–495. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460335.49525.17>
- Camacho, J. (2006). Ether à go-go potassium channels and cancer. *Cancer Letters*, 233(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.02.016>
- Carbone, E., & Lux, H. D. (1984). A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophysical Journal*, 46(3), 413–418. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84037-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84037-0)
- Carr, R. W., Pianova, S., Fernandez, J., Fallon, J. B., Belmonte, C., & Brock, J. A. (2003). Effects of Heating and Cooling on Nerve Terminal Impulses Recorded from Cold-sensitive Receptors in the Guinea-pig Cornea. *The Journal of General Physiology*, 121(5), 427–439. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08769>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of Physiology*, 590(11), 2577–2589. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224204>
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>
- Catterall, W. A., & Zheng, N. (2015). Deciphering voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels by studying prokaryotic ancestors. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(9), 526–534. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.002>
- Chaplan, S. R., Guo, H.-Q., Lee, D. H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., ... Dubin, A. E. (2003). Neuronal

- hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), 1169–1178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12598605>
- Chattopadhyay, M., Zhou, Z., Hao, S., Mata, M., & Fink, D. J. (2012). Reduction of voltage gated sodium channel protein in DRG by vector mediated miRNA reduces pain in rats with painful diabetic neuropathy. *Molecular Pain*, 8, 17. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-17>
- Chen, W., Zhang, X., Zhang, J., Chen, J., Wang, S., Wang, Q., & Qu, J. (2008). A Murine Model of Dry Eye Induced by an Intelligently Controlled Environmental System. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(4), 1386. <https://doi.org/10.1167/iops.07-0744>
- Chen, X., Belmonte, C., & Rang, H. P. (1997). Capsaicin and carbon dioxide act by distinct mechanisms on sensory nerve terminals in the cat cornea. *Pain*, 70(1), 23–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106806>
- Chen, X., Gallar, J., Pozo, M. A., Baeza, M., & Belmonte, C. (1995). CO₂ stimulation of the cornea: a comparison between human sensation and nerve activity in polymodal nociceptive afferents of the cat. *The European Journal of Neuroscience*, 7(6), 1154–1163. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582088>
- Chen, X., Sirois, J. E., Lei, Q., Talley, E. M., Lynch, C., & Bayliss, D. A. (2005). HCN Subunit-Specific and cAMP-Modulated Effects of Anesthetics on Neuronal Pacemaker Currents. *Journal of Neuroscience*, 25(24), 5803–5814. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1153-05.2005>
- Choi, J.-S., & Waxman, S. G. (2011). Physiological interactions between Na_v 1.7 and Na_v 1.8 sodium channels: a computer simulation study. *Journal of Neurophysiology*, 106(6), 3173–3184. <https://doi.org/10.1152/jn.00100.2011>
- Cohen, A., Sagron, R., Somech, E., Segal-Hayoun, Y., & Zilberberg, N. (2009). Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K₂P_{2.1} channel. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 40(3), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.12.004>
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., ... Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>
- Cox, J. J., Reimann, F., Nicholas, A. K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., ... Woods, C. G. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, 444(7121), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature05413>

- Craner, M. J., Klein, J. P., Renganathan, M., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2002). Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. *Annals of Neurology*, *52*(6), 786–792. <https://doi.org/10.1002/ana.10364>
- Cruz, J. S., Silva, D. F., Ribeiro, L. A., Araújo, I. G. A., Magalhães, N., Medeiros, A., ... Oliveira, F. A. (2011). Resurgent Na⁺ current: A new avenue to neuronal excitability control. *Life Sciences*, *89*(15–16), 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.016>
- Cruzat, A., Schrems, W. A., Schrems-Hoesl, L. M., Cavalcanti, B. M., Baniyadi, N., Witkin, D., ... Hamrah, P. (2015). Contralateral Clinically Unaffected Eyes of Patients With Unilateral Infectious Keratitis Demonstrate a Sympathetic Immune Response. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(11), 6612. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-16560>
- Cummins, T. R., Howe, J. R., & Waxman, S. G. (1998). Slow closed-state inactivation: a novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(23), 9607–9619. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822722>
- Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (1997). Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(10), 3503–3514. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133375>
- Dartt, D. A., McCarthy, D. M., Mercer, H. J., Kessler, T. L., Chung, E. H., & Zieske, J. D. (1995). Localization of nerves adjacent to goblet cells in rat conjunctiva. *Current Eye Research*, *14*(11), 993–1000. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8585938>
- De Cillà, S., Ranno, S., Carini, E., Fogagnolo, P., Ceresara, G., Orzalesi, N., & Rossetti, L. M. (2009). Corneal subbasal nerves changes in patients with diabetic retinopathy: an in vivo confocal study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *50*(11), 5155–5158. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3384>
- de Greef, B. T. A., Hoeijmakers, J. G. J., Geerts, M., Oakes, M., Church, T. J. E., Waxman, S. G., ... Merkies, I. S. J. (2019). Lacosamide in patients with Nav1.7 mutations-related small fibre neuropathy: a randomized controlled trial. *Brain : A Journal of Neurology*, *142*(2), 263–275. <https://doi.org/10.1093/brain/awy329>
- de Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function,

- Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(18), 7093–7118.
<https://doi.org/10.1021/jm501981g>
- DelMonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 37(3), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., ... Bourinet, E. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Molecular Medicine*, 3(5), 266–278.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201100134>
- Deutsch, C., & Chen, L. Q. (1993). Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(21), 10036–10040. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10036>
- Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., & Lingueglia, E. (2010). Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. *Pharmacology & Therapeutics*, 128(3), 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.08.006>
- Deval, E., & Lingueglia, E. (2015). Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology*, 94, 49–57.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.009>
- Devor, M. (1991). Neuropathic pain and injured nerve: peripheral mechanisms. *British Medical Bulletin*, 47(3), 619–630. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1794075>
- Devor, M. (2013). Variability, pain genes and the pain practitioner. *Pain Management*, 3(1), 1–3.
<https://doi.org/10.2217/pmt.12.58>
- Dib-Hajj, S., Black, J. A., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2002). Na_v1.9: a sodium channel with unique properties. *Trends in Neurosciences*, 25(5), 253–259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972962>
- Dib-Hajj, S. D., Cummins, T. R., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2010). Sodium Channels in Normal and Pathological Pain. *Annual Review of Neuroscience*, 33(1), 325–347.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153234>
- Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1998). Na_v, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8963–8968.

<https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8963>

- Dib-Hajj, S. D., Yang, Y., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2013). The NaV1.7 sodium channel: from molecule to man. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrn3404>
- Ding, W., You, Z., Shen, S., Chen, L., Zhu, S., & Mao, J. (2016). Inhibition of HCN channel activity in the thalamus attenuates chronic pain in rats. *Neuroscience Letters*, *631*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.08.021>
- Dong, X.-W., Goregoaker, S., Engler, H., Zhou, X., Mark, L., Crona, J., ... Priestley, T. (2007). Small interfering RNA-mediated selective knockdown of NaV1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience*, *146*(2), 812–821. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.054>
- Du, L., Wang, S.-J., Cui, J., He, W.-J., & Ruan, H.-Z. (2013). The role of HCN channels within the periaqueductal gray in neuropathic pain. *Brain Research*, *1500*, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.035>
- Dubin, A. E., Schmidt, M., Mathur, J., Petrus, M. J., Xiao, B., Coste, B., & Patapoutian, A. (2012). Inflammatory signals enhance piezo2-mediated mechanosensitive currents. *Cell Reports*, *2*(3), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.014>
- Duprat, F., Lauritzen, I., Patel, A., & Honoré, E. (2007). The TASK background K₂P channels: chemo- and nutrient sensors. *Trends in Neurosciences*, *30*(11), 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.003>
- Dursun, D., Wang, M., Monroy, D., Li, D.-Q., Lokeshwar, B. L., Stern, M. E., & Pflugfelder, S. C. (2002). A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *43*(3), 632–638. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867577>
- Dvorscak, L., & Marfurt, C. F. (2008). Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*(3), 910–916. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1324>
- Eijkelkamp, N., Linley, J. E., Torres, J. M., Bee, L., Dickenson, A. H., Gringhuis, M., ... Wood, J. N. (2013). A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nature Communications*, *4*(1), 1682. <https://doi.org/10.1038/ncomms2673>
- Emery, E. C., Young, G. T., Berrocoso, E. M., Chen, L., & McNaughton, P. A. (2011). HCN2 Ion Channels Play a Central Role in Inflammatory and Neuropathic Pain. *Science*, *333*(6048), 1462–1466.

<https://doi.org/10.1126/science.1206243>

Emery, E. C., Young, G. T., & McNaughton, P. A. (2012). HCN2 ion channels: an emerging role as the pacemakers of pain. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(8), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.004>

England, S., & de Groot, M. J. (2009). Subtype-selective targeting of voltage-gated sodium channels. *British Journal of Pharmacology*, 158(6), 1413–1425. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00437.x>

Enyedi, P., & Czirják, G. (2010). Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiological Reviews*, 90(2), 559–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2009>

Everill, B., & Kocsis, J. D. (1999). Reduction in Potassium Currents in Identified Cutaneous Afferent Dorsal Root Ganglion Neurons After Axotomy. *Journal of Neurophysiology*, 82(2), 700–708. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.2.700>

Faber, C. G., Lauria, G., Merkies, I. S. J., Cheng, X., Han, C., Ahn, H.-S., ... Waxman, S. G. (2012). Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19444–19449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216080109>

Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C., & Viana, F. (2008). TRPA1 Channels Mediate Cold Temperature Sensing in Mammalian Vagal Sensory Neurons: Pharmacological and Genetic Evidence. *Journal of Neuroscience*, 28(31), 7863–7875. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1696-08.2008>

Fan, X., Chen, Y., Xing, J., Wu, P., Chen, H., Yang, J., ... Huang, C. (2012). Blocking effects of acehytisine on pacemaker currents (I_f) in sinoatrial node cells and human HCN4 channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.039>

Fang, X., Djouhri, L., Black, J. A., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., & Lawson, S. N. (2002). The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(17), 7425–7433. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196564>

Fares, U., Otri, A. M., Al-Aqaba, M. A., & Dua, H. S. (2012). Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Contact Lens and Anterior Eye*, 35(1), 39–45.

<https://doi.org/10.1016/j.clae.2011.07.004>

- Fedulova, S. A., Kostyuk, P. G., & Veselovsky, N. S. (1985). Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of Physiology*, 359(1), 431–446. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015594>
- Feizi, S., Jafarinasab, M. R., Karimian, F., Hasanpour, H., & Masudi, A. (n.d.). Central and peripheral corneal thickness measurement in normal and keratoconic eyes using three corneal pachymeters. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, 9(3), 296–304. <https://doi.org/10.4103/2008-322X.143356>
- Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D., & Lesage, F. (2015). The family of K_{2P} channels: salient structural and functional properties. *The Journal of Physiology*, 593(12), 2587–2603. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.287268>
- Felipe, Gonzalez, Gallar, & Belmonte. (1999). Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. *European Journal of Pain (London, England)*, 3(1), 31–39. <https://doi.org/10.1053/eujp.1998.0100>
- Ferrer-Montiel, A., Fernández-Carvajal, A., Planells-Cases, R., Fernández-Ballester, G., González-Ros, J. M., Messeguer, À., & González-Muñiz, R. (2012). Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(9), 999–1017. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.711320>
- Fertleman, C. R., Baker, M. D., Parker, K. A., Moffatt, S., Elmslie, F. V., Abrahamsen, B., ... Rees, M. (2006). SCN9A Mutations in Paroxysmal Extreme Pain Disorder: Allelic Variants Underlie Distinct Channel Defects and Phenotypes. *Neuron*, 52(5), 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.006>
- Folgering, J. H. A., Sharif-Naeini, R., Dedman, A., Patel, A., Delmas, P., & Honoré, E. (2008). Molecular basis of the mammalian pressure-sensitive ion channels: focus on vascular mechanotransduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 97(2–3), 180–195. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.02.006>
- François, A., Schüetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., ... Bourinet, E. (2015). The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Reports*, 10(3), 370–382. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.042>
- Furukawa, T. (2013). Types of voltage-gated calcium channels: molecular and electrophysiological views. *Current Hypertension Reviews*, 9(3), 170–181. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24479748>

- Gallar, J., Acosta, M. C., Gutiérrez, A. R., & Belmonte, C. (2007). Impulse activity in corneal sensory nerve fibers after photorefractive keratectomy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(9), 4033–4037. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0012>
- Gallar, J., Acosta, M. C., Moilanen, J. A. O., Holopainen, J. M., Belmonte, C., & Tervo, T. M. T. (2004). Recovery of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation after laser in situ keratomileusis. *Journal of Refractive Surgery (Thorofare, N.J. : 1995)*, 20(3), 229–235. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15188899>
- Gallar, J., Pozo, M. A., Tuckett, R. P., & Belmonte, C. (1993). Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *The Journal of Physiology*, 468, 609–622. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254527>
- Gallar, J., Tervo, T. M. T., Neira, W., Holopainen, J. M., Lamberg, M. E., Miñana, F., ... Belmonte, C. (2010). Selective Changes in Human Corneal Sensation Associated with Herpes Simplex Virus Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(9), 4516. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5225>
- Gallar J, A. M. . L. C. . B. C. . (2007). Effects of microkeratome lesion on corneal nerves recorded from the ciliary nerves of the guinea-pig eye "in vitro." In *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.* 48(13):3471.
- Gallar Martinez, J. (2010). Sensibilidad corneal y dolor ocular. *21 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica*, 1–5. Retrieved from <http://www.congresocnoo.com/node/204>
- Galor, A., Levitt, R. C., Felix, E. R., Martin, E. R., & Sarantopoulos, C. D. (2015). Neuropathic ocular pain: An important yet underevaluated feature of dry eye. *Eye (Basingstoke)*, 29(3), 301–312. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.263>
- Gelatt, K. N., Peiffer, R. L., Erickson, J. L., & Gum, G. G. (1975). Evaluation of tear formation in the dog, using a modification of the Schirmer tear test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 166(4), 368–370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1116954>
- Giblin, F. J., Leverenz, V. R., Padgaonkar, V. A., Unakar, N. J., Dang, L., Lin, L. R., ... Dillon, J. P. (2002). UVA light in vivo reaches the nucleus of the guinea pig lens and produces deleterious, oxidative effects. *Experimental Eye Research*, 75(4), 445–458. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387792>

- Gilbard, J. P., Rossi, S. R., & Gray, K. L. (1987). A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28(2), 225–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8591900>
- Gilbard, J. P., Rossi, S. R., Gray, K. L., Hanninen, L. A., & Kenyon, K. R. (1988). Tear film osmolarity and ocular surface disease in two rabbit models for keratoconjunctivitis sicca. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29(3), 374–378. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3343094>
- Gipson, I. K. (2007). The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(10), 4391. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0770>
- Gold, M. S., Weinreich, D., Kim, C.-S., Wang, R., Treanor, J., Porreca, F., & Lai, J. (2003). Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), 158–166. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514212>
- GOLDIN, A. L. (1999). Diversity of Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868(1 MOLECULAR AND), 38–50. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11272.x>
- Goldstein, S. A. N., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L. D., & Rajan, S. (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 527–540. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.12>
- González-González, O., Bech, F., Gallar, J., Merayo-Llodes, J., & Belmonte, C. (2017). Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(1), 404–415. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20033>
- Grupcheva, C. N., Laux Fenton, W. T., Green, C. R., & McGhee, C. N. J. (2002). In vivo and ex vivo in situ confocal analysis of a rat model demonstrating transient “epithelialization of the endothelium”. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 30(3), 191–195. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010213>
- Habib, A. M., Wood, J. N., & Cox, J. J. (2015). Sodium Channels and Pain. In *Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 227, pp. 39–56). https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_3
- Han, C., Yang, Y., de Greef, B. T. A., Hoesjmakers, J. G. J., Gerrits, M. M., Verhamme, C., ... Waxman, S. G. (2015). The Domain II S4-S5 Linker in Nav1.9: A Missense Mutation Enhances Activation, Impairs Fast Inactivation, and Produces Human Painful Neuropathy. *Neuromolecular Medicine*,

17(2), 158–169. <https://doi.org/10.1007/s12017-015-8347-9>

- Handwerker, HO.; Reeh, P. (1992). Chemosensitivity and sensitization by chemical agents. In *Nociceptors. Hyperalgesia and allodynia*. Ed. Willis JR WD. New York Raven Press. (pp. 107–115).
- Harris, L. W., & Purves, D. (1989). Rapid remodeling of sensory endings in the corneas of living mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(6), 2210–2214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2723770>
- He, C., Chen, F., Li, B., & Hu, Z. (2014). Neurophysiology of HCN channels: From cellular functions to multiple regulations. *Progress in Neurobiology*, 112, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.001>
- Helper, L. C., Magrane, W. G., Koehm, J., & Johnson, R. (1974). Surgical induction of keratoconjunctivitis sicca in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 165(2), 172–174. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4837826>
- Hirata, H., Dallacasagrande, V., Mizerska, K., Ivakhnitskaia, E., & Rosenblatt, M. I. (2018). Ocular Desiccation in Rats : Simultaneous Recordings of Neural Activity and Corneal Temperature.
- Hirata, H., Okamoto, K., Tashiro, A., & 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. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(17), 4224–4232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0381-04.2004>
- Hirata, H., & Rosenblatt, M. I. (2014). Hyperosmolar Tears Enhance Cooling Sensitivity of the Corneal Nerves in Rats: Possible Neural Basis for Cold-Induced Dry Eye Pain. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(9), 5821. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14642>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4), 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Honoré, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(4), 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrn2117>
- Hoshi, T., Zagotta, W., & Aldrich, R. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, 250(4980), 533–538. <https://doi.org/10.1126/science.2122519>
- Huang, J., Han, C., Estacion, M., Vasylyev, D., Hoeijmakers, J. G. J., Gerrits, M. M., ... PROPANE Study

- Group. (2014). Gain-of-function mutations in sodium channel Nav1.9 in painful neuropathy. *Brain*, 137(6), 1627–1642. <https://doi.org/10.1093/brain/awu079>
- Huang, J., Yang, Y., Zhao, P., Gerrits, M. M., Hoeijmakers, J. G. J. ., Bekelaar, K., ... Waxman, S. G. (2013). Small-Fiber Neuropathy Nav1.8 Mutation Shifts Activation to Hyperpolarized Potentials and Increases Excitability of Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience*, 33(35), 14087–14097. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2710-13.2013>
- Ikeda, M., Tomita, Y., Mouri, A., Koga, M., Okochi, T., Yoshimura, R., ... Iwata, N. (2010). Identification of Novel Candidate Genes for Treatment Response to Risperidone and Susceptibility for Schizophrenia: Integrated Analysis Among Pharmacogenomics, Mouse Expression, and Genetic Case-Control Association Approaches. *Biological Psychiatry*, 67(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.030>
- Iñigo-Portugués, A. ; B. F. . R.-F. L. . E. G. . G. J. . B. C. . M. V. M. (2017). Monitoring plasticity and regeneration of individual intraepithelial corneal cold nerves in the adult living mouse.
- Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F. X., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Structure and function of the $\beta 2$ subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*, 83(3), 433–442. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90121-3)
- Ivanusic, J. J., Wood, R. J., & Brock, J. A. (2013). Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 521(4), 877–893. <https://doi.org/10.1002/cne.23207>
- Jalbert, I., Stapleton, F., Papas, E., Sweeney, D. F., & Coroneo, M. (2003). In vivo confocal microscopy of the human cornea. *British Journal of Ophthalmology*, 87(2), 225–236. <https://doi.org/10.1136/bjo.87.2.225>
- Jarvis, M. F., Honore, P., Shieh, C.-C., Chapman, M., Joshi, S., Zhang, X.-F., ... Krafte, D. S. (2007). A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8520–8525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611364104>
- Jester, J. V, Ghee Lee, Y., Li, J., Chakravarti, S., Paul, J., Petroll, W. M., & Dwight Cavanagh, H. (2001). Measurement of corneal sublayer thickness and transparency in transgenic mice with altered corneal clarity using in vivo confocal microscopy. *Vision Research*, 41(10–11), 1283–1290. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322973>

- Johnson, B. W., Whiteley, H. E., & McLaughlin, S. A. (1990). Effects of inflammation and aqueous tear film deficiency on conjunctival morphology and ocular mucus composition in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 51(5), 820–824. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2337286>
- Jordt, S.-E., Bautista, D. M., Chuang, H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., ... Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427(6971), 260–265. <https://doi.org/10.1038/nature02282>
- Jordt, S.-E., McKemy, D. D., & Julius, D. (2003). Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(4), 487–492. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12965298>
- Joubert, F., Acosta, M. del C., Gallar, J., Fakih, D., Sahel, J. A., Baudouin, C., ... Réaux-Le Goazigo, A. (2018). Effects of corneal injury on ciliary nerve fibre activity and corneal nociception in mice: A behavioural and electrophysiological study. *European Journal of Pain (United Kingdom)*, (April), 1–14. <https://doi.org/10.1002/ejp.1332>
- Juana Gallar, Kamila Mizerska, Carolina Luna García, Susana Quirce, M. C. A. (2018). Characterization of corneal sensory nerve activity in young and adult guinea pigs. *Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018;59(9):154.
- Juana Gallar; Carolina Luna; Susana Quirce; Carlos Belmonte; M Carmen Acosta. (2016). Altered Impulse Activity of Corneal Sensory Nerves Caused by Unilateral UV-induced Corneal Inflammation also Develops in the Contralateral Eye Sensory Nerves. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016; 57(12):429. doi:
- Julius, D. (2013). TRP Channels and Pain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(1), 355–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833>
- Kang, D., Choe, C., & Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *The Journal of Physiology*, 564(Pt 1), 103–116. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.081059>
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K. Y., Vennekens, R., ... Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), 1273–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808487106>
- Kaswan, R. L., Salisbury, M. A., & Ward, D. A. (1989). Spontaneous Canine Keratoconjunctivitis Sicca. *Archives of Ophthalmology*, 107(8), 1210.

<https://doi.org/10.1001/archophth.1989.01070020276038>

- Kellenberger, S., & Schild, L. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. Structure, Function, and Pharmacology of Acid-Sensing Ion Channels and the Epithelial Na⁺ Channel. *Pharmacological Reviews*, *67*(1), 1–35. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009225>
- Kim, C. S., Chang, P. Y., & Johnston, D. (2012). Enhancement of Dorsal Hippocampal Activity by Knockdown of HCN1 Channels Leads to Anxiolytic- and Antidepressant-like Behaviors. *Neuron*, *75*(3), 503–516. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.027>
- Kim, S.-J., Widenmaier, S. B., Choi, W. S., Nian, C., Ao, Z., Warnock, G., & McIntosh, C. H. S. (2012). Pancreatic β -cell prosurvival effects of the incretin hormones involve post-translational modification of Kv2.1 delayed rectifier channels. *Cell Death & Differentiation*, *19*(2), 333–344. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.102>
- Kim, S. E., Coste, B., Chadha, A., Cook, B., & Patapoutian, A. (2012). The role of Drosophila Piezo in mechanical nociception. *Nature*, *483*(7388), 209–212. <https://doi.org/10.1038/nature10801>
- Kobayashi, A., Yokogawa, H., & Sugiyama, K. (2006). In Vivo Laser Confocal Microscopy of Bowman's Layer of the Cornea. *Ophthalmology*, *113*(12), 2203–2208. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.05.058>
- Koga, K., Descalzi, G., Chen, T., Ko, H.-G., Lu, J., Li, S., ... Zhuo, M. (2015). Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. *Neuron*, *85*(2), 377–389. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.021>
- Kohno, T., Wang, H., Amaya, F., Brenner, G. J., Cheng, J.-K., Ji, R.-R., & Woolf, C. J. (2008). Bradykinin Enhances AMPA and NMDA Receptor Activity in Spinal Cord Dorsal Horn Neurons by Activating Multiple Kinases to Produce Pain Hypersensitivity. *Journal of Neuroscience*, *28*(17), 4533–4540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5349-07.2008>
- Kovács, I., Dienes, L., Perényi, K., Quirce, S., Luna, C., Mizerska, K., ... Gallar, J. (2016). Lacosamide diminishes dryness-induced hyperexcitability of corneal cold sensitive nerve terminals. *European Journal of Pharmacology*, *787*, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.05.044>
- Kovács, I., Luna, C., Quirce, S., Mizerska, K., Callejo, G., Riestra, A., ... Gallar, J. (2016). Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain*, *157*(2), 399–417. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000455>
- Kurose, M., & Meng, I. D. (2013). Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal

- primary afferent cool cells. *Journal of Neurophysiology*, 110(2), 495–504. <https://doi.org/10.1152/jn.00222.2013>
- Kwan, K. Y., Glazer, J. M., Corey, D. P., Rice, F. L., & Stucky, C. L. (2009). TRPA1 Modulates Mechanotransduction in Cutaneous Sensory Neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(15), 4808–4819. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5380-08.2009>
- Labbé, A., Liang, H., Martin, C., Brignole-Baudouin, F., Warnet, J.-M., & Baudouin, C. (2006). Comparative Anatomy of Laboratory Animal Corneas with a New-Generation High-Resolution *In Vivo* Confocal Microscope. *Current Eye Research*, 31(6), 501–509. <https://doi.org/10.1080/02713680600701513>
- Lam, H., Bleiden, L., de Paiva, C. S., Farley, W., Stern, M. E., & Pflugfelder, S. C. (2009). Tear Cytokine Profiles in Dysfunctional Tear Syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 147(2), 198–205.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.08.032>
- Lambiase, A., Micera, A., Sacchetti, M., Cortes, M., Mantelli, F., & Bonini, S. (2011). Alterations of Tear Neuromediators in Dry Eye Disease. *Archives of Ophthalmology*, 129(8), 981. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2011.200>
- Lee, C.-Y., Chen, H.-T., Lin, H.-Y., Chen, H.-C., Yeung, L., Hwang, Y.-S., ... Lai, C.-C. (2019). Changes in corneal endothelial density following scleral buckling surgery for rhegmatogenous retinal detachment: a retrospective cross-sectional study. *BMC Ophthalmology*, 19(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12886-018-1015-8>
- Lee, Y. T., Vasilyev, D. V., Shan, Q. J., Dunlop, J., Mayer, S., & Bowlby, M. R. (2008). Novel pharmacological activity of loperamide and CP-339,818 on human HCN channels characterized with an automated electrophysiology assay. *European Journal of Pharmacology*, 581(1–2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.058>
- Leipold, E., Liebmann, L., Korenke, G. C., Heinrich, T., Giesselmann, S., Baets, J., ... Kurth, I. (2013). A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nature Genetics*, 45(11), 1399–1404. <https://doi.org/10.1038/ng.2767>
- Lesage, F., & Barhanin, J. (2011). Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(6), 424–437. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2011>
- Levin, L.; Nilsson, S.; VerHoeve, J.; Wu, S.; Kaufman, P.; Alm, A. (2011). *Adler's Physiology of the Eye* (11th ed.). Elsevier Health Sciences.

- Li, D., Xiao, Y., Xu, X., Xiong, X., Lu, S., Liu, Z., ... Liang, S. (2004). Structure--activity relationships of hainantoxin-IV and structure determination of active and inactive sodium channel blockers. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(36), 37734–37740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405765200>
- Lin, Z., Liu, X., Zhou, T., Wang, Y., Bai, L., He, H., & Liu, Z. (2011). A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Molecular Vision*, 17, 257–264. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21283525>
- Liu, B., Fan, L., Balakrishna, S., Sui, A., Morris, J. B., & Jordt, S.-E. (2013). TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. *Pain*, 154(10), 2169–2177. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.043>
- Liu, C.-Y., Lu, Z.-Y., Li, N., Yu, L.-H., Zhao, Y.-F., & Ma, B. (2015). The role of large-conductance, calcium-activated potassium channels in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Cephalalgia*, 35(1), 16–35. <https://doi.org/10.1177/0333102414534083>
- Liu, H., Begley, C., Chen, M., Bradley, A., Bonanno, J., McNamara, N. A., ... Simpson, T. (2009). A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(8), 3671–3679. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2689>
- Liu, Z., Dai, J., Chen, Z., Hu, W., Xiao, Y., & Liang, S. (2003). Isolation and characterization of hainantoxin-IV, a novel antagonist of tetrodotoxin-sensitive sodium channels from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(5), 972–978. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2354-x>
- Loeliger, M., Briscoe, T., Lambert, G., Caddy, J., Rehn, A., Dieni, S., & Rees, S. (2004). Chronic placental insufficiency affects retinal development in the guinea pig. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(7), 2361–2367. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1349>
- LU, L. (2006). Stress-induced corneal epithelial apoptosis mediated by K⁺ channel activation. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(6), 515–538. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.07.004>
- Lu, L., Wang, L., & Shell, B. (2003). UV-Induced Signaling Pathways Associated with Corneal Epithelial Cell Apoptosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(12), 5102. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0591>
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., & Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393(6685), 587–591. <https://doi.org/10.1038/31255>

- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F., & Biel, M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *The EMBO Journal*, *18*(9), 2323–2329. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2323>
- Luo, L., Chang, L., Brown, S. M., Ao, H., Lee, D. H., Higuera, E. S., ... Chaplan, S. R. (2007). Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience*, *144*(4), 1477–1485. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.048>
- Lütjen-Drecoll, E. (2006). Choroidal innervation in primate eyes. *Experimental Eye Research*, *82*(3), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.09.015>
- MacDonald, P. E., Sewing, S., Wang, J., Joseph, J. W., Smukler, S. R., Sakellaropoulos, G., ... Wheeler, M. B. (2002). Inhibition of Kv2.1 Voltage-dependent K⁺ Channels in Pancreatic β -Cells Enhances Glucose-dependent Insulin Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(47), 44938–44945. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205532200>
- Madrid, R., de la Pena, E., Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C., & Viana, F. (2009). Variable Threshold of Trigeminal Cold-Thermosensitive Neurons Is Determined by a Balance between TRPM8 and Kv1 Potassium Channels. *Journal of Neuroscience*, *29*(10), 3120–3131. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4778-08.2009>
- Madrid, R., Donovan-Rodriguez, T., Meseguer, V., Acosta, M. C., Belmonte, C., & Viana, F. (2006). Contribution of TRPM8 Channels to Cold Transduction in Primary Sensory Neurons and Peripheral Nerve Terminals. *Journal of Neuroscience*, *26*(48), 12512–12525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3752-06.2006>
- Maingret, F., Coste, B., Padilla, F., Clerc, N., Crest, M., Korogod, S. M., & Delmas, P. (2008). Inflammatory Mediators Increase Nav1.9 Current and Excitability in Nociceptors through a Coincident Detection Mechanism. *The Journal of General Physiology*, *131*(3), 211–225. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709935>
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., ... Honoré, E. (2000). TREK-1 is a heat-activated background K⁺ channel. *The EMBO Journal*, *19*(11), 2483–2491. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2483>
- Maitchouk, D. Y., Beuerman, R. W., Ohta, T., Stern, M., & Varnell, R. J. (2000). Tear production after unilateral removal of the main lacrimal gland in squirrel monkeys. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, *118*(2), 246–252. <https://doi.org/10.1001/archopht.118.2.246>

- Malkia, A., Morenilla-Palao, C., & Viana, F. (2011). The Emerging Pharmacology of TRPM8 Channels: Hidden Therapeutic Potential Underneath a Cold Surface. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(1), 54–67. <https://doi.org/10.2174/138920111793937916>
- Mantelli, F., Massaro-Giordano, M., Macchi, I., Lambiase, A., & Bonini, S. (2013). The cellular mechanisms of dry eye: From pathogenesis to treatment. *Journal of Cellular Physiology*, 228(12), 2253–2256. <https://doi.org/10.1002/jcp.24398>
- Mantelli, F., Micera, A., Sacchetti, M., & Bonini, S. (2010). Neurogenic inflammation of the ocular surface. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 10(5), 498–504. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328333e16cc>
- Mantelli, F., Moretti, C., Micera, A., & Bonini, S. (2007). Conjunctival mucin deficiency in complete androgen insensitivity syndrome (CAIS). *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(6), 899–902. <https://doi.org/10.1007/s00417-006-0452-x>
- Marfurt, C. F. (1981). The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *The Anatomical Record*, 201(1), 105–118. <https://doi.org/10.1002/ar.1092010113>
- Marfurt, C. F. (2000). The rat nervous system. In *Nervous control of the cornea in "nervous control of the eye"* (pp. 41–92).
- Marfurt, C. F., Cox, J., Deek, S., & Dvorscak, L. (2010). Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental Eye Research*, 90(4), 478–492. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.12.010>
- Martinez, S., & Belmonte, C. (1996). C-Fos expression in trigeminal nucleus neurons after chemical irritation of the cornea: reduction by selective blockade of nociceptor chemosensitivity. *Experimental Brain Research*, 109(1), 56–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8740208>
- McFadden, S. A., Howlett, M. H. C., & Mertz, J. R. (2004). Retinoic acid signals the direction of ocular elongation in the guinea pig eye. *Vision Research*, 44(7), 643–653. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751549>
- Mckemy, D. D. (2010). Therapeutic Potential of TRPM8 Modulators. *The Open Drug Discovery Journal*, 2, 81–88. <https://doi.org/10.2174/1877381801002030081>
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58.

<https://doi.org/10.1038/nature719>

- McLaughlin, S. A., Brightman, A. H., Helper, L. C., Primm, N. D., Brown, M. G., & Greeley, S. (1988). Effect of removal of lacrimal and third eyelid glands on Schirmer tear test results in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *193*(7), 820–822. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3192460>
- Meek, K. M., & Boote, C. (2004). The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental Eye Research*, *78*(3), 503–512. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15106929>
- Meng, I. D., Barton, S. T., Mecum, N. E., & Kurose, M. (2015). Corneal Sensitivity Following Lacrimal Gland Excision in the Rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(5), 3347. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-16717>
- Meng, I. D., Hu, J. W., & Bereiter, D. A. (2000). Parabrachial area and nucleus raphe magnus inhibition of corneal units in rostral and caudal portions of trigeminal subnucleus caudalis in the rat. *Pain*, *87*(3), 241–251. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963904>
- Meng, Q. -t., Xia, Z. -y., Liu, J., Bayliss, D. A., & Chen, X. (2011). Local Anesthetic Inhibits Hyperpolarization-Activated Cationic Currents. *Molecular Pharmacology*, *79*(5), 866–873. <https://doi.org/10.1124/mol.110.070227>
- Milescu, M., Lee, H. C., Bae, C. H., Kim, J. II, & Swartz, K. J. (2013). Opening the Shaker K⁺ channel with hanatoxin. *The Journal of General Physiology*, *141*(2), 203–216. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210914>
- Momin, A., Cadiou, H., Mason, A., & Mcnaughton, P. A. (2008). Role of the hyperpolarization-activated current Ih in somatosensory neurons. *Journal of Physiology*, *586*(24), 5911–5929. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163154>
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F., & Ludwig, A. (1999). Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biological Chemistry*, *380*(7–8), 975–980. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.121>
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F., & Ludwig, A. (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *European Journal of Biochemistry*, *268*(6), 1646–1652. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02036.x>
- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Bíró, T., & Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential

- channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(8), 601–620. <https://doi.org/10.1038/nrd3456>
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J. L., Bayliss, D. A., & Viana, F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Reports*, 8(5), 1571–1582. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.003>
- Mosimann, B. L., White, M. V, Hohman, R. J., Goldrich, M. S., Kaulbach, H. C., & Kaliner, M. A. (1993). Substance P, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide increase in nasal secretions after allergen challenge in atopic patients. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 92(1 Pt 1), 95–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7687608>
- Müller, L. J., Marfurt, C. F., Kruse, F., & Tervo, T. M. T. (2003). Corneal nerves: Structure, contents and function. *Experimental Eye Research*, 76(5), 521–542. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00050-2)
- Müller, L. J., Pels, L., & Vrensen, G. F. (1996). Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 37(4), 476–488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8595948>
- Murata, Y., & Masuko, S. (2006). Peripheral and central distribution of TRPV1, substance P and CGRP of rat corneal neurons. *Brain Research*, 1085(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.035>
- Myers, B. R., & Julius, D. (2007). TRP channel structural biology: new roles for an old fold. *Neuron*, 54(6), 847–850. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.011>
- Nassar, M. A., Stirling, L. C., Forlani, G., Baker, M. D., Matthews, E. A., Dickenson, A. H., & Wood, J. N. (2004). Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12706–12711. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404915101>
- Neira-Zalentein, W., Holopainen, J. M., Tervo, T. M. T., Borrás, F., Acosta, M. C., Belmonte, C., & Gallar, J. (2011). Corneal Sensitivity in Diabetic Patients Subjected to Retinal Laser Photocoagulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(8), 6043. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-7054>
- Nilius, B., & Szallasi, A. (2014). Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the

- Science of Basic Research to the Art of Medicine. *Pharmacological Reviews*, 66(3), 676–814.
<https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., ... Lazdunski, M. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *The EMBO Journal*, 28(9), 1308–1318. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.57>
- Nolan, M. F., Malleret, G., Lee, K. H., Gibbs, E., Dudman, J. T., Santoro, B., ... Morozov, A. (2003). The Hyperpolarization-Activated HCN1 Channel Is Important for Motor Learning and Neuronal Integration by Cerebellar Purkinje Cells. *Cell*, 115(5), 551–564. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00884-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00884-5)
- Notomi, T., & Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 471(3), 241–276. <https://doi.org/10.1002/cne.11039>
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316(6027), 440–443. <https://doi.org/10.1038/316440a0>
- Okamoto, T., Harnett, M. T., & Morikawa, H. (2006). Hyperpolarization-Activated Cation Current (I_{h}) Is an Ethanol Target in Midbrain Dopamine Neurons of Mice. *Journal of Neurophysiology*, 95(2), 619–626. <https://doi.org/10.1152/jn.00682.2005>
- Olausson, B. (1998). Recordings of polymodal single c-fiber nociceptive afferents following mechanical and argon-laser heat stimulation of human skin. *Experimental Brain Research*, 122(1), 44–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9772110>
- Orio, P., Madrid, R., De La Peña, E., Parra, A., Meseguer, V., Bayliss, D. A., ... Viana, F. (2009). Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *Journal of Physiology*, 587(9), 1961–1976. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165738>
- Orio, P., Parra, A., Madrid, R., Gonzalez, O., Belmonte, C., & Viana, F. (2012). Role of Ih in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings. *Journal of Neurophysiology*, 108(11), 3009–3023. <https://doi.org/10.1152/jn.01033.2011>
- Pal, S. K., Takimoto, K., Aizenman, E., & Levitan, E. S. (2006). Apoptotic surface delivery of K⁺ channels. *Cell Death & Differentiation*, 13(4), 661–667. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401792>

- Papazian, D., Schwarz, T., Tempel, B., Jan, Y., & Jan, L. (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science*, *237*(4816), 749–753. <https://doi.org/10.1126/science.2441470>
- Parra, A., Gonzalez-Gonzalez, O., Gallar, J., & Belmonte, C. (2014). Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain*, *155*(8), 1481–1491. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.04.025>
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., Del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M. C., ... Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature Medicine*, *16*(12), 1396–1399. <https://doi.org/10.1038/nm.2264>
- Payne, C. E., Brown, A. R., Theile, J. W., Loucif, A. J. C., Alexandrou, A. J., Fuller, M. D., ... Stevens, E. B. (2015). A novel selective and orally bioavailable Na^v 1.8 channel blocker, PF-01247324, attenuates nociception and sensory neuron excitability. *British Journal of Pharmacology*, *172*(10), 2654–2670. <https://doi.org/10.1111/bph.13092>
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., ... Patapoutian, A. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, *108*(5), 705–715. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00652-9)
- Pellegrini, J. J., Horn, A. K., & Evinger, C. (1995). The trigeminally evoked blink reflex. I. Neuronal circuits. *Experimental Brain Research*, *107*(2), 166–180. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8773237>
- Peterlin, Z., Chesler, A., & Firestein, S. (2007). A painful trp can be a bonding experience. *Neuron*, *53*(5), 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.011>
- Peters, C. H., & Ruben, P. C. (2014). Introduction to Sodium Channels. In *Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 221, pp. 1–6). https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3_1
- Pethő, G., & Reeh, P. W. (2012). Sensory and Signaling Mechanisms of Bradykinin, Eicosanoids, Platelet-Activating Factor, and Nitric Oxide in Peripheral Nociceptors. *Physiological Reviews*, *92*(4), 1699–1775. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2010>
- Petroll, W. M., Cavanagh, H. D., & Jester, J. V. (1993). Three-dimensional imaging of corneal cells using in vivo confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, *170*(Pt 3), 213–219. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8371258>
- Planells-Cases, R., & Ferrer-Montiel, A. (2007). *TRP Channel Trafficking. TRP Ion Channel Function in*

Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204515>

- Planells-Cases, R., Valente, P., Ferrer-Montiel, A., Qin, F., & Szallasi, A. (2011). Complex Regulation of TRPV1 and Related Thermo-TRPs: Implications for Therapeutic Intervention. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 704, pp. 491–515). https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_27
- Priest, B. T., Murphy, B. A., Lindia, J. A., Diaz, C., Abbadie, C., Ritter, A. M., ... Martin, W. J. (2005). Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(26), 9382–9387. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501549102>
- Proudfoot, C. J., Garry, E. M., Cottrell, D. F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D. C., ... Mitchell, R. (2006). Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Current Biology : CB*, *16*(16), 1591–1605. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.061>
- Qu, Y., Isom, L. L., Westenbroek, R. E., Rogers, J. C., Tanada, T. N., McCormick, K. A., ... Catterall, W. A. (1995). Modulation of Cardiac Na⁺ Channel Expression in *Xenopus* Oocytes by 1 Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(43), 25696–25701. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25696>
- Quallo, T., Vastani, N., Horridge, E., Gentry, C., Parra, A., Moss, S., ... Bevan, S. (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature Communications*, *6*(1), 7150. <https://doi.org/10.1038/ncomms8150>
- Quirce-Vázquez, S.; Gallar, J.; Belmonte, C.; Donovan-Rodríguez, T. (2008). Abnormal activity of cold receptors from injured corneas is modulated by sodium channel blockers.
- Ranade, S. S., Woo, S.-H., Dubin, A. E., Moshourab, R. A., Wetzel, C., Petrus, M., ... Patapoutian, A. (2014). Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*, *516*(7529), 121–125. <https://doi.org/10.1038/nature13980>
- Reid, G., & Flonta, M. (2001). Cold transduction by inhibition of a background potassium conductance in rat primary sensory neurones. *Neuroscience Letters*, *297*(3), 171–174. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01694-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01694-3)
- Renganathan, M., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2001). Contribution of Na_v1.8 Sodium Channels to Action Potential Electrogenesis in DRG Neurons. *Journal of Neurophysiology*, *86*(2), 629–640. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.2.629>

- Renigunta, V., Schlichthörl, G., & Daut, J. (2015). Much more than a leak: structure and function of K2P-channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 467(5), 867–894. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1703-7>
- Rivera, L., Gallar, J., Pozo, M. A., & Belmonte, C. (2000). Responses of nerve fibres of the rat saphenous nerve neuroma to mechanical and chemical stimulation: an in vitro study. *The Journal of Physiology*, 527 Pt 2, 305–313. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970431>
- Rosenberg, M. E., Tervo, T. M., Gallar, J., Acosta, M. C., Müller, L. J., Moilanen, J. A., ... Vesaluoma, M. H. (2001). Corneal morphology and sensitivity in lattice dystrophy type II (familial amyloidosis, Finnish type). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(3), 634–641. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222521>
- Rosenthal, P., Baran, I., & Jacobs, D. S. (2009). Corneal pain without stain: is it real? *The Ocular Surface*, 7(1), 28–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19214350>
- Rosenthal, P., & Borsook, D. (2012). The corneal pain system. Part I: The missing piece of the dry eye puzzle. *Ocular Surface*, 10(1), 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2012.01.002>
- Rózsa, A. J., & Beuerman, R. W. (1982). Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*, 14(2), 105–120. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7177676>
- Ruggeri, A., & Pajaro, S. (2002). Automatic recognition of cell layers in corneal confocal microscopy images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 68(1), 25–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11886700>
- Rugiero, F., Mistry, M., Sage, D., Black, J. A., Waxman, S. G., Crest, M., ... Gola, M. (2003). Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and NaV1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(7), 2715–2725. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12684457>
- Sabbadini, M., & Yost, C. S. (2009). Molecular Biology of Background K Channels: Insights from K2P Knockout Mice. *Journal of Molecular Biology*, 385(5), 1331–1344. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.048>
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R., & Siegelbaum, S. A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in

- the mouse CNS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(14), 5264–5275. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884310>
- Santoro, B., Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., & Tibbs, G. R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell*, 93(5), 717–729. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630217>
- Schrader, S., Mircheff, A. K., & Geerling, G. (2008). Animal models of dry eye. *Developments in Ophthalmology*, 41, 298–312. <https://doi.org/10.1159/000131097>
- Sepúlveda, F. V., Pablo Cid, L., Teulon, J., & Niemeyer, M. I. (2015). Molecular Aspects of Structure, Gating, and Physiology of pH-Sensitive Background K_{2P} and Kir K^+ -Transport Channels. *Physiological Reviews*, 95(1), 179–217. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2014>
- Sessle, B. J. (2011). Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. In *International review of neurobiology* (Vol. 97, pp. 179–206). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385198-7.00007-2>
- Shin, M., Simkin, D., Suyeoka, G. M., & Chetkovich, D. M. (2006). Evaluation of HCN2 abnormalities as a cause of juvenile audiogenic seizures in Black Swiss mice. *Brain Research*, 1083(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.102>
- Simsek, C., Kojima, T., Nagata, T., Dogru, M., & Tsubota, K. (2019). Changes in Murine Subbasal Corneal Nerves After Scopolamine-Induced Dry Eye Stress Exposure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(2), 615. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-26318>
- Singer-Lahat, D., Sheinin, A., Chikvashvili, D., Tsuk, S., Greitzer, D., Friedrich, R., ... Lotan, I. (2007). K^+ channel facilitation of exocytosis by dynamic interaction with syntaxin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(7), 1651–1658. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4006-06.2007>
- Singleton, K. R., Will, D. S., Schotanus, M. P., Haarsma, L. D., Koetje, L. R., Bardolph, S. L., & Ubels, J. L. (2009). Elevated extracellular K^+ inhibits apoptosis of corneal epithelial cells exposed to UV-B radiation. *Experimental Eye Research*, 89(2), 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.02.023>
- Sittl, R., Lampert, A., Huth, T., Schuy, E. T., Link, A. S., Fleckenstein, J., ... Carr, R. W. (2012). Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype NaV1.6-resurgent and persistent current. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

109(17), 6704–6709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118058109>

Skrzypecki, J., Tomasz, H., & Karolina, C. (2019). Variability of Dry Eye Disease Following Removal of Lacrimal Glands in Rats (pp. 109–115). https://doi.org/10.1007/5584_2019_348

Springer, J., Geppetti, P., Fischer, A., & Groneberg, D. A. (2003). Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 16(3), 121–130. [https://doi.org/10.1016/S1094-5539\(03\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S1094-5539(03)00049-X)

Staaf, S., Oerther, S., Lucas, G., Mattsson, J. P., & Ernfors, P. (2009). Differential regulation of TRP channels in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 144(1), 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.04.013>

Stern, M. E., Gao, J., Siemasko, K. F., Beuerman, R. W., & Pflugfelder, S. C. (2004). The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Experimental Eye Research*, 78(3), 409–416. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15106920>

Stevenson, W., Chauhan, S. K., & Dana, R. (2012). Dry Eye Disease. *Archives of Ophthalmology*, 130(1), 90. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2011.364>

Stevenson, W., Chen, Y., Lee, S.-M., Lee, H. S., Hua, J., Dohlman, T., ... Dana, R. (2014). Extraorbital Lacrimal Gland Excision. *Cornea*, 33(12), 1336–1341. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000264>

Stieber, J., Wieland, K., Stöckl, G., Ludwig, A., & Hofmann, F. (2006). Bradycardic and Proarrhythmic Properties of Sinus Node Inhibitors. *Molecular Pharmacology*, 69(4), 1328–1337. <https://doi.org/10.1124/mol.105.020701>

Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., ... Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6), 819–829. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00158-2)

Talavera, K., Gees, M., Karashima, Y., Meseguer, V. M., Vanoirbeek, J. A. J., Damann, N., ... Voets, T. (2009). Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nature Neuroscience*, 12(10), 1293–1299. <https://doi.org/10.1038/nn.2379>

Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., & Bayliss, D. A. (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7491–7505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567039>

- Tanelian, D. L., & Beuerman, R. W. (1984). Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Experimental Neurology*, 84(1), 165–178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6705882>
- Tervo, T., & Moilanen, J. (2003). In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(3), 339–358. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852490>
- Tervo, T., Tervo, K., & Eränkö, L. (1982). Ocular neuropeptides. *Medical Biology*, 60(2), 53–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6178909>
- The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). (2007). *The Ocular Surface*, 5(2), 75–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508116>
- Thomas, D., Wimmer, A.-B., Wu, K., Hammerling, B. C., Ficker, E. K., Kuryshev, Y. A., ... Karle, C. A. (2004). Inhibition of human ether-a-go-go-related gene potassium channels by $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonists prazosin, doxazosin, and terazosin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(5), 462–472. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0931-8>
- Tibbs, G. R., Posson, D. J., & Goldstein, P. A. (2016). Voltage-Gated Ion Channels in the PNS: Novel Therapies for Neuropathic Pain? *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(7), 522–542. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.002>
- Tóth, I. E., Boldogkoi, Z., Medveczky, I., & Palkovits, M. (1999). Lacrimal preganglionic neurons form a subdivision of the superior salivatory nucleus of rat: transneuronal labelling by pseudorabies virus. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 77(1), 45–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494749>
- Trost, K., Skalicky, M., & Nell, B. (2007). Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3), 143–146. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2007.00521.x>
- Tsavalier, L., Shapero, M. H., Morkowski, S., & Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Research*, 61(9), 3760–3769. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325849>
- Tu, H., Deng, L., Sun, Q., Yao, L., Han, J.-S., & Wan, Y. (2004). Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels: Roles in the differential electrophysiological properties of rat

- primary afferent neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 76(5), 713–722.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20109>
- Tuominen, I. S. J., Konttinen, Y. T., Vesaluoma, M. H., Moilanen, J. A. O., Helintö, M., & Tervo, T. M. T. (2003). Corneal innervation and morphology in primary Sjögren's syndrome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(6), 2545–2549. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-1260>
- Ubels, J. L., Schotanus, M. P., Bardolph, S. L., Haarsma, L. D., Koetje, L. R., & Louters, J. R. (2010). Inhibition of UV-B induced apoptosis in corneal epithelial cells by potassium channel modulators. *Experimental Eye Research*, 90(2), 216–222.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.10.005>
- VanDerMeid, K. R., Su, S. P., Ward, K. W., & Zhang, J.-Z. (2012). Correlation of Tear Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases with Four Dry Eye Diagnostic Tests. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(3), 1512. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7627>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Vesaluoma, M. H., Sankila, E. M., Gallar, J., Müller, L. J., Petroll, W. M., Moilanen, J. A., ... Tervo, T. M. (2000). Autosomal recessive cornea plana: in vivo corneal morphology and corneal sensitivity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(8), 2120–2126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892853>
- Vetter, I., Deuis, J. R., Mueller, A., Israel, M. R., Starobova, H., Zhang, A., ... Mobli, M. (2017). Nav1.7 as a pain target – From gene to pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, 172, 73–100.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.015>
- Viana, F., & Belmonte, C. (2008). Funny currents are becoming serious players in nociceptor's sensitization. *The Journal of Physiology*, 586(24), 5841–5842.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165852>
- Viana, F., de la Peña, E., & Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nature Neuroscience*, 5(3), 254–260.
<https://doi.org/10.1038/nn809>
- Voight, E. A., & Kort, M. E. (2010). Transient receptor potential vanilloid-1 antagonists: a survey of recent patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(9), 1107–1122.
<https://doi.org/10.1517/13543776.2010.497756>

- von Hehn, C. A., Baron, R., & Woolf, C. J. (2012). Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron*, 73(4), 638–652. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.008>
- Wahl-Schott, C., & Biel, M. (2009). HCN channels: Structure, cellular regulation and physiological function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(3), 470–494. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8525-0>
- Wang, L., Dai, W., & Lu, L. (2005). Ultraviolet irradiation-induced K⁺ channel activity involving p53 activation in corneal epithelial cells. *Oncogene*, 24(18), 3020–3027. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208547>
- Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., ... Keating, M. T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics*, 12(1), 17–23. <https://doi.org/10.1038/ng0196-17>
- Watanabe, H., Nagata, E., Kosakai, A., Nakamura, M., Yokoyama, M., Tanaka, K., & Sasai, H. (2001). Disruption of the Epilepsy KCNQ2 Gene Results in Neural Hyperexcitability. *Journal of Neurochemistry*, 75(1), 28–33. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750028.x>
- Waxman, S. G., Merkies, I. S. J., Gerrits, M. M., Dib-Hajj, S. D., Lauria, G., Cox, J. J., ... Faber, C. G. (2014). Sodium channel genes in pain-related disorders: phenotype–genotype associations and recommendations for clinical use. *The Lancet Neurology*, 13(11), 1152–1160. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70150-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70150-4)
- Waxman, S. G., & Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: Emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience*, 17(2), 153–163. <https://doi.org/10.1038/nn.3602>
- Wemmie, J. A., Taugher, R. J., & Kreple, C. J. (2013). Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(7), 461–471. <https://doi.org/10.1038/nrn3529>
- Weng, X., Smith, T., Sathish, J., & Djouhri, L. (2012). Chronic inflammatory pain is associated with increased excitability and hyperpolarization-activated current (I_h) in C- but not A δ -nociceptors. *Pain*, 153(4), 900–914. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.01.019>
- Woo, S.-H., Ranade, S., Weyer, A. D., Dubin, A. E., Baba, Y., Qiu, Z., ... Patapoutian, A. (2014). Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature*, 509(7502), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature13251>
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*,

306(5944), 686–688. <https://doi.org/10.1038/306686a0>

- Woolf, C. J. (2011). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, *152*(Supplement), S2–S15. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.09.030>
- Wray, D. (2009). Structure and function of ion channels. *European Biophysics Journal*, *38*(3), 271–272. <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0357-1>
- Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W., & Gu, J. G. (2007). TRPM8 Mechanism of Cold Allodynia after Chronic Nerve Injury. *Journal of Neuroscience*, *27*(50), 13680–13690. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2203-07.2007>
- Xiong, C., Chen, D., Liu, J., Liu, B., Li, N., Zhou, Y., ... Wang, Z. (2008). A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*(5), 1850–1856. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0720>
- Yamamoto, Y., Hatakeyama, T., & Taniguchi, K. (2009). Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neuroscience Letters*, *454*(2), 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.069>
- Yang, Y., Wang, Y., Li, S., Xu, Z., Li, H., Ma, L., ... Shen, Y. (2004). Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *Journal of Medical Genetics*, *41*(3), 171–174. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.012153>
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, *419*(6902), 35–42. <https://doi.org/10.1038/nature00978>
- Yeomans, D. C., Levinson, S. R., Peters, M. C., Koszowski, A. G., Tzabazis, A. Z., Gilly, W. F., & Wilson, S. P. (2005). Decrease in Inflammatory Hyperalgesia by Herpes Vector-Mediated Knockdown of Na_v 1.7 Sodium Channels in Primary Afferents. *Human Gene Therapy*, *16*(2), 271–277. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.271>
- Ying, S.-W., Abbas, S. Y., Harrison, N. L., & Goldstein, P. A. (2006). Propofol block of Ih contributes to the suppression of neuronal excitability and rhythmic burst firing in thalamocortical neurons. *European Journal of Neuroscience*, *23*(2), 465–480. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04587.x>
- Young, G. T., Emery, E. C., Mooney, E. R., Tsantoulas, C., & McNaughton, P. A. (2014). Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. *Pain*, *155*(9), 1708–1719.

<https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.05.021>

- Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A., & Catterall, W. A. (2005). Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 387–395. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.13>
- ZANDER, E., & WEDDELL, G. (1951). Observations on the innervation of the cornea. *Journal of Anatomy*, 85(1), 68–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14814019>
- Zhang, M.-M., Wilson, M. J., Gajewiak, J., Rivier, J. E., Bulaj, G., Olivera, B. M., & Yoshikami, D. (2013). Pharmacological fractionation of tetrodotoxin-sensitive sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by μ -conotoxins. *British Journal of Pharmacology*, 169(1), 102–114. <https://doi.org/10.1111/bph.12119>
- Zhang, X., Mak, S., Li, L., Parra, A., Denlinger, B., Belmonte, C., & McNaughton, P. A. (2012). Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by G α q. *Nature Cell Biology*, 14(8), 851–858. <https://doi.org/10.1038/ncb2529>
- Zhou, C., Ke, B., Zhao, Y., Liang, P., Liao, D., Li, T., ... Chen, X. (2015). Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels May Contribute to Regional Anesthetic Effects of Lidocaine. *Anesthesiology*, 122(3), 606–618. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000557>
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C. M., Carr, R. W., Kobayashi, J. I., ... Reeh, P. W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*, 447(7146), 855–858. <https://doi.org/10.1038/nature05880>

8 ANEXO: PUBLICACIONES

Lacosamide diminishes dryness-induced hyperexcitability of corneal cold sensitive nerve terminals

Illés Kovács^{1,2}, Lóránt Dienes², Kristóf Perényi², Susana Quirce¹, Carolina Luna¹, Kamila Mizerska¹, M.Carmen Acosta¹, Carlos Belmonte¹, Juana Gallar¹

¹Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández – CSIC, San Juan de Alicante, Spain

²Department of Ophthalmology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Corresponding author: Juana Gallar, MD, PhD, Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Avda. Santiago Ramon y Cajal, s/n, 03550 San Juan de Alicante, Spain. Phone: +34 965919532, Fax: +34 965919549, e-mail: juana.gallar@umh.es

Abstract

Lacosamide is an anti-epileptic drug that is also used for the treatment of painful diabetic neuropathy acting through voltage-gated sodium channels. The aim of this work was to evaluate the effects of acute application of lacosamide on the electrical activity of corneal cold nerve terminals in lacrimo-deficient guinea pigs.

Four weeks after unilateral surgical removal of the main lacrimal gland in guinea pigs, corneas were excised and superfused in vitro at 34 °C for extracellular electrophysiological recording of nerve terminal impulse activity of cold thermosensitive nerve terminals. The characteristics of the spontaneous and the stimulus-evoked (cooling ramps from 34° to 15 °C) activity before and in presence of lacosamide 100 µM and lidocaine 100 µM were compared.

Cold nerve terminals (n=34) recorded from dry eye corneas showed significantly enhanced spontaneous activity (8.0±1.1 vs. 5.2±0.7 imp/s; P<0.05) and cold response (21.2±1.7 vs. 16.8±1.3 imp/s; P<0.05) as well as reduced cold threshold (1.5±0.1 vs. 2.8±0.2 Δ°C; P<0.05) to cooling ramps compared to terminals (n=58) from control animals. Both lacosamide and lidocaine decreased spontaneous activity and peak response to cooling ramps significantly (P<0.05). Temperature threshold was increased by the addition of lidocaine (P<0.05) but not lacosamide (P>0.05) to the irrigation fluid.

In summary, the application of lacosamide results in a significant decrease of the augmented spontaneous activity and responsiveness to cold of corneal sensory nerves from tear-deficient animals. Based on these promising results we may speculate that lacosamide might be used to reduce the hyperexcitability of corneal cold receptors caused by prolonged ocular surface dryness due to hyposecretory or evaporative dry eye disease.

Keywords: dry eye, cold thermoreceptors, hyperexcitability, sodium channels, lacosamide

1. Introduction

Ocular discomfort sensations accompanying dry eye are one of the most commonly reported conditions in eye care with an estimated prevalence ranging from 5% to 35% (International Dry Eye WorkShop, 2007). Patients who suffer from dry eye disease (DED) present symptoms including ocular dryness, burning, photophobia and foreign body sensations accompanied by clinical signs such as conjunctival redness, shorter tear film breakup time, increased tear fluid osmolarity, and ocular surface staining.

The precorneal tear film humidifies the ocular surface and contributes to its protection from environmental challenges. Additionally, corneal sensory nerve endings, located very superficially in the epithelium are readily stimulated when physical and chemical characteristics of the tear film are altered. Functionally, such sensory nerves innervating the cornea and the conjunctiva belong to distinct functional sensory receptor types and their selective stimulation evokes conscious sensations of different quality (Acosta et al., 2001), being the origin of discomfort accompanying ocular surface injury. Recently, it has been suggested that unpleasant sensations accompanying DED may be due at least in part to an abnormal activity in cold receptor fibers innervating the cornea and the conjunctiva, produced by the sustained ocular surface desiccation and tear hyperosmolarity present in DED (Kovács et al., 2016; Parra et al., 2014). Cold thermoreceptors represent 10–15% of the nerve fibers of the cornea, exhibit a continuous nerve impulse discharge at basal corneal temperature and are highly sensitive to small temperature variations, as those occurring during tear film evaporation (Acosta et al., 2001; Hirata and Oshinsky, 2012). There is experimental evidence that tonic sensory inflow from ocular cold thermoreceptors reaching trigeminal brainstem centers, contributes to maintain basal tearing, adjusting its flow to the variable external humidity conditions. On another hand, gradual, moderate cooling of the ocular surface in humans evokes cooling sensations that become rapidly unpleasant with discrete temperature drops, suggesting that progressive

recruitment of cold thermoreceptor fibers contributes to the built up of irritation sensations associated to drying of the ocular surface.

Using an experimental model of dry eye produced through the removal of the main lachrymal gland in guinea pigs, Kovacs et al (2016) showed that progressive reduction of basal tear flow is accompanied by morphological and functional changes in all classes of corneal epithelial nerve branches and terminals, affecting particularly cold thermoreceptors. Furthermore, in this population of sensory fibers, background impulse activity and responses to cooling were abnormally enhanced (Kovács et al., 2016). Such dryness-induced changes in peripheral cold thermoreceptor responsiveness developed in parallel with a progressive enhancement of the membrane excitability of trigeminal ocular cold thermoreceptor neurons, primarily due to an increase of sodium currents and a decrease of potassium currents. These electrophysiological disturbances are similar to those observed in injured nociceptor neurons in pathologies leading to neuropathic pain (Dib-Hajj et al., 2010; Everill and Kocsis, 1999), thus suggesting that altered sodium and potassium channel expression leading to augmented cold thermoreceptor activity may underlie at least in part the unpleasant sensations experienced by dry eye patients (Kovács et al., 2016).

Current therapy of dry eye is based on tear supplementation to lubricate and replace missing tear constituents, which counteracts the reduced tear film volume and abnormally high tear film osmolarity thereby contributing to alleviate symptoms of eye surface irritation (Blackie et al., 2009). Indeed, long term use of artificial tears in patients with dry eye has been consistently associated with significant improvement of some of the dry eye symptoms (Benelli et al., 2010; Christensen et al., 2004; Gifford et al., 2006; Hartstein et al., 2005; Ousler et al., 2007; Paugh et al., 2008; Rolando et al., 2009; Sánchez et al., 2010; Versura et al., 2008), although the majority of patients still report abnormal ocular surface sensations despite frequent application of tear supplements.

Lacosamide is an anticonvulsant agent, currently used as an antiepileptic drug for adjunctive therapy of partial onset seizures (Halász et al., 2009). This drug is believed to enhance the slow inactivation of voltage-gated sodium channels without affecting their fast inactivation (Rogawski et al., 2015), thereby reducing channel opening probability during the action potential. This results in stabilization of hyperexcitable neuronal membrane and inhibition of neuronal firing (Cawello, 2015). Based on these properties, lacosamide has been used also to selectively block the abnormal activity of nociceptive neurons in chronic neuropathies. Lacosamide has shown efficacy in several animal models of neuropathic pain (Beyreuther et al., 2006, 2007) and also in clinical studies on neuropathic pain in diabetes (Hearn et al., 2012; Shaibani et al., 2009a, 2009b; Wymer et al., 2009; Ziegler et al., 2010) but its effect on the abnormal impulse activity in corneal nerve fibers, likely associated to unpleasant dryness sensations in DED has not been tested. The purpose of this study was to evaluate the effect of lacosamide on the enhanced activity of corneal cold nerve terminals in an animal model of tear-deficient dry eye. Preliminary results have been presented in abstract form (Kovács et al., 2013).

2. Material and Methods

2.1. Animals

Dunkin Hartley guinea pigs of both sexes weighting 200-300 g were used. Animals were kept in individual cages with free access to food and water and were maintained under controlled day-night cycles. The study was carried out in accordance with the *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, the European Union Directive (2010/63/EU) and the Spanish Regulations on the protection of Animals Used for Research, and followed a protocol approved and supervised by the Ethics Committee of the University Miguel Hernández.

2.2. Surgical procedures

Removal of the main lachrymal gland was performed following the technique previously described (Kovács et al., 2016). Briefly, animals were anaesthetized with ketamine (90

mg/kg i.p.) and xylazine (5 mg/kg i.p.), and after performing a unilateral 8 mm skin incision on the temporal side, posterior to the lateral canthus, the fibrous capsule of the exorbital gland was exposed and dissected, and the lachrymal gland was excised *in toto*. At the end of the operation, a drop of antibiotic (3 mg/ml tobramycin) was applied onto the surgical area. The skin incision was sewed using 6.0 braided silk suture. Animals were housed individually, and conjunctival and corneal signs checked regularly. A group of non-operated guinea pigs of both sexes of similar age and weight was used as control group. Animals were randomly assigned to the experimental groups.

2.3. Recording of corneal cold-sensitive nerve terminals

Four weeks after surgical removal of the main lachrymal gland, the animals were sacrificed using an overdose of sodium pentobarbital (120 mg/kg, i.p.). Eyeballs were removed and the corneas were cut circularly at the limbus with iris scissors, placed in a perfusion chamber and secured with insect pins to the silicone bottom of the chamber (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA). Corneas were continuously superfused at a flow of 2.5 ml/min with physiological solution (composition in mM: 133.4 NaCl; 4.7 KCl; 2 CaCl₂; 1.2 MgCl₂; 16.3 NaHCO₃; 1.3 NaH₂PO₄ and 7.8 glucose; gassed with 95% O₂/5% CO₂ to pH=7.4). Temperature of the chamber solution was maintained at 34°C (basal temperature) by means of a feed-back regulated, home-made Peltier device. Nerve terminal impulse (NTI) activity of single cold thermoreceptor terminals was recorded following the technique described by Brock et al (1998) using ~50 µm tip diameter glass micro electrodes filled with saline solution, and sealed to surface of the cornea by slight suction. Previous evidence indicated that extracellular recordings of nerve terminal impulse discharges with a micropipette applied onto the corneal surface favors the detection of the activity of cold receptor nerve terminals (Acosta et al, 2013). Electrical signals were recorded with respect to an Ag/AgCl pellet located in the bath, amplified (1000x, NL 103 AC amplifier, Digitimer, Welwyn, UK), filtered (high pass 1 Hz, low pass 5 KHz; NL 125/NL 126 filter, Digitimer) and stored in a computer, using an interface (CED micro1401 MK II, Cambridge Electronic Design,

Cambridge, UK) and dedicated software (Spike2, also from Cambridge Electronic Design). Only NTIs originating from single cold-sensitive terminals were selected for further study. They were identified by their relatively high level of regular spontaneous discharge, occasionally in bursts, that increased prominently with cooling and silenced with warming of the superfusion solution (Acosta et al., 2013, 2014; Brock et al., 1998, 2001; Gallar et al., 1993; Parra et al., 2010). Ongoing NTI activity at the basal temperature of 34°C was recorded for at least 2 min before applying a cooling ramp down to 15°C in 30s (cooling rate of -0.5°C/s), and returning bath temperature to 34°C. Lacosamide (at 100 µM because the clinically relevant concentrations of lacosamide range from 32 to 100 µM) (Errington et al., 2008) or lidocaine (also at 100 µM) were tested by adding the drug to the bathing solution, that was perfused during a 10-min period, during which cooling ramps were applied. Perfusion with the test drug was followed by washing with control solution for 10-30 min. Responses to cooling ramps were tested before and during exposure to the drug. In a set of experiments, the spontaneous and cold-evoked activity was also explored 30 min after perfusion with the drug.

2.4. Data analysis

NTIs were discriminated during the acquisition process using a threshold criterion, and filtered manually afterwards to remove electrical artifacts. The following firing pattern parameters were calculated: *Spontaneous activity at basal temperature*: average number of NTIs recorded per second (impulses/s) during 1 min at basal temperature (34°C); *Cooling threshold*: Temperature change during the cooling ramp at which a 25% increase of the mean NTI frequency at basal temperature

was obtained; *Peak response*: Maximal impulse/s value of NTI frequency during the cooling ramp.

Statistical comparisons were made using Statistica 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Ok, USA). Previous analysis of sample size and test power was required by the Ethics Committee of the University Miguel Hernández to approve the use of animals in research. Data were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.), being n the number of nerve terminals explored. Data were compared using parametric or their equivalent non-parametric tests, as indicated. ANOVA with post-hoc Dunnett test or repeated measures ANOVA were used as indicated. In the case of multiple comparisons, for instance over the pharmacological testing, data were analyzed using the relevant statistical tests on dependent samples. The significance level was set at $P < 0.05$ in all statistical analyses.

3. Results

A total of 92 nerve terminals exhibiting an ongoing, beating activity at 34°C and responding to cooling with a rapid frequency increase were recorded in intact corneas (n = 58) and in corneas of tear-deficient animals (n = 34) (Fig. 1). Confirming previous reports (Kovács et al, 2016; Kurose and Meng, 2013), corneal cold endings from tear-deficient animals showed a higher ongoing firing frequency of NTIs at 34°C and a comparatively larger response to cooling pulses, in comparison with the cold nerve endings of intact corneas. They also showed a significantly lower cooling threshold, i.e., their firing frequency started to increase at warmer temperatures during the cooling pulse (Table 1; Fig. 1).

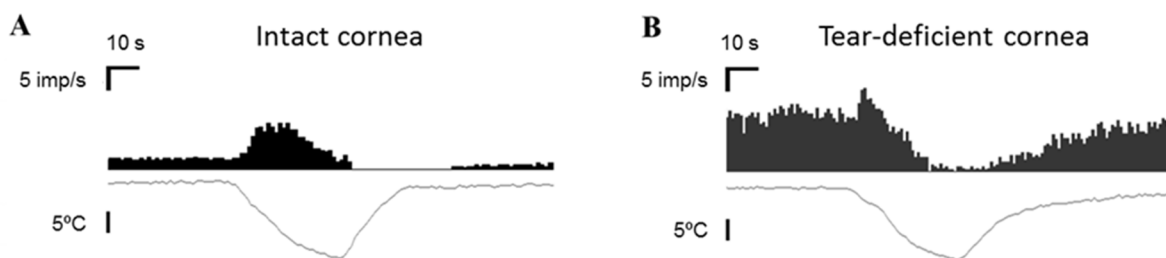


Figure 1. Example of the change in NTI activity evoked by a cooling ramp from 34° to 20°C in cold thermoreceptor nerve terminals from an intact (A) and a tear-deficient cornea (B). Upper trace: histogram of the firing frequency in impulses/s. Lower trace: Temperature change.

Table 1: Spontaneous activity at 34°C and cold-evoked firing response of cold nerve terminals in control and tear-deficient corneas.

	<i>Control corneas</i>	<i>Tear-deficient corneas</i>
	(n=58)	(n=34)
<i>Spontaneous activity at 34°C (imp/s)</i>	5.2±0.7	8.0±1.1 ^a
<i>Peak firing response (imp/s)</i>	16.8±1.3	21.2±1.7 ^a
<i>Cold threshold (Δ°C)</i>	-2.80±0.2	-1.5±0.1 ^a

^aP<0.05, Student t-test.

As illustrated in Figure 2, perfusion of tear-deficient corneas with 100 μM lacosamide resulted in a marked decrease of the enhanced spontaneous background activity at basal temperature, so that of nerve terminals from tear-deficient corneas (Table 2; Fig. 2), reaching mean frequency values statistically similar to those obtained in intact corneas (see Table 1).

Perfusion with lacosamide at 100 μM also affected the response to cooling ramps of cold nerve terminals from tear-deficient corneas, as evidenced by the significantly reduced peak

response frequency values (Table 2, Fig. 2), while the mean cooling threshold temperature was not modified by lacosamide (Table 2). Despite this significant reduction of peak frequency in response to cooling ramps during perfusion with lacosamide, all cold thermoreceptors increased their firing frequency in response to cold stimulation. When tested, these effects of lacosamide were maintained after 30 min of washout.

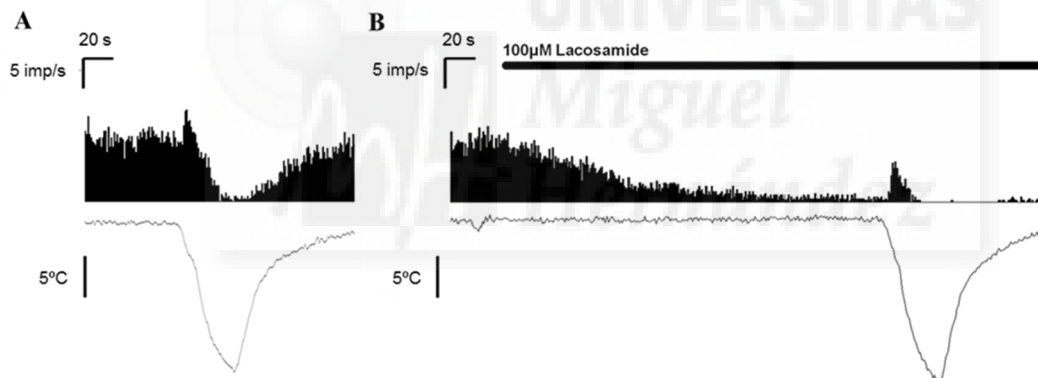


Figure 2. Response to a cooling pulse from 34° to 15°C of a cold thermoreceptor recorded from a tear-deficient cornea before (A) and during (B) perfusion with solution containing lacosamide at 100 μM (black bar). Upper traces: Impulse frequency histogram of discharge in imp/s. Lower traces: Temperature of the bath solution.

Table 2: Effects of lacosamide and lidocaine, both at 100 μM, on the spontaneous activity at the basal temperature (34°C) and the characteristics of cold-evoked responses of cold nerve in tear-deficient corneas.

	<i>Lacosamide</i>		<i>Lidocaine</i>	
	(n = 21)		(n = 8)	
	<i>Before</i>	<i>During</i>	<i>Before</i>	<i>During</i>
<i>Spontaneous activity at 34°C (imp/s)</i>	8.5±0.9	4.2±0.4 ^d	6.1±0.4	1.1±0.3 ^c
<i>Peak response (imp/s)</i>	20.8±1.1	14.0±1.0 ^b	23.1±2.2	4.7±1.3 ^a
<i>Cold threshold (Δ°C)</i>	-1.69±0.08	-1.66±0.14	-1.74±0.1	-2.9±0.3 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01, ^cP<0.001, paired t-test; ^dP<0.001, Wilcoxon signed Rank test. All are differences between data obtained before and during perfusion with the corresponding drug.

The effects of lacosamide were less prominent in cold thermoreceptors of intact, control corneas ($n = 4$). Background ongoing activity at 34°C and response to cooling ramp were not significantly affected during perfusion with lacosamide (Fig. 3).

Lidocaine 100 μM added to the perfusion solution markedly decreased background firing rate of cold nerve terminals at 34°C

(Table 2, Fig. 4). Moreover, increased activity evoked by a cooling ramp was almost abolished in 7 out of 8 cold thermoreceptor units (Fig. 4 and Table 2). Similar effects were observed in 4 cold thermoreceptors of intact corneas (data not shown).

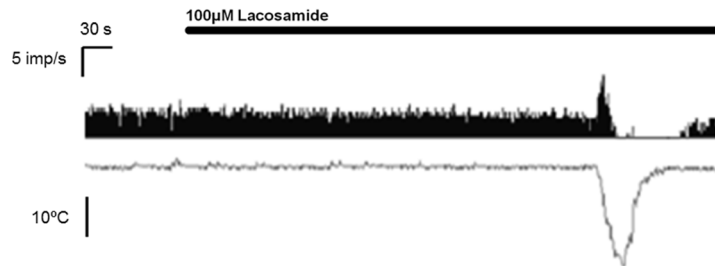


Figure 3. Ongoing activity at basal temperature and response to a cooling pulse from 34° to 15°C of a cold thermoreceptor recorded from an intact cornea before and during perfusion with solution containing lacosamide at 100 μM (black bar). Upper traces: Impulse frequency histogram of discharge in imp/s. Lower traces: Temperature of the bath solution.

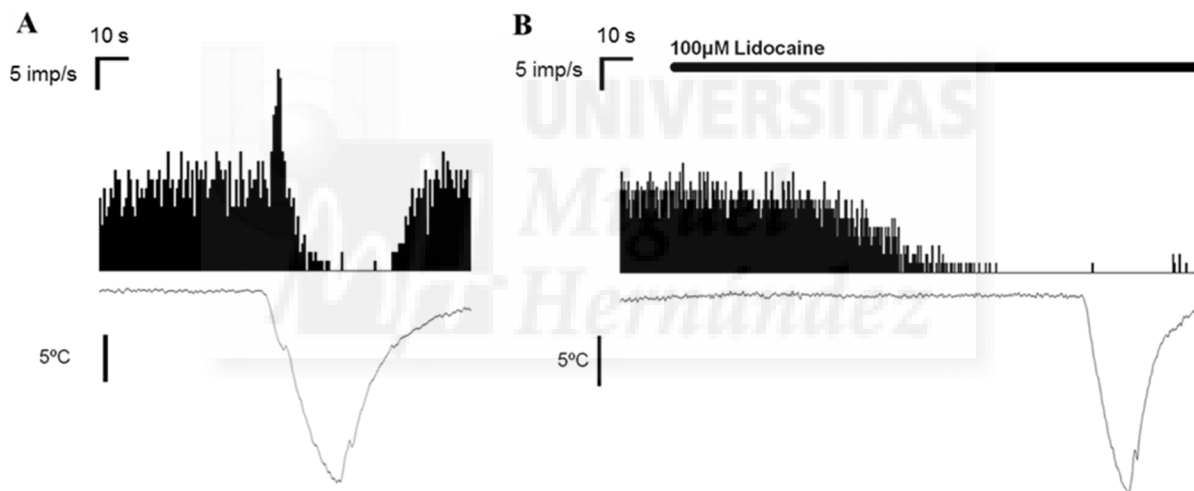


Figure 4. Response to a cooling pulse from 34° to 15°C of a cold thermoreceptor recorded from a tear-deficient cornea before (A) and during (B) perfusion with solution containing lidocaine at 100 μM (black bar). Upper traces: Impulse frequency histogram of discharge in imp/s. Lower traces: Temperature of the bath solution.

4. Discussion

This study confirms that ongoing activity in corneal cold nerve terminals and NTI firing frequency increases evoked by cooling are enhanced four weeks after lachrymal gland removal (Kovács et al., 2016) and shows that lacosamide and lidocaine, two drugs with a well-known blocking effect on sodium channel currents (Sheets et al., 2008), significantly reduced the enhanced background activity and response to cooling developed by corneal cold thermoreceptor terminals in such chronic tear-deficient conditions.

Dry eye syndrome is a common cause of ocular surface unpleasant sensations. Such sensations represent a primary therapeutic goal to improve patients' ocular comfort and restore ocular surface homeostasis (Dry Eye WorkShop, 2007; Friedman, 2010; Schaumberg et al., 2013).

The effects of lacosamide on neuronal sodium channel isoforms have been investigated previously and lacosamide was found to substantially reduce all three current types, however, in contrast to lidocaine lacosamide did not alter steady-state fast inactivation of these channels. Lacosamide targets the slow, inactivated state of voltage-gated sodium channels to promote time spent in the refractory state and hence directly reduce neuronal firing rate. It has already been described, that the slow inactivation state of neurones is induced under conditions of repetitive neuronal firing or under conditions of slight and sustained membrane depolarisation (Beyreuther et al., 2007). Previous results suggests that lacosamide might be more effective than lidocaine at selectively blocking the electrical activity of neurons that are chronically depolarized compared with those at more normal resting potentials (Sheets et al., 2008).

The effects of lacosamide on the different parameters of corneal cold receptor activity were different of those of lidocaine. Lacosamide at a concentration of 100 μ M reduced significantly ongoing activity at basal temperature as well as the response of corneal cold receptors approximately to the values that were obtained in control corneas, while perfusion

with 100 μ M lidocaine resulted in an almost complete abolishment of both the ongoing and the stimulus-evoked activity of cold thermoreceptors from tear-deficient corneas. Moreover, despite the significant reduction of the peak frequency in response to cooling ramps, all cold thermoreceptors responded to cold stimulation during perfusion with lacosamide while lidocaine abolish equally the spontaneous and stimulus-evoked activity of cold thermoreceptors (Wymer et al., 2009).

The effect of acute administration of lacosamide, which is a selective enhancer of sodium channel slow inactivation, and lidocaine, which is a nonselective sodium channel blocker supposed to be the result of their facilitating effect on the ending of the action potential. Alterations in sodium and potassium currents are characteristic of peripheral sensory nerve damage (Dib-Hajj et al., 2010; Everill and Kocsis, 1999) and the disturbances in these currents rather than in the cold-transducing transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 (TRPM8) current are behind the enhanced responsiveness to cooling of corneal cold sensory nerve terminals in tear-deficient eyes (Kovács et al., 2016; Kurose and Meng, 2013). It has been shown previously, that the sustained increase in ocular cold thermoreceptor impulse activity in dry eye is mediated by enhanced sodium currents combined with diminished potassium currents, and is the most prominent alteration of corneal sensory input during experimental reductions of ocular surface wetness (Kovács et al., 2016). Changes in the responsiveness and membrane currents of polymodal nociceptor neurons, the presumed source of pain sensations in all body tissues (Olausson, 1998) appeared to be significantly less pronounced in chronic ocular surface dryness (Kovács et al., 2016). In corneal cold thermoreceptor neurons ocular dryness increased TTX-sensitive sodium currents and decreased rapidly- and slowly-inactivating potassium currents (Kovács et al., 2016). Altogether, these effects supposed to move firing threshold of corneal cold receptors towards higher temperatures,

enhancing thermoreceptor firing at basal or near-basal temperature levels. Under comfortable environmental conditions, background activity of low-threshold cold thermoreceptors, the only afferent tonic input produced by corneal nerves, helps to maintain basal tearing and spontaneous blinking, yet it is probably too weak to evoke conscious sensations of cooling or dryness (Acosta et al., 2001; Kovács et al., 2016; Parra et al., 2010). Augmented firing of these low-threshold cold thermoreceptors and recruitment of high-threshold cold thermoreceptors may be triggered when the tear film is thin or abnormal and eventually evokes a distinct, unpleasant, irritating sensation in aqueous deficient and evaporative dry eye patients (Begley et al., 2013; Benjamin and Hill, 1983; Kovács et al., 2016). Moreover, it is presumed that the augmented cold thermoreceptor activity is further potentiated by the increased tear fluid osmolality, which is a common consequence of decreased tear volume in this population due to the enhanced tear film evaporation (Benjamin and Hill, 1983; Hirata and Rosenblatt, 2014; Liu et al., 2009; Parra et al., 2014). Finally, the activation of nociceptors by damage of corneal nerve terminals due to corneal epithelial injury and inflammation possibly aggravates the unpleasant and distressing nature of the final sensation experienced by patients with more advanced forms of dry eye (Belmonte et al., 2015).

In this study, lacosamide decreased significantly both the enhanced spontaneous activity and the frequency response to cooling of corneal cold receptors, although its decreasing effect was significantly lower than that of lidocaine. In the present experiments, lidocaine abolished almost completely both the spontaneous and cold-evoked responses of cold thermoreceptor units in tear-deficient corneas, similarly to the reduction of the spontaneous and stimulus-evoked activity of cold thermoreceptors and polymodal nociceptors from intact and lesioned corneas (Belmonte et al., 2009b, 2015) due to its blocking activity on different types of sodium channels. On the contrary,

lacosamide reduced the spontaneous and stimulus-evoked activity of sensitized thermosensitive corneal units from tear-deficient corneas without blocking their responsiveness to cold stimulation or the spontaneous and cold-evoked activity of thermoreceptors from intact corneas, which opens new therapeutic uses for this drug in the management of ocular discomfort sensations produced by the enhanced firing of cold thermoreceptors developed in dry eye disease.

The differences between the effects of lacosamide and lidocaine on cold thermoreceptors are presumably due to the significant differences in their mechanism of action. Several different sodium channels are thought to be potential targets for pain therapeutics, including Na(v)1.3, which is up-regulated in sensory neurons following chronic inflammation and nerve injury, Na(v)1.7, which is highly expressed in nociceptors and plays crucial role in pain and inherited painful neuropathies, and Na(v)1.8, which has been implicated in inflammatory and neuropathic pain mechanisms, being present in polymodal nociceptors and cold sensory receptors and providing them the capability to maintain nerve impulse activity at low temperatures and encode noxious cold stimuli (Belmonte et al., 2009).

Although we have demonstrated a significant increase in corneal cold receptor responsiveness in corneas from tear-deficient animals, changes that occur in patients with dry eye disease are not well understood. It has been described that the selective stimulation of corneal cold sensory fibers with menthol in healthy humans evokes distinct sensations of eye discomfort, reinforcing the assumption that cold thermoreceptors plays an important role in signaling potentially harmful desiccation of the ocular surface (Belmonte and Gallar, 2011; Kovács et al., 2016). These results unequivocally demonstrate that alterations in the excitability of corneal cold receptors underlie the development of abnormal corneal sensations in dry eye patients. Although a treatment resulting in prompt relief of complaints is the desirable medium of care, it has already been shown that the altered responsiveness of corneal

sensory nerve endings is still maintained and might be responsible for the remaining complaints of dry eye patients despite a significant improvement in tear film dynamics after tear supplementation (Dienes et al., 2015). The clinical relevance of the findings of this study is that local application of lacosamide might be suitable for a direct pharmacological modulation of the enhanced responsiveness of corneal sensory nerve terminals in patients with dry eye. One might conclude from our experimental study that the topical application of lacosamide might result in a normalization of aberrant corneal cold receptor activity, the presumed source of abnormal ocular surface sensations experienced in dry eye, without a significant unspecific analgesic effect on corneal nerves. Further clinical studies are recommended as this beneficial effect would be better described when the effect of different concentrations of topical lacosamide on subjective symptoms of dry eye patients were analyzed. Our future clinical studies aim to examine whether the addition of lacosamide to artificial tears lead to a more effective decrease in dry eye symptoms due to the combined effect of pharmacological modulation of abnormal nerve activity as well as an improvement in tear film dynamics.

As a conclusion, in this experimental animal study we have shown that the application of lacosamide results in a

significant decrease of the augmented spontaneous activity and responsiveness to cold of corneal sensory nerves from tear-deficient animals. Although there are several reports on the beneficial effect of systemic treatment with lacosamide in diabetic polyneuropathy, to the best of our knowledge, there is no available experimental data on the effect of direct pharmacological modulation of corneal cold receptor responsiveness by lacosamide. Based on these promising results we may speculate that lacosamide might be used to reduce the hyperexcitability of corneal cold receptors caused by prolonged ocular surface dryness due to hyposecretory or evaporative dry eye disease.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, project SAF2014-54518-C3-1-R (JG, MCA), and in part by SAF2014-54518-C3-2-R (CB), and by the Hungarian Scientific Research Fund - European FP7 Marie Curie Mobility grant Human-MB08A 80372 and OTKA NN106649 (IK, LD). The authors wish to thank Manuel Bayonas for his skillful technical assistance. Commercial Relationships: All authors declare no competing financial interests related to this manuscript.

References

- Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J Physiol.* 2001;15:511-25.
- Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Changes in impulse activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain.* 2013;154:2353-2362.
- Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:3403- 3412.
- Aicher SA, Hermes SM, Hegarty DM. Denervation of the Lacrimal Gland Leads to Corneal Hypoalgesia in a Novel Rat Model of Aqueous Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:6981-6989.
- Begley C, Simpson T, Liu H, Salvo E, Wu Z, Bradley A, Situ P. Quantitative analysis of tear film fluorescence and discomfort during tear film instability and thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:2645-53.
- Belmonte C, Gallar J. Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:3888-3892.
- Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J, Gallar J. What Causes Eye Pain? *Curr Ophthalmol Rep.* 2015;3:111-121.
- Belmonte C, Brock JA, Viana F. Converting cold into pain. *Exp Brain Res.* 2009;196:13-30.
- Belmonte C, Donovan-Rodriguez T, Luna C, Quirce S, Parra A, Acosta MC, Gallar J. Sodium Channel Blockers Modulate Abnormal Activity of Regenerating Corneal Sensory Nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; ARVO abstract E-908.
- Benelli U, Nardi M, Posarelli C, Albert TG. Tear osmolarity measurement using the TearLab Osmolarity System in the assessment of dry eye treatment effectiveness. *Cont Lens Anterior Eye.* 2010;33:61–67.
- Benjamin WJ, Hill RM. Human tears: Osmotic characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983;24:1624–1626.
- Beyreuther BK, Callizot N, and Stohr T (2006) Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model

- for painful diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 539:64–70.
- Beyreuther BK, Callizot N, Brot MD, Feldman R, Bain SC, and Stohr T (2007a) Antinociceptive efficacy of lacosamide in rat models for tumor- and chemotherapy-induced cancer pain. *Eur J Pharmacol* 565:98–104.
 - Beyreuther BK, Freitag J, Heers C, et al. Lacosamide: a review of preclinical properties. *CNS Drug Rev*. 2007;13:21–42.
 - Blackie CA, Solomon JD, Scaffidi RC, Greiner JV, Lemp MA, Korb DR. The relationship between dry eye symptoms and lipid layer thickness. *Cornea*. 2009;28:789–794.
 - Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C. Tetrodotoxin-resistant impulses in single nerve terminals signalling pain. *J Physiol*. 1998;512:211–217.
 - Brock JA, Pianova S, Belmonte C. Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *J Physiol*. 2001;533:493–501.
 - Cawello W. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of lacosamide. *Clin Pharmacokinet*. 2015 Sep;54(9):901–14.
 - Christensen MT, Cohen S, Rinehart J, Akers F, Pemberton B, Bloomstein M, et al. Clinical evaluation of an HP-guar gellable lubricant eye drop for the relief of dryness of the eye. *Curr Eye Res*. 2004;28:55–62.
 - Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci*. 2010;33:325–347.
 - Dienes L, Kiss HJ, Perenyi K, Szepessy Z, Nagy ZZ, Barsi A, Acosta MC, Gallar J, Kovacs I. The Effect of Tear Supplementation on Ocular Surface Sensations during the Interblink Interval in Patients with Dry Eye. *PLoS One*. 2015;10:e0135629. doi: 10.1371/journal.pone.0135629. eCollection 2015.
 - Dry Eye Workshop. Management and therapy of dry eye disease: Report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surf*. 2007;5:163–178.
 - Errington AC, Stöhr T, Heers C, and Lees G (2008) The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol* 73:157–169.
 - Everill B, Kocsis JD. Reduction in potassium currents in identified cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons after axotomy. *J Neurophysiol*. 1999;82:700–708.
 - Friedman NJ. Impact of dry eye disease and treatment on quality of life. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010;21:310–316.
 - Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP, Belmonte C. Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol*. 1993;468:609–622.
 - Gifford P, Evans BJ, Morris J. A clinical evaluation of Systane. *Cont Lens Anterior Eye*. 2006;29:31–40.
 - Halász P, Kälviäinen R, Mazurkiewicz-Beldzinska M, Rosenow F, Doty P, Hebert D, and Sullivan T; SP755 Study Group (2009) Adjunctive lacosamide for partial-onset seizures: Efficacy and safety results from a randomized controlled trial. *Epilepsia* 50:443–453.
 - Hartstein I, Khwarg S, Przydryga J. An open-label evaluation of Hpguar gellable lubricant eye drops for the improvement of dry eye signs and symptoms in a moderate dry eye adult population. *Curr Med Res Opin*. 2005;21:255–260.
 - Hearn L, Derry S, Moore RA. Lacosamide for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;(2):CD009318.
 - Hirata H, Meng ID. Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: implications for dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:3969–3976.
 - Hirata H, Oshinsky ML. Ocular dryness excites two classes of corneal afferent neurons implicated in basal tearing in rats: involvement of transient receptor potential channels. *J Neurophysiol*. 2012;107:1199–1209.
 - Hirata H, Rosenblatt MI. Hyperosmolar tears enhance cooling sensitivity of the corneal nerves in rats: possible neural basis for cold-induced dry eye pain. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:5821–5833.
 - International Dry Eye Workshop. The epidemiology of dry eye disease: Report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surf*. 2007;5:93–107.
 - Kovacs I, Quirce S, Luna C, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Lacosamide decreases the hyperexcitability of corneal cold thermosensitive nerve terminals in experimental dry eye. 11 Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics. Alicante, Spain, 2013
 - Kovács I, Luna C, Quirce S, Mizerska K, Callejo G, Riestra A, Fernandez-Sanchez L, Meseguer VM, Cuenca N, Merayo-Llodes J, Gasull X, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain*. 2016;157:399–417.
 - Kurose M, Meng ID. Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *J Neurophysiol*. 2013;110:495–504.
 - Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, Nelson JD, Simpson. A link between tear instability and hyperosmolality in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3671–3679.
 - Michael A, Rogawski, Azita Tofighy, H. Steve White, Alain Matagne, Christian Wolff. Current understanding of the mechanism of action of the antiepileptic drug lacosamide. *Epilepsy Research*. 2015;110:189–205.
 - Olausson B. Recordings of polymodal single c-fiber nociceptive afferents following mechanical and argon-laser heat stimulation of human skin. *Exp Brain Res*. 1998;122:44–54.
 - Ousler GW, Michaelson C, Christensen MT. An evaluation of tear film breakup time extension and ocular protection index scores among three marketed lubricant eye drops. *Cornea*. 2007;26:949–952.
 - Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8- dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med*. 2010;16:1396–1399.
 - Parra A, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J, Belmonte C. Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain*. 2014;155:1481–1491.
 - Paugh JR, Nguyen AL, Huang P, Hwang JS. Retention and retention of effect of topical formulations in dry eye subjects. *Optom Vis Sci*. 2008;85:873–879.
 - Rolando M, Autori S, Badino F, Barabino S. Protecting the ocular surface and improving the quality of life of dry eye patients: A study of the efficacy of an HP-guar containing ocular lubricant in a population of dry eye patients. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2009;25:271–278.
 - Rogawski MA, Tofighy A, White HS, Matagne A, Wolff C. Current understanding of the mechanism of action of the antiepileptic drug lacosamide. *Epilepsy Research*. 2015;110:189–205.
 - Sánchez MA, Arriola-Villalobos P, Torralbo-Jiménez P, Girón N, de la Heras B, Herrero Vanrell R, et al. The effect of preservative-free HP-Guar on dry eye after phacoemulsification: A flow cytometric study. *Eye (Lond)*. 2010;24:1331–1337.

- Schaumberg DA, Uchino M, Christen WG, Semba RD, Buring JE, Li JZ. Patient Reported Differences in Dry Eye Disease between Men and Women: Impact, Management, and Patient Satisfaction. *PLoS One*. 2013;8: e76121.
- Shaibani A1, Biton V, Rauck R, Koch B, Simpson J. Long-term oral lacosamide in painful diabetic neuropathy: a two-year open-label extension trial. *Eur J Pain*. 2009 May;13(5):458-63.
- Shaibani A1, Fares S, Selam JL, Arslanian A, Simpson J, Sen D, Bongardt S. Lacosamide in painful diabetic neuropathy: an 18-week double-blind placebo-controlled trial. *J Pain*. 2009 Aug;10(8):818-28.
- Sheets PL, Heers C, Stoehr T, and Cummins TR (2008) Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-Nbenzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 326:89–99.
- Versura P, Profazio V, Campos EC. One month use of Systane improves ocular surface parameters in subjects with moderate symptoms of ocular dryness. *Clin Ophthalmol*. 2008;2:629–635.
- Wymer JP1, Simpson J, Sen D, Bongardt S; Lacosamide SP742 Study Group. Efficacy and safety of lacosamide in diabetic neuropathic pain: an 18-week double-blind placebo-controlled trial of fixed-dose regimens. *Clin J Pain*. 2009 Jun;25(5):376-85.
- Ziegler D1, Hidvégi T, Gurieva I, Bongardt S, Freynhagen R, Sen D, Sommerville K; Lacosamide SP743 Study Group.





Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease

Illés Kovács^{1,2}, Carolina Luna^{1,§}, Susana Quirce^{1,§}, Kamila Mizerska¹, Gerard Callejo^{3,4}, Ana Riestra⁵, Laura Fernández-Sánchez⁶, Victor M. Meseguer¹, Nicolás Cuenca⁶, Jesús Merayo-Lloves⁵, M. Carmen Acosta¹, Xavier Gasull^{3,4,*}, Carlos Belmonte^{1,5,*‡}, Juana Gallar^{1,* ‡}

¹Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández–CSIC, 03550 San Juan de Alicante, Spain.

²Department of Ophthalmology, Semmelweis University, 1085 Budapest, Hungary.

³Laboratory of Neurophysiology, School of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain.

⁴Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain.

⁵Instituto Universitario Fernández-Vega, Universidad de Oviedo and Fundación de Investigación Oftalmológica, 33012 Oviedo, Spain.

⁶Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, 03690 San Vicente del Raspeig, Spain.

§ CL and SQ contributed equally to the work presented here and should therefore be regarded as equivalent authors.

* XG, CB and JG contributed equally to this work.

‡ Corresponding authors:

Carlos Belmonte, MD, PhD
Instituto de Neurociencias
Universidad Miguel Hernández-CSIC
Avda. Santiago Ramon y Cajal, s/n
03550 San Juan de Alicante
Spain
Phone: +34 965919530
Fax: +34 965919549
carlos.belmonte@umh.es

Juana Gallar, MD, PhD
Instituto de Neurociencias
Universidad Miguel Hernández-CSIC
Avda. Santiago Ramon y Cajal, s/n
03550 San Juan de Alicante
Spain
Phone: +34 965919532
Fax: +34 965919549
juana.gallar@umh.es

Keywords

Eye pain; dry eye; corneal nerve injury; neuropathic pain; eye inflammation; cold thermoreceptors; nociceptors

SUMMARY

Discomfort in Dry-Eye is possibly caused by an augmented ongoing activity in corneal cold neurons secondary to dryness-induced alterations in sodium and potassium channel expression.

ABSTRACT

Dry eye disease (DED) affects >10% of the population worldwide and it provokes an unpleasant sensation of ocular dryness, for which the underlying neural mechanisms remain unknown. Removal of the main lachrymal gland in guinea-pigs caused a long-term reduction of basal tearing accompanied by changes in the architecture and density of sub-basal corneal nerves and epithelial terminals. Four weeks later, ongoing impulse activity and responses to cooling of corneal cold thermoreceptor endings were enhanced. Menthol (200µM) first excited and then inactivated this augmented spontaneous and cold-evoked activity. Comparatively, corneal polymodal nociceptors of tear-deficient eyes remained silent and exhibited only a mild sensitization to acidic stimulation, while mechano-nociceptors were not affected. Dryness-induced changes in peripheral cold thermoreceptor responsiveness developed in parallel with a progressive excitability enhancement of corneal cold trigeminal ganglion neurons, primarily due to an increase of sodium currents and a decrease of potassium currents. In corneal polymodal nociceptor neurons, sodium currents were enhanced while potassium currents remain unaltered. In healthy humans, exposure of the eye surface to menthol vapors or to cold air currents evoked unpleasant sensations accompanied by increased blinking frequency that we attributed to cold thermoreceptor stimulation. Notably, stimulation with menthol reduced the ongoing background discomfort of DED patients, conceivably due to use-dependent inactivation of cold thermoreceptors. Together, these data indicate that cold thermoreceptors contribute importantly to the detection and signaling of ocular surface moistness, and develop under chronic eye dryness conditions an injury-evoked neuropathic firing that appears to underlie the unpleasant sensations experienced by DED patients.

INTRODUCTION

The precorneal tear film that covers the exposed surface of the eye is continuously subjected to evaporation. Under normal circumstances this fluid loss is replenished through the secretion of tears by the lachrymal glands, helping to moisten the non-keratinized epithelium of the corneal surface [17]. Dry Eye Disease (DED) is a multifactorial ocular disease due in most cases to deficient tear production or excessive evaporation, resulting in discomfort, visual disturbance, and tear instability, with potential damage to the eye surface [63]. The peripheral neural mechanisms underlying the sensation of dryness elicited by abnormal ocular surface desiccation are poorly understood. During interblink periods, the temperature of the eye surface decreases rapidly due to tear evaporation [67]. Osmolality of the tear film also rises [45], whereas thinning and eventual disruption of the precorneal tear film apply a mechanical stress to the cells and nerve fibers of the superficial epithelial layers of the cornea [27,55], eventually causing local release of inflammatory agents [43]. All these physical and chemical disturbances accompanying excessive evaporation, represent potential stimuli for the distinct functional classes of trigeminal ganglion (TG) sensory neurons that innervate the ocular surface (mechano-nociceptor, polymodal nociceptor and cold thermoreceptor neurons) [10,24], each of which is a possible source for the discomfort evoked by eye surface dryness [3,8,34,35,42]. However, the relative contribution of these various neuron functional types to the final sensory input evoking unpleasant symptoms of dryness in healthy subjects and DED patients are still largely ignored, as they are the molecular mechanisms underlying the excitation of corneal peripheral endings during eye surface dryness in normal and pathological conditions.

To address these questions, we experimentally reproduced in guinea pigs the reduced moistness of the ocular surface in DED through unilateral, surgical removal of the main lachrymal gland [41], and examined its effects on the morphology and impulse firing of corneal nerve fibers, as well as on the sodium and potassium membrane currents of the various functional classes of corneal sensory neurons. We also explored in humans the quality of the conscious sensations evoked by stimulation of cold sensory receptors of the ocular surface in healthy individuals and in DED patients.

METHODS

Animal experiments

Dunkin Hartley guinea pigs of both sexes weighting 200-300 g were used. Animals were kept in individual cages with free access to food and water and were maintained under controlled day-night cycles. The study was carried out in accordance with the *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and the European Union Directive (2010/63/EU) and the Spanish regulations on the protection of animals used for research, and followed a protocol approved and supervised by the Ethics Committees of the University Miguel Hernández and the University of Barcelona.

Surgical procedures

Animals were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg i.p.) and xylazine (5 mg/kg i.p.) for unilateral removal of the main lachrymal gland. After performing an 8 mm skin incision on the temporal side, posterior to the lateral canthus, the fibrous capsule of the exorbital gland was exposed and dissected, and the lachrymal gland carefully excised. Total removal was verified by inspecting the surgical area for any remaining glandular tissue. At the end of the operation, a drop of antibiotic (3 mg/ml tobramycin) was applied onto the surgical area. The skin incision was then sutured using 6.0 braided silk suture. Animals were housed individually, and conjunctival and corneal signs checked regularly. Palpebral morphology and reflex blinking responses to corneal stimulation were tested post-surgically. Both appeared unaffected in all the operated animals. Diluted fluorescein dye (5 µl of 0.2% fluorescein, Alcon-Cusí, Barcelona, Spain) instilled in the eye was used to confirm the absence of corneal epithelial defects developed after lachrymal gland excision. In preliminary experiments, a group of guinea pigs were subjected to every step of the above described procedure except the gland removal. No differences in tear secretion and corneal nerve activity were found between sham-operated and non-operated animals. Thus, non-operated guinea pigs of similar age and weight were used as control group. Animals were randomly assigned to the experimental groups.

Tear secretion and blinking rate measurement

Basal tear secretion and blinking were determined before and at different times after surgery (1, 2 and 4 weeks). Blinks were independently counted during a 5 min period while the animal move freely in a 80x60x60 cm ceiling-less white cage by two different observers (one eye each observer) that knew the assignation of the animal to an experimental group. The number of scratching movements of the posterior legs directed to the either eye during this 5 min period was also noted [4].

Immediately after assessing blinking rate and eye scratching movements, tear fluid secretion was measured in both eyes using commercial phenol red threads (Zone-Quick, Menicon, Tokyo, Japan) placed in the lower lid for 30 s without topical anesthesia [4,70]. The lower lid was pulled down slightly, the folded 2-mm end of the thread was gently placed onto the nasal palpebral conjunctiva, and the lower lid was released. After a 30s period, the lower lid was again pulled down and the thread was gently removed. The length of red color thread reflects the amount of tears. Tear rate was determined as the entire length of the red-stained portion of the thread in mm, measured with a ruler under a stereomicroscope with an accuracy of ± 0.5 mm. The data obtained from control and operated animals at different time points after lachrymal gland removal were compared using the appropriate paired parametric or non-parametric statistical test, as indicated.

In a separate set of experiments, tear secretion, blinking rate and scratching responses were measured during 5 min in control and 4-weeks tear deficient guinea pigs, before and immediately after topical ocular application of 10 μ l of cold saline (2°C), menthol (100-200 μ M) and capsaicin (100 μ M) [5]. In these experiments, intervals of 40-90 min were allowed between applications of the different test solutions.

Immunohistochemistry of corneal nerves

The morphological changes of corneal nerves were analyzed four weeks after removal of the main lachrymal gland. Animals were sacrificed with an overdose of anesthetic and both eyes were excised. Eyeballs were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M Phosphate buffer (PB), pH=7.4 for 1 hour at room temperature. After washes in 0.1 M PB, eyes were cryoprotected in 10% sucrose for 1 hour and 20% sucrose for 1 hour, followed by immersion in 30% sucrose overnight. The next day, corneas were dissected from the eye cups and radial cuts were made to flatten them. Corneas were put through a freeze thaw procedure by dipping them in liquid nitrogen-cooled isopentane for a few seconds. After thawing in 30% sucrose, corneas were washed in 0.1 M PB and then incubated in 0.01% hyaluronidase (type IV-S, Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO) and 0.1% EDTA (Sigma) diluted in 0.1 M PB pH=5.3 at 37°C overnight in agitation. After washes in 0.1 M PB, corneas were incubated in 2.28% sodium metaperiodate (NaIO_4) for 5 minutes and in 0.05% sodium borohydride (NaBH_4) for 5 additional minutes. After further washes with PB, corneas were incubated in 10% normal goat serum in 0.1 M PB for 1 hour at 4°C to block non-specific

binding. Without washing, the corneas were subsequently incubated for 2 days at 4°C under agitation in mouse monoclonal primary antibody, neuronal class III beta-tubulin (anti-TUJ 1, catalog number MMS-435P, Covance Research Products, Berkeley, CA, USA) at a concentration of 1:200 in 0.1 M PB plus 1% Triton X-100 [52].

Immunofluorescence. After further washes in PB, the tissue was transferred to Alexa 488 goat anti-mouse (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) diluted 1:100 in 0.1M PB, 1% Triton X-100 for 1 day at 4°C. The corneas were finally washed in 0.1 M PB, included in mounting media (Citifluor®, Citifluor Ltd; London, UK) and coverslipped for laser-scanning confocal microscopy viewing on a Leica TCS SP2 system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Immunohistochemical controls were performed by omission of either the primary or secondary antibodies.

Immunoperoxidase. After exposure to the primary antibody, the corneas were incubated for 1 day at 4°C in the secondary antibody biotinylated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Labs. Inc., West Grove, PA, USA) diluted 1:100 in 0.1 M PB + 1% Triton X-100. Corneas were rinsed again in PB and incubated for 1 day at 4°C in avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (ABC reagent; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Thereafter, they were incubated under agitation in the dark in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; at 0.1% in 0.1 M PB) for 15 minutes and further incubated with fresh DAB solution with 0.01% H_2O_2 [52]. The DAB reaction was stopped by washes in distilled water. The corneas were mounted in high adherence reagent-coated glass slides (Vectabond, Vector Laboratories, Burlingame, CA) and coverslipped. Light photomicrographs and *camera lucida* drawings were made in a Leica DMR microscope.

Electrophysiological recordings

Previous evidence [4] indicated that extracellular recording of nerve terminal impulse (NTI) discharges with a micropipette applied onto the corneal surface [Brock et al. 1998] favors the detection of the activity of cold receptor nerve terminals, while extracellular recording of single parent nerve fibers dissected out of the ciliary nerves in the back of the eye predominantly selected polymodal and mechano-nociceptor axons. Therefore, we alternate preparations of the isolated cornea, and of the excised whole eye with its sensory nerves, to record the impulse activity of the different functional types of peripheral corneal receptors. For this

purpose, 1, 2 or 4 weeks after lachrymal gland removal, animals were euthanized with an intraperitoneal injection of 100mg/kg sodium pentobarbitone and both eyes immediately enucleated together with the bulbar and tarsal conjunctiva and the optic and ciliary nerves, and placed in cold saline (4°C).

Recording of corneal mechanosensory and polymodal nociceptor fibers.

Connective tissue and extraocular muscles were carefully removed from the excised eyeball to expose the back of the eye with the ciliary nerves around the optic nerve. The eye was then placed in a double chamber specially designed to keep the anterior segment of the eye with the conjunctiva, separated from the back pole and the ciliary nerves. In the front part of the chamber, the conjunctiva was pinned to the separating wall in order to isolate both compartments, which were perfused separately. The anterior compartment was perfused with warm saline (34 °C) dropping continuously over the upper corneoscleral border. In the rear compartment of the chamber, filled with warmed mineral oil, nerve filaments were teased apart from the ciliary nerves and placed on an Ag-AgCl electrode for monopolar recording of single unit impulse activity, using conventional electrophysiological equipment (gain x10000, high pass 300 Hz, low pass 3 KHz; DAM50 amplifier, WPI, Sarasota, FL, USA). Electrical signals were recorded with respect to an Ag/AgCl pellet in the posterior compartment. Electrical signals were transferred to a PC with a CED interface (CED micro1401 MK II, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) and analyzed with the appropriate software (Spike 2, v7.0, also from CED). Spontaneous activity of the selected unit was recorded during 1 min before any intended stimulation. Mechanical threshold was determined thereafter using calibrated von Frey hairs (range 0.25-4.00 mN). Receptive fields of corneal afferent fibers were localized using mechanical stimulation with a fine paint brush and mapped afterwards using a suprathreshold von Frey hair. For chemical stimulation, a gas jet containing 98.5% CO₂ was applied on the corneal receptive field during 30s. Thermal stimulation was performed by heating (up to 45 °C) or cooling (down to 20 °C) the perfusion solution by means of a custom-made Peltier device. In a group of experiments, the topical effect of menthol (100-200 µM) on polymodal nociceptor activity was also tested. For this purpose, a 6 mm piece of paper soaked in menthol was placed during 1 min on the receptive field of the recorded polymodal nociceptor fiber. Response to mechanical and chemical stimulation performed before, immediately after application of the drug, and 15 min afterwards were compared.

Recording of corneal cold-sensitive nerve terminals. In this type of experiment, the corneas were cut circularly at the limbus with iris scissors, placed in a perfusion chamber and secured with insect pins to the silicone bottom of the chamber (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA). Corneas were continuously superfused at a flow of 2.5 ml/min with physiological solution (composition in mM: 133.4 NaCl; 4.7 KCl; 2 CaCl₂; 1.2 MgCl₂; 16.3 NaHCO₃; 1.3 NaH₂PO₄ and 7.8 glucose; gassed with carbogen: 95% O₂, 5% CO₂ to pH=7.4). Temperature of the bath solution was maintained at 34°C (basal temperature) by means of a feed-back regulated, home-made Peltier device. Nerve terminal impulse (NTI) activity of single cold thermoreceptors terminals was recorded following the technique described by Brock et al (1998) using 50 µm diameter glass micropipette electrodes filled with bath saline solution, applied onto the surface of the cornea under slight suction. Electrical signals were recorded with respect to an Ag/AgCl pellet in the bath. Electrical activity was amplified (1000x, NL 103 AC amplifier, Digitimer, Welwyn, UK), filtered (high pass 1 Hz, low pass 5 KHz; NL 125/NL 126 filter, Digitimer) and stored in a computer, using a CED interface and Spike 2 software. Only NTIs originating from single cold-sensitive terminals were selected for further study. They were identified by their relatively high level of regular spontaneous discharge, occasionally in bursts, that increased prominently with cooling and silenced with warming of the superfusion solution [4,5,14,15,24,59]. Ongoing NTI activity at the basal mean temperature was recorded for at least 2 min before applying a cooling ramp to 15°C of 30s duration, obtained by decreasing the temperature of the perfusion solution (average cooling rate -0.5°C/s). This was followed by re-warming to the baseline temperature. After a resting period of 2 min, corneal temperature was increased up to 50°C for 30 s to explore heat sensitivity (average heating rate +0.4°C). In a set of experiments, a stepwise cooling was performed from 34°C down to 22°C in four -3°C steps of 2 min duration. In another group of experiments, the effect of TRPM8 agonist menthol (50-200 µM) and TTX-sensitive Na⁺ channel inhibitor hainantoxin-IV (100 nM) [76] on the spontaneous and evoked activity of cold receptors was tested. To study these effects, the corresponding drug was added to the physiological saline solution and perfused during 8 min; responses to thermal stimulation were tested before and during exposure to the drug.

Data analysis. In cold nerve terminal recordings, NTIs were discriminated during the acquisition process using a threshold criterion, and filtered manually afterwards to remove artifacts. Interval durations between

successive NTIs (*interspike interval*, ISI) were first obtained. The following additional firing pattern parameters were calculated: *Mean NTI frequency*: average number of NTIs recorded per second (impulses/s); *Instantaneous frequency*: The inverse of the time interval between successive NTIs, expressed in Hz; *Cooling threshold*: Temperature during the cooling ramp at which a 25% increase of the mean NTI frequency at basal temperature was obtained; *Peak response*: Maximal impulse/s value of NTI frequency during the cooling ramp; *Temperature at the peak response*: Temperature value (°C) at which peak frequency was reached. Also, to determine the effect of temperature on the shape of NTIs, the impulse duration and amplitude, and the mean rate of voltage change (dV/dt) during the upstroke and downstroke phases of the individual NTIs were measured [59].

In single fiber recordings of ciliary nerves, impulse firing of individual units discriminated accordingly to their stimulus modality, amplitude and shape was analyzed. *Ongoing impulse activity* was expressed as mean impulse frequency (in impulses/s) measured during 30 s at the beginning of the recording and during the interstimulus periods. Responses to CO₂ were quantified measuring the following parameters: *Latency*: time delay between onset of the CO₂ pulse and the first impulse given by the unit; *Mean discharge rate*: mean number of impulses per second (imp/s) throughout the CO₂ pulse; *Postdischarge*: mean firing frequency (imp/s) during 30s immediately after the CO₂ pulse [3,4].

Labelling of TG corneal neurons

In guinea pigs anesthetized with 90 mg/kg ketamine and 5 mg/kg xylazine (i.p.), a 6 mm-diameter piece of Spongostan® film (Ferrosan A/S, Soeborg, Denmark) saturated with the cell stain FM® 1-43 (Invitrogen, Molecular probes, Eugene, OR, USA) at 5 mM in saline solution was carefully placed in the center of the cornea to retrogradely label trigeminal ganglion (TG) sensory cell bodies whose axons innervate the cornea. After 40 min, the film was removed and the eyes were repeatedly washed with warm (30°C) PBS [72].

Six days afterwards, animals were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital and both TGs immediately removed and maintained in cold (4–5°C) Ca²⁺- and Mg²⁺-free Hanks' balanced salt solution (HBSS; Gibco) until dissociation of TG neurons for intracellular calcium imaging or electrophysiological recording.

Intracellular calcium imaging in TG neurons

TG ganglia were incubated in a mixture of collagenase type XI (0.66 mg/ml) and dispase (3 mg/ml) for 1 h followed by mechanical dissociation. The cell suspension was then layered on top of a 14% Percoll (Sigma) gradient to separate myelin and nerve debris from the neurons. Next, the cell suspension was centrifuged at 2500 rpm for 13 min at room temperature. Neurons found in the pellet were suspended in 3 ml HBSS + 10% FBS (Invitrogen), centrifuged at 1500 rpm for 5 min and re-suspended in the culture medium [89% Minimum Essential Media (MEM) and 10% FBS supplemented with 1% MEM vitamins (all from Invitrogen), plus 100 µg/ml penicillin/streptomycin, and 100 ng/ml nerve growth factor (all from Sigma)]. Cell suspensions were transferred to poly-L-lysine/laminin-coated 6 mm-diameter glass coverslips and incubated at 37°C up to 1 day [51]. Corneal neurons labeled with FM® 1-43 were identified by their fluorescence emission when excited with 470 nm light. Each coverslip contained only one or two labeled neurons, where intracellular calcium or ion currents were subsequently measured.

Changes in intracellular calcium levels were measured using ratiometric digital fluorescence calcium imaging. Neurons were incubated with 5 µM Fura-2 AM (Invitrogen) for 1 h at 37°C in the dark [51]. Then, the coverslip was placed into a small chamber continuously perfused at 3 ml/min with (in mM) 140 NaCl, 3 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose, at pH=7.4 adjusted with NaOH. The temperature of the perfusion solution was maintained at 34°C (basal temperature) or decreased down to 15°C for 30s (cooling ramp stimulus) using a feedback-controlled home-made Peltier device. 100 µM menthol, 100 µM cinnamaldehyde and 1 µM capsaicin (all from Sigma) were added to the perfusion solution for 3 min to test the effects of TRP channel agonists. The response to 30 mM KCl was explored at the end of each experiment and those neurons not producing a [Ca²⁺]_i increase in response to this depolarizing stimulus were discarded. Fluorescence measurements were made with a Zeiss Axioskop FS upright microscope fitted with an ORCA-ERCCD camera (Hamamatsu Photonics). Fura-2 was excited at 340 and 380 nm (excitation time 300 ms) with a rapid switching monochromator (TILL Photonics GmbH, Graefelfing, Germany), and the emitted fluorescence was filtered with a 510 nm long-pass filter. Mean fluorescence intensity ratios (F₃₄₀/F₃₈₀) were displayed online with MetaFluor software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Fluorescence signals and bath temperature were recorded simultaneously.

The following parameters were measured in FM® 1-43 labeled TG neurons from both control and lacrimo-deficient guinea pigs: *Peak response* to cold, defined as the peak value of the F_{340}/F_{380} ratio during the cooling ramp. *Temperature at the peak of the response*, defined as the temperature at which the positive peak of the first derivative of the fluorescence ratio was obtained. *Cold threshold*, i.e. the temperature decrease required to evoke a $[Ca^{2+}]_i$ response, determined and expressed as the temperature change at which the F_{340}/F_{380} rose 4 standard deviations over its basal value at 34°C.

Patch-clamp recording of TG neurons

TG cell suspensions were transferred to poly-L-lysine/laminin-coated 12 mm-diameter glass coverslips and incubated at 37°C up to 1 day. FM® 1-43 labeled neurons from control and lacrimo-deficient animals (1-2 by coverslip) were identified and used for patch-clamp electrophysiological recordings.

Cold-evoked currents. Coverslips with cultured cells were placed in a microchamber and continuously perfused (0.8 ml/min) with solutions warmed at $33 \pm 1^\circ\text{C}$. The temperature was adjusted with a water-cooled Peltier device (RDTC-1, Reid-Dan Electronics) placed directly on the cell field and controlled by a feedback device [73]. Cold sensitivity was investigated with a temperature ramp to 15°C performed during perfusion with the standard bath solution or containing 100 μM menthol.

Cold-evoked currents in FM® 1-43 labeled TG neurons were monitored at -60 mV in the whole-cell patch clamp configuration, filtered at 2 kHz and sampled at 10 kHz. Current recordings were performed simultaneously with temperature recordings [51]. The standard bath solution contained the following (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1.3 MgCl_2 , 2.4 CaCl_2 , 10 HEPES and 10 glucose, pH = 7.4 adjusted with NaOH (297 mOsm/kg). Standard patch pipettes 5–8 $\text{M}\Omega$ were fabricated from borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK) and contained the following (in mM): 140 KCl, 6 NaCl, 1 EGTA, 0.6 MgCl_2 , 1 NaATP, 0.1 Na-GTP and 10 HEPES, at pH = 7.4 adjusted with KOH (282 mOsm/kg).

Current signals were recorded with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Stimulus delivery and data acquisition were performed using pClamp 9 software (Molecular Devices). Analysis was performed with pClamp 9 and WinASCD software (Guy Droogmans, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium).

Na^+ and K^+ currents. An Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA) was used for patch-clamp recordings of FM® 1-43 labeled neurons. Membrane currents were recorded in the whole-cell patch clamp configuration, filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz and acquired with pClamp 9 software (Molecular Devices). Recordings were analyzed with Clampfit 9 (Molecular Devices) and Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Whole-cell capacitance and series resistance were compensated with the amplifier circuitry. Series resistance was always kept below 10 $\text{M}\Omega$ and compensated at 70-80%. All recordings were done at room temperature (23°C). Patch electrodes were fabricated in a Flaming/Brown micropipette puller P-97 (Sutter Instruments). Electrodes had a resistance between 2 and 3 $\text{M}\Omega$ when filled with intracellular solutions.

To record Na^+ currents, the following solutions were used: Intracellular solution contained (in mM) 100 Cs^+ -methanesulfonate, 40 TEA-Cl, 5 Na Cl, 1 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 2 ATP, 1 GTP, 11 EGTA and 10 HEPES at pH = 7.2 (310 mOsm/Kg). Extracellular solution contained (in mM) 35 NaCl, 65 Choline-Cl, 30 TEA-Cl, 0.1 CaCl_2 , 5 MgCl_2 , 10 HEPES and 10 glucose at pH = 7.4 (325 mOsm/Kg). As previously described [29,30], from a holding voltage of -80 mV, voltage-gated Na^+ currents were evoked after a 500 ms voltage step to either -120 or -40 mV. Current evoked from -40 mV was considered to be TTX-R current, whereas the difference between the current evoked from -120 and -40 mV was considered to be TTX-S I_{Na} . Currents were evoked after a 500 ms prepulse to either -120 or -40 mV with a 100 ms step to potentials between -60 and +50 mV in 10 mV increments. After recording Na^+ currents, neurons were challenged with 100 μM menthol, 100 μM allyl isothiocyanate (AITC) and 1 μM capsaicin. Inward currents activated by these compounds were used to classify neurons as cold sensory neurons or polymodal nociceptor neurons.

The voltage dependence for activation of I_{Na} was determined from the peak sodium conductance (g_{Na}) at different potentials, calculated as a chord conductance, from the corresponding peak current, as $g_{\text{Na}} = I_{\text{Na}}/(V_m - E_{\text{Na}})$, where E_{Na} is the reversal potential for sodium current. E_{Na} was determined for each neuron wherein the current values around the reversal potential were fit with a linear regression line to determine the voltage at which the current was zero. The conductance values were fitted to a Boltzman function using a least-squares fit to characterize the activation characteristics $G/G_{\text{max}} = 1/\{1 + \exp [(V_{0.5} - V_m)/k]\}$ where $V_{0.5}$ is the voltage for half-maximum activation and k is the slope factor.

To record K^+ currents, the intracellular solution used was (in mM): 120 K^+ -gluconate, 20 KCl, 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES, 10 EGTA and 1 mM ATP at pH = 7.2. Extracellular solution contained (in mM): 150 choline-Cl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 0.2 $CdCl_2$, 5 glucose and 1 μM tetrodotoxin at pH = 7.4. Solutions were adjusted to 310 mOsm/Kg with sorbitol. K^+ currents were separated into three groups based on inactivation properties: rapidly inactivating, slowly inactivating, and noninactivating currents, that presumably correspond to the previously described rapidly inactivating ($K_{A,fast}$) and slowly inactivating ($K_{A,slow}$) A-currents and delayed rectifier current (K_{dr}), respectively [28,53]. Protocol 1 consisted in voltage-clamp steps (-100 to +50 mV; 500 ms) made from a holding potential of -100 mV and activating a family of mixed outward current components [48]. Protocol 2 was like protocol 1 but included a short depolarizing prepulse to -10 mV (60 ms) that preferentially removed a rapidly inactivating component, leaving more slowly and non-inactivating components. The rapidly inactivating component was isolated by subtracting the traces generated with protocol 2 from those generated with protocol 1. Protocol 3 was similar to protocol 1 but cells were held at -10 mV (instead of -100 mV) for 7 s, which inactivated both the rapidly and slowly inactivating currents and test steps resulted in traces consisting of the non-inactivating component and leak current. The leak current was subsequently subtracted out with a p/8 leak subtraction protocol, isolating the non-inactivating current. The slowly inactivating component was isolated by subtracting currents generated with protocol 3 from the ones generated with protocol 2. Similarly to Na^+ currents, activation voltage dependency was studied by plotting normalized conductance (G/G_{max}) against test pulse voltage, and fitting the data using a Boltzmann function. To study the voltage dependency of inactivation for $K_{A,fast}$ and $K_{A,slow}$ two-pulse voltage protocols were used. Residual $K_{A,fast}$ currents were measured following short (1 s) conditioning prepulse varying between -120 and 0 mV, followed by a 400 ms test pulse of +50 mV, which allowed inactivation of only the rapidly inactivating $K_{A,fast}$ currents. Longer conditioning pulses (8 s duration; -80 to 0 mV) allowed inactivation of both $K_{A,fast}$ and $K_{A,slow}$ currents. Current amplitude measured at the test pulse was plotted against conditioning pulse potential, and the continuous line resulted an average of fits to a negative Boltzmann function: $I/I_{max} = 1/(1 + \exp[V_{0.5} - V_m/k])$, where I is the current, I_{max} is the maximal current, $V_{0.5}$ is the membrane potential for half-activation, V_m is the command potential, and k is the slope factor.

Human experiments

Eighteen healthy subjects (14 females and 4 males, mean age 33.3 ± 2.3 years, range 20-54) and nine dry eye patients (7 female, 2 male; mean age 43.5 ± 5.4 years, range 25-70) were recruited and participated voluntarily in the study. All the participants signed an informed consent to a protocol approved by the Ethical Review Committees of the University Miguel Hernandez and the Hospital Universitario Central de Asturias that followed the tenets of the Declaration of Helsinki and the Spanish and European Union regulations. An abbreviated medical history was obtained from all the subjects and patients, including age, gender and time from dry eye diagnosis. Contact lens wearers and subjects previously subjected to ocular surgery were not included in the study. Prior to testing, the ocular surface of each patient was examined by biomicroscopy to ascertain the absence of any ocular pathology other than aqueous tear-deficient dry eye disease.

Experimental protocol

At the beginning of the session, the volunteers were filmed at rest for 3 minutes using a high sensitivity webcam. Blinking rate was counted off-line from the recordings. Then, participants were asked to fill in the OSDI (Ocular Surface Disease Index) questionnaire validated for Spanish speakers [25], and to evaluate the sensation of eye discomfort using a Visual Analogue Scale (VAS) from 0 (no discomfort) to 100 (the maximum discomfort they can imagine). The Schirmer test without anesthesia was then performed using commercial paper strips of known water absorption quality (Dina Strip Schirmer-Plus, Gecis, Lamotte, France). The lower lid margin was slightly pulled down and the paper strip folded along the printed bold line, was gently placed in the lower temporal lid margin. The eye remained closed for 5 min and the paper strip was gently removed afterwards. The length of the moist portion of the paper strip was then measured from the bold printed line, and tearing rate was expressed as the length of moistened paper per 5 min (mm/5min). The experimental protocol was performed under stable environmental conditions (23°C and 60% humidity) while volunteers were subjected to a continuous air jet (6.5-7.5 m/s) directed to the face.

After a 10 min rest period, an ointment containing menthol at 1 mM was applied to the malar region skin using a cotton swab. The volunteers rated 3 min later the magnitude of cold and unpleasant components of the sensation produced by menthol, using separate visual analogue scales. A sample of

tear was taken thereafter. Schirmer test and BUT determination were performed 3 min later. After a 10 min resting period, the procedure was repeated using an ointment containing 10 mM menthol. In a set of experiments, the same experimental protocol was repeated in volunteers subjected to a continuous air jet (velocity: 6.5-7.5 m/s) at room temperature directed to the face.

Menthol concentration in tear samples was quantified using gas chromatography with flame ionization detector. Tears collected with a glass capillary 5 min after ointment application to the malar skin, and frozen until measurement were used to determine menthol concentration in tears using a gas chromatograph (CLARUS 400, PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, USA) provided with an Elite-Wax column (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.5 μ m df; also from PerkinElmer). Helium was used as the carrier gas and camphor as internal standard. The initial column temperature was 100°C, increasing at 30 °C/min to 200°C (hold 2 min). The injector temperature was 200°C and the interface temperature was 240°C. Tear osmolarity was measured using a lab-on-a-chip system that collects a 50-nl tear sample from the temporal side of the inferior lid margin and analyses its electrical impedance to calculate the concentration of ions within the tear fluid (TearLab Corp., San Diego, CA, USA).

Statistical analysis of data

Statistical comparisons were made using Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Ok, USA), SigmaStat 3.5 (Systat Software, Erkrath, Germany) and Prism 4 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) data analysis software. SigmaStat was used to determine the normality, sample size and sensitivity of the experimental designs. Previous analysis of sample size and test power was required by the Ethics Committee of the University Miguel Hernández to approve the use of animals in research. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), being n the number of nerve terminals, fibers, neurons, corneas or subjects explored. Data were compared using parametric or their equivalent non-parametric tests, as indicated. ANOVA with post-hoc Dunnett test or repeated measures ANOVA were used as indicated. In the case of multiple comparisons, for instance over a voltage range, data were initially analyzed using an ANOVA with repeated measures. If this revealed a significant difference, Student's t-tests were applied for post hoc testing with a Bonferroni correction. Z test was used to

compare proportions. The significance level was set at $p < 0.05$ in all statistical analyses.

RESULTS

Tearing, blinking and corneal nerve morphology are altered in guinea pig tear-deficient eyes

Mild conjunctival hyperemia was observed one and four weeks after surgical removal of the exorbital lachrymal gland in all experimental animals. Occasional mild punctate staining but no epithelial defects were detected in the cornea with fluorescein staining at any time point after surgery. At the end of the first post-operative week, we confirmed a significant reduction in tear secretion volume to 30% of the baseline value, and this remained low until the last measurement taken one month after the intervention ($p < 0.001$, repeated measures one way ANOVA: **(Figure 1a)**). Intriguingly, the basal tearing rate in the contralateral eye was also significantly reduced four weeks after surgery ($p = 0.018$, paired t-test), albeit less than in the operated side (**Figure 1b**). Blinking frequency in both eyes was slightly higher than in the controls one week after surgery (2.4 ± 0.6 vs. 1.6 ± 0.3 blinks/min: $p = 0.208$, paired t-test), although this parameter returned to basal values two and four weeks after surgery.

We took advantage of this model to explore whether the chronic tearing deficit and the prolonged ocular surface dryness provoked in these corneas altered the morphology, distribution and density of the sensory afferent nerve fibers stained with a monoclonal antibody against neuronal class III beta-tubulin (TuJ1) [52]. TuJ1-positive nerve fibers were distributed homogeneously throughout the surface of corneas from control, non-operated animals ($n = 3$; **Figure 2a**). Typically, stromal nerve bundles sent perpendicular, ascending branches that traversed the Bowman membrane and divided into several, parallel long sub-basal nerve fibers (leashes) within the basal epithelium cell layer (**Figure 2b**). Branches from these leashes ascended perpendicularly towards the outermost corneal epithelium layers, where they ended as asymmetric clusters of free nerve terminals (**Figure 2c**) [38,52,59]. By contrast, there were significantly fewer peripheral sub-basal leashes throughout the cornea four weeks after removal of the lachrymal gland, these leashes presenting a quite tortuous trajectory that covered shorter distances (**Figure 2d,e**). Moreover, the terminal ramifications of the branches arising from the leashes were less abundant and they had a distinct morphology in these corneas, which had

significantly fewer nerve terminals (**Figure 2f-i**).

Corneal cold sensory nerve fibers exhibit abnormal activity after prolonged eye dryness

Having seen that the dryness produced by removing the lachrymal gland affected nerve architecture in the cornea, we assessed whether the responsiveness of the different functional types of sensory receptors innervating the corneal surface to natural stimuli was also altered. For this purpose, we recorded the impulse activity of single afferent fibers dissected from the ciliary nerves of excised and superfused guinea pig eyes from control and operated animals, one to four weeks after lachrymal gland removal. In the intact cornea, sensory afferents identified as mechanosensory and polymodal nociceptor fiber [9,10,24] presented corneal receptive fields usually extending up to 1 mm into the adjacent sclera and were in most cases silent at rest, both responding to mechanical stimulation and in the case of polymodal nociceptors also to 98.5% CO₂ jets (**Figure 3a**; the functional characteristics of both these types of sensory afferents are summarized in **Table 1**).

One week after lachrymal gland removal, the mechanical thresholds of mechano-nociceptors and polymodal nociceptors remained unaltered. However, more fibers displayed ongoing activity at rest than in control eyes, both among mechano-nociceptor (38% vs 7%; $p < 0.05$, Z-test) and polymodal nociceptor fibers (33% vs 9%; $p < 0.05$, Z-test). Moreover mean ongoing firing frequency of the spontaneously active fibers was significantly higher in mechano-nociceptors (**Table 1**). We also noticed that a fraction of the polymodal fibers in tear-deficient eyes readily developed ongoing activity after applying the initial CO₂ pulse employed to search for chemical sensitivity (**Table 2**), and in some of them spontaneous paroxysmal discharges occasionally occurred. In addition, one week after surgery the mean discharge rate evoked by CO₂ pulses in polymodal nociceptors of tear deficient corneas was larger ($p < 0.05$) and the latency in the onset of this impulse response was shorter ($p < 0.001$). By contrast, the mean discharge rate of the post-discharge following chemical stimulation was only slightly but not significantly increased ($p = 0.113$; **Table 2**). Altogether, these changes seem to reflect the development of a moderate degree of corneal polymodal nociceptor sensitization [9,10,24] in the days following lachrymal gland excision. Four weeks after surgery, the proportion of spontaneously active mechano- and polymodal nociceptor fibers had returned to normal levels (**Table 1**). The only functional difference between both classes of afferents in control corneas and in

corneas exposed for four weeks to reduced tearing was that polymodal nociceptor fibers maintained an augmented firing response to CO₂, which additionally started at a significantly shorter latency (**Figure 3a,b** and **Table 2**).

We also recorded the impulse activity at nerve terminals of cold thermoreceptor fibers, which represent about 10% of all corneal sensory afferents, confirming in intact eyes their regular ongoing impulse activity at 34°C and the marked frequency increase caused by 15°C cooling pulses (**Figure 4a**), characteristic of ocular cold thermoreceptors [14,15,24,59]. Notably, corneal cold endings in eyes deprived of the lachrymal gland developed progressively, in the weeks following surgery an increase in the ongoing firing frequency at the basal temperature of 34°C, as well as comparatively larger responses to cooling pulses (see **Figure 4b**).

The various parameters that define cold receptor activity at these endings were assessed in control corneas and in corneas four weeks after removal of the lachrymal gland, and are summarized in **Table 3**. **Figure 4c** represents the mean firing frequency in response to a cooling ramp in both conditions. As soon as one week after surgery the cooling threshold had already moved to warmer values (**Figure 4d**). Ongoing NTIs frequency at 34°C also raised gradually with prolonged low corneal wetting, becoming significantly higher in comparison with control corneas four weeks afterwards (**Figure 4e**). The same was true for the peak firing frequency evoked by cooling ramps (**Figure 4f**). Moreover, such higher peak frequency values were attained at temperatures of around 29°C, a warmer value in comparison with intact animals (**Table 3**). The differences in excitability and responsiveness between corneal cold nerve terminals of intact and tear-deficient eyes were also evidenced in the interval distribution histograms of cold nerve impulse activity. In corneas with a reduced tearing flow, the intervals between NTIs fired at the temperature at which the peak frequency discharge was attained, were shorter and of more uniform duration than those of control animals, reflecting the higher firing frequency attained during the cooling ramps in tearing-deficient corneas (**Figure 4c,g**).

We further analyzed in control and 4-weeks tear deficient corneas, the changes in cold thermoreceptor impulse activity evoked by an stepwise cooling between 34°C and 22°C in steps of -3°C (**Figure 4h,i**). The static discharge frequency tend to be higher and the peak frequency of the dynamic response smaller for temperature values over 26°C in tear deficient eyes, reflecting that cold thermoreceptors fired at a higher frequency at any static temperature but were less able to encode dynamic temperature reductions (**Figure 4h,i**). Finally, at low static temperatures, the NTIs in the

corneas with impaired moistening were significantly wider and had smaller amplitude (**Figure 5**). The different amplitude and shape of NTIs of cold nerve terminals are due to changes in local generator currents [14,15] being consistent with an alteration in the expression of ion channels involved in the stimulus transduction, and/or the generation of propagated nerve impulses.

Membrane currents of corneal cold TG sensory neurons are disturbed in tear-deficient animals

Transduction of temperature reductions by corneal cold thermoreceptors is mainly mediated by TRPM8 channels [18,54,60]. Thus, we used cultured adult corneal TG neurons retrogradely labeled with FM1-43, and obtained from control guinea pigs (n=14) and from animals in which the lachrymal gland was removed 4 weeks earlier (n=18: **Figure 6a**), to compare changes in somal intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) evoked by both thermal (cold pulses from 35°C to 15°C) and chemical stimuli (capsaicin 1 μ M, cinnamaldehyde 100 μ M, menthol 100 μ M). Putative cold thermosensitive neurons were identified by their positive response to cold and menthol 100 μ M [73] (**Figure 6b, c**, blue traces), while neurons insensitive to cold stimuli but activated by cinnamaldehyde and/or capsaicin, were classified as corneal polymodal nociceptor neurons (**Figure 6d, e**, blue traces).

We did not detect significant differences in the $[Ca^{2+}]_i$ response to 100 μ M menthol or to a cooling ramp between corneal cold-sensitive neurons from control (n=36) and from tear-deficient animals (n=29) (**Figure 6f, g**) or in the amplitude of the I_{cold} current monitored at -60 mV (-80 pA, n=7 vs -114 pA, n=9, medians of control and tear-deficient respectively; p=0.916, Mann-Whitney rank sum test), the $I_{menthol}$ current (-62 pA, n=8 vs -69 pA, n=7; p=0.878, Mann-Whitney test) or the $I_{menthol+cold}$ current (-409 pA, n=7 vs -642 pA, n=6; p=1.0, Mann-Whitney test). Likewise, the $[Ca^{2+}]_i$ response to cinnamaldehyde and capsaicin was of a similar amplitude in putative polymodal neurons from both groups of animals (9 and 15 neurons, respectively, data not shown). Taken together, these data suggest that cold-evoked currents that are largely mediated by TRPM8 channels in corneal thermoreceptor TG neurons [Parra et al., 2010] were not markedly altered by prolonged corneal dryness.

The changes in excitability observed in corneal cold terminals exposed to reduced surface moistening are suggestive of alterations in sodium currents (I_{Na}), similar to those that take place after injury of peripheral sensory nerves [2,68]. To explore this possibility, we recorded the TTX-resistant (TTX-R) and TTX-sensitive (TTX-S) I_{Na} in retrogradely-labeled corneal

TG neurons from intact (n=8) and operated guinea-pigs (n=8) (**Figure 7a**). Based on their positive response to 100 μ M menthol and their insensitivity to 1 μ M capsaicin and 100 μ M AITC, 7 out of 25 neurons from control animals and 7 out of 26 from operated animals were classified as cold-sensitive. Despite the apparently higher current density in neurons of tear-deficient animals, TTX-R current was not significantly different from control guinea-pigs (p=0.16, t-test). However, conductance-voltage relationship for TTX-R I_{Na} activation in neurons of operated eyes appeared to have shifted significantly towards more negative voltages without modification in the slope factor (**Figure 7b, c and Table 4**). Interestingly, TTX-S I_{Na} current amplitude in cold-sensitive corneal neurons was significantly larger at -40 and -30mV in neurons from the operated animals (**Figure 7d**). Mid-point of activation was significantly shifted towards more hyperpolarized voltages in tear-deficient animals (**Figure 7e**), implying that TTX-S I_{Na} were activated at more negative membrane potentials. No significant differences were observed between the slope factors of the activation curves (**Table 4**).

From these data we concluded that the disturbed sodium currents found in the soma of corneal cold neurons of operated animals could be one of the causes of the increased excitability of peripheral terminations in these neurons, in tear-deficient eyes. Indeed, hainantoxin-IV, a neurotoxin that selectively inhibits TTX-sensitive Na^+ channels [76], did reduce at 100 nM the spontaneous and cold-evoked activity of cold nerve terminals from both tear-deficient and control corneas (**Figure 8**), supporting the hypothesis that TTX-sensitive currents are stronger in corneal nerve terminals subjected to chronic dryness, thereby contributing to their enhanced excitability.

Increased Na^+ currents appearing in primary sensory neurons after peripheral injury or inflammation are often accompanied by dampened K^+ currents [1,66]. We examined the calcium-independent K^+ currents in corneal cold sensory neurons from control and tear-deficient animals (n=7 and 8, respectively). Rapidly-inactivating ($K_{A,fast}$) and slowly-inactivating ($K_{A,slow}$) K^+ currents were significantly weaker in corneal cold neurons of tear-deficient eyes than in those of control eyes, and current-voltage relationships were significantly different for both currents (**Figure 9a,b and Table 5**), while the non-inactivating K^+ currents (K_{dr} , delayed rectifier) were similar in both groups (**Figure 9c**). The activation and voltage dependency of the three kinetically-separate current components were not significantly different between the control and tear-deficient eyes. By contrast, a significant difference was observed between corneal cold neurons of control and tear-deficient eyes in terms of the voltage-

dependence of inactivation for $K_{A,fast}$ but not for $K_{A,slow}$ (**Table 5** and **Figure 10**).

Collectively, our electrophysiological analysis of corneal cold neurons from intact and tear-deficient animals revealed that the enhancement of sodium currents was accompanied by an impairment of K^+ currents in dry eye animals, in particular the rapidly and slowly-inactivating K^+ currents while cold-activated current remained essentially unaffected. These disturbances are likely to at least partially underlie the enhanced excitability exhibited by corneal cold sensory fibers in tear-deficient eyes.

We also analyzed the changes in Na^+ and K^+ currents observed in retrogradely labeled corneal TG neurons unresponsive to menthol, but activated by capsaicin and in most cases also by AITC, which were classified as corneal polymodal nociceptor neurons. Four weeks after lachrymal gland removal, TTX-R I_{Na} currents in polymodal nociceptor neurons innervating tear deficient eyes were not significantly different ($p=0.501$; **Fig 11a**, **Table 4**) from those of intact animals. In contrast, a significant increase in TTX-S Na^+ currents ($p<0.001$; two-way ANOVA) was observed in such polymodal neurons, where significantly larger currents were activated at -30 and -20 mV ($n=6$) when compared with those found in intact eyes ($n=8$; **Figure 11b**). Despite a slight leftward shift in the conductance-voltage relationship for TTX-S I_{Na} in neurons of tear deficient eyes, differences did not reach statistical significance; the same was true for the slope factor (**Table 4**). Likewise, rapidly-, slowly- and non-inactivating K^+ currents were similar in operated ($n=15$) and in control animals ($n=12$; data not shown).

Finally, we identified a population of retrogradely labeled corneal TG neurons that did not respond to any of the compounds tested (menthol, AITC or capsaicin) but were depolarized by extracellular K^+ application. By exclusion, we considered these corneal mechano-nociceptor neurons. The characteristics of Na^+ and K^+ currents in this subgroup of neurons from control and from tear-deficient animals were not statistically different (data not shown).

Relationship between activation of corneal cold thermoreceptors and discomfort sensations in healthy subjects and DED patients

Next, we tried to determine whether the unpleasant sensations experienced by humans when the eye surface is insufficiently humidified might be associated to changes in impulse activity of ocular cold thermoreceptors. We thus attempted to increase the impulse activity of cold receptor fibers in the ocular surface of healthy human volunteers and in DED patients, using

relatively specific stimuli for TRPM8 channels, such as menthol, cold saline and air blown onto the eye, assessing in parallel the sensations experienced.

In the first place, we confirmed that, as expected, menthol (50-200 μ M) effectively increased the ongoing and cold-evoked activity of corneal cold terminals and augmented blinking frequency and tearing rate in vigilant intact and operated guinea pigs (**Fig. 12**). As shown in **Figure 12a**, the value of mean NTI peak frequency evoked by a cooling ramp in intact corneas (filled black column) increased significantly after 100 μ M menthol application (hatched black column). In tear deficient corneas, the peak NTI response to a cold pulse ramp was significantly higher than in control animals (filled red column), while in the presence of 100 μ M menthol, peak frequency values evoked by cooling pulses were significantly lower (hatched red bar). As shown in **Figure 12 b**, black columns, basal spontaneous activity of cold nerve terminals (filled column) increased significantly with 100 μ M menthol (hatched column) recovering after a 5 min washing period (grid column). A similar effect but with an initially higher value of background activity was observed in tear-deficient corneas (**Fig. 12b**, red columns). Application of a higher menthol concentration (200 μ M) evoked an initial frequency increase followed by partial inactivation in both intact and tear deficient corneal nerve terminals, as shown in **Figure 12c**. Also, blinking frequency increases induced by 200 μ M menthol were less pronounced in tear-deficient than in control guinea pigs (**Fig. 12d**). We also ascertained that at concentrations up to 200 μ M (50-200 μ M, $n=26$), menthol did not evoke acute firing or the appearance of ongoing activity in polymodal nociceptor fibers of intact or tear deficient guinea pig corneas (data not shown). Finally, we found that topical menthol (100 and 200 μ M) and cold saline (2° C), did not evoke in guinea pigs scratching or wiping movements as those provoked by topical administration of the TRPV1 agonist capsaicin at 100 μ M (data not shown). Previous, preliminary experiments applying to healthy human subjects a 100 μ M menthol solution on both eyes [11] had shown that this compound evoked a sensation of irritation and cooling; Nonetheless, the vehicle (containing 0.001% ethanol in order to dissolve the menthol) already produce mild irritation symptoms. Therefore, in the present experiments, menthol stimulation of cold sensory fibers of the human ocular surface was performed indirectly, through application onto the cheekbone of an ointment that released menthol vapors. The final menthol concentrations attained in the tear fluid, of the conjunctival sac, 4 min after applying ointments containing 1mM and 10mM menthol, were respectively 5 μ M and

39.5 μ M (see **Methods**). The effects of the menthol ointment were studied in healthy volunteers (age: 33.3 \pm 2.3, n=18) and in moderate DED patients (age: 43.6 \pm 3.8, n=9). Blinking rate was determined 3min after menthol application while tear flow was measured 7 min later. Then, an assessment of the psychophysical parameters of the experienced sensations was performed (see **Methods**). The low-concentration (1mM) menthol ointment evoked weak conscious sensations of cold and no significant unpleasantness or changes in tearing rate in healthy volunteers, although their blinking rate rose significantly (**Fig. 13a**). By contrast, the high-concentration (10mM) menthol ointment significantly increased the blinking rate and the perception of discomfort and coolness measured with a V.A.S. scale, reflecting the unpleasant nature of the sensation. No significant changes in tearing rate were observed with any of these concentrations. A similar yet less pronounced response was obtained after exposing the eyes of healthy subjects and DED patients to a room temperature air current (**Fig. 14**). Noteworthy, in the group of DED patients, the basal blinking rate at rest was significantly higher than in healthy subjects ($p=0.002$, t-test) and was augmented by menthol. The most striking observation of menthol ointment application in DED patients at both concentrations was that unpleasantness, which under basal conditions was rated higher than in healthy individuals, decreased. The sensation evoked by menthol in healthy subjects and DED patients also included a component of coolness (**Fig. 13a,b**). Finally, the higher background discomfort in DED patients was not further increased by exposure to an air current (**Fig. 14**).

DISCUSSION

Together, our study proves that sustained increases of ocular cold thermoreceptor impulse activity mediated by enhanced Na⁺ currents combined with diminished K⁺ currents, is the most prominent alteration of peripheral sensory input during prolonged, experimental reduction of eye surface moistness. Changes in the responsiveness and membrane currents of polymodal nociceptor neurons, the presumed source of pain sensations in all body tissues [56] appear to be comparatively less pronounced. We also found that selective stimulation of corneal cold sensory fibers in healthy humans evokes distinct sensations of eye discomfort, reinforcing the suggestion that the population of cold thermoreceptors plays an important role in signaling potentially injurious desiccation of the ocular surface [8]. In mammals, low-threshold cold thermoreceptors have been hitherto considered specific sensors of environmental temperature reductions [33].

However, our recent evidence has shown that moderate elevations of tear osmolality, as those occurring during eye surface evaporation act directly on TRPM8 channels and increase corneal cold thermoreceptor activity [58,62]. Hence, we now propose that in addition to the canonical role of signalling body surface temperature decreases attributed to cold thermoreceptors, this seem to provide also information about the moistness level of the eye surface and possibly of other exposed body mucosae, reminiscent of thermosensitive 'hygroreceptors' of the sensory antennae of insects [69], eventually evoking conscious sensations and compensatory changes in tearing and blinking rate.

We noticed that after a long-lasting, experimental tearing reduction, the axonal arborizations in the uppermost layers of the guinea pig corneal epithelium, which are subjected to continuous regeneration and remodeling [32] appeared morphologically altered. Anatomical abnormalities have been also reported in the sub-basal corneal nerves of DED patients [12], possibly reflecting nerve injury secondary to the chronic physical trauma exerted on ocular surface epithelial cells and the local inflammatory reaction evoked by prolonged surface dryness [22,24]. Altered sodium and potassium currents are characteristic of peripheral sensory nerve damage [21,23]. Our data suggest that injury-induced disturbances in these currents rather than in cold-transducing TRPM8 current are behind the enhanced responsiveness to low temperatures of cold sensory nerve terminals gradually developing in tear-deficient corneas [41,42]. Such excitability disturbances were largely restricted to cold neurons, and have similitudes with those produced for instance by the neurotoxic chemotherapy agent oxaliplatin, which causes peripheral damage of cutaneous nerve terminals and cold allodynia; oxaliplatin impairs the expression of channels that modulate cold thermoreceptor neuronal activity, enhancing TTX-sensitive, resurgent and persistent Na⁺ currents evoked by cooling, while the expression of TRPM8 was unaffected [19,65]. In corneal cold thermoreceptor neurons ocular dryness increased TTX-sensitive Na⁺ currents while decreasing rapidly- and slowly-inactivating K⁺ currents. Altogether, these effects are likely to move the firing threshold towards higher temperatures, enhancing thermoreceptor impulse activity. In contrast, nociceptors appear less altered and only TTX-sensitive Na⁺ currents in corneal polymodal nociceptor neurons appeared augmented, while TTX-resistant and K⁺ currents were not significantly changed. This is in agreement with the weak sensitization found in mechano- and polymodal nociceptor fibers of tear-deficient guinea pig eyes. It is doubtful that inflammatory mediators responsible of such sensitization also contribute to the hyper-excitability displayed by cold

thermoreceptors; inflammatory substances actually reduce basal and stimulus-evoked firing of corneal cold thermoreceptors through direct inhibition of TRPM8 channels [4,78].

Menthol evoked conscious eye discomfort sensations and augmented blinking in healthy human subjects. This gives further support to the hypothesis that a heightened sensory input from eye surface cold thermoreceptors to the brain importantly contributes to the sustained unpleasant sensations and blinking and tearing rate adjustments occurring during eye dryness [59,62]. Menthol effects on cold thermoreceptors are mediated through the opening of TRPM8 channels [44,54,60,61]. However, this drug is very promiscuous and acts also as an inhibitor of TRPA1, a transduction channel expressed by polymodal nociceptor neurons exhibiting sensitivity to intense cold [50,75,77]. Thus, the possibility that menthol affects other channels in polymodal fibers cannot be completely excluded. However, human TRPA1 is insensitive to the inhibitory effects of menthol [75]. Moreover, we confirmed that at the concentrations reached in our human experiments, menthol did not act in guinea pig corneal polymodal nociceptor fibers. This reinforces the conclusion that unpleasant sensations evoked by menthol applied to the healthy human ocular surface, are mediated predominantly, and perhaps exclusively through a concentration-dependent activation of TRPM8-expressing eye surface cold thermoreceptor fibers. In intact guinea pig cornea, menthol at low concentrations (<200 μ M) strongly activates cold thermoreceptor fibers while higher concentrations depress such activity after an initial, transient excitatory period [42,59]. A previous study in healthy human eyes reported that 1mM menthol caused an immediate and transient feeling of cooling and mild irritation, followed by long lasting, selective suppression of corneal sensitivity to cold [3].

Trigeminal neurons with the phenotype of specific cold thermoreceptors exhibit an ample range of thermal and menthol thresholds [51,71]. Such threshold differences are due to a variable expression of TRPM8 and of cold-sensitive Kv1 channels whose I_{K_D} current opposes cold-induced depolarization [31,40,51,73]. In our experiments in humans using an ointment containing 1mM menthol, a low concentration of the drug was detected in the tear film suggesting that under these conditions, only the fraction of lowest threshold cold thermoreceptors was activated. Noteworthy, this caused a significant increase of basal blinking rate, which depends on TRPM8-expressing cold thermoreceptor fibers [62] but did not produce an augmented tearing and only weak conscious sensations, with a predominant thermal component. Notably, a higher menthol concentration

in the ointment, that expectedly recruits a larger number of cold thermoreceptor fibers, evoked a sensation containing a distinct discomfort component. We cannot exclude the possibility that such unpleasantness appears when the subpopulation of polymodal nociceptors expressing TRPA1 and connected centrally with pain-labelled lines is recruited [16,46,49,77], although most canonical polymodal nociceptor fibers of the cornea appear to be insensitive to intense cold [10]. However, in the skin, a fraction of sensory fibers exhibiting sensitivity to menthol and cold, combined with responsiveness to capsaicin and/or AITC have been identified [39]. Likewise, a small number of TRPM8-expressing thermoreceptor fibers, with no spontaneous activity at background corneal temperatures, responding to menthol and intense cooling have been recently described in the mouse cornea [37]. Whether these belong to the group of highest threshold cold thermoreceptors [71] or to the subset of TRPM8-expressing polymodal nociceptors found in the skin [57] cannot be yet answered.

Notably, in patients suffering moderate DED, menthol attenuated the subjective indicators of unpleasantness that were already present under basal conditions, in contrast to healthy individuals. Likewise, topical application of menthol to the healthy skin of neuropathic patients evoked cold allodynia while in a mirror neuropathic skin area, menthol attenuated the pre-existing cold allodynia [74]. Recent evidence in the rat has shown that menthol concentrations over 0.5mM are required in intact eyes to evoke long-lasting inhibition of corneal cold thermoreceptor activity whereas in tear-deficient animals inhibition was already obtained with values under 100 μ M [42]. Hence, alleviation of basal unpleasant dryness sensations experienced by DED patients with menthol concentrations causing discomfort in healthy eyes can be attributed at least in part, to an attenuation of the augmented cold thermoreceptor ongoing firing expectedly present in human chronic tear-deficient corneas. This inhibition could be the consequence of a use-dependent depression of sodium channel activity in cold thermoreceptor fibers, reportedly caused by menthol [26].

Altogether, the present data suggest that under comfortable environmental conditions, background activity in low-threshold cold thermoreceptors, the only afferent tonic input produced by corneal nerves, helps to maintain basal tearing [59] automatic blinking [62], yet it is probably too weak to evoke conscious sensations of cooling or dryness. This background sensory input builds up critically with ocular surface temperatures decreases, as those occurring under exposure to extreme low temperatures, cold air or evaporation in very dry environments. Augmented firing and recruitment of

higher threshold cold thermoreceptors would evoke an unpleasant and qualitatively distinct sensation, consciously defined as unpleasant, irritating dryness [6]. Conceivably, a similar response is already triggered by less drastic cooling when the tear film is too thin or abnormal, as occurs in aqueous deficient and evaporative DED patients. There, ongoing cold thermoreceptor activity is expected to be high and further potentiated by the rise in tear fluid osmolality that accompanies enhanced evaporation [13,36,47,59]. Damage to corneal nerve terminals due to long-term reduction of ocular surface moistness, as observed in guinea pig dry eye corneas, possibly confers neuropathic characteristics to the augmented activity of cold thermoreceptors, thereby perpetuating the initial sensations of discomfort [20,64]. Recruitment of nociceptors by ocular surface injury and inflammation [7] possibly aggravates the unpleasant and distressing nature of the final sensation experienced by DED patients.

In summary, cold thermoreceptors could be envisaged as the afferent branch of a specific alerting sensory circuit to maintain the equilibrium of ocular surface moistness, despite environmental oscillations in temperature and humidity. Such a mechanism would work in parallel with the conventional nocifensive system evoking pain and aimed to protect the eye from external injury, whose peripheral component corresponds to the canonical nociceptive afferents. Accordingly, dysfunction of the neural mechanisms regulating wetness would be at least partly, behind the characteristic unpleasant dryness sensations reported by DED patients, the most significant and disturbing symptom of this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS AND CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors wish to thank Manuel Bayonas and Ana Miralles for their skillful technical assistance, Enoch Luis and Javier Belmonte for their help with calcium imaging analysis and human experiments, respectively, and Héctor González for measuring menthol concentration in tears.

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, projects SAF2014-54518-C3-1-R (JG and MCA) and SAF2011-22500 (JG), and in part by SAF2014-54518-C3-2-R and BFU2008-04425 (CB), BFU2012-36845 and RETICS RD12/0034/0010 (NC), FIS PI11/01601, FIS PI14/00141, 2014SGR1165 and RD12/0034/0003 (XG), Fundación M^a Cristina Masaveu Peterson and PI FIS 110288 (JM-LI and CB), and by the Hungarian Scientific Research Fund - European FP7 Marie Curie Mobility grant Human-MB08A 80372 and OTKA NN106649 (IK).

Commercial relationship: Carlos Belmonte and Juana Gallar are authors of a patent (ES2377785, US2013245231) that could be affected indirectly by this publication. All other authors declare no competing financial interests. All the other authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

[1] Abdulla FA, Smith PA. Axotomy- and autotomy-induced changes in Ca²⁺ and K⁺ channel currents of rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol* 2001;85:644-58.

[2] Abdulla FA, Smith PA. Changes in Na⁽⁺⁾ channel currents of rat dorsal root ganglion neurons following axotomy and axotomy-induced autotomy. *J. Neurophysiol* 2002;88:2518-29.

[3] Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Sensory experiences in humans and single unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J. Physiol* 2001;534:511-25.

[4] Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Changes in impulse activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain* 2013;154:2353-62.

[5] Acosta MC, Luna C, Quirce S, Belmonte C, Gallar J. Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:3403-12.

[6] Begley C, Simpson T, Liu H, Wu Z, Bradley A, Situ P. Quantitative Analysis of Tear Film Fluorescence and Discomfort During Tear Film Instability and Thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:2645-53.

[7] Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J, Gallar J. What Causes Eye Pain? *Curr Ophthalmol Rep* 2015;3:111-21.

[8] Belmonte C, Gallar J. Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3888-92.

[9] Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I. Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J Physiol* 1991;437:709-25.

[10] Belmonte C, Giraldez F. Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol.* 1981;321:355-68.

[11] Belmonte J, Alfaro S, Berenguer TB, Costa JM, Cuquerella V, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Effects of the TRPM8 Agonist Menthol on Corneal Sensitivity and Tear Secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:E-Abstract 3405.

[12] Benítez-Del-Castillo JM, Acosta MC, Wassfi MA, Díaz-Valle D, Gegúndez JA, Fernández C, García-Sánchez J. Relation between corneal innervation with confocal microscopy and corneal sensitivity with noncontact esthesiometry in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:173-81.

[13] Benjamin WJ, Hill RM. Human tears: Osmotic characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1624-26.

[14] Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C. Tetrodotoxin-resistant impulses in single nerve terminals signalling pain. *J. Physiol* 1998;512:211-17.

[15] Brock JA, Pianova S, Belmonte C. Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *J Physiol* 2001;533:493-501.

[16] Campero M, Baumann TK, Bostock H, Ochoa JL. Human cutaneous C fibres activated by cooling, heating and menthol. *J Physiol* 2009;587:5633-52.

[17] Dartt DA. Neural regulation of lachrymal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res* 2009;28:155-77.

[18] De la Peña E, Mälkiä A, Cabedo H, Belmonte C, Viana F. The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *J Physiol* 2005;567:415-26.

[19] 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, Bourinet E. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med* 2011;3:266-78.

[20] Devor M. Neuropathic pain: Pathophysiological response of nerves to injury. McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, eds. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013. pp. 861-88.

[21] Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci* 2010;33:325-47.

[22] Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862-73.

- [23] Everill B, Kocsis JD. Reduction in potassium currents in identified cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons after axotomy. *J Neurophysiol* 1999;82:700-8.
- [24] Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP, Belmonte C. Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol* 1993;468:609-22.
- [25] García-Catalán MR, Jerez-Olivera E, Benítez-Del-Castillo-Sánchez JM (2009) Dry eye and quality of life. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2009;84:451-8.
- [26] Gaudio C, Hao J, Martin-Eauclaire MF, Gabriac M, Delmas P. Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels. *Pain* 2012;153:473-84.
- [27] Gilbard JP, Carter JB, Sang DN, Refojo MF, Hanninen LA, Kenyon KR. Morphologic effect of hyperosmolarity on rabbit corneal epithelium. *Ophthalmology* 1984;91:1205-12.
- [28] Gold MS, Shuster MJ, Levine JD. Characterization of six voltage-gated K⁺ currents in adult rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 1996;75:2629-46.
- [29] Gold MS, Weinreich D, Kim CS, Wang R, Treanor J, Porreca F, Lai J. Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci* 2003;23:158-66.
- [30] Gold MS, Zang L, Wrigley DL, Traub RJ. Prostaglandin E2 modulates TTX-R INa in rat colonic sensory neurons. *J Neurophysiol* 2002;88:1512-22.
- [31] Green BG, Akirav C. Threshold and rate sensitivity of low-threshold thermal nociception. *Eur J Neurosci* 2010;31:1637-45.
- [32] Harris LW, Purves D. Rapid remodeling of sensory endings in the corneas of living mice. *J Neurosci* 1989;9:2210-4.
- [33] Hensel H, Andres KH, von Düring M. Structure and function of cold receptor. *Pflügers Arch* 1974;352:1-10.
- [34] Hirata H, Fried N, Oshinsky ML. Quantitative characterization reveals three types of dry-sensitive corneal afferents: pattern of discharge, receptive field, and thermal and chemical sensitivity. *J Neurophysiol* 2012;108:2481-93.
- [35] Hirata H, Meng ID. Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: implications for dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:3969-76.
- [36] Hirata H, Rosenblatt MI. Hyperosmolar tears enhance cooling sensitivity of the corneal nerves in rats: possible neural basis for cold-induced dry eye pain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:5821-33.
- [37] Íñigo-Portugués A, Alcalde I, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J, Merayo-Lloves J, Belmonte C. Effects of aging on neurochemical properties of mouse corneal cold sensory neurons, changes in morphology in their afferent projections and implications in basal tear secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:E-Abstract 0290.
- [38] Ivanusic JJ, Wood RJ, Brock JA. Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *J Comp Neurol* 2013;521:877-93.
- [39] Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 2010;150:340-50.
- [40] Knowlton WM, Palkar R, Lippoldt EK, McCoy DD, Baluch F, Chen J, McKemy DD. A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J Neurosci* 2013;33:2837-48.
- [41] Kovacs I, Quirce S, Luna C, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Increased responsiveness of corneal cold receptors in an experimental model of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:E-Abstract 3403.
- [42] Kurose M, Meng ID. Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *J Neurophysiol* 2013;110:495-504.
- [43] Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol* 2009;147:198-205.
- [44] Latorre R, Brauchi S, Madrid R, Orío P. A cool channel in cold transduction. *Physiology (Bethesda)* 2011;26:273-85.
- [45] Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, Benítez Del Castillo JM, Geffen D, Tauber J, Foulks GN, Pepose JS, Sullivan BD. Tear osmolality in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol* 2011;151:792-8.
- [46] Lippoldt EK, Elmes RR, McCoy DD, Knowlton WM, McKemy DD. Artemin, a glial cell line-derived neurotrophic factor family member, induces TRPM8-dependent cold pain. *J Neurosci* 2013;33:12543-52.
- [47] Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, Nelson JD, Simpson T. A link between tear instability and hyperosmolality in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3671-9.
- [48] Luther JA, Birren SJ. Nerve growth factor decreases potassium currents and alters repetitive firing in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 2006;96:946-58.
- [49] Ma Q. Labeled lines meet and talk: population coding of somatic sensations. *J Clin Invest* 2010;120:3774-8.
- [50] Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 2006;32:335-43.
- [51] Madrid R, de la Peña E, Donovan-Rodriguez T, Belmonte C, Viana F. Variable threshold of cold-sensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J Neurosci* 2009;29:3120-31.
- [52] Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res* 2010;90:478-92.
- [53] McFarlane S, Cooper E. Kinetics and voltage dependence of A-type currents on neonatal rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 1991;66:1380-91.
- [54] McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002;416:52-8.
- [55] Mengher LS, Pandher KS, Bron AJ. Non-invasive tear film break-up time: sensitivity and specificity. *Acta Ophthalmol (Copenh.)* 1986;64:441-4.
- [56] Olausson B. Recordings of polymodal single c-fiber nociceptive afferents following mechanical and argon-laser heat stimulation of human skin. *Exp Brain Res* 1998;122:44-54.
- [57] Palkar R, Lippoldt EK, McKemy DD. The molecular and cellular basis of thermosensation in mammals. *Curr Opin Neurobiol* 2015;34C:14-9.
- [58] Parra A, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J, Belmonte C. Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain* 2014;155:1481-91.
- [59] Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 2010;16:1396-9.
- [60] Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002;108:705-15.
- [61] Pertusa M, Madrid R, Morenilla-Palao C, Belmonte C, Viana F. N-glycosylation of TRPM8 ion channels modulates temperature sensitivity of cold thermoreceptor neurons. *J Biol Chem* 2012;287:18218-29.
- [62] Quallo T, Vastani N, Horridge E, Gentry C, Parra A, Moss S, Viana F, Belmonte C, Andersson D, Bevan S. TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat Commun* 2015;6:7150.
- [63] Report of the International Dry eye Workshop (DEWS). *Ocul Surf* 2007;5:65-204.

- [64] Rosenthal P, Borsook D. The corneal pain system. Part I: the missing piece of the dry eye puzzle. *Ocul Surf* 2012;10:2-14.
- [65] Sittl R, Lampert A, Huth T, Schuy ET, Link AS, Fleckenstein J, Alzheimer C, Grafe P, Carr RW. Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:6704-9.
- [66] Stewart T, Beyak MJ, Vanner SJ. Ileititis modulates potassium and sodium currents in guinea pig dorsal root ganglia sensory neurons. *J Physiol* 2003;552:797-807.
- [67] Tan JH, Ng EY, Acharya UR. Evaluation of tear evaporation from ocular surface by functional infrared thermography. *Med. Phys.* 2010;37:6022-34.
- [68] Tan ZY, Donnelly DF, LaMotte RH. Effects of a chronic compression of the dorsal root ganglion on voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents in cutaneous afferent neurons. *J Neurophysiol* 2006;95:1115-23.
- [69] Tichy H. Humidity-dependent cold cells on the antenna of the stick insect. *J Neurophysiol* 2007;97:3851-8.
- [70] Trost K, Skalicky M, Nell B. Schirmer tear test, phenol red thread tear test, eye blink frequency and corneal sensitivity in the guinea pig. *Vet Ophthalmol* 2007;10:143-6.
- [71] Thut PD, Wrigley D, Gold MS. Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience* 2003;119:1071-83.
- [72] Veiga Moreira TH, Gover TD, Weinreich D. Electrophysiological properties and chemosensitivity of acutely dissociated trigeminal somata innervating the cornea. *Neuroscience* 2007;148:766-74.
- [73] Viana F, de la Peña E, Belmonte C. Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 2002;5:254-60.
- [74] Wasner G, Naleschinski D, Binder A, Schattschneider J, McLachlan EM, Baron R. The effect of menthol on cold allodynia in patients with neuropathic pain. *Pain Med* 2008;9:354-8.
- [75] Xiao B, Dubin AE, Bursulaya B, Viswanath V, Jegla TJ, Patapoutian A. Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J Neurosci* 2008;28:9640-51.
- [76] Xiao Y, Liang S. Inhibition of neuronal tetrodotoxin-sensitive Na⁺ channels by two spider toxins: hainantoxin-III and hainantoxin-IV. *Eur J Pharmacol* 2003;477:1-7.
- [77] Yin K, Zimmermann K, Vetter I, Lewis RJ. Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways. *Biochem Pharmacol* 2015;93:125-40.
- [78] Zhang X, Mak S, Li L, Parra A, Denlinger B, Belmonte C, McNaughton PA. Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by Gaq. *Nat Cell Biol* 2012;14:851

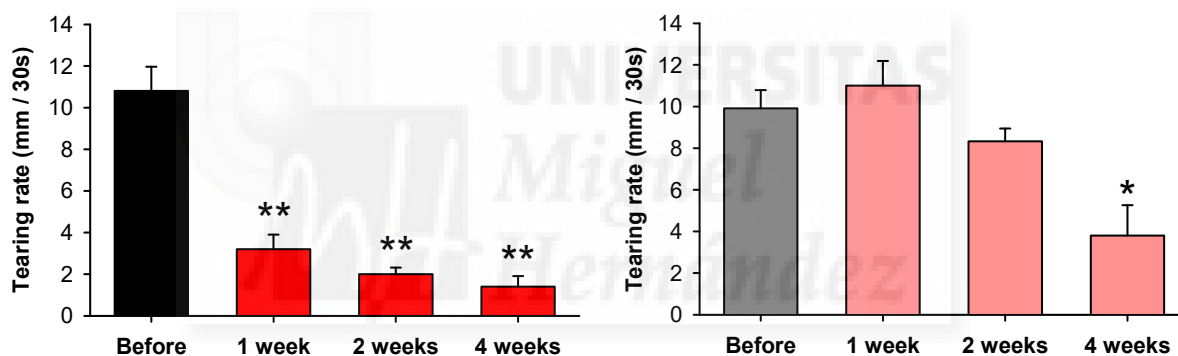


Figure 1. Tearing rate determined at different time points (1 to 4 weeks) after unilateral removal of the main lacrimal gland in the guinea pig. Basal tearing rate expressed as the mean wetted length (in mm) of the phenol red thread placed in the lower lid for 30 s was measured in the same animals (n=5) before and at different time points after surgery, (A) in the operated side and (B) in the contralateral eye. **p<0.001, One Way Repeated Measures ANOVA with post-hoc Dunnett's test. *p<0.05, paired t-test, difference from tearing rate before surgery.

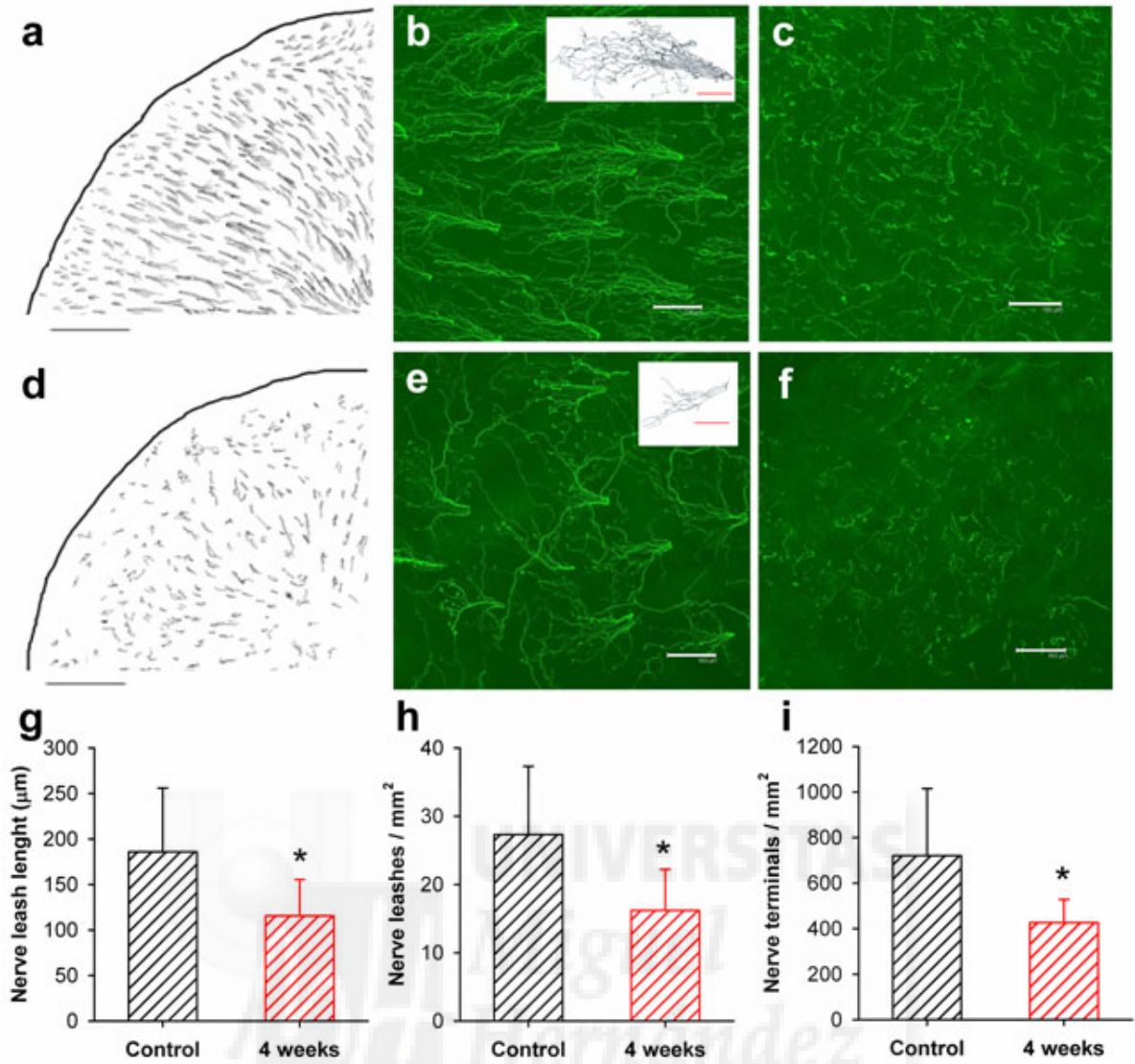


Figure 2. Morphological changes of corneal nerves at four weeks after removal of the main lachrymal gland (tear deficient corneas). (a) *Camera lucida* drawing of the subbasal plexus from a quadrant of a control cornea. (b) Tuj-1 positive subbasal nerves (leashes) in a control cornea. Inset: drawing of a subbasal nerve ramification (leash). (c) Epithelial nerve endings in a control cornea labeled with Tuj-1. (d) *Camera lucida* drawing of subbasal plexus from a quadrant of a tear deficient cornea. (e) Tuj-1 positive subbasal nerves in a tear deficient cornea. Inset: drawing of a subbasal nerve ramification. (f) Tuj-1 positive epithelial nerve endings in a tear deficient cornea. (g) Average length of subbasal nerve leashes in control and tear deficient corneas. (h) Average density of corneal subbasal nerve leashes per mm² in control and tear deficient corneas. (i) Average density of nerve terminals per mm² in control and tear deficient corneas. Data shown in **g-i** are mean ± s.e.m. of data from 4 control and 8 tear deficient animals; *p<0.05, t-test. Scale bars: **a, d** = 1000 μm; **b, c, e, f** = 100 μm; inset = 40 μm.

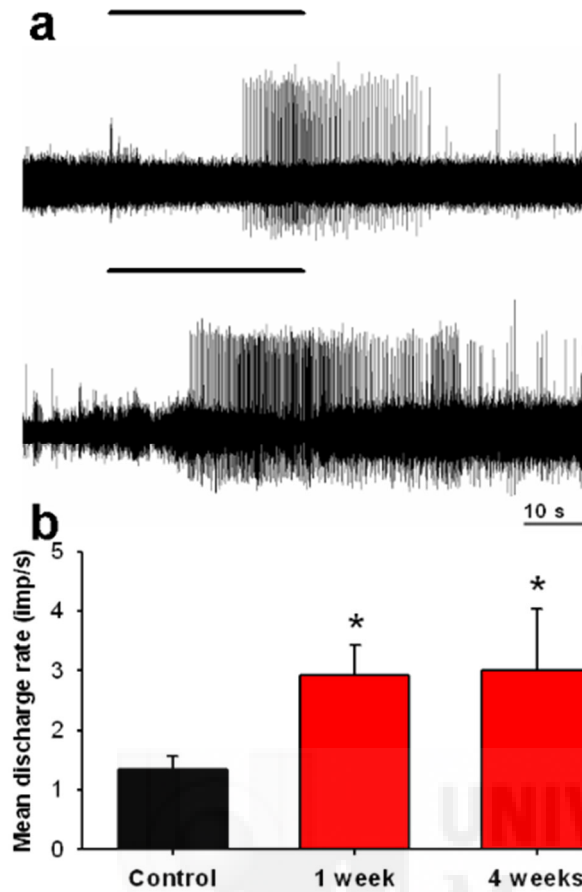


Figure 3. Chemical sensitivity of polymodal nociceptor nerve fibers recorded from control and tear deficient corneas 4 week after lachrymal gland removal. (a) Sample recording of the response of corneal polymodal nociceptor fibers to chemical stimulation of the receptive field with a 30s-duration CO₂ pulse in control (upper trace) and tear deficient corneas (lower trace). The bars indicate the duration of the stimulus. Notice that the impulse discharge evoked by CO₂ over passed in both cases the duration of the stimulus (postdischarge). (b) Mean discharge rate of polymodal nociceptor fibers during the CO₂ pulse in control (n=18) and tear deficient corneas (1 week, n=25; 4 weeks, n=8). Data are mean ± s.e.m.; p<0.001, One Way ANOVA with Dunnett's test (*p<0.05).

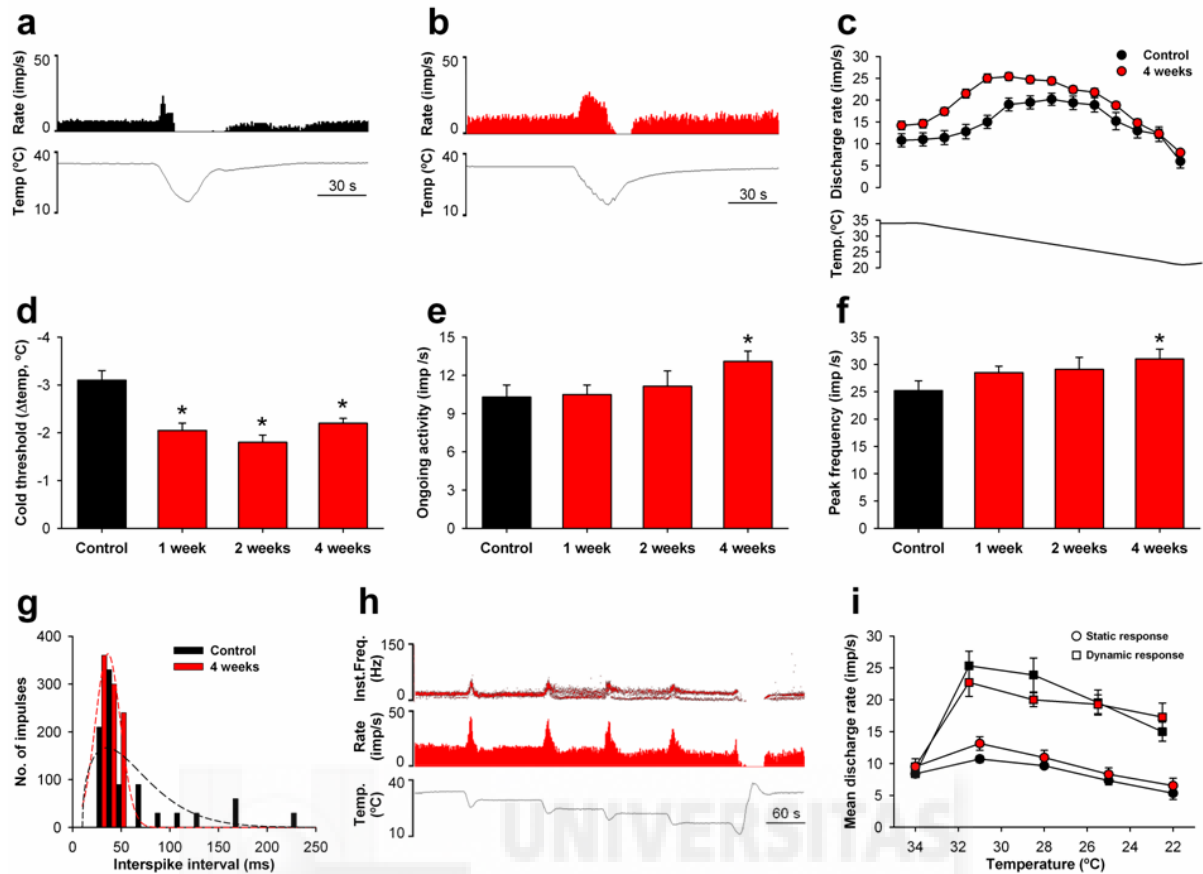


Figure 4. Responses to cooling of cold-sensitive nerve terminals in control and tear deficient animals.

(a) Sample recording of a single cold-sensitive nerve terminal recorded from a control cornea. Upper channel: Nerve terminal impulse (NTI) firing rate (impulses/s); lower channel: temperature values ($^{\circ}\text{C}$) of the perfusion solution along the record. (b) Sample recording of a single cold sensitive nerve terminal from a tear deficient cornea, at 4 weeks after lachrymal gland removal. (c) Response of cold nerve terminals from control ($n=45$) and tear deficient corneas ($n=57$) to a cooling ramp from 34°C to 21°C . Data are mean \pm s.e.m of the mean discharge rate at the corresponding temperatures of the ramp. Repeated measures ANOVA, $p<0.005$; post hoc comparison using t-test with Bonferroni corrections; $**p<0.001$, $*p<0.05$. (d-f) Change in the response characteristics to a cooling ramp, of cold nerve terminals in control and tear deficient corneas at different time points after surgery (control, $n=45$; 1 week $n=93$; 2 weeks, $n=18$ and 4 weeks, $n=57$). (d) Cooling threshold (temperature decrease in $^{\circ}\text{C}$ that evokes a 25% increase in the firing frequency). (e) Ongoing NTI activity (mean discharge rate in impulses/s) at 34°C . (f) Peak frequency (maximal response to cold in impulses/s obtained during a cooling ramp). $*p<0.05$ One Way ANOVA with Dunnet's test. (g) Histogram showing the interval distribution of NTIs of cold nerve terminals from control and 4-weeks tear deficient eyes ($n=30$ in each group) during the maximal response to cold. The corresponding normal-fit curves are projected on histograms (dashed lines). Shorter interspike intervals were observed in tear deficient nerve terminals. (h) Sample recording of a single cold sensitive nerve terminal in a tear deficient cornea (4 weeks after surgery) during stepwise cooling. Upper channel: Instantaneous frequency (Hz); middle channel: firing rate (impulses/s); lowest channel: temperature values ($^{\circ}\text{C}$) of the perfusion solution along the record. (i) Mean NTI firing frequency (impulses/s) of cold nerve terminals of control ($n=10$) a tear-deficient corneas ($n=10$) during stepwise cooling. In control corneas, the firing rate during the dynamic component of the NTI response (black squares) was significantly higher than during the static component of the NTI response (black circles, $p<0.05$) while in tear deficient corneas these differences were not significant ($p=0.125$). All the data are mean \pm s.e.m.

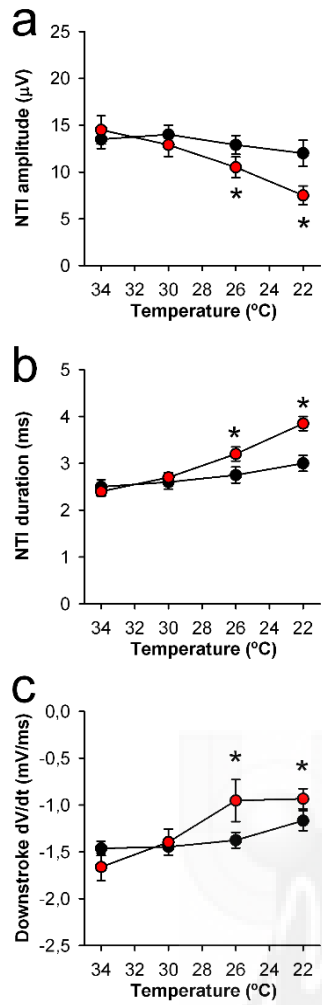


Figure 5. Changes in NTI shape in cold nerve terminals of control and tear deficient corneas.

Parameters of 15-20 successive NTIs were measured in the same population of cold nerve terminals at four static temperatures in control (n=10, black symbols) and in tear deficient animals (n=10, red symbols). (a) Mean amplitude. (b) Mean impulse duration. (c) Mean dV/dt measured during the downstroke phase of the nerve impulses. Data are mean \pm s.e.m.; *p<0.05, t-test, difference from values at 34°C.



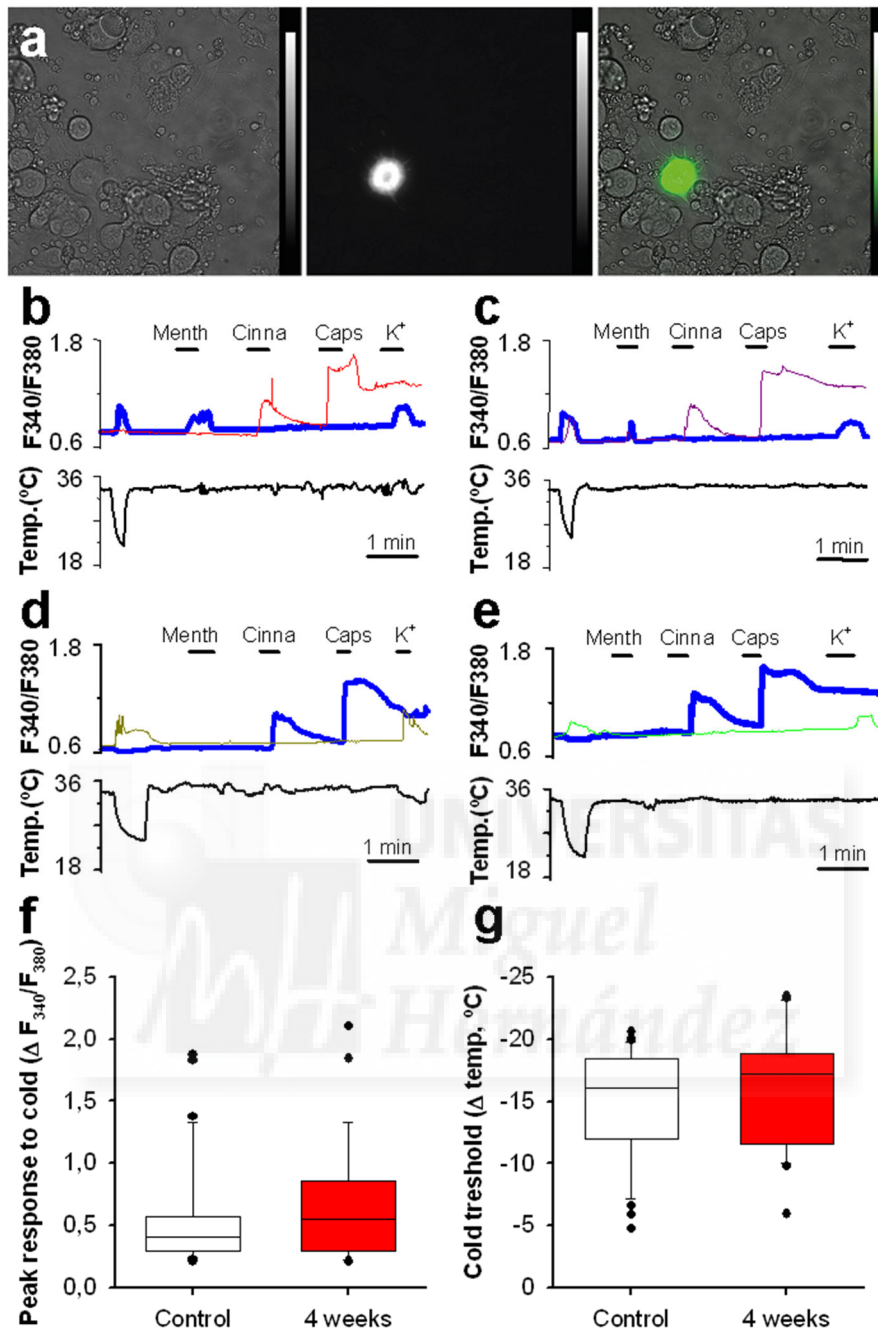


Figure 6. Intracellular calcium responses of trigeminal sensory neurons innervating the cornea of control and 4-weeks tear deficient guinea pigs.

(a) TG neurons innervating the cornea were retrogradely labeled with FM® 1-43 applied on the corneal surface 6 days earlier and identified with fluorescence microscopy. Only one or two corneal neurons were found per culture plate. Photographs show (from left to right) bright field, FM® 1-43 fluorescence when excited with 470 nm light, and merged images. (b-e) Ratiometric fluorescence changes (expressed as the ratio of fluorescence of Fura-2 when excited at 340 and 380 nm, F_{340}/F_{380}) recorded simultaneously in the same culture plate from several fresh cultured TG sensory neurons from control (b, d) and tear deficient (c, e) animals, in response to a cooling ramp and to the addition to the bath solution of 100 μ M menthol, 100 μ M cinnamaldehyde, 1 μ M capsaicin and 30 mM K^+ ; the bath temperature was simultaneously recorded (lower channels). The blue lines correspond to recordings from TG neurons innervating the cornea. Neurons responding to cooling and menthol were classified as cold thermosensitive neurons (b, c); neurons not responding to cooling stimulus but responding to capsaicin and cinnamaldehyde were classified as putative polymodal nociceptive neurons (d, e). (f) Box plots showing $[Ca^{2+}]_i$ peak response to cooling ramps (peak value of the F_{340}/F_{380} ratio during the ramp) in cold sensitive corneal neurons of control (n=36; median=0.40, range=0.21-1.87) and tear deficient animals (29; median=0.55, range= 0.21-2.10). Horizontal line, median; bar, 25th and 75th interquartile range; whiskers, 10th and 90th percentiles. (g) Box plots showing $[Ca^{2+}]_i$ threshold response to cooling ramps (temperature decrease required to evoke the $[Ca^{2+}]_i$ response) in the same population of corneal neurons of control (n=36; median = -16.06, range = -4.79 to -20.59) and tear deficient animals (n=29; median = -17.23, range = -5.94 to -23.46).

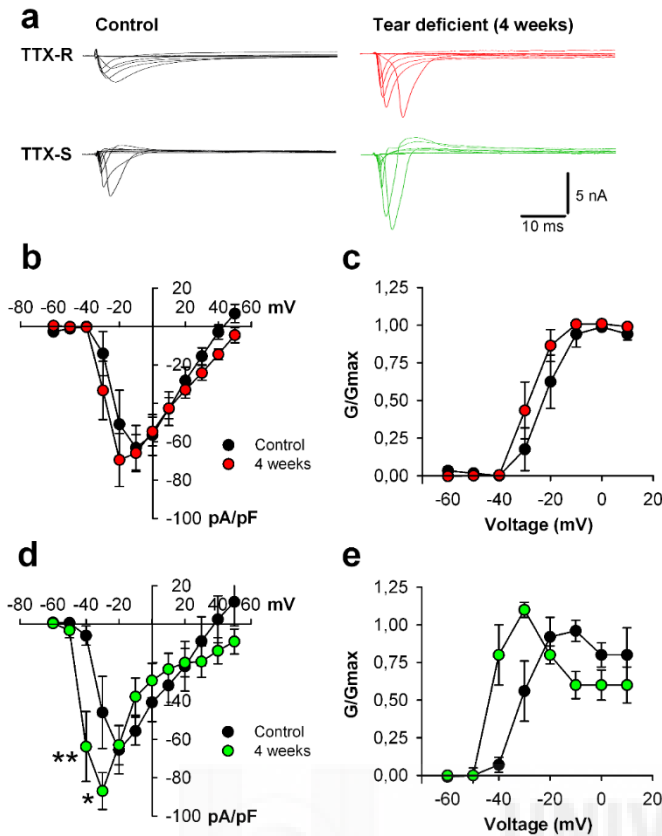


Figure 7. Voltage-gated Na⁺ currents in trigeminal corneal cold sensory neurons of control and tear deficient guinea pigs at 4 weeks after lachrymal gland removal.

Corneal neurons were retrogradely labeled with FM 1-43 applied on the cornea 6 days earlier. (a) For each neuron, membrane potential was held at -80 mV; whole cell sodium currents were evoked after a 500 ms prepulse to either -120 or -40 mV with a 100 ms step to potentials between -60 and +50 mV in 10 mV increments; current evoked from -40 mV was considered to be TTX-R current, whereas the difference between the current evoked from -120 and -40 mV was considered to be TTX-S; for clarity, only traces from -60 to +20 mV are shown. (b-c) Mean voltage-current relationships and mean relative peak conductance normalized to the maximal conductance (G/G_{max}) and plotted against voltage of TTX-R sodium currents. (d-e) Mean voltage-current relationships and mean relative peak conductance normalized to the maximal conductance (G/G_{max}) and plotted against voltage of TTX-S sodium currents. Data are mean ± s.e.m. **p<0.01; *p<0.05, t-test.

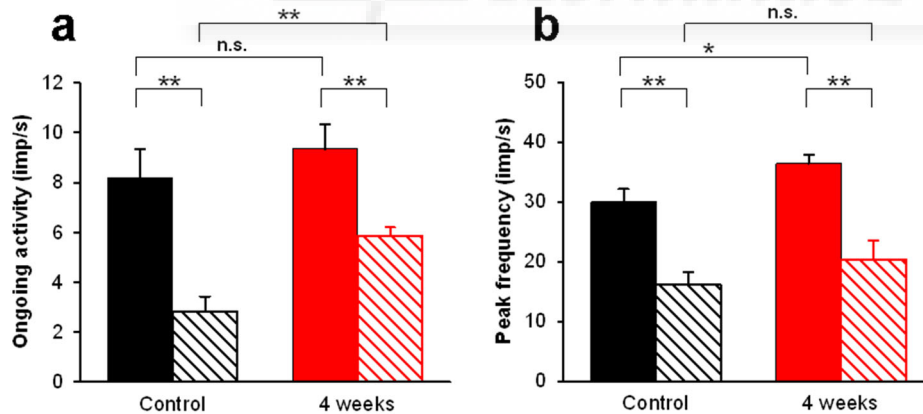


Figure 8. Effect of 100 nM hainantoxin-IV on the spontaneous and cold-evoked activity of corneal cold nerve terminals in control and tear deficient corneas.

(a) Effect of hainantoxin on the ongoing NTI activity of cold nerve terminals at basal temperature in control and tear deficient corneas. (b) Effect of hainantoxin on the peak frequency of the discharge evoked by a cooling ramp in cold nerve terminals of control and tear deficient corneas. Data are mean ± s.e.m, n = 6 in control and 4 in tear-deficient corneas; *p<0.05, **p<0.001, paired or unpaired t-test, as needed.

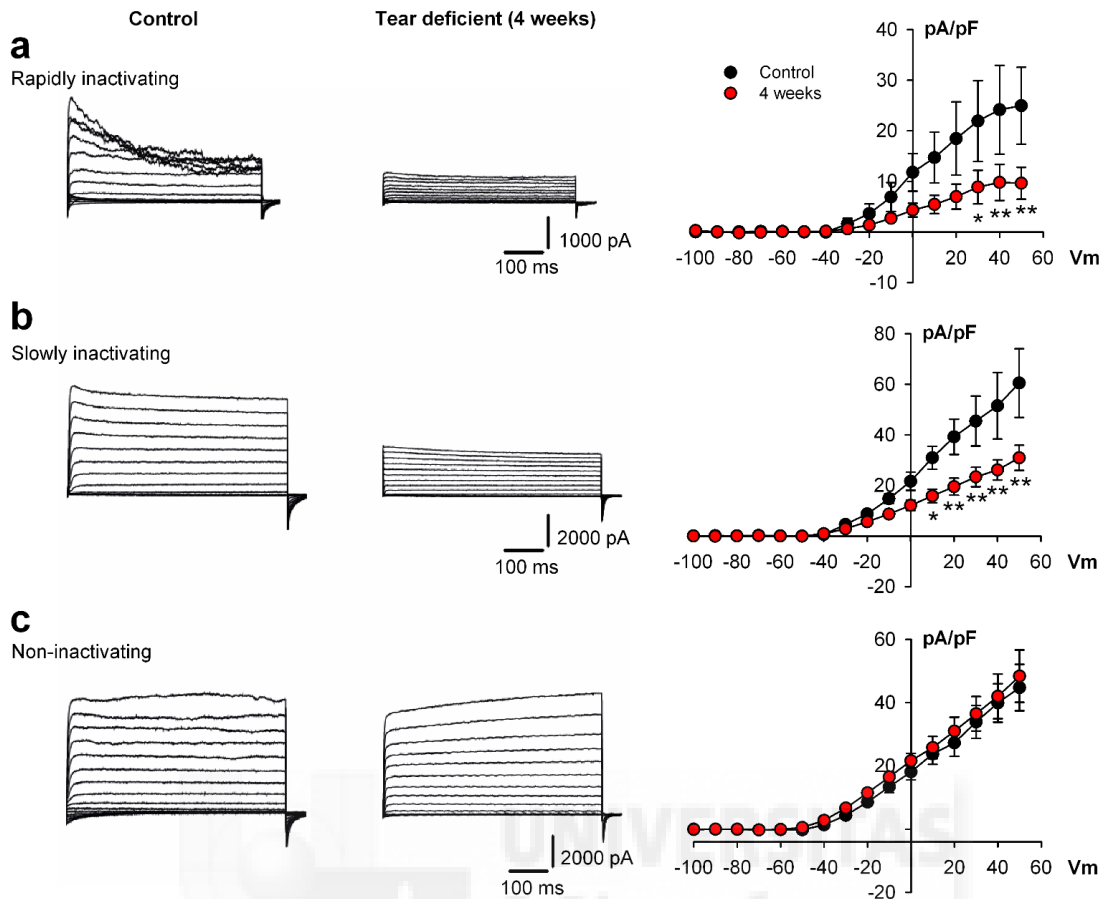


Figure 9. Voltage-gated K^+ currents (rapidly inactivating, slowly inactivating, and non-inactivating currents) in control and tear deficient trigeminal cold-sensitive neurons innervating the cornea. **(a)** Rapidly inactivating $K_{A, fast}$ currents obtained by subtraction of protocol 2 from protocol 1. Protocol 1: depolarizing voltage steps from -100 to +50 mV (500 ms) made from a -100 mV. Protocol 2: like protocol 1 but including a short depolarizing prepulse at -10 mV, 60 ms to inactivate the rapidly inactivating component (see Methods). **(b)** Slowly inactivating $K_{A, slow}$ currents obtained by subtraction of currents elicited by protocol 3 from these obtained by protocol 2. In protocol 3 the same voltage steps were recorded but after a 7 s conditioning step to -10 mV to inactivate both the rapidly and slowly inactivating currents, leaving only the non-inactivating and leak components. **(c)** Non-inactivating currents obtained with protocol 3 where the leak component was removed with a p/8 leak subtraction protocol. On the right side of the figure, the mean voltage-current relationships for the three types of K^+ currents ($n=5$ for each group) are shown. Rapidly and slowly inactivating V-I curves showed statistically significant differences between control and tear deficient neurons (Repeated measures ANOVA, $p<0.001$; post hoc comparison using t-test with Bonferroni corrections; $**p<0.001$, $*p<0.05$). Non-inactivating currents did not show significant differences between groups.

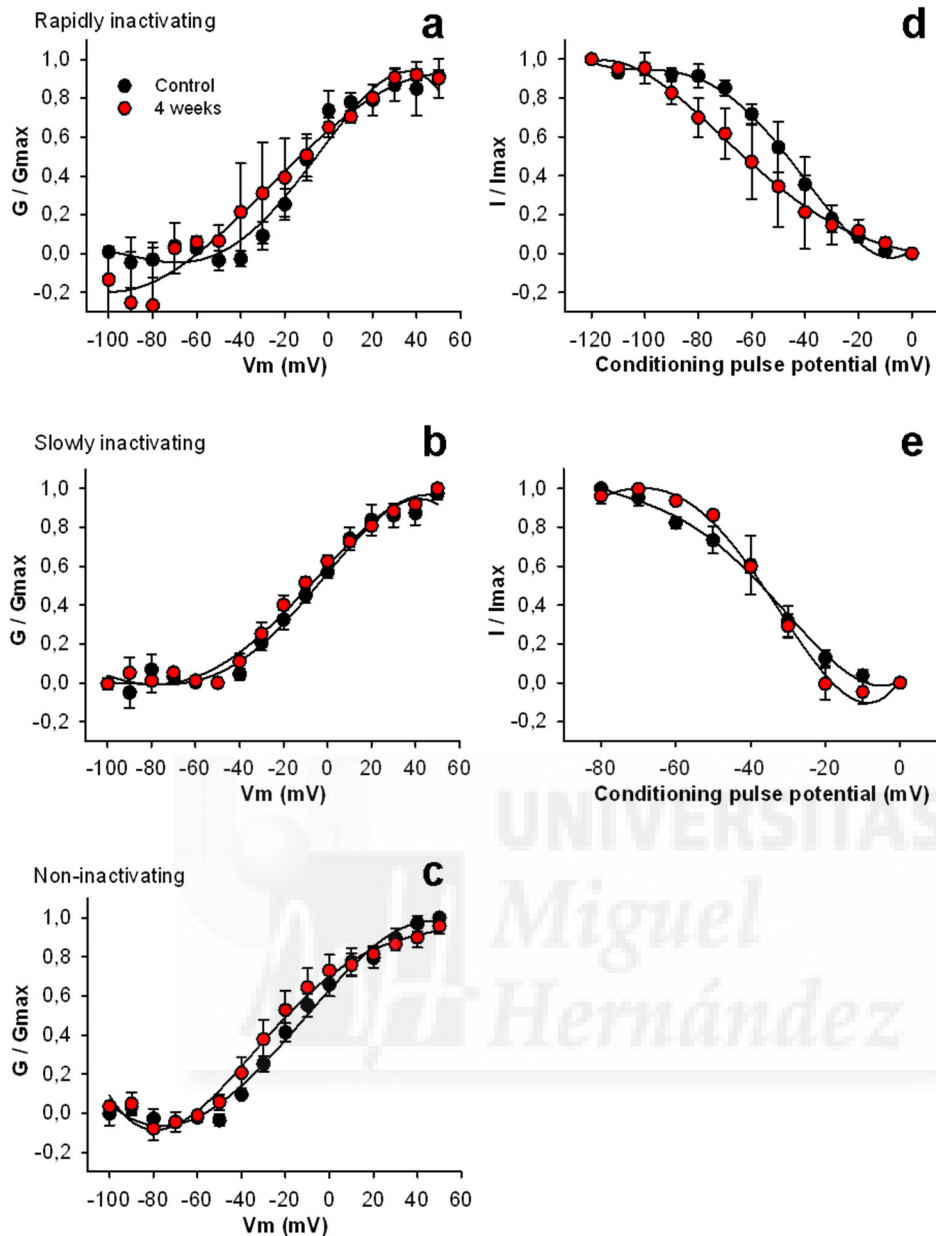


Figure 10. Activation and inactivation curves of voltage-gated K^+ currents in corneal cold sensory neurons from control and 4-weeks tear deficient guinea-pigs.

Activation curves were generated by voltage pulses in 10 mV steps from -100 to +50 mV. Activation voltage dependency was studied by plotting normalized conductance (G/G_{max}) against test pulse voltage and the data were fitted using a Boltzmann function. (A) Activation curves for rapidly inactivating K^+ current in cold sensory neurons from control and tear deficient animals ($n=5$ neurons each group). $V_{0.5}$: control -12.5 ± 2.0 mV; tear-deficient -14.5 ± 7.6 mV. Slope factor: control 7.9 ± 1.7 ; tear-deficient 15.9 ± 6.0 . No significant differences were observed. (B) Activation curves for slowly inactivating K^+ current ($n=5$ neurons each) $V_{0.5}$: control -8.6 ± 2.4 mV; tear-deficient -10.6 ± 2.1 mV. Slope factor: control 15.1 ± 2.2 ; tear-deficient 17.2 ± 2.0 . (C) Activation curves for non-inactivating K^+ current. ($n=5$ neurons each group) $V_{0.5}$: control -12.7 ± 1.5 mV; tear-deficient -20.1 ± 2.5 mV. Slope factor: control 16.8 ± 1.5 ; tear-deficient 20.2 ± 2.5 . (D) Inactivation curves for rapidly inactivating K^+ current. Inactivation curves were constructed using a two-pulse protocol, a 1 s prepulse varying between -120 and 0 mV, followed by a 400 ms test pulse of +50 mV. The peak of the transient component was measured. Tear-deficient neurons showed a significant leftward shift in the inactivation curve of $K_{A,fast}$ ($p < 0.05$, One Way Repeated Measures ANOVA). $V_{0.5}$: control -45.9 ± 2.5 mV, tear-deficient -64.2 ± 7.7 mV. Slope factor: control -12.3 ± 2.2 , tear-deficient -20.5 ± 9.0 . (E) Inactivation curves for slowly inactivating $K_{A,slow}$ were constructed using a two-pulse protocol: an 8 s prepulse varying between -80 and 0 mV followed by a 1 s test pulse of +50 mV. No significant effects were observed between groups. $V_{0.5}$: control -36.3 ± 2.9 mV, tear-deficient -35.9 ± 1.0 mV. Slope factor: control 11.9 ± 3.2 , tear-deficient 6.8 ± 1.0 .

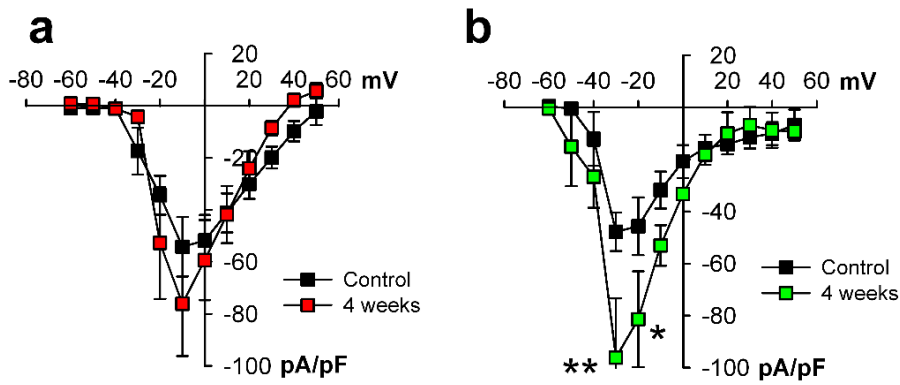


Figure 11. Voltage-gated Na⁺ currents in trigeminal polymodal sensory neurons of control and tear deficient guinea pigs 4 weeks after lachrymal gland removal. Corneal neurons were retrogradely labeled with FM 1-43 applied on the cornea 6 days earlier. Mean voltage-current relationships for TTX-R (a) and TTX-S (b) sodium currents. Data are mean \pm s.e.m. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, t-test.

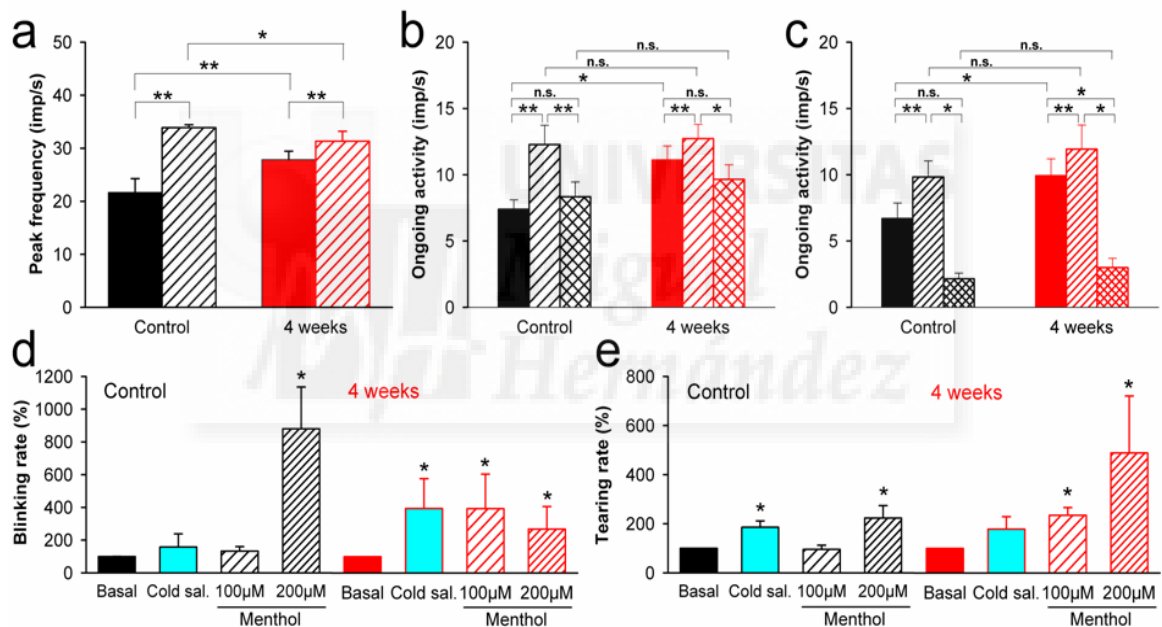


Figure 12. Effects of menthol on the spontaneous and cold-evoked NTI firing frequency of cold nerve terminals, blinking frequency and tearing rate, in control (red columns) and tear deficient animals (red columns) 4 weeks after surgical removal of the lachrymal gland.

(a) Effect of menthol on NTI peak frequency value of the response evoked by cooling ramps to 20°C, in cold nerve terminals of control and tear deficient corneas. (b-c) Effect of 100 μ M (b) and 200 μ M (c) menthol on the ongoing NTI activity in control (n=17, black) and tear deficient (n=15, red) cold nerve terminals at the basal temperature of 34°C. The bars represent ongoing activity before (full bars), during (hatched bars) and 5 min after perfusion with menthol (double hatched bars). ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, paired or unpaired t-test, as needed. (c-d) Effect on blinking frequency and tearing rate of topical application of ice-cold saline and 100 μ M and 200 μ M menthol solutions in control and tear deficient animals. Data are mean \pm s.e.m. of the change in the measured parameter, expressed as % of the basal value; n=6 each group; * $p < 0.05$, paired t-test.

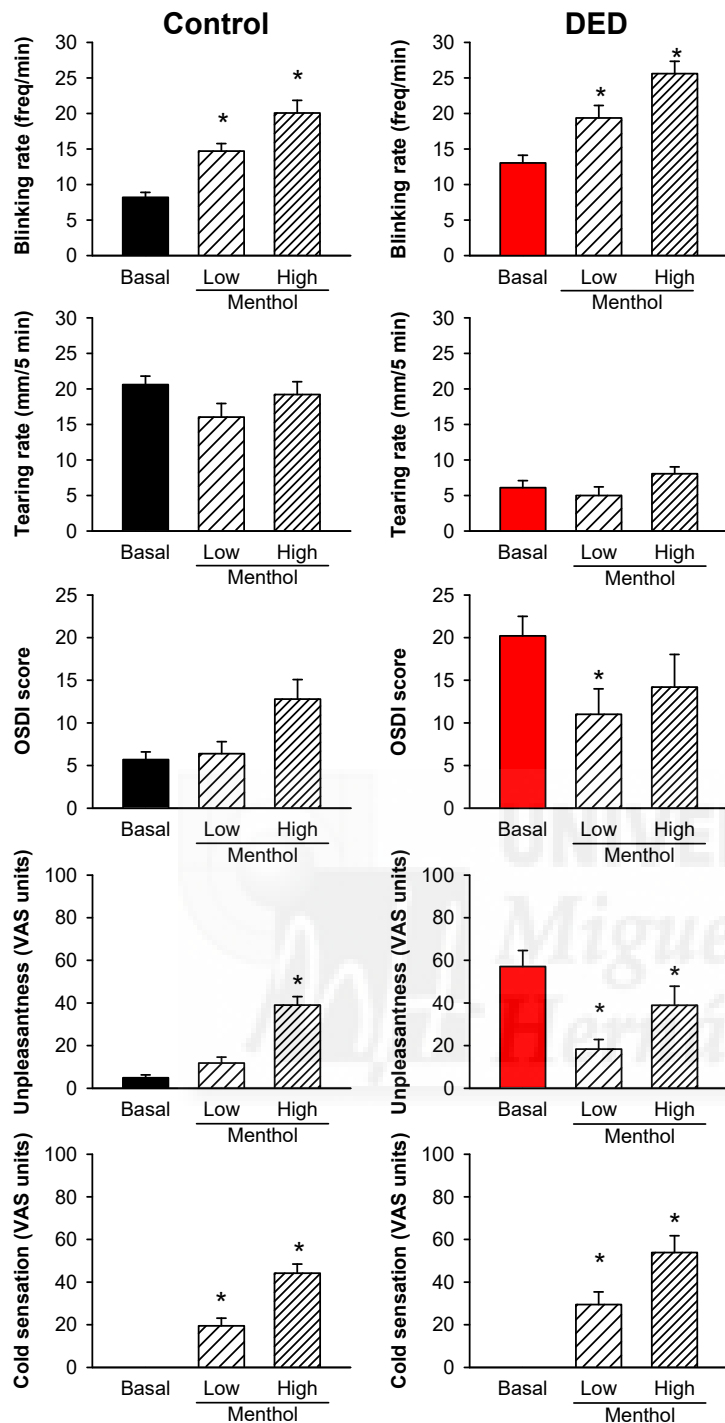


Figure 13. Effects of menthol on blinking frequency, tearing rate and ocular sensation parameters in control and dry eye (DED) patients.

Menthol was applied as an ointment onto the cheekbone skin at 1 and 10 mM concentrations (leading respectively to 5 and 39.5 μM menthol concentrations in tears). Data from control subjects ($n=18$) and DED patients ($n=9$) are shown. From top to bottom: Mean blinking frequency measured off-line from webcam recordings performed during 3 min. Tearing rate measured with commercial Schirmer strips without anesthesia during 5 min. Ocular Surface Disease Index (OSDI) score measured with a questionnaire approved for Spanish-speaking people. Unpleasantness sensation measured with a 0-100 Visual Analogue Scale (VAS). Cold sensation intensity measured with a 0-100 VAS. $p < 0.001$, Repeated Measures ANOVA with post-hoc analysis using Bonferroni t-test ($*p < 0.001$).

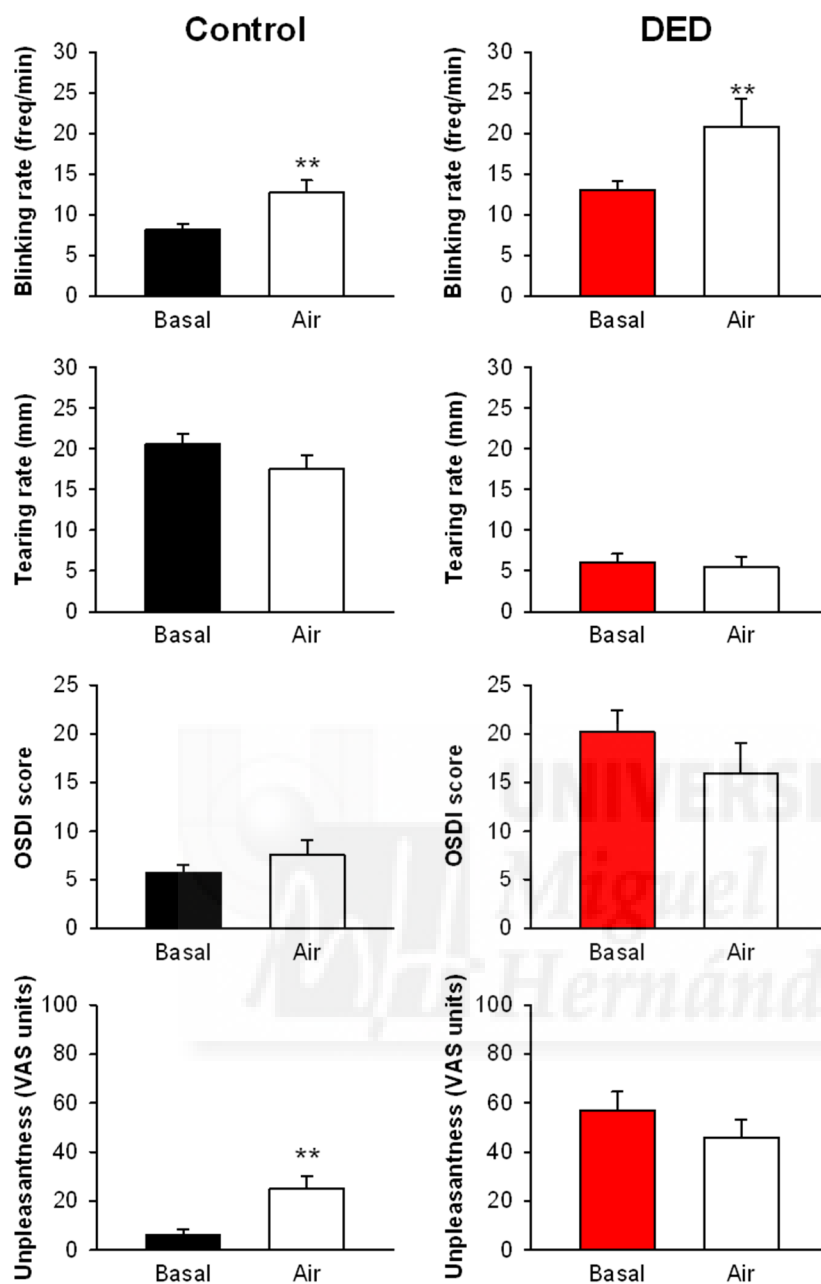


Figure 14. Effect of ocular surface dryness induced by an air stream directed to the face on blinking frequency, tearing rate and ocular sensations in (a) control subjects and (b) DED patients. The following parameters were measured: Mean blinking frequency measured off-line from video recordings of 3 min duration. Tearing rate, measured with Schirmer strips without anesthesia during 5 min. Ocular Surface Disease Index (OSDI) score determined with a questionnaire validated for Spanish-speaking people. Unpleasantness sensation intensity scored with a 0 to 100 Visual Analogue Scale (VAS). Data are mean \pm s.e.m., n= 18 control and 9 DED patients; **p<0.001, paired t-test.

Table 1. General properties of mechano- and polymodal nociceptor fibers recorded in control corneas, and 1 and 4 weeks after surgical removal of the lachrymal gland.

	Control	Time after lachrymal gland removal	
		1 week	4 weeks
Mechano-nociceptor fibers	n=55	n=17	n=12
<i>Receptive field diameter (mm)</i>	3.85 ± 0.08	3.19 ± 0.17	2.70 ± 0.26
<i>Spontaneous activity (imp/s)</i>	0.02 ± 0.02 (4/55)	0.30 ± 0.22 * (6/16)	0.00 ± 0.00 (0/12)
<i>Mechanical threshold (mN)</i>	0.89 ± 0.13	0.52 ± 0.11	0.61 ± 0.15
Polymodal nociceptor fibers	n=34	n=27	n=8
<i>Receptive field diameter (mm)</i>	3.65 ± 0.12	3.19 ± 0.17	2.88 ± 0.30
<i>Spontaneous activity (imp/s)</i>	0.09 ± 0.09 (3/34)	0.36 ± 0.31 (9/27)	0.00 ± 0.00 (0/8)
<i>Mechanical threshold (mN)</i>	0.32 ± 0.02	0.45 ± 0.10	0.29 ± 0.0

Data are mean ± SEM. n = number of fibers. Numbers in brackets: number of fibers with spontaneous activity/number of recorded fibers. *p<0.05, t-test, difference from Control.

Table 2. Characteristics of the response to CO₂ of corneal polymodal nociceptors, recorded in control corneas, and 1 and 4 weeks after removal of the lachrymal gland.

	Control	Time after lachrymal gland removal	
		1 week	4 weeks
	n=18	n=25	n=8
<i>Ongoing activity (imp/s)</i>	0.07 ± 0.07	0.23 ± 0.06***	0.06 ± 0.01
<i>Latency (s)</i>	18.3 ± 1.8	9.4 ± 1.6 ***	9.8 ± 3.9 *
<i>Mean discharge rate (imp/s)</i>	1.34 ± 0.23	2.93 ± 0.50 *	3.01 ± 1.02 *
<i>Postdischarge (imp/s)</i>	0.81 ± 0.19	3.17 ± 0.86	1.40 ± 0.38

Data are mean ± SEM, n = number of fibers. *p<0.05, ***p<0.001, One way ANOVA with Dunnett's test for differences from Control.

Table 3. Characteristics of spontaneous and cold-evoked nerve terminal impulse activity in control corneas and at different times after surgical removal of the lachrymal gland.

	Control	Time after lachrymal gland removal		
		1 week	2 weeks	4 weeks
	n=45	n=93	n=18	n=57
<i>Ongoing activity (imp/s)</i>	10.27 ± 0.78	10.50 ± 0.59	11.32 ± 1.35	13.22 ± 1.00*
<i>Cooling threshold (°C)</i>	29.87 ± 0.35	32.37 ± 0.13*	32.67 ± 0.33*	32.42 ± 0.14*
<i>Peak frequency (imp/s)</i>	25.29 ± 1.79	28.51 ± 1.37	29.47 ± 2.03	31.12 ± 1.80*
<i>Temperature at peak frequency (°C)</i>	27.46 ± 0.53	28.28 ± 0.33	30.33 ± 0.53	28.68 ± 0.28

Data are mean ± SEM, n = number of nerve terminals. *p<0.05, One way ANOVA with Dunnett's test for differences from Control.

Table 4. Activation properties of voltage-gated Na⁺ currents in corneal cold and polymodal sensory neurons from control and 4-weeks tear deficient animals.

		Cold		Polymodal	
		Control	4 weeks	Control	4 weeks
		n=7	n=7	n=8	n=6
TTX-R	<i>V_{0.5} (mV)</i>	-21.9±3.0	-29.0±2.4*	-22.3±3.5	-23.7±1.6
	<i>Slope factor</i>	1.9±0.8	1.3±0.5	1.5±0.7	1.5±0.7
TTX-S	<i>V_{0.5} (mV)</i>	-29.7±2.8	-42.8±1.9**	-35.8±2.7	-31.6±6.7
	<i>Slope factor</i>	2.3±1.2	1.3±0.8	0.5±0.1	0.7±0.2

Data are mean ± SEM, n = number of recorded neurons. *p<0.05, **p<0.01, t-test.

Table 5. Activation and inactivation properties of voltage-gated K⁺ currents in corneal cold sensory neurons from control and 4-weeks tear deficient animals.

		Control	4 weeks
		n=5	n=5
Activation			
<i>Rapidly inactivating</i>	<i>V_{0.5} (mV)</i>	-12.5± 2.0	-14.5± 7.6
	<i>Slope factor</i>	7.9± 1.7	15.9± 6.0
<i>Slowly inactivating</i>	<i>V_{0.5} (mV)</i>	-8.6± 2.4	-10.6± 2.1
	<i>Slope factor</i>	15.1± 2.2	17.2± 2.0
<i>Non-inactivating</i>	<i>V_{0.5} (mV)</i>	-12.7± 1.9	-20.1± 3.2
	<i>Slope factor</i>	16.8± 1.5	20.2± 2.5
Inactivation			
<i>Rapidly inactivating</i>	<i>V_{0.5} (mV)</i>	-45.9 ± 2.5	-64.2 ± 7.7*
	<i>Slope factor</i>	-12.3 ± 2.2	-20.5 ± 9.0
<i>Slowly inactivating</i>	<i>V_{0.5} (mV)</i>	-36.3 ± 2.9	-35.9 ± 1.1
	<i>Slope factor</i>	11.9 ± 3.2	6.8 ± 1.0

Data are mean ± SEM, n = number of recorded neurons. *p<0.05, t-test

