



Programa de Doctorado en Neurociencias  
Instituto de Neurociencias

Contribución de los termorreceptores de  
frío de la superficie ocular al control  
del parpadeo espontáneo

Tesis Doctoral presentada por  
Miguel Delicado Miralles

Directora: Dra. María del Carmen Acosta Boj  
Codirectora: Dra. Juana Gallar Martínez

Universidad Miguel Hernández de Elche

– 2024 –







La presente Tesis Doctoral, titulada “Contribución de los termorreceptores de frío de la superficie ocular al control del parpadeo espontáneo” se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

- Delicado-Miralles M, Velasco E, Díaz-Tahoces A, Gallar J, Acosta MC, Aracil-Marco A. Deciphering the Action of Perfluorohexyloctane Eye Drops to Reduce Ocular Discomfort and Pain. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Oct 26;8:709712. doi: 10.3389/fmed.2021.709712.





La Dra. D<sup>a</sup> María del Carmen Acosta Boj, directora de la presente Tesis Doctoral, y la Dra. D<sup>a</sup> Juana Gallar Martínez, codirectora,

**INFORMAN:**

Que D. Miguel Delicado Miralles ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Contribución de los termorreceptores de frío de la superficie ocular al control del parpadeo espontáneo”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos en Sant Joan d’Alacant, a los efectos oportunos, en la fecha indicada en la firma.

Directora de la tesis  
Dra. D<sup>a</sup> María del Carmen Acosta Boj

Codirectora de la tesis  
Dra. D<sup>a</sup> Juana Gallar Martínez

Dña. Cruz Morenilla Palao, Coordinadora del programa de Doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

INFORMA:

Que D. Miguel Delicado Miralles ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Contribución de los termorreceptores de frío de la superficie ocular al control del parpadeo espontáneo”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo a los efectos oportunos en Sant Joan d’Alacant, en la fecha indicada en la firma.

Dra. Cruz Morenilla Palao

Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias



Para la realización de la presente tesis doctoral, D. Miguel Delicado Miralles ha disfrutado de un contrato predoctoral, financiado por el programa de Subvenciones para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral de la Generalitat Valenciana y el Fondo Social Europeo de la Unión Europea, con referencia ACIF/2019/054. Para el trabajo experimental se ha contado con la financiación de los proyectos SAF2017-83674-C2-2-R y PID2020-115934RB-I00, ambos financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación–Agencia Estatal de Investigación (DOI:MCIN/AEI/10.13039/50110001103)/FEDER “Una manera de hacer Europa”.



GENERALITAT  
VALENCIANA







*La vida es un constante cambio de ciclo.*

*No nos damos cuenta durante el camino.*

*Por eso necesitamos puntos y finales  
que nos recuerden los olvidos.*

*Este ciclo ha vivido mi mejor y peor versión.*

*Amor a la ciencia, odio y un punto medio.*

*Obsesión y pasión; anhedonia y depresión;  
Ego y humildad.*

*Nunca me interesó el ojo.*

*Luego, por conocerlo, despertó mi interés.*

*Ahora descubro que no hacía falta.*

*El método hace al investigador.*

*No sé a dónde me llevará el siguiente ciclo.*

*Si la ciencia y mi vida encontrarán armonía.*

*Poco me preocupa el destino  
mientras me alimento día a día.*

## Agradecimientos

A *María del Carmen (MCarmen)*, por ser la mejor jefa y directora de tesis que he podido tener. Ni exagero, ni pretendo adular. De hecho, como buen científico, tengo argumentos para defender mi posición. Es responsable y humilde. Me ha acompañado en todo el proceso de tesis como responsable y como compañera. Me ha enseñado, con el ejemplo, que los valores y el trabajo duro van de la mano. También me ha enseñado que, en el campo tan jerarquizado de la investigación, el conocimiento o la posición no tienen por qué traducirse en ego. A una persona se le escucha, sea quien sea. Un doctorando es un estudiante, un trabajador con derechos y responsabilidades y un compañero de trabajo. La humanidad es de sus valores más remarcables. Me ha enseñado que la parte profesional es importante, pero también la personal. Siempre ha estado pendiente de mi madre y de mi situación. Jamás me presionó y fue permisiva cuando más lo necesitaba. Tampoco ha faltado tiempo en cualquier reunión para escucharme, aconsejarme o, simplemente, charlar. Ha dado la cara por mí cuando ha hecho falta y me ha consolado cuando he pasado por una situación difícil. Con todo ello, gracias MCarmen porque has influido en el tipo de persona que quiero ser de mayor y se parece en algo a ti.

A *Juana*, por ser la persona que ha hecho esto posible y abrirnos las puertas de su casa. Ella fue la única que apostó por nosotros, "los fisios". Quizá no sea consciente, pero tengo grabado en mi mente la primera vez que me senté a hablar con ella tras mi vuelta removida de Madrid. Lo primero que hizo fue preguntarme, ¿cómo estás? ¿qué tal por Madrid? No fue gran cosa, pero para mí significó mucho y casi me puse a llorar. Venía de una mala experiencia donde nunca vi esa humildad ni cercanía. Por los valores que nos ha enseñado y que siempre me acompañarán.

Gracias también por ser rigurosa con nuestros datos, argumentos y razonamientos. Por enseñarnos la importancia del detalle y el perfeccionismo.

A *Kike*, simplemente por todo. Por confiar en mí más de lo que yo lo hago y por darme el valor que me falta. Por ser tan listo y aún más loco y pasional. Pero sobre todo por esforzarte constantemente en tratar de ser mejor. Por haber crecido y vivido juntos tantas experiencias estos años, por transformarnos juntos, por compartir: aprender, estudiar, descubrir, cocinar, hacer deporte, jugar, hablar y callar. Porque eres el responsable último de que haya encontrado apasionante la ciencia al infectarme con el gusanillo de la curiosidad. Gracias a ti soy una persona muy diferente.

A *Vicente*, por lo valiente que eres. Porque te fuiste a vivir fuera del país. Por el valor de reconocer que no estabas bien y que tu antiguo trabajo no te llenaba. Por tener esa curiosidad innata y querer explorarla. Por tener los cojones de dar el paso, unirme al camino de la investigación y disfrutar del proceso. Por haber vivido los 3 juntos. Por afrontar la adversidad y la incomodidad de crecer. Por ser tan llano e inmenso.

A *Fito y Ari*, por ser dos de las principales piezas en mi enseñanza y desarrollo profesional y personal.

A *Fernando, Lau, Almu, Omar y Fede* por haber compartido dentro y fuera del labo. Me enseñaron que la ciencia no es siempre tan bonita y que la realidad es siempre más complicada. Cómo la afrontas es determinante y con ellos se afronta genial.

A *Carol, Susana, David y Víctor*, por ser parte de esta familia y siempre estar predispuestos a ayudar, compartir y cuidar.

A Cruz y a Elvira, por el esfuerzo y la preocupación que muestran por cada alumno y, en especial, por mi caso particular.

A *Nicky*, por ser mi compañera de viaje y por estar SIEMPRE ahí. Eres de lo mejor que me ha dado esta fase y uno de los pilares fundamentales de mi vida. No sabes lo agradecido que estoy de conocerte y todo lo que me aportas. Lo divertida, alegre, empática, atenta y demás adjetivos que te caracterizan. Por haberme escuchado siempre que lo he necesitado, por aconsejarme, por preocuparte. Por haber ayudado a mi madre y a toda mi familia. Jamás podré expresarte con palabras lo agradecido que me siento. Gracias por haberme entendido y querido incluso en mis peores momentos. Si soy mejor persona es por ti. Porque ojalá me quisiera, entendiera y valorara tanto como tú lo haces por mí.

A *Patri*, a *Majo* y al resto del equipo *NiP*, por ser mi segunda familia. Por confiar en este proyecto y apostar por él. Por tener ilusión. Por nosotros y esta nueva etapa.

A Sergio, Carlos, María Isabel, Jose Vicente, Mari Carmen, Emilio y Víctor, por haber sido mis profesores antes y mis compañeros ahora. Por confiar en mí y tratarme como uno más.

A *todos mis amigos y amigas*, por quererme por como soy. Porque son tus raíces las que te recuerdan como eres y te ayudan a no perder tu esencia.

A Andrea Vizcaíno, porque has sido crucial para mi estabilidad psicológica. Gracias por ayudarme a superar el peor tramo de mi vida, a entender que no hay nada malo en mí, a soltar, a escucharme y a hacer las paces conmigo mismo. Por la salud mental.

A *Barbablanca*, por haber sido un buen padre.

A *mi familia*, por ser una familia unida, sea lejana o cercana. Por la fortaleza que hemos demostrado tener y porque nos apoyaremos en la situación que sea. En especial a mis hermanos Cristina y Alberto, porque, aunque a veces tenga dudas, sé mejor que nunca que siempre nos tendremos ahí.

A *mis padres*, porque siempre me han apoyado y confiado en mí. Estudiar fisioterapia, viajar a Madrid, abandonar mi profesión para investigar en el ojo, volver a la fisioterapia. Por alocado que fuera lo que les dijera, ellos me apoyarían incondicionalmente si me veían ilusionado y feliz. Hace tiempo que detecté que están orgullosos de mí, y como hijo, es una de las sensaciones más bonitas y satisfactorias que he sentido nunca. Os quiero mucho.

A *mi mamá*, por estar hoy aquí. Por ser tan dura como para romper las expectativas. Por jamás abandonar la esperanza. Esa esperanza que reconozco casi haber perdido en más de una ocasión. Porque no sabes lo que te necesito y porque hoy eres mi mayor regalo. Por seguir sonriendo, aunque a veces pueda parecer que faltan los motivos.



Porque yo últimamente sólo sonrío si tú sonríes.

Esta tesis es para ti mamá.

Te quiere mucho tu hijo,

Miguel



# Índice

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	5
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. ANATOMÍA DE LA INERVACIÓN SENSORIAL DE LA SUPERFICIE OCULAR .....	13
1.1.1. <i>Origen, distribución y arquitectura.</i> .....	14
1.2. FUNCIONES DE LA INERVACIÓN SENSORIAL DE LA SUPERFICIE OCULAR .....	18
1.2.1 <i>Tipos de receptores sensoriales</i> .....	19
1.2.2. <i>Sensaciones evocadas</i> .....	23
1.2.3. <i>Trofismo</i> .....	24
1.2.4. <i>Lagrимación y parpadeo: mecanismos de protección de la superficie ocular</i> .....	25
1.3. INERVACIÓN SENSORIAL DE LA SUPERFICIE OCULAR EN LA ENFERMEDAD DE OJO SECO .....	32
1.3.1. <i>Definición, diagnóstico y clasificación de la Enfermedad de Ojo Seco (EOS)</i> .....	32
1.3.2. <i>Cambios en la inervación sensorial de la superficie ocular en la EOS.</i> .	35
1.3.3. <i>Tratamiento de la EOS: el perfluorohexiloctano (F6H8).</i> .....	38
2. OBJETIVOS .....	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	49
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL OBJETIVO ESPECÍFICO 1 .....	49
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS UTILIZADOS PARA LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2 Y 3 .....	58
4. RESULTADOS .....	65
4.1. EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE F6H8 SOBRE LA SUPERFICIE OCULAR .....	65
4.2. EFECTOS DE LA ACTIVIDAD DE LOS TERMORRECEPTORES DE FRÍO EN LA FRECUENCIA Y CARACTERÍSTICAS DEL PARPADEO ESPONTÁNEO .....	74
4.3. CARACTERÍSTICAS Y FRECUENCIA DEL PARPADEO ESPONTÁNEO DURANTE LA ACTIVACIÓN O LA INHIBICIÓN DE LOS TERMORRECEPTORES DE FRÍO DE LA SUPERFICIE	

OCULAR EN CONDICIONES QUE MODIFICAN EL ESTADO COGNITIVO (TAREAS AV Y N-AV) Y EL INPUT VISUAL (OSCURIDAD) .....	79
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
5.1. EL PERFLUOROHEXILOCTANO DISMINUYE LA TEMPERATURA DE LA SUPERFICIE OCULAR, AUMENTANDO LA ACTIVIDAD DE LOS TERMORRECEPTORES DE FRÍO.....	87
5.2. AUMENTAR LA ACTIVIDAD DE LOS TERMORRECEPTORES DE FRÍO DE LA SUPERFICIE OCULAR AUMENTA LA FRECUENCIA DE PARPADEO ESPONTÁNEO Y AFECTA SUS CARACTERÍSTICAS .....	91
5.3. EL AUMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LOS TERMORRECEPTORES DE FRÍO DE LA SUPERFICIE OCULAR TIENE UNA MAYOR INFLUENCIA SOBRE EL PARPADEO ESPONTÁNEO QUE EL ESTADO COGNITIVO ATENCIONAL .....	93
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>116</b>
ANEXO I:.....	117







## Abreviaturas

AL	Anestésicos Locales
AV	Atención Visual
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina ( del inglés Calcitonin gene-related peptide)
CsA	Ciclosporina A
DEQ-5	Cuestionario de ojo seco de 5 ítems (del inglés Five-item Dry Eye Questionnaire )
EMG	Electromiografía
EOS	Enfermedad de ojo seco
EVA	Escala visual analógica
FP	Frecuencia de parpadeo
F6H8	Perfluorohexiloctano
HB-LT	Termorreceptores de frío con alta actividad basal y bajo umbral (del inglés High background, low threshold cold thermoreceptors)
IBI	Intervalo entre parpadeos (del inglés Interblink Interval)
LB-HT	Termorreceptores de frío con baja actividad basal y alto umbral (del inglés Low background, high threshold cold thermoreceptor)
NRS	Escala de valoración numérica (del inglés Numerical Rate Scale)
OO	Músculo <i>orbicularis oculi</i> , músculo orbicular del párpado
OSDI	Ocular Surface Disease Index, cuestionario para medir la severidad de la enfermedad de la superficie ocular
POm	Núcleo posterior medial del tálamo
TBNC	Complejo nuclear del trigémino del tronco del encéfalo (del inglés Trigeminal brainstem nuclear complex)
TSC	Temperatura de la superficie corneal
TRP	Receptor de membrana de potencial transitorio (del inglés Transient receptor potential)
Vc	Subnúcleo <i>caudalis</i> del núcleo espinal del TBNC
Vi	Subnúcleo <i>interpolaris</i> del núcleo espinal del TBNC
Vp	Núcleo principal del TBNC
VPM	Núcleo ventral posteromedial del tálamo
Vo	Subnúcleo <i>oralis</i> del núcleo espinal del TBNC
Vs	Núcleo espinal del TBNC
V1	Rama oftálmica del nervio trigémino
V2	Rama maxilar del nervio trigémino
V3	Rama mandibular del nervio trigémino
S1	Corteza somatosensorial primaria
S2	Corteza somatosensorial secundaria
ST	Sin tratamiento

## Resumen

La inervación sensorial de la superficie ocular desempeña un papel fundamental en varios mecanismos de protección del ojo como son el parpadeo y la lagrimación. Sin embargo, aún no se conoce la contribución de la actividad de los diferentes tipos de receptores sensoriales de la superficie ocular a la regulación del parpadeo espontáneo. El objetivo general de la presente tesis ha sido *determinar el papel de los termorreceptores de frío de la superficie ocular en el control de la frecuencia y las características del parpadeo espontáneo en personas voluntarias sanas.*

En primer lugar, exploramos los efectos del perfluorohexiloctano (F6H8), una molécula introducida en los últimos años para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco que está ofreciendo muy buenos resultados, sobre el parpadeo y la lagrimación, midiendo además la temperatura de superficie de la córnea mediante termografía por infrarrojos, antes y a diferentes tiempos durante una hora después de aplicar F6H8. Encontramos que el F6H8 reduce de manera sostenida la temperatura de la superficie ocular, a la vez que provoca un aumento de la producción lagrimal y la frecuencia de parpadeo. Propusimos que, al disminuir la temperatura de la superficie ocular tratando tópicamente con F6H8, se estaba induciendo un aumento de la actividad de los termorreceptores de frío de la córnea que, si bien no era suficiente para evocar sensaciones oculares conscientes, sí era capaz de inducir cambios en el parpadeo y la producción de lágrima.

A continuación, investigamos la influencia de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular sobre el control del parpadeo espontáneo, analizando tanto la frecuencia como algunas características del parpadeo a partir del registro electromiográfico de superficie del músculo *orbicularis oculi*. Encontramos que,

cuando aumentábamos la actividad de los termorreceptores de frío al enfriar la superficie ocular instilando F6H8, además de incrementarse significativamente la frecuencia de parpadeo, se modificaban las características electromiográficas del mismo, registrando señales de mayor amplitud y menor duración que antes del tratamiento con F6H8. En contraste, cuando disminuíamos la actividad de los termorreceptores de frío y del resto de receptores sensoriales de la superficie ocular con anestésicos locales tópicos, no se producían cambios significativos ni en la frecuencia ni en las características electromiográficas.

Por último, planteamos estudiar si la modulación ejercida sobre el parpadeo por el aumento de la actividad de los termorreceptores de frío ejercía mayor o menor influencia que el estado cognitivo. Encontramos que los efectos del tratamiento con F6H8 sobre el parpadeo espontáneo también se daban durante la realización de diferentes pruebas de atención, así como en condiciones de oscuridad. Específicamente, el tratamiento con F6H8 evitaba la conocida disminución de la frecuencia de parpadeo característica de la atención visual. Estos hallazgos sugieren que la influencia ejercida por el incremento del input sensorial de los termorreceptores de frío oculares sobre el control del parpadeo espontáneo es mayor que la influencia descendente ejercida por la corteza cerebral en base al estado cognitivo de la persona.

En resumen, los resultados de esta tesis muestran que el tratamiento tópico con perfluorohexiloctano, al producir un enfriamiento de la superficie ocular, aumenta la actividad los termorreceptores de frío y esto resulta en cambios significativos en la frecuencia y características del parpadeo espontáneo. Asimismo, muestran que, incluso cuando el incremento de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular es pequeño e insuficiente para evocar sensaciones oculares conscientes, ese input sensorial determina el patrón de parpadeo, superando incluso

la modulación en base al estado cognitivo, lo que constituye un poderoso mecanismo de protección para evitar el enfriamiento intenso y la desecación de la superficie anterior del ojo.



## Abstract

Sensory innervation of the ocular surface plays a fundamental role in several eye protection mechanisms, such as blinking and tearing. However, the contribution of the activity of different types of sensory receptors on the ocular surface to the regulation of spontaneous blinking remains unknown. The general objective of this thesis has been to determine the role of cold thermoreceptors on the ocular surface in controlling the frequency and characteristics of spontaneous blinking in healthy volunteers.

First, we explored the effects of perfluorohexyloctane (F6H8), a molecule introduced in recent years for the treatment of dry eye disease that is offering excellent results on blinking and tearing, also measuring the surface temperature of the cornea using infrared thermography before and at different times for one hour after applying F6H8. We found that F6H8 sustainably reduces corneal surface temperature while causing an increase in tear production and blink frequency. We proposed that by decreasing the temperature of the ocular surface by treating topically with F6H8, an increase in the activity of the corneal cold thermoreceptors was induced, which, although it was not sufficient to evoke conscious ocular sensations, was capable of causing changes in blinking and tear production.

Next, we investigated the influence of the activity of cold thermoreceptors of the ocular surface on the control of spontaneous blinking, analyzing both the frequency and some characteristics of spontaneous blink from surface electromyographic recordings of the *orbicularis oculi* muscle. We found that increasing the activity of cold thermoreceptors by instilling F6H8, in addition to significantly increasing the blinking frequency, the electromyographic characteristics of the blink were modified. Recording signals of greater amplitude and shorter duration than before treatment

with F6H8 were obtained. In contrast, when we decreased the activity of cold thermoreceptors and other sensory receptors innervating the ocular surface with topical local anesthetics, there were no significant changes in frequency or the electromyographic characteristics of blink.

Finally, we proposed to study whether the modulation exerted on blinking by the increased activity of cold thermoreceptors had more or less influence than the cognitive state. We found that the effects of F6H8 on spontaneous blinking also occurred during performance of different attentional tasks and in dark conditions. Specifically, topical F6H8 treatment prevented the well-known decrease in blink rate characteristic of visual attention tasks. These findings suggest that the influence exerted by the increased sensory input of cold thermoreceptors on the control of spontaneous blinking is greater than the descending influence exerted by the cerebral cortex based on the person's cognitive state.

In summary, the results of this thesis show that topical treatment with perfluorohexyloctane, which reduces the ocular surface temperature, increases the activity of corneal cold thermoreceptors, and this results in significant changes in the frequency and characteristics of spontaneous blinking. Results also show that, even when the increase of ocular cold thermoreceptors' activity is slight and insufficient to evoke conscious ocular sensations, this sensory input determines the blink pattern, even surpassing the modulation based on the cognitive state, thus constituting a powerful protective mechanism to prevent intense cooling and desiccation of the anterior surface of the eye.







# Introducción



Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

# 1. Introducción

## 1.1. Anatomía de la inervación sensorial de la superficie ocular

El globo ocular de los seres humanos es una esfera de unos 2,5 cm de diámetro que se encuentra recogida en la órbita y, por tanto, sólo una sexta parte está expuesta al entorno. Está compuesto por tres capas: la túnica fibrosa, que es la más externa, la túnica vascular o úvea y la retina, que es la capa más interna, donde se inicia la vía visual. La túnica fibrosa está formada esencialmente por tejido conectivo y se compone de la esclerótica, que cubre la gran mayoría del ojo dotándole de color blanco, rigidez y forma, y la córnea (Kels *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2022).

La córnea está compuesta por cinco capas que le dotan un grosor total de 540-700  $\mu\text{m}$  y que ordenadas de interior a exterior son: endotelio, membrana de Descemet, estroma, capa de Bowman y epitelio. Se trata de un tejido transparente que permite el paso de la luz al interior del ojo y, al mismo tiempo, la refracta. Por ende, la córnea carece de tejidos opacos, como los vasos sanguíneos (Ludwig *et al.*, 2021). De hecho, según la Organización Mundial de la Salud, la opacidad corneal es la cuarta causa de ceguera en el mundo, por detrás de las cataratas, el glaucoma y la degeneración macular (Pineda, 2020).

La conjuntiva, por su parte, es una delgada membrana mucosa que recubre tanto el borde interior de los párpados (conjuntiva palpebral) como la esclerótica (conjuntiva bulbar). Está compuesta por un epitelio cúbico estratificado que descansa sobre una fina membrana basal que lo separa de un estroma de tejido conectivo con abundantes glándulas lagrimales accesorias y vasos sanguíneos y linfáticos. A diferencia de la córnea, está muy vascularizada y también contiene mastocitos, células plasmáticas y neutrófilos que facilitan la respuesta inmunitaria celular (Takahashi *et al.*, 2013).

La córnea, junto con la conjuntiva son los tejidos expuestos del ojo, formando la superficie ocular.

#### 1.1.1. Origen, distribución y arquitectura.

La inervación sensorial de la superficie ocular proviene del nervio nasociliar originado de la rama oftálmica (V1) del nervio trigémino, que, a su vez, se subdivide en los nervios ciliares (Figura 1). Los nervios ciliares entran en el globo ocular a través de la lámina cribosa e inervan la mayoría de los tejidos oculares, exceptuando el cristalino y la retina (Stapleton *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018).

La morfología de la inervación sensorial de la córnea ha sido ampliamente estudiada, por lo que se conoce con detalle. Una vez las fibras nerviosas alcanzan la córnea, penetran en el estroma corneal, se ramifican y discurren rodeados por una lámina basal y células de Schwann. Los axones mielinizados (aproximadamente el 20-30% de los axones totales) pierden su vaina de mielina al penetrar en el estroma (De Felipe & Belmonte, 1999; Bron *et al.*, 2014) contribuyendo a la conservación de la transparencia de la córnea. Las ramas más anteriores de esta ramificación se anastomosan formando una red densa y compleja de fibras que se conoce como el plexo nervioso estromal anterior. En cambio, la mitad posterior, más interna, del estroma humano y el endotelio corneal carecen de fibras sensoriales. La capa más superficial y densa de este plexo estromal se encuentra por debajo de la capa de Bowman y se conoce como plexo nervioso subepitelial. Algunas de estas fibras son axones únicos y delgados que no penetran hacia el epitelio corneal, formando una malla altamente anastomosada. Otras fibras, que son de tamaño medio, sí penetran la capa de Bowman llegando hasta el epitelio, fundamentalmente en la córnea periférica e intermedia, dando lugar al plexo nervioso subbasal (Figura 1).

Las fibras de este plexo subbasal se ramifican en múltiples fibras paralelas, constituyendo una estructura neuroanatómica única de la córnea que se denominan traíllas ("leashes" en inglés). Las fibras nerviosas de estas "leashes" se interconectan hasta que dejan de ser reconocibles como individuales, formando finalmente un plexo nervioso relativamente homogéneo. La microscopía confocal *in vivo* ha mostrado que el plexo nervioso subbasal forma un patrón espiral de fibras nerviosas cuyo centro se denomina "vórtice" (Nagasaki & Zha, 2003). Las fibras nerviosas del plexo subbasal se separan individualmente y ascienden desde la capa basal del epitelio, distribuyéndose entre las células epiteliales de las capas intermedias y llegando hasta las capas más superficiales del epitelio corneal (Müller *et al.*, 2003; Marfurt *et al.*, 2010), finalizando su recorrido como terminaciones nerviosas libres. Estas terminaciones nerviosas intraepiteliales son muy numerosas y presentan un íntimo contacto con las células epiteliales. De hecho, en algunos casos, las células epiteliales muestran invaginaciones que pueden llegar a rodear completamente la terminación nerviosa (Müller *et al.*, 2003; Marfurt *et al.*, 2010).

La córnea presenta una densidad de inervación 300-600 veces superior a la de la piel (Rózsa & Beuerman, 1982; Müller *et al.*, 2003) lo que le confiere una sensibilidad extraordinaria (Kenshalo, 1960; Millodot, 1984; Collins *et al.*, 1989; Belmonte *et al.*, 2017). A pesar de la alta densidad de fibras corneales, éstas suelen tener campos receptores grandes, generando un alto grado de solapamiento, lo que proporciona a la córnea de baja discriminación espacial ante los estímulos externos (Belmonte *et al.*, 2004a).

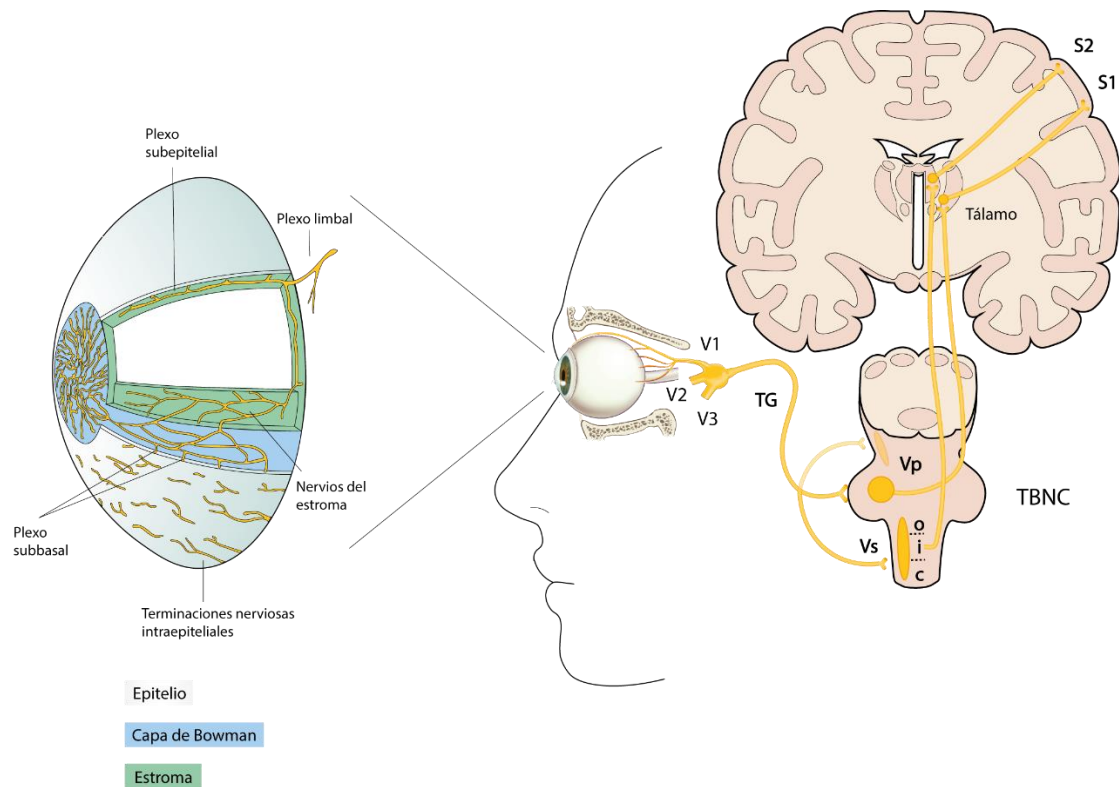


Figura 1 | Inervación sensorial de la córnea: origen, distribución, arquitectura y vías centrales. TG: ganglio del trigémino; V1: rama oftálmica del nervio trigémino; V2: rama maxilar del nervio trigémino; V3: rama mandibular del nervio trigémino; Vp: núcleo principal del complejo nuclear troncoencefálico del trigémino (TBNC); Vs: núcleo espinal del TBNC; o: subnúcleo *oralis*; i: subnúcleo *interpolaris*; c: subnúcleo *caudalis*; S1: corteza somatosensorial primaria; S2: corteza somatosensorial secundaria.

Respecto a la inervación de la conjuntiva y del borde de los párpados, la información disponible es escasa. La conjuntiva también se encuentra inervada por las ramas ciliares del nervio nasociliar de la rama oftálmica (V1) del trigémino. Sin embargo, también participan otras ramas del nervio oftálmico como la rama frontal o lagrimal y algunas ramas de la rama maxilar (V2) del trigémino, de la que se origina el nervio infraorbitario (Panneton *et al.*, 2010). La conjuntiva, al igual que la córnea, está inervada fundamentalmente por axones mielinizados finos y no mielinizados que contienen CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) o sustancia P. Dichos axones finalizan como terminaciones nerviosas libres, habitualmente situadas alrededor de los vasos sanguíneos y linfáticos del estroma conjuntival, los acinos de

las glándulas de Meibomio o el epitelio conjuntival (Belmonte *et al.*, 2011). Además, en el ojo humano y de primates hay algunos axones mielinizados que alcanzan la conjuntiva limbal asociados a estructuras similares a los corpúsculos de Krause de la piel (Gallar J & Acosta, in press).

El borde de los párpados también está innervado por terminaciones nerviosas libres localizadas entre las células epiteliales, así como por axones asociados a estructuras especializadas, similares a las terminaciones del disco de Merkel y a los corpúsculos de Meissner descritos en la piel (Gallar J & Acosta, in press). En cuanto a la zona donde se encuentran las pestañas, está innervada por axones mielinizados que acaban como terminales lanceoladas asociadas, de manera similar a la piel vellosa (Gallar J & Acosta, in press). Estas estructuras especializadas suelen asociarse a mecanorreceptores de bajo umbral, lo que explica la gran sensibilidad mecánica de borde del párpado (Gallar J & Acosta, in press).

### 1.1.2. Vías centrales

Las proyecciones centrales de las neuronas trigeminales se dirigen a la porción ventral del complejo nuclear ipsilateral del trigémino en el tronco del encéfalo (TBNC, de sus siglas en inglés). El TBNC está compuesto por el núcleo principal del trigémino (Vp) y el núcleo trigeminal espinal (Vs), que es alargado y se subdivide anatómicamente y funcionalmente en los subnúcleos *oralis* (Vo), *interpolaris* (Vi) y *caudalis* (Vc) (Belmonte *et al.*, 2011). Un reducido número de las neuronas trigeminales que innervan la superficie ocular proyectan a Vp. La mayoría de las neuronas trigeminales corneales proyectan a la zona intermedia entre Vi y Vc, a las láminas I y II del Vc y la zona de transición con la médula espinal cervical superior (Vc/C1), así como a la formación reticular bulbar adyacente (Belmonte *et al.*, 2011) (Figura 1). Las neuronas de Vi/Vc responden a todas las modalidades de estímulo y están relacionadas con el control del parpadeo, mientras que las que se encuentran en el área Vc/C1

responden solo al calor y los irritantes químicos, lo que sugiere que las aferencias a esta región provienen de las neuronas nociceptivas polimodales del ganglio trigémino (Belmonte *et al.*, 2011, 2017). Poco se conoce sobre las neuronas de las regiones Vp y Vo del TBNC que inervan la superficie ocular o los tejidos perioculares (Belmonte *et al.*, 2011, 2017).

La mayoría de las neuronas de segundo orden que procesan información originada en la superficie ocular proyectan a varios lugares del sistema nervioso central, incluidas otras regiones del tronco encefálico como el núcleo salivar superior/núcleo motor del nervio facial, y al tálamo contralateral, aunque todavía se sabe poco sobre la vía sensorial central involucrada en las sensaciones oculares (Pellegrini *et al.*, 1995; Hirata *et al.*, 2000; Bereiter *et al.*, 2000; Belmonte *et al.*, 2017). Las áreas más posteriores y mediales del tálamo somatosensorial contralateral reciben información corneal (Hirata *et al.*, 2000) (Figura 1), cuya somatotopía corresponde a la representación de la rama oftálmica del trigémino (Rausell & Jones, 1991; Nosedá *et al.*, 2008). Estas neuronas talámicas proyectan a las áreas corticales somatosensorial primaria (S1) y secundaria (S2) responsables de las sensaciones y reacciones de dolor (Figura 1).

Algunas neuronas de segundo orden de Vi/Vc y de Vc/C1 que procesan información de la superficie ocular proyectan hacia el área parabraquial, que a su vez está conectada con la corteza insular, cingulada y prefrontal, y la amígdala, el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal. Estas proyecciones proporcionan el sustrato neural para los componentes afectivos de las sensaciones evocadas por la estimulación ocular, así como para la participación del sistema nervioso autónomo en el dolor ocular (Belmonte *et al.*, 2017).

## 1.2. Funciones de la inervación sensorial de la superficie ocular



### 1.2.1 Tipos de receptores sensoriales

Gracias a los experimentos electrofisiológicos, que permiten registrar la actividad eléctrica de las neuronas sensoriales en respuesta a diferentes estímulos, se realizó la caracterización funcional de los receptores sensoriales de la superficie ocular (Belmonte & Giraldez, 1981; Tanelian & Beuerman, 1984; Belmonte *et al.*, 1991, 2004a, 2004b; Gallar *et al.*, 1993, 2014; González-González *et al.*, 2017; Santiago *et al.*, 2017). Los receptores sensoriales de la córnea han sido ampliamente estudiados, describiéndose mecanonociceptores, nociceptores polimodales y termorreceptores de frío. Adicionalmente, en el limbo esclerocorneal se pueden encontrar mecanorreceptores de bajo umbral (Belmonte *et al.*, 1997, 2004a, 2004c). La heterogeneidad funcional de las neuronas sensoriales del trigémino viene dada por la diferente expresión de determinadas proteínas de membrana, que participan en la transducción y señalización de los estímulos físicos externos, como los canales iónicos TRP, “Receptores de membrana de potencial transitorio”, en inglés “Transient receptor potencial”.

Los mecanonociceptores (que suponen aproximadamente un 15% del total) responden exclusivamente a la estimulación mecánica y suelen estar asociados a fibras A-delta. Su respuesta es de adaptación relativamente rápida, es decir, es rápida y breve ante cualquier estimulación, aunque ésta sea sostenida en el tiempo, por lo que la capacidad de estos receptores para codificar la intensidad y la duración de un estímulo es baja. Tienen campos receptores redondeados cubriendo un 10% de la superficie corneal (Figura 2). El grupo de Ardem Patapoutian descubrió que los canales Piezo eran la base molecular para la detección neuronal de estímulos mecánicos (Coste *et al.*, 2010). Puesto que las fibras corneales de los ratones *knockout* de Piezo2 muestran una respuesta reducida a los estímulos mecánicos, se generó la

evidencia de que el Piezo2 supone la base molecular de la mecano-transducción de las neuronas corneales (Fernández-Trillo *et al.*, 2020).

Los nociceptores polimodales (que suponen el 70%), se denominan así porque pueden ser activados por una gran diversidad de estímulos nocivos o potencialmente nocivos (mecánicos, de calor e irritantes químicos). Tienen campos receptores grandes que cubren, a veces, un cuarto de la córnea y se extienden más allá del limbo, hasta la esclera o la conjuntiva bulbar (Figura 2). Estos receptores se activan de manera proporcional a la intensidad del estímulo aplicado, disparando repetitiva e irregularmente durante todo el estímulo (Gallar *et al.*, 1993). La mayoría de estos receptores están asociados a axones amielínicos, de conducción lenta (fibras C). En determinadas situaciones se sensibilizan, disminuyendo su umbral de respuesta y aumentando la respuesta a un estímulo de la misma intensidad (Belmonte & Giraldez, 1981). La capsaicina activa los nociceptores polimodales de la córnea (Belmonte *et al.*, 1991) actuando a través del canal TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997). Además de responder a la capsaicina, el TRPV1 responde a calor nocivo ( $>42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y al pH ácido, entre otros estímulos, por lo que TRPV1 sería uno de los canales más importantes en la transducción de los nociceptores polimodales (Pozo *et al.*, 1992; Alamri *et al.*, 2015; Belmonte *et al.*, 2017), hasta tal punto de considerarse el marcador molecular putativo de este tipo celular. Además de expresar TRPV1, los nociceptores polimodales también expresan otros canales iónicos como TRPA1, ASIC o Piezo, lo que proporciona precisamente a estos nociceptores su capacidad de respuesta polimodal (Frutos-rincón *et al.*, 2022).

Los termorreceptores de frío (que suponen el 10-15%) responden específicamente a la disminución de la temperatura y pueden asociarse a fibras A-delta y C. Tienen campos receptores pequeños (alrededor de 1 mm de diámetro) que se encuentran por toda la córnea, siendo más frecuentes en la zona periférica (Figura 2). Fundamentalmente el canal TRPM8 confiere a los receptores corneales su

sensibilidad al frío (Peier *et al.*, 2002; Bautista *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2010; Quallo *et al.*, 2015), aunque en su actividad también intervienen otros canales como los de K<sup>+</sup> (Viana *et al.*, 2002). El canal TRPM8 también confiere a los termorreceptores de frío corneales la capacidad de responder a un estímulo químico, como el mentol, y a la osmolaridad (Parra *et al.*, 2014; Quallo *et al.*, 2015). Los termorreceptores de frío se han subclasificado en dos poblaciones, atendiendo a su frecuencia basal de disparo a temperatura basal de la córnea (actividad espontánea a aproximadamente 34°C) y a su umbral de respuesta al enfriamiento (Gallar *et al.*, 1993; González-González *et al.*, 2017). Los termorreceptores de frío con alta actividad basal y bajo umbral de respuesta al frío, en inglés “high background-low threshold” (HB-LT) presentan una elevada actividad espontánea a la temperatura basal de la córnea y tienen un umbral de respuesta al frío bajo, lo que les proporciona la capacidad de detectar variaciones pequeñas de temperatura. Los HB-LT son los receptores de frío más frecuentes (70%). Por el contrario, los termorreceptores de frío de baja actividad basal y de alto umbral de respuesta al frío, en inglés “low background-high threshold” (LB-HT), son una subpoblación menos abundante (30%) que presentan baja actividad basal y precisan de estímulos de frío de mayor intensidad para activarse (alto umbral).

Se ha sugerido la existencia de receptores sensoriales silentes en la córnea (MacIver & Tanelian, 1993), un grupo de fibras que no responden a ninguna estimulación en condiciones normales, pero que se vuelven excitables a determinados estímulos en condiciones de inflamación.

La caracterización funcional de las neuronas sensoriales de la conjuntiva o del borde del párpado es escasa en comparación con la córnea. Los pocos estudios publicados indican que la conjuntiva es inervada por fibras sensoriales con características funcionales similares a las neuronas corneales (mecano-nociceptores, nociceptores polimodales y receptores de frío) (Gallar, 1991; Belmonte *et al.*, 1997; Santiago *et al.*, 2017). Se han identificado mecanorreceptores de bajo umbral en el

limbo esclerocorneal (Figura 2) y en el borde del párpado que responden a una estimulación mecánica de baja intensidad (Gallar, 1991; Santiago *et al.*, 2017). Estos mecanorreceptores de bajo umbral se pueden activar por partículas aéreas, el parpadeo o el uso de lentes de contacto y no evocan una percepción dolorosa (Munger & Halata, 1984).

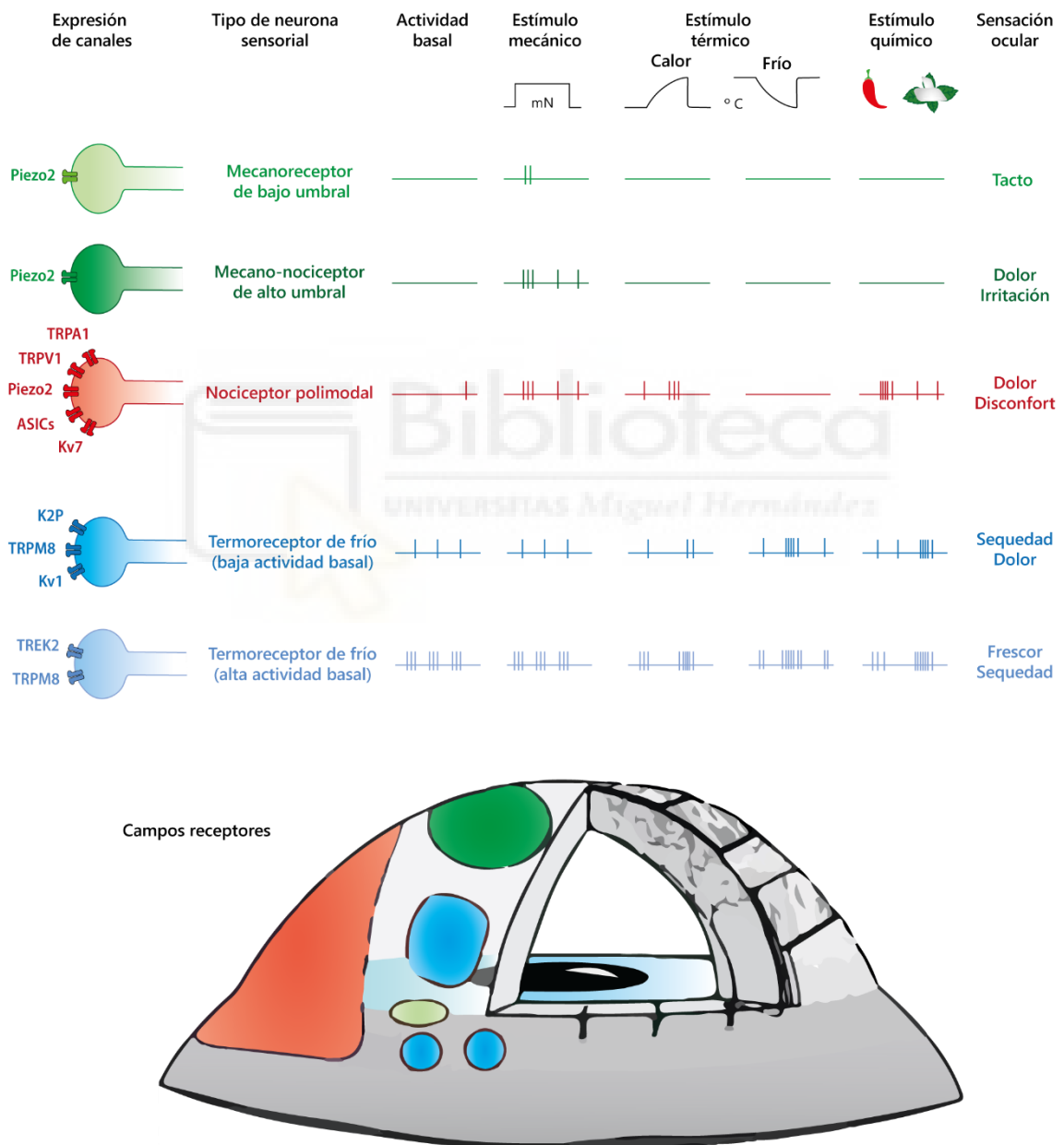


Figura 2 | Tipos funcionales de neuronas sensoriales que inervan la superficie del ojo. Representación esquemática de la actividad espontánea y evocada de impulsos nerviosos en los diferentes tipos funcionales de neuronas sensoriales que inervan la córnea y el limbo esclerocorneal. En base a las características de la descarga de impulsos nerviosos en ausencia de estimulación

(actividad basal o espontánea) y en respuesta a diferentes tipos de estímulos (mecánicos, térmicos o químicos), las terminales periféricas de las neuronas sensoriales primarias que inervan el ojo se clasifican en cinco tipos funcionales. En la figura también se representan la ubicación de los campos receptores en las diferentes estructuras de la superficie ocular y la expresión de canales implicados en la transducción sensorial presentes en los diferentes tipos de terminales sensoriales, así como las sensaciones que se evocan con su estimulación. Adaptado de Belmonte et al., 2004; Belmonte et al., 2015 y Frutos-Rincón et al., 2022.

### 1.2.2. Sensaciones evocadas

La mayoría de los estudios psicofísicos clásicos indicaban que cualquier modalidad de estimulación en la córnea producía sensación de irritación o dolor, aunque existía controversia al no disponer de métodos de estimulación selectiva para los diferentes tipos de receptores sensoriales (Belmonte *et al.*, 1997). Gracias al desarrollo del estesiómetro de gas (Belmonte *et al.*, 1999) se realizaron estudios aplicando estímulos selectivos de diferente modalidad (mecánicos, químicos y térmicos), confirmándose que, en general, los estímulos aplicados sobre la córnea evocan sensación de irritación independientemente de su modalidad (Acosta *et al.*, 2001a, 2001b). Sin embargo, la estimulación con frío ligero produce una percepción de frío/frescor sin componente de irritación (Acosta *et al.*, 2001a). Este resultado concuerda con la activación específica de los termorreceptores de frío, que son la única población de neuronas descritas en la córnea que no son nociceptores (Beuerman & Tanelian, 1979; Acosta *et al.*, 2001a, 2001b). Sin embargo, es cierto que cuando la estimulación de frío se vuelve más intensa (enfriamiento  $>2$  °C) la sensación evocada presenta un componente irritativo (Acosta *et al.*, 2001a, 2001b). Mientras que el enfriamiento leve y moderado de la superficie ocular aumentaría la actividad de los termorreceptores de frío tipo HB-LT, el enfriamiento intenso activaría, además, los termorreceptores de frío tipo LB-HT así como a los nociceptores polimodales, evocando sensaciones de irritación y sequedad (Acosta *et al.*, 2001b; Belmonte *et al.*, 2011, 2017) (Figura 2).

En la conjuntiva, la estimulación selectiva provoca sensaciones similares a las de la córnea, con la diferencia de que el estímulo mecánico de baja intensidad en la conjuntiva no evoca sensaciones irritantes (Acosta *et al.*, 2001b, 2006; Feng & Simpson, 2003). Este hallazgo no es sorprendente si tenemos en cuenta la presencia de mecanorreceptores de bajo umbral en la conjuntiva (Santiago *et al.*, 2017).

Los estudios psicofísicos y la caracterización funcional de los nervios de la superficie ocular han permitido entender que las sensaciones conscientes evocadas por un estímulo de una modalidad específica están determinadas principalmente por el tipo de población neuronal que se activa (Acosta *et al.*, 2001b). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la información codificada por las neuronas periféricas debe ser procesada a lo largo de toda la vía sensorial antes de que se genere la sensación consciente. Resultados recientes sugieren que las neuronas oculares de la corteza somatosensorial primaria se activan con múltiples modalidades de estímulo (Velasco *et al.*, 2024).

### 1.2.3. Trofismo

La inervación sensorial de la superficie ocular también contribuye al mantenimiento trófico de la córnea. Es frecuente observar un deterioro en el epitelio corneal cuando la inervación sensorial se ve alterada, con la aparición de úlceras corneales en el caso de la queratitis neurotrófica. La contribución al trofismo tisular de los nervios sensoriales se produce mediante la liberación de sustancias tróficas como neuropéptidos, neurotrofinas y factores de crecimiento. La propagación antidrómica de los potenciales de acción hacia la periferia provoca la liberación de neuropéptidos, como la sustancia P y el CGRP. Estos compuestos, solos o en combinación con otros factores de crecimiento, son cruciales en la preservación del

epitelio corneal y en la cicatrización de heridas (Gallar & Pozo, 1990; Garcia-Hirschfeld *et al.*, 1994; Lambiase *et al.*, 2000; Belmonte *et al.*, 2017).

#### 1.2.4. Lagrimación y parpadeo: mecanismos de protección de la superficie ocular

La inervación sensorial de la superficie ocular, además de proporcionar sensibilidad y participar en el trofismo del tejido, regula dos funciones cruciales en la protección de la superficie ocular: la lagrimación y el parpadeo. Ambos protegen mecánicamente la superficie ocular y mantienen su humedad. Son capaces de generar una respuesta involuntaria ante un estímulo dañino o potencialmente dañino que actúe sobre el ojo o los tejidos perioculares. Sin embargo, en ambos mecanismos cabe distinguir entre una función “basal” o “espontánea” y la función refleja. La primera sería mantenida sin ningún tipo de estímulo aparente y en cuyo control se ha sugerido que también intervienen los receptores sensoriales de la superficie ocular (Parra *et al.*, 2010, 2014; Quallo *et al.*, 2015).

##### 1.2.4.1. Lagrimación y película lagrimal.

La superficie ocular está cubierta por la película lagrimal de unas 3 micras de grosor (Pflugfelder & Stern, 2020) que proporciona gran parte de los nutrientes necesarios para mantener el trofismo de la superficie ocular (Beuerman & Schimmelpfennig, 1980; Nishida, 2005). Está actualmente aceptado que consta de cuatro capas que, ordenadas de interior a exterior, son: glicocálix, capa mucosa, capa acuosa y capa lipídica. El glicocálix, al ser la capa más interna, está en contacto directo con las microvellosidades de las células del epitelio. Está formada por polisacáridos y mucinas producidas por las células estratificadas de la córnea y la

conjuntiva. La capa mucosa cubre directamente el glicocálix y está formada por Mucina-5AC (MUC5AC), otras proteínas, electrolitos y agua secretados por las células caliciformes conjuntivales. Contiene factores que promueven la cicatrización de heridas, suprimen la inflamación, eliminan los radicales libres y actúan contra la infección microbiana (Dartt, 2004; Belmonte *et al.*, 2017; Pflugfelder & Stern, 2020). La capa acuosa contiene principalmente electrolitos, agua, proteínas y pequeñas mucinas solubles producidas por las glándulas lagrimales (principal y accesorias) y el epitelio conjuntival (Yokoi & Georgiev, 2019). Por último, la capa lipídica externa está secretada por las glándulas de Meibomio, y su función principal es la prevención de la evaporación de la capa acuosa de la lágrima (Mishima & Maurice, 1961; Wong *et al.*, 2018).

La producción de las glándulas lagrimales está regulada por fibras eferentes del sistema nervioso autónomo, fundamentalmente parasimpáticas, que provienen del ganglio pterigopalatino y llegan a la glándula lacrimal con ramas del nervio maxilar (V2). De hecho, tanto la lesión de las fibras parasimpáticas a nivel pre y post ganglionar como la administración de antagonistas muscarínicos producen una reducción de la secreción lagrimal (Ruskell, 1969; Toshida *et al.*, 2007).

La eliminación de la lágrima se produce por evaporación y a través del sistema de drenaje lagrimal, ayudada por el parpadeo. La tasa de evaporación de la lágrima está influida por diversos factores como el tiempo entre parpadeos (exposición de la lágrima), el estado de la capa lipídica de la película lagrimal precorneal, o la temperatura, la humedad y otras condiciones ambientales como el viento (Wu *et al.*, 2015).

- *Lagrimación refleja*

Cuando un estímulo nocivo (dañino o potencialmente dañino) se aplica sobre la superficie ocular, se produce como respuesta un incremento en la producción de lágrima. En este caso, la secreción lagrimal es una respuesta refleja ante la



estimulación de las neuronas sensoriales corneales, incrementándose sobre todo la secreción acuosa y de mucinas (Kessler *et al.*, 1995). La lagrimación refleja está mediada por la activación de los nociceptores corneales, fundamentalmente los nociceptores polimodales (Acosta *et al.*, 2004).

- *Lagrimación basal*

La lagrimación basal es la producción de lágrima continua, sin que exista un estímulo aparente que la desencadene. La evidencia científica indica que, en circunstancias normales, la actividad espontánea de los termorreceptores de frío, mediada por la activación de canales TRPM8, constituye un estímulo tónico para la producción basal de lágrimas (Parra *et al.*, 2010; Belmonte & Gallar, 2011). Mientras que los ojos están abiertos, la película lagrimal se evapora, enfriando ligeramente la superficie ocular (0.3°C/s) (Fujishima *et al.*, 1996). Este enfriamiento es detectado por los termorreceptores de frío de bajo umbral (LT-HB), apareciendo cambios en su actividad espontánea. El aumento en la actividad de los termorreceptores de frío como consecuencia del enfriamiento de la superficie ocular produciría una subsiguiente respuesta eferente autonómica que incrementaría la producción lacrimal. Un hallazgo que fundamenta el papel de los termorreceptores de frío en la regulación de la lagrimación basal es la disminución de la tasa de lagrimación basal a la mitad en ratones knock-out del TRMP8, así como la disminución de la tasa basal de lagrimación en voluntario sanos expuestos a un ambiente muy cálido, que disminuye el disparo de los termorreceptores de frío de la superficie ocular (Parra *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.2. Parpadeo

El parpadeo es un acto motor simple que consiste en el movimiento de cierre y reapertura de los párpados. Desempeña un rol fundamental en la protección de la superficie ocular por ser una barrera física. Participa, además, en la humidificación de la superficie ocular ya que estimula la producción lacrimal y favorece su distribución por toda la superficie ocular (Tsubota & Nakamori, 1995). El cierre de los párpados se produce por la contracción del músculo *orbicularis oculi* (OO). El OO está inervado por el nervio Facial (VII par craneal), cuyas motoneuronas no tienen actividad tónica en condiciones de salud. La contracción del OO se produce tras recibir trenes de impulsos provenientes de las motoneuronas. La apertura de los párpados se produce por la contracción del músculo elevador del párpado y por la inhibición del OO. La subida del párpado es considerablemente más lenta (~ 175 milisegundos) que su bajada o cierre (~ 75 milisegundos) (Bologna *et al.*, 2008). El músculo elevador del párpado está inervado por el nervio oculomotor común (III par craneal) y sus motoneuronas sí exhiben actividad tónica; por lo tanto, dicho músculo es el responsable del mantenimiento de los ojos abiertos en condiciones normales. Por último, el músculo de Müller sostiene una contracción tónica determinada por la activación de nervios simpáticos y contribuye a mantener el ojo abierto. De hecho, la ptosis palpebral que se produce en el síndrome de Horner es debido a la denervación simpática del músculo de Müller (Evinger, 1995).

El estudio del parpadeo se ha realizado principalmente mediante grabaciones con cámaras de vídeo ultrarrápidas y con registro de electromiografía (EMG) de superficie del OO (OO<sub>EMG</sub>). Las características de la señal OO<sub>EMG</sub>, como la duración y la amplitud, permiten distinguir tres tipos de parpadeo: voluntario, reflejo y espontáneo (Evinger *et al.*, 1991; Gruart *et al.*, 1995; VanderWerf *et al.*, 2003) (Figura 3).

- *El parpadeo voluntario*

Como su nombre indica, es aquel que se produce por propia voluntad. El OO es un músculo esquelético por lo que puede controlarse de manera voluntaria. Se puede inferir que el circuito motor del parpadeo voluntario es diferente del parpadeo reflejo, pero dichos circuitos no se conocen con detalle (Evinger *et al.*, 1991; Smit, 2009).

- *El parpadeo reflejo*

Es el parpadeo evocado por la estimulación dañina o potencialmente dañina de la superficie del ojo o de cualquier tejido peri-ocular. El circuito neural del parpadeo reflejo está muy estudiado y consta al menos de tres componentes básicos: (1) los nervios sensoriales de la superficie ocular, que proyectan a (2) las neuronas de segundo orden de las subdivisiones *interpolaris* y *caudalis* del núcleo espinal del TBNC, las cuales proyectan directamente al (3) núcleo facial motor (VII par craneal), cuyas motoneuronas inervan el OO (Hiraoka & Shimamura, 1977; Pellegrini *et al.*, 1995; Henriquez & Evinger, 2007). Al registrar con OO<sub>EMG</sub> la respuesta del parpadeo reflejo se encuentran dos respuestas de diferente latencia (R1 y R2). La respuesta de corta latencia (R1, 10-13 ms) suele ser unilateral y la intensidad de respuesta es independiente del input sensorial. Se desconoce el circuito responsable de esta respuesta, pero se sugiere que al ser una respuesta tan rápida debería estar mediada por fibras gruesas y, por tanto, posiblemente mediada por el núcleo principal del TBNC. La respuesta de latencia larga (R2, 30-41 ms) es bilateral y sus características sí son dependientes del input sensorial. En el circuito responsable de la respuesta R2 se sugiere que participa el núcleo espinal del TBNC (Panneton *et al.*, 2010). La activación de los nociceptores, fundamentalmente los polimodales, es el principal responsable de inducir el parpadeo reflejo (Acosta *et al.*, 1999).

- *El parpadeo espontáneo*

Es el tipo de parpadeo que sucede a lo largo del día sin ser evocado aparentemente por un estímulo periférico y que sucede sin que el individuo sea consciente. De hecho, el sujeto tampoco percibe la pérdida momentánea de la visión mientras los párpados están cerrados. La frecuencia basal de parpadeo en humanos se estima en torno a 12-20 veces por minuto, lo que resulta aproximadamente en 14.000 veces por día (Ponder & Kennedy, 1927; Acosta *et al.*, 1999; Tsubota *et al.*, 1999; Doughty, 2001; Kaminer *et al.*, 2011), siendo el movimiento mediado por musculatura esquelética que más veces realizamos a lo largo del día (Doughty, 2001).

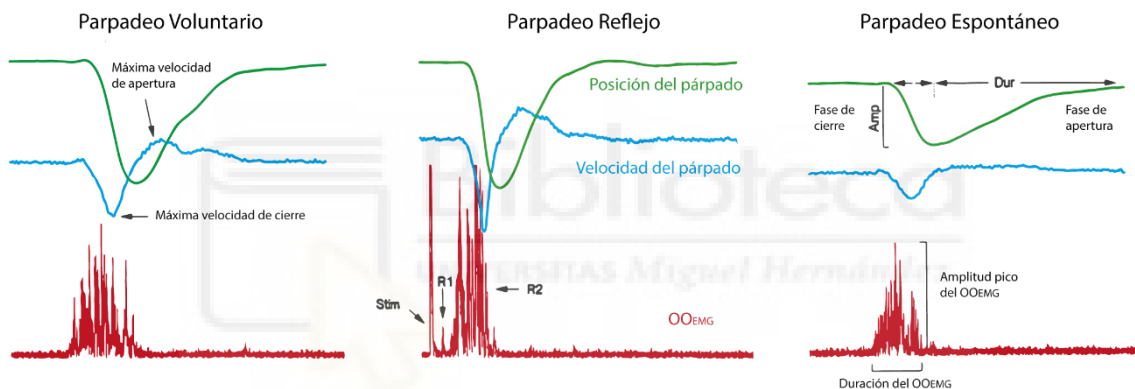


Figura 3 | Tipos de parpadeo. Representación de la posición y la velocidad de movimiento del párpado y la señal electromiográfica (OO<sub>EMG</sub>) producida por la contracción del músculo orbicular. Modificado de Evinger *et al.*, 1991.

El trabajo pionero de Ponder and Kennedy (1927) apuntaba que el parpadeo espontáneo no dependía exclusivamente de la información sensorial de la superficie ocular, sino que se correlacionaba con diferentes estados cognitivos, proponiendo un control central sobre el parpadeo espontáneo. Con el tiempo se ha incrementado el estudio de la influencia de las tareas cognitivas sobre el parpadeo. Por ejemplo, las tareas cognitivas de atención visual disminuyen la tasa de parpadeo espontáneo (Acosta *et al.*, 1999; Himebaugh, 2009; Delicado-Miralles *et al.*, 2023). Por el contrario, las

tareas no visuales, como problemas de aritmética mental, escuchar mientras se memoriza o tener una conversación, incrementan la tasa (Ponder & Kennedy, 1927; Karson *et al.*, 1981; Bentivoglio *et al.*, 1997; Doughty, 2001; Delicado-Miralles *et al.*, 2023). Además, se ha encontrado una relación entre la tasa de parpadeo y los niveles de dopamina del sistema nervioso central (Taylor *et al.*, 1999). Por ejemplo, la frecuencia de parpadeo espontáneo se encuentra reducida en pacientes con parálisis supranuclear progresiva (Bologna *et al.*, 2008) y en la enfermedad del párkinson (Karson *et al.*, 1982; Karson, 1983; Korošec *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2017). Lo contrario ocurre en pacientes con esquizofrenia, que muestran tasas de parpadeo incrementadas (C Karson *et al.*, 1981; Kleinman *et al.*, 1984).

Ponder y Kenedy ya propusieron por primera vez en 1927 que el patrón y la frecuencia de parpadeo espontáneo podrían estar definidos por el sistema nervioso central. La propuesta surgió como hipótesis tras observar que no se suprimía el parpadeo espontáneo cuando se anestesiaban los tejidos orbitales y peri-orbitales. Actualmente, la propuesta sobre un centro neuronal que determina un patrón central del parpadeo espontáneo ha ganado más fuerza, e incluso se propone que dicho centro se encuentra ubicado en el tronco del encéfalo, aunque no hay información sólida que lo contraste. El hallazgo principal que fundamenta esta propuesta, además de la incapacidad de abolir el parpadeo con anestésicos locales aplicados en el ojo y sus anexos, es la existencia de cierta periodicidad en el parpadeo espontáneo tanto en ratas como en humanos (Kaminer *et al.*, 2011). Una organización temporal rítmica del parpadeo podría ser consecuencia de un generador central de parpadeos.

Sin embargo, el parpadeo espontáneo también viene determinado por las condiciones de la superficie ocular, en conjunción con factores psicológicos y medioambientales (Nakamori *et al.*, 1997), y serían los receptores sensoriales que inervan la superficie ocular los que detectarían su estado. Sin embargo, aunque la

contribución de los nociceptores al parpadeo reflejo está clara, aún se desconoce cómo la actividad de los diferentes tipos de receptores sensoriales de la superficie ocular contribuye a la regulación del parpadeo espontáneo. Hay estudios que relacionan la actividad basal de los termorreceptores de frío con la tasa del parpadeo basal o “espontáneo” en ratones (Quallo *et al.*, 2015).

En resumen, se postula la existencia de un patrón central establecido por el sistema nervioso central, en el troncoencéfalo, que determina una organización temporal del parpadeo espontáneo. Este patrón está influenciado tanto por la actividad cognitiva (y, por tanto, gobernado descendentemente por la corteza cerebral) como por la actividad sensorial procedente de la superficie ocular. Sin embargo, no existen evidencias sobre cuál de los dos sistemas podría tener mayor peso en la modulación del parpadeo espontáneo.

### 1.3. Inervación sensorial de la superficie ocular en la Enfermedad de Ojo Seco

#### 1.3.1. Definición, diagnóstico y clasificación de la Enfermedad de Ojo Seco (EOS)

En 2017 se actualizó la definición de la Enfermedad de Ojo Seco (EOS) como parte del informe del II International Dry Eye Workshop (DEWS II) (Craig *et al.*, 2017): *“Enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y acompañada de síntomas oculares, en la que la inestabilidad e hiperosmolaridad de la película lagrimal, la inflamación y el daño de la superficie ocular y las anomalías neurosensoriales desempeñan funciones etiológicas”*. El cambio más notable de esta definición con respecto a la anterior es la inclusión, por primera vez, de las anomalías neurosensoriales como factor

etiológico de la enfermedad, resaltando también la importancia de los síntomas sensoriales como el dolor (Craig *et al.*, 2017; Shimazaki, 2018).

La EOS es una enfermedad ocular tan prevalente que se considera un problema de salud pública (Zhang *et al.*, 2020). La prevalencia mundial oscila entre el 5 y el 50% (Stapleton *et al.*, 2017). La edad y el sexo son dos de los principales factores de riesgo, siendo frecuente en mujeres de avanzada edad (Chia *et al.*, 2003; Moss *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2017). La prevalencia en España se encuentra en torno al 8-11% de la población adulta (Viso *et al.*, 2009).

El diagnóstico de la EOS se realiza mediante una batería de pruebas diagnósticas (Figura 4). Como primer criterio, el paciente tiene que reportar síntomas oculares mediante alguno de los cuestionarios validados como el "Ocular Surface Disease Index" (OSDI, Índice de Enfermedad de la Superficie Ocular en castellano) o el "Dry Eye Questionnaire with 5 items" (DEQ-5; cuestionario de ojo seco de 5 ítems en castellano). Como segundo criterio (Wolffsohn *et al.*, 2017), el paciente debe dar positivo (obtener valores alterados) en al menos uno de los siguientes parámetros: tiempo de ruptura de la lágrima (TBUT), osmolaridad de la lágrima o tinción de la superficie ocular con fluoresceína o verde lisamina (Figura 4).

### Diagnóstico de la Enfermedad del Ojo Seco

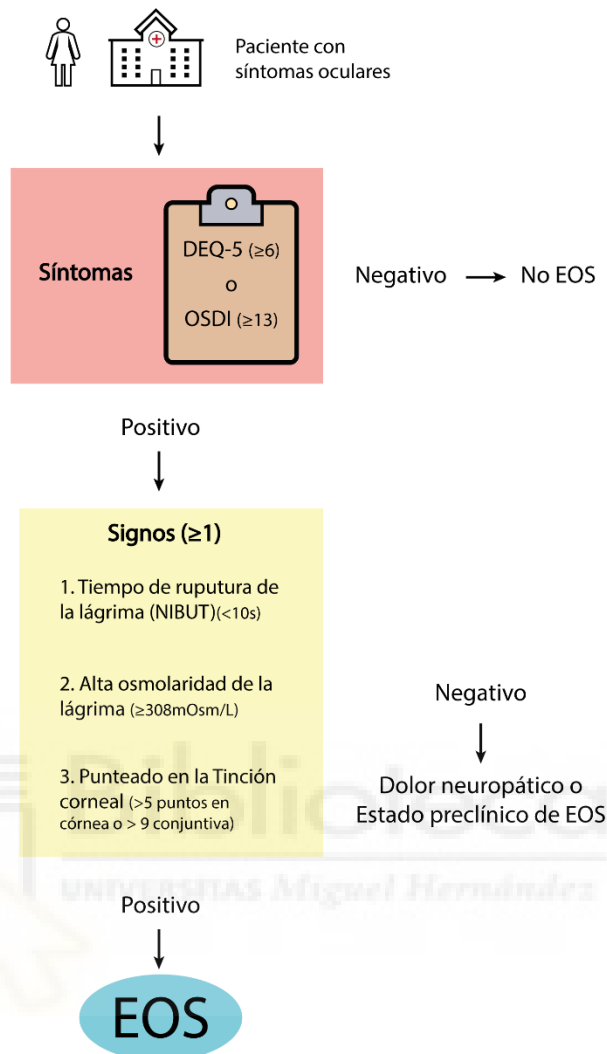


Figura 4 | Diagnóstico clínico de la Enfermedad del Ojo Seco (EOS). DEQ-5: Dry Eye Questionnaire with 5 items; OSDI: Ocular Surface Disease Index (ver texto).

La EOS se puede clasificar en acuodeficiente o evaporativa, según se deba a una deficiencia en la producción de la capa acuosa de la lágrima o a una evaporación excesiva, respectivamente (Figura 5). La clasificación se realiza según el resultado de la medición del volumen lagrimal (Test de Schirmer), de la valoración de la capa lipídica de la película lagrimal (debido a su rol primordial en la prevención de la evaporación lagrimal) mediante interferometría y/o del tamaño de las glándulas de Meibomio, responsables de la producción del componente lipídico (Craig *et al.*, 2017).



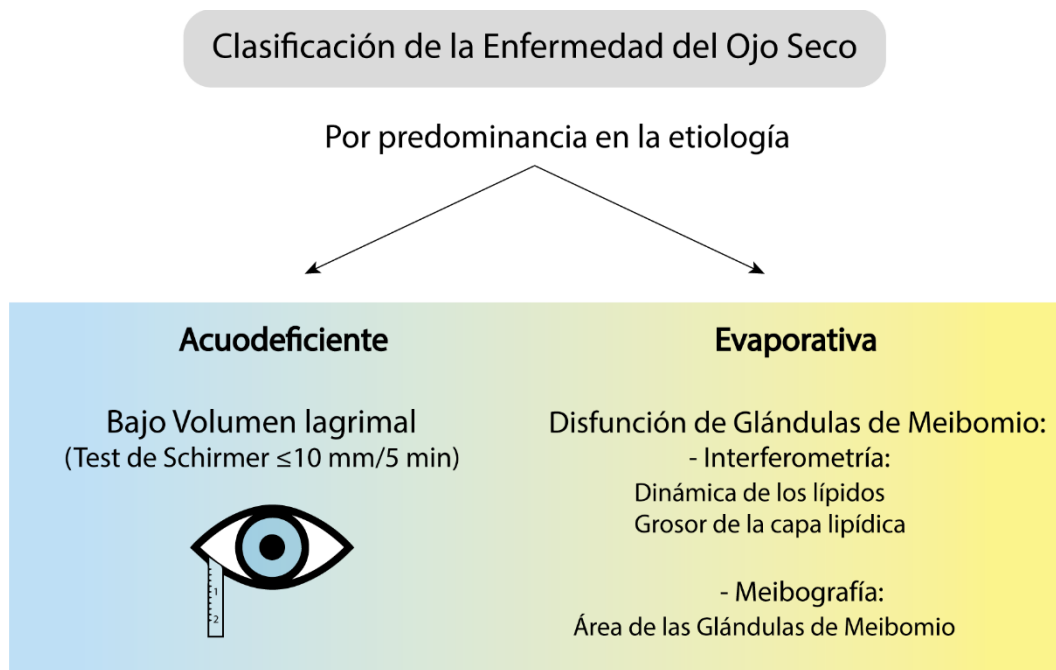


Figura 5 | Clasificación de la Enfermedad del Ojo Seco basada en la etiología (ver texto).

### 1.3.2. Cambios en la inervación sensorial de la superficie ocular en la EOS.

La investigación básica sobre la EOS ha descrito los cambios estructurales y funcionales que se producen en los nervios sensoriales de la superficie ocular, responsables de parte de los síntomas oculares. Dichos síntomas abarcan desde ligero discomfort hasta dolor o quemazón intensos que afectan a la calidad de vida (Belmonte *et al.*, 2017).

La investigación de las alteraciones morfológicas y funcionales en las neuronas sensoriales del trigémino y sus proyecciones corneales durante la EOS se ha llevado a cabo fundamentalmente en modelos animales de ojo seco acuodeficiente, que implican la eliminación quirúrgica de la glándula lagrimal principal (Kurose & Meng, 2013; Kovács *et al.*, 2016; Belmonte *et al.*, 2017). En este modelo, los nociceptores corneales muestran signos de sensibilización (disminución del umbral, aumento de la actividad espontánea y de la respuesta a un estímulo) (Kovács *et al.*, 2016). El

incremento de actividad espontánea de los nociceptores polimodales conlleva a la liberación local de sustancias proinflamatorias, contribuyendo a la inflamación del tejido periférico (Belmonte *et al.*, 2003). Por otro lado, se observa también una sensibilización de los receptores de frío, cuya actividad basal y en respuesta a la estimulación están aumentadas. Como la tasa de lagrimación basal y el parpadeo espontáneo están regulados por la actividad basal de los termorreceptores de frío (Parra *et al.*, 2010; Quallo *et al.*, 2015), la alteración de la actividad de los termorreceptores de frío en el ojo seco acuodeficiente también puede contribuir a una alteración en la producción lacrimal y de la distribución de la película lagrimal sobre la superficie ocular. Los pacientes con EOS muestran intervalos entre parpadeos menores que los sujetos sanos, es decir, muestran una frecuencia de parpadeo elevada (Tsubota *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2018; Mitchell *et al.*, 2021). Además, muestran mayor número de parpadeos incompletos o parciales que los sujetos sanos (Su *et al.*, 2018). Por lo tanto, la alteración funcional de los termorreceptores de frío de la córnea observada en condiciones de EOS contribuye a la etiología de la enfermedad y no sólo es una consecuencia (Parra *et al.*, 2014; Belmonte *et al.*, 2015; Kovács *et al.*, 2016).

En condiciones de deficiencia lagrimal, la sensibilización de los nervios sensoriales por la presencia mantenida en el tejido ocular de mediadores inflamatorios como neuropéptidos (Lambiase *et al.*, 2011), citocinas proinflamatorias (Lam 2009), anticuerpos específicos contra gangliósidos (Giordano *et al.*, 2003) o células inflamatorias infiltrantes (Kunert *et al.*, 2000) puede, a su vez, favorecer al desarrollo de una posible sensibilización central. Además, puede contribuir a lesionar los nervios o neuronas de la vía sensorial, desarrollándose dolor ocular neuropático. Otro factor a tener en cuenta es que con la edad aumenta el riesgo de EOS, estando correlacionado con la disminución de la densidad de los nervios

corneales (Niederer *et al.*, 2007), sobre todo de termorreceptores de frío (Alcalde *et al.*, 2018).

En la figura 6 se resumen las alteraciones de los nervios sensoriales de la córnea en la EOS y su efecto sobre las sensaciones oculares, la lagrimación y el parpadeo.

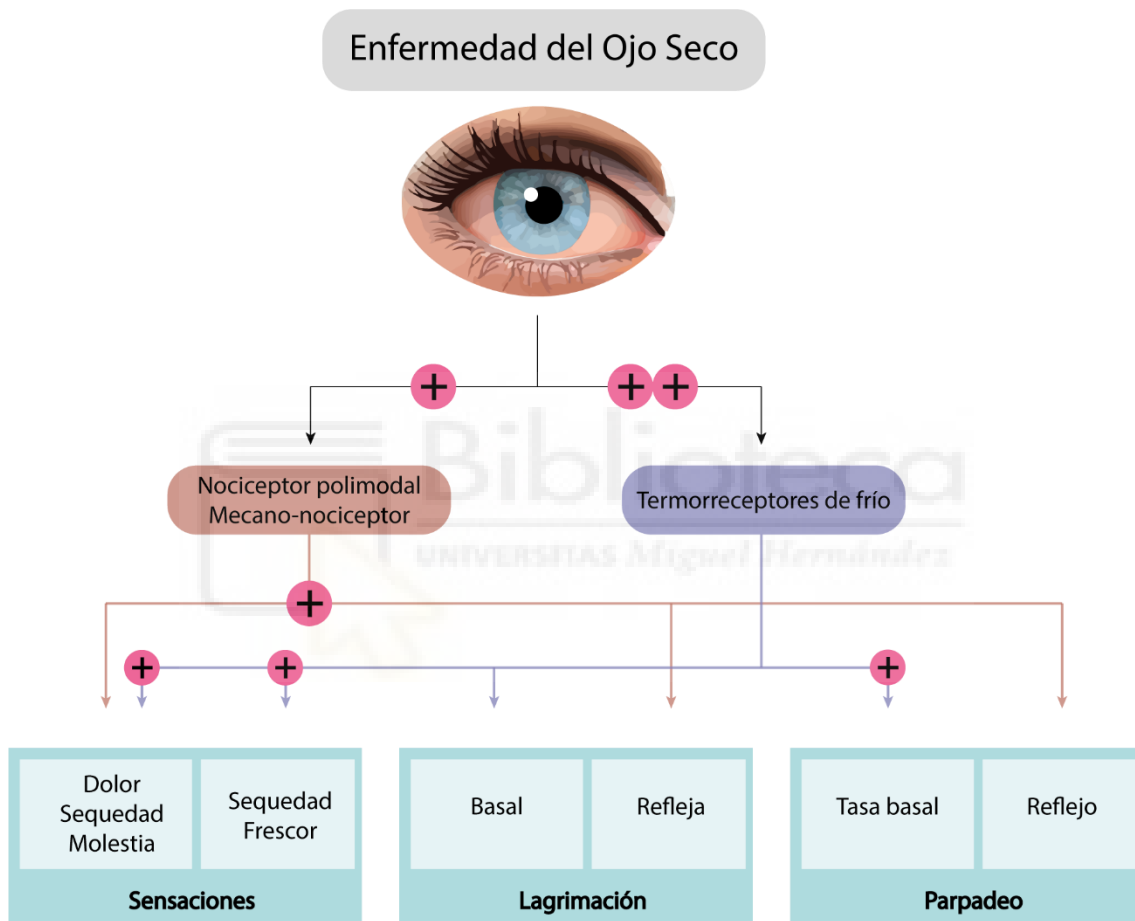


Figura 6 | Cambios en la actividad de los nervios sensoriales de la superficie ocular (nociceptores y termorreceptores de frío) en la enfermedad de ojo seco y su efecto sobre las sensaciones oculares, la lagrimación y el parpadeo. Modificado de Belmonte et al 2017.

### 1.3.3. Tratamiento de la EOS: el perfluorohexiloctano (F6H8).

Debido a la etiología multifactorial de la EOS, no se disponen de tratamientos específicos que resuelvan la patología. El enfoque más aceptado actualmente consiste en administrar tratamientos individualizados y centrados en la fisiopatología (O'Neil *et al.*, 2019) aunque ésta no siempre esté clara. Los profesionales de la salud siguen teniendo dificultades para controlar la EOS de moderada a grave (Asbell & Spiegel, 2010).

El uso de lágrimas artificiales es el tratamiento más habitual (O'Neil *et al.*, 2019) y su objetivo es reponer el volumen de líquido que cubre el ojo, disminuido por una producción acuosa reducida o por un aumento de su evaporación (Alves *et al.*, 2013), a la vez que aumenta la lubricación y mejora el desplazamiento de los párpados sobre la córnea. Es por ello que la mayoría contienen moléculas como polisacáridos o polímeros que aportan viscosidad y gran capacidad de retener agua. Más recientemente se han introducido en el mercado lágrimas artificiales que aportan, además, algunos componentes lipídicos. Las lágrimas artificiales, cuya composición difiere en todos los casos de la de la lágrima, suelen contener conservantes para evitar la proliferación microbiana en el medio. Sin embargo, los mismos conservantes, como el cloruro de benzalconio, son los responsables de producir efectos secundarios en los pacientes como picor o irritación y, a su vez, de lesionar el epitelio corneal de los pacientes (Baudouin *et al.*, 2010).

Otro posible tratamiento es el empleo de antiinflamatorios o de inmunosupresores. La ciclosporina A tópica (CsA) al 0,05 % se ha convertido en el fármaco inmunosupresor más prescrito en la EOS. Es un antimetabolito fúngico que tiene la capacidad de disminuir la activación de las células T mediada por la calcineurina, que regula la expresión de la interleucina -2 (Deveney & Asbell, 2018). En el caso de la EOS, la CsA también actúa directamente sobre las terminaciones

nerviosas sensoriales sensibilizadas, posiblemente gracias a su actividad como inhibidor de la calcineurina (Gyenes *et al.*, 2023). Es importante destacar que los efectos clínicos del tratamiento con CsA pueden empezar a producirse a los 3 meses, sin embargo, los efectos adversos son frecuentes y acaban siendo la principal causa de discontinuidad del tratamiento con CsA. Entre los efectos adversos más frecuentes encontramos quemazón ocular (17% de los pacientes), hiperemia, sensación de cuerpo extraño en el ojo o prurito (Barber *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 2008). Recientemente se ha aprobado el empleo del derivado del ácido propanóico lifitegrast, cuyo mecanismo de acción como antiinflamatorio consiste en bloquear las interacciones entre la molécula de adhesión intercelular-1 y el antígeno asociado funcional de linfocitos-1, que son fundamentales en la activación y migración de las células T (Lollett & Galor, 2018). El lifitegrast al 5% tiene efectos relativamente rápidos comparado con la CsA y sus efectos secundarios (irritación o dolor) son menos frecuentes (Donnenfeld *et al.*, 2016; Holland *et al.*, 2017).

En los últimos años también se utilizan productos derivados de plasma o ricos en plaquetas, utilizados para promover la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos (Drew *et al.*, 2018). El objetivo es maximizar la concentración de factores tróficos y de crecimiento, moléculas de adhesión celular y citocinas para mejorar el estado trófico del tejido (Drew *et al.*, 2018). Las gotas de suero autólogo y/o alogénico parecen mejorar los signos y síntomas de la EOS (Celebi *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2014).

Una de las últimas moléculas que se están empleando para el tratamiento de la EOS es el perfluorohexiloctano, un líquido alcalino semi fluorado que se utilizó inicialmente en oftalmología como sustituto del humor vítreo (Zeana *et al.*, 1999). Este peculiar compuesto es física, química y fisiológicamente inerte, ligeramente anfifílico, incoloro y con una densidad superior a la del agua y tensiones superficial e interfacial muy bajas (Meinert & Roy, 2000). Una de sus principales ventajas es que, al ser un líquido no acuoso, el crecimiento microbiano es imposible y, por lo tanto,

no necesita ningún conservante (Zeana *et al.*, 1999), evitando los efectos secundarios. La evidencia sobre su eficacia clínica está aún en estudio debido a su relativo reciente uso como tratamiento para la EOS (Steven *et al.*, 2015). Los principales trabajos que evalúan los efectos del F6H8 aplicado en la superficie ocular en pacientes con EOS son dos estudios observacionales prospectivos (Steven *et al.*, 2015, 2017) en los que el fármaco redujo los síntomas asociados con el ojo seco. También encontraron un aumento en el espesor de la capa lipídica y en el tiempo de ruptura de la película lagrimal. Debido a estos resultados, los autores sugirieron que el F6H8 podría prevenir el aumento de la evaporación que causa la EOS al formar una capa protectora y reducir las fuerzas de cizallamiento del párpado durante el parpadeo (Steven *et al.*, 2015, 2017). Esta idea se ve reforzada por la observación de que, en conejos, el F6H8 mejora el grado de calidad de la capa lipídica de la película lagrimal medida por interferometría manual (Agarwal *et al.*, 2019). Además, en pacientes con EOS de leve a moderada, el F6H8 aumenta transitoriamente el grosor de la película lagrimal 10 minutos después de su aplicación (Schmidl *et al.*, 2020). Un estudio más reciente mostró que el tratamiento tópico con F6H8 reduce significativamente la tinción corneal en pacientes con EOS sin inducir cambios en el endotelio corneal, lo que respalda su eficacia y seguridad (Mateo Orobia *et al.*, 2020). Estos resultados, junto con la baja tensión superficial del compuesto, llevaron a concluir que la gota de F6H8 (de unos 10  $\mu\text{L}$ ) se esparcía uniformemente sobre la superficie ocular tras la aplicación, formando una capa protectora sobre la película lagrimal e impidiendo su evaporación (Figura 7). Sin embargo, los mecanismos precisos que explicarían los efectos de F6H8 en la superficie ocular, y particularmente en la EOS, aún no se conocen con exactitud.

Finalmente, existen tratamientos no farmacológicos como los dispositivos para estimular eléctricamente los nervios que inervan las glándulas lacrimales o la mucosa nasal, empleados en aquellos pacientes de EOS que muestran un déficit en la

generación acuosa de la lágrima (Merino *et al.*, 2018; Dieckmann *et al.*, 2019; O'Neil *et al.*, 2019). Otros tratamientos no farmacológicos proponen ejercicios de parpadeo como tratamiento adyuvante en la ESO, cuyo objetivo es modificar los patrones de parpadeo deficientes y mejorar la sintomatología. Un estudio encuentra cambios modestos en la calidad de la película lagrimal, en los síntomas reportados por los pacientes, la proporción de parpadeos incompletos y en el OSDI (Kim *et al.*, 2021). En la figura 7 se resumen los tratamientos utilizados para la EOS, así como el mecanismo de acción propuesto para el F6H8.

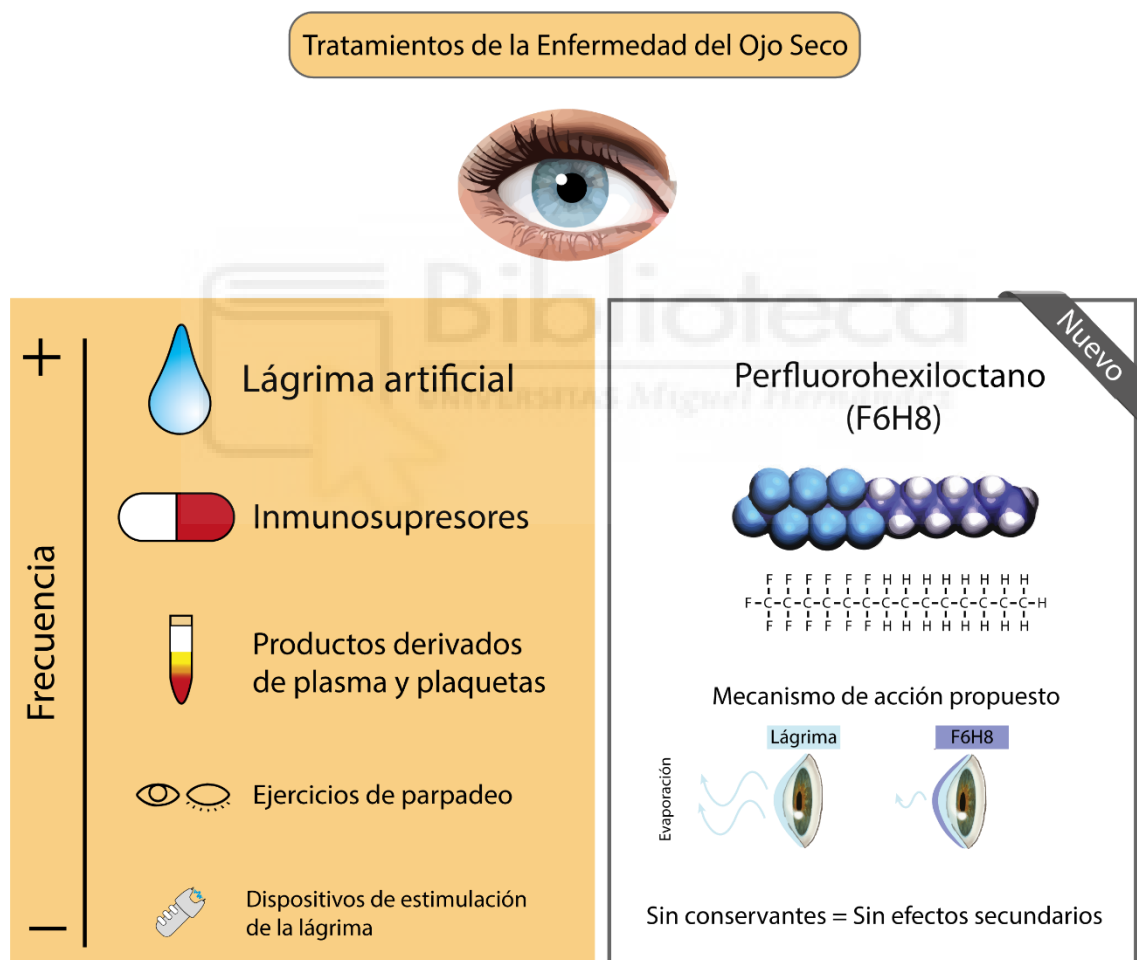


Figura 7 | Tratamientos empleados en la enfermedad de ojo seco y mecanismo de acción propuesto para el F6H8.







# Objetivos



Biblioteca

UNIVERSITAS Miguel Alemán

## 2. Objetivos

Sabiendo que la inervación sensorial juega un papel fundamental en los mecanismos de protección de la superficie ocular como son el parpadeo y la lagrimación, el objetivo general de esta tesis ha sido *estudiar el papel concreto que tienen los termorreceptores de frío de la superficie ocular en el control de la frecuencia y las características del parpadeo espontáneo en personas sanas.*

Para el logro de este objetivo general se han analizado en primer lugar los efectos de una nueva molécula recientemente comercializada para el tratamiento de la enfermedad de ojo seco que estaba resultando clínicamente efectivo, el perfluorohexiloctano (F6H8). Nuestra hipótesis principal era que el F6H8 disminuía la temperatura de la superficie ocular, activando los termorreceptores de frío y, consecuentemente, aumentaba la tasa de lagrimación y la frecuencia de parpadeo. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que la instilación de F6H8 es un método útil para disminuir discretamente y manera localizada la temperatura de la superficie ocular, lo que estimula los termorreceptores de frío, aumentando así la lagrimación y la frecuencia de parpadeo, todo ello sin evocar sensaciones térmicas ni de discomfort.

En la siguiente etapa, se ha estudiado cómo se afecta la frecuencia y las características del parpadeo espontáneo cuando se modifica la información sensorial de la córnea, bien inhibiendo la transmisión de impulsos nerviosos con anestésicos locales o aumentando el disparo de los termorreceptores de frío al tratar tópicamente con F6H8. La inhibición o activación los termorreceptores de frío de la superficie ocular se realizó bajo diferentes condiciones experimentales, en concreto con iluminación basal y en ausencia de iluminación, así como durante la realización de tareas que requerían atención visual o atención no visual. Este grupo de

experimentos nos permitió determinar hasta qué punto los diferentes estados cognitivos en estas situaciones tienen un mayor o menor peso sobre el control del parpadeo espontáneo que la entrada sensorial de los termorreceptores de frío de la superficie ocular.

Por tanto, este trabajo de tesis ha tenido varios objetivos específicos:

1. Determinar mediante termografía por infrarrojos los cambios de la temperatura de la superficie ocular inducidos por la aplicación tópica ocular de perfluorohexiloctano (F6H8) en personas sanas y definir los efectos de dicho tratamiento sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo, la tasa de lagrimación y las sensaciones oculares.
2. Comprobar si el aumento de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular, inducido al enfriar con F6H8 tópico, o su inhibición utilizando anestésicos locales, modifica la frecuencia y las características del parpadeo espontáneo en personas sanas, analizando para ello la amplitud y duración de la señal electromiográfica del músculo orbicular durante el parpadeo espontáneo.
3. Determinar si el estado cognitivo (atención visual y no visual) y la ausencia de entrada sensorial visual modifican el parpadeo espontáneo en personas sanas, así como definir si los efectos ejercidos por el estado cognitivo tienen una mayor o menor influencia que la actividad de los termorreceptores de frío oculares sobre el control del parpadeo.





# **Materiales y Métodos**

UNIVERSITAS Miguel Hernández

### 3. Materiales y métodos

Para la realización de esta tesis se utilizaron varios materiales y métodos, dependiendo de los objetivos.

#### 3.1. Materiales y métodos utilizados para el objetivo específico 1

Estos materiales y métodos son los utilizados para realizar los experimentos incluidos en el artículo Delicado-Miralles et al. (2021) que forma parte de esta tesis doctoral (Anexo I).

##### 3.1.1. Sujetos

Se reclutaron 20 voluntarios jóvenes y sanos (9 mujeres, 11 hombres; edad media de  $24,1 \pm 4,4$  años). Tras firmar un consentimiento informado, se realizó una breve anamnesis a los voluntarios y rellenaron el cuestionario OSDI (Ocular Surface Disease Index) adaptado a personas de habla hispana (Rodríguez-Torres *et al.*, 2010).

Los criterios de inclusión fueron personas jóvenes y sanas, de 18 a 35 años. Los criterios de exclusión comprendieron: enfermedades oculares previas, cirugía ocular, puntuación OSDI  $\geq 12$ , ser usuario habitual de lentes de contacto y tener prescrito algún tratamiento tópico o sistémico. Se indicó a los participantes que no consumieran fármacos antiinflamatorios o analgésicos dispensados sin receta durante al menos 48 horas previas al estudio. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa legal española y la Declaración de Helsinki, y siguieron el protocolo UMH.INJGa.03.20 aprobado por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández.

### 3.1.2. Protocolos experimentales

Se diseñaron dos protocolos experimentales realizados en la misma sala, con temperatura ( $24,3 \pm 1,2$  °C) y humedad parcial ( $40,8 \pm 8,3$  %) controladas. La posición de los voluntarios y de los experimentadores, así como la distancia desde la cara del sujeto a los distintos objetos de la sala (cámara de vídeo, salida del aire acondicionado, puerta, ventanas, etc.) se estandarizó para evitar cualquier variación ambiental a lo largo de los procedimientos que pudiera influir en los resultados. Como el F6H8 no induce punteado corneal (Mateo Orobia *et al.*, 2020), no fue necesaria la tinción corneal con fluoresceína. De este modo, los efectos del F6H8 no serían enmascarados por la fluoresceína o sus excipientes.

En el protocolo experimental 1, se aplicó en ambos ojos de 13 voluntarios (6 mujeres, 7 hombres) una gota de 10  $\mu$ L de F6H8 (EvoTears™, Brill Pharma S.L., España) o de solución salina (NaCl 0,9 %, Braun Medical, S.A.), cada uno de los tratamientos en sesiones diferentes ordenadas de manera aleatoria y separadas al menos dos días. En el protocolo experimental 2, a un grupo distinto de voluntarios, compuesto por 7 sujetos (3 mujeres y 4 hombres), se aplicó una gota de 10  $\mu$ L de F6H8 o de solución salina únicamente en el ojo derecho para observar los efectos unilaterales del tratamiento (Figura 8).

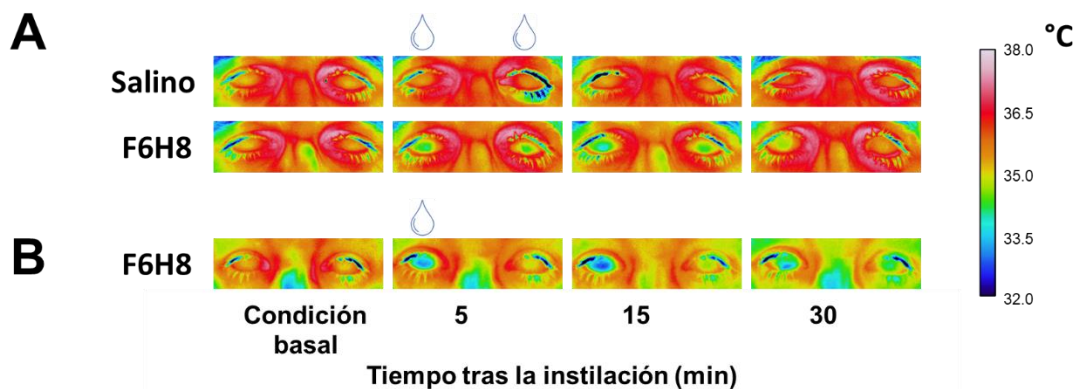


Figura 8 | Ejemplos representativos del efecto del tratamiento tópico con F6H8 o salino sobre la temperatura de la superficie ocular. Imágenes termográficas (adquiridas con una cámara



de video de infrarrojo) de ambos ojos tomadas para cuantificar los cambios de temperatura de la superficie corneal después de la aplicación tópica bilateral de solución salina o F6H8 (A, Protocolo 1) o la aplicación tópica unilateral (ojo derecho) de F6H8 (B, Protocolo 2).

Los voluntarios del protocolo 1 (aplicación bilateral de F6H8 o solución salina) se distribuyeron a su vez en dos subgrupos (Figura 9A):

- *Protocolo 1A.* En un primer subgrupo de 7 sujetos (3 mujeres y 4 hombres) se midió la temperatura de la superficie corneal (TSC) y la frecuencia de parpadeo (FP) y se evaluaron mediante escalas analógicas visuales las sensaciones experimentadas en la superficie ocular. Dichas variables fueron registradas antes del tratamiento (condición basal) y en diferentes momentos tras el tratamiento con F6H8 o solución salina (5, 15, 30 y 60 min).
- *Protocolo 1B.* En el segundo subgrupo de 6 participantes (3 mujeres y 3 hombres), se midió exclusivamente la tasa de lagrimación antes y a los 5, 15 y 30 min del tratamiento con F6H8 o solución salina.

### 3.1.2.1. Protocolo 1A

#### 3.1.2.1.1. Medición de la temperatura de la superficie corneal (TSC).

La TSC se midió con una cámara de vídeo termográfica de infrarrojos (InfRec R300SR, Nippon Avionics Co. Ltd., Tokio, Japón). Cada sujeto se sentó cómodamente con la cabeza apoyada en una mentonera y fijando la mirada en la cámara, situada a una distancia de 50 cm. Los parámetros de grabación (zoom 1,6x; 320 x 240 píxeles; 60 fps; emisividad de 0,96), así como la extracción de datos (área circular de 1 cm<sup>2</sup>-rango de 0,93-1,01 cm<sup>2</sup>- localizada en la córnea) se realizaron con un software específico (InfRec Analyzer NS9500 Standard, Nippon Avionics Co. Ltd.) (Figura 9B). Ambos ojos se grabaron a la vez durante 1 minuto. Al inicio de la

grabación, los sujetos mantuvieron los ojos cerrados durante tres segundos, los abrieron y parpadearon espontáneamente sin instrucciones durante el resto de la grabación. Los valores de TSC fueron calculados promediando la temperatura de ambas superficies delimitadas en la córnea en cada ojo al comienzo del último período entre parpadeos registrado, considerándose ésta la variable principal para definir los efectos del tratamiento con F6H8 y solución salina sobre la TSC.

#### 3.1.2.1.2. Sensaciones evocadas en la superficie ocular

Las sensaciones evocadas en la superficie ocular se midieron antes y en diferentes momentos tras el tratamiento con F6H8 o solución salina, siempre inmediatamente tras la finalización de la termografía. Los sujetos utilizaron diferentes escalas analógicas visuales (EVAs) de 10 cm; donde 0 representa la ausencia de sensación y 10 es la máxima sensación que pueden imaginar (Acosta *et al.*, 2001a, 2001b) para valorar cada una de las siguientes sensaciones experimentadas en la superficie ocular: frío, escozor, sequedad, punzante, sensación de cuerpo extraño, picor, arenilla, fatiga ocular, ojos llorosos y molestias inducidas por la luz.

#### 3.1.2.1.3. Frecuencia de parpadeo (FP)

La FP se midió contando el número de parpadeos durante el minuto siguiente a la evaluación de las sensaciones. Se pidió a los voluntarios que leyeran en voz alta las letras de una tabla LogMar colocada a 1 m de distancia, de izquierda a derecha y de arriba abajo mientras el experimentador contaba manualmente el número de parpadeos. Los sujetos no sabían que se estaban contando sus parpadeos para evitar el condicionamiento por la situación experimental (Goto *et al.*, 2002). La FP se calculó como el número de parpadeos durante la duración de la tarea para cada sujeto. El tiempo medio de la tarea fue de  $24,6 \pm 8,6$  segundos. La medición se realizó antes y a los 5, 15, 30 y 60 minutos tras el tratamiento tópico correspondiente.

### 3.1.2.2. Protocolo 1B. Volumen de lágrima

El volumen de lágrima se evaluó en condiciones basales y a los 5, 15 y 30 minutos tras la administración del tratamiento tópico correspondiente, utilizando hilos de rojo de fenol comerciales colocados cuidadosamente durante 30 segundos en el saco conjuntival inferior, cerca del canto temporal. El volumen de lágrima se expresó como la longitud de hilo húmedo, medida en mm utilizando una regla.

### 3.1.2.3. Protocolo 2

Se registró la TSC como se ha descrito en la sección 1.2.1.1, analizando la TSC en ambos ojos antes y a diferentes tiempos tras la aplicación, solo en el ojo derecho, de F6H8 (5 y 60 minutos). Para describir mejor los efectos del F6H8 sobre la TSC se analizaron varios parámetros a partir de la grabación de video, promediando los valores obtenidos de 6 periodos entre parpadeos con el fin de reducir la variabilidad (Figura 9C). Los parámetros inicialmente analizados en las imágenes de termografía infrarroja fueron: (a) valor de la TSC inmediatamente antes de un parpadeo, (b) valor de la TSC inmediatamente después del parpadeo y (c) valor de la TSC inmediatamente antes del siguiente parpadeo. A partir de los valores de esos parámetros, se calcularon posteriormente tres parámetros más: (d) el cambio de la TSC durante el parpadeo (calculado como b menos a), (e) el cambio de la TSC durante el intervalo entre dos parpadeos (calculado como c menos b) y (f) la variación de la TSC entre parpadeos consecutivos (calculado como c menos a). Además, se calcularon otros parámetros como (g) la duración del movimiento de parpadeo (calculada como el tiempo entre a y b) y (h) la pendiente del descenso de temperatura durante el primer segundo del intervalo entre parpadeos (IBI, de sus

siglas en inglés, interblink interval). Además de determinar esos parámetros en la superficie corneal, se midió la temperatura de 1 cm<sup>2</sup> de la piel del párpado en los diferentes puntos temporales antes y después del tratamiento con gotas (tanto con F6H8 como con la solución salina).

### 3.1.3. Respuesta del F6H8 y de la solución salina a los cambios de temperatura

Se colocó una sonda de temperatura termopar, flexible y ultrafina (IT-23, Physitemp Instruments LLC, Clifton, NJ, EE. UU.), en el fondo de un tubo Eppendorf que contenía 1 ml de F6H8 o de solución salina o nada (aire). Se realizaron 4 observaciones por condición. La temperatura se registró continuamente mediante la sonda, que enviaba la información captada a un termómetro digital (BAT-12 Microprobe Thermometer, Physitemp Instruments LLC), se digitalizaba y almacenaba para su análisis offline (Figura 9D). La temperatura en el interior del tubo se modificaba a voluntad mediante un dispositivo controlador de temperatura de fabricación casera cuya célula Peltier se colocó en el interior del tubo. El Peltier permitía cambiar rápidamente la temperatura entre 15 y 50°C, aunque sólo se exploró el rango de temperatura cercano a los valores normales de temperatura de la superficie ocular. A partir de una temperatura Peltier en reposo ( $T_{\text{Peltier}}$ ) en torno a los 34°C, se incrementó la temperatura en 3°C a un ritmo aproximado de 0,030 °C/s. Tras 8 minutos a 37°C, se indujo un enfriamiento de 3°C con el Peltier a una velocidad de enfriamiento similar a la del calentamiento previo. El Peltier y la temperatura del fluido del tubo ( $T_{\text{F6H8}}$ ,  $T_{\text{salino}}$  o  $T_{\text{aire}}$ ) se registraron simultáneamente y se almacenaron en un ordenador utilizando una interfaz CED micro1401 y el software Spike2 v8.02 (Cambridge Electronic Design Ltd., Milton, Cambridge, RU) para su posterior análisis off-line. Los experimentos se realizaron también en una habitación

con la temperatura ambiente y la humedad parcial controladas (23-24°C y 40%, respectivamente).



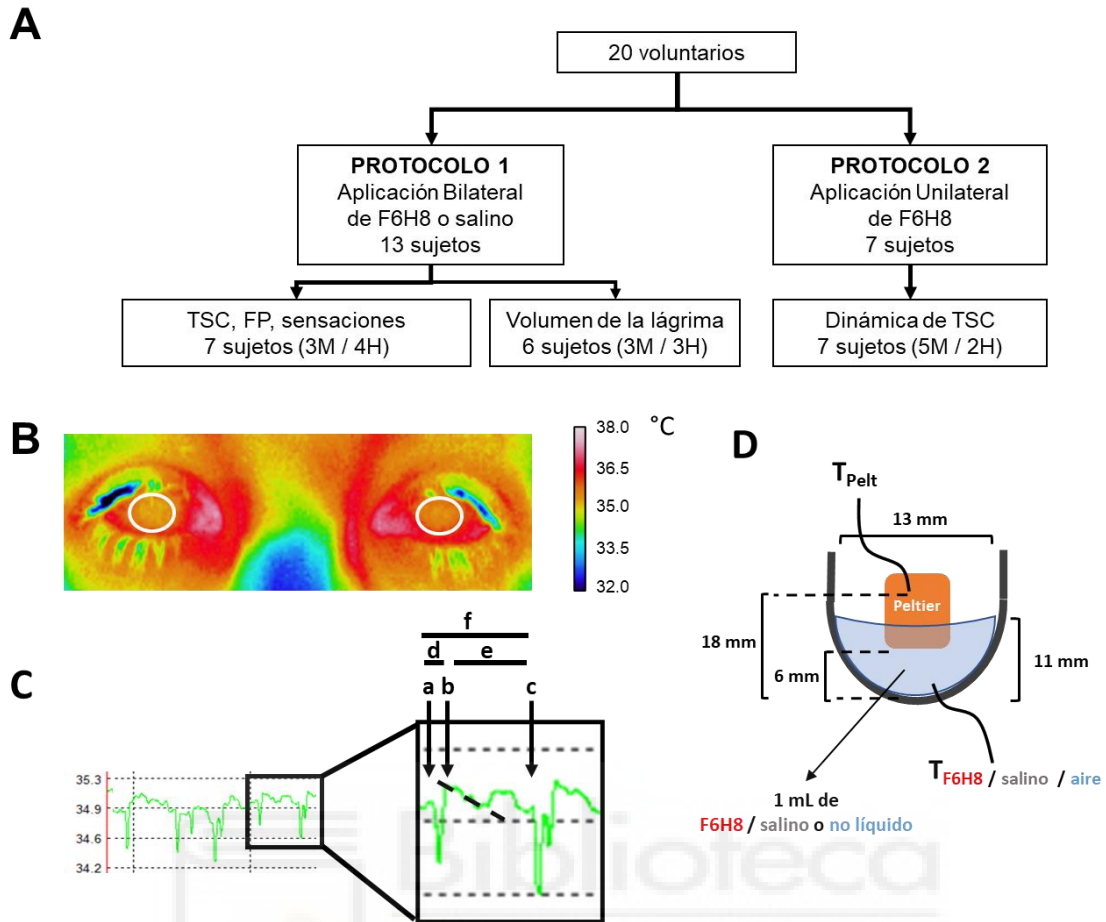


Figura 9 | Protocolo experimental y métodos utilizados para alcanzar el objetivo específico 1. A. Distribución de los participantes entre los diferentes protocolos experimentales. En el protocolo experimental 1, se aplicó F6H8 o solución salina en ambos ojos, mientras que en el protocolo experimental 2, se aplicó F6H8 solo en el ojo derecho. TSC: temperatura de la superficie corneal. FP: frecuencia de parpadeo. B. La TSC se calculó a partir de imágenes termográficas de video por infrarrojos. Los valores de temperatura de un área de 1 cm<sup>2</sup> de la superficie de la córnea (circunferencias blancas) se promediaron para obtener el valor de la TSC en cada tiempo estudiado. C. Parámetros medidos a partir de las imágenes termográficas para cuantificar la dinámica de la TSC. Se seleccionaron aleatoriamente seis intervalos entre parpadeos (IBI, de sus siglas en inglés: interblink interval) y se analizaron las siguientes variables: (a) valor de la TSC inmediatamente antes de un parpadeo; (b) valor de la TSC inmediatamente después del parpadeo; (c) valor de la TSC inmediatamente antes del siguiente parpadeo; (d) cambio de la TSC durante un parpadeo, calculado como b-a; (e) cambio de la TSC durante el IBI, calculado como c-b; y (f) cambio de la TSC entre parpadeos consecutivos, calculado como c-a. El tiempo entre a y b se consideró como la duración del movimiento de parpadeo. Además, se calculó la pendiente de la disminución de la temperatura durante el primer segundo del IBI (línea de puntos). D. Representación esquemática de la configuración experimental utilizada para medir la dinámica de los cambios de temperatura de F6H8 y la solución salina durante los cambios de temperatura inducidos con una célula de Peltier colocada dentro del líquido en un tubo. La temperatura se midió con un termopar sumergido en el líquido contenido en un tubo.  $T_{Pelt}$ : temperatura de la célula de Peltier medida con un sensor PT100.  $T_{F6H8}$ ,  $T_{Salino}$  y  $T_{Aire}$ : temperatura medida con un termopar colocado dentro de F6H8, solución salina o recipiente vacío, respectivamente.

### 3.1.4. Análisis de datos

El cálculo del tamaño muestral para el análisis de comparación por pares (t test pareado) se realizó utilizando Gpower\*3.1,14 considerando un tamaño del efecto de 1,5 (d de Cohen), una potencia de 0,8 y un error  $\alpha$  de 0,05. El número mínimo de sujetos se estableció en  $n=6$ , de modo que el tamaño muestral de participantes en cada subconjunto del protocolo experimental fuera suficiente para alcanzar la significación estadística.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics (versión 25.0). Primero se realizó un análisis descriptivo para detectar posibles valores atípicos. Después se estudió la distribución de los datos con la observación de las gráficas de cajas y bigotes de cada variable y con la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. Cuando fue necesario, se compararon las varianzas mediante la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. Las variables con distribución normal se compararon con la prueba t de Student pareada, ANOVA o ANOVA de medidas repetidas (RM ANOVA). Cuando las variables mostraron una distribución no normal se compararon con la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Las variables categóricas se compararon con la prueba de la  $\chi^2$ .

A menos que se indique lo contrario, los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (mediana  $\pm$  rango intercuartílico, en caso de no cumplir el supuesto de normalidad). El umbral de significación estadística se estableció en  $p<0,05$ . Los gráficos se realizaron con el programa informático SigmaPlot (Systat Software Inc., San José, CA, EE. UU.).

### 3.2. Materiales y métodos utilizados para los objetivos específicos 2 y 3

A continuación, se exponen los materiales y métodos utilizados para la consecución de los objetivos específicos 2 y 3, cuyos resultados están recogidos en un segundo artículo que se encuentra en preparación.

#### 3.2.1. Sujetos

Doce voluntarios sanos (7 mujeres, 5 hombres; edad media  $28,67 \pm 6,68$  años) participaron en este estudio. Cada sujeto firmó un consentimiento informado tras una cuidadosa explicación y lectura de una hoja informativa sobre los procedimientos experimentales y las condiciones del estudio. Tras el consentimiento informado sobre el protocolo experimental y el tratamiento de datos, se realizó una breve historia clínica que incluía información sobre variables que constituyeran un criterio de exclusión (véase apartado 1.1) o que pudieran influir en los resultados por afectar el estado de la sensibilidad ocular (ingesta de fármacos antiinflamatorios y analgésicos, la fase del ciclo menstrual, la presencia de dolor crónico o agudo, etc.). Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la ley española (RD 53/2013) y la Declaración de Helsinki, y siguieron un protocolo aprobado por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández (UMH.INJGa.03.20).

#### 3.2.2. Sensaciones evocadas en la superficie ocular

Se preguntó a los sujetos sobre la percepción consciente (sí/no) de sus ojos (*consciencia de la superficie ocular*) y se evaluaron las sensaciones oculares experimentadas (*irritación, sequedad, picor, sensación de lagrimeo, quemazón, frío*



y *dolor*) al final de cada condición (ver apartado 2.4) usando Escalas de Valoración Numéricas verbales (NRS, del inglés Numerical Rating Scale) de 0-10, siendo 0 ninguna sensación y 10 la máxima sensación imaginable (Acosta *et al.*, 2001a).

### 3.2.3. Electromiografía de superficie del músculo *orbicularis oculi*

La actividad eléctrica del músculo orbicular del párpado ( $OO_{EMG}$ ) se midió usando electrodos de superficie (30 mm, Dormo® Ag/AgCl). Un electrodo se colocó en la parte central del margen infraorbitario de cada ojo, formado por la unión de los huesos cigomático y maxilar. Un único electrodo de referencia se colocó en el centro de la frente. Para reducir la impedancia de los electrodos, se limpió la piel con una gasa estéril empapada en alcohol (Sheedy *et al.*, 2005). Las señales electromiográficas fueron amplificadas, filtradas (0.001-5 kHz) (Wireless 2100 System, Multi Channel Systems, Harvard Bioscience, Inc., EE. UU.) y adquiridas a 40 kHz mediante una interfase (IFB-C multiboot) y el software específico Spike2. Ese mismo software se empleó para analizar off-line las señales eléctricas. Se midió la amplitud y la duración de la señal  $OO_{EMG}$  asociada a cada parpadeo (Figura 10) y se calculó el valor medio de ambos parámetros para cada sujeto y en cada condición. A fin de reducir la varianza de la señal entre sujetos, la amplitud se normalizó para cada sujeto con respecto a la obtenida en condiciones control (Allison *et al.*, 1993; Arendt-Nielsen *et al.*, 1996). Para medir la amplitud y la duración de la fase negativa de la señal  $OO_{EMG}$ , en el programa Spike2 se creó un *script*, o secuencia de comandos, para detectar la deflexión negativa de la señal  $OO_{EMG}$ , correspondiente a la despolarización del músculo OO durante el parpadeo, para automatizar la detección de cada evento y la extracción de datos. Además, se calculó el promedio de las señales  $OO_{EMG}$  de todos los eventos para cada sujeto y condición. Asimismo, a partir de los datos obtenidos se calcularon la FP y el IBI (Figura 10).

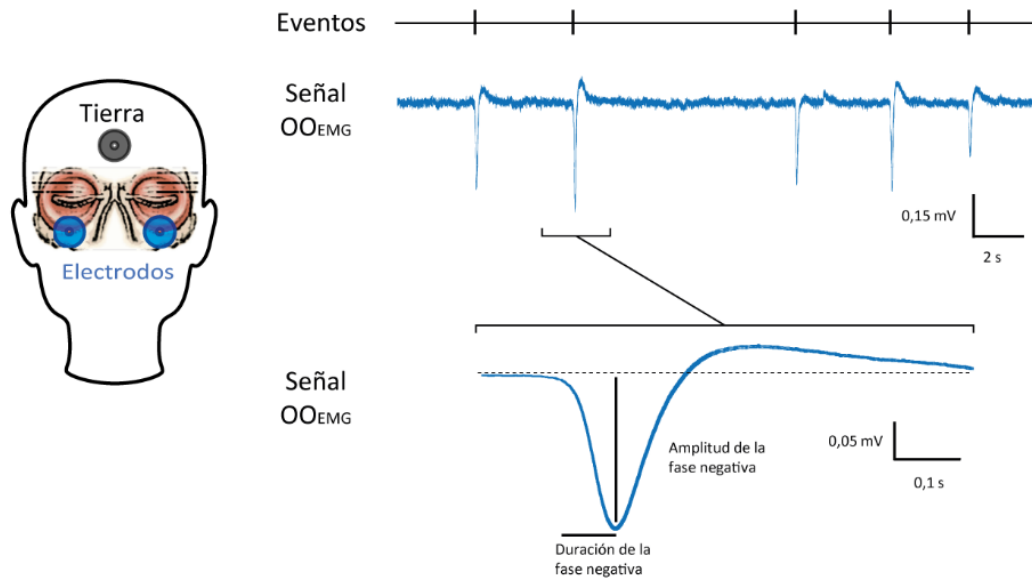


Figura 10 | Registro de la actividad electromiográfica del músculo orbicular del párpado ( $OO_{EMG}$ ) y parámetros medidos. La figura izquierda muestra la localización de los electrodos para realizar el registro de la actividad eléctrica. La parte derecha muestra un ejemplo de registro de la actividad  $OO_{EMG}$  en condición control. La duración de la fase negativa y la amplitud de las señales se midieron para cada evento eléctrico asociado a un parpadeo espontáneo.

#### 3.2.4. Protocolo experimental

El protocolo experimental constaba de dos sesiones realizadas en días diferentes, con un intervalo de 7 días entre ellos. El protocolo se resume en la Figura 11.

El día 1, las señales  $OO_{EMG}$  y las sensaciones oculares se midieron mientras los sujetos se sometían a cuatro condiciones experimentales, de 5 minutos de duración cada una:

- A. Control. Los sujetos estaban sentados cómodamente, mirando a la pared frontal de la sala con la luz encendida.
- B. Oscuridad. La misma medición se realizó después, esta vez con la luz apagada. Para asegurar la oscuridad total, se cubrió el ordenador con una pieza de tela opaca de PVC y se taparon las juntas de la puerta con cartón oscuro.

- C. Realización de una tarea de atención visual (AV). A continuación, los sujetos realizaron una tarea de discriminación visual en un ordenador. Aparecían cinco imágenes consecutivas y aleatorias durante un minuto y los sujetos intentaban encontrar personas, animales u objetos ocultos. Cuando los sujetos terminaban la prueba, lo indicaban dando un golpe con el dedo índice en el teclado del ordenador. Indicando al experimentador que habían concluido la tarea.
- D. Realización de una tarea de atención no visual (N-AV). La tarea no visual consistía en escuchar cinco grabaciones de audio aleatorias con problemas matemáticos y éticos. Al finalizar el enunciado de cada problema, disponían de un minuto para comunicar la solución. Se insistía a los sujetos que debían estar calculando o reflexionando sobre los dilemas durante el minuto entero. De la misma manera que en la tarea AV, si por cualquier motivo los sujetos finalizaban la tarea antes de cumplir un minuto, debían indicarlo con un golpe con el índice.

En ambas tareas atencionales, para realizar grabaciones de 5 minutos de duración, si los sujetos terminaban la tarea antes de ese tiempo, se sometían a problemas o imágenes adicionales hasta completar el tiempo.

Una semana después (día 2 de experimentación), se volvieron a realizar la EMG y el análisis de las sensaciones en las cuatro condiciones experimentales, pero esta vez tras la aplicación tópica, en ambos ojos, de una gota de 10µl de F6H8 (EvoTears®, Novaliq GmbH) o de un combinado comercial de anestésicos locales (AL) que contiene oxibuprocaína (4mg/ml) y tetracaína (1mg/ml) (Colirofta Anestésico Doble, Barcelona). Si bien en caso del AL solo fue necesaria una aplicación al principio del experimento, ya que la duración de su efecto supera la duración de la sesión (Liu *et al.*, 1993; Verma *et al.*, 1997; Douet *et al.*, 2013), el F6H8 tuvo que administrarse nuevamente entre la tercera y la cuarta condición para asegurar

el mantenimiento de sus efectos, de alrededor de 20 minutos sobre la frecuencia de parpadeo (Delicado-Miralles *et al.*, 2021).

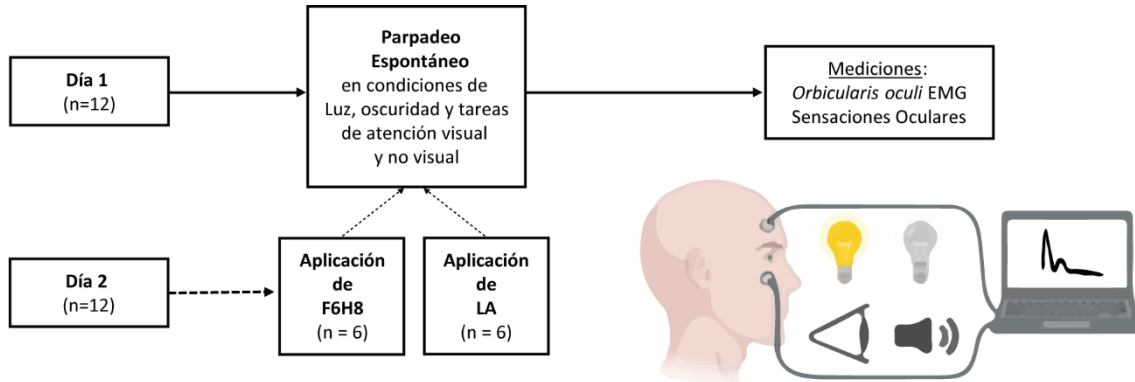


Figura 11 | Protocolo experimental para los objetivos 2 y 3 (véase el texto).

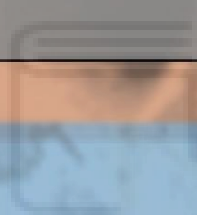
### 3.2.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics (versión 26.0.). Se realizó un análisis descriptivo para detectar posibles valores atípicos (*outlier values*). Después se estudió la distribución de los datos de cada variable con la observación de las gráficas de cajas y bigotes, así como con la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. Se utilizó la prueba T y la prueba T pareada para muestras independientes y dependientes, respectivamente, o las pruebas equivalentes no paramétricas en los casos donde no se cumplió la asunción de normalidad. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de  $\chi^2$ . Las varianzas se compararon mediante la prueba de Levene para la igualdad de varianzas, cuando fue necesario.

Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (mediana  $\pm$  rango intercuartílico, en caso de no cumplir el supuesto de normalidad). El umbral de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .



# Resultados



Biblioteca  
UNIVERSIDAD Miguel Hernández

## 4. Resultados

A continuación, se exponen los resultados de la presente tesis. En el caso de los resultados correspondientes al objetivo 1, los datos son los resultados publicados en el artículo que se acompaña en el Anexo I (Delicado-Miralles *et al.*, 2021). Los resultados correspondientes a los objetivos 2 y 3, además de en esta memoria, se incluyen en un manuscrito actualmente en preparación (Delicado-Miralles *et al.*, en preparación).

### 4.1. Efectos de la aplicación de F6H8 sobre la superficie ocular

#### 4.1.1. Efectos de la aplicación tópica de F6H8 o de solución salina en ambos ojos

En primer lugar, en siete personas jóvenes voluntarias sanas (3 mujeres, 4 hombres) estudiamos los efectos de la instilación tópica bilateral de una gota de 10  $\mu$ l de F6H8 sobre la temperatura de la superficie corneal (TSC), la frecuencia de parpadeo (FP) y las sensaciones evocadas (protocolo 1A). Estas variables se estudiaron antes y a diferentes tiempos (5, 15 y 60 min) tras del tratamiento. Además, en otras 6 personas jóvenes voluntarias (3 mujeres y 3 hombres) se estudió los efectos del F6H8 sobre la tasa de lagrimación (Protocolo 1B). En todos los casos, los resultados obtenidos tras la aplicación de F6H8 se compararon con los obtenidos tras la instilación de solución salina.

## 4.1.1.1. Sensaciones evocadas

Se evaluaron varias sensaciones oculares (sensación de frío, sequedad, quemazón, picor, molestia punzante, sensación de cuerpo extraño, arenilla, fatiga ocular, lagrimeo y molestias inducidas por la luz) experimentadas por los voluntarios antes y en diferentes momentos tras el tratamiento correspondiente. En general, ni el tratamiento con F6H8 ni con solución salina evocaron sensaciones oculares en ninguno de los puntos temporales estudiados, siendo 0 la mediana de las puntuaciones. A modo de ejemplo, la Tabla 1 muestra los valores de la EVA de las sensaciones oculares evaluadas 5 min después del tratamiento tópico bilateral con F6H8 o solución salina. Además, no se encontraron diferencias entre los tratamientos con F6H8 y solución salina en la proporción de sujetos que comunicaron haber experimentado alguna sensación tras el tratamiento (Tabla 1), aunque 5/7 sujetos diferenciaron el F6H8 de la solución salina. Dos sujetos informaron de visión borrosa durante unos segundos inmediatamente tras la aplicación de F6H8.

Sensaciones oculares	F6H8		Salino	
	Intensidad de la sensación	Número de sujetos con sensaciones	Intensidad de la sensación	Número de sujetos con sensaciones
Frío	0 (0.0)	1/7	0 (0.0)	1/7
Sequedad	0 (0.0)	0/7	0 (0.0)	1/7
Quemazón	0 (0.0)	1/7	0 (3.2)	2/7
Molestia punzante	0 (0.0)	0/7	0 (0.0)	0/7
Cuerpo extraño	0 (6.0)	2/7	0 (7.1)	1/7
Picor	0 (0.0)	1/7	0 (6.8)	3/7
Arenilla	0 (4.8)	1/7	0 (0.0)	1/7
Fatiga ocular	0 (0.0)	1/7	0 (0.0)	0/7
Lagrimeo	0 (0.0)	0/7	0 (8.4)	2/7
Molestias inducidas por la luz	0 (0.0)	0/7	0 (1.3)	1/7



Tabla 1 | Sensaciones de la superficie ocular evaluadas 5 min después del tratamiento tópico bilateral con una gota de 10  $\mu$ L de F6H8 o de solución salina. Los datos mostrados en cada columna son: mediana (IQR) de unidades de la EVA; número de sujetos que respondieron/número total de sujetos explorados. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con F6H8 y con solución salina para ninguna sensación (prueba de rangos con signo de Wilcoxon y prueba de chi cuadrado).

#### 4.1.1.2. Temperatura de la superficie corneal

Los valores de la TSC se calcularon promediando la temperatura de 1  $\text{cm}^2$  de superficie corneal (véase Figura 9B) de las imágenes termográficas infrarrojas tomadas inmediatamente después de la apertura del ojo (véase Figura 9C, parámetro b), antes y en diferentes momentos tras el tratamiento tópico (véase Figura 8). La TSC disminuyó significativamente después del tratamiento con F6H8 en comparación con el valor antes del tratamiento ( $p= 0,001$ , ANOVA de medidas repetidas;  $p= 0,001$ ,  $p= 0,008$  y  $p= 0,012$  a los 5, 15 y 60 min, respectivamente; prueba post hoc de Dunnett;  $n= 7$ ) (Figura 12A). Por el contrario, la instilación bilateral de solución salina no modificó la TSC en ninguno de los tiempos tras el tratamiento (Figura 12A, *inset*).

#### 4.1.1.3. Volumen de lágrima

Tras el tratamiento con salino, no se encontraron cambios significativos en el volumen de lágrima medido con hilos de rojo de fenol ( $p= 0,640$ , ANOVA de medidas repetidas;  $n= 6$ ) (Figura 12B, *inset*). El volumen de lágrima aumentó ligeramente y sólo a los 5 min después de F6H8, aunque el cambio no fue estadísticamente significativo ( $p= 0,151$ , ANOVA de Medidas Repetidas;  $n= 6$ ) (Figura 12B).

#### 4.1.1.4. Frecuencia de parpadeo

La aplicación bilateral de solución salina no afectó a la FP en ningún punto temporal estudiado (inserto de la Figura 12C, *inset*). Por el contrario, la aplicación de F6H8 aumentó significativamente la FP en comparación con la frecuencia previa al tratamiento, siendo significativo este aumento durante los 15 minutos posteriores al mismo ( $p = 0,004$ , ANOVA de medidas repetidas;  $p = 0,015$  y  $0,008$  a los 5 y 15 min, respectivamente, prueba post hoc de Dunnett,  $n = 7$ ) (Figura 12C).

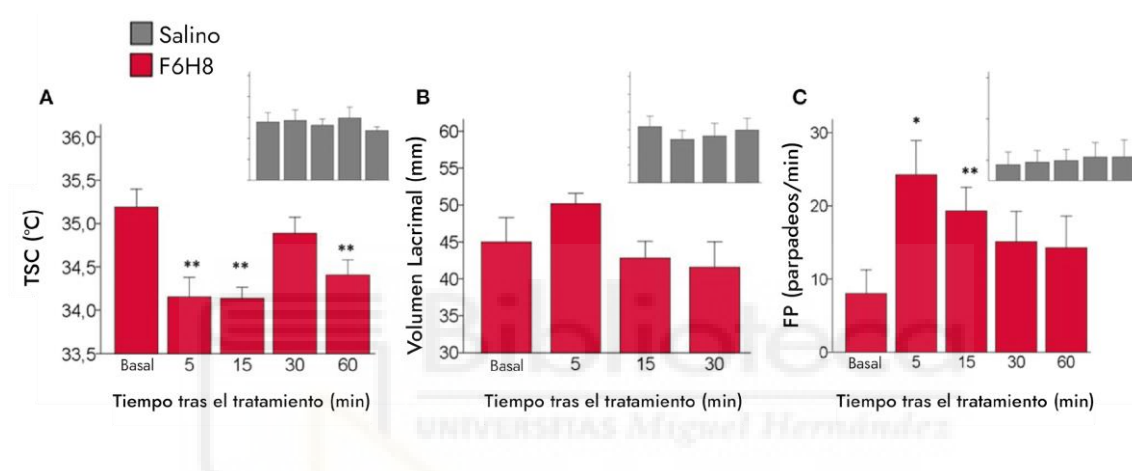


Figura 12 | Efectos de la instilación tópica de F6H8 o solución salina en ambos ojos. (A) TSC medida al principio del último intervalo entre parpadeos capturado en imágenes termográficas infrarrojas;  $p = 0,001$ , ANOVA de Medidas Repetidas;  $**p < 0,01$  prueba de Dunnett  $n = 7$ . (B) Volumen de lágrima medido con hilos de rojo de fenol; no hubo diferencias significativas, ANOVA de medidas repetidas, los datos son la media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 6$ . (C) Frecuencia de parpadeo (FP);  $p < 0,005$ , ANOVA de medidas repetidas;  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ , prueba de Dunnett,  $n = 7$ .

#### 4.1.2. Efectos de la administración unilateral de F6H8 en la temperatura de la superficie ocular

En un grupo diferente de personas voluntarias ( $n = 7$ ; Protocolo 2), se midió la TSC antes y después de la aplicación de una gota de F6H8 aplicada sólo en el ojo derecho, para comparar la dinámica de la temperatura durante los intervalos entre

parpadeos (IBI) en el ojo tratado con la del ojo contralateral, no tratado. Para ello, se analizó la evolución de los valores de la TSC a lo largo de los IBI (Figura 9C).

Confirmando los resultados obtenidos en los experimentos del protocolo 1, los valores de TSC del ojo tratado al inicio del IBI fueron más bajos en las mediciones hechas a los 5 y 15 min tras la aplicación del F6H8 ( $p = 0,001$ , ANOVA de medidas repetidas;  $p = 0,002$  y  $0,007$ , respectivamente, prueba post hoc de Dunnett;  $n = 7$ ), siendo el efecto máximo a los 5 min después del tratamiento (Figura 13A). Por el contrario, en los ojos no tratados, no se observó ningún cambio significativo de los valores de la TSC al inicio del IBI en ninguno de los puntos temporales estudiados (Figura 13A). Los valores de TSC obtenidos al inicio del IBI fueron significativamente inferiores en los ojos que recibieron F6H8 que en los ojos no tratados a los 5 y 15 min después del tratamiento ( $p = 0,001$  y  $0,023$ , respectivamente, prueba t pareada;  $n = 7$ ) (Figura 13A).

Para confirmar que el efecto de enfriamiento al tratar con F6H8 se limitaba a la superficie ocular, también medimos la temperatura de la piel del párpado, observando que ésta no se modificaba significativamente en el párpado del ojo tratado con F6H8 ( $35,01 \pm 0,61^{\circ}\text{C}$  vs  $35,3 \pm 0,44^{\circ}\text{C}$ , antes y 5 min después del tratamiento, respectivamente;  $p = 0,072$ , prueba t pareada) ni en el del ojo no tratado ( $34,98 \pm 0,57^{\circ}\text{C}$  vs  $35,37 \pm 0,53^{\circ}\text{C}$ ;  $p = 0,052$ ).

Además de obtener los valores absolutos de temperatura, también se calcularon los cambios de temperatura en varias circunstancias a partir de las imágenes de vídeo tomadas antes de tratar con F6H8 y a los 5 min (cuando se obtenía la mayor reducción de temperatura) o los 60 min después del tratamiento con F6H8. En concreto, se calculó el aumento de la TSC provocado mientras los párpados permanecían cerrados en cada parpadeo, la evolución de la temperatura entre

parpadeos consecutivos y el enfriamiento de la superficie corneal durante el IBI (Figura 13B-D). Además de partir de una temperatura más baja al inicio del IBI (Figura 13A), el descenso de la temperatura durante el IBI fue más prominente en los ojos tratados con F6H8 a los 5 min del tratamiento, y recuperó los valores basales a los 60 minutos (Figura 13B, barras rojas). Este efecto no se produjo en el ojo no tratado (Figura 13B, barras vacías).

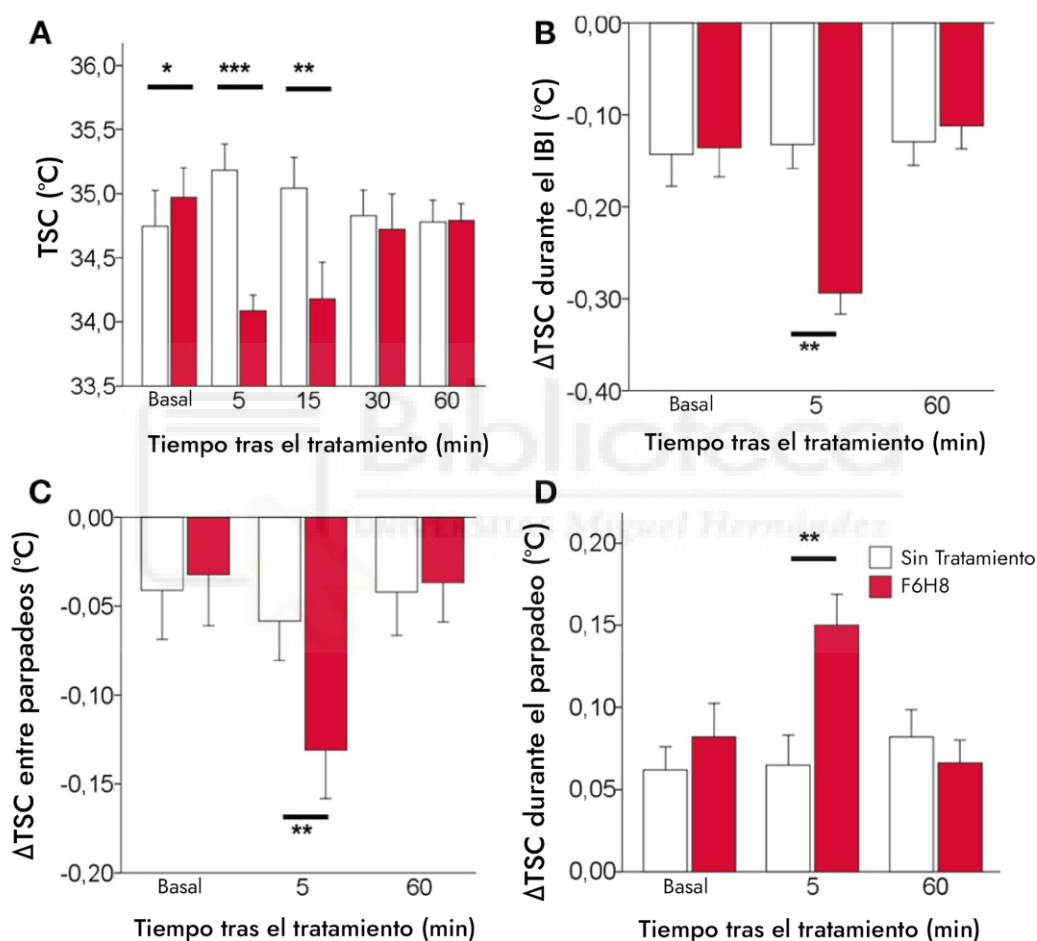


Figura 13 | Efectos de la instilación tópica unilateral de F6H8 sobre los valores de la TSC medidos a partir de imágenes de termografía por infrarrojos. (A) TSC medida inmediatamente después del parpadeo, es decir, al principio del intervalo entre parpadeos (IBI). (B) Cambio de la TSC entre el inicio y el final del IBI. (C) Cambio de la TSC entre parpadeos consecutivos. (D) Variación de la TSC durante el parpadeo. Los datos son la media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 7$ ; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t pareada.

Durante el IBI, los ojos tratados con F6H8 se enfriaron más rápidamente que los ojos no tratados, como refleja la más rápida pendiente del descenso de la temperatura durante el primer segundo del IBI obtenida en imágenes obtenidas a los 5 min del tratamiento con F6H8 ( $-0,078 \pm 0,16^\circ\text{C}/\text{s}$  vs  $-0,165 \pm 0,82^\circ\text{C}/\text{s}$ , antes y 5 min después del F6H8, respectivamente;  $p < 0,01$ , prueba t pareada). Por el contrario, la pendiente de descenso de la temperatura durante el IBI no cambió significativamente en el ojo no tratado ( $-0,061 \pm 0,145^\circ\text{C}/\text{s}$  vs  $-0,082 \pm 0,101^\circ\text{C}/\text{s}$ , antes y 5 min, respectivamente;  $p = 0,437$ ).

La reducción de la TSC inducida por F6H8 se presentó inmediatamente después de su aplicación, aunque la magnitud del efecto fue aumentando con el tiempo durante los primeros 15 min tras el tratamiento (Figuras 8B, 13A). El enfriamiento creciente durante este tiempo se evidenció por las diferencias significativas obtenidas al comparar los valores de TSC de parpadeos consecutivos que tuvo el máximo entre 5 y 15 minutos (Figura 13C).

A continuación, comparamos los valores de TSC medidos inmediatamente antes y después de un parpadeo para valorar la magnitud del calentamiento de la superficie ocular que se producía durante el tiempo en que los ojos estaban cerrados. Este aumento de la TSC producido durante el parpadeo fue significativamente mayor en los ojos tratados con F6H8 que en los ojos no tratados (Figura 13D). Como este calentamiento de la superficie ocular se produce por transferencia de calor entre la conjuntiva palpebral vascularizada y el tejido corneal avascular, especulamos si el mayor calentamiento durante el parpadeo se debía a una mayor duración del cierre ocular en los ojos tratados con F6H8 y, por tanto, a un mayor tiempo de contacto de la córnea con un tejido vascularizado. Para discernir este punto, utilizamos las grabaciones de vídeo para medir la duración del parpadeo, encontrando que la duración del cierre ocular no se modificó

significativamente tras la aplicación de F6H8 ( $0,59 \pm 0,14$  ms vs.  $0,65 \pm 0,18$  ms, antes y 5 min tras la aplicación de F6H8, respectivamente;  $p = 0,128$ , prueba t pareada).

#### 4.1.3. Respuesta térmica del F6H8 y de la solución salina a los cambios de temperatura

Se realizaron mediciones con una sonda térmica utilizando el diseño experimental descrito en la Figura 9D. Encontramos que para una temperatura constante en torno a 33-34°C mantenida de la célula Peltier ( $T_{\text{Peltier}}$ ) y una temperatura ambiente de unos 23°C, la temperatura de la solución salina ( $T_{\text{salino}}$ ) era cercana a 32°C; es decir, alrededor de 1°C más baja que la  $T_{\text{Peltier}}$  (Figura 14A). La temperatura medida en F6H8 ( $T_{\text{F6H8}}$ ) en estas condiciones era de unos 29°C; es decir, alrededor de 4-5°C más baja que la  $T_{\text{Peltier}}$  (Figura 14A). En este sentido, la  $T_{\text{F6H8}}$  se comportó de manera similar a la temperatura en el interior del tubo medida sin ningún líquido ( $T_{\text{aire}}$ ), unos 4°C inferior a la  $T_{\text{Peltier}}$  (Figura 14A).

Al cambiar la temperatura de la Peltier, las temperaturas  $T_{\text{salino}}$ ,  $T_{\text{F6H8}}$  y  $T_{\text{aire}}$  siguieron los cambios de la  $T_{\text{Peltier}}$  (Figura 14A), manteniendo la diferencia descrita en el párrafo anterior para cada fluido. La comparación de las temperaturas  $T_{\text{salino}}$  y  $T_{\text{F6H8}}$ , medidas mientras se realizaban escalones de temperatura ascendentes o descendentes, mostró dos curvas de histéresis diferentes (Figura 14B).  $T_{\text{salino}}$  mostró una tasa más lenta de aumento o descenso de la temperatura en comparación con  $T_{\text{F6H8}}$ . Además, las tasas de calentamiento y de enfriamiento en el interior de cada fluido mostraron que el F6H8 tendía a enfriarse más rápidamente que la solución salina. Además, en nuestras condiciones experimentales, la velocidad de enfriamiento de  $T_{\text{F6H8}}$  fue más alta para temperaturas cercanas a los 34°C (Figura 14B).

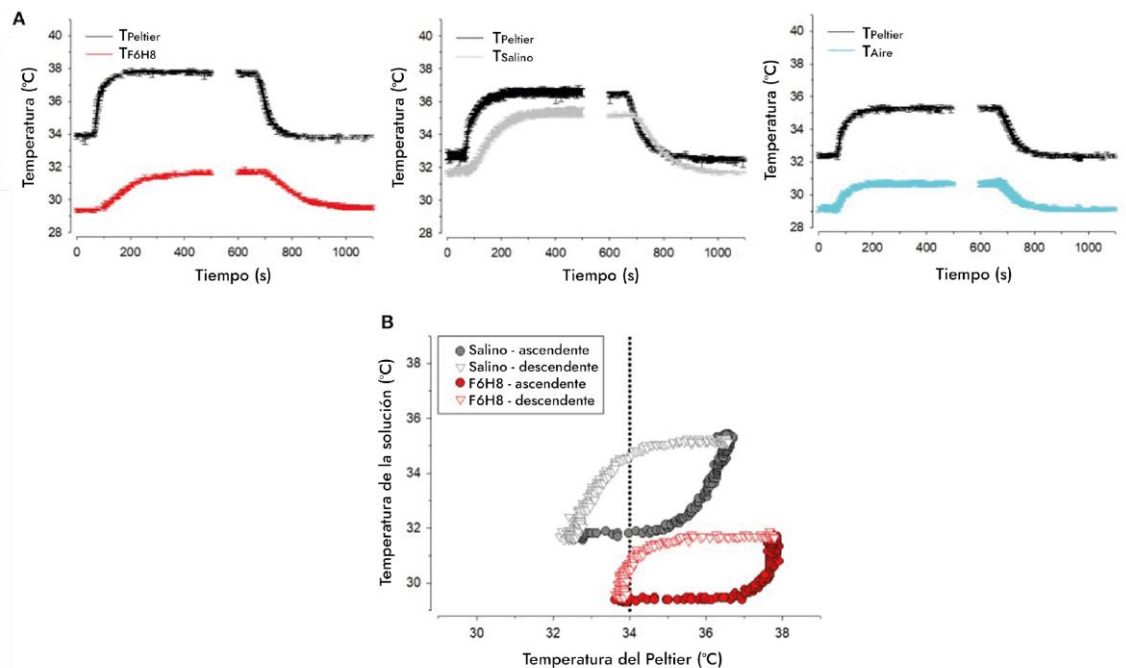


Figura 14 | Resultados de la adaptación térmica del F6H8 y la solución salina a los cambios de temperatura generados con una placa Peltier. (A) Ejemplos del registro de la temperatura medida en el interior de tubos conteniendo F6H8, solución salina o vacíos (aire) durante el calentamiento o enfriamiento experimental en las condiciones explicadas en Métodos (véase Figura 9D). (B) Curvas de histéresis de la temperatura medida durante el calentamiento (símbolos rellenos) o el enfriamiento (símbolos vacíos) dentro de solución salina (gris) y F6H8 (rojo).

## 4.2. Efectos de la actividad de los termorreceptores de frío en la frecuencia y características del parpadeo espontáneo

### 4.2.1. Sensaciones oculares y parpadeo espontáneo en diferentes condiciones experimentales (control, oscuridad y realización de tareas que requieren la atención visual o no visual)

En ausencia de tratamiento tópico ocular, la proporción de personas voluntarias que reportaron la percepción consciente de la superficie ocular fue similar en condiciones control (luz; 25%) y en oscuridad (33.3%). La realización de ambas tareas atencionales (AV y N-AV) redujo hasta cero esa proporción (Tabla 2). En comparación con las condiciones de reposo de control y oscuridad, la realización de AV y N-AV también redujo hasta valores cercanos a cero las valoraciones de las diferentes cualidades de las sensaciones oculares experimentadas (Tabla 2).

	Consciencia de la superficie ocular (% de sujetos)			Irritación			Sensación de lagrimeo			Quemazón			Picor			Sequedad		
	ST	F6H8	AL	ST	F6H8	AL	ST	F6H8	AL	ST	F6H8	AL	ST	F6H8	AL	ST	F6H8	AL
Control	25	83.3*	66.7	1 (3)	0 (2)	0 (1)	0	0 (5)	1 (3)	0	0 (2)	0	0 (2)	0 (1)	0 (3)	0,5 (3)	0 (6)	2,5 (7)
Oscuridad	33,3	66.7	50	0 (1)	0	0 (1)	0	0	0	0	0 (1)	0	0 (1)	0 (1)	0 (3)	0 (3)	0 (3)	1,5 (4)
Atención visual	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (1)	0	0	0	0 (1)
Atención no visual	0	0	16.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (1)	0	0	0	0	0

Tabla 2. Sensaciones oculares experimentadas en diferentes condiciones experimentales, sin tratamiento o con tratamiento tópico con perfluorohexiloctano o anestésicos locales. Se muestran los datos obtenidos en las diferentes condiciones experimentales (Control, oscuridad, realización de tareas AV y N-AV), sin tratamiento (ST) o tras el tratamiento tópico con una gota de un colirio comercial de perfluorohexiloctano (F6H8) o de anestésicos locales (AL). Los datos de la primera columna son el % de voluntarios que refirieron una sensación consciente de la superficie ocular (\*  $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ). El resto de las columnas muestran la mediana y, entre paréntesis, el rango intercuartílico de los valores asignados a las diferentes cualidades de las sensaciones evocadas,



medidas con una escala de valoración numérica (NRS). No se encontraron diferencias significativas al comparar las sensaciones valoradas por el grupo sin tratamiento (ST,  $n = 12$ ) en las diferentes condiciones (control, oscuridad, AV y N-AV). Tampoco entre los datos obtenidos con los diferentes tratamientos (ST, F6H8 y AL) en cada condición experimental ( $n = 6$ ). Los valores asignados a la sensación de dolor no figuran en la tabla, ya que fueron 0 en todas las condiciones y tratamientos.

Los valores de la frecuencia de parpadeo espontáneo fueron similares en condiciones de luz (Control) y oscuridad. La realización de tareas que requerían AV disminuyó significativamente la FP, mientras que las tareas de N-AV aumentaron la FP ( $p < 0,05$ , ANOVA RM y prueba de Dunnett, en comparación con la condición Control; Figura 15A). De forma coherente, se observó el efecto opuesto en la duración del IBI durante la realización de AV y N-AV ( $p < 0,001$ , ANOVA RM y prueba de Dunnett, en comparación con la condición Control; Tabla 3, Figura 1B). La oscuridad no modificó el IBI respecto a la condición Control.

En cuanto a la señal  $OO_{EMG}$  generada durante el parpadeo espontáneo, tanto las tareas AV como las N-AV aumentaron su amplitud (siendo el aumento significativo en el caso de las AV;  $p < 0,05$ , ANOVA RM y test de Dunnett, comparando con la condición Control) y disminuyeron su duración (Figura 15C-D). En condiciones de oscuridad, disminuyó significativamente la amplitud ( $p < 0,001$ , ANOVA RM y test de Dunnett, comparado con el control) y aumentó ligeramente la duración de la señal  $OO_{EMG}$  (Figura 15C-D). Esto sugiere que durante la realización de tareas que requieren atención (especialmente de tipo visual) se modifica el control del parpadeo, resultando en señales  $OO_{EMG}$  de mayor amplitud, pero de menor duración. Esto contribuiría a disminuir el tiempo en que los párpados permanecen cerrados y, por tanto, a aumentar el tiempo en el que es posible generar información visual en la retina. En situaciones en las que la información visual ya está restringida (por ejemplo, en condiciones de oscuridad) las señales eléctricas del OO son de menor amplitud y mayor duración.

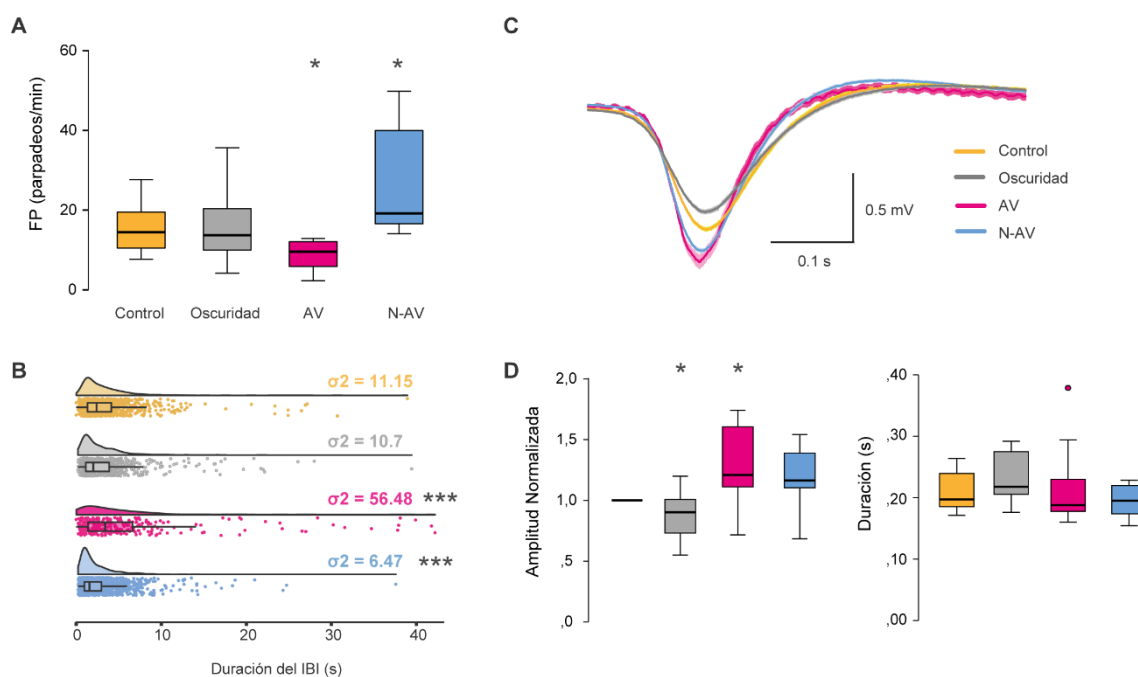


Figura 15 | Frecuencia y características del parpadeo espontáneo en diferentes condiciones experimentales (Control, en oscuridad, realización de tareas AV y N-AV). A. Frecuencia de parpadeo espontáneo (FP),  $n=12$ . B. Duración del intervalo entre parpadeos (IBI). Los IBI se ordenaron por duración y se compararon las Varianzas (Prueba de Levene para la igualdad de varianzas;  $n = 1077$  Control; 971 oscuridad; 285 AV; 1689 N-AV). C. Media e intervalo de confianza de la señal OO<sub>EMG</sub> registrada durante todos los parpadeos registrados en todos los sujetos en las diferentes condiciones experimentales. D. Amplitud normalizada y duración de la señal OO<sub>EMG</sub> registrada en las diferentes condiciones experimentales ( $n = 1062$  en condición Control,  $n = 993$  en oscuridad,  $n = 304$  en AV y  $n = 1075$  en N-AV). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ANOVA RM y test de Dunnett como comparación post hoc.

#### 4.2.2. Efectos del tratamiento tópico con perfluorhexiloctano (F6H8) sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo en condición Control (en reposo y con iluminación normal)

Como parte del protocolo experimental, se estudió la frecuencia y características del parpadeo espontáneo, así como las sensaciones oculares, tras instilar sobre la superficie ocular una gota de F6H8 para reducir la temperatura de la superficie ocular y, consecuentemente, provocar un aumento del input periférico de los termorreceptores de frío. Como se ha indicado en el apartado anterior, parte de los sujetos reportaron sensaciones oculares de valores moderados tras el tratamiento tópico ocular con F6H8 en la situación control, siendo estadísticamente

significativo el porcentaje de voluntarios con percepción consciente de la superficie ocular (véase Tabla 2). Además, la FP aumentó significativamente tras el tratamiento con F6H8 (Tabla 3, Figura 16A). Además, disminuyó significativamente la duración media de los IBI, que se hicieron más regulares ya que disminuyó la variabilidad de su duración (Tabla 3, Figura 16B). En cuanto a la señal  $OO_{EMG}$ , el tratamiento con F6H8 aumentó ligeramente la amplitud y disminuyó la duración (Tabla 3, Figura 16C-D). Así, en la condición de Control (en reposo y con iluminación normal), instilar F6H8 provocó parpadeos más frecuentes y ligeramente más rápidos.


	FP (parpadeos/min)		IBI (s)		Amplitud $OO_{EMG}$ (mV)		Duración $OO_{EMG}$ (s)	
	ST	F6H8	ST	F6H8	ST	F6H8	ST	F6H8
Control	18.2 ± 5.5	30.7±11.9*	3.56±1.1	2.13±0.7**	1±0	1.35±0.3	0.21±0.04	0.18±0.03
Oscuridad	19.6 ± 8.7	29±11.1*	3.48±1.4	2.4±1	0.94±0.2	1.05±0.3	0.23±0.04	0.2±0.04
AV	8 ± 3.8	24.2±4.28* *	7.9±5	2.5±0.4	1.4±0.2	1.6±0.5	0.18±0.02	0.16±0.01
N-AV	28.4±10.9	37.8±11.97*	2.45±0.8	1.7±0.5*	1.25±0.3	1.38±0.3	0.19±0.03	0.17±0.02

Tabla 3. Efectos del F6H8 sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo en diferentes condiciones experimentales. Se muestran la frecuencia de parpadeo (FP), la duración de los intervalos entre parpadeos (IBI) y la amplitud y duración de la señal  $OO_{EMG}$  en diferentes condiciones experimentales (Control, oscuridad, AV y N-AV). ST: sin tratamiento. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; Test de pares, comparación entre ST y F6H8, N = 5 sujetos).

#### 4.2.3. Efecto del tratamiento tópico con anestésicos locales sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo en condición Control (en reposo y con iluminación normal)

En el protocolo experimental se incluyó una sesión en la que los participantes recibieron tratamiento tópico ocular con un colirio comercial con anestésicos locales, con la finalidad de estudiar las características del parpadeo y las sensaciones oculares cuando está inhibida la conducción de información sensorial desde la superficie ocular hacia el SNC. En la condición Control, el tratamiento con AL indujo

sensaciones oculares y tendió a aumentar la percepción consciente de la superficie ocular (Tabla 2). Al menos la mitad de los voluntarios (3/6) refirieron picor y sensación de sequedad inmediatamente tras la aplicación. Estas sensaciones iniciales son debidas, muy probablemente, al efecto directo de los conservantes presentes en su composición, especialmente el clorobutanol, sobre las terminaciones nociceptivas de la córnea y la conjuntiva y desaparecían al empezar a hacer efecto los dos bloqueantes de canales de Na<sup>+</sup> que contiene, como principios activos, el colirio usado. Cuando se bloqueaba la entrada sensorial periférica de la superficie ocular aplicando AL, no se modificaron significativamente la FP, la duración media del IBI o la variabilidad de los IBI (Tabla 4, Figura 17A-B). Asimismo, los valores de la amplitud y duración de la señal OO<sub>EMG</sub> fueron similares a los obtenidos en condición Control sin tratamiento con AL (Tabla 4, Figura 17C-D).



	FP (parpadeos/min)		IBI (s)		Amplitud OO <sub>EMG</sub> (mV)		Duración OO <sub>EMG</sub> (s)	
	ST	AL	ST	AL	ST	AL	ST	AL
Control	20 ± 15.3	16.8 ± 11.59	4.7±2.2	4.7±5.1	1±0	1.1±0.2	0.21±0.03	0.2±0.04
Oscuridad	17.7 ± 18.2	11.9 ± 13.7	7±1	7.5±8.7	0.78±0.2	0.84±0.3	0.24±0.04	0.22±0.03
AV	8.2 ± 4.4	7.3 ± 3.42	9.29±8.9	6.7±2.8	1.2±0.4	1.3±0.5	0.25±0.08	0.2±0.03
N-AV	21.9 ± 13.79	21.1 ± 16.06	3.1±1	4.1±2.2	1.11±0.3	1.12±0.4	0.2±0.02	0.2±0.02

Tabla 4. Efectos de la anestesia local de la superficie ocular con oxibuprocaina y tetracaína (AL) sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo. Se muestran la frecuencia de parpadeo (FP), la duración de los intervalos entre parpadeos (IBI) y la amplitud y duración de la señal OO<sub>EMG</sub> en diferentes condiciones experimentales (Control, oscuridad, AV y N-AV). ST= sin tratamiento. No hubo diferencias significativas entre ST y F6H8, test de pares, N = 6 sujetos.

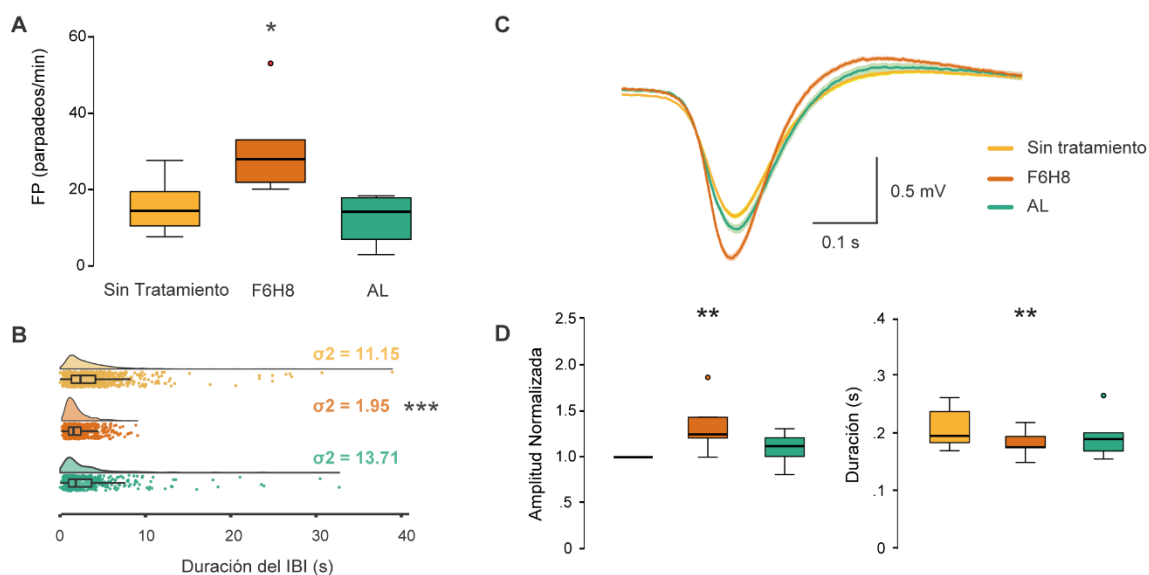


Figura 16 | Efecto del tratamiento tópico con perfluorohexiloctano (F6H8) o con anestésicos locales (AL) sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo en condición Control (en reposo y con iluminación normal). A. Frecuencia de parpadeo espontáneo (FP),  $n=5-6$ . B. Duración del intervalo entre parpadeos (IBI). Los IBI se ordenaron por duración y se compararon las varianzas (prueba de Levene para la igualdad de varianzas,  $n = 1077$  Sin tratamiento;  $n = 951$  F6H8;  $n = 454$  AL). C. Media e intervalo de confianza de la señal OO<sub>EMG</sub> de todos los parpadeos registrados en todos los sujetos en condición Control, con y sin tratamiento. D. Amplitud normalizada y duración de las señales electromiográficas ( $n = 1062$  Sin tratamiento,  $n = 950$  F6H8 y  $n = 440$  AL). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , t-test o Mann Whitney, tomando como control los datos Sin tratamiento.

### 4.3. Características y frecuencia del parpadeo espontáneo durante la activación o la inhibición de los termorreceptores de frío de la superficie ocular en condiciones que modifican el estado cognitivo (tareas AV y N-AV) y el input visual (oscuridad)

#### 4.3.1. Efecto del F6H8 y los AL sobre el parpadeo espontáneo en condiciones de ausencia de luz (Oscuridad)

En ausencia de entrada sensorial visual por estar en oscuridad, los efectos de tratamiento con F6H8 y AL sobre la FP y el IBI fueron los mismos que en la condición de control. Tras F6H8 aumentó la FP y disminuyó la duración y variabilidad de los IBI (Tabla 3, Figura 17A-B) y los AL disminuyeron ligeramente la FP y aumentaron la duración del IBI, aunque sin afectar a su variabilidad (Tabla 4, Figura 17A-B). En

cuanto a los efectos de F6H8 y AL sobre la señal  $OO_{EMG}$ , también fueron similares que en la condición control. Tras F6H8 aumentó la amplitud y disminuyó la duración de la señal (Tabla 3, Figura 17C-D), mientras que los AL no produjeron cambios significativos (Tabla 4 y Figura 17C-D).

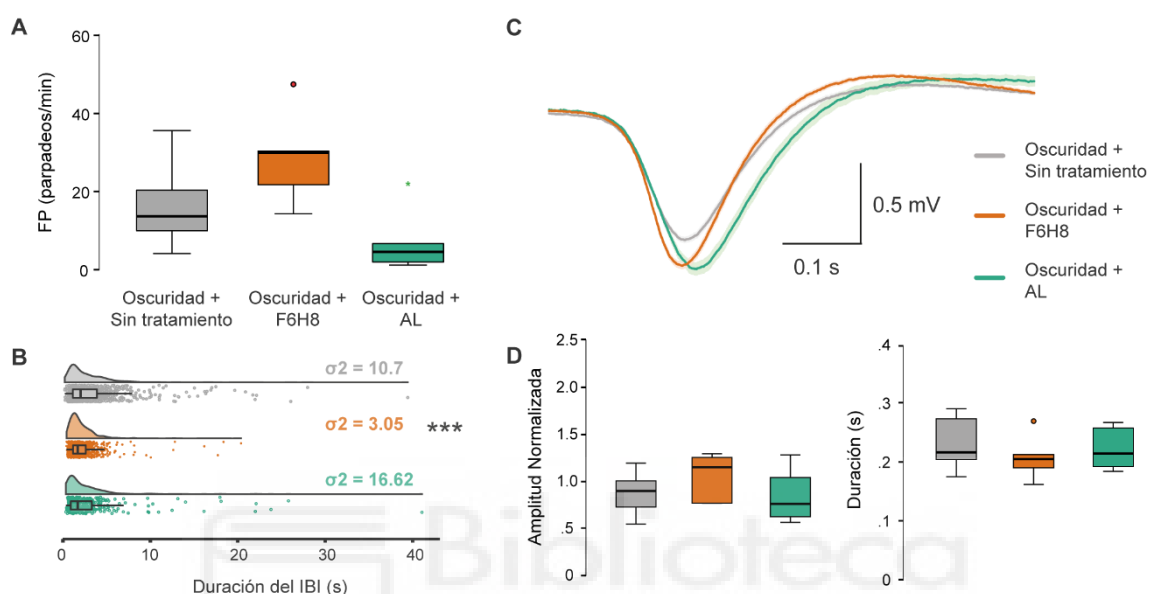


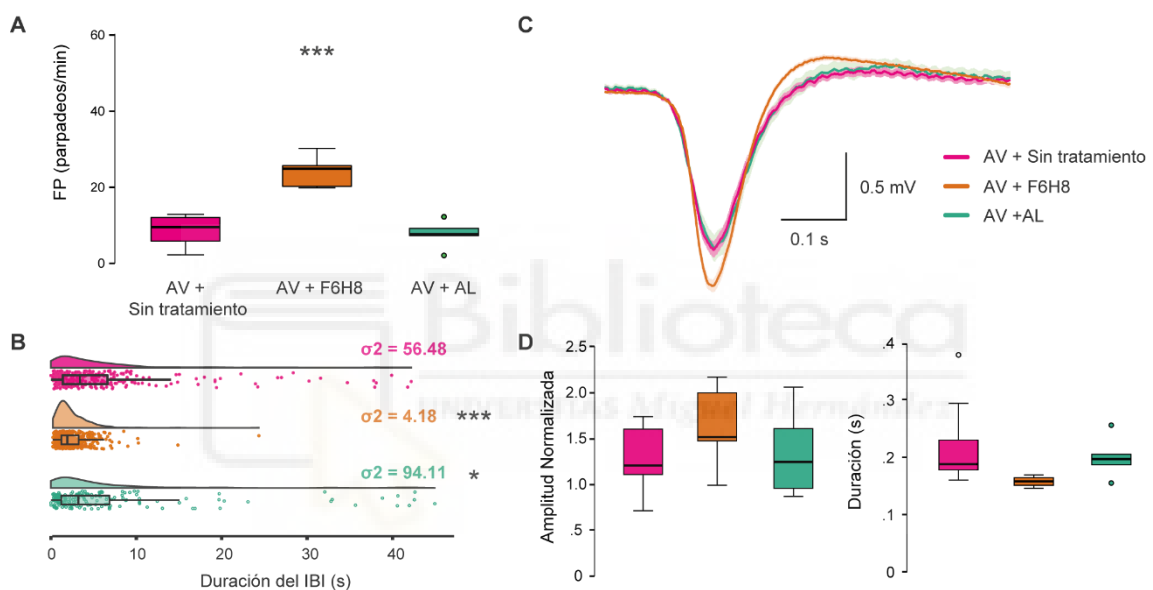
Figure 17 | Efecto del tratamiento tópico con perfluorohexiloctano (F6H8) o con anestésicos locales (AL) sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo en condiciones de ausencia de luz (Oscuridad). A. Frecuencia de parpadeo espontáneo (FP),  $n=5-6$ . B. Los IBI se ordenaron por duración y se compararon las Varianzas (prueba de Levene para la igualdad de Varianzas,  $n = 971$  sin tratamiento;  $n = 851$  F6H8;  $n = 322$  AL). C. Media e intervalo de confianza de la señal  $OO_{EMG}$  de todos los parpadeos de todos los sujetos. D. Amplitud normalizada y duración de la señal  $OO_{EMG}$  ( $n = 993$  en la condición Oscuridad + Sin tratamiento,  $n = 784$  en la condición Oscuridad + F6H8 y  $n = 330$  en la condición Oscuridad + AL). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , t-test o Mann Whitney respecto a "Sin tratamiento".

#### 4.3.2. Efecto de F6H8 y AL sobre el parpadeo espontáneo en condiciones de atención visual (AV)

El tratamiento con F6H8 previno del efecto de las tareas AV sobre la FP, la duración y variabilidad de los IBI (Tabla 3, Figura 18A-B) y también sobre la señal  $OO_{EMG}$  (Tabla 3, Figura 18C-D). Así pues, el efecto que tiene la activación de la

entrada sensorial desde la periferia con F6H8 sobre el parpadeo espontáneo parece prevalecer sobre el efecto ejercido por el estado atencional.

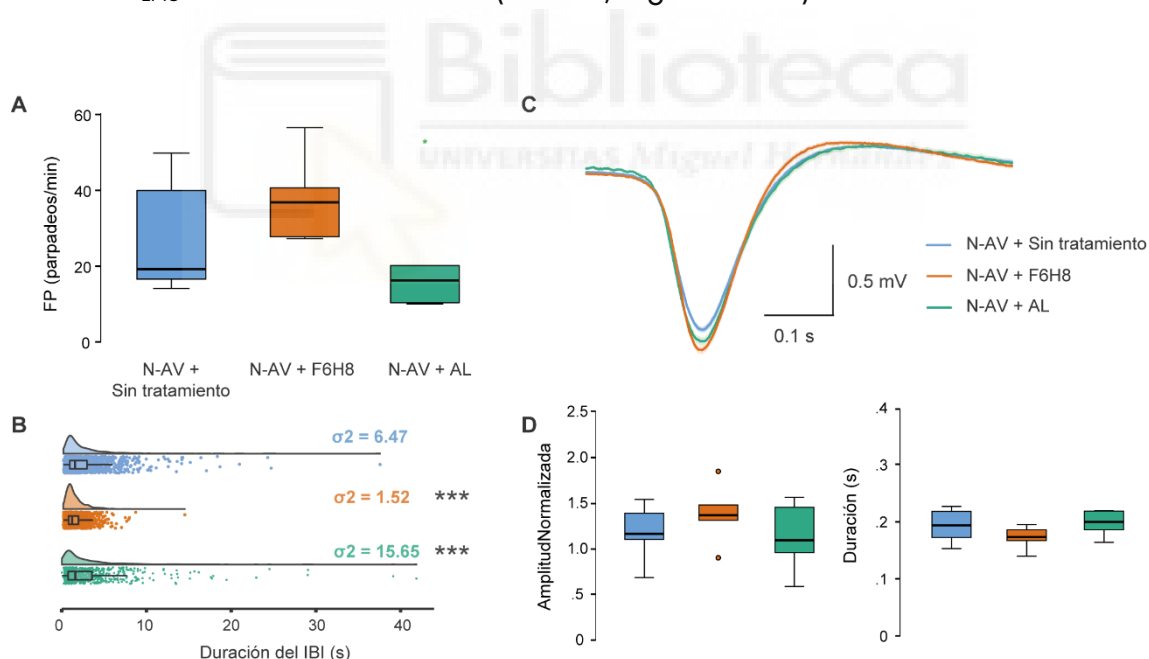
Por su parte, el tratamiento con AL tendió a disminuir el FP y aumentó significativamente la variabilidad de los IBI, debido al aumento de los IBI de duración larga (Tabla 4, Figuras 18A-B). La amplitud y duración del  $OO_{EMG}$  fueron similares durante la tarea visual sin tratamiento y con AL (Tabla 4, Figura 18C-D).



### 4.3.3. Efecto de F6H8 y AL sobre el parpadeo espontáneo en condiciones de atención no visual (N-AV)

El F6H8 mantuvo su efecto durante las tareas N-AV, aumentando la FP y disminuyendo la duración y la variabilidad de los IBI (Tabla 3, Figura 19A-B), así como aumentando la amplitud y disminuyendo la duración de la señal  $OO_{EMG}$  (Tabla 3, Figura 19C-D).

El tratamiento con AL no produjo ningún cambio en la FP ni en la duración de los IBI frente a la condición sin tratamiento durante la tarea N-AV (Tabla 4, Figura 19A-B). Sin embargo, sí se incrementó la variabilidad de los IBI (Figura 19B). El tratamiento con AL no modificó significativamente la amplitud ni la duración de la señal  $OO_{EMG}$  durante la tarea N-AV (Tabla 4, Figura 19C-D).









# Discusión

## 5. Discusión

En la presente tesis exploramos, en primer lugar, los efectos del perfluorohexiloctano (F6H8), componente único de un colirio usado como tratamiento para el ojo seco, con el fin de intentar profundizar en los mecanismos que explican sus efectos positivos en esta patología. Hasta el momento se sabía que el F6H8 estabiliza la película lagrimal (Steven *et al.*, 2015, 2017), pero nuestro trabajo encontró que, además, el F6H8 es capaz de incrementar el input de los termorreceptores de frío corneales ya que disminuye la temperatura de la superficie del ojo. Este aumento de la actividad de los termorreceptores de frío como consecuencia del ligero enfriamiento de la córnea produce un incremento de la lagrimación y la frecuencia de parpadeo (FP), pero no llega a evocar sensaciones oculares. Por lo tanto, el F6H8 resultó una herramienta interesante para la investigación en humanos, ya que permite incrementar ligeramente el input sensorial de los termorreceptores de frío sin evocar sensaciones, a diferencia de lo que puede ocurrir con otras moléculas que aumentan la actividad de los termorreceptores de frío como el mentol (Kovács *et al.*, 2016). Estudiar la contribución de la actividad de las diferentes clases de nervios sensoriales de la córnea a las sensaciones oculares y a la regulación de la lagrimación y el parpadeo puede ayudar a comprender la patofisiología y el tratamiento de una patología tan prevalente y molesta como es el ojo seco.

En segundo lugar, nos propusimos estudiar cuál es la influencia de los termorreceptores de frío de la superficie del ojo sobre el parpadeo espontáneo. No solo estudiando la frecuencia, sino incluyendo un análisis de las señales electromiográficas OO<sub>EMG</sub> asociadas que determinó la amplitud y duración de esas señales, así como la duración de los intervalos entre señales consecutivas (IBI). En el campo de investigación del parpadeo espontáneo, se ha propuesto que la FP viene

determinada por un mecanismo central (Kaminer *et al.*, 2011) que está modulado por la función cognitiva (Karson *et al.*, 1981; Tsubota *et al.*, 1996; Bentivoglio *et al.*, 1997; Acosta *et al.*, 1999; Doughty, 2001; Himebaugh, 2009; Liu *et al.*, 2019), aunque la actividad de los termorreceptores de frío también parece tener un papel en su control (Quallo *et al.*, 2015). Pero este papel de los termorreceptores de frío de la superficie ocular no había sido estudiado en profundidad, ni comparada su influencia con la de la función cognitiva o los diferentes estados atencionales. Con nuestros experimentos demostramos que incrementar la actividad de los termorreceptores de frío enfriando la superficie ocular con F6H8, además de incrementar la FP, cambia las características de la señal electromiográfica del parpadeo. Sin embargo, disminuir el input sensorial de la córnea con la instilación de anestésicos locales (Luna *et al.*, 2021) no produce cambios significativos ni en la frecuencia ni en la señal de OO<sub>EMG</sub> del parpadeo espontáneo.

Además, tratamos de responder a la pregunta: ¿cuál de las dos fuentes de modulación del parpadeo espontáneo (el input sensorial procedente de la superficie ocular o la modulación descendente de la corteza cerebral) tiene mayor influencia? Para ello, estudiamos los efectos de la oscuridad (para reducir en todo lo posible la información visual) y la realización de tareas atencionales (tanto las que requieren atención visual como las que requieren atención no visual) sobre el parpadeo espontáneo (Ponder & Kennedy, 1927; Tsubota *et al.*, 1996; Bentivoglio *et al.*, 1997; Acosta *et al.*, 1999; Doughty, 2001; Himebaugh, 2009), comparando los resultados obtenidos sin tratamiento con los obtenidos después del tratamiento tópico con una gota de colirio de F6H8 o de anestésicos locales. En nuestro trabajo, hemos podido demostrar que los efectos de incrementar el input sensorial mediado por los termorreceptores de frío de la superficie ocular tras instilar F6H8 se produjeron también durante las diferentes pruebas de atención y en oscuridad. En especial, el tratamiento con F6H8

previno los cambios en el parpadeo que se producen durante la atención visual, de manera que la realización de tareas que requieren atención visual no redujo la FP en sujetos tratados con F6H8. Por el contrario, se observaba en ellos una FP elevada y con parpadeos que muestran una señal de  $OO_{EMG}$  de mayor amplitud y menor duración que en situación control, sin tratamiento con F6H8. Estos resultados sugieren que la actividad sensorial originada en la superficie ocular mediada por los termorreceptores de frío tiene una influencia sobre el control del parpadeo mayor que la del estado cognitivo, lo que podría ayudar a impedir un exceso de desecación de la superficie ocular.

No existe literatura previa sobre cuál es la contribución de los distintos tipos funcionales de neuronas sensoriales que inervan la superficie ocular a definir la frecuencia y las características (amplitud y duración) del parpadeo espontáneo, ni que compare si la entrada sensorial desde la superficie ocular podría interferir, o no, sobre la modulación del parpadeo que ejercen el estado cognitivo y la atención. Por tanto, más allá de constituir un análisis descriptivo de las señales de  $OO_{EMG}$  del parpadeo espontáneo en varias situaciones experimentales, este trabajo constituye una importante novedad al establecer la preponderancia de la información sensorial sobre la temperatura de la superficie ocular, que en última instancia se asocia al nivel de humedad, sobre la modulación descendente que la corteza cerebral ejerce sobre el parpadeo en determinados estados atencionales.

5.1. El perfluorohexiloctano disminuye la temperatura de la superficie ocular, aumentando la actividad de los termorreceptores de frío

Las evidencias disponibles hasta el momento únicamente mostraban que el efecto beneficioso del F6H8 en la EOS se basaba en su capacidad para estabilizar la

película lagrimal, presumiblemente reforzando el papel la capa lipídica y reduciendo consecuentemente la evaporación del componente acuoso de la lágrima. Debido a su baja tensión superficial, el F6H8 puede actuar como un surfactante, formando monocapas en la interfase agua/aire (Gaines, 1991). Por ello, el F6H8 se ha introducido en el mercado como tratamiento alternativo de la EOS durante los últimos 5 años, especialmente para su forma evaporativa, que se debe principalmente a la disfunción de las glándulas de Meibomio (DGM) (Steven *et al.*, 2015, 2017; Lam *et al.*, 2020; Schmidl *et al.*, 2020) y en la que los pacientes muestran una elevada tasa de evaporación de la lágrima (Wong *et al.*, 2018). Se ha descrito que, tras 4-8 semanas de tratamiento con F6H8, los pacientes con DGM muestran un incremento del grosor de la película lagrimal y, específicamente, de la capa lipídica (Schmidl *et al.*, 2020); de los valores del test de Schirmer I, y del tiempo de ruptura de la película lagrimal (TFBUT), así como una reducción de las puntuaciones en el OSDI total, lo que, en conjunto, supone una mejora sintomatológica (Steven *et al.*, 2015, 2017).

Hasta donde sabemos, nuestras observaciones son la primera demostración de que la aplicación tópica de F6H8 en el ojo humano disminuye de manera importante y durante un tiempo prolongado la temperatura de la superficie ocular. Ese efecto es máximo a los 5 minutos después de la administración de F6H8, con una disminución de la temperatura de unos  $-0,7^{\circ}\text{C}$  de media, aunque la temperatura se mantiene reducida de manera significativa durante al menos una hora. No conocemos el mecanismo biofísico preciso que explica esa disminución de la temperatura de superficie que muestran las imágenes termográficas por infrarrojo después de aplicar F6H8. En condiciones control, la temperatura de la superficie ocular cambia durante el parpadeo. Es más alta al abrir los párpados y se produce un enfriamiento progresivo durante el intervalo entre parpadeos. La velocidad de ese enfriamiento se ha relacionado con la tasa de evaporación de la lágrima, en el que el paso del

estado líquido a vapor usaría el calor del tejido corneal que, al perderlo, se enfriaría. Podría pensarse que el enfriamiento tras F6H8 se debe a un aumento de la tasa de evaporación de la lágrima. Sin embargo, hay evidencias que apuntan en sentido contrario. La evaporación de la lágrima tras la administración tópica de F6H8, medida en conejos sanos, presenta un incremento transitorio a los 5 minutos de la instilación de F6H8. Sin embargo, a los 60 y 90 minutos, la tasa de evaporación presenta valores inferiores a los de la condición basal (Agarwal *et al.*, 2019). Además, en ese mismo trabajo también encontraron tasas de evaporación incrementadas transitoriamente tras la aplicación de suero salino, por lo que los autores atribuyeron ese hallazgo al aumento del volumen lagrimal que sucede tras administrar un líquido, sea acuoso o F6H8. Un mecanismo alternativo podría ser que el enfriamiento se produce por la evaporación de la propia molécula, aunque el F6H8 presenta una baja tasa de evaporación, especialmente en comparación con otros alcanos semifluorinados (*in vitro*, <1,5% se evaporó en 1 hora, y < 50% en más de 24 horas) (Agarwal *et al.*, 2018). Esa baja tasa de evaporación, junto a la inmiscibilidad del F6H8 con la solución acuosa que constituye la lágrima, permitiría explicar el efecto prolongado que hemos observado en la temperatura corneal, que permanece reducida incluso una hora después de la instilación del colirio de F6H8. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el enfriamiento de la superficie ocular producido tras la aplicación de F6H8 puede deberse a un aumento de la conductividad térmica y el consiguiente aumento de la pérdida de calor de la superficie ocular al entorno.

De manera paralela al enfriamiento corneal, se observó un aumento de la FP y la tasa de lagrimación. Considerando la influencia de la actividad de los termorreceptores de frío sobre ambos mecanismos de protección ocular (Parra *et al.*, 2010; Quallo *et al.*, 2015), no resulta sorprendente encontrar cambios en el parpadeo y

la lagrimación como consecuencia del incremento de actividad de los termorreceptores de frío secundario al enfriamiento de la superficie ocular. Desde las observaciones clásicas de Mapstone (Mapstone, 1968) se ha sugerido que el parpadeo y la lagrimación se consideran respuestas fisiológicas reflejas que contrarrestan el enfriamiento de la superficie ocular producido durante la apertura del ojo. Los termorreceptores de frío tipo HB-LT aumentan su actividad de disparo como consecuencia de los cambios de temperatura ( $\sim -0.5^{\circ}\text{C}$ ) y osmolaridad (que se considera que supera 800 mOsm cerca de los “puntos secos” de la película lagrimal precorneal) que suceden durante el intervalo entre parpadeos (Parra *et al.*, 2014), lo que evoca el reflejo de parpadeo (Belmonte *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos apoyan nuestra hipótesis de que el descenso de la temperatura corneal producido por el F6H8 aumenta el disparo de los termorreceptores frío HB-LT hasta un nivel suficiente para incrementar la FP y la producción lacrimal.

Sin embargo, el enfriamiento inducido por el F6H8 no es lo suficientemente intenso como para inducir un aumento de la actividad de los termorreceptores de frío lo suficientemente grande para evocar sensaciones de frío. Como ya hemos mencionado, el descenso de temperatura promedio producido por el F6H8 en la superficie ocular fue de unos  $0.7^{\circ}\text{C}$ . Estudios psicofísicos previos demuestran que las sensaciones de frío se evocan cuando la superficie ocular se enfría entre  $1$  y  $2^{\circ}\text{C}$  (Acosta *et al.*, 2001a, 2001b). Esto encaja con el hallazgo de que la disminución de la temperatura causada por el F6H8 no provoca sensación de frío. Ya que el F6H8 no produjo ninguna sensación consciente, sus efectos sobre el parpadeo y la lagrimación tampoco puede achacarse a la activación de las fibras nerviosas corneales nociceptivas, cuya activación evoca parpadeo y lagrimeo reflejos (Acosta *et al.*, 2001a, 2001b).



## 5.2. Aumentar la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular aumenta la frecuencia de parpadeo espontáneo y afecta sus características

En este trabajo se ha comparado el efecto de incrementar la entrada sensorial mediada por los termorreceptores de frío al aplicar F6H8 con el efecto de disminuir la entrada sensorial. Al no haber moléculas lo suficientemente selectivas como para inhibir la actividad de los termorreceptores de frío sin afectar la actividad de otros receptores sensoriales, se optó por abolir totalmente la conducción de potenciales de acción de todas las fibras nerviosas sensoriales de la superficie ocular mediante la aplicación tópica de AL.

En consonancia con nuestros resultados del objetivo 1 (Delicado-Miralles *et al.*, 2021), en la segunda parte del trabajo, relacionada con el objetivo 2, confirmamos que la aplicación de F6H8 no inducía sensaciones oculares claras, pero provocaba un aumento de la FP. En este segundo grupo de experimentos, entre los parámetros que tuvimos en cuenta para determinar los efectos del F6H8 sobre el parpadeo espontáneo analizamos la distribución de la duración de los intervalos entre parpadeos (IBI), que aporta información no solo sobre la frecuencia, sino también sobre el patrón de parpadeo. Encontramos una disminución del valor medio de duración de los IBI y una disminución de su variabilidad. El cambio en la distribución de los IBI, que tendieron a ser más cortos, podría deberse simplemente al aumento de la FP, que haría que fuesen menos frecuentes los parpadeos con IBI muy largos que suceden esporádicamente en condiciones control. Además, encontramos que la forma de la señal  $OO_{EMG}$  producida con el parpadeo cambió tras la aplicación de F6H8. En esas condiciones, la señal eléctrica generada por el músculo orbicular fue significativamente más corta y de mayor amplitud.

La aplicación del AL bloquea la actividad de todos los nervios sensoriales de la superficie ocular, incluidos los termorreceptores de frío, los nociceptores y los mecanorreceptores de bajo umbral del borde de los párpados (Brock *et al.*, 2001; Kovács *et al.*, 2016; Luna *et al.*, 2021). El efecto de anestésicar por completo la superficie ocular sobre el parpadeo es controvertido, ya que mientras que la mayoría de los datos publicados informan de una disminución significativa de la FP espontánea o basal (Collins *et al.*, 1989; Nakamori *et al.*, 1997; Naase *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2010), otros trabajos no encuentran cambios significativos (Ponder & Kennedy, 1927). Además, no existen trabajos que estudien cuál es el efecto de la anestesia de la superficie ocular sobre la distribución de los IBI o las características del parpadeo espontáneo. En nuestros experimentos, la FP disminuyó tras aplicar AL, aunque no significativamente, cambiando en ocasiones la distribución de los IBI pero no produciendo cambios significativos en los parámetros medidos en las señales OO<sub>EMG</sub>. La aplicación del colirio comercial con AL suele producir inicialmente malestar y escozor debido a que contiene conservantes que activan las fibras sensoriales nociceptivas (Kaur *et al.*, 2009). Por tanto, no se podría descartar completamente que los parpadeos reflejos evocados a esa breve irritación estén enmascarando una posible disminución de la FP, como sugieren algunos trabajos publicados anteriormente (Collins *et al.*, 1989; Nakamori *et al.*, 1997; Naase *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2010). Los datos obtenidos en el presente trabajo podrían apoyar la idea de que habría un patrón central que definiría la tasa mínima de parpadeo. Esa frecuencia mínima de parpadeo no decrece ni se afecta cuando disminuye la entrada sensorial desde la superficie ocular. En resumen, nuestros resultados muestran, por primera vez, que el incremento del input sensorial mediado por los termorreceptores de frío corneales es capaz de modificar, no sólo la FP, sino la duración y la contracción del músculo orbicular durante el parpadeo.

5.3. El aumento de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular tiene una mayor influencia sobre el parpadeo espontáneo que el estado cognitivo atencional

En este trabajo hemos explorado también la posible modulación del parpadeo espontáneo por parte de la entrada sensorial la superficie ocular, aumentando o disminuyendo la actividad de los nervios sensoriales, y la realización de dos clases de tareas cognitivas, una que requiere atención visual y una que requiere atención no visual, a fin de comprobar que circunstancia tenía una mayor influencia sobre la frecuencia y características del parpadeo espontáneo. Además, realizamos un grupo de medidas en condiciones de ausencia de input visual (oscuridad), ya que la tarea de atención visual disminuyó significativamente la FP. En oscuridad no se modificó significativamente la FP, lo que sugiere que el input visual no es necesario para el mantenimiento de la tasa basal de parpadeo espontáneo. En la misma dirección, los pacientes con ceguera por atrofia óptica primaria bilateral presentan patrones de parpadeo similares a los de los sujetos sanos (Ponder & Kennedy, 1927). Nuestros resultados muestran que no se modifica la FP en oscuridad, pero sí se observa un aumento en la duración y una disminución en la amplitud de las señales  $OO_{EMG}$ , lo que se puede asociar a contracciones del músculo OO más pequeñas y lentas. Estos datos están en consonancia con trabajos previos de conducción en los que se ha descrito que la duración del parpadeo aumenta en la oscuridad (Ahlström *et al.*, 2018). En cuanto a los efectos de la activación de los termorreceptores de frío o la inhibición general de la actividad sensorial en la superficie del ojo, estos fueron los mismos en condiciones de luz (reposo con la luz encendida) y de oscuridad, en consonancia con trabajos previos (Nakamori *et al.*, 1997).

En conjunto, los resultados apoyan la existencia del generador central del parpadeo espontáneo (Ponder & Kennedy, 1927), que funcionaría como un marcapasos que

determina una tasa basal de parpadeo cuya frecuencia mínima parece ser independiente del input sensorial desde la superficie ocular.

Las tareas atencionales modifican la FP espontánea (Karson *et al.*, 1981; Tsubota *et al.*, 1996; Bentivoglio *et al.*, 1997; Acosta *et al.*, 1999; Iwanaga *et al.*, 2000; Doughty, 2001; Himebaugh, 2009; Liu *et al.*, 2019). De acuerdo con la literatura (Holland & Tarlow, 1972), al realizar tareas que conllevan atención visual la FP se redujo, a fin de que el parpadeo interfiera lo menos posible la entrada de la información visual que es objeto de atención. En tareas atencionales no visuales la FP aumentó significativamente. Aunque los mecanismos responsables del incremento de la FP en estas situaciones no se conocen en profundidad (Iwanaga *et al.*, 2000), se han atribuido al aumento del estrés o "tensión mental" (Ponder & Kennedy, 1927; Iwanaga *et al.*, 2000). Esto podría influir sobre la regulación del parpadeo a través del hipotálamo, como en algunas respuestas autonómicas (Iwanaga *et al.*, 2000; Nakano & Miyazaki, 2019). Nuestros resultados, además de corroborar los efectos ya conocidos de la atención visual y no visual sobre la FP y el IBI, tienen la novedad de mostrar que ambas condiciones atencionales inducen cambios en las características de las señales electromiográficas del parpadeo, que conllevarían contracciones musculares del OO más fuertes y rápidas durante las tareas atencionales.

Los efectos de los fármacos (F6H8 o AL) sobre los parámetros del parpadeo (frecuencia, IBI y duración y amplitud de la señal OO<sub>EMG</sub>) en las condiciones de atención visual y de atención no visual fueron similares a los observados en condiciones control. El F6H8 incrementó la frecuencia del parpadeo espontáneo y redujo la duración de las señales eléctricas del OO, aunque no indujo sensaciones oculares. Por el contrario, cuando inhibimos la actividad de los nervios sensoriales de la córnea con anestésicos locales tópicos, la FP no se ve modificada significativamente en ninguna de las condiciones. Como se ha comentado

anteriormente, la instilación de AL produce inmediatamente una breve sensación de irritación y escozor debida a la acción de sus conservantes (Kaur *et al.*, 2009). Inmediatamente a continuación se produce el bloqueo de los canales de sodio y, por tanto, queda anestesiada la superficie corneal, por lo que no observamos cambios significativos en la FP ni siquiera a los 5 min tras el tratamiento.

En resumen, los resultados de la presente tesis muestran que el perfluorohexiloctano aplicado tópicamente en el ojo provoca un enfriamiento sostenido de la superficie ocular. En respuesta a ese descenso de temperatura, aumenta la frecuencia de disparo de los termorreceptores de frío y, como consecuencia, se incrementa la frecuencia de parpadeo y la tasa de lagrimación. Ese aumento de la actividad de los termorreceptores de frío no es suficiente para evocar sensaciones térmicas de frío o frescor, por el contrario, una mayoría de sujetos reporta una ausencia total de sensaciones oculares después de recibir el tratamiento. Además de tener un efecto claro sobre la frecuencia de parpadeo, el F6H8 modifica algunas de sus características, resultando parpadeos con señales electromiográficas del músculo orbicular del párpado de mayor amplitud y menor duración. Estos resultados apoyan el papel de la información sensorial mediada por los termorreceptores de frío de la superficie ocular en la regulación del parpadeo, que contribuye tanto a redistribuir la película lagrimal como a calentar por conducción un tejido avascular como la córnea. Por otra parte, hemos encontrado que, a aplicar tópicamente en la córnea anestésicos locales para bloquear la conducción nerviosa, la ausencia total de información sensorial de los termorreceptores de frío que llega al sistema nervioso central no induce cambios significativos en el parpadeo espontáneo. Este hallazgo apoya la existencia de un generador central del patrón de parpadeo que, a partir de

una frecuencia basal intrínseca, aumentaría la frecuencia de parpadeo en respuesta al aumento de la actividad de los termorreceptores de frío.

Por otro lado, el bien conocido efecto de la atención visual disminuyendo la frecuencia de parpadeo espontáneo no se observa cuando la tarea atencional se realiza después del tratamiento tópico con F6H8, lo que indica que el aumento de la actividad sensorial de la superficie ocular, incluso cuando es tan pequeño que no evoca sensaciones conscientes, tiene una influencia sobre el mecanismo regulador del parpadeo que es incluso mayor que el control descendente derivado del estado atencional (Figura 20). Así pues, el incremento de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular parece ser el factor con mayor peso en la regulación del parpadeo espontáneo, constituyendo un mecanismo importante de protección para prevenir el enfriamiento y el exceso de evaporación de la película lagrimal.

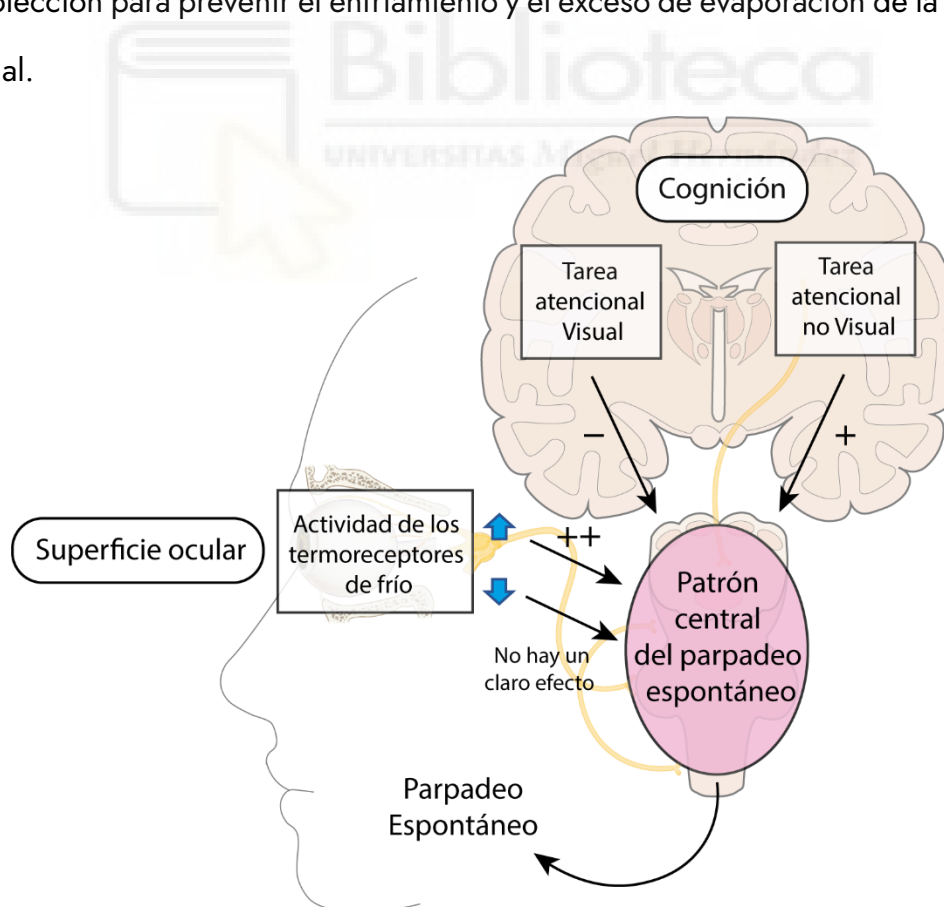


Figura 20 | Representación esquemática de los factores que modulan la frecuencia y características del parpadeo espontáneo.





# Conclusiones





## 6. Conclusiones

1. La aplicación tópica de perfluorohexiloctano, utilizado clínicamente en la enfermedad de ojo seco, causa un descenso de la temperatura de la superficie ocular que puede detectarse mediante termografía de superficie por infrarrojos. Ese enfriamiento de la superficie del ojo induce un aumento de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular que, a pesar de no ser suficiente para evocar sensaciones térmicas oculares, provoca un aumento de la frecuencia de parpadeo espontáneo y de la tasa de lagrimación.
2. El bloqueo de la transmisión de potenciales de acción en los receptores sensoriales de la superficie ocular, aplicando tópicamente anestésicos locales, no modifica la frecuencia ni otras características del parpadeo espontáneo.
3. El enfriamiento de la superficie ocular con perfluorohexiloctano modifica tanto la frecuencia como las características electromiográficas del parpadeo espontáneo, siendo las señales eléctricas de mayor amplitud y menor duración y haciéndose más regular el patrón de parpadeo, con intervalos entre parpadeos de duración más homogénea. Estos efectos también se observan cuando el protocolo experimental se lleva a cabo en condiciones de oscuridad.
4. La frecuencia de parpadeo disminuye significativamente durante la realización de tareas que requieren atención visual y aumenta significativamente al realizar tareas no visuales. El tratamiento tópico con perfluorohexiloctano previene la reducción de la frecuencia de parpadeo provocada por la atención visual e incrementa ligeramente el aumento de la frecuencia inducido por la atención no visual.
5. Si bien está determinado por el sistema nervioso central y su frecuencia no se modifica al inhibir la entrada sensorial de la superficie del ojo, el parpadeo espontáneo se ve influenciado por el estado cognitivo atencional y, sobre todo,

por el aumento de la actividad de los termorreceptores de frío de la superficie ocular, responsables de detectar el nivel de humedad de la mucosa ocular. Ese predominio de la activación de los termorreceptores de frío sobre cualquier otro factor que afecta el parpadeo espontáneo constituye un mecanismo de protección para evitar una sequedad excesiva de la superficie ocular.



## 7. Referencias Bibliográficas

- Acosta M, Belmonte C & Gallar J (2001a). Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *Journal of Physiology* 534, 511–525.
- Acosta MC, Alfaro ML, Borrás F, Belmonte C & Gallar J (2006). Influence of age, gender and iris color on mechanical and chemical sensitivity of the cornea and conjunctiva. *Exp Eye Res* 83, 932–938.
- Acosta MC, Gallar J & Belmonte C (1999). The influence of eye solutions on blinking and ocular comfort at rest and during work at video display terminals. *Exp Eye Res* 68, 663–669.
- Acosta MC, Peral A, Luna C, Pintor J, Belmonte C & Gallar J (2004). Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2333–2336.
- Acosta MC, Tan ME, Belmonte C & Gallar J (2001b). Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2063–2067.
- Agarwal P, Khun D, Krösser S, Eickhoff K, Wells FS, Willmott GR, Craig JP & Rupenthal ID (2019). Preclinical studies evaluating the effect of semifluorinated alkanes on ocular surface and tear fluid dynamics. *Ocul Surf* 17, 241–249.
- Agarwal P, Scherer D, Günther B & Rupenthal ID (2018). Semifluorinated alkane based systems for enhanced corneal penetration of poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 538, 119–129.
- Ahlström C, Anund A, Fors C & Åkerstedt T (2018). The effect of daylight versus darkness on driver sleepiness: a driving simulator study. *J Sleep Res*; DOI: 10.1111/JSR.12642.
- Alamri A, Bron R, Brock JA & Ivanusic JJ (2015). Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Front Neuroanat*; DOI: 10.3389/FNANA.2015.00071.

- Alcalde I, Íñigo-Portugués A, González-González O, Almaraz L, Artime E, Morenilla-Palao C, Gallar J, Viana F, Merayo-Llodes J & Belmonte C (2018). Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice. *J Comp Neurol* 526, 1859–1874.
- Allison GT, Marshall RN & Singer KP (1993). EMG signal amplitude normalization technique in stretch-shortening cycle movements. *J Electromyogr Kinesiol* 3, 236–244.
- Alves M, Fonseca EC, Alves MF, Malki LT, Arruda GV, Reinach PS & Rocha EM (2013). Dry eye disease treatment: a systematic review of published trials and a critical appraisal of therapeutic strategies. *Ocul Surf* 11, 181–192.
- Arendt-Nielsen L, Graven-Nielsen T, Sværre H & Svensson P (1996). The influence of low back pain on muscle activity and coordination during gait: a clinical and experimental study. *Pain* 64, 231–240.
- Asbell PA & Spiegel S (2010). Ophthalmologist perceptions regarding treatment of moderate-to-severe dry eye: results of a physician survey. *Eye Contact Lens* 36, 33–38.
- Barber LD, Pflugfelder SC, Tauber J & Foulks GN (2005). Phase III safety evaluation of cyclosporine 0.1% ophthalmic emulsion administered twice daily to dry eye disease patients for up to 3 years. *Ophthalmology* 112, 1790–1794.
- Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A & Brignole-Baudouin F (2010). Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 29, 312–334.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE & Julius D (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204–208.
- Belmonte C, Acosta MC & Gallar J (2004a). Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res* 78, 513–525.
- Belmonte C, Acosta MC & Gallar J (2004b). Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res* 78, 513–525.
- Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J & Gallar J (2015). What Causes Eye Pain? *Curr Ophthalmol Rep* 3, 111–121.

- Belmonte C, Acosta MC, Schmelz M & Gallar A (1999). Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO<sub>2</sub> esthesiometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 513–519.
- Belmonte C, Aracil A, Acosta MC, Luna C & Gallar J (2004c). Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul Surf* 2, 248–253.
- Belmonte C & Gallar J (2011). Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 3888–3892.
- Belmonte C, Gallar J, Pozo MA & Rebollo I (1991). Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J Physiol* 437, 709–725.
- Belmonte C, Garcia-Hirschfeld J & Gallar J (1997). Neurobiology of ocular pain. *Prog Retin Eye Res* 16, 117–156.
- Belmonte C & Giraldez F (1981). Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol* 321, 355–368.
- Belmonte C, Luna CL & Gallar J (2003). Cgrp is Released by Selective Stimulation of Polymodal Nociceptor but Not of Cold Receptor Nerve Fibers of the Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1391–1391.
- Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, Dartt DA, Galor A, Hamrah P, Ivanusic JJ, Jacobs DS, McNamara NA, Rosenblatt MI, Stapleton F & Wolffsohn JS (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf* 15, 404–437.
- Belmonte C, Tervo TT & Gallar J (2011). *Sensory Innervation of the Eye, in Adler's Physiology of the Eye*, 11th edn. ed. Levin, L.A., (Elsevier).
- Bentivoglio AR, Bressman SB, Cassetta E, Carretta D, Tonali P & Albanese A (1997). Analysis of blink rate patterns in normal subjects. *Movement Disorders* 12, 1028–1034.
- Bereiter DA, Hirata H & Hu JW (2000). Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. *Pain* 88, 221–224.
- Beuerman RW & Schimmelpfennig B (1980). Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 69, 196–201.

- Beuerman RW & Tanelian DL (1979). Corneal pain evoked by thermal stimulation. *Pain* 7, 1–14.
- Bologna M, Agostino R, Gregori B, Belvisi D, Ottaviani D, Colosimo C, Fabbrini G & Berardelli A (2008). Voluntary, spontaneous and reflex blinking in patients with clinically probable progressive supranuclear palsy. *Brain* 132, 502–510.
- Borges FP, Garcia DM & Cruz AAV (2010). Distribuição dos intervalos do piscar espontâneo em medidas repetidas com e sem anestesia tópica ocular. *Arq Bras Oftalmol* 73, 329–332.
- Brock JA, 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, 493–501.
- Bron R, Wood RJ, Brock JA & Ivanusic JJ (2014). Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *J Comp Neurol* 522, 2967–2979.
- C Karson, W J Freed, J E Kleinman, L B Bigelow & R J Wyatt (1981). Neuroleptics decrease blinking in schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry* 16, 679–682.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.
- Celebi ARC, Ulusoy C & Mirza GE (2014). The efficacy of autologous serum eye drops for severe dry eye syndrome: a randomized double-blind crossover study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 252, 619–626.
- Chia EM, Mitchell P, Rochtchina E, Lee AJ, Maroun R & Wang JJ (2003). Prevalence and associations of dry eye syndrome in an older population: the Blue Mountains Eye Study. *Clin Exp Ophthalmol* 31, 229–232.
- Collins M, Seeto R, Campbell L & Ross M (1989). Blinking and corneal sensitivity. *Acta Ophthalmol* 67, 525–531.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE & Patapoutian A (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330, 55–60.
- Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K & Stapleton F (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocular Surface* 15, 276–283.

- Dartt DA (2004). Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res* 78, 173–185.
- Delicado-Miralles M, Velasco E, Díaz-Tahoces A, Gallar J, Acosta MC & Aracil-Marco A (2021). Deciphering the Action of Perfluorohexyloctane Eye Drops to Reduce Ocular Discomfort and Pain. *Front Med (Lausanne)*; DOI: 10.3389/FMED.2021.709712.
- Delicado-Miralles M, Velasco E, Gallar J & Acosta M (2023). Contribution of Corneal Cold Thermoreceptor Activity to Spontaneous Blinking Rate and Characteristics. XXV Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, Queensland.
- Deveney T & Asbell PA (2018). Patient and physician perspectives on the use of cyclosporine ophthalmic emulsion 0.05% for the management of chronic dry eye. *Clin Ophthalmol* 12, 569–576.
- Dieckmann G, Fregni F & Hamrah P (2019). Neurostimulation in dry eye disease—past, present, and future. *Ocul Surf* 17, 20–27.
- Donnenfeld ED, Karpecki PM, Majmudar PA, Nichols KK, Raychaudhuri A, Roy M & Semba CP (2016). Safety of Lifitegrast Ophthalmic Solution 5.0% in Patients With Dry Eye Disease: A 1-Year, Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Cornea* 35, 741–748.
- Douet JY, Michel J & Regnier A (2013). Degree and duration of corneal anesthesia after topical application of 0.4% oxybuprocaine hydrochloride ophthalmic solution in ophthalmically normal dogs. *Am J Vet Res* 74, 1321–1326.
- Doughty MJ (2001). Consideration of three types of spontaneous eyeblink activity in normal humans: During reading and video display terminal use, in primary gaze, and while in conversation. *Optometry and Vision Science* 78, 712–725.
- Drew VJ, Tseng CL, Seghatchian J & Burnouf T (2018). Reflections on Dry Eye Syndrome Treatment: Therapeutic Role of Blood Products. *Front Med (Lausanne)*; DOI: 10.3389/FMED.2018.00033.
- Evinger C (1995). A Brain Stem Reflex in the Blink of an Eye. *undefined* 10, 147–153.
- Evinger C, Manning KA & Sibony PA (1991). Eyelid movements. Mechanisms and normal data. *IOVS* 32, 387–400.

- De Felipe C & Belmonte C (1999). c-Jun expression after axotomy of corneal trigeminal ganglion neurons is dependent on the site of injury. *Eur J Neurosci* 11, 899–906.
- Feng Y & Simpson TL (2003). Nociceptive Sensation and Sensitivity Evoked from Human Cornea and Conjunctiva Stimulated by CO<sub>2</sub>. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 529–532.
- Fernández-Trillo J, Florez-Paz D, Íñigo-Portugués A, González-González O, del Campo AG, González A, Viana F, Belmonte C & Gomis A (2020). Piezo2 Mediates Low-Threshold Mechanically Evoked Pain in the Cornea. *The Journal of Neuroscience* 40, 8976.
- Frutos-rincón L, Gómez-sánchez JA, Íñigo-portugués A, Carmen Acosta M & Gallar J (2022). An Experimental Model of Neuro–Immune Interactions in the Eye: Corneal Sensory Nerves and Resident Dendritic Cells. *Int J Mol Sci*; DOI: 10.3390/IJMS23062997.
- Fujishima H, Toda I, Yamada M, Sato N & Tsubota K (1996). Corneal temperature in patients with dry eye evaluated by infrared radiation thermometry. *Br J Ophthalmol* 80, 29.
- Gaines GL (1991). Surface Activity of Semifluorinated Alkanes: F(CF<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>H. *Langmuir* 7, 3054–3056.
- Gallar (1991). *Caracterización electrofisiológica de los receptores sensoriales del ojo del gato* (thesis). Universidad de Alicante.
- Gallar J & Acosta MC. (in press). Chapter 16. Sensory innervation of the eye. In: *Adler's Physiology of the Eye (in press)*, 12nd Ed. Elsevier.
- Gallar J & Pozo MA (1990). Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1968–1974.
- Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP & Belmonte C (1993). Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol* 468, 609–622.
- Gallar J, Santiago B, Acosta MC & Belmonte C (2014). In vivo Functional Characterization of Trigeminal Neurons Innervating the Eye and Periocular Tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55, 3645–3645.



- Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG & Belmonte C (1994). Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 59, 597–605.
- Giordano N, Lucani B, Amendola A, Geraci S, Santacroce C, Gennari C, Hartini G & Nuti R (2003). IgG and IgM antiganglioside M1 antibodies in primary Sjogren's syndrome with and without peripheral neuropathy. *Clin Rheumatol* 22, 256–258.
- González-González O, Bech F, Gallar J, Merayo-Llodes J & Belmonte C (2017). Functional Properties of Sensory Nerve Terminals of the Mouse Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58, 404–415.
- Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y & Tsubota K (2002). Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol* 133, 181–186.
- Gruart A, Blazquez P & Delgado-García JM (1995). Kinematics of spontaneous, reflex, and conditioned eyelid movements in the alert cat. *J Neurophysiol* 74, 226–248.
- Gyenes A, Tapasztó Z, Quirce S, Luna C, Frutos-Rincón L, Gallar J, Acosta MC & Kovács I (2023). Cyclosporine A Decreases Dryness-Induced Hyperexcitability of Corneal Cold-Sensitive Nerve Terminals. *Int J Mol Sci*; DOI: 10.3390/IJMS241613025.
- Henriquez VM & Evinger C (2007). The three-neuron corneal reflex circuit and modulation of second-order corneal responsive neurons. *Exp Brain Res* 179, 691–702.
- Himebaugh NL (2009). Blinking and tear break-up during four visual tasks. *Optometry and Vision Science* 86, E106–E114.
- Hiraoka M & Shimamura M (1977). Neural mechanisms of the corneal blinking reflex in cats. *Brain Res* 125, 265–275.
- Hirata H, Takeshita S, Hu JW & Bereiter DA (2000). Cornea-responsive medullary dorsal horn neurons: modulation by local opioids and projections to thalamus and brain stem. *J Neurophysiol* 84, 1050–1061.
- Holland EJ, Luchs J, Karpecki PM, Nichols KK, Jackson MA, Sall K, Tauber J, Roy M, Raychaudhuri A & Shojaei A (2017). Lifitegrast for the Treatment of Dry Eye Disease: Results of a Phase III, Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Trial (OPUS-3). *Ophthalmology* 124, 53–60.

- Holland MK & Tarlow G (1972). Blinking and Mental Load. <http://dx.doi.org/102466/pr01972311119> 31, 119–127.
- Hussain M, Shtein RM, Sugar A, Soong HK, Woodward MA, De Loss K & Mian SI (2014). Long-term use of autologous serum 50% eye drops for the treatment of dry eye disease. *Cornea* 33, 1245–1251.
- Iwanaga K, Saito S, Shimomura Y, Harada H & Katsuura T (2000). The effect of mental loads on muscle tension, blood pressure and blink rate. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 19, 135–141.
- Johnston PR, Rodriguez J, Lane KJ, Ousler G & Abelson MB (2013). The interblink interval in normal and dry eye subjects. *Clin Ophthalmol* 7, 253–259.
- Kaminer J, Powers AS, Horn KG, Hui C & Evinger C (2011). Characterizing the spontaneous blink generator: An animal model. *Journal of Neuroscience* 31, 11256–11267.
- Karson CN (1983). Spontaneous eye-blink rates and dopaminergic systems. *Brain* 106, 643–653.
- Karson CN, Berman KF, Donnelly EF, Mendelson WB, Kleinman JE & Wyatt RJ (1981). Speaking, thinking, and blinking. *Psychiatry Res* 5, 243–246.
- Karson CN, Lewitt PA, Calne DB & Wyatt RJ (1982). Blink rates in parkinsonism. *Ann Neurol* 12, 580–583.
- Kaur IP, Lal S, Rana C, Kakkar S & Singh H (2009). Ocular preservatives: Associated risks and newer. *Cutan Ocul Toxicol* 28, 93–103. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19505226/> [Accessed April 22, 2021].
- Kels BD, Grzybowski A & Grant-Kels JM (2015). Human ocular anatomy. *Clin Dermatol* 33, 140–146.
- Kenshalo DR (1960). Comparison of thermal sensitivity of the forehead, lip, conjunctiva and cornea. *J Appl Physiol* 15, 987–991.
- Kessler TL, Mercer HJ, Zieske JD, McCarthy DM & Dartt DA (1995). Stimulation of goblet cell mucous secretion by activation of nerves in rat conjunctiva. *Curr Eye Res* 14, 985–992.
- Kim AD, Muntz A, Lee J, Wang MTM & Craig JP (2021). Therapeutic benefits of blinking exercises in dry eye disease. *Cont Lens Anterior Eye*; DOI: 10.1016/J.CLAE.2020.04.014.

- Kimura N, Watanabe A, Suzuki K, Toyoda H, Hakamata N, Fukuoka H, Washimi Y, Arahata Y, Takeda A, Kondo M, Mizuno T & Kinoshita S (2017). Measurement of spontaneous blinks in patients with Parkinson's disease using a new high-speed blink analysis system. *J Neurol Sci* 380, 200–204.
- Kleinman JE, Karson CN, Weinberger DR, Freed WJ, Berman KF & Wyatt RJ (1984). Eye-blinking and cerebral ventricular size in chronic schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 141, 1430–1432.
- Korošec M, Zidar I, Reits D, Evinger C & VanderWerf F (2006). Eyelid movement during blinking in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders* 21, 1248–1251.
- Kovács I, Luna C, Quirce S, Mizerska K, Callejo G, Riestra A, Fernández-Sánchez L, Meseguer VM, Cuenca N, Merayo-Llodes J, Acosta MC, Gasull X, Belmonte C & Gallar J (2016). Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain* 157, 399–417.
- Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith JA & Gipson IK (2000). Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 118, 1489–1496.
- Kurose M & Meng ID (2013). Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *J Neurophysiol* 110, 495.
- Lam PY, Shih KC, Fong PY, Chan TCY, Ng ALK, Jhanji V & Tong L (2020). A Review on Evidence-Based Treatments for Meibomian Gland Dysfunction. *Eye Contact Lens* 46, 3–16. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31834043/> [Accessed March 8, 2021].
- Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A & Aloe L (2000). *Nerve Growth Factor Promotes Corneal Healing: Structural, Biochemical, and Molecular Analyses of Rat and Human Corneas*.
- Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Cortes M, Mantelli F & Bonini S (2011). Alterations of tear neuromediators in dry eye disease. *Arch Ophthalmol* 129, 981–986.
- Liu CC, Hajra SG, Song X, Doesburg SM, Cheung TPL & D'Arcy RCN (2019). Cognitive loading via mental arithmetic modulates effects of blink-related oscillations on precuneus and ventral attention network regions. *Hum Brain Mapp* 40, 377–393.

- Liu JC, Steinemann TL, McDonald MB, Thompson HW & Beuerman RW (1993). Topical bupivacaine and proparacaine: a comparison of toxicity, onset of action, and duration of action. *Cornea* 12, 228–232.
- Lollett I V. & Galor A (2018). Dry eye syndrome: developments and lifitegrast in perspective. *Clin Ophthalmol* 12, 125–139.
- Ludwig PE, Lopez MJ & Sevensma KE (2021). Anatomy, Head and Neck, Eye Cornea. *StatPearls*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470340/> [Accessed August 3, 2022].
- Luna C, Mizerska K, Quirce S, Belmonte C, Gallar J, Acosta M del C & Meseguer V (2021). Sodium Channel Blockers Modulate Abnormal Activity of Regenerating Nociceptive Corneal Nerves After Surgical Lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 62, 2–2.
- MacIver MB & Tanelian DL (1993). Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurosci* 13, 4511–4524.
- Mapstone R (1968). Determinants of corneal temperature. *British Journal of Ophthalmology* 52, 729–741.
- Marfurt CF, Cox J, Deek S & Dvorscak L (2010). Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res* 90, 478–492.
- Mateo Orobia AJ, Blasco-Martinez A, Rodríguez-Ausín P, Pablo Júlvez LE, Güemes Villahoz N, del Prado Sanz E, Satué Palacián M & Benítez-del-Castillo JM (2020). Effects and safety of perfluorohexyloctane on the eye surface and corneal endothelium. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)* 95, 538–543.
- Meinert H & Roy T (2000). Semifluorinated alkanes—a new class of compounds with outstanding properties for use in ophthalmology. *Eur J Ophthalmol* 10, 189–197.
- Merino ML, Belmonte J, Acosta M del C, Belmonte C; & Gallar J (2018). Ocular Surface Temperature in Sjögren's Syndrome. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 59, 148.
- Millodot M (1984). A REVIEW OF RESEARCH ON THE SENSITIVITY OF THE CORNEA\*. *Ophthalmic and Physiological Optics* 4, 305–318.

- Mishima S & Maurice DM (1961). The oily layer of the tear film and evaporation from the corneal surface. *Exp Eye Res* 1, 39–45.
- Mitchell T, Murri M & Pflugfelder SC (2021). Video Viewing Blink Rate in Normal and Dry Eyes. *Eye Contact Lens* 47, 442–444.
- Moss SE, Klein R & Klein BEK (2004). Incidence of Dry Eye in an Older Population. *Archives of Ophthalmology* 122, 369–373.
- Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F & Tervo TMT (2003). Corneal nerves: Structure, contents and function. *Exp Eye Res* 76, 521–542.
- Munger BL & Halata Z (1984). The sensorineural apparatus of the human eyelid. *Am J Anat* 170, 181–204.
- Naase T, Doughty MJ & Button NF (2005). An assessment of the pattern of spontaneous eyeblink activity under the influence of topical ocular anaesthesia. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 243, 306–312.
- Nagasaki T & Zha J (2003). Centripetal movement of corneal epithelial cells in the normal adult mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 558–566.
- Nakamori K, Odawara M, Nakajima T, Mizutani T & Tsubota K (1997). Blinking is controlled primarily by ocular surface conditions. *Am J Ophthalmol* 124, 24–30.
- Nakano T & Miyazaki Y (2019). Blink synchronization is an indicator of interest while viewing videos. *International Journal of Psychophysiology* 135, 1–11.
- Niederer RL, Perumal D, Sherwin T & McGhee CNJ (2007). Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol* 91, 1165–1169.
- Nishida T (2005). Neurotrophic mediators and corneal wound healing. *Ocul Surf* 3, 194–202.
- Nosedá R, Monconduit L, Constandil L, Chalus M & Villanueva L (2008). Central nervous system networks involved in the processing of meningeal and cutaneous inputs from the ophthalmic branch of the trigeminal nerve in the rat. *Cephalalgia* 28, 813–824.
- O'Neil EC, Henderson M, Massaro-Giordano M & Bunya VY (2019). Advances in dry eye disease treatment. *Curr Opin Ophthalmol* 30, 166–178.

- Panneton WM, Hsu H & Gan Q (2010). Distinct central representations for sensory fibers innervating either the conjunctiva or cornea of the rat. *Exp Eye Res* 90, 388.
- Parra A, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J & Belmonte C (2014). Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain* 155, 1481–1491.
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, Del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F & Belmonte C (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 16, 1396–1399.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S & Patapoutian A (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705–715.
- Pellegrini JJ, Horn AKE & Evinger C (1995). The trigeminally evoked blink reflex. I. Neuronal circuits. *Exp Brain Res* 107, 166–180.
- Perry HD, Solomon R, Donnenfeld ED, Perry AR, Wittpenn JR, Greenman HE & Savage HE (2008). Evaluation of topical cyclosporine for the treatment of dry eye disease. *Arch Ophthalmol* 126, 1046–1050.
- Pflugfelder SC & Stern ME (2020). Biological functions of tear film. *Exp Eye Res*; DOI: 10.1016/j.EXER.2020.108115.
- Pineda R (2020). World Corneal Blindness. In *In: Colby, K., Dana, R. (eds) Foundations of Corneal Disease. Springer, Cham.*, pp. 299–305. Springer, Cham. Available at: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-25335-6\\_25](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-25335-6_25) [Accessed December 1, 2022].
- Ponder E & Kennedy WP (1927). ON THE ACT OF BLINKING. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 18, 89–110.
- Pozo MA, Gallego R, Gallar J & Belmonte C (1992). Blockade by calcium antagonists of chemical excitation and sensitization of polymodal nociceptors in the cat's cornea. *J Physiol* 450, 179–189.
- Quallo T, Vastani N, Horridge E, Gentry C, Parra A, Moss S, Viana F, Belmonte C, Andersson DA & Bevan S (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat Commun* 6, 7150.

- Rausell E & Jones EG (1991). Chemically distinct compartments of the thalamic VPM nucleus in monkeys relay principal and spinal trigeminal pathways to different layers of the somatosensory cortex. *J Neurosci* 11, 226–237.
- Rehman I, Hazhirkarzar B & Patel BC (2022). Anatomy, Head and Neck, Eye. *StatPearls*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482428/> [Accessed November 15, 2022].
- Rodríguez-Torres LA, Porras-Machado DJ, Villegas-Guzmán AE & Molina-Zambrano JA (2010). Analysis of incidence of ocular surface disease index with objective tests and treatment for dry eye. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)* 85, 70–75.
- Rózsa AJ & Beuerman RW (1982). Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* 14, 105–120.
- Ruskell GL (1969). Changes in nerve terminals and acini of the lacrimal gland and changes in secretion induced by autonomic denervation. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 94, 261–281.
- Santiago B, Diaz-Tahoces A, Gallar J, Belmonte C & Acosta MC (2017). Somatotopic organization of the different functional types of trigeminal ganglion neurons innervating the ocular surface and periocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58, 1020–1020.
- Schmidl D, Bata AM, Szegedi S, Aranha Dos Santos V, Stegmann H, Fondi K, Krösser S, Werkmeister RM, Schmetterer L & Garhöfer G (2020). Influence of Perfluorohexyloctane Eye Drops on Tear Film Thickness in Patients with Mild to Moderate Dry Eye Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 36, 154–161.
- Sheedy JE, Gowrisankaran S & Hayes JR (2005). Blink rate decreases with eyelid squint. *Optom Vis Sci* 82, 905–911.
- Shimazaki J (2018). Definition and Diagnostic Criteria of Dry Eye Disease: Historical Overview and Future Directions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59, DES7–DES12.
- Smit A (2009). Blinking and the Brain - Pathways and Pathology.
- Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, Na KS, Schaumberg D, Uchino M, Vehof J, Viso E, Vitale S & Jones L (2017). TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf* 15, 334–365.

- Steven P, Augustin AJ, Geerling G, Kaercher T, Kretz F, Kunert K, Menzel-Severing J, Schrage N, Schrems W, Krösser S, Beckert M & Messmer EM (2017). Semifluorinated Alkane Eye Drops for Treatment of Dry Eye Disease Due to Meibomian Gland Disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 33, 678–685.
- Steven P, Scherer D, Krösser S, Beckert M, Cursiefen C & Kaercher T (2015). Semifluorinated Alkane Eye Drops for Treatment of Dry Eye Disease—A Prospective, Multicenter Noninterventional Study. *J Ocul Pharmacol Ther* 31, 498–503.
- Su Y, Liang Q, Su G, Wang N, Baudouin C & Labbé A (2018). Spontaneous Eye Blink Patterns in Dry Eye: Clinical Correlations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59, 5149–5156.
- Takahashi Y, Watanabe A, Matsuda H, Nakamura Y, Nakano T, Asamoto K, Ikeda H & Kakizaki H (2013). Anatomy of secretory glands in the eyelid and conjunctiva: a photographic review. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 29, 215–219.
- Tanelian DL & Beuerman RW (1984). Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Exp Neurol* 84, 165–178.
- Taylor JR, Elsworth JD, Lawrence MS, Sladek JR, Roth RH & Redmond DE (1999). Spontaneous blink rates correlate with dopamine levels in the caudate nucleus of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol* 158, 214–220.
- Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW & Murakami A (2007). Evaluation of Novel Dry Eye Model: Preganglionic Parasympathetic Denervation in Rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 4468.
- Tsubota K, Hata S, Okusawa Y, Egami F, Ohtsuki T & Nakamori K (1996). Quantitative videographic analysis of blinking in normal subjects and patients with dry eye. *Archives of Ophthalmology* 114, 715–720.
- Tsubota K, Kwong KK, Lee TY, Nakamura J & Cheng HM (1999). Functional MRI of brain activation by eye blinking. *Exp Eye Res* 69, 1–7.
- Tsubota K & Nakamori K (1995). Effects of Ocular Surface Area and Blink Rate on Tear Dynamics. *Archives of Ophthalmology* 113, 155–158.
- VanderWerf F, Brassinga P, Reits D, Aramideh M & Ongerboer de Visser B (2003). Eyelid movements: Behavioral studies of blinking in humans under different stimulus conditions. *J Neurophysiol* 89, 2784–2796.



- Velasco E, Zaforas M, Acosta MC, Gallar J & Aguilar J (2024). Ocular surface information seen from the somatosensory thalamus and cortex. *J Physiol*; DOI: 10.1113/JP285008.
- Verma S, Corbett MC, Patmore A, Heacock G & Marshall J (1997). A Comparative Study of the Duration and Efficacy of Tetracaine 1% and Bupivacaine 0.75% in Controlling Pain following Photorefractive Keratectomy (PRK). <https://doi.org/10.1177/112067219700700404> 7, 327–333.
- Viana F, De la Peña E & Belmonte C (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 5, 254–260.
- Viso E, Rodriguez-Ares MT & Gude F (2009). Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (the Salnes Eye Study). *Ophthalmic Epidemiol* 16, 15–21.
- Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K, Gupta PK, Karpecki P, Lazreg S, Pult H, Sullivan BD, Tomlinson A, Tong L, Villani E, Yoon KC, Jones L & Craig JP (2017). TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf* 15, 539–574.
- Wong S, Murphy PJ & Jones L (2018). Tear evaporation rates: What does the literature tell us? *Contact Lens and Anterior Eye* 41, 297–306.
- Wu Z, Begley CG, Port N, Bradley A, Braun R & King-Smith E (2015). The effects of increasing ocular surface stimulation on blinking and tear secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56, 4211–4220.
- Yang AY, Chow J & Liu J (2018). Focus: Sensory Biology and Pain: Corneal Innervation and Sensation: The Eye and Beyond. *Yale J Biol Med* 91, 13.
- Yokoi N & Georgiev GA (2019). Tear-film-oriented diagnosis for dry eye. *Jpn J Ophthalmol* 63, 127–136.
- Zeana D, Becker J, Kuckelkorn R & Kirchhof B (1999). Perfluorohexyloctane as a long-term vitreous tamponade in the experimental animal. Experimental perfluorohexyloctane substitution. *Int Ophthalmol* 23, 17–24.
- Zhang X, Wang L, Zheng Y, Deng L & Huang X (2020). Prevalence of dry eye disease in the elderly: A protocol of systematic review and meta-analysis. *Medicine* 99, e22234.



## Anexos



## Anexo I:

### Deciphering the Action of Perfluorohexyloctane Eye Drops to Reduce Ocular Discomfort and Pain.

Miguel Delicado-Miralles <sup>1</sup>, Enrique Velasco <sup>1,2</sup>, Ariadna Díaz-Tahoces <sup>1,3</sup>,  
Juana Gallar <sup>1,2,3</sup>, M Carmen Acosta <sup>1,2</sup>, Adolfo Aracil-Marco <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cellular and Systems Neurobiology Unit, Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, San Juan de Alicante, Spain.

<sup>2</sup>The European University of Brain and Technology-NeurotechEU, San Juan de Alicante, Spain.

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante, San Juan de Alicante, Spain.

Front Med (Lausanne). 2021 Oct 26;8:709712. doi: 10.3389/fmed.2021.709712.  
eCollection 2021. PMID: 34765614 PMCID: PMC857756





# Deciphering the Action of Perfluorohexyloctane Eye Drops to Reduce Ocular Discomfort and Pain

Miguel Delicado-Miralles<sup>1†</sup>, Enrique Velasco<sup>1,2†</sup>, Ariadna Díaz-Tahoces<sup>1,3</sup>, Juana Gallar<sup>1,2,3\*</sup>, M. Carmen Acosta<sup>1,2</sup> and Adolfo Aracil-Marco<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cellular and Systems Neurobiology Unit, Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, San Juan de Alicante, Spain, <sup>2</sup> The European University of Brain and Technology-Neurotech<sup>EU</sup>, San Juan de Alicante, Spain, <sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante, San Juan de Alicante, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Giulio Ferrari,  
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy

### Reviewed by:

Melis Palamar,  
Ege University, Turkey  
Sue A. Aicher,  
Oregon Health and Science  
University, United States

### \*Correspondence:

Juana Gallar  
juana.gallar@umh.es

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share first  
authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Ophthalmology,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

Received: 04 June 2021

Accepted: 28 September 2021

Published: 26 October 2021

### Citation:

Delicado-Miralles M, Velasco E,  
Díaz-Tahoces A, Gallar J, Acosta MC  
and Aracil-Marco A (2021)  
Deciphering the Action of  
Perfluorohexyloctane Eye Drops to  
Reduce Ocular Discomfort and Pain.  
*Front. Med.* 8:709712.  
doi: 10.3389/fmed.2021.709712

Perfluorohexyloctane (F6H8) eyedrops have been recently introduced in Europe as a product to treat dry eye disease, based on its ability to reduce tear film instability in Meibomian gland dysfunction and evaporative dry eye disease, although its mechanism of action is still unknown. In the present pilot study, we evaluated the effects of the ocular instillation of a single drop of commercial F6H8 eyedrops in 20 healthy humans (9 women/11 men), measuring: (a) Corneal surface temperature (CST) from infrared video images; (b) tear volume using phenol red threads; (c) blinking frequency; and (d) ocular surface sensations (cold, dryness, pricking, foreign body, burning, itching, gritty, eye fatigue, watering eyes, and light-evoked discomfort sensations; scored using 10 cm Visual Analog Scales), before and 5–60 min after F6H8 or saline treatment. CST decreased and tearing and blinking frequency increased significantly after F6H8 but not after saline solution. When applied unilaterally, CST decreased only in the F6H8-treated eye. No sensations were evoked after F6H8 or saline. The corneal surface temperature reduction produced by topical F6H8 does not evoke conscious ocular sensations but is sufficient to increase the activity of corneal cold thermoreceptors, leading to an increased reflex lacrimation and blinking that may relieve dry eye condition thus reducing ocular discomfort and pain.

**Keywords:** ocular discomfort, ocular pain, dry eye, perfluorohexyloctane, blinking, tearing, cold thermoreceptors, corneal surface temperature

## INTRODUCTION

The ocular surface is a unique exposed mucosa that must endure environmental conditions while maintaining its function and integrity (1). Upon their activation by environmental physical and chemical changes acting on their peripheral nerve endings, trigeminal sensory neurons innervating the ocular surface trigger protective responses such as blinking and tearing (2). In particular, there is strong evidence that TRPM8-mediated activation of corneal cold-thermoreceptors constitutes the afferent signal to the CNS for the regulation of tearing and blinking, mechanisms that allow to maintain and distribute moistness of the eye surface (3, 4).

Dry Eye Disease (DED), a condition that affects over 10% of people worldwide (5), is characterized by a loss of the so-called homeostasis of the tear film, that is, the disruption of the equilibrium of the chemical composition and functions of the tear film due to one or more

of the underlying causes of dry eye (6). Due to the multi-etiological origin of DED, no specific treatments are available nowadays, and there is scarce scientific evidence on their effectiveness in the management of the disease. Artificial tears are commonly used by most DED patients (7) although some of them contain preservatives that are known to produce side effects (8).

Perfluorohexyloctane (F6H8) is a semifluorinated alkane liquid that has been used initially in ophthalmology as a long-term vitreous substitute (9). This compound is physically, chemically and physiologically inert, slightly amphiphilic, colorless and laser stable with a density higher than water, and very low surface and interface tensions (10). In addition, as it is a non-aqueous liquid, microbial growth is not possible and therefore, it does not need any preservative (8).

F6H8 applied topically in DED patients reduced their dry-eye associated symptoms in two prospective observational studies (8, 11). As F6H8 increased tear film breakup time and lipid layer thickness in DED patients, it has been proposed that F6H8 could prevent the increased evaporation that causes DED by forming an occlusive layer and reducing shearing forces of the eyelid during blinking (8, 11). This idea is reinforced by the observation that in rabbits, F6H8 improves the quality grade of the tear film lipid layer measured by hand-held interferometry (12). Additionally, in mild to moderate DED patients F6H8 transiently increases tear film thickness 10 min after its application (13). A more recent study showed that topical treatment with F6H8 does not induce changes in corneal endothelium and significantly reduce corneal staining in DED patients, supporting its effectiveness and safety (14).

These results, together with the low surface tension of the compound, led to conclude that the very small drop of F6H8 (about 10  $\mu$ L) spread uniformly over the ocular surface upon application, forming a protective layer over the tear film and preventing its evaporation. However, the precise mechanisms that would explain the effects of F6H8 in DED are far from being clarified and still need investigation.

In a previous report, we found that F6H8 produces corneal surface temperature changes in tear-deficient guinea pigs (15), suggesting that F6H8 may be more than an inert molecule, forming a non-water mixable thin layer over the tears and reducing tear evaporation. We hypothesized that, in addition to preventing evaporation, F6H8 may facilitate heat exchange between corneal tissue and the environment, thus reducing corneal temperature and activating TRPM8 cold-thermosensitive channels of cold thermoreceptor nerves. In turn, the increased activity of corneal cold nerves will lead to an increase in tearing and blinking rate. To test this hypothesis, we have studied the ocular sensations evoked in a group of volunteers by topical instillation of F6H8, in parallel with its effects on tear production, blinking frequency, and corneal surface temperature measured by infrared thermography. Additionally, we performed a simple experiment to investigate the temperature transmittance of F6H8 as a first approach to understand the mechanism of action of this molecule.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

Twenty 20 young healthy volunteers (9 women, 11 men; mean age  $24.1 \pm 4.4$  years, range 19–34 years) participated in this pilot study. After signing an informed consent, volunteers were subjected to a brief anamnesis and filled out an ocular surface discomfort index (OSDI) questionnaire adapted to Spanish-speaking people (16). Individuals with previous eye disease, ocular surgery, OSDI  $\geq 12$ , as well as daily contact lens users or subjects that were receiving either ocular or systemic drugs were excluded. Participants were instructed to not consume any anti-inflammatory or pain-killer drug in the 48 h previous to the experiment. All experimental procedures were carried out according to the Spanish legal regulations and the Helsinki Declaration, and followed the protocol UMH.INJGa.01.14 approved by the Ethics Committee of the Universidad Miguel Hernández de Elche.

### Experimental Protocols

Two different experimental protocols were carried out (**Figure 1**) in the same room, under controlled temperature ( $24.2 \pm 1.5^\circ\text{C}$ , range  $21.2\text{--}27.9^\circ\text{C}$ ) and partial humidity ( $42.4 \pm 7.9\%$ , range  $22.6\text{--}55.0\%$ ). The position of the volunteers and experimenters, as well the distance from the face of the subject to the different objects in the room (video camera, air conditioning outlet, door, windows, etc.) was standardized to avoid any environmental variation along the procedures. As F6H8 does not induce corneal punctate (14), fluorescein corneal staining was considered not necessary. This way, the observed effects of F6H8 were not masked or affected by fluorescein or its excipients.

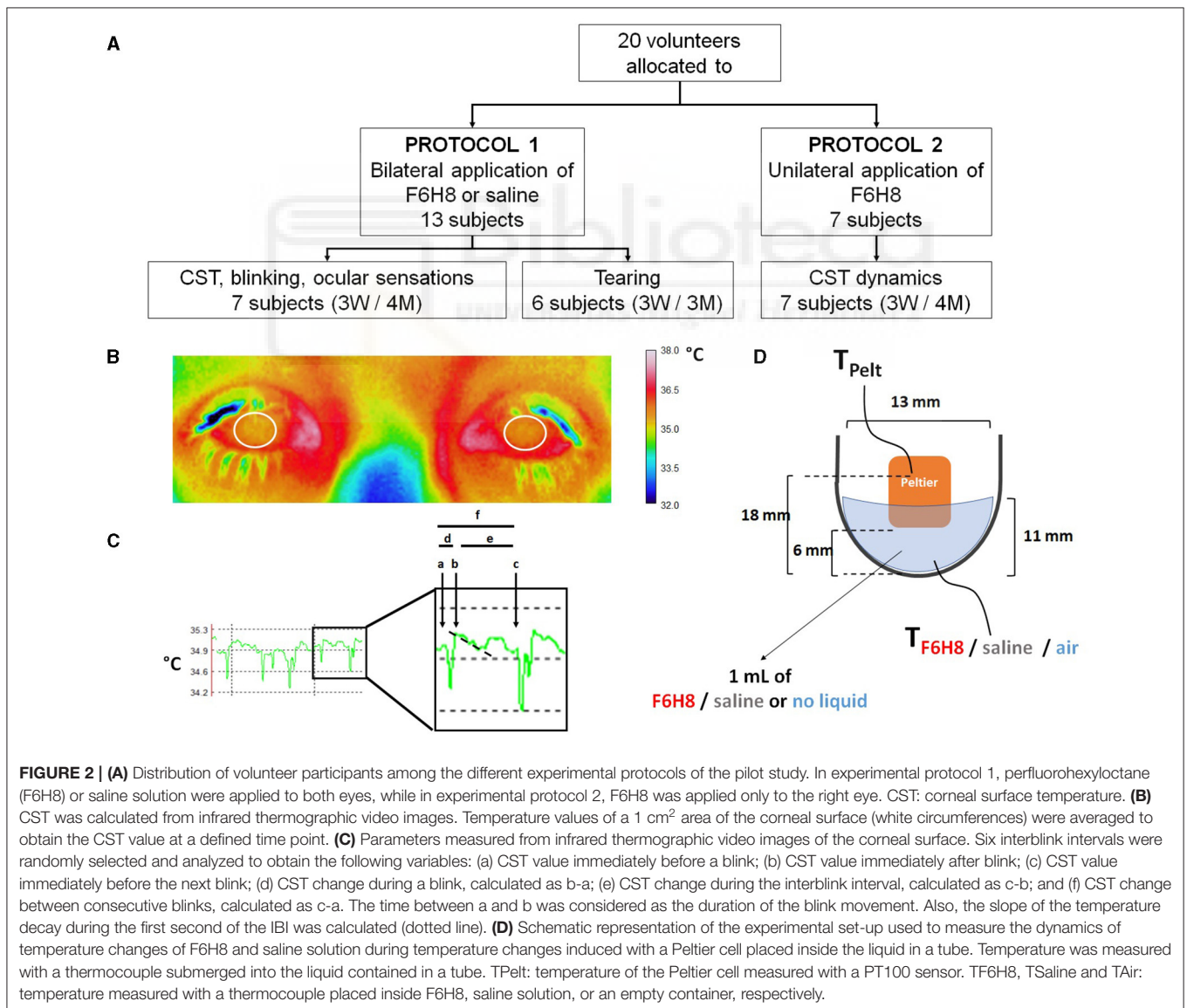
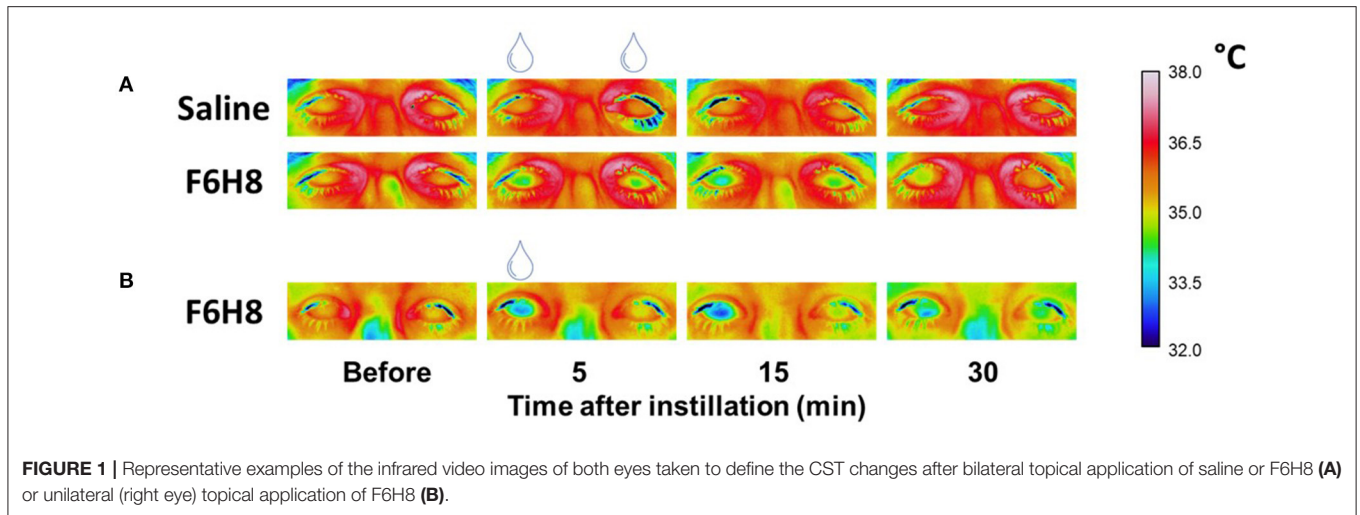
In experimental protocol 1 (**Figure 1A**), 13 participants received bilaterally a single 10  $\mu$ L drop of F6H8 (EvoTears™, Brill Pharma S.L., Spain) or saline solution (NaCl 0.9 %, Braun Medical, S.A.) in two different sessions (application order at random). In experimental protocol 2 (**Figure 1B**), corneal surface temperature (CST) was measured in a separate group of 7 subjects (3 women and 4 men) before and after a single 10  $\mu$ L drop of F6H8 instilled only on the right eye.

#### Protocol 1: F6H8 or Saline Solution Applied to Both Eyes

Participants in protocol 1 were distributed in two different subsets (**Figure 2A**). In the first subset (protocol 1A) of 7 subjects (3 women and 4 men) CST, blinking frequency and ocular surface sensations were evaluated before and at different times (5, 15, 30, and 60 min) after F6H8 or saline bilateral treatment. In the second subset (protocol 1B) of 6 participants (3 women and 3 men), tearing was measured before and after F6H8 or saline.

#### Protocol 1A: CST, Blinking Rate and Ocular Sensations

**Measurement of corneal surface temperature.** Surface temperature of the ocular tissue was measured from video images taken with an infrared thermographic video camera (InfRec R300SR, Nippon Avionics Co. Ltd., Tokyo, Japan). The subject sat quietly with the head in a chin rest, fixing the gaze over the objective of the camera, placed at a fixed distance of 50 cm.





Recording parameters (digital 1.6x zoom; 320 x 240 pixels; 60 frames per second; 0.96 emissivity) as well as data extraction (a circular area of 1 cm<sup>2</sup> -range 0.93–1.01 cm<sup>2</sup>- specifically located over the cornea) were established using dedicated software (InfRec Analyzer NS9500 Standard, Nippon Avionics Co. Ltd.) (Figure 2B). Both eyes were simultaneously recorded for 1 min at different time points: before and 5, 15, 30, and 60 min after the corresponding topical treatment. At the beginning of the 1 min recording, subjects kept their eyes closed for 3 s and blink spontaneously afterwards. CST values calculated by averaging the temperature of 1 cm<sup>2</sup> area of both corneas at the beginning of the last registered interblink period were considered the main parameter to define the effects of F6H8 and saline treatments on ocular surface temperature.

**Ocular surface sensations.** Immediately after the end of the 1-min IR video recordings performed before and at different times after F6H8 or saline treatment, subjects were asked to use separate 10 cm Visual Analog Scales (VASs; where 0 represents no sensation and 10 is the maximal sensation the subject can imagine) (17) to score the following sensations experienced at the ocular surface: cold, burning, dryness, pricking, foreign body sensation, itching, gritty, eye fatigue, watering eyes, and light-induced discomfort.

**Blinking frequency.** Immediately afterwards, the number of blinks was manually counted from direct observation of the subjects, who did not know that their blinks were being counted in order to avoid conditioning by the experimental situation (18). Volunteers were asked to read aloud the letters in a LogMar chart placed at 1 m distance, from left to right and from up to down. Blinking frequency (BF) was calculated as the number of blinks during the duration of the task for each subject. The average time needed to perform one complete reading of the chart was 24.6 ± 8.6 s, although depending on the subject it varied between 15 and 60 s. BF while performing this task was measured before, and at 5, 15, 30, and 60 min after the corresponding topical treatment.

### Protocol 1B: Tear Volume

Tear volume was assessed before and 5, 15, and 30 min after the corresponding topical treatment using phenol red threads carefully placed during 30 s in the inferior conjunctival sac, near the temporal canthus. Tear volume was expressed as the length of wet thread, measured in mm using a ruler.

### Protocol 2: F6H8 or Saline Solution Applied Only to the Right Eye

CST was measured in both eyes before and at different time points after F6H8 instillation onto the right eye only, using the infrared thermography analysis described before. To further define the effects of F6H8, the following parameters were analyzed from the IR video recordings performed before, 5 and 60 min after treatment, averaging the values obtained from 6 interblink periods (Figure 2C): (a) CST value immediately before one blink; (b) CST value immediately after blink; (c) CST value immediately before next blink. From these values, (d) CST change during blink, (e) CST change during the interblink interval (IBI), and (f) CST change between consecutive

blinks were calculated. Also, the slope of the temperature decay during the first second of the IBI was calculated. Additionally, the temperature of 1 cm<sup>2</sup> of the eyelid skin was measured at the different time points before and after eyedrop treatment.

## Adaptation of F6H8 and Saline Solution to Temperature Changes

An ultrafine flexible temperature thermocouple (IT-23, Physitemp Instruments LLC, Clifton, NJ, USA) was placed at the bottom of an Eppendorf tube filled with 1 ml of F6H8 or saline solution, or empty of liquid ( $n = 4$  observations per condition). Temperature was continuously recorded with a digital thermometer (BAT-12 Microprobe Thermometer, Physitemp Instruments LLC) (Figure 2D). Increases and decreases of temperature inside the tube were produced by a home-made temperature controller device whose Peltier cell was placed inside the tube. This device allows changing temperature between 15° and 50°C although only the temperature range close to the normal ocular surface temperature values were explored. From a resting Peltier temperature ( $T_{\text{Peltier}}$ ) around 34°C, temperature was increased by 3°C in a single step at an approximate rate of 0.030°C·s<sup>-1</sup>. After 8 min at 37°C, a 3°C cooling step was induced with the Peltier at a similar cooling rate.  $T_{\text{Peltier}}$  and temperature of the solution ( $T_{\text{F6H8}}$ ,  $T_{\text{saline}}$ , or  $T_{\text{Air}}$ ) were recorded simultaneously and stored in a computer using a micro1401 CED interface and Spike2 software (both from Cambridge Electronic Devices, Ltd., Milton, Cambridge, UK) for further off-line analysis. As in the case of human measurements, experiments were made at a room temperature of 23–24°C and a partial humidity around 40%.

## Data Analysis

Power analysis for paired comparison analysis (matched pairs) was performed using Gpower\*3.1 (19), considering an effect size of 1.5 (Cohen's  $d$ ), a power of 0.8 and an  $\alpha$ -error of 0.05. The minimum number of observations was established in  $n = 6$ , so that the sample size of participants in each subset of the experimental protocol ( $n = 6$  or 7) was enough to achieve statistical significance.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Windows (Version 25.0). Descriptive analysis was performed to detect possible outliers. Data distribution was studied with the Kolmogorov-Smirnoff test. Variances were compared using the Levene's test for Equality of Variances, when necessary. Normally distributed variables were compared with the paired Student's  $t$ -test, ANOVA or Repeated measurements ANOVA. Non-normally distributed parameters were compared with the Wilcoxon's test. Categorical variables were compared with the  $\chi^2$  test. Unless otherwise indicated, data are presented as mean ± standard deviation (median ± interquartile range if non-normal). Statistical differences were accepted for  $p < 0.05$ . Graphs were made with SigmaPlot software v11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

**TABLE 1** | Ocular surface sensations reported 5 min after bilateral topical treatment with a 10  $\mu$ L drop of F6H8 or saline solution.

Sensations	F6H8		Saline	
	Sensation intensity	Responding subjects	Sensation intensity	Responding subjects
Cold	0 (0.0)	1/7	0 (0.0)	1/7
Dryness	0 (0.0)	0/7	0 (0.0)	1/7
Burning	0 (0.0)	1/7	0 (3.2)	2/7
Pricking	0 (0.0)	0/7	0 (0.0)	0/7
Foreign body	0 (6.0)	2/7	0 (7.1)	1/7
Itching	0 (0.0)	1/7	0 (6.8)	3/7
Gritty	0 (4.8)	1/7	0 (0.0)	1/7
Eye fatigue	0 (0.0)	1/7	0 (0.0)	0/7
Tearing	0 (0.0)	0/7	0 (8.4)	2/7
Light-evoked discomfort	0 (0.0)	0/7	0 (1.3)	1/7

Data shown on each column are: median (IQR) of VAS units; number of responding/total number of explored subjects. No significant differences were found between F6H8 and saline-treated groups for any sensation (Wilcoxon Signed Rank test and chi square test).

## RESULTS

### Effects of Topical F6H8 and Saline Solution Applied to Both Eyes

We first studied the effects of bilateral topical instillation of a 10  $\mu$ L drop of F6H8 on corneal surface temperature (CST), blinking rate and ocular surface sensations measured at different time points after treatment in 7 seven healthy young volunteers. Results were also compared with those obtained after bilateral instillation of an aqueous solution (saline solution).

#### Ocular Surface Sensations

Sensations of cold, dryness, burning, pricking, foreign body sensation, itching, gritty, eye fatigue, watering eyes, and light-induced discomfort experienced by the volunteers were evaluated before and at different times after the corresponding treatment. Overall, no conscious ocular sensations were evoked by F6H8 or saline treatment at any of the studied time points, being 0 the median of the scored values. As an example, **Table 1** shows the VAS values of the ocular sensations scored 5 min after bilateral topical treatment with F6H8 or saline. In addition, no differences in the proportion of subjects reporting any sensation were found between F6H8 and saline treatments (**Table 1**), although 5 out of the 7 subjects were able to differentiate F6H8 from saline. Two subjects also reported blurry vision for a few seconds after F6H8 application.

#### Corneal Surface Temperature

At different times after bilateral topical treatment (**Figure 1A**), CST values were calculated by averaging the temperature of 1  $\text{cm}^2$  of corneal surface (**Figure 2B**) in infrared thermographic images taken immediately after eye opening (**Figure 2C**, parameter b, see methods). CST was significantly decreased after F6H8 ( $p = 0.001$ , Repeated Measurements ANOVA;  $p = 0.001$ , 0.008, 0.012 at 5, 15 and 60 min, respectively, in comparison with the value before treatment, *post hoc* Dunnett's test;  $n = 7$ )

(**Figure 3A**). In contrast, bilateral instillation of saline solution did not modify CST at any of the different time point after treatment (**Figures 1A, 3A**, inset).

#### Tear Volume

No significant changes in the volume of tears collected with phenol red threads were found after saline treatment ( $p = 0.640$ , Repeated measures ANOVA;  $n = 6$ ) (**Figure 3B**). Tear volume was slightly increased only at 5 min after F6H8, although the change was not statistically significant ( $p = 0.151$ , Repeated Measurements ANOVA;  $n = 6$ ).

#### Blinking Frequency

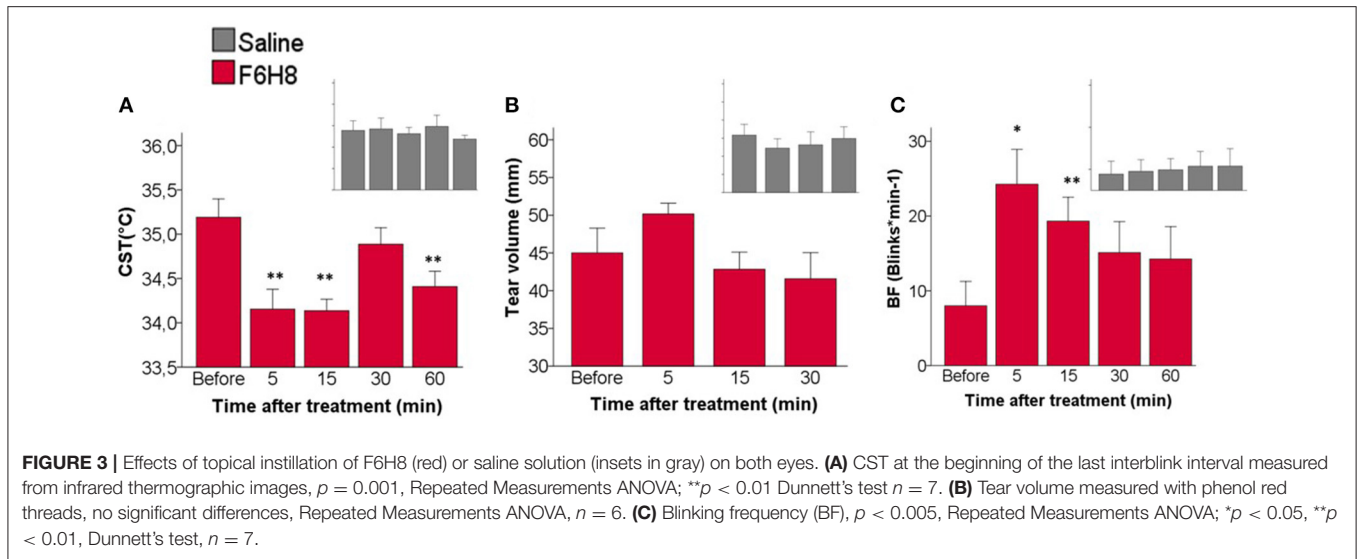
Bilateral application of saline did not affect blink frequency at any studied time point (**Figure 3C** inset). In contrast F6H8 significantly increased BF ( $p = 0.004$ , Repeated Measurements ANOVA;  $p = 0.015$  and 0.008 at 5 and 15 min, respectively, in comparison with the value before treatment, *post hoc* Dunnett's test;  $n = 7$ ) (**Figure 3C**).

### Effects of Unilateral Administration of F6H8 on CST

This set of experiments was performed to further describe the cooling effect of F6H8. In a separate group of volunteers ( $n = 7$ , see Methods), CST was measured before and after a single drop of F6H8 applied only onto the right eye in order to compare the dynamics of the temperature change during the interblink intervals (IBIs) in the treated eye, in comparison with the untreated, fellow eye. For that purpose, the evolution of CST values along the interblink interval was analyzed (See Methods and **Figure 2C** for details).

As expected, CST values at the beginning of the IBI were reduced after F6H8 ( $p = 0.001$ , repeated measures ANOVA;  $p = 0.002$  and 0.007 for the values obtained at 5 and 15 min after treatment, respectively, compared with pre-treatment values, *post hoc* Dunnett's test;  $n = 7$ ) with a maximal effect 5 min after treatment (**Figure 4A**). On the contrary, in untreated eyes, no significant changes of the CST values at the beginning of the IBI were found at any explored time point (**Figure 4A**). The CST values obtained at the beginning of the IBI were significantly lower in eyes receiving F6H8 than in untreated eyes at 5 and 15 min after treatment ( $p = 0.001$  and 0.023, respectively, paired *t*-test;  $n = 7$ ) (**Figure 4A**). To define if the cooling effect was restricted to the eye surface, we also measured the temperature of the eyelid skin, finding that it was not significantly modified neither in the F6H8-treated ( $35.01 \pm 0.61^\circ\text{C}$  vs.  $35.3 \pm 0.44^\circ\text{C}$ , before and 5 min after, respectively;  $p = 0.072$ , paired *t*-test) or untreated eye ( $34.98 \pm 0.57^\circ\text{C}$  vs.  $35.37 \pm 0.53^\circ\text{C}$ ;  $p = 0.052$ ).

To describe in more detail the effects of F6H8 on ocular surface temperature, the dynamics of CST change along an IBI was studied from the infrared video images taken before and 5 min after administration (when the maximal temperature reduction was obtained), as well as 60 min after F6H8 treatment (**Figures 4B–D**). In addition to starting from a lower temperature at the beginning of the IBI (**Figure 4A**), the decay of temperature during IBI was more prominent in the F6H8-treated eyes at 5 min after treatment, and recovered basal values afterwards



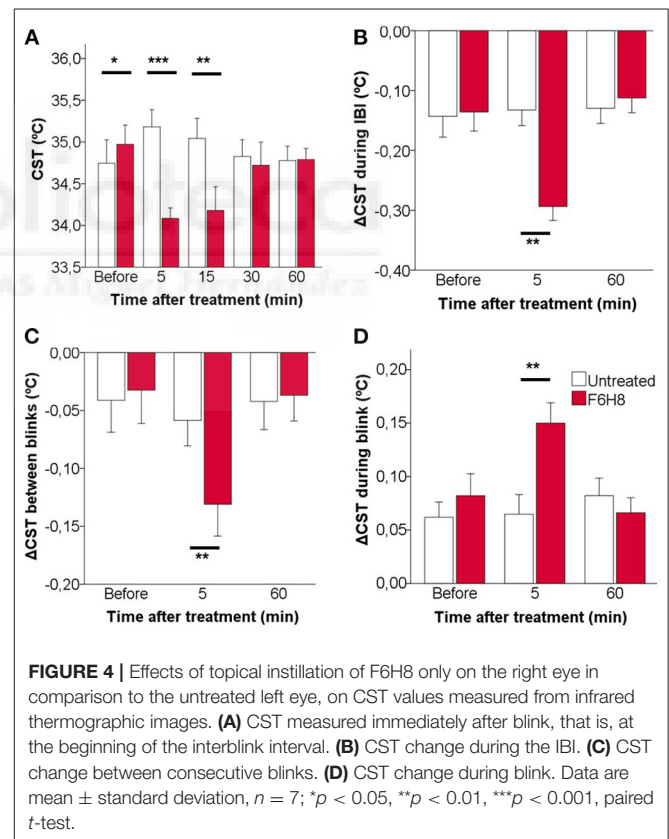
(Figure 4B, red bars). This effect was not present in the untreated eye (Figure 4B, empty bars). During the IBI, eyes treated with F6H8 cooled faster than untreated eyes, as reflected by the faster slope of the temperature decay during the first second ( $-0.078 \pm 0.16^\circ\text{C/s}$  and  $-0.165 \pm 0.82^\circ\text{C/s}$ , before and 5 min after F6H8, respectively;  $p < 0.01$ , paired  $t$ -test). On the contrary, the slope of temperature decay during IBI did not change significantly in the untreated eye ( $-0.061 \pm 0.145^\circ\text{C/s}$  and  $-0.082 \pm 0.101^\circ\text{C/s}$ , before and 5 min, respectively;  $p = 0.437$ ).

The reduction of CST induced by F6H8 was present immediately after its application, although the magnitude of the cooling effect was increasing with time during the first 15 min after treatment (Figures 1B, 4A). The increasing cooling during this time was evidenced by the significant differences obtained when comparing CST values of consecutive blinks (Figure 4C).

We then compared CST values obtained immediately before and after a blink to measure the magnitude of warming of the ocular surface that occurred during the time when the eyes were closed. This CST increase produced during blink was significantly larger in the eyes receiving F6H8 than in the contralateral, untreated eyes (Figure 4D). As this warming of the ocular surface is produced by heat transference between the vascularized palpebral conjunctiva and the avascular corneal tissue, we speculate whether the increased warming during blink was due to a longer duration of the eye closure in F6H8-treated eyes. We then used the IR video recordings to measure blink duration, finding that the duration of eye closure during blink was not modified after F6H8 ( $0.59 \pm 0.14$  ms vs.  $0.65 \pm 0.18$  ms, before and 5 min after F6H8, respectively;  $p = 0.128$ , paired  $t$ -test).

### Thermal Adaptation of F6H8 and Saline Solution to Temperature Changes

Measurements done with a thermoprobe using the experimental setup described in Figure 2D showed that for a sustained Peltier cell temperature ( $T_{\text{Peltier}}$ ) around  $33\text{--}34^\circ\text{C}$  and a room



temperature around  $23^\circ\text{C}$ , temperature of the saline solution ( $T_{\text{saline}}$ ) placed in a tube was close to  $32^\circ\text{C}$ , that is, around  $1^\circ\text{C}$  lower than  $T_{\text{Peltier}}$  (Figure 5A). Temperature of F6H8 ( $T_{\text{F6H8}}$ ) in this condition was around  $29^\circ\text{C}$ , that is, around  $4\text{--}5^\circ\text{C}$  lower than  $T_{\text{Peltier}}$  (Figure 5A). In this regard,  $T_{\text{F6H8}}$  behaved similarly to the temperature inside the tube measured without

any liquid ( $T_{\text{air}}$ ), about  $4^{\circ}\text{C}$  lower than  $T_{\text{Peltier}}$  (Figure 5A). When changing the Peltier temperature, the profiles of  $T_{\text{saline}}$ ,  $T_{\text{F6H8}}$ , and  $T_{\text{air}}$  followed the changes of  $T_{\text{Peltier}}$  (Figure 5A), although maintaining the difference described above. Comparison of  $T_{\text{saline}}$  and  $T_{\text{F6H8}}$  during ascending and descending temperature steps showed two different hysteresis patterns (Figure 5B).  $T_{\text{saline}}$  exhibited a slower rate of either increasing or decreasing temperature in comparison with  $T_{\text{F6H8}}$ . Furthermore, the warming rate and cooling rate of each substance showed that F6H8 tended to cool down faster than saline. Moreover, under our experimental conditions,  $T_{\text{F6H8}}$  cooling rate was higher around  $34^{\circ}\text{C}$  (Figure 5B).

## DISCUSSION

During the last 5 years, perfluorohexyloctane has been used as an alternative treatment of DED, particularly for its evaporative form due to Meibomian gland dysfunction (MGD) (8, 11, 13, 20). After 4–8 weeks of treatment with F6H8, MGD patients show an increase of the tear film and the lipid layer thickness (13), and Schirmer I test and Tear Film Break-Up Time (TFBUT) values, as well as a reduction of OSDI scores (8, 11). These data supported the idea that F6H8 is effective to treat evaporative forms of DED by improving the lipid layer of the tear film, and subsequently reducing tear evaporation and increasing tear film stability. This is a conceivable mechanism of action, because dry eye patients show an increased tear evaporation rate (21) and, due to its low surface tension, the F6H8 liquid state can act as a surfactant, forming monolayers at the water/air interphase (22, 23). F6H8 incorporation into artificial lipid systems mimicking the lipid layer of the tear film does not affect the tear film interface properties and restores the fluidity of these artificial lipid layers (24). Moreover, when applied onto healthy rabbit corneas, F6H8 spreads over larger areas than saline with lower viscosity (12). Therefore, F6H8 may contribute to restore, at least partially, the altered tear film lipid layer in evaporative DED patient.

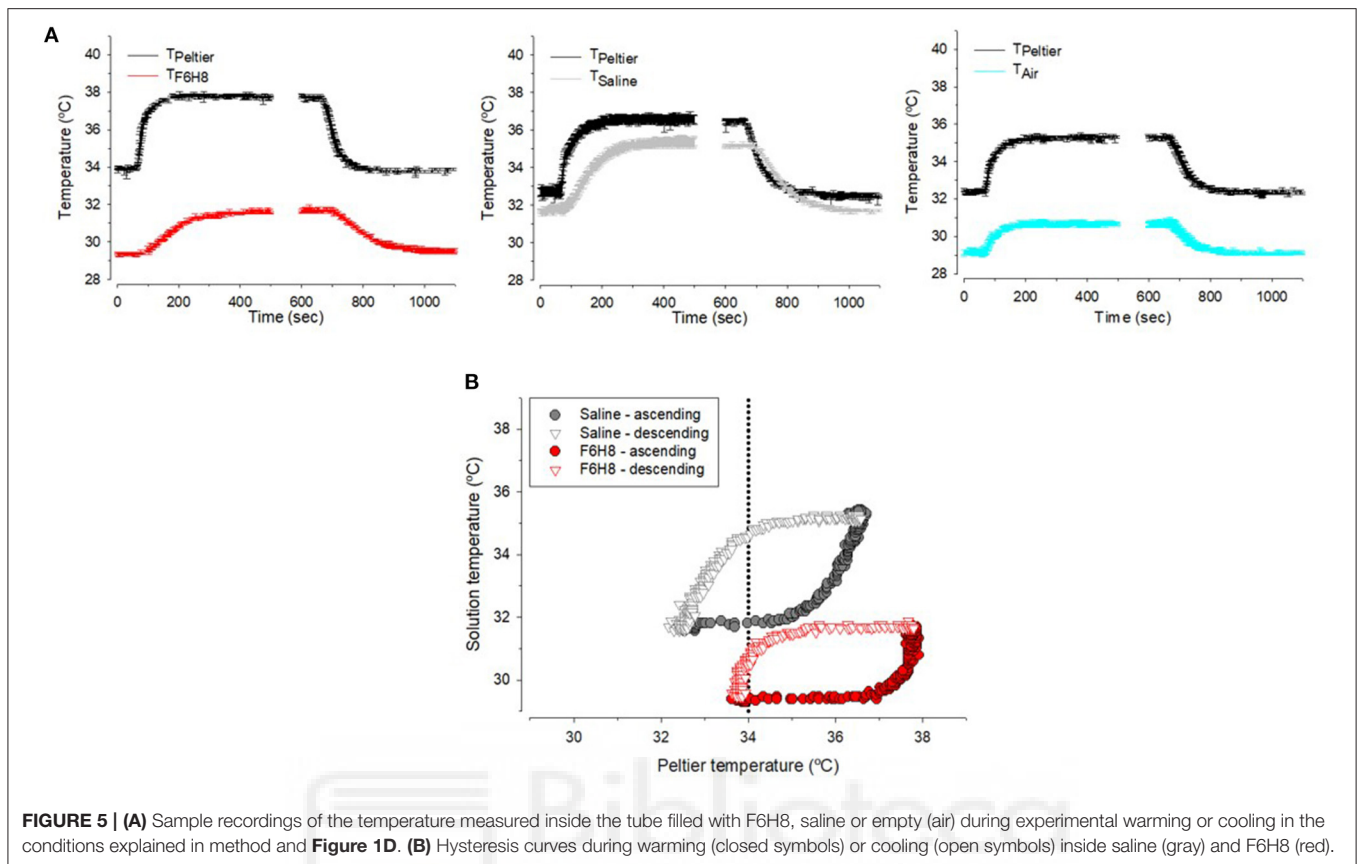
To the best of our knowledge our observations are the first demonstration that, in addition, topical application of F6H8 onto the human eye decreases for several minutes the corneal surface temperature. Five min after administration of F6H8, CST decreased about  $-0.7^{\circ}\text{C}$  in all the studied subjects. This ocular surface cooling occurs in parallel to an increase in tearing and blinking frequency that cannot be associated to the activation of the nociceptive corneal nerve fibers responsible to reflex blinking and tearing (25, 26) because any conscious sensation was evoked by F6H8.

The biophysical mechanism explaining the cooling effect of F6H8 is unknown. Cooling of the ocular surface after eye opening has been related to tear evaporation rate. Thus, the possibility exists that the compound would increase it. However, to the best of our knowledge tear evaporation after topical F6H8 administration has not been measured neither in evaporative DED patients, nor in healthy eyes. Only in an experimental model in healthy rabbit eyes *in vivo*, Agarwal et al. have described an acute biphasic effect of F6H8 in the percentage of change of tear evaporation from baseline (12). They noticed that

although tear evaporation rate slightly and transiently increased by 5 min after F6H8 instillation, it tended to decrease 60–90 min afterwards, reaching values even below baseline. As the increase of tear evaporation occurred also after application of saline, these authors attributed this finding to the increased tear volume and, possibly, to the transient alteration of the tear film structure due to the instillation itself. An alternative mechanism could be the evaporation of the molecule itself, although F6H8 exhibits a low evaporation rate compared with other semifluorinated alkane molecules. When tested *in vitro*,  $<1.5\%$  evaporated within 1 h, and more than 50% of the initial volume remained unevaporated after 24 h, both at  $35^{\circ}\text{C}$  (27). However, we cannot exclude that an increased fluid evaporation rate would explain, at least in part, the cooling effect found after F6H8 treatment.

According to Fourier's law of heat conduction, heat flow is inversely proportional to the thickness of the material and directly proportional to (a) the heat diffusion area; (b) the temperature gradient; and (c) the specific thermal conductivity constant of materials. In our experiments we assumed that the temperature gradient among the inner parts of the eye globe, the exposed area of the corneal tissue and the room environment keep constant, and that if F6H8 would cause an increase of the tear film thickness, this would represent a negligible increase of the total distance among the inner parts of the eye and the environmental air. Therefore, it can be hypothesized that a mechanism for the cooling effect of F6H8 would be an increase of the tear film thermal conductivity after the incorporation of F6H8 to the outermost tear film layer. In the presence of F6H8, we observed an increase of the ocular surface warming produced with blink (during the time that the eye is closed) and a faster decay of CST during the IBI. Interestingly, when measuring the thermal adaptation of F6H8 to temperature changes in a quite naïve experiment, we observed that the temperature measured inside liquid F6H8 tends to be between the temperature imposed by the Peltier cell and that of the environmental room air. Despite the absence of experimental data on the heat transmissivity properties of the molecule, it can be speculated that an increase of thermal conductivity and the subsequent increase of heat loss from the ocular surface to the environment is produced after topical administration of F6H8. However, an effect on radiative cooling cannot be ruled out with the present set of experiments.

In the present experiments we have not studied the time course of F6H8 removal from the ocular surface. Despite that, it seems reasonable that, at least partially, the compound could be drained continuously together with tear fluid, thus explaining the attenuation of the cooling effect of F6H8 with time. Previous studies estimated that the basal turnover of the tear film lipid layer occurs at an approximated rate of 1% per min in healthy humans (28). Therefore, if F6H8 is homogeneously distributed along the lipid layer and both are drained together, 30 min after F6H8 application it would be expected that 30% of the compound have been removed from the front of the eye. This value could be even higher, given that the molecule has a specific-gravity greater than water (9, 29). Thus, when the head is in vertical position -as in our experiments- F6H8 would tend to be accumulated in the lower part of tear film and the inferior tear meniscus, which could accelerate its draining. Despite deeper studies on



the spatiotemporal dynamics of F6H8 and its distribution and removal from the ocular surface would be welcomed, existing literature on the precorneal residence of a F6H8 drop in an *ex vivo* model of porcine eye shows a rapid drop of 36% of the substance in the precorneal space during the first 10 min after its application. Interestingly, from that moment on, F6H8 elimination slowed down and 56% is still in the precorneal space 1 h after application (27), and even tends to accumulate in the corneal epithelium (27, 30).

The F6H8-induced cooling of the ocular surface was produced in parallel with transient increases in tearing and blinking. Considering the role of corneal cold-thermoreceptors on basal tear production and blinking (3, 4), it seems conceivable that the changes in the activity of this population of trigeminal sensory neurons would be signaling the F6H8-induced CST reduction, thus inducing reflex changes in tearing and blinking. Since the classical observations by Mapstone (31), both blinking and tearing are considered as physiologic reflex responses that counteract the ocular surface cooling produced during eye opening. In our experiments we found prominent and long-lasting effects of F6H8 in blinking frequency. We also confirmed that along a blinking cycle, the eye is closed about 6% of the time and open about 94% of the time, a long period when the cornea is losing heat to the environment. Blinking may counteract CST cooling by three mechanisms: (a) passive prevention of heat loss; (b) heat transfer from the eyelids to the ocular surface

during blink; and, (c) re-layering of the warm tear film over the cornea (31). F6H8 increased blinking rate and reduced IBI duration therefore reducing the time that the ocular surface is losing heat to the environment due to the cornea-air temperature gradient. In the same direction, a slight increase of the eye-closure time was observed, therefore favoring the heat exchange from the lids to the cornea. However, both processes were not enough to counteract the net cooling effect that is possibly related to the spreading of the compound over the whole tear film with each blink and the subsequent F6H8 evaporation. Increased blink and tearing rate are due to an increase in the TRPM8-dependent activity of cold thermoreceptor neurons, whose central axon projections have synapses with second order neurons of the trigeminal brainstem complex (32). The corneal nerve endings of these thermosensitive cold neurons are activated by cooling and tear hyperosmolarity (33), and also by the continuous oscillatory changes of temperature and wetness produced in the front of the eyes while they are open. Psychophysical experiments showed that a corneal cooling between 1 and 2°C is needed to evoke conscious sensations of cooling, while reducing the corneal temperature beyond these values elicits sensations of irritation (17, 25). The increased neural activity evoked in cold thermoreceptor neurons, especially in those belonging to the high background-low threshold subtype (HB-LT), by the small temperature and/or osmolarity changes produced during the interblink interval (expected to be around

0.5°C) is sufficient to evoke blink reflex (34), while more intense corneal cooling recruit the low background-high threshold (LB-HT) cold thermoreceptor endings, whose activation, together with that of nociceptive nerve endings, is claimed to evoke irritation and pain sensations (35). In the present experiments we found that F6H8 reduces the corneal temperature  $\sim 1^\circ\text{C}$  and also induces a fast and intense further cooling of the corneal surface during the interblink interval, two times larger in F6H8-treated eyes than in untreated or saline-treated eyes. We propose that this corneal temperature drop produced by F6H8 increases the firing of HB-LT cold thermoreceptor nerve endings to a level enough to reflexively increase blinking rate and tear production, although not enough to evoke cooling sensations arising from the ocular surface. The absence of conscious sensations after F6H8 may be also explained by the higher tear film stability produced by the molecule (8, 11). The F6H8 layer formed over the tear film would reduce aqueous tear evaporation and prevents the local production of tear hyperosmolarity and drying spots that are leading to the activation of corneal nerve endings and development of ocular sensations of dryness and irritation (36).

In summary, we described here the unknown long-lasting cooling effect of F6H8 when applied topically onto the healthy ocular surface. This effect was paralleled by thermal homeostatic responses to protect the avascular ocular surface, such as the increase of tearing and blinking, both reflex responses driven by the TRPM8-mediated activation of corneal cold-thermoreceptors in response to ocular surface cooling. Besides this temperature reduction, F6H8 increases tear film stability and thickness, which limits the production of the local osmolarity changes underlying the genesis of ocular sensations. As a concluding remark, F6H8 instilled onto the eye reduces corneal surface temperature enough to increase tearing and blinking rate but not to evoke conscious sensations of ocular discomfort. The increased tear volume more frequently redistributed over the ocular surface helps to prevent corneal dryness and contributes to the clinical benefits of F6H8 in DED and other ocular surface pathologies.

## REFERENCES

- Pflugfelder SC, de Paiva CS. The pathophysiology of dry eye disease: what we know and future directions for research. *Ophthalmology*. (2017) 124:S4–13. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.07.010
- McMonnies CW. How blink anomalies can contribute to post-LASIK neurotrophic epitheliopathy. *Optom Vis Sci*. (2015) 92:e241–7. doi: 10.1097/OPX.0000000000000567
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, Del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, et al. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med*. (2010) 16:1396–9. doi: 10.1038/nm.2264
- Quallo T, Vastani N, Horridge E, Gentry C, Parra A, Moss S, et al. TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nat Commun*. (2015) 6:7150. doi: 10.1038/ncomms8150
- Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arzteblatt Online*. (2015) 112:71–81. doi: 10.3238/arztebl.2015.0071
- Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II definition and classification report. *Ocul Surf*. (2017) 15:276–83. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.008

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Órgano Evaluador de Proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD-M and EV acquired and interpreted the data. EV and JG conceived and designed the work. AD-T and AA-M contributed to design the experiments. MCA and AA-M equally contributed to supervise the work. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was funded by the Spanish Agencia Estatal de Investigación and the European Regional Development Fund grants SAF2017-83674-C2-1-R and SAF2017-83674-C2-2-R, the Generalitat Valenciana Excellence Program grant PROMETEO/2018/114, Predoctoral fellowships ACIF/2019/054 from GV (MD-M) and FPU16/00283 from Spanish Ministry of Universities (EV), and PID2020-115934RB-I00/AEI/10.13039/501100011033.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to Carolina Luna for her expert technical assistance.

- Alves M, Fonseca EC, Alves ME, Malki LT, Arruda GV, Reinach PS, et al. Dry eye disease treatment: a systematic review of published trials and a critical appraisal of therapeutic strategies. *Ocul Surf*. (2013) 11:181–92. doi: 10.1016/j.jtos.2013.02.002
- Steven P, Scherer D, Krösser S, Beckert M, Cursiefen C, Kaercher T. Semifluorinated alkane eye drops for treatment of dry eye disease—a prospective, multicenter noninterventional study. *J Ocul Pharmacol Ther*. (2015) 31:498–503. doi: 10.1089/jop.2015.0048
- Zeana D, Becker J, Kuckelkorn R, Kirchhof B. Perfluorohexyloctane as a long-term vitreous tamponade in the experimental animal. Experimental perfluorohexyloctane substitution. *Int Ophthalmol*. (1999) 23:17–24. doi: 10.1023/A:1006444615412
- Meinert H, Roy T. Semifluorinated alkanes—a new class of compounds with outstanding properties for use in ophthalmology. *Eur J Ophthalmol*. (2000) 10:189–97. doi: 10.1177/112067210001000301
- Steven P, Augustin AJ, Geerling G, Kaercher T, Kretz F, Kunert K, et al. Semifluorinated alkane eye drops for treatment of dry eye disease due to meibomian gland disease. *J Ocul Pharmacol Ther*. (2017) 33:678–85. doi: 10.1089/jop.2017.0042
- Agarwal P, Khun D, Krösser S, Eickhoff K, Wells FS, Willmott GR, et al. Preclinical studies evaluating the effect of semifluorinated alkanes

- on ocular surface and tear fluid dynamics. *Ocul Surf.* (2019) 17:241–9. doi: 10.1016/j.jtos.2019.02.010
13. Schmidl D, Bata AM, Szegei S, Aranha Dos Santos V, Stegmann H, Fondi K, et al. Influence of perfluorohexyloctane eye drops on tear film thickness in patients with mild to moderate dry eye disease: a randomized controlled clinical trial. *J Ocul Pharmacol Ther.* (2020) 36:154–61. doi: 10.1089/jop.2019.0092
  14. Mateo Orobía AJ, Blasco-Martinez A, Rodríguez-Ausín P, Pablo Júlvez LE, Güemes Villahoz N, del Prado Sanz E, et al. Effects and safety of perfluorohexyloctane on the eye surface and corneal endothelium. *Arch Soc Española Oftalmol.* (2020) 95:538–43. doi: 10.1016/j.oftale.2020.05.015
  15. Acosta MC, Luna C, Quirce S, Gallar J. Infrared thermography of the ocular surface of tear-deficient eyes treated with perfluorohexyloctane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2017) 58:465.
  16. Rodríguez-Torres LA, Porras-Machado DJ, Villegas-Guzmán AE, Molina-Zambrano JA. Analysis of incidence of ocular surface disease index with objective tests and treatment for dry eye. *Arch Soc Española Oftalmol.* (2010) 85:70–75. doi: 10.1016/S2173-5794(10)70015-3
  17. Acosta MC, Tan ME, Belmonte C, Gallar J. Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2001) 42:2063–7.
  18. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* (2002) 133:181–6. doi: 10.1016/S0002-9394(01)01365-4
  19. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, biomedical sciences. *Behav Res Meth.* (2007) 39:175–91. doi: 10.3758/BF03193146
  20. Lam PY, Shih KC, Fong PY, Chan TCY, Ng ALK, Jhanji V, et al. A review on evidence-based treatments for meibomian gland dysfunction. *Eye Contact Lens.* (2020) 46:3–16. doi: 10.1097/ICL.0000000000000680
  21. Wong S, Murphy PJ, Jones L. Tear evaporation rates: what does the literature tell us? *Contact Lens Anterior Eye.* (2018) 41:297–306. doi: 10.1016/j.clae.2017.12.003
  22. Gaines GL. Surface activity of semifluorinated alkanes: F(CF<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>H. *Langmuir.* (1991) 7:3054–6. doi: 10.1021/la00060a025
  23. Broniatowski M, Dynarowicz-Latka P. Semifluorinated alkanes - primitive surfactants of fascinating properties. *Adv Colloid Interface Sci.* (2008) 138:63–83. doi: 10.1016/j.cis.2007.11.002
  24. Chachaj-Brekiesz A, Wnetrzak A, Lipiec E, Kobierski J, Dynarowicz-Latka P. Perfluorohexyloctane (F6H8) as a delivery agent for cyclosporine A in dry eye syndrome therapy – langmuir monolayer study complemented with infrared nanospectroscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* (2019) 184:110564. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110564
  25. 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. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00511.x
  26. Acosta MC, Peral A, Luna C, Pintor J, Belmonte C, Gallar J. Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2004) 45:2333–6. doi: 10.1167/iovs.03-1366
  27. Agarwal P, Scherer D, Günther B, Rupenthal ID. Semifluorinated alkane based systems for enhanced corneal penetration of poorly soluble drugs. *Int J Pharm.* (2018) 538:119–29. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.019
  28. Mochizuki H, Yamada M, Hatou S, Tsubota K. Turnover rate of tear-film lipid layer determined by fluorophotometry. *Br J Ophthalmol.* (2009) 93:1535–8. doi: 10.1136/bjo.2008.156828
  29. Mackiewicz J, Maaijwee K, Lüke C, Kociok N, Hiebl W, Meinert H, et al. Effect of gravity in long-term vitreous tamponade: *In vivo* investigation using perfluorocarbon liquids and semi-fluorinated alkanes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* (2007) 245:665–75. doi: 10.1007/s00417-006-0414-3
  30. Agarwal P, Craig JP, Krösser S, Eickhoff K, Swift S, Rupenthal ID. Topical semifluorinated alkane-based azithromycin suspension for the management of ocular infections. *Eur J Pharm Biopharm.* (2019a) 142:83–91. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.06.008
  31. Mapstone R. Determinants of corneal temperature. *Br J Ophthalmol.* (1968) 52:729–41. doi: 10.1136/bjo.52.10.729
  32. Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, et al. TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf.* (2017) 15:404–37. doi: 10.1016/j.jtos.2017.05.002
  33. 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. doi: 10.1016/j.pain.2014.04.025
  34. Merino ML, Belmonte J, Acosta M, del C, Belmonte C, Gallar J. Ocular surface temperature in sjögren's syndrome. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* (2018) 59:148.
  35. Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J, Gallar J. What causes eye pain? *Curr Ophthalmol Rep.* (2015) 3:111–21. doi: 10.1007/s40135-015-0073-9
  36. Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, et al. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* (2009) 50:3671–9. doi: 10.1167/iovs.08-2689

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Delicado-Miralles, Velasco, Díaz-Tahoces, Gallar, Acosta and Aracil-Marco. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.