



Grado en Ciencias Ambientales

Facultad de Ciencias Experimentales

***Alteraciones inducidas por la acidificación
ambiental sobre la superficie ocular***

Trabajo de Fin de Grado

Lucía Pérez Domene

Tutoras: Laura Rincón Frutos

Cristina Ripoll Orts

Área de Fisiología - Departamento de Fisiología

San Juan de Alicante, 2019

Agradecimientos

Gracias a la Dra. Juana Gallar por abrirme las puertas de su laboratorio y a todos los que forman parte del Laboratorio 222 por haberme tratado con tanto cariño desde el primer momento, ha sido una gran experiencia.

A Carol y Susana por compartir el día a día y por darme ánimos constantes.

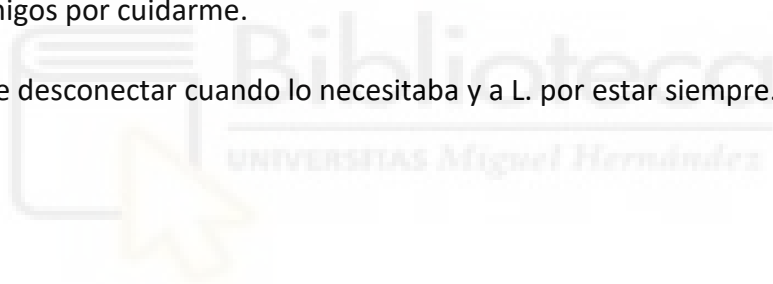
A Fito por su disposición para ayudar siempre y por resolernos las dudas que aparecían a última hora.

A mi tutora Cristina por haber confiado en mí, por su disponibilidad y por ofrecerme su ayuda continuamente.

Gracias especialmente a Laura, por implicarse en este trabajo, por dedicarle tantas horas y por estos meses llenos de aprendizaje que me llevo gracias a ella.

A mi familia y amigos por cuidarme.

A N. por hacerme desconectar cuando lo necesitaba y a L. por estar siempre.



Resumen

El aumento de sustancias acidificantes en la atmósfera en las últimas décadas, como el dióxido de azufre (SO₂), los óxidos de nitrógeno (NO, NO₂) o el dióxido de carbono (CO₂), principales responsables de la contaminación, han generado la necesidad de conocer sus efectos en el medio ambiente y en la salud de los seres vivos.

Respecto a los efectos sobre la salud, la mayoría de los estudios se han centrado sobre todo en la exposición y sus consecuencias sobre el sistema respiratorio y el sistema cardiovascular. Menos estudiados han sido los efectos producidos sobre la superficie ocular, un sistema altamente expuesto al ambiente.

La superficie ocular es de fácil acceso y puede ser examinada empleando métodos sencillos y poco invasivos. Por tanto, puede ser utilizada como un indicador del impacto de la polución sobre la salud.

En este trabajo se estudia la influencia del pH ácido ambiental en la actividad basal y en la respuesta a distintos estímulos de las neuronas sensoriales primarias del ojo, así como su posible papel en la aparición de cambios en el funcionamiento fisiológico del párpado, como la tasa de parpadeo y lagrimación.

Palabras clave

Córnea, termorreceptores de frío, nociceptores polimodales, pH ácido, sustancias acidificantes, contaminación atmosférica.

Abstract

The increase of acidifying substances in the atmosphere in the last decades, such as sulfur dioxide (SO₂), nitrogen oxides (NO, NO₂) or carbon dioxide (CO₂), which represent the main factors responsible for pollution, have generated the need to know its effects on the environment and on the health of living beings.

Regarding health effects, most studies have focused mainly on the exposure of the respiratory and cardiovascular systems. Less attention has been paid to the effects on the ocular surface, a system highly exposed to the environment.

The ocular surface is easily accessible and can be examined using simple and non-invasive methods. Therefore, it can be used as an indicator of the impact of pollution on health.

In this work we study the influence of acid environmental pH on the basal activity and the response to stimuli of the primary sensory neurons of the eye, as well as its possible role in alterations in the physiological functioning of eyelids, such as blinking and tearing rate.

Keywords

Cornea, cold thermoreceptors, polymodal nociceptors, acid pH, acidifying substances, air pollution.



Índice

1. Introducción	6
1.1. Efectos de la contaminación en la superficie ocular	6
1.2. La córnea y su inervación	9
1.3. Tipos de neuronas sensoriales corneales	10
1.4. Acidificación	13
2. Antecedentes y Objetivos	14
3. Materiales y Métodos	15
3.1. Animales	15
3.2. Medición de las tasas de parpadeo y lagrimación	15
3.2.1. Preparación de soluciones	15
3.2.2. Tasas de parpadeo y lagrimación	15
3.2.3. Protocolo experimental	16
3.3. Registros electrofisiológicos	17
3.3.1. Preparación de solución salina para los registros electrofisiológicos	17
3.3.2. Registros electrofisiológicos	17
3.3.3. Protocolo experimental	19
3.4. Análisis de los registros electrofisiológicos	19
3.5. Análisis estadístico	21
4. Resultados	21
4.1. Tasas de parpadeo	21
4.2. Tasa de lagrimación	23
4.3. Actividad electrofisiológica de las terminales nerviosas de la córnea	24
4.4. Termorreceptores de frío	25
4.5. Nociceptores polimodales	29
5. Discusión	31
6. Conclusiones	33
6.1. Proyección futura	33
7. Bibliografía	34

1. Introducción

1.1. Efectos de la contaminación en la superficie ocular

En las últimas décadas, paralelamente con el aumento tanto de los procesos de industrialización como del transporte motorizado, ha aumentado la necesidad de conocer las consecuencias, a largo y corto plazo, de la exposición a la contaminación atmosférica sobre diferentes aspectos de la salud humana y animal (*Figura 1*).

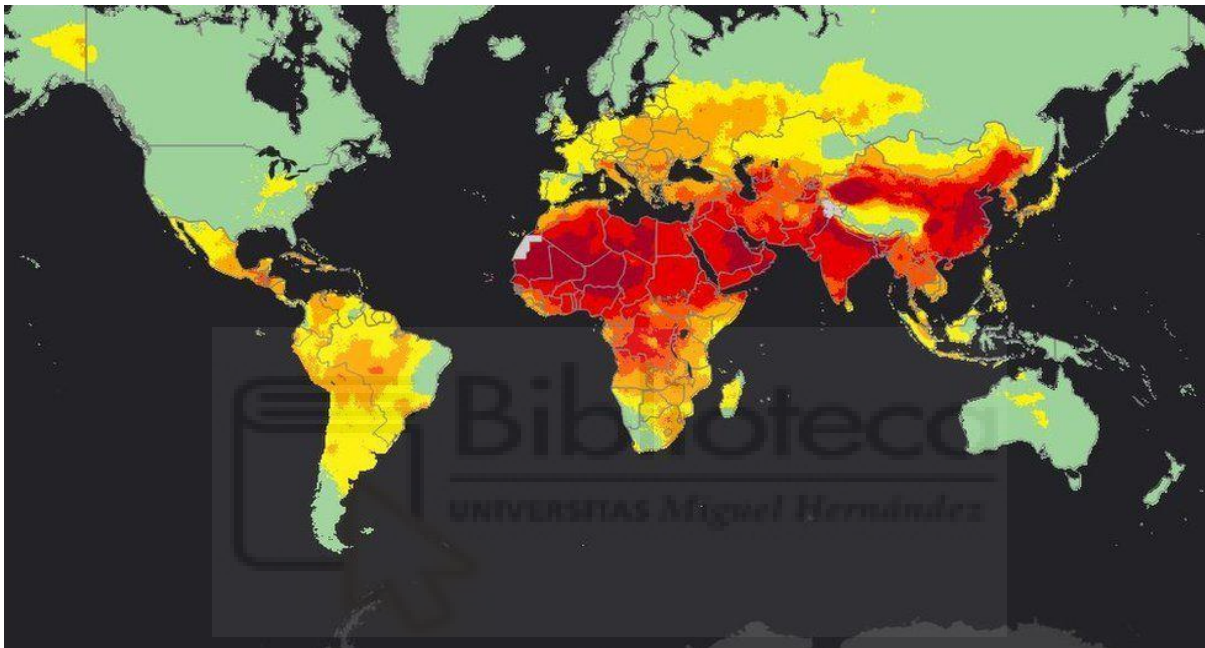


Figura 1. Representación de la contaminación atmosférica por países. Las zonas más afectadas son aquellas pintadas de rojo. El satélite no distingue materia particulada gruesa y fina, por lo que el rojo sobre África se debe a las tempestades de arena del Sahara. La arena es un tipo de materia particulada gruesa, menos dañina que la fina, que afecta seriamente sistema respiratoria y cardiovascular (World Health Organization, 2016)

Se considera que la atmósfera está contaminada cuando los niveles de determinadas sustancias son lo suficientemente elevados como para causar daños en los seres vivos o el medio ambiente en general. Este concepto incluye cualquier tipo de sustancia, sea o no tóxica, siempre que tenga efectos nocivos (*Tabla 1 y Tabla 2*).

Las principales fuentes de emisión de sustancias contaminantes son el transporte, la producción de energía eléctrica, la incineración de residuos, el consumo de combustibles, los procesos industriales, la respiración de animales y plantas, la descomposición de materia orgánica, los volcanes o los incendios naturales.

Los principales contaminantes en la atmósfera, como se muestra en la *Tabla 1*, son SO₂, CO₂, CO, NO y NO₂, O₃, HC y determinadas partículas en suspensión en el aire. Para cada una de ellas se han determinado aquellos valores límite, por encima de los cuales se considera que pueden presentar un riesgo para la salud (*Tabla 2*)

Contaminantes principales: concentración en atmósfera natural y contaminada		
Componentes	Aire limpio	Aire contaminado
SO ₂	3-30 µg/m ³	> 50 µg/m ³
CO ₂	550-600 mg/m ³	> 630 mg/m ³
CO	< 1 mg/m ³	> 6 mg/m ³
NO + NO ₂	2-15 µg/m ³	> 15 µg/m ³
O ₃	30-60 µg/m ³	> 80 µg/m ³
HC	1 ppm	1-20 ppm
Partículas	10-20 µg/m ³	70-700 µg/m ³

Tabla 1. Contaminantes principales y su concentración en atmósfera natural y contaminada respectivamente (BOE nº 151, June 23, 2004).

Valores límite para la protección de la salud humana de los principales contaminantes atmosféricos		
Contaminante	Periodo de promedio	Valor límite
Dióxido de azufre	1 hora	350 µg/m ³
Dióxido de azufre	24 horas	125 µg/m ³
Dióxido de nitrógeno	1 hora	200 µg/m ³
Dióxido de nitrógeno	1 año civil	40 µg/m ³
PM ₁₀	24 horas	50 µg/m ³
PM ₁₀	1 año civil	40 µg/m ³
PM _{2,5}	1 año civil	25 µg/m ³
Plomo	1 año civil	0,5 µg/m ³
Benceno	1 año civil	5 µg/m ³
Monóxido de carbono	8 horas	10 mg/m ³
Ozono	8 horas	120 µg/m ³

Tabla 2. Valores límite para la protección de la salud humana de los principales contaminantes atmosféricos, entendiéndose como valor límite el nivel fijado basándose en conocimientos científicos, con el fin de evitar, prevenir o reducir los efectos nocivos para la salud humana y el medio ambiente (BOE number 151, June 23, 2004).

Los estudios realizados al respecto, tradicionalmente, han prestado más atención a los efectos adversos de la polución originados en el sistema respiratorio y en el sistema cardiovascular, tales como asma, cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o

enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, hasta hace unos años, ha habido menos interés sobre los efectos causados sobre la superficie ocular, a pesar de estar más expuesta a la contaminación del aire, ya que solo una película lagrimal muy fina separa los epitelios corneal y conjuntival del aire ambiente contaminado (Łatka, Nowakowska, Nowomiejska, & Rejdak, 2018).

Los efectos oculares más frecuentes asociados a la contaminación del aire son enrojecimiento de los ojos, irritación, lagrimeo excesivo o visión borrosa (Jung, Mehta, & Tong, 2018) (Novaes et al., 2010). El conjunto de estos síntomas se conoce como el síndrome del ojo seco, una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la superficie ocular que se manifiesta en molestias, alteraciones de la visión e inestabilidad de la película lagrimal que puede potencialmente causar daño a la superficie ocular. Se acompaña de un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular. (Kantor, 2010) (Profazio, Versura, Torreggiani, Caramazza, & Cellini, 2003). Trastornos en la producción, la velocidad de evaporación o en la película lagrimal causan esta enfermedad, siendo la disfunción oftálmica más común, con una prevalencia del 11 al 58%, en función de diversos factores (Murube J, Wilson S, Ramos-Esteban J, 2001).

Se ha demostrado que la población de grandes ciudades con niveles elevados de contaminación sufre con mayor frecuencia alteraciones oculares como el síndrome del ojo seco. La población de la ciudad de Nueva York, Chicago y alrededores fueron diagnosticados de tres a cuatro veces más de este síndrome, en comparación con la población de áreas con menor polución del aire. Se concluyó que, en las ciudades más contaminadas, como Nueva York o Chicago, existe una relación directa entre la contaminación ambiental y el ojo seco: entre el 17% y el 21% de los pacientes con el síndrome, presentaron complicaciones asociadas con la contaminación (Galor, Kumar, Feuer, & Lee, 2014).

Se ha demostrado también la correlación directa entre el número de pacientes en la consulta de oftalmología con los aumentos en las concentraciones de CO₂, NO₂, SO₂, O₃, PM_{2.5} y PM₁₀ en el aire los días previos, siendo la mayor dependencia respecto al SO₂ (Fu et al., 2017)

Esta contaminación disminuye el pH lagrimal por la acción acidificante del SO₂, entre otros (ANDRÉS, S.; GARCÍA, M.L.; ESPINA M.; VALERO, J.; VALLS O, 1988) (Abelson, Udell, & Weston, 1981).

El rango de pH de la lágrima oscila entre 6,6 y 7,8 unidades de pH. En colirios, baños oculares y pomadas oculares, así como en las lágrimas artificiales, se opta por valores comprendidos entre 7,2 y 7,6, aproximadamente, ya que, fuera de esos valores, producen un cierto grado de malestar ocular.

1.2. La córnea y su inervación

La función fisiológica principal de la córnea es mantener una superficie lisa desde el punto de vista óptico y un medio transparente. La superficie externa, el epitelio, ejerce de barrera impermeable para las sustancias hidrosolubles, mientras que la función principal del endotelio es mantener la hidratación corneal adecuada. Actualmente se considera la película lagrimal y el epitelio córneo-conjuntival como una unidad funcional. Los párpados distribuyen la lágrima por la superficie ocular en una fina película lagrimal mediante los movimientos palpebrales, dando como resultado una velocidad de evaporación y de secreción lagrimal idóneas. La fina capa de lágrima que baña la superficie córneo-conjuntival se destruye y reconstruye con cada parpadeo. Cualquier alteración en la frecuencia del parpadeo (como cuando se mira con atención la pantalla de un ordenador), apertura palpebral grande o funcionamiento incorrecto del mecanismo de parpadeo, pueden conducir a problemas de sequedad ocular.

En condiciones normales, la película lagrimal (PL) se mantiene estable alrededor de 15 a 30 segundos después del último parpadeo, transcurridos los cuales la fase acuosa se ha evaporado en su mayor parte y se inicia la formación de puntos hidrófobos (puntos secos) que, progresivamente, se extienden, afectando a la mayor parte de la PL, hasta desencadenar su ruptura. Las terminaciones nerviosas en la zona del punto seco se ven estimuladas por este proceso y, en condiciones normales, provocan un nuevo parpadeo, recuperándose la estructura laminar de la PL e iniciándose un nuevo ciclo. Como el parpadeo tiene lugar a intervalos regulares de 5 a 10 segundos, habitualmente no se produce la completa deshidratación del epitelio córneo-conjuntival, dado que, tras la aparición del punto seco, tiene lugar un nuevo parpadeo que reconstruye dicha película. Cuando la película lagrimal se altera, la protección de la córnea y de la conjuntiva ocular frente a la deshidratación se ve comprometida, y ello da lugar, en muchos casos, a la instauración del cuadro clínico de sequedad ocular conocido como ojo seco.

En la córnea la inervación sensorial de la superficie ocular es especialmente abundante y está a cargo de los axones periféricos de las neuronas sensoriales primarias localizadas en el ganglio trigémino (Müller, Marfurt, Kruse, & Tervo, 2003)(Belmonte & Gallar, 2011)

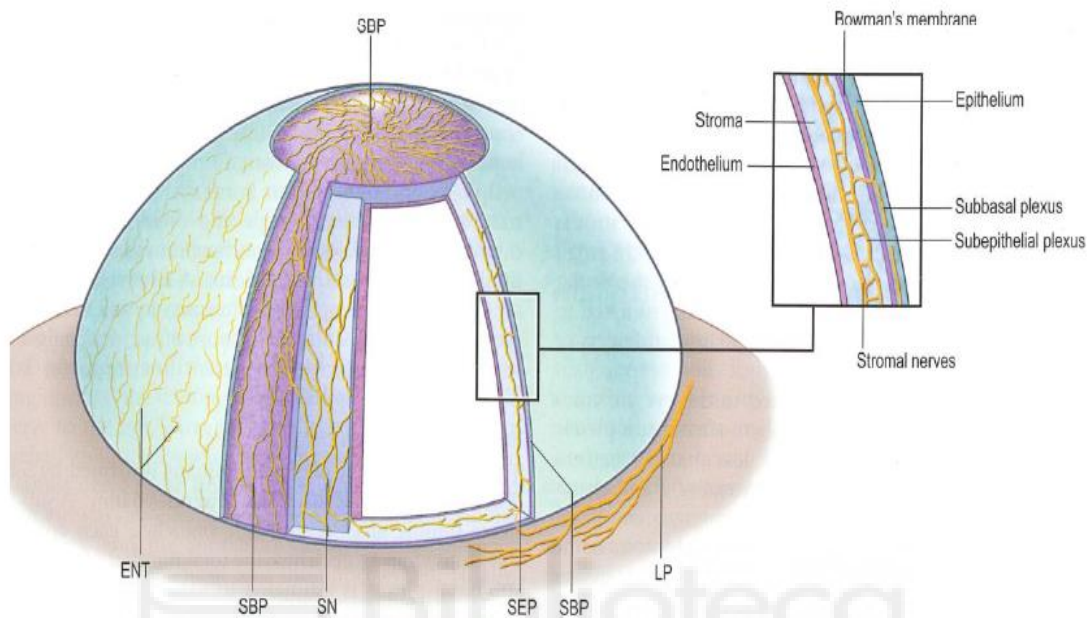


Figura 2. Inervación corneal. Plexo limbal (LP) - Troncos nerviosos del estroma (SN) - Plexo subepitelial (SEP) - Plexo subbasal (SBP) - Terminales nerviosas intraepiteliales (ENT) (Belmonte & Gallar, 2011)

La distribución de los nervios sensoriales en la córnea tiene lugar desde el plexo limbal, donde los troncos nerviosos penetran en el estroma radialmente y se dividen dicotómicamente para formar el plexo subepitelial. Las ramas de este ascienden desde el plexo hacia el epitelio, atraviesan la capa de Bowman y forman el plexo sub-basal entre la capa basal del epitelio y su lámina basal. Allí las ramas nerviosas avanzan horizontalmente como familias de nervios paralelos que a su vez dan lugar a terminales nerviosas intraepiteliales. (Belmonte & Gallar, 2011) (Figura 2).

1.3. Tipos de neuronas sensoriales corneales

Estudios electrofisiológicos han establecido que la córnea está inervada por tres clases de neuronas sensoriales primarias, con distinta actividad en reposo y distinta respuesta a estímulos de diferente naturaleza física y química. (Belmonte, Acosta, & Gallar, 2004)(Figura 3).

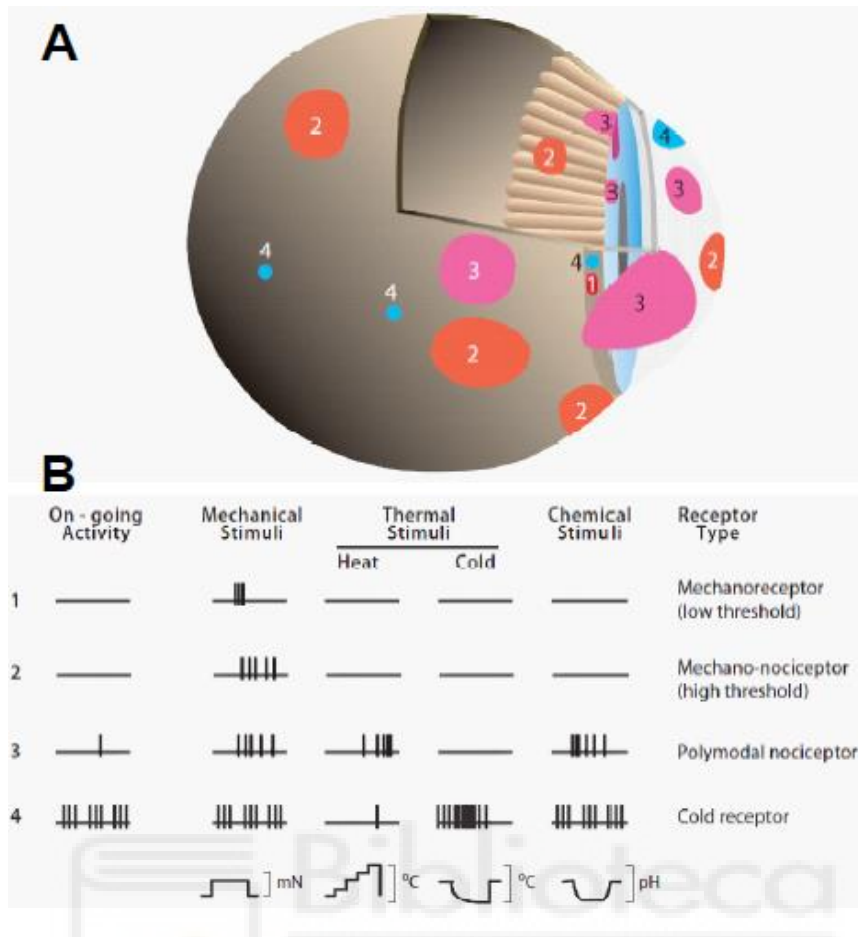


Figura 3. Representación esquemática de los tipos de neuronas receptoras sensoriales que se encuentran en el ojo. En la parte A se muestra la ubicación y el tamaño del campo receptor de los diferentes tipos de neuronas receptoras sensoriales en el globo ocular. En la parte B se muestra la actividad basal en reposo y la respuesta a diferentes estímulos representada para cada tipo (adaptado de Belmonte et al., 2004).

- Termorreceptores de frío.

Se encuentran ubicados por toda la superficie ocular, siendo especialmente abundantes en la córnea periférica y el limbo esclerocorneal. Se activan por soluciones hiperosmolares y por la disminución de la temperatura basal de la superficie ocular, aumentando de manera significativa su frecuencia de disparo con los pequeños cambios de temperatura producidos durante la evaporación de la película lagrimal. (Giraldez, Geijo, & Belmonte, 1979) (Belmonte et al., 2004) (Acosta, Luna, Quirce, Belmonte, & Gallar, 2013)(Carmen Acosta, Luna, Quirce, Belmonte, & Gallar, 2014)

- Nociceptores polimodales.

Se distribuyen por la totalidad de la superficie ocular, la conjuntiva y la úvea y responden a estímulos físicos (fuerza mecánica, calor, frío intenso) y químicos (cambios de PH, exposición

a determinadas sustancias exógenas o endógenas como las liberadas tras la lesión tisular y durante la inflamación...). (Giraldez et al., 1979) (Belmonte et al., 2004) (Acosta et al., 2013)(Carmen Acosta et al., 2014)

- Mecanorreceptores

Se distribuyen por la córnea, la esclera, la conjuntiva y la úvea. Responden a la aplicación de estímulos mecánicos de intensidad alta y son los responsables de las sensaciones de dolor agudo localizado que se experimenta tras un estímulo mecánico corneal repentino. (Giraldez et al., 1979) (Belmonte et al., 2004) (Acosta et al., 2013)(Carmen Acosta et al., 2014)

Dependiendo de qué subpoblación de neuronas sensoriales de la córnea sea activada por estímulos, aparecen sensaciones diferentes y se proporciona distinta información a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC)(Carmen Acosta, Belmonte, & Gallar, 2001).

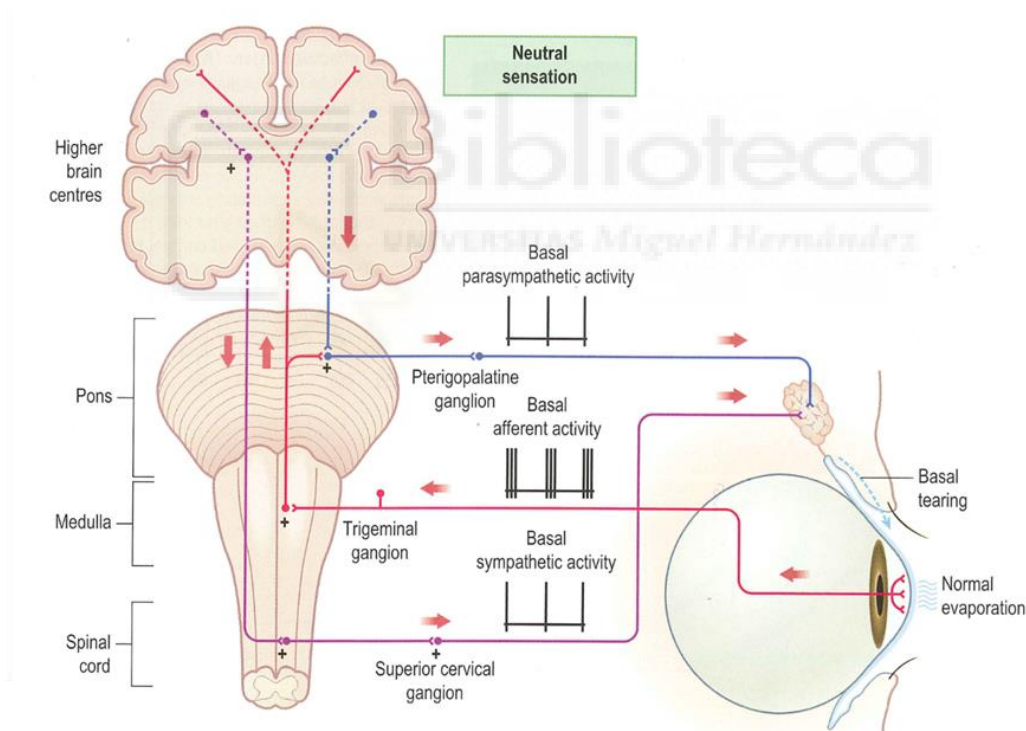


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos implicados en las sensaciones oculares y la regulación de la secreción lagrimal. La lagrimación basal se mantiene por la actividad del impulso sostenido de los termorreceptores de frío de la córnea. Esto activa el sistema simpático y parasimpático eferente, vías del sistema nervioso central, estimulando la secreción basal de lágrima. (Belmonte & Gallar, 2011)

La actividad de las neuronas sensoriales de la córnea constituye un mensaje sensorial que es transportado al cerebro por vía del trigémino, alcanzando el tálamo y, desde allí, la corteza sensorial primaria, donde se generan sensaciones oculares conscientes (Belmonte & Gallar,

2011). Además, la inervación sensitiva de la córnea contribuye a la regulación de los niveles de humedad de la superficie ocular, y constituye la rama aferente que proporciona la información necesaria para mantener la tasa de parpadeo y lagrimación basales (Parra et al., 2010) (Quallo et al., 2015) (Figura 4).

La respuesta específica de las neuronas sensoriales primarias de la córnea a los diferentes estímulos viene determinada por la expresión de proteínas que actúan como sensores moleculares, principalmente por canales iónicos de potencial transitorio o “Transient Receptor Potential channels” (TRPs). La familia de receptores TRP (Transient Receptor Potential), originalmente descubierta en *Drosophila melanogaster* (Benemei, Patacchini, Trevisani, & Geppetti, 2015), juega un papel fundamental en la transducción de las distintas modalidades somatosensoriales en mamíferos, incluyendo la termosensación, la recepción de feromonas, la regulación del tono vascular, la nocicepción y el dolor.

En este contexto, se ha demostrado que un tipo particular de TRP, los canales TRPM8 de las neuronas termorreceptoras de frío, tienen un papel importante en la regulación del flujo lagrimal (Parra et al., 2010) (Acosta et al., 2013). También se ha demostrado el papel de los nociceptores polimodales en la lagrimación refleja, aquella producida como respuesta a estímulos que irritan el polo anterior del ojo, como por ejemplo exposición al viento frío, cuerpos extraños o la irritación conjuntival y la implicación de los canales TRPV1 en dicho proceso (Acosta et al., 2013). El receptor TRPV1 destaca por ser un sensor molecular del umbral de temperaturas nocivas para el ojo (M J Caterina & Julius, 2001). Además, se ha verificado que tanto los canales TRPV1 (Receptor de potencial transitorio de tipo V1) como los canales ASIC, una nueva familia de receptores de protones que se encuentran inactivos al pH fisiológico (7,4), están involucrados en la respuesta de los nociceptores polimodales a la disminución del pH, detallada en el siguiente apartado *1.4 Acidificación*.

1.4. Acidificación

Los canales TRPV1 se activan sólo por acidosis severa, cuando el pH extracelular se reduce por debajo de 6, en cuyo caso se genera una corriente de canal sostenida (Michael J Caterina et al., 1997)(Tominaga et al., 1998)

Los canales ASIC por el contrario, se activan por disminuciones moderadas de pH extracelular (Kress & Waldmann, 2006) (Wemmie, Price, & Welsh, 2006). En general, producen corrientes que se inactivan rápidamente pero hay evidencias de que también pueden controlar la acidosis prolongada (Benson, Eckert, & McCleskey, 1999)(Kress & Waldmann, 2006)(Wemmie et al., 2006)(Yagi, Wenk, Naves, & McCleskey, 2006)(Kellenberger & Schild, 2019).

Por otra parte, hay estudios incipientes que muestran cómo la actividad de otros canales, como el TRPV4 o los canales K, también se ve modificada por reducciones del pH extracelular, aunque se requiere más investigación sobre ello.(Suzuki, Watanabe, Oyama, Mizuno, & Kusano, 2003) (Duprat, Lauritzen, Patel, & Honore, 2007)

2. Antecedentes y Objetivos

Los estudios realizados sobre los efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud, tradicionalmente, han prestado más atención a los sistema respiratorio y cardiovascular. Sin embargo, hasta hace unos años, ha habido menos interés sobre los efectos causados sobre la superficie ocular, a pesar de ser un órgano muy expuesto a la contaminación del aire.

El objetivo principal del trabajo consiste en estudiar la influencia del pH ácido ambiental sobre la superficie corneal.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Analizar los cambios producidos en la tasa de parpadeo como consecuencia de la disminución del pH sobre la superficie ocular.
- Analizar los cambios producidos en la tasa de lagrimación como consecuencia de la disminución del pH sobre la superficie ocular.
- Realizar el registro electrofisiológico de las neuronas sensoriales primarias del ojo y observar las posibles alteraciones en su actividad o en sus respuestas a estímulos, como consecuencia de la disminución del pH sobre la superficie ocular.

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales

Se utilizaron ratones *Wild type C57* de 6 meses de edad de ambos sexos.. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales para el cuidado de los animales y de acuerdo con la Ley Española de Investigación Biomédica y la Directiva Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Todos los procedimientos experimentales cumplieron con el Real Decreto Español 53/2013 y con el protocolo aprobado por el comité de ética de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y la Generalitat Valenciana.

3.2. Medición de las tasas de parpadeo y lagrimación

3.2.1. Preparación de soluciones

Para la medición de las tasas de lagrimación y parpadeo se prepararon soluciones salinas a pH fisiológico (7.4) y a pH ácido (5). Para ello, se preparó una solución salina concentrada inicial mediante la disolución en 1L de agua de los siguientes componentes (en Mm): NaCl (128), KCl (5), NaH₂PO₄ (1), NaHCO₃ (26), CaCl₂ (2.4), MgCl₂ (1.3) y glucosa (10) c A partir de esa solución inicial se realizó una dilución 1/10 para la obtención de 25ml de solución salina a pH = 7.4, mantenida a este pH a través de un sistema de carbógeno (5% de CO₂ y 95% O₂), y se repitió el mismo proceso para la elaboración de 25ml de solución salina a pH 5 pero disminuyendo en este caso el pH de la solución con ácido clorhídrico (HCl) al 37% haciendo uso de un pHmetro .

3.2.2. Tasas de parpadeo y lagrimación

La medida de la tasa de parpadeo se realizó en ambos ojos de manera simultánea, contando el número de parpadeos realizados, en cada uno durante 5 minutos.

La medida del nivel de la lágrima por su parte, se llevó a cabo utilizando hilos de rojo fenol (Zona-Quick, Menicon, Magoya, Japón) colocados entre el párpado inferior y la conjuntiva bulbar en el lado temporal del ojo durante 30 segundos. El rojo fenol es un indicador de pH y cambia de amarillo a rojo cuando se moja de lágrima. De esta manera la parte del hilo de color rojo indica la cantidad de lágrima, expresada como la longitud total de hilo de color rojo en

milímetros (mm), medida con una escala calibrada bajo un estereomicroscopio de precisión 0.1mm, inmediatamente después de retirarlo del ojo. (Patel, Farrell, Blades, & Grierson, 1998)

3.2.3. Protocolo experimental

Los ratones se anestesiaron por vía inhalatoria en el interior de una cámara con isoflurano, cuya proporción isoflurano-oxígeno era 1.5~2 – 0.6 y una vez anestesiados se procedió a su inmovilización en un sistema de inmovilización especialmente diseñado para la realización de estos experimentos (*Figura 5*).



Figura 5. Sistema de inmovilización empleado para la medida in vivo de las tasas de lagrimación y parpadeo.

El protocolo a seguir posteriormente fue el siguiente:

- 1- Medición en condiciones basales de la tasa de parpadeo de ambos ojos de manera simultánea durante 5 minutos.
- 2- Medición en condiciones basales de la lagrimación del ojo izquierdo y del ojo derecho durante 30 segundos respectivamente.
- 3- Tras 3 minutos de reposo, aplicación de 5 μ l de la solución a pH = 7.4 en el ojo izquierdo e inmediatamente después, medición de la tasa de parpadeo de ambos ojos de manera simultánea durante 5 minutos. Para evitar la acumulación de líquido de la solución en las proximidades del ojo que pudiera interferir posteriormente con la medición del nivel de lágrima, secado de 3 segundos con una hemosteta.
- 4- Medición del nivel de lágrima del ojo izquierdo y del ojo derecho durante 30 segundos respectivamente.

- 5- Tras 3 minutos de reposo, aplicación de 5µl de solución a pH = 5 en el ojo izquierdo e inmediatamente después, medición de la tasa de parpadeo de ambos ojos de manera simultánea durante 5 minutos. Para evitar la acumulación de líquido de la solución en las proximidades del ojo que pudiera interferir posteriormente con la medición del nivel de lágrima, secado de 3 segundos con una hemosteta.
- 6- Medición del nivel de lágrima del ojo izquierdo y del ojo derecho durante 30 segundos respectivamente.

Durante la realización de los experimentos los animales se mantuvieron tapados con un aislante térmico para evitar la pérdida de calor y se monitoreó su temperatura corporal mediante una sonda rectal. También se controlaron los valores de temperatura y humedad de la sala.

3.3. Registros electrofisiológicos

3.3.1. Preparación de solución salina para los registros electrofisiológicos

Antes de realizar los registros electrofisiológicos se prepararon 500ml de solución salina a pH fisiológico (7.4) y 500ml de solución salina a pH ácido (5), repitiendo el proceso de preparación detallado anteriormente en el apartado 3.2.1. *Preparación de soluciones.*

3.3.2. Registros electrofisiológicos

Se realizaron grabaciones de las terminales nerviosas individuales de la córnea *in vitro* como se describe en estudios previos (Parra et al., 2010, 2014), (Brock et al., 1998).

Los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal®, Ventoquinol, Francia), mediante una inyección intraperitoneal de 0.1ml, con posterior dislocación cervical para confirmar su muerte. A continuación, utilizando las pinzas del material quirúrgico se extrajeron ambos ojos con una pequeña longitud de nervio óptico y con tejido circundante.

Los ojos extirpados se colocaron boca arriba en una cámara recubierta de silicona (Sylgard 154®, Dow Corning, MI, EE.UU) con un pequeño agujero que permitía conectar el nervio óptico con un tubo succionador que lo mantenía fijo y estable. El ojo se mantuvo, al inicio del registro,

bañado en la solución fisiológica salina control con un valor de pH 7.4 y a una temperatura basal $\sim 34^{\circ}\text{C}$, gracias a la utilización de un sistema de Peltier casero.

Se colocó un electrodo, formado por un capilar de vidrio 1.5 OD x 1.17 ID x 75 L mm y un filamento de plata, en contacto con la superficie de la córnea utilizando para ello un micromanipulador. Para generar un sello de alta resistencia que permitiera la grabación de los impulsos nerviosos, se aplicaba una ligera succión con una jeringuilla (*Figura 6*).

Los impulsos nerviosos fueron amplificados con un amplificador AC (Neurolog NL104, Digitimer, Welwyn, Reino Unido), filtrados por un módulo de filtros NL124 (Digitimer, Welwyn, Reino Unido), eliminándose las frecuencias por encima de 9 Hz y por debajo de 5kHz y almacenados a 25kHz en un ordenador, utilizando un convertidor analógico digital CED micro-1401 interfaz y el software Spike2 v.7.01. (ambos de Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido). Los estímulos aplicados a las terminales fueron estímulos térmicos de frío y calor en presencia de distinto pH. La estimulación con frío consistía en una rampa que disminuía la temperatura de la solución de 34°C a 20°C a una velocidad de $\sim 0.25^{\circ}\text{C} / \text{s}$ mientras que la estimulación con calor consistía en una rampa que elevaba la temperatura de la solución de 34°C a 45°C a una velocidad de $\sim 0.25^{\circ}\text{C} / \text{s}$. El cambio de pH se llevó a cabo cambiando la perfusión del ojo de una solución fisiológica salina con $\text{pH} = 7$ a otra con $\text{pH} = 5$.

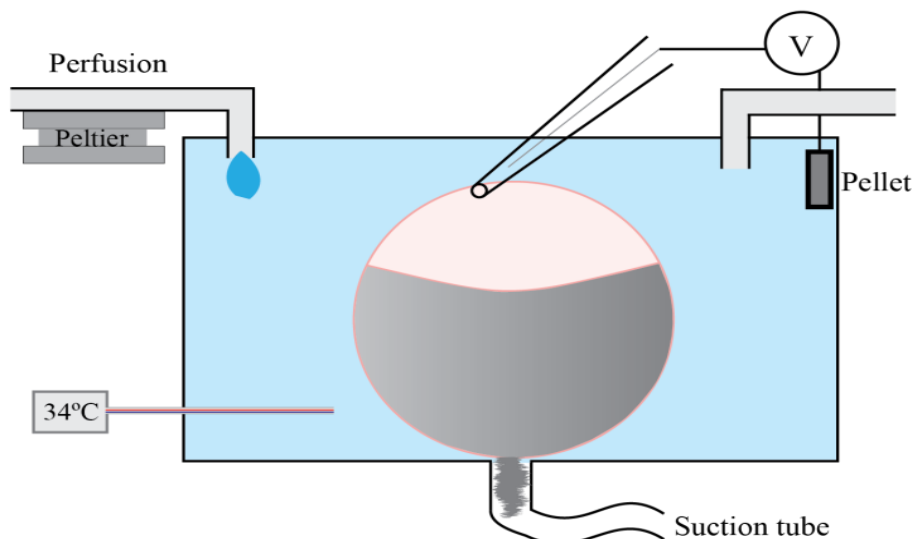


Figura 6. Montaje experimental usado para el registro extracelular de las terminaciones nerviosas corneales.

3.3.3. Protocolo experimental

Con el objetivo de obtener una muestra de las diferentes terminaciones nerviosas, el electrodo de registro se colocó en distintos puntos distribuidos por toda la superficie corneal, girando el ojo cuando fuera necesario con el fin de explorar la totalidad de la misma.

Después de cada aplicación del electrodo sobre la superficie corneal, la aparición de actividad de las terminaciones nerviosas, espontánea o provocada por un estímulo en el lugar de grabación, nos indicaba el éxito de la aplicación y la detección de una terminal nerviosa sensorial activa. Si considerábamos que la amplitud de la respuesta era óptima, realizábamos el protocolo completo y una vez terminado, el electrodo se trasladaba al siguiente punto de la superficie corneal comenzando de nuevo el proceso.

El protocolo consistía en que tras 2 minutos de perfusión con solución fisiológica salina a pH = 7.4 se aplicaba una rampa de frío y posteriormente una rampa de calor, dejando entre ellas 3 minutos de reposo de manera que las terminales pudieran recuperar sus condiciones basales.

Este proceso se repetía a continuación cambiando la solución fisiológica salina de pH = 7.4 por la solución de pH = 5.

Por último, la solución se cambiaba de nuevo, dejando que el ojo se lavara en solución fisiológica salina a pH = 7.4 durante unos minutos.

3.4. Análisis de los registros electrofisiológicos

El análisis de los registros electrofisiológicos se realizó utilizando Spike2 v.7.01 software (Electronic Design Cambridge, Cambridge, Reino Unido). Las terminales nerviosas registradas se filtraron considerando el límite basal como criterio para distinguirlas del ruido. El software detectaba las espigas y las separaba en función de sus formas y amplitudes, de manera que aquellas con forma y amplitud similar eran clasificadas en el mismo grupo (*Figura 7*).

Utilizando las herramientas que nos ofrece el programa informático se calcularon una serie de parámetros relacionados con la actividad de las terminaciones nerviosas:

- Actividad basal: Frecuencia basal media ($\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$) a la temperatura basal ($33,5 \pm 0,16$ ° C) medida durante los 60 segundos que preceden a un estímulo.

- Umbral de frío: Valor de la temperatura (°C) durante la rampa de frío en la que la frecuencia de las terminaciones nerviosas aumenta un 25% respecto a su basal.
- Respuesta al frío: Frecuencia de disparo ($\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$) durante la respuesta a frío.
- Frecuencia pico: Máxima frecuencia de disparo alcanzada durante la rampa de frío.
- Temperatura de la respuesta pico: Valor de la temperatura (°C) en la frecuencia pico.
- Respuesta al calor: Frecuencia de disparo ($\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$) durante la respuesta a calor.
- Umbral de calor: Valor de la temperatura (°C) durante la rampa de calor en la que la frecuencia de las terminaciones nerviosas aumenta un 25% respecto a su basal.

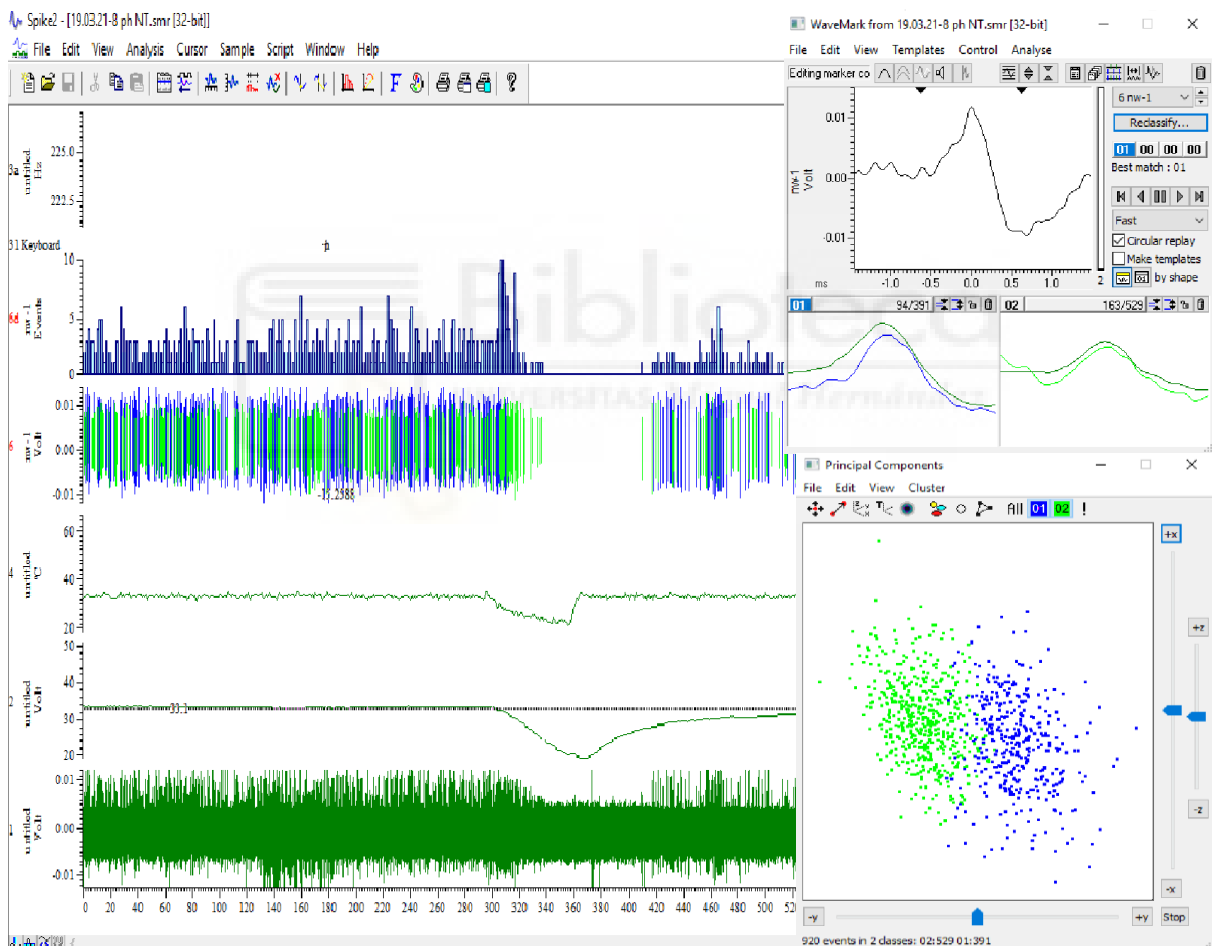


Figura 7. Uso del software Spike2 para analizar los registros electrofisiológicos. En la ventana grande se muestra la actividad registrada de dos terminaciones nerviosas. Los canales representados de arriba abajo son: tasa media de disparo ($\text{imp}\cdot\text{s}^{-1}$); actividad filtrada (mV); temperatura del calentador (°C); temperatura de la solución de perfusión que baña el ojo (°C) y los datos en bruto de la actividad grabada (mV). Las ventanas pequeñas muestran las diferentes espigas registradas y la distribución de las mismas en una nube de puntos.

3.5. Análisis estadístico

Los datos se recogieron y se procesaron para el análisis estadístico usando el software SigmaStat incluido en SigmaPlot software v.11 (*Systat Software Inc., Point Richmond, CA, EE.UU.*).

Para analizar las diferencias en la medición de las tasas de parpadeo y lagrimación se utilizaron el *Repeated Measures ANOVA on Ranks test*, el *One Way Repeated Measures ANOVA test* y el *T-test*.

Para analizar las diferencias en la actividad de las terminales nerviosas a los estímulos aplicados se utilizó el *Paired Student's t test*, a no ser que la distribución de los datos no fuera normal, en cuyo caso se utilizó la prueba no paramétrica *Signed Rank test*.

Los datos fueron expresados como media \pm SEM, siendo "n" el número de terminales nerviosas exploradas.

4. Resultados

4.1. Tasas de parpadeo

La tasa de parpadeo se midió en 3 ratones WT, de los cuales 2 eran hembras y 1 era macho, de 6 meses. Los resultados bajo las distintas condiciones experimentales se expresaron como número de parpadeos registrados en cada ojo durante los 5 minutos de medición y se muestran en la *Tabla 3*.

	OI (n=3)	OD (n=3)
Condiciones basales	5,333 \pm 3,527	8 \pm 3,464
pH = 7	5,667 \pm 2,603	5,333 \pm 2,603
pH = 5	9,333 \pm 4,631	7 \pm 3,055

Tabla 3. Número de parpadeos registrados en condiciones basales, con pH=7 y con pH=5 respectivamente.

En la *Figura 8* se representa el número de parpadeos registrados en el ojo izquierdo bajo tres condiciones experimentales: condiciones basales, con pH=7 y con pH=5.

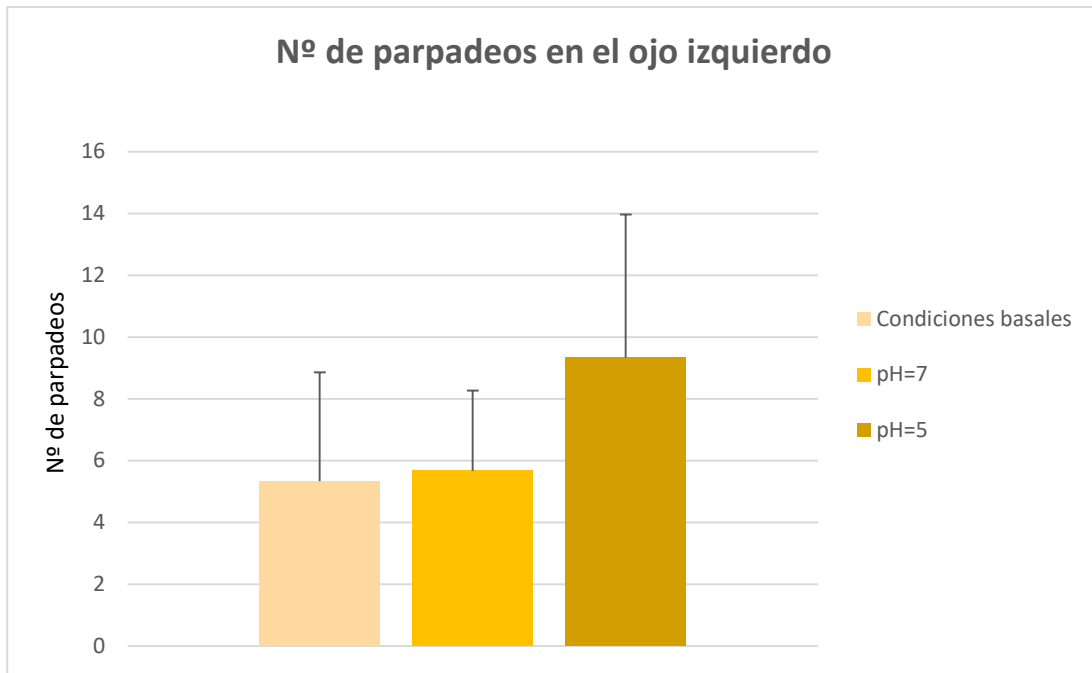


Figura 8. Representación del número de parpadeos registrados en el ojo izquierdo en condiciones basales, con pH=7 y con pH=5 respectivamente. Datos: media \pm SEM.

En la *Figura 9* se representa el número de parpadeos registrados en el ojo derecho bajo tres condiciones experimentales: condiciones basales, con pH=7 y con pH=5. Estas condiciones experimentales fueron aplicadas en el ojo izquierdo, como se especifica en el apartado 3.2.3. *Protocolo experimental*, para buscar un posible efecto contralateral de la acidez en el ojo derecho con cambios significativos en los valores.

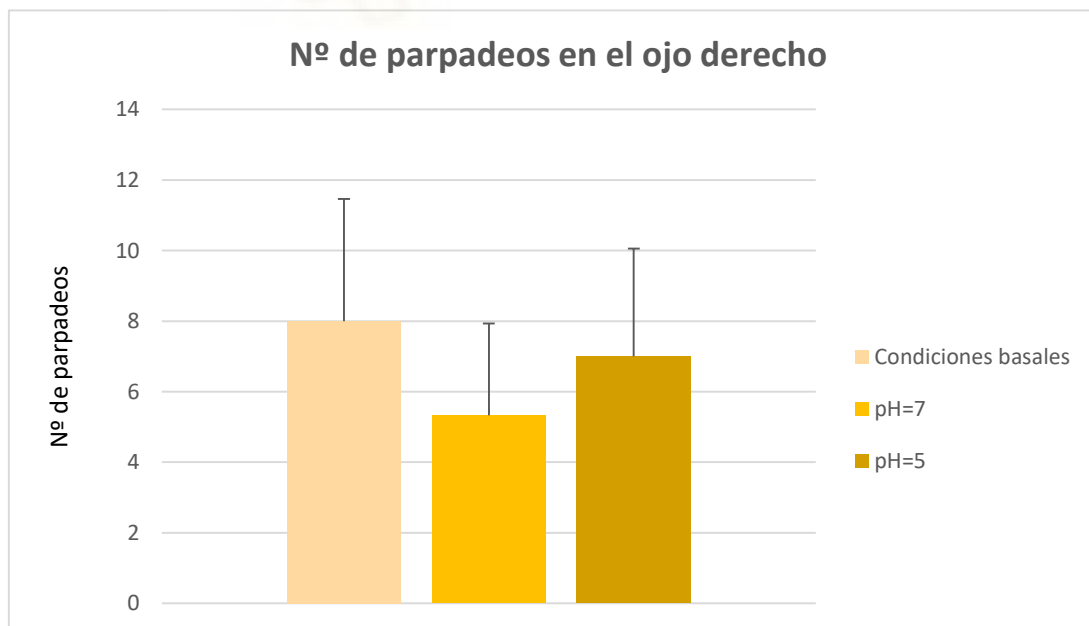


Figura 9. Representación del número de parpadeos registrados en el ojo derecho en condiciones basales, con pH=7 y con pH=5 respectivamente. Datos: media \pm SEM

En la *Figura 10* se representa el número de parpadeos registrados en ambos ojos únicamente bajo la condición experimental de pH=5.

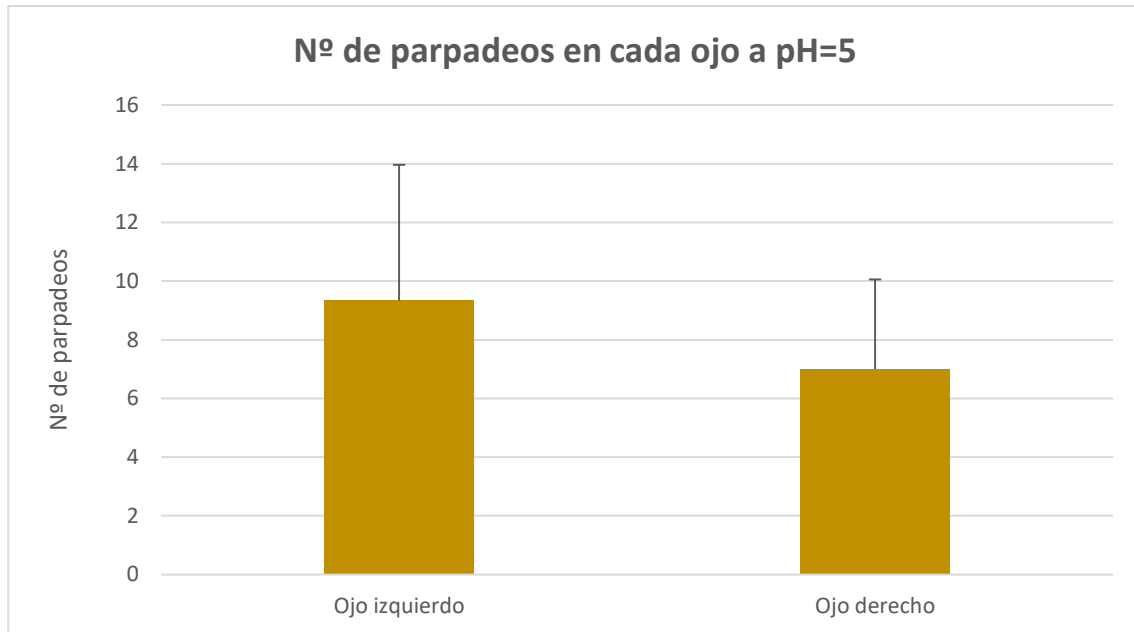


Figura 10. Representación del número de parpadeos en cada ojo a pH=5. Datos: media \pm SEM.

En estos experimentos no se encontraron diferencias significativas en las tasas de parpadeo bajo distinto pH (*Figura 8* y *Figura 9*), ni tampoco en las tasas de parpadeo a pH = 5 de ambos ojos entre sí (*Figura 10*). Sin embargo, dado que en 2 de los 3 ratones empleados los parpadeos observados coincidieron con movimientos del animal, no puede excluirse a priori la posibilidad de una afectación en la tasa de parpadeo causada por acidificación de la superficie ocular.

4.2. Tasa de lagrimación

La tasa de lagrimación se midió en ambos ojos en 3 ratones WT, de los cuales 2 eran hembras y 1 era macho de 6 meses tal y como se especifica en el apartado “*Medición de las tasas de parpadeo y lagrimación*”. La cantidad de lágrima se expresó como la longitud total de hilo de color rojo en milímetros (mm) como se muestra en la *Tabla 4*.

	OI (n=3)	OD (n=3)
Condiciones basales	16 ± 4,163	18 ± 2,309
pH = 7	-	-
pH = 5	31,333 ± 9,528	15,333 ± 6,888

Tabla 4. Nivel de lágrima medida en condiciones basales, con pH=7 y con pH=5 respectivamente.

Los resultados de la tasa de lagrimación a pH = 7 no pudieron completarse debido a la dificultad de inmovilizar a uno de los ratones empleados en el estudio, por lo que de estos resultados tampoco podemos deducir la influencia del pH en la tasa de lagrimación.

En la *Figura 11* se representa la medida de la lágrima registrada en ambos ojos únicamente bajo la condición experimental de pH=5. En estos experimentos tampoco se encontraron diferencias significativas en la tasa de lagrimación.

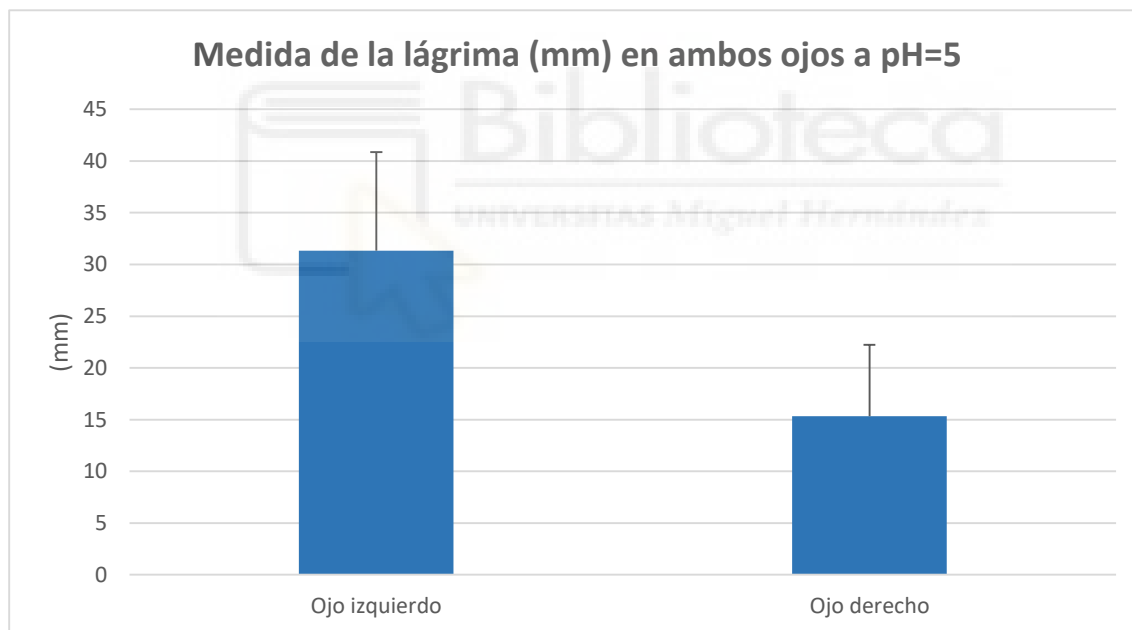


Figura 11. Representación de la medida de la lágrima en cada ojo a pH=5. Datos: media ± SEM

4.3. Actividad electrofisiológica de las terminales nerviosas de la córnea

Los registros electrofisiológicos se realizaron en 10 ojos obtenidos a partir de 5 ratones WT, 3 machos y 2 hembras, de 6 meses de edad. Se hicieron, en cada ojo, una media de 20 aplicaciones alrededor de la córnea y se identificaron un total de 11 terminaciones nerviosas sensoriales sensibles.

En función de las características de las respuestas obtenidas tras la aplicación de los diferentes estímulos, las neuronas sensoriales de la córnea se clasificaron como termorreceptores de frío (n=6), nociceptores polimodales (n=3) o indefinidos (n=2), estos últimos en el caso de ser terminales que presentan respuestas anómalas o ausencia de las mismas (*Figura 12*).

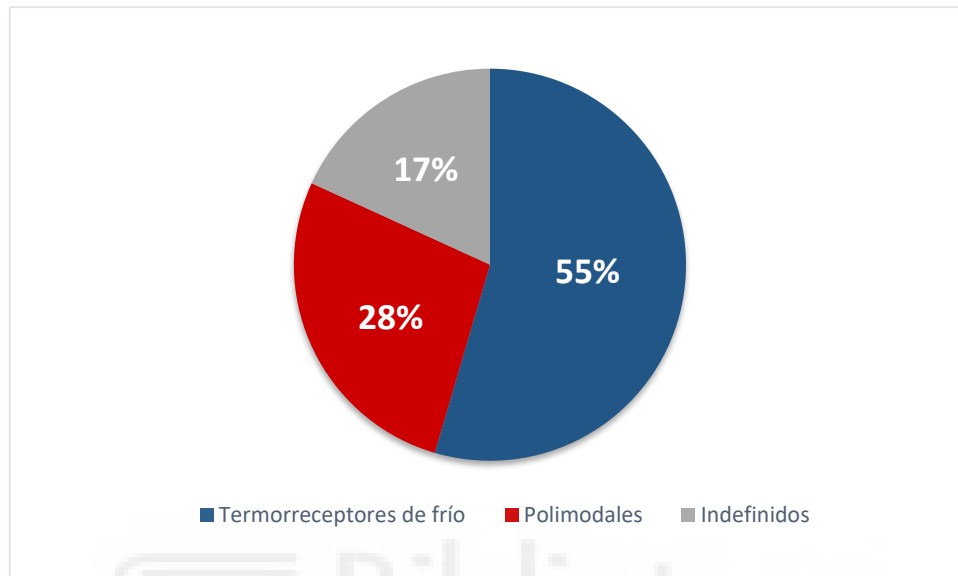


Figura 12. Proporción de las diferentes clases funcionales de terminales nerviosas registradas durante los experimentos.

4.4. Termorreceptores de frío

De las 11 terminaciones nerviosas registradas, 6 fueron termorreceptores de frío (55%) (*Figura 12*), ya que respondieron a la rampa de frío con un claro aumento de la frecuencia de disparo. Un ejemplo de estos registros se muestra en la *Figura 13*.

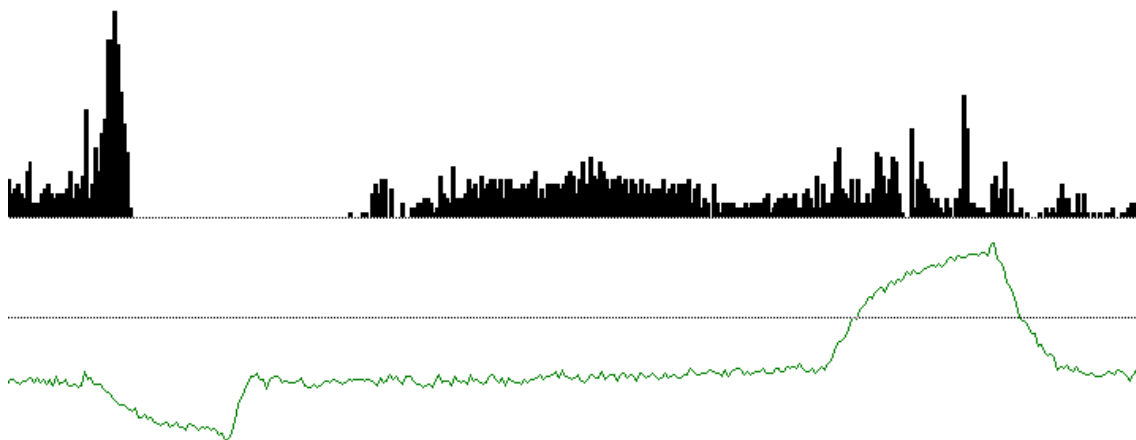


Figura 13. Registro de un termorreceptor de frío y su respuesta a una rampa de frío (hasta 20°C) y una rampa de calor (hasta 45°C). En la parte superior de la Figura, el canal 1, se representa la tasa media de disparo (imp/s^{-1}), y en la parte inferior, el canal 2, la temperatura del calentador (C°).

En la *Figura 14* se representa la actividad basal inicial medida en los termorreceptores de frío a pH=7 y a pH=5. Esta medida resulto ser significativamente mayor en condiciones de pH=5 ($1,095 \pm 0,418$, $P = 0,043$, $n=6$, Paired t-test).

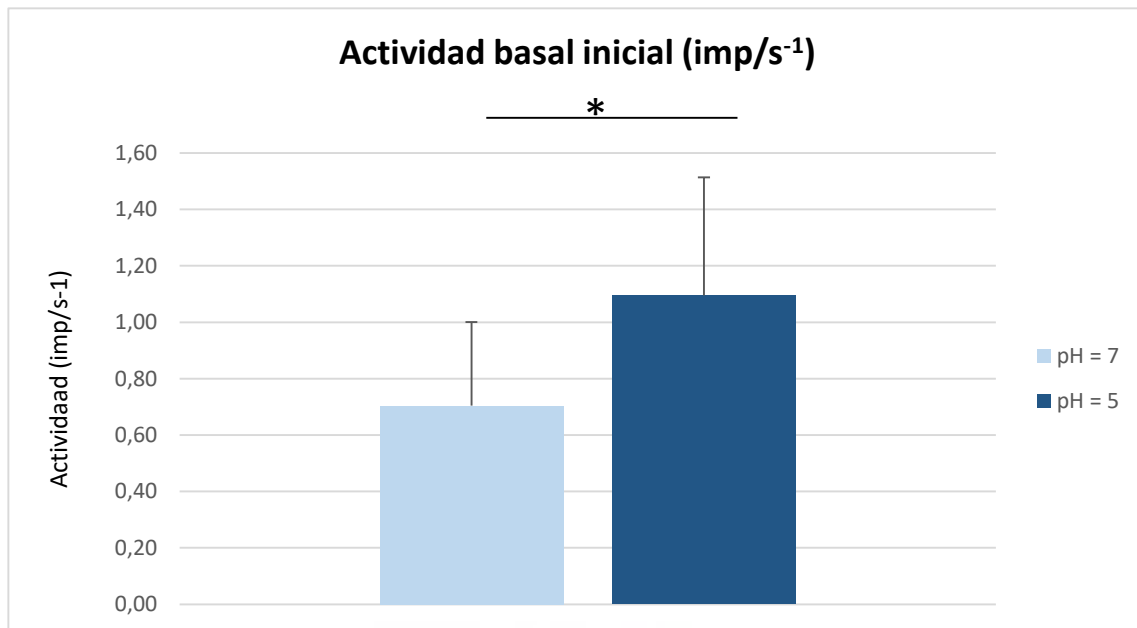


Figura 14. Actividad basal inicial (imp/s⁻¹) de los termorreceptores de frío a pH=7 y a pH=5 respectivamente ($0,705 \pm 0,296$ vs $1,095 \pm 0,418$, $P = 0,043$, $n=6$, Paired t-test).

La *Figura 15* muestra la evolución que tiene lugar en la actividad basal inicial de los termorreceptores de frío al cambiar de pH=7 y a pH=5.

Evolución de la actividad basal

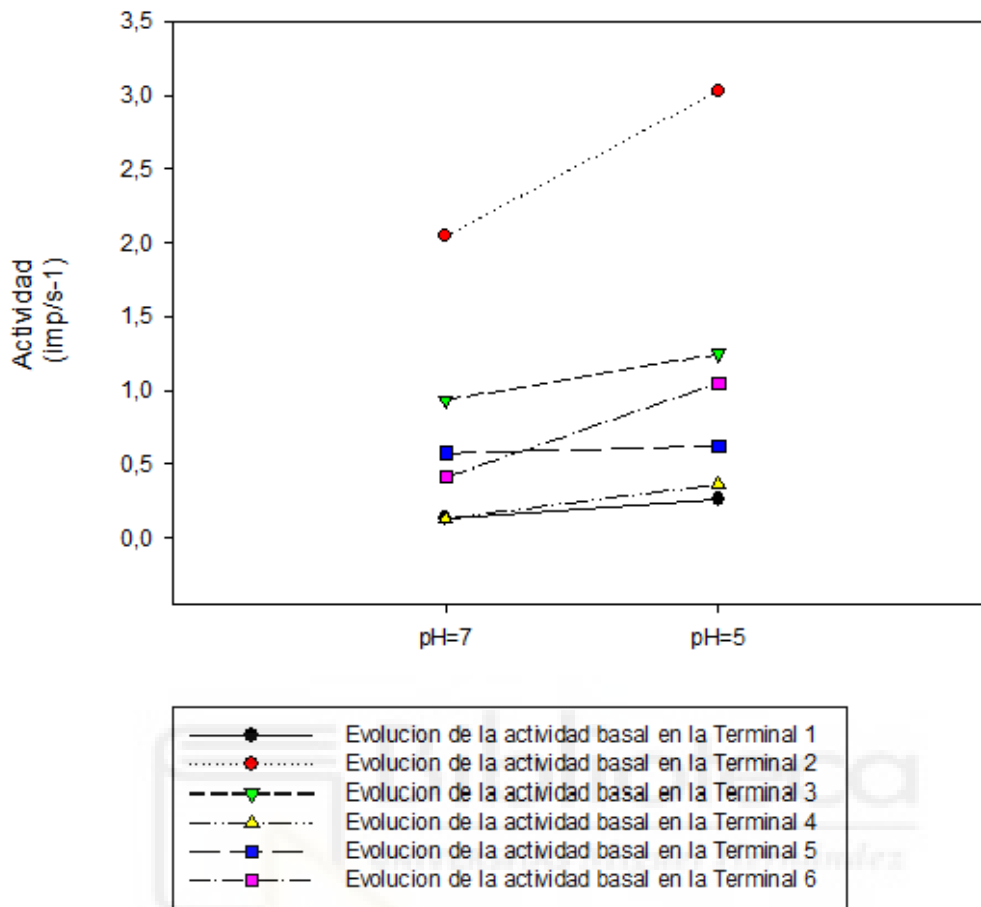


Figura 15. Evolución de la actividad basal inicial (imp/s^{-1}) de los termorreceptores de frío.

La respuesta a frío de los termorreceptores no se vio afectada por la acidificación, observándose valores muy similares tanto en el umbral de respuesta como en la magnitud de la misma (Tabla 5).

Sin embargo, en la respuesta al calor, a pesar de no observarse diferencias significativas por la falta de muestra, sí que se observó un aumento cualitativo de la respuesta a calor en presencia de $\text{pH} = 5$. Mientras que a $\text{pH} = 7$ sólo respondía una terminal, a $\text{pH} = 5$ respondían 4.

De los demás parámetros medidos, especificados en la Tabla 5, no se pueden comentar diferencias destacables ni cuantitativas ni cualitativas.

Termorreceptores de frío	Condición	
	pH = 7	pH = 5
Nº de terminales = 6		
Actividad basal inicial a 33º C (imp/s-1)	0,705 ± 0,296	1,095 ± 0,418
Rampa de frío de 33ºC a 20ºC		
Umbral de frío (ºC)	28,615 ± 1,564	28,485 ± 2,182
Respuesta al frío (imp/s-1)	4,011 ± 1,779	4,087 ± 1,626
Frecuencia pico (imp/s-1)	10,667 ± 3,190	12 ± 4,509
Temperatura de la frecuencia pico (ºC)	28,085 ± 1,466	28,287 ± 2,059
Rampa de calor de 33ºC a 45ºC		
Umbral de calor (ºC)	45,46	44,77 ± 1,879
Respuesta al calor (imp/s-1)	0,89	1,83 ± 0,560
Actividad basal a 33ºC de la vuelta de pH =5 a pH =7	0,524 ± 0,158	0,637 ± 0,135

Tabla 5. Medición de parámetros en los termorreceptores de frío.

4.5. Nociceptores polimodales

De las 11 terminaciones nerviosas registradas, 3 fueron nociceptores polimodales (28%) (Figura 12), ya que no respondieron a la rampa de frío pero sí a la rampa de calor. Un ejemplo de estos registros se muestra en la Figura 16.

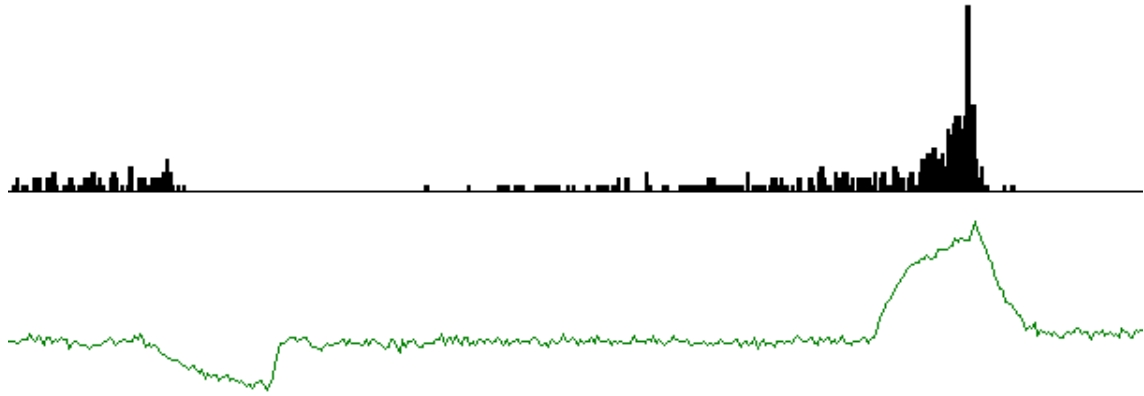


Figura 16. Registro de un nociceptor polimodal y su respuesta a una rampa de frío (hasta 20°C) y una rampa de calor (hasta 45°C). En la parte superior de la Figura, el canal 1, se representa la tasa media de disparo (imp/s^{-1}), y en la parte inferior, el canal 2, la temperatura del calentador ($^{\circ}\text{C}$).

La actividad basal de estos nociceptores polimodales no se vio afectada significativamente por el pH ácido, sin embargo, sí que se vio afectada su respuesta a temperaturas elevadas: la magnitud de la respuesta a calor fue significativamente mayor en condiciones de pH = 5 ($1,575 \pm 0,196$, $P = 0,034$, $n=3$, Paired t-test), como se puede observar en la Figura 17, aunque el umbral de respuesta era muy similar en ambas condiciones (Tabla 6).

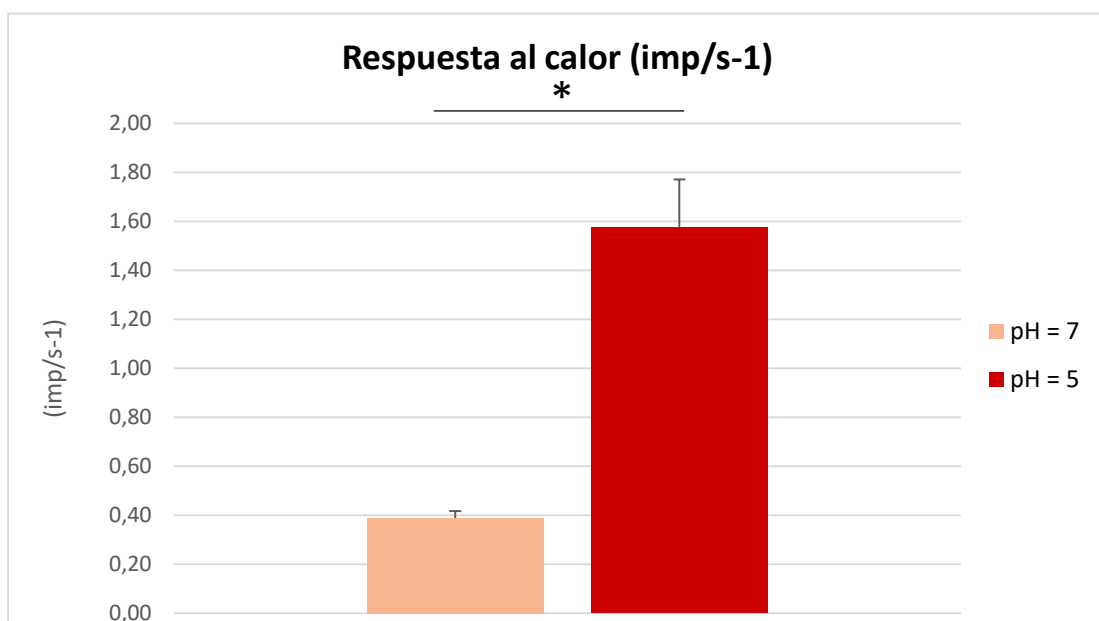


Figura 17. Respuesta al calor (imp/s^{-1}) de los nociceptores polimodales a pH=7 y a pH=5 respectivamente ($0,388 \pm 0,028$ vs $1,575 \pm 0,196$, $P = 0,034$, $n=3$, Paired t-test).

La *Figura 18* muestra la evolución que tiene lugar en la respuesta a la rampa de calor de los nociceptores polimodales al cambiar de pH=7 y a pH=5.

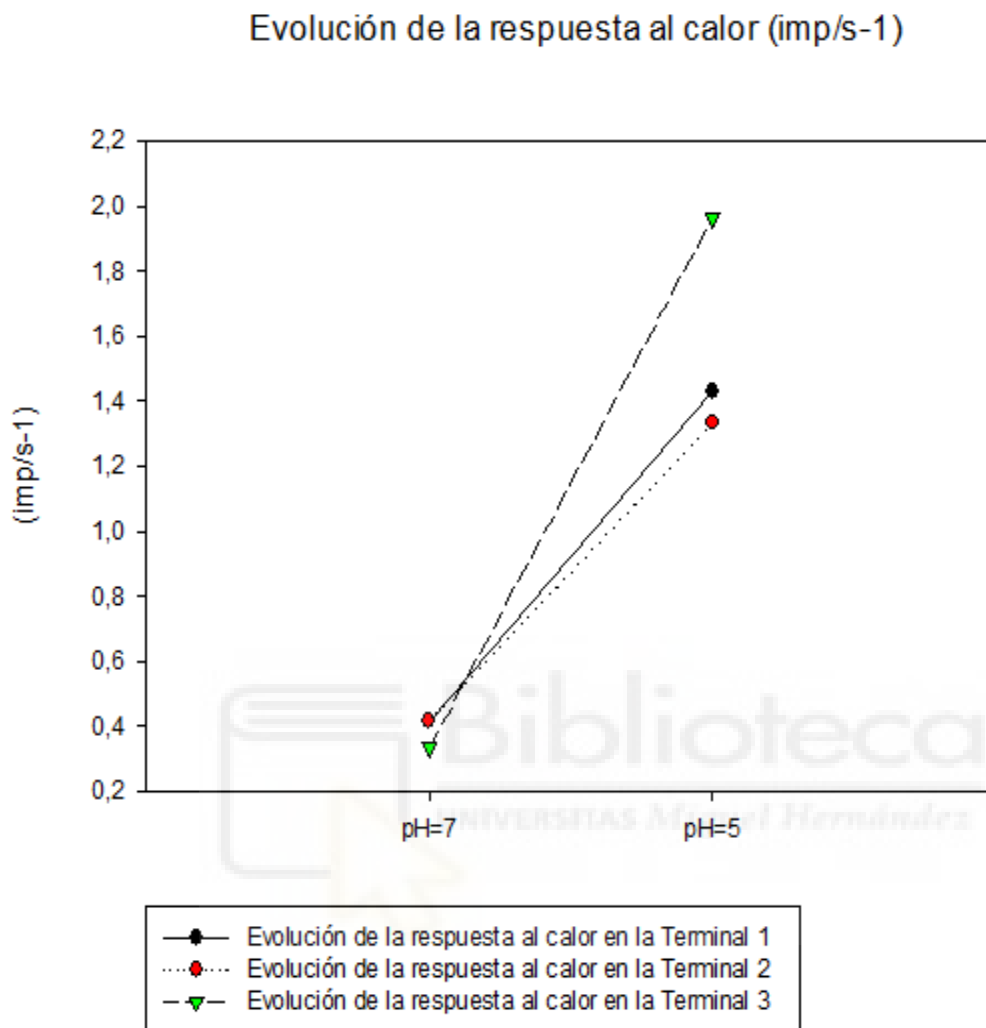


Figura 18. Evolución de la respuesta al calor (imp/s-1) de los nociceptores polimodales

De los demás parámetros medidos, especificados en la *Tabla 6*, no se pueden comentar diferencias destacables ni cuantitativas ni cualitativas.

Nociceptores polimodales	Condición	
	pH = 7	pH = 5
Nº de terminales = 3		
Actividad basal inicial a 33º C (imp/s-1)	0,153 ± 0,056	0,574 ± 0,285
Rampa de calor de 33ºC a 45ºC		
Umbral de calor (ºC)	40,168 ± 2,781	39,772 ± 3,158
Respuesta al calor (imp/s-1)	0,388 ± 0,028	1,575 ± 0,196
Actividad basal a 33ºC de la vuelta de pH =5 a pH =7	0,333 ± 0,159	0,273 ± 0,133

Tabla 6. Medición de parámetros en los nociceptores polimodales.

5. Discusión

En este trabajo, hemos definido funcionalmente las neuronas del ganglio trigémino que inervan la córnea como termorreceptores de frío y nociceptores polimodales, coincidiendo con los resultados obtenidos para otras especies de mamíferos y también para ratones jóvenes (Gallar, Pozo, Tuckett, & Belmonte, 1993) (Acosta et al., 2013) (Carmen Acosta et al., 2001) aunque no se han encontrado mecanorreceptores, probablemente debido al bajo número de terminaciones nerviosas registradas.

Nuestros resultados mostraron un 28% de nociceptores polimodales del total de terminaciones nerviosas registradas, un porcentaje menor del registrado en otras especies o en el propio ratón (Giraldez et al., 1979) (Britain, 1981) (Gallar et al., 1993) (Brock, Mclachlan, & Belmonte, 2008) (Acosta et al., 2013) (Carmen Acosta et al., 2014) (González-González, Bech, Gallar, Merayo-Lloves, & Belmonte, 2017). Esto puede deberse a que el 17% de

terminaciones nerviosas registradas que no fueron identificadas correspondieran a “nociceptores silentes”, cuya presencia en el ojo se ha sugerido (MacIver & Tanelian, 1993).

El porcentaje de termorreceptores de frío identificado fue del 55%, un valor elevado en comparación con otras especies (Gallar et al., 1993) (Brock et al., 2008), confirmándose la densa inervación de la córnea de ratón por estos terminales, como consta en investigaciones inmunocitoquímicas (Parra et al., 2010) (Ivanusic, Wood, & Brock, 2013).

Por otro lado, nuestro estudio muestra que la actividad basal de los termorreceptores de frío es significativamente mayor en presencia de pH ácido. Estos terminales tienen un papel importante en la regulación de la lagrimación basal (Acosta et al., 2013) (Parra et al., 2010).

La alteración de este proceso puede conducir a la sequedad ocular y a enfermedades como el síndrome del ojo seco, que afecta a 344 millones de personas en todo el mundo, a 5 millones de personas en nuestro país y cuya prevalencia se ha demostrado que es mayor en mujeres y que aumenta con la edad. (Schaumberg, 2009) (Moss, Klein, & Klein, 2000) (Kasetuwan, Gorvanich, Erjongmanee, Thienprasiddhi, & Jitapunkul, 2012)

También se muestra en nuestro estudio que, en los nociceptores polimodales, la respuesta al calor es significativamente mayor en presencia de pH ácido. Estos terminales participan en la lagrimación refleja (Acosta et al., 2013) y son responsables de la aparición de sensaciones dolorosas y desagradables como el ardor y el escozor ocular (Belmonte, Acosta, Merayo-Llives, & Gallar, 2015), pudiendo ser esta la causa de la aparición de sensaciones de malestar tras la exposición a una atmósfera contaminada que cuente con la presencia de sustancias acidificantes como el dióxido de azufre (SO₂), los óxidos de nitrógeno (NO, NO₂) o el dióxido de carbono (CO₂).

En los termorreceptores de frío, el canal TRPM8 es crucial en el desarrollo y mantenimiento de la actividad basal (Parra et al., 2010). El aumento de dicha actividad observado a pH=5 en nuestros experimentos, sugiere una posible afectación de la actividad del canal como consecuencia del cambio de pH extracelular, ya que en otros estudios se ha demostrado que la activación de TRPM8 por distintos agonistas se ve modulado de manera diferencial por el pH (Andersson, 2004).

En cuanto al aumento en el número de respuestas a calor observadas en los termorreceptores de frío, puede deberse a la sensibilización del canal TRPV1, responsable de las respuestas a

calor (Tominaga & Tominaga, 2005) y pH (Michael J Caterina et al., 1997) (Tominaga et al., 1998), y que coexpresa con el canal (Morenilla-Palao et al., 2014). Dicha sensibilización debida a cambios de pH y otros factores como el calor, ha sido descrita por distintos (Huang, Li, Yu, Wang, & Caterina, 2011) (Reid, Babes, & Pluteanu, 2002) (Viana, De la Peña, & Belmonte, 2002).

Por otra parte, dado que este canal se expresa en los nociceptores polimodales, el aumento de la magnitud de la respuesta observada en ellos también podría ser debido a la sensibilización del mismo.

6. Conclusiones

Lo resultados obtenidos en este trabajo indican que:

- Los termorreceptores de frío localizados en la superficie corneal presentan una mayor actividad basal en presencia de pH ácido.
- El número de termorreceptores de frío localizados en la superficie corneal que responden a temperaturas elevadas (hasta 45°C) es mayor en presencia de pH ácido.
- Los nociceptores polimodales localizados en la superficie corneal muestran una mayor respuesta a temperaturas elevadas (hasta 45°C) en presencia de pH ácido.

6.1. Proyección futura

Dado que la superficie ocular es fácilmente accesible y puede ser examinada mediante procedimientos sencillos y poco invasivos, puede tener utilidad como indicador del impacto de la polución sobre la salud.

Estos resultados sirven como base para la hipótesis de que la exposición a sustancias acidificantes como el dióxido de azufre (SO₂), los óxidos de nitrógeno (NO_x) o el dióxido de carbono (CO₂), responsables de la contaminación atmosférica, inducen alteraciones en las respuestas fisiológicas de las terminaciones nerviosas de la superficie ocular.

Los progresos en la comprensión de la fisiología y en los métodos de evaluación de la superficie ocular en los últimos años contrastan con la falta de estudios que investiguen el

efecto de la contaminación atmosférica en el ojo. Si se aumenta la investigación en este campo en un futuro cercano, se podrán esclarecer las consecuencias de la exposición a la contaminación atmosférica y por tanto disminuir y evitar sus efectos nocivos.

7. Bibliografía

Abelson, M. B., Udell, I. J., & Weston, J. H. (1981). Normal Human Tear Measurement. *Archives of Ophthalmology*, 99, 301.

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>

Andersson, D. A. (2004). TRPM8 Activation by Menthol, Icilin, and Cold Is Differentially Modulated by Intracellular pH. *Journal of Neuroscience*, 24(23), 5364–5369. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0890-04.2004>

ANDRÉS, S.; GARCÍA, M.L.; ESPINA M.; VALERO, J.; VALLS O, (1988). Tear pH, air pollution, and contact lenses.

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., & 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>

Benemei, S., Patacchini, R., Trevisani, M., & Geppetti, P. (2015). TRP channels. *Current Opinion in Pharmacology*, 22, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.02.006>

Benson, C. J., Eckert, S. P., & McCleskey, E. W. (1999). *Acid-Evoked Currents in Cardiac Sensory*

Neurons A Possible Mediator of Myocardial Ischemic Sensation.

- BOE number 151, June 23, 2004. (2004). I. Disposiciones Generales. *Boletín Oficial Del Estado*, núm. 151, 22737–22754. <https://doi.org/BOE-A-2012-5403>
- Britain, G. (1981). *Physiol.* (1981), 321,. 355–368.
- Brock, J. A., Mclachlan, E. M., & Belmonte, C. (2008). *Rapid Report Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea.* 211–217.
- Carmen Acosta, M., Belmonte, C., & Gallar, J. (2001). Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *Journal of Physiology*, 534(2), 511–525. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00511.x>
- Carmen Acosta, M., 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>
- Caterina, M J, & Julius, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 487–517.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.487>
- Caterina, Michael 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.* 389(October).
- Duprat, F., Lauritzen, I., Patel, A., & Honore, E. (2007). *The TASK background K 2P channels : chemo- and nutrient sensors.* 30(11). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.003>
- Fu, Q., Mo, Z., Lyu, D., Zhang, L., Qin, Z., Tang, Q., ... Yao, K. (2017). Air pollution and outpatient visits for conjunctivitis: A case-crossover study in Hangzhou, China. *Environmental Pollution*, 231, 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.109>
- Gallar, J., Pozo, M. A., Tuckett, R. P., & Belmonte, C. (1993). Response of Sensory Units With Unmyelinated Fibres. *Journal of Physiology*, 468, 609–622.
- Galor, A., Kumar, N., Feuer, W., & Lee, D. J. (2014). Environmental Factors Affect the Risk of Dry Eye Syndrome in a United States Veteran Population. *Ophthalmology*, 121(4), 972-

973.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.11.036>

Giraldez, F., Geijo, E., & Belmonte, C. (1979). Response characteristics of corneal sensory fibers to mechanical and thermal stimulation. *Brain Research*, 177(3), 571–576. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90475-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90475-X)

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>

Huang, S. M., Li, X., Yu, Y., Wang, J., & Caterina, M. J. (2011). TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Molecular Pain*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-37>

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>

Jung, S. J., Mehta, J. S., & Tong, L. (2018). Effects of environment pollution on the ocular surface. *Ocular Surface*, 16(2), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.03.001>

Kantor, A. (2010). Actualización clínica en ojo seco para el médico no oftalmólogo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(6), 883–890. Retrieved from www.theocularsurface.com

Kasetsuwan, N., Gorvanich, S., Erjongmanee, S., Thienprasiddhi, P., & Jitapunkul, S. (2012). Prevalence of dry eyes in elderly Thai population (the Romklao eye study). *Asian Biomedicine*, 6(6), 875–882. <https://doi.org/10.5372/1905-7415.0606.134>

Kellenberger, S., & Schild, L. (2019). *Epithelial Sodium Channel / Degenerin Family of Ion Channels : A Variety of Functions for a Shared Structure*. 735–767.

Kress, M., & Waldmann, R. (2006). *CHAPTER 8 Acid Sensing Ionic Channels*. 57(06). [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(06\)57007-3](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(06)57007-3)

Łatka, P., Nowakowska, D., Nowomiejska, K., & Rejdak, R. (2018). How air pollution affects the eyes — a review. *Ophthalmology Journal*, 3(2), 58–62.

<https://doi.org/10.5603/oj.2018.0032>

- MacIver, M. B., & Tanelian, D. L. (1993). Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *13*(10), 4511–4524. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8410200>
- 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>
- Moss, S. E., Klein, R., & Klein, B. E. K. (2000). Prevalance of and risk factors for dry eye syndrome. *Archives of Ophthalmology*, *118*(9), 1264–1268. <https://doi.org/10.1001/archopht.118.9.1264>
- Murube J, Wilson S, Ramos-Esteban J (2001). New horizons in the relief and control of dry eye
- 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)
- Novaes, P., Hilário do Nascimento Saldiva, P., Matsuda, M., Macchione, M., Peres Rangel, M., Kara-José, N., & Berra, A. (2010). The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environmental Research*, *110*(4), 372–374. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.03.003>
- 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>
- Patel, S., Farrell, J., Blades, K. J., & Grierson, D. J. (1998). The value of a phenol red impregnated thread for differentiating between the aqueous and non-aqueous deficient dry eye. *Ophthalmic and Physiological Optics*, *18*(6), 471–476. [https://doi.org/10.1016/S0275-5408\(98\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0275-5408(98)00005-2)
- Profazio, V., Versura, P., Torreggiani, A., Caramazza, R., & Cellini, M. (2003). Eye Discomfort

and Air Pollution. *Ophthalmologica*, 213(2), 103–109.
<https://doi.org/10.1159/000027401>

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(May), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms8150>

Reid, G., Babes, A., & Pluteanu, F. (2002). A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: Properties and role in cold transduction. *Journal of Physiology*, 545(2), 595–614. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024331>

Schaumberg, D. A. (2009). Prevalence of Dry Eye Disease Among US Men. *Archives of Ophthalmology*, 127(6), 763. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.103>

Suzuki, M., Watanabe, Y., Oyama, Y., Mizuno, A., & Kusano, E. (2003). Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. 353, 189–192.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.09.041>

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., ... Julius, D. (1998). The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. 21, 531–543.

Tominaga, M., & Tominaga, T. (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 451(1), 143–150. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1457-8>

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>

Wemmie, J. A., Price, M. P., & Welsh, M. J. (2006). *Acid-sensing ion channels : advances , questions and therapeutic opportunities*. 29(10).

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.06.014>

Yagi, J., Wenk, H. N., Naves, L. A., & McCleskey, E. W. (2006). Sustained Currents Through ASIC3 Ion Channels at the. 501–509. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000238388.79295.4c>