

**MODULACIÓN FOTOFARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DE LAS
TERMINACIONES NERVIOSAS DE FRÍO CORNEALES MEDIANTE UN
COMPUESTO FOTOCRÓMICO BLOQUEANTE DE CANALES IÓNICOS**

Doctorando:

David Ares Suárez

Director:

Dr. Víctor Manuel Meseguer Viguera

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Programa de Doctorado en Neurociencias

Instituto de Neurociencias de Alicante

- 2025 -



«Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias. No todo es matemáticas y no todo es simple lógica, también se trata de un poco de belleza y poesía».

María Montessori.





San Juan de Alicante,

La presente Tesis Doctoral, titulada “Modulación fotofarmacológica de la actividad de las terminaciones nerviosas de frío corneales mediante un compuesto fotocromico bloqueante de canales iónicos” se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de la siguiente publicación:

David Ares-Suárez, Almudena Iñigo-Portugués, Enrique Velasco, Susana Quirce, Fernando Aleixandre-Carrera, Ariadna Díaz-Tahoces, M. Carmen Acosta, Wan-Chen Lin, Richard H. Kramer, Carlos Belmonte, Juana Gallar & Victor Meseguer.

Optochemical modulation of corneal cold nerve terminal impulse activity with a photochromic ion channel blocker. *British Journal of Pharmacology*, 2025.

<https://doi.org/10.1111/bph.70189>

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido AUTORIZADO bajo el Código de Investigación Responsable (COIR) **ADH.NEU.VMV.DAS.23**. Esta autorización se obtuvo por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación, Vicerrectorado de investigación, de la Universidad Miguel de Elche para la realización del trabajo titulado “Modulación optoquímica de la actividad sensorial de las terminaciones nerviosas de la córnea del cobaya”, dirigida por el Dr. Víctor Manuel Meseguer Viguera.



El Dr. D. Víctor Manuel Meseguer Viguera, director de la presente tesis doctoral,

INFORMA:

Que D. David Ares Suárez ha realizado bajo mi supervisión el trabajo titulado “Modulación fotofarmacológica de la actividad de las terminaciones nerviosas de frío corneales mediante un compuesto fotocromático bloqueante de canales iónicos” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al 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 en San Juan de Alicante, a los efectos oportunos, a fecha de septiembre de 2025.

Director de la tesis:

Dr. D. Víctor. M. Meseguer Viguera.





Dra. Dña. M^a Cruz Morenilla Palao, Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

INFORMA:

Que D. David Ares Suárez ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “Modulación fotofarmacológica de la actividad de las terminaciones nerviosas de frío corneales mediante un compuesto fotocromático bloqueante de canales iónicos” 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 con los objetivos previstos de forma satisfactoria para la defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante, a fecha de septiembre de 2025.

Coordinadora del Programa de Doctorado de Neurociencias:

Dra. Dña. M^a Cruz Morenilla Palao.





Para la realización de la presente tesis doctoral, D. David Ares Suárez ha disfrutado de un contrato competitivo para la formación de doctores, con referencia: **ISABIAL 2022/0048** con cargo al Proyecto de Investigación UGP-21-217(CIPROM/2021/048) Título: “Conundrum on research in corneal nerve regeneration - CORNER2” concedido mediante la RESOLUCIÓN de la Dirección General de Ciencia e Investigación de la Generalitat Valenciana, por la que se conceden subvenciones del programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia – PROMETEO 2022.

Asimismo, ha disfrutado de un contrato asociado al Proyecto RTI2018-100994-A-I00 Título: “Modulación optoquímica de la actividad de las terminaciones nerviosas sensoriales de la córnea del ratón”. Entidad financiadora: MCI, AEI. Plan Nacional de I+D+i-Retos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. La Córnea: anatomía, fisiología e inervación sensorial.....	16
1.2. Bases moleculares de la transducción sensorial en la superficie ocular y el papel de los termorreceptores de frío, mecano-nociceptores, receptores polimodales y pruriceptores.	20
1.2.1. <i>Termorreceptores de frío.</i>	20
1.2.2. Mecanonociceptores.	21
1.2.3. <i>Receptores polimodales.</i>	21
1.2.4. Pruriceptores.	22
1.3. Bases moleculares de la excitabilidad de las fibras nerviosas en la córnea y el papel de canales dependientes de voltaje.	24
1.3.1. <i>Canales iónicos de potasio dependientes de voltaje.</i>	24
1.3.2. <i>Canales iónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos.</i>	25
1.4. El ojo seco y la disfunción de los canales iónicos expresados por los termorreceptores de frío.	26
1.5. Fotomodulación de la actividad biológica.	28
1.5.1. <i>Optogenética.</i>	28
1.5.2. <i>Optofarmacología.</i>	29
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1. Aspectos éticos y animales de experimentación.....	38
3.2. Inducción del modelo de deficiencia lagrimal crónica en cobaya.	38
3.3. Registro electrofisiológico de las terminaciones nerviosas corneales de frío en cobaya.....	39
3.4. Estimulación lumínica del compuesto DENAQ.	42
3.5. Reactivos químicos.....	44
3.6. Inmunohistoquímica.	45
3.7. Registro de la actividad electromiográfica del músculo orbicular del ojo (OOemg) de rata.....	46
3.8. Análisis estadístico.....	47
4. DISCUSIÓN.....	47
5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	53
5.1. Perspectivas futuras.....	54
6. BIBLIOGRAFÍA.....	55

7. ANEXO. 65
8. AGRADECIMIENTOS. 91



RESUMEN.

Antecedentes y Propósito.

La organización funcional de las terminaciones nerviosas de frío de la córnea, estructuras críticas para mantener la integridad de la superficie ocular, sigue siendo escasamente conocida. En este trabajo, se utilizó la molécula fotoisomerizable DENAQ para modular mediante el uso de luz, la actividad de las terminaciones nerviosas sensibles al frío en córneas control y con deficiencia lagrimal crónica. Además, se usó DENAQ para la regulación fotoquímica *in vivo* del reflejo de parpadeo inducido mediante estímulos térmicos.

Enfoque Experimental.

Se registró extracelularmente la actividad de los impulsos de las terminaciones nerviosas de frío en córneas extirpadas de cobayas sanas y con deficiencia lagrimal, previamente incubadas con DENAQ. Se aplicaron pulsos de luz con una longitud de onda de 460 nm a las córneas perfundidas. Se realizó un análisis inmunohistoquímico en córneas de ratón para determinar la expresión de los receptores P2X2 y P2X3 en las terminales nerviosas de frío. El reflejo de parpadeo inducido térmicamente se evaluó mediante electromiografía del músculo orbicular del ojo (OOemg) en ratas anestesiadas después de la administración tópica de DENAQ en el ojo, bajo condiciones de luz azul y oscuridad.

Resultados Clave.

La exposición a la luz azul redujo notablemente la actividad espontánea de las terminaciones nerviosas de frío, tanto las de animales sanos como las de animales con deficiencia lagrimal, que habían sido previamente incubadas con DENAQ, mientras que las respuestas evocadas por el frío no se vieron afectadas. La incubación previa al registro de córneas extirpadas con DENAQ, junto con antagonistas farmacológicos del receptor P2X, previno la fotorreducción de la actividad espontánea de la terminación nerviosa de frío mediada por DENAQ. Se detectó la expresión inmunohistoquímica de receptores P2X2 y P2X3 en terminaciones de frío en la córnea del ratón. Además, la luz azul aumentó el reflejo de parpadeo evocado por el frío en ojos tratados previamente con DENAQ.

Conclusiones e Implicaciones.

El DENAQ entra en las terminaciones nerviosas sensoriales de frío del cobaya, principalmente a través de los canales P2X en las córneas extirpadas. Posteriormente, el DENAQ disminuye la actividad espontánea de los impulsos de las terminaciones nerviosas tras la irradiación con luz, al modular la actividad de los canales Kv. Además, el reflejo de parpadeo evocado por el frío se modula con la luz en ojos tratados con DENAQ. Los compuestos fotoconmutables como el DENAQ, podrían suponer nuevos tratamientos potenciales para el malestar y el dolor ocular en la enfermedad del ojo seco.

ABSTRACT.

Background and Purpose.

The functional organization of corneal cold nerve endings, critical structures in maintaining the ocular surface, remains poorly understood. Here, the photoisomerizable small molecule DENAQ was used to photomodulate cold-sensing nerve terminals' activity in control and chronic tear-deficient corneas. Furthermore, DENAQ was used for *in vivo* photochemical regulation of the thermally induced blink reflex.

Experimental approach.

Extracellular nerve terminal impulse activity was recorded on cold terminals in excised corneas of naïve and tear-deficient guinea pigs, pre-incubated with DENAQ. Pulses of light at a wavelength of 460 nm were delivered to the perfused corneas. An immunohistochemical analysis was performed on mouse corneas to determine the expression of P2X2 and P2X3 receptors in cold nerve terminals. The thermally induced blink reflex was assessed using orbicularis oculi electromyography (OOemg) in anesthetized rats after topical administration of DENAQ to the eye, under blue light and darkness conditions.

Key results.

Exposure to blue light robustly reduced spontaneous activity of both naïve and tear-deficient cold nerve terminals pre-incubated with DENAQ, while cold-evoked responses remained unaffected. Pre-incubation of excised corneas with DENAQ, along with pharmacological P2X receptor antagonists, prevented the DENAQ-mediated photoreduction of the cold nerve terminal spontaneous activity. P2X2 and P2X3 receptor expression was immunohistochemically detected in cold terminals in the mouse cornea. In addition, blue light increased cold-evoked reflex blink in eyes pretreated with DENAQ.

Conclusions and implications.

DENAQ enters guinea-pig cold sensory nerve endings primarily through P2X channels in excised corneas. Subsequently, DENAQ decreases the spontaneous nerve terminal impulse activity upon light irradiation by modulating Kv channel activity. Furthermore, the cold-evoked blink reflex is modulated by light in DENAQ-treated eyes. Chemical photoswitches like DENAQ might be potential new treatments for ocular discomfort and pain in dry eye disease.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La Córnea: anatomía, fisiología e inervación sensorial.

La córnea, el tejido más externo del ojo, se sitúa por delante de la cámara anterior, que alberga el humor acuoso, el iris y la pupila. Su transparencia, una de sus características más distintivas, es fundamental para su función principal, la refracción de la luz. Aproximadamente dos tercios del poder refractivo total del ojo humano se atribuyen a la córnea, un proceso esencial para que la luz se enfoque en la mácula retiniana, permitiendo así la visión (Kaufman & Alm, 2011).

Anatómicamente, la córnea es un tejido avascular, lo que contribuye a su transparencia y la distingue de la esclera circundante (Zeiss et al., 2017). La córnea está constituida por cinco capas, cada una con una estructura y función específicas que garantizan la integridad del tejido y su papel en la visión (Figura 1) (DelMonte & Kim, 2011; JJ Ivanusic et al., 2013; Zeiss et al., 2017). La capa más externa es el epitelio, un tejido epitelial estratificado no queratinizado de 5-7 células de espesor. Este epitelio está profusamente inervado y es fundamental para la protección del ojo, actuando como una barrera contra patógenos y agentes externos. Bajo el epitelio se encuentra la membrana de Bowman, en humanos, también conocida como lámina basal en ratón. Se trata de una capa delgada y acelular de colágeno, que confiere resistencia al tejido. El estroma, la capa más gruesa, constituye aproximadamente el 90% del grosor total de la córnea. Está compuesto por una matriz extracelular de fibras de colágeno y células especializadas llamadas queratocitos. La disposición regular de las fibrillas de colágeno en el estroma es crucial para mantener la transparencia corneal. Por debajo del estroma se encuentra la membrana de Descemet. Finalmente, la capa más interna es el endotelio, una única capa de células hexagonales que regulan el contenido hídrico del estroma, bombeando iones y agua hacia el humor acuoso para mantener la transparencia (DelMonte & Kim, 2011; Frutos-rincón et al., 2022; JJ Ivanusic et al., 2013; Zeiss et al., 2017).

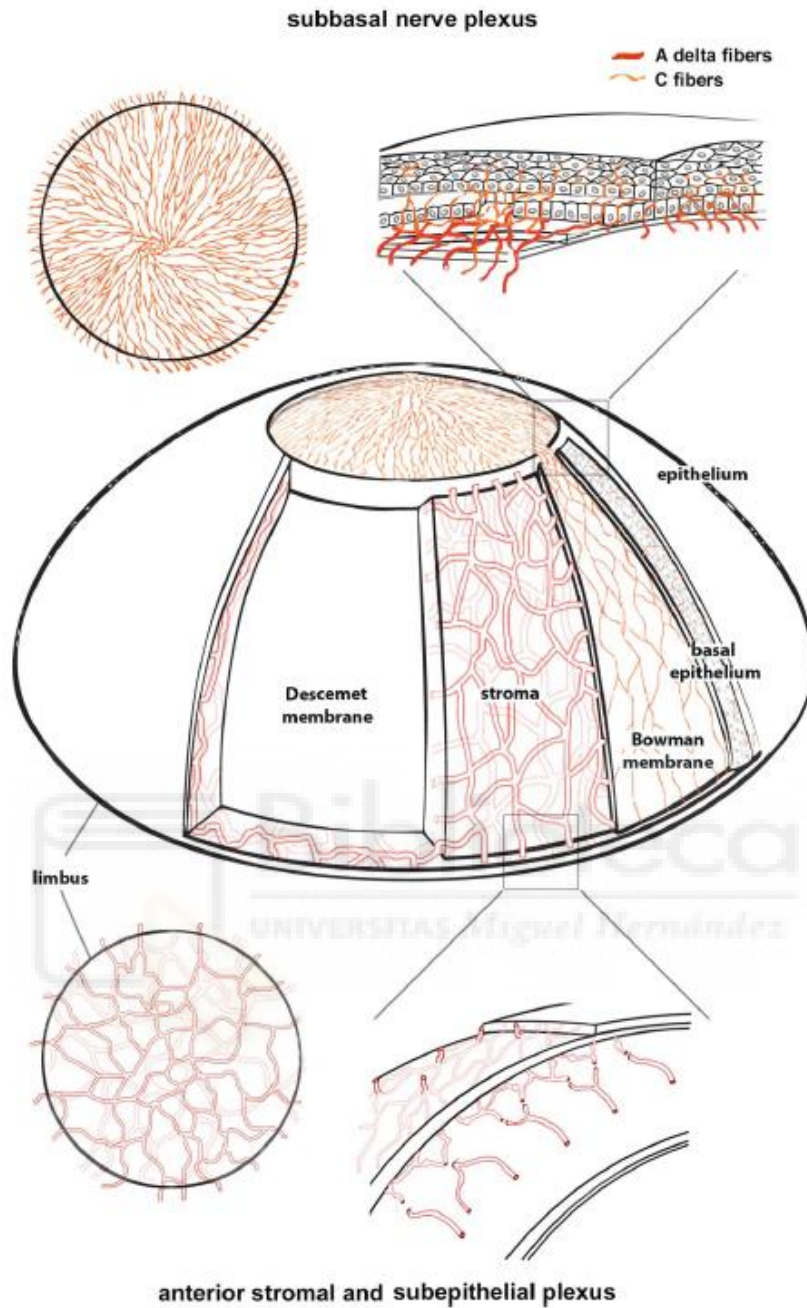


Figura 1. Organización anatómica y distribución de fibras nerviosas en la córnea. Se muestra un esquema de las distintas capas corneales (epitelio, membrana de Bowman, estroma y membrana de Descemet), destacando la abundante inervación que penetra desde el limbo hacia el estroma y asciende hacia la superficie epitelial. En el epitelio basal, las terminaciones nerviosas se ramifican y forman una densa red subbasal que se proyecta hacia las capas superficiales. Se incluyen ampliaciones que ilustran la disposición radial de las fibras en la córnea central, el entramado nervioso en el limbo y la penetración de fibras hacia el epitelio, reflejando la compleja organización del plexo nervioso corneal. Adaptado de Lum et al., 2019.

La córnea no solamente actúa como una barrera protectora para los componentes internos del globo ocular, sino que también alberga una inervación somatosensorial excepcionalmente densa y compleja. Esta profusa inervación es la responsable de la transducción de estímulos fisicoquímicos externos en impulsos eléctricos, un proceso fundamental para la generación de las sensaciones del ambiente y el mantenimiento de la integridad de la superficie ocular (Belmonte, Acosta, et al., 2004; Kaufman & Alm, 2011; Shaheen et al., 2014).

La base de la sensibilidad corneal reside en las neuronas somatosensoriales de primer orden, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el ganglio del trigémino (GT), ubicado en la base del cráneo (Figura 2) (Kaufman & Alm, 2011). Estas neuronas pseudounipolares extienden un axón con dos ramas a través de la rama oftálmica (V1) del nervio trigémino (V par craneal). Una de las ramas sigue un recorrido centrífugo hacia la superficie ocular, formando una red nerviosa en el estroma, el plexo nervioso subepitelial. Las fibras más finas de este plexo penetran la membrana de Bowman para formar el plexo nervioso subbasal en el epitelio, organizándose en un patrón de espiral convergente hacia el centro corneal. Finalmente, estas fibras forman las terminaciones nerviosas en la superficie ocular, clasificadas morfológicamente como simples, ramificadas o complejas (Alamri et al., 2018; Frutos-rincón et al., 2022; Ivanusic et al., 2013).

La otra rama del axón sigue un trayecto centrípeto, estableciendo una sinapsis en los núcleos caudalis e interpolaris del núcleo trigeminal en el tronco encefálico (Figura 2). Esta vía se extiende a otras áreas del sistema nervioso central, como el tálamo y el córtex somatosensorial primario, permitiendo el procesamiento consciente de las sensaciones. Además de esta inervación somatosensorial, la córnea cuenta con una inervación autónoma proveniente de los sistemas simpático y parasimpático, que regulan funciones como el flujo sanguíneo, la producción lagrimal y la sensibilidad corneal, contribuyendo indirectamente a la percepción del dolor y la respuesta a estímulos (Guerrero-Moreno et al., 2020; Meng & Kurose, 2013).

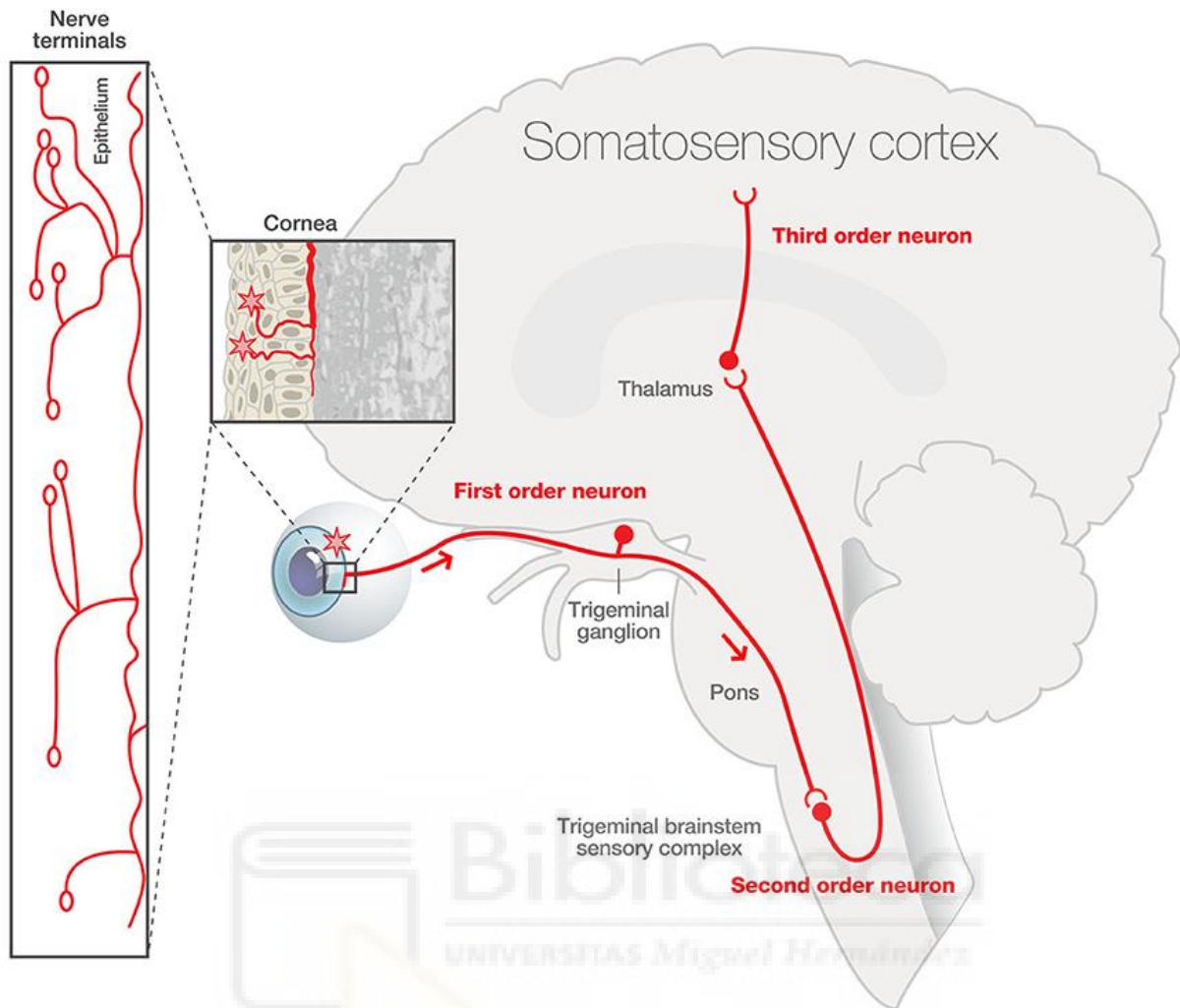


Figura 2. Vías neuronales de la sensibilidad corneal. Las terminaciones nerviosas libres ubicadas en el epitelio corneal detectan estímulos químicos, térmicos o mecánicos, transmitiendo la señal a través de las fibras sensoriales de primer orden que hacen sinapsis en el ganglio trigeminal. Desde allí, la información se transmite hacia el complejo sensorial del tronco encefálico trigeminal, donde se integra y es retransmitida por las neuronas de segundo orden hacia el tálamo. Finalmente, las neuronas de tercer orden transmiten la señal hacia la corteza somatosensorial, donde se genera la percepción consciente del estímulo. Adaptado de Park et al., 2025.

Las fibras nerviosas terminales de la córnea se clasifican funcionalmente según la velocidad de conducción de sus potenciales de acción (Figura 1). Las fibras A δ , mielinizadas y con una velocidad de conducción rápida (3-15 m/s), constituyen aproximadamente el 20% de la inervación total y son cruciales para la detección de estímulos nocivos agudos, como los mecánicos (presión). En contraste, las fibras de tipo C, amielínicas y con una velocidad de conducción más lenta (< 2 m/s), representan el 80% de la inervación y están implicadas en el desarrollo de la inflamación y la

sensibilización periférica. La ausencia de mielina en la mayoría de estas fibras es un factor clave para mantener la transparencia corneal. La interacción neuroglial, a través de las células de Schwann no mielinizantes, también desempeña un papel en la homeostasis neuronal, el trofismo y la regeneración tisular (Abdo et al., 2019; Bargagna-Mohan et al., 2021; Mirmoeini et al., 2023; Ojeda-Alonso et al., 2024; Rinwa et al., 2021).

1.2. Bases moleculares de la transducción sensorial en la superficie ocular y el papel de los termorreceptores de frío, mecanonociceptores, receptores polimodales y pruriceptores.

Las terminaciones nerviosas corneales están dotadas de una variedad de canales iónicos transductores que les permiten detectar estímulos físicos y químicos. Entre estos, se encuentran los canales iónicos del Potencial Receptor Transitorio (TRPs), los canales iónicos sensibles a los ácidos (ASICs) y el canal iónico Piezo 2. La activación de estos canales iónicos conduce a la entrada de cationes al interior de la neurona, la despolarización de la membrana plasmática y la generación de un potencial generador. Además, la excitabilidad de estas terminaciones está modulada por otros canales iónicos activados por voltaje y ligando, como los canales iónicos de sodio (Navs), de potasio (Kvs), de calcio (VGCCs) y los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos hiperpolarizados (HCN), que en conjunto regulan la formación y propagación de los potenciales de acción (Belmonte et al., 2015; Matzner & Devor, 1994).

Desde el punto de vista de su función, las terminaciones nerviosas que inervan la superficie ocular se han clasificado en termorreceptores de frío, mecanonociceptores, receptores polimodales y pruriceptores (Figura 3).

1.2.1. Termorreceptores de frío.

Los termorreceptores de frío corneales representan un 10-20% de la inervación corneal (Piña et al., 2019) y su principal función es la transducción sensorial del enfriamiento de la superficie ocular (Figura 3) (Belmonte, Aracil, et al., 2004; Kaufman & Alm, 2011; Palchevskiy et al., 2023). La detección de este descenso de temperatura depende en gran medida de la expresión del receptor ionotrópico TRPM8 (transient receptor potential cation channel subfamily M member 8). Este canal iónico, un miembro de la superfamilia de los canales iónicos TRP, se activa por el descenso de la temperatura y cambios en la osmolaridad en la superficie ocular. Estos estímulos

ocurren de manera natural en ambientes secos debido a la evaporación de las lágrimas (González-González et al., 2017; Parra et al., 2010, 2014). Los termorreceptores de frío presentan una actividad espontánea (conocida como actividad basal) a temperaturas fisiológicas que aumenta con el enfriamiento. Su actividad se ha relacionado con la regulación refleja del flujo lagrimal y la tasa de parpadeo (Parra et al., 2010; Quallo et al., 2015).

Desde un punto de vista electrofisiológico, se han descrito dos subtipos de termorreceptores de frío (Figura 3) (Acosta et al., 2014; Guerrero-Moreno et al., 2020; Parra et al., 2010; Piña et al., 2019), los de umbral alto y actividad basal baja (LB-HTCs), que requieren de mayores reducciones de temperatura para activarse y se asocian a la percepción de sequedad y dolor nociceptivo, y los de umbral bajo y actividad basal alta (HB-LTCs), que son más sensibles a pequeños cambios de temperatura y están relacionados con funciones reflejas como el parpadeo y el lagrimeo basales. Esta diferenciación funcional parece estar ligada a la expresión diferencial de canales iónicos, como TRPM8, Kv1, o TRPV1 (Guerrero-Moreno et al., 2020).

1.2.2. Mecanonociceptores.

Son terminaciones nerviosas altamente especializadas en la detección de estímulos mecánicos de alta intensidad (tacto y presión intensos) (Figura 3). Suponen alrededor de un 15-20% del total de los receptores corneales y responden exclusivamente a estímulos mecánicos nocivos, pero no a cambios de temperatura o irritantes químicos (Kaufman & Alm, 2011). Expresan una variedad de canales iónicos, incluyendo el canal iónico Piezo 2, que son cruciales para la transducción de la energía mecánica en señales eléctricas. Su activación genera un reflejo de parpadeo y la percepción de dolor (Belmonte, Acosta, et al., 2004; Belmonte, Aracil, et al., 2004).

1.2.3. Receptores polimodales.

Los receptores polimodales constituyen la mayoría de las terminaciones nerviosas corneales (alrededor del 60 %) (Figura 3). Su nombre deriva de su capacidad para responder a distintos estímulos nocivos, incluyendo mecánicos de alta intensidad, químicos (como ácidos o irritantes) y térmicos (frío o calor intensos). La transducción sensorial de estos estímulos depende de la expresión de distintos canales iónicos, como TRPV1 (que se activa con calor y compuestos químicos como la capsaicina), TRPA1 (sensible al frío intenso, compuestos químicos irritantes y

estrés mecánico), y ASICs (canales sensibles a los ácidos) (Figura 3). La activación de estos receptores polimodales está asociada con la sensación de dolor y con la respuesta inflamatoria (Belmonte, Acosta, et al., 2004; González-González et al., 2017).

Cabe destacar que la activación repetida de los canales iónicos P2X contribuye a la sensibilización periférica, lo que puede resultar en hiperalgesia y alodinia, produciéndose dolor ante estímulos que normalmente no lo causan (Belmonte et al., 2015; Guerrero-Moreno et al., 2020). Sin embargo, los P2X no han sido identificados funcionalmente en los receptores polimodales corneales (Matthews et al., 1997). Futuras investigaciones serán necesarias para dilucidar un posible papel de los canales iónicos P2X en la nocicepción corneal.

1.2.4. Pruriceptores.

Algunas terminaciones nerviosas de la conjuntiva expresan el receptor acoplado a proteína G relacionado con MAS, miembro D (Mrgprd) y el receptor acoplado a proteína G relacionado con MAS, miembro A3 (MrgprA3). Estos son marcadores característicos de las terminaciones nerviosas pruriceptoras responsables de la inducción de la sensación de prurito (picazón) (Galor et al.2025).

Además de los receptores de la familia Mrgpr, en términos generales, la transducción de la señal en los pruriceptores está íntimamente ligada a los receptores purinérgicos. En este sentido, se ha descrito que los receptores P2X3 se expresan funcionalmente en las terminaciones nerviosas MrgprA3 de la piel. El receptor P2X3 es activado por la liberación de adenosín trifosfato (ATP) extracelular, que ocurre en el contexto de daño celular o inflamación, y activaría el P2X3 en las terminaciones nerviosas. Por lo tanto, el P2X3 podría ser un mediador en la señalización neurogénica que subyace al prurito crónico y patológico (Shiratori-Hayashi et al., 2019). No obstante, la contribución específica del receptor P2X3 a la actividad de los pruriceptores en la conjuntiva aún no se ha determinado y requiere investigación.

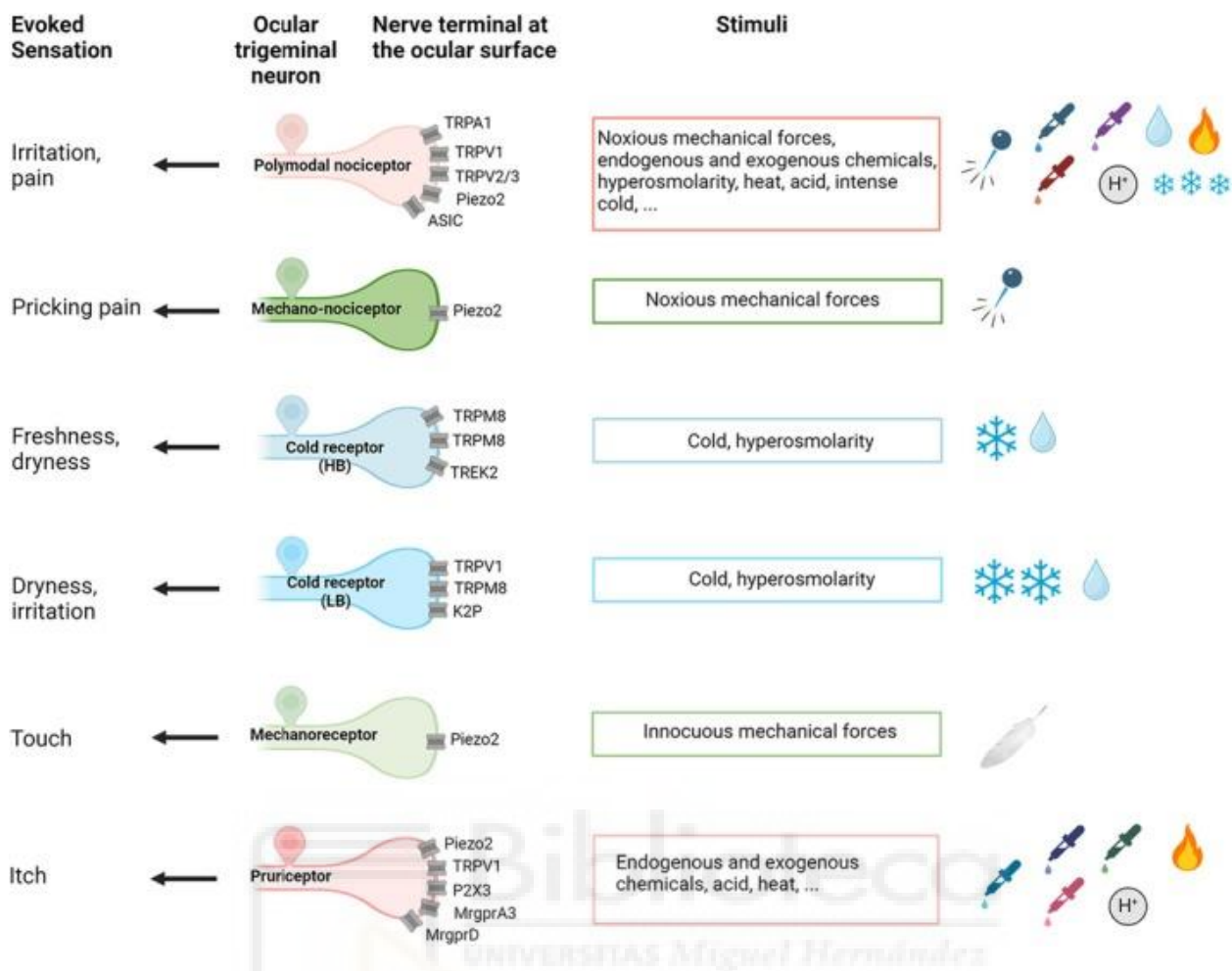


Figura 3. Representación de los diferentes tipos de neuronas trigeminales oculares, sus terminaciones nerviosas en la superficie ocular, los receptores iónicos asociados y los estímulos que evocan sensaciones específicas. Los nociceptores polimodales (en rosa) median la irritación y el dolor ante fuerzas mecánicas nocivas, compuestos químicos endógenos o exógenos, hiperosmolaridad, calor, ácido o frío intenso, a través de canales iónicos como TRPA1, TRPV1, TRPV2/3, Piezo2 y ASIC. Los mecano-nociceptores (en verde) detectan fuerzas mecánicas nocivas mediante Piezo2, generando dolor punzante. La estimulación de los termorreceptores de frío tipo HB (en azul claro) produce sensación de frescor y sequedad inducidos por frío o hiperosmolaridad, principalmente a través de TRPM8 y TREK2. Los termorreceptores de frío de tipo LB (en azul oscuro) responden también al frío y la hiperosmolaridad, mediando la sensación de sequedad e irritación, con participación de TRPV1, TRPM8 y K2P. Los pruriceptores (en rojo) median la sensación de picor ante estímulos químicos endógenos o exógenos, ácido o calor, a través de los canales iónicos Piezo2, TRPV1, Mrgpr o P2X3. Adaptado de Galor et al., 2025.

1.3. Bases moleculares de la excitabilidad de las fibras nerviosas en la córnea y el papel de canales dependientes de voltaje.

1.3.1. Canales iónicos de potasio dependientes de voltaje.

Los canales iónicos de potasio forman parte de una extensa y diversa familia de canales iónicos que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad neuronal y muscular. Se han descrito varias familias según la cantidad de dominios transmembrana, sus mecanismos de activación y su comportamiento fisiológico (Kuang et al., 2015); (1) canales de potasio activados por voltaje (Kv) y activados por Ca^{2+} (KCa), (2) los canales de potasio de “fuga” o “rectificadores de entrada” (Kir), (3) canales de potasio de dos dominios en tándem (K2P también conocidos como TASK, TREK, entre otros) (Aronson, 1992; Bryant, 1995; Kuang et al., 2015; Miller, 2000; Stillwell, 2013) y (4) canales iónicos activados por hiperpolarización (HCN).

Aunque todos estos canales iónicos comparten la función general de transportar iones de potasio, sus estructuras y mecanismos evolutivamente distintos, los han adaptado para cumplir funciones específicas en diferentes tejidos y contextos fisiológicos (Aronson, 1992; Kuang et al., 2015; Lai & Jan, 2006). En neuronas sensoriales primarias, se ha descrito la expresión de canales iónicos Kv (Lai & Jan, 2006). En este contexto, Kv3.1 presenta una expresión discreta, mientras que Kv2.1 muestra una expresión marcadamente elevada (Stewart et al., 2024; Tsantoulas et al., 2014; Zheng et al., 2019). En el caso de Kv4.2, aunque algunos estudios reportan una expresión elevada (Zheng et al., 2019), los resultados son inconsistentes (Na Phuket & Covarrubias, 2009). En la misma línea, se ha demostrado la presencia de Kv7.2 y Kv7.3 en terminales sensoriales nociceptivos y de frío de la córnea (Vetter et al., 2013), cuya pérdida genera alodinia mecánica e hiperalgesia térmica (King et al., 2014). Cabe destacar que, tras la lesión nerviosa, se produce una regulación a la baja de Kv2, lo que induce un fenotipo hiperexcitable y el desarrollo de dolor crónico (Tsantoulas et al., 2014).

Desde una perspectiva mecanística, los canales iónicos Kv se activan en respuesta a oscilaciones del voltaje de membrana, inducidos por otros canales iónicos como, los TRPs u otros canales iónicos dependientes de voltaje, como los Nav. Su contribución es permitir la salida de iones K^+ , facilitando la fase de repolarización rápida de la membrana durante el potencial de acción. Este

proceso es esencial para restaurar el equilibrio electrolítico y mantener la homeostasis eléctrica necesaria para la correcta transmisión de los potenciales de acción y los impulsos eléctricos (Armstrong & Hille, 1998).

Se han identificado diferentes antagonistas para los canales iónicos Kv como tetraetilamonio (TEA), (Mourot et al., 2011), 4-aminopiridina (4-AP), XE991, α -dendrotoxina, factores de crecimiento, citocinas o amonios cuaternarios (King et al., 2014; Mourot et al., 2013; Vetter et al., 2013). El bloqueo de los Kv implica una alteración de la excitabilidad de la neurona. Esta alteración se traduce en una prolongación del potencial de acción, y un aumento de la frecuencia de disparo. El bloqueo del flujo de K^+ hace que la célula entre en un estado de hiperexcitabilidad. Dicho bloqueo prolonga la actividad de la célula, lo que a su vez puede interferir con la función de otros canales iónicos dependientes de voltaje, como los Nav o HCN, alterando de manera significativa la fisiología neuronal y el comportamiento eléctrico general de la membrana (Martynyuk et al., 2016).

1.3.2. *Canales* iónicos activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos.

Los canales iónicos HCN comprenden una superfamilia de canales iónicos con cuatro isoformas (HCN1-4), cuyas cinéticas de activación se vuelven progresivamente más lentas en subtipos de mayor numeración. Estos canales iónicos permiten el paso de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática (Lai & Jan, 2006), regulando la excitabilidad neuronal mediante la corriente I_h . Se han identificado los subtipos HCN1, HCN3 y HCN4 en neuronas sensoriales, donde el HCN1 se observa en los ganglios raquídeos (Sartiani et al., 2017), el ganglio trigémino, y las fibras termorreceptoras de frío corneales (Orio et al., 2009). Las subunidades homoméricas HCN1 y la heteroméricas HCN1-2, presentes en las terminales sensoriales del frío, junto con HCN2, predominante en terminales nociceptivas (Lainez et al., 2019), participan en la regulación del patrón de disparo de las terminales nerviosas, ajustando su frecuencia y amplitud.

Los canales iónicos HCN se activan más lentamente en comparación con los Kv (Flynn & Zagotta, 2018; Ramentol et al., 2020). Esta diferencia en las cinéticas de activación influye en sus roles fisiológicos y en la temporización de las respuestas eléctricas en las células excitables.

También se ha demostrado que los canales iónicos HCN, mediante activación repetitiva de corrientes I_h en neuronas primarias, contribuyen en el procesamiento e instauración del dolor (Luo et al., 2007; Ramírez et al., 2018; Viana & Belmonte, 2008; Young et al., 2014). En la misma línea, se ha demostrado que en modelos neurodegenerativos se producen cambios de expresión de los canales iónicos HCN. De esta manera, se ha observado una reducción de HCN1, así como un aumento de HCN3 en la retina interna y de HCN4 en las dendritas, el soma y los axones de las células ganglionares de la retina (RGC) degeneradas (Tochitsky et al., 2016).

Los canales iónicos HCN son susceptibles a la modulación por nucleótidos cíclicos como el AMPc, que actúa como agonista principalmente para HCN2 y HCN4 (Lainez et al., 2019). Además, existen compuestos como ZD7288, Cs o cilobradina (también conocida como DK-AH 269) que inhiben su función (Kase & Imoto, 2012; Orio et al., 2009). Cabe destacar que el fotomodulador DENAQ puede bloquear la actividad de los canales iónicos HCN, lo que sugiere su potencial terapéutico en el tratamiento de trastornos relacionados con la disfunción de estos canales iónicos (Nikonov et al., 2022; Tochitsky et al., 2016).

1.4. El ojo seco y la disfunción de los canales iónicos expresados por los termorreceptores de frío.

La enfermedad de ojo seco se define como “una enfermedad multifactorial y sintomática, caracterizada por la alteración de la película lagrimal o de la superficie ocular, en la que la inestabilidad e hiperosmolaridad de la película lagrimal, la inflamación y el daño de la superficie ocular, y las anomalías neurosensoriales son factores etiológicos” (Wolffsohn et al., 2025).

Se trata de una entidad prevalente, especialmente en la población de edad avanzada y bajo condicionante hormonal (Stapleton et al., 2025). Esta enfermedad afecta entre un 7% y un 33% de la población general (Gayton, 2009). Sus síntomas principales, incluyendo el malestar, la sensación de sequedad y el dolor, se asocian a un entorno crónico de deficiencia lagrimal. La enfermedad se clasifica en distintas etiologías; deficiencia en los componentes lacrimales, anomalías palpebrales, alteraciones de la superficie ocular e iatrogénica. Según su fisiopatología, existen dos categorías principales, ojo seco acuodeficiente y ojo seco evaporativo, o una combinación de ambas (Wolffsohn et al., 2025).

El ojo acuodeficiente se asocia principalmente con infiltración inflamatoria en la glándula lacrimal, inducida por deficiencia de andrógenos o procesos autoinmunes que conlleva una producción inadecuada e insuficiente de lágrimas. Este daño activa una cascada inflamatoria caracterizada por la liberación de proteasas y citocinas, el reclutamiento de células inflamatorias, la maduración de células dendríticas y una respuesta adaptativa mediada por linfocitos T.

El ojo evaporativo presenta un aumento leve de mediadores inflamatorios en la película lagrimal. Entre sus desencadenantes destacan las alteraciones fenotípicas del epitelio corneal que afectan al glicocálix, la queratinización de las glándulas de Meibomio y la disminución del parpadeo y alteraciones de la superficie ocular, especialmente durante el uso prolongado de pantallas, lo que favorece el estrés por desecación (Wolffsohn et al., 2025).

Ambas formas de la enfermedad resultan en una inestabilidad de la película, con cambios cuantitativos y cualitativos, que conlleva una hiperosmolaridad de la superficie ocular, un factor clave en la inflamación, estrés mitocondrial y oxidativo, el daño tisular y anomalías neurosensoriales (Bron et al., 2017; Guerrero-Moreno et al., 2020; Kiyoi et al., 2024; Pflugfelder & de Paiva, 2017). A medida que progresa la enfermedad, estos mecanismos se acumulan y amplifican entre sí, agravando el daño tisular y la pérdida de homeostasis de la superficie ocular (Perez et al., 2025).

El manejo clínico actual de la enfermedad del ojo seco se centra en reponer la lágrima y el uso de suplementos oculares, considerados la piedra angular. Para la disfunción de las glándulas de meibomio, se emplea calor y la terapia de luz pulsada. Cuando la inflamación es la causa subyacente, se recurre a antiinflamatorios, inmunomoduladores y sustitutos biológicos (Jones et al., 2025).

En modelos animales de ojo seco, se ha observado que las terminaciones sensoriales de frío de la córnea muestran un aumento de su excitabilidad. Este fenómeno está relacionado con cambios funcionales en los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (Nav) y los canales iónicos de potasio dependientes de voltaje (Kv) (Kovács et al., 2016). Esta alteración en la excitabilidad neuronal contribuye a los síntomas de hiperalgesia y alodinia. La inflamación crónica y la alteración de la integridad corneal conducen a una remodelación de la red nerviosa y a una sensibilización de los nociceptores, lo que exacerba los síntomas de la enfermedad (Belmonte, Acosta, et al., 2004; Kovács et al., 2016; Meng & Kurose, 2013; Parra et al., 2014).

La modulación de la actividad de los canales iónicos juega un papel crucial en la excitabilidad neuronal, alterando el mecanismo de parpadeo y se secreción lacrimal. En algunos casos, el dolor ocular refleja una disfunción somatosensorial más amplia, que involucra la participación del sistema nervioso central (Perez et al., 2025). El bloqueo farmacológico de estos canales iónicos puede alterar significativamente la capacidad de la célula para generar o inhibir potenciales de acción, afectando su frecuencia, duración y morfología (Fakih et al., 2020; James A Brock et al., 1998; Jin et al., 2023; Mourot et al., 2011). Comprender la organización funcional de los canales iónicos de membrana en las terminaciones nerviosas sensoriales de frío es esencial, dado su papel central en la fisiología de la superficie ocular y en estados patológicos.

1.5. Fotomodulación de la actividad biológica.

La fotomodulación de la actividad biológica se cimienta en dos metodologías emergentes, la optogenética y la optofarmacología. Estas técnicas ofrecen la posibilidad de controlar la actividad neuronal mediante la luz con una alta precisión espaciotemporal sin precedentes (Frank et al., 2020; Gazerani, 2017; Hüll et al., 2018; Morstein et al., 2021).

1.5.1. Optogenética.

La optogenética es una técnica que emplea luz a diferentes longitudes de onda para regular la actividad de neuronas específicas que han sido previamente modificadas genéticamente (Mourot et al., 2013). A través de vectores víricos, se introducen genes que codifican proteínas exógenas fotosensibles, como las opsinas, que se asocian al cromóforo 11-*cis* retinal, una molécula endógena derivada de la vitamina A. El vector vírico puede dirigirse a una línea celular particular gracias a un promotor selectivo celular (Boyden et al., 2005; Tochitsky et al., 2016). Al tratarse de una expresión controlada en una línea celular definida, los cambios en el comportamiento celular serán específicos de esa estirpe. La principal ventaja de esta metodología es su extraordinaria precisión espacial y temporal para controlar neuronas específicas, permitiendo activar o inhibir estas neuronas de manera extremadamente rápida mediante pulsos de luz (Mourot et al., 2013). No obstante, existen varias limitaciones asociadas al uso de la optogenética que incluyen la necesidad de modificar genéticamente las células objetivo, un proceso que puede requerir mucho tiempo (días o semanas para la expresión viral

de opsinas (Mouro et al., 2018)). Además, la modificación genética no siempre es factible, especialmente en tejidos humanos, debido a cuestiones éticas relacionadas con la modificación genética humana y el uso de organismos manipulados genéticamente. También, puede presentarse una respuesta inmunitaria a expresiones proteicas exógenas, por ejemplo, en forma de *retinitis autoimmune experimental* (Tochitsky et al., 2018). Otro desafío es la intervención necesaria para implantar una fibra óptica que dirija la luz hacia la región cerebral deseada. Además, se deberían monitorear parámetros fisiológicos críticos, como temperatura, pH, presión intracraneal, glucemia y oxigenación, así como evaluar posibles daños, lo que dificulta su aplicación práctica (Nazempour et al., 2022).

Aunque la optogenética proporciona una potente herramienta para investigar los mecanismos electrofisiológicos y comportamentales subyacentes de la dinámica neuronal, aún no permite una comprensión de los mecanismos moleculares. Esto sugiere la necesidad de desarrollar nuevas herramientas ópticas que aborden estas limitaciones y permitan una comprensión más profunda de la neurociencia celular y molecular.

1.5.2. Optofarmacología.

El uso de optofármacos ha surgido como una alternativa prometedora sobre la optogenética para modular la actividad celular con alta precisión. A diferencia de la optogenética, los optofármacos combinan principios de farmacología y fotónica para modular los procesos biológicos sin necesidad de modificaciones genéticas (Mouro et al., 2013). Esta estrategia se basa en el diseño de compuestos químicos fotosensibles, también conocidos como fotofármacos, fotomoduladores, fotoconmutadores, farmacóforos, optoquímicos o fotointerruptores (photoswitches, en inglés).

Los fotointerruptores exhiben diferentes afinidades y eficacia para interactuar con receptores nativos en el sistema nervioso, como los canales iónicos, alterando sus propiedades físicas, químicas o biológicas e influyendo en la actividad celular en respuesta a la aplicación de la luz a diferentes longitudes de onda.

Existen tres tipos principales de fotointerruptores sintéticos:

- Ligandos enjaulados: están formados por un agonista o antagonista unido a un grupo fotosensible. Este grupo fotosensible inactiva al ligando hasta que es excitado por luz, lo

que permite que el ligando se libere y se vuelva activo de forma irreversible. Este tipo de fotointerruptor se utiliza para desencadenar cambios rápidos y permanentes en la actividad celular.

- Ligandos anclados fotoconmutables o PTL: Estos ligandos están unidos a un grupo maleimida que les permite enlazarse covalentemente a su diana proteica, la cual ha sido modificada genéticamente para incorporar un residuo cisteína. Esta modificación mejora la especificidad de la interacción, reduciendo las interferencias indeseables fuera del objetivo. Además, estos ligandos pueden fotoconvertirse cuando se irradian con luz, lo que permite un control preciso y repetible.
- Ligandos fotocromicos o PCL: este tipo de ligandos interactúa de forma reversible con su diana mediante enlaces no covalentes (Mourot et al., 2013), lo que proporciona un control preciso, reversible y flexible sobre la actividad celular. El fotofármaco DENAQ, empleado en este trabajo de tesis doctoral, es un ejemplo de PCL.

Con la introducción e integración de moléculas funcionales fotosensibles como el azobenceno, y ocasionalmente, usando otros compuestos como el estilbenceno, espiropiranos, diariletanos, fúlgidos o naftopiranos (Tochitsky et al., 2018), se ha logrado el desarrollo de una amplia gama de ligandos fotocromicos. Cuando se usa azobenceno como interruptor molecular, este proceso es conocido como azonización o azobenzonización. La azonización ha permitido el desarrollo de una amplia variedad de “photoswitches”, capaces de modificar su conformación estructural y propiedades en respuesta a la irradiación con luz de diferentes longitudes de onda. Esta capacidad los convierte en herramientas altamente eficaces para la modulación precisa de la actividad celular. Entre las principales ventajas se incluyen; su capacidad fotomoduladora derivada del enlace diazeno (N=N), su tamaño molecular pequeño, su resistencia al fotoblanqueo o pérdida de fluorescencia consecuencia de la degradación química, y su estabilidad fotoquímica, que permite muchos ciclos de fotoisomerización sin fatiga. Este avance ha dado lugar al desarrollo de multitud de nuevos compuestos con aplicaciones específicas, como BTDAzo, dirigido a fotomodular el canal iónico TRPC5 (Müller et al., 2022); PhoDAG, OptoDArg o OptoBI-1, diseñados para fotomodular TRPC3 y TRPC6 (Curcic et al., 2019); así como fotocaína o azovanilloides, incluyendo AzCA4, rojo-AzCA4, Azo-Capsazepina-4 y ABCTC, orientados a fotomodular el canal iónico TRPV1 (Aleixandre-Carrera et al., 2021); optovina, TRPswitch o PSTRAPs para la fotomodulación de TRPA1 (Peng et al., 2025); fotocaína aplicada a los canales

iónicos Nav; fotofentanilo-2, enfocado a receptores opioides tipo μ , o azopropofol-2 para la fotomodulación del receptor GABA_A.

Cabe destacar que compuestos como AAQ, BENAQ, AFM2-10 y DENAQ fotomodulan la actividad de los canales iónicos Kv y HCN (Tochitsky et al., 2014, 2016).

Al igual que en la optogenética, cuando el tejido a fotomodular se encuentra en una región externa, el control lumínico resulta más sencillo debido a su accesibilidad y la menor interferencia de las estructuras anatómicas circundantes. En este contexto, la luz penetra y alcanza las células diana de manera más directa y eficaz. Este es el caso de la córnea, que se clasifica como un tejido de acceso óptico directo o clase 1 (Lerch et al., 2016), su estructura avascular y su transparencia permiten que la luz atraviese con facilidad, lo que la convierte en un tejido ideal para la fotomodulación. Además, la córnea tiene una función sensorial fundamental, ya que alberga una alta densidad de terminaciones nerviosas, lo que hace que su modulación sea de particular interés en estudios de neurociencia y en aplicaciones terapéuticas relacionadas con el control del dolor y la regeneración nerviosa (Mourot et al., 2013). Una de las principales ventajas de los optofármacos es que no requiere ingeniería genética para su aplicación. Esto permite modular la actividad neuronal sin necesidad de introducir genes exógenos, lo que amplía las posibilidades de aplicación al aprovechar una amplia variedad de compuestos fotosensibles (Mourot et al., 2011). Además, los fotointerruptores ofrecen una gran precisión temporal y espacial de los canales iónicos. Esta capacidad permite ajustar la dosis de manera específica, minimizando los efectos secundarios sistémicos que podrían afectar áreas fuera de la región objetivo. Esta precisión de los fotointerruptores resulta especialmente efectiva en tejidos externos, como la córnea (Mourot et al., 2013).

La funcionalidad de los fotointerruptores radica en la rápida y reversible fotoisomerización entre sus formas *trans* y *cis*, lo que provoca cambios significativos en su geometría y polaridad cuando se expone a la luz. En condiciones de oscuridad o bajo exposición a luz de longitudes de onda corta, el azobenzeno permanece mayoritariamente en su forma *trans* (>99.99%), una estructura alargada y estable termodinámicamente. La irradiación con luz induce su cambio a la forma *cis* (>95-96% para algunos ligandos fotocromicos como AAQ, BzAQ), siendo una configuración angular (Mourot et al., 2013). El retorno a su forma *trans*, proceso conocido como isomerización térmica retroactiva, se impulsa mediante la relajación térmica espontánea, por aplicación de

longitudes de onda corta e incluso en oscuridad. La velocidad de fotoisomerización o fotoconversión del azobenceno se encuentra en el rango de picosegundos, lo que la hace significativamente más rápida que la mayoría de procesos biológicos. Esta rapidez es una ventaja clave, ya que permite modular la actividad celular de manera casi instantánea, lo que es esencial para aplicaciones que requieren una respuesta rápida y precisa. Gracias a esta velocidad, el azobenceno puede interrumpir o activar procesos celulares con una temporalidad muy ajustada, donde se busca una modulación exacta de la actividad celular sin interferir con otros procesos biológicos de forma inadvertida (Mourot et al., 2013).

Sin embargo, los fotointerruptores presentan una serie de desafíos que limitan su aplicación. Uno de los principales es la limitada capacidad que tienen estos compuestos para atravesar barreras biológicas, como la barrera epitelial o la membrana citoplasmática, que protege los tejidos internos o a la propia célula de sustancias externas que podrían resultar potencialmente dañinas. En este sentido, los optofármacos suelen ser moléculas polares, una propiedad que facilita su fotoconversión, pero que los hace menos permeables a estas barreras biológicas. La efectividad de estos compuestos depende en gran medida de su capacidad para superar estas barreras sin perder su actividad biológica y su capacidad de alcanzar su diana terapéutica. Para lograr su efecto, los fotomoduladores deben primero difundir hasta su zona de acción, lo que puede implicar atravesar membranas celulares, y luego unirse a su objetivo molecular, como los canales iónicos. Lograr este nivel de control requiere optimizar cuidadosamente las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los compuestos, asegurando tanto su difusión eficaz como su capacidad para modular de manera precisa la actividad celular o neuronal en el tejido deseado. Curiosamente, algunos ligandos fotocromicos como el QAQ, BENAQ y DENAQ exhiben una acción selectiva sobre las células en procesos degenerativos, lo que favorece su penetración y acción en tejidos alterados sin afectar a los tejidos sanos o indemnes (Tochitsky et al., 2016).

1.5.2.1. DENAQ.

El compuesto químico Diethylaminoazobenceno-4'-Aza-Quinolizinium Bromide, más conocido como DENAQ, es un fotointerruptor de características anfifílicas, cuya síntesis se basó en la estructura del tetraetilamonio (TEA), un bloqueante clásico de los canales iónicos Kv.

Estructuralmente, el DENAQ está compuesto por tres elementos:

- Un azobenzeno que proporciona la capacidad de fotoconversión al compuesto.
- Un amonio cuaternario, con carga positiva, que interactúa con el poro del canal iónico bloqueando el flujo iónico.
- Un grupo alquilamino, donador de electrones, que contribuye a las propiedades espectrales y a la estabilidad termodinámica del isómero *cis* (Mourot et al., 2011).

En términos funcionales, el DENAQ ha demostrado ser eficaz en conferir sensibilidad a la luz a tejidos nerviosos como la vía auditiva en jerbos, particularmente en neuronas binaurales de la oliva medial superior y a las células ganglionares de tipo OFF en la retina de un modelo animal de ceguera RD1. En ambos casos, la fotosensibilización de estos tejidos depende de la acción del DENAQ sobre canales iónicos HCN (Ko et al., 2016; Tochitsky et al., 2014, 2016). El DENAQ presenta una respuesta óptima a la luz de 480 nm de longitud de onda (Mourot et al., 2011; Nikonov et al., 2022; Tochitsky et al., 2014), debido a una absorción de luz desplazada hacia el rojo, lo que significa que su activación ocurre a longitudes de onda menos fotodañinas que otros “fotoswitches”, cuyo pico de absorción máxima está en el espectro ultravioleta. En este último caso, la irradiación lumínica puede afectar la viabilidad celular y diversos procesos fisiológicos, incluida la transcripción génica y la generación de estrés oxidativo (Gataulina et al., 2024; Tochitsky et al., 2014).

Se ha descrito previamente que el DENAQ puede restaurar comportamientos fototáxicos y aprendizaje visual en modelos animales de ceguera, como ratones, ratas y perros con *retinitis pigmentosa* o degeneración parcial de la retina (Hüll et al., 2018; Tochitsky et al., 2014, 2017). Sin embargo, su efecto en estructuras neuronales alejadas del soma, como las terminaciones nerviosas periféricas, aún resulta desconocido (Tochitsky et al., 2016). En los modelos de degeneración retiniana, el DENAQ ingresa en las células ganglionares principalmente a través de canales iónicos nativos como los canales iónicos P2X (Nikonov et al., 2022; Tochitsky et al., 2016), principalmente a través del canal iónico P2X7 (Tochitsky et al., 2016). Este fenómeno podría estar relacionado con la regulación al alza de los canales iónicos P2X y HCN en el modelo degenerativo, lo que explicaría la fotosensibilización observada en el modelo de degeneración retiniana y no así en retinas sanas (Tochitsky et al., 2016).

Una vez dentro de la célula, y en condiciones de oscuridad, el isómero *trans* se convierte en un bloqueante eficiente, uniéndose al poro de los canales iónicos HCN y Kv, especialmente de Kv3.1, Kv2.1, Kv4.2 (Mourot et al., 2011; Tochitsky et al., 2016), obstruyéndolos y permitiendo el control

de los potenciales de acción de estas células (Tochitsky et al., 2016). Asimismo, se ha descrito que el DENAQ no presenta afinidad por otros canales iónicos como $Ca_v2.2$, Nav e incluso algunos miembros de la familia de los canales iónicos de potasio como Shaker-IR o Kir2.1 (Mourot et al., 2013). Bajo luz visible de alta intensidad o con diodo emisor de luz (LED) azul de alta intensidad, el DENAQ cambia a su forma *cis*, modificando su afinidad por estos canales iónicos, que desaparece bruscamente, y se desplaza fuera del poro del canal iónico, lo que produce el desbloqueo del mismo (Mourot et al., 2011) (Figura 4). Este proceso es reversible, y la relajación térmica de *cis* a *trans* en la oscuridad tiene un tiempo aproximado de 300 ms, aunque pueden observarse dinámicas más rápidas (<50 ms) (Mourot et al., 2011; Tochitsky et al., 2014). El DENAQ, mediante su cambio estructural dependiente de su exposición a la luz, modifica su capacidad para bloquear los canales iónicos Kv y HCN, lo que induce una alteración en el patrón o frecuencia de disparo neuronal, fenómeno conocido como photoswitching (PS) y también utilizado en ese trabajo de tesis como foto-conmutación o foto-reducción (Mourot et al., 2011; Nikolaev & Tikhonov, 2023; Nikolaev et al., 2021; Tochitsky et al., 2014).

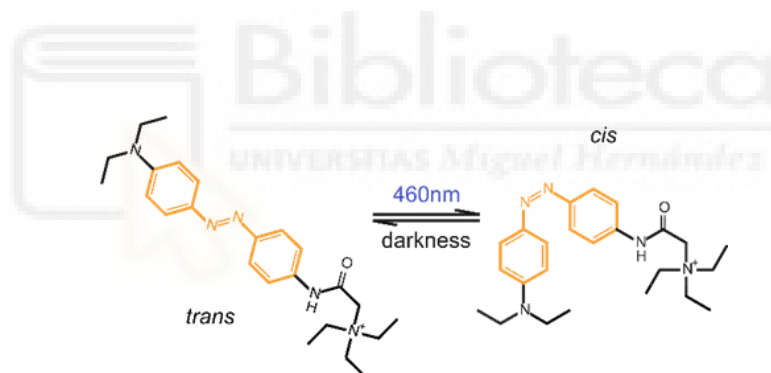


Figura 4. Estructura química del DENAQ en conformación *trans* (oscuridad) y *cis* (luz). El componente de DENAQ sensible a la luz, el azobenceno, está resaltado en naranja. Adaptado de Mourot et al., 2013.

Aunque los datos disponibles sobre la inyección intravítrea del DENAQ en ratones indican una nula citotoxicidad (Nikonov et al., 2022; Tochitsky et al., 2014), algunos estudios reportan hallazgos controvertidos en perros, especialmente en concentraciones elevadas. A partir de volúmenes de 150 μ L y, particularmente, con concentraciones de 0,3 mM para ojos no vitrectomizados y entre 3 a 10 mM para ojos vitrectomizados, se han observado efectos adversos como uveítis, malestar ocular, retinotoxicidad, catarata subcapsular posterior, glaucoma, atrofia retiniana, deterioro visual agudo o desprendimiento de retina. Estos efectos podrían ser explicados por el efecto del DENAQ sobre la actividad de las células de Müller, las cuales también

expresan P2X7 y Kir4.1. Este hallazgo resalta la necesidad de evaluar cuidadosamente la seguridad y la toxicidad del DENAQ, especialmente en estudios preclínicos y en posibles aplicaciones clínicas en seres humanos (Nikonov et al., 2022; Tochitsky et al., 2018).

Dado que la fotosensibilidad inducida por el DENAQ depende de la presencia funcional de canales iónicos P2X en la retina degenerada, surge la hipótesis de que el DENAQ también podría servir como un indicador ultrasensible para explorar la expresión funcional de estos canales iónicos en otras regiones del sistema nervioso, como el periférico. Esto incluye, por ejemplo, las terminaciones sensoriales de frío de la córnea, abriendo nuevas posibilidades prometedoras para el estudio y la modulación de estas estructuras periféricas a través de la optofarmacología (Mouro et al., 2011; Nikonov et al., 2022; Tochitsky et al., 2016). Investigaciones previas han revelado que la entrada del DENAQ a las neuronas puede estar mediada por receptores específicos, como el canal iónico P2X7 (Figura 5). Los receptores P2X son canales iónicos de membrana activados por ATP extracelular que permiten el paso de cationes. Se ha demostrado que el canal iónico P2X7 media la entrada de DENAQ a células ganglionares de la retina degenerada en un modelo de ratón de *retinosis pigmentosa* (Figura 5) (Tochitsky et al., 2014, 2016). Esta propiedad del DENAQ se ha utilizado para identificar la expresión funcional de los canales iónicos P2X7 en la retina de ratón (Tochitsky et al., 2016).

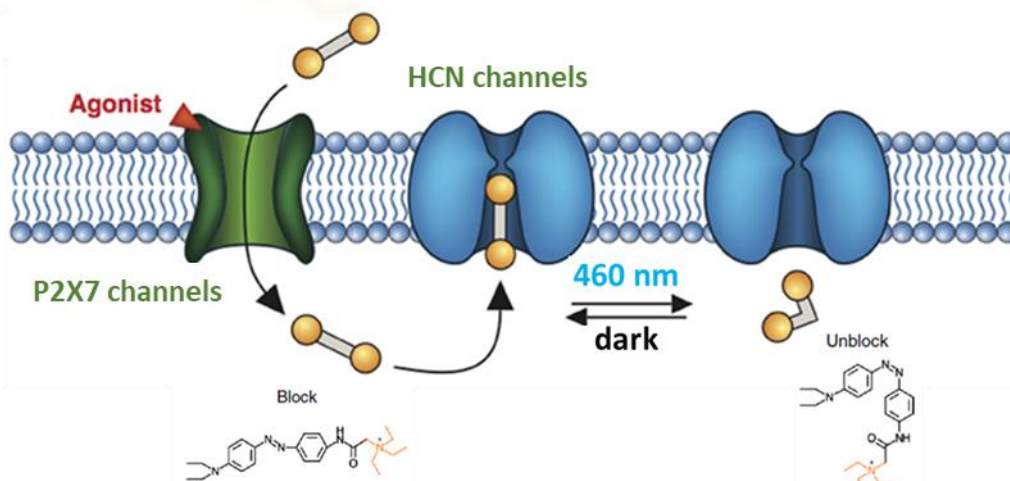
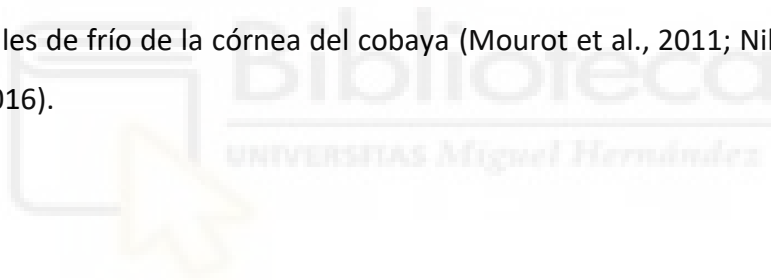


Figura 5. Estructura química, permeación de la membrana y bloqueo en *trans*. Dado que la membrana celular es impermeable a DENAQ, este entra en la célula a través de los canales P2X7 abiertos en células ganglionares de retinas degeneradas en el modelo murino de ceguera Rd1. A continuación, el DENAQ se une al vestíbulo intracelular de los canales iónicos HCN y bloquea la conducción de iones en la

configuración *trans* (oscuridad) pero no después de la foto-isomerización a la configuración *cis* (estimulación con luz de 460 nm). Adaptado de Mourot et al., 2013.

Por lo tanto, funcionalmente el DENAQ entra a la célula a través de canales iónicos P2X y actúa como un transbloqueante de los canales iónicos HCN y Kv, en condiciones de oscuridad. Bajo esta configuración, el DENAQ modula el patrón de disparo neuronal al bloquear la corriente I_h y la salida de potasio, lo que provoca alteraciones tanto en la frecuencia como en la forma del potencial de acción, dependiendo del tipo celular y su contexto fisiopatológico. Al ser activado por luz visible (460 nm), cambia a su forma *cis*, pierde afinidad por estos canales iónicos, generando un “photoswitching” reversible que confiere control espaciotemporal sobre la excitabilidad neuronal. Este mecanismo también permite evaluar de forma indirecta la expresión funcional de canales iónicos HCN y Kv, así como su regulación en procesos degenerativos, convirtiéndolo en una herramienta óptica y farmacológica de diagnóstico y modulación neuronal. Así, surge la hipótesis de que el DENAQ podría modular la actividad eléctrica de las terminaciones nerviosas sensoriales de frío de la córnea del cobaya (Mourot et al., 2011; Nikonov et al., 2022; Tochitsky et al., 2016).



2. OBJETIVOS.

1. Determinar la capacidad del DENAQ de modular la actividad eléctrica espontánea y evocada por frío en las terminaciones nerviosas sensoriales de frío en córneas de cobaya, tanto en condiciones de control como en un modelo patológico de deficiencia lagrimal.
2. Evaluar el papel de los canales iónicos P2X en la entrada del DENAQ a las terminaciones nerviosas de frío en córneas de cobaya, a través de la co-aplicación de compuestos antagonistas de estos canales iónicos y DENAQ.
3. Determinar el posible rol de los canales iónicos Kv y HCN como dianas farmacológicas del DENAQ.
4. Determinar la expresión de los canales iónicos P2X2 y P2X3 en las terminaciones nerviosas de frío en córneas de ratón.
5. Demostrar el potencial del DENAQ en la foto-modulación del reflejo de parpadeo evocado por frío, tras su instilación tópica en el ojo, como una prueba de su eficacia *in vivo* en la rata.

La consecución de estos objetivos contribuiría a una mejor comprensión de la organización funcional de los canales iónicos de membrana de los termorreceptores de frío y podría abrir nuevas vías para el desarrollo de terapias opto-farmacológicas en el tratamiento del ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Aspectos éticos y animales de experimentación.

Esta investigación se llevó a cabo siguiendo la Directiva de la Unión Europea (2010/63/EU), y la legislación española sobre la protección de animales de experimentación. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández (códigos 2019/VSC/PEA/0275 y 2021/VSC/PEA/0025). Todos los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos de experimentación. Se utilizaron cobayas Dunkin Hartley de ambos sexos, de 2 a 3 meses de edad, ratones transgénicos TRPM8^{BAC}-EYFP (Morenilla-Palao et al., 2014) de 3 a 6 meses de edad y ratas Wistar de 3 a 5 meses de edad. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y en una instalación con temperatura controlada. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*.

3.2. Inducción del modelo de deficiencia lagrimal crónica en cobaya.

Para este estudio, se utilizó un modelo animal de ojo seco inducido por la extirpación bilateral de la glándula lagrimal principal según (Kovács et al., 2016). Las cobayas se anestesiaron con ketamina hidrocloreto (90 mg/kg i.p. Ketamidor, metViva Richter, ref 5880393.7) y xilacina hidrocloreto (5 mg/kg i.p. Xilagesic, CALIER, ref 572599-4) con aguja estéril 25G x 5/8" (Terumo® Agani, ref AN*2525R1) antes de proceder a la disección bilateral de la glándula lagrimal principal. Una vez anestesiado, se colocó sobre una manta eléctrica y tapado con un paño para preservar su temperatura corporal durante la intervención quirúrgica. Se rasuró la piel, primero con unas tijeras pequeñas (FST, ref 15015-11), o si fuera necesario con una maquinilla de afeitar (Braun™ Aesculap Vega GT410, Fisher scientific), justo encima de donde se localiza la glándula, y se lavó con solución salina para eliminar restos de pelo. Con el uso de una lámpara de hendidura (Takagi MFG.Go., Modelo MT ON-5, Nakano, Japón), se realizó una incisión cutánea de aproximadamente ~8 mm en el lado temporal, posterior al canto lateral por medio de una hoja desechable de bisturí estéril de n11 (Nahita, ref FMB012) con mango del n3 (FST; ref 10003-12), desde el extremo temporal del ojo y dirigido hacia inferior, se fueron disecando los tejidos en profundidad hasta que se expuso la glándula exorbitaria y se disecó la cápsula fibrosa, extrayendo cuidadosamente la glándula lagrimal. La extracción completa se verificó inspeccionando el área quirúrgica para descartar la presencia de tejido glandular residual. Ante la presencia de

hemorragia se usaron hisopos absorbentes de algodón o hemostetas estériles de punta aguda (Kettenbach; Sugi Inside, 30601; ref 18105-01) para generar hemostasia. Al finalizar el procedimiento, se aplicaron dos gotas de colirio antibiótico (tobramicina al 3 mg/mL; Tobrex, ref 977298.7) en el área quirúrgica para prevenir infecciones y promover el bienestar de los animales. Finalmente, la incisión cutánea fue suturada con seda trenzada 6.0 y aguja curva (Lorca Marín; ref 55343) estériles por medio de dos a cuatro puntos. Los animales se alojaron individualmente y se controlaron regularmente para detectar posibles signos clínicos de inflamación o defectos epiteliales locales (conjuntivales y corneales) o sistémicos hasta la realización del registro electrofisiológico extracelular un mes más tarde. En caso de necesidad, se tuvo previsto la administración postoperatoria de buprenorfina subcutánea 0.1 mg/kg/día (Bupaq; Richer pharma; ref 578816.6) y paracetamol/meloxicam (apiretal; ref 661267.5 oral en el agua de bebida *ad libitum* / loxicom; ref 570043.4 i.p; Servicio de experimentación animal).

Para asegurar la efectividad de la cirugía, se valoró el volumen de lágrimas con un hilo de rojo de fenol (Zone-Quick, Menicon, Nagoya, Japón) colocado en el borde temporal del ojo durante 30 s antes de la cirugía (a los dos meses de edad) y el día del registro electrofisiológico, cuatro semanas después (a los tres meses de edad) para confirmar cualitativamente la instauración de la deficiencia lagrimal. Los hilos de rojo fenol son inicialmente de color amarillo, sin embargo, el color cambia a rojo en contacto con la secreción lacrimal (con pH más alcalino), lo cual permite su medición en milímetros.

3.3. Registro electrofisiológico de las terminaciones nerviosas corneales de frío en cobaya.

Las córneas se prepararon para los registros electrofisiológicos siguiendo el protocolo descrito por (Acosta et al., 2013). Las cobayas fueron sacrificadas mediante una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vétoquinol E.V.S.A., Madrid, España) a una dosis de 120 mg/kg. Tras confirmar la pérdida de reflejos vitales, las córneas se extrajeron cuidadosamente bajo microscopio estereoscópico. Para ello, se realizó una incisión inicial con una hoja de bisturí estéril nº11 (Nahita, ref. FMB012) acoplada a un mango nº3 (FST; ref. 10003-12), seguida de un corte circular a nivel del limbo utilizando tijeras de iris (FST, ref. 15015-11), evitando el contacto directo con el epitelio corneal. Durante la disección, la córnea se sostuvo con una pinza de disección (FST nº5, ref. 91150-20) para garantizar la precisión del procedimiento y minimizar el daño tisular.

Inmediatamente después de la extracción, las córneas se colocaron en un vaso de precipitados con una solución fisiológica de la siguiente composición: 133,4 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 2 CaCl₂, 1,2 mM de MgCl₂, 16,3 mM de NaHCO₃, 1,3 mM de NaH₂PO₄ y 9,8 mM de glucosa. La osmolaridad de la solución fue ~310 mOsm·L⁻¹ y se burbujeó con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) durante 60 minutos para mantener un pH de 7,4 y la oxigenación.

A continuación, las córneas se dividieron en dos mitades y se asignaron a distintas condiciones experimentales, control o tratadas con el DENAQ. Las muestras se incubaron con DENAQ a concentraciones de 200 µM o 2 mM, durante aproximadamente 40 minutos en un baño termostático (J.P. Selecta, SERO-TEST) a 34 °C. Posteriormente, cada pieza de córnea se transfirió a una cámara de perfusión *ex vivo*, donde se fijó y aseguró por la conjuntiva o la esclera utilizando alfileres entomológicos de acero inoxidable (FST, ref. 26002-10) sobre una base de silicona (Sylgard 184®; Dow Corning, Midland, MI) en el fondo de la cámara.

Los registros electrofisiológicos se efectuaron dentro de una jaula de Faraday para minimizar las interferencias electromagnéticas. Durante el registro, las córneas se perfundieron de forma continua a un flujo de ~2,5 mL/min con la misma solución fisiológica, mantenida en burbujeo constante con carbógeno. La temperatura del baño se mantuvo estable a 34 °C (temperatura basal) mediante un sistema Peltier de fabricación casera, controlado por retroalimentación térmica mediante una microsonda (termómetro BAT-12, Physitemp Instruments Inc., EE. UU., con microsonda IT-18).

El registro extracelular de los impulsos de las terminaciones nerviosas (NTIs) se realizó según la técnica descrita por (James A Brock et al., 1998) (Figura 6a). Se utilizaron micropipetas de vidrio de borosilicato (Harvard Apparatus, 1.5 mm O.D. × 1.17 mm I.D.; ref. 30-0065), con un diámetro de punta aproximado de 50 µm, fabricadas mediante un estirador térmico (Narishige, modelo PC-10). Las micropipetas, llenas con solución fisiológica, se aplicaron suavemente sobre la superficie corneal bajo una ligera succión, evitando dañar el epitelio, pero permitiendo aislar la actividad de las terminaciones nerviosas. El electrodo de registro, de plata, se introdujo en la micropipeta, mientras que el electrodo de referencia de Ag/AgCl se colocó en el baño de perfusión. Se registró un máximo de un termorreceptor de frío por cada pieza de córnea.

Las señales eléctricas se amplificaron 100× mediante un amplificador NL 104 AC (Digitimer, Welwyn, Reino Unido) y se filtraron con un sistema NL 125/NL 126 (Digitimer) con paso alto de 5 Hz y paso bajo de 5 kHz, incorporando además un filtro de red de 50/60 Hz (Hum Bug, Quest

Scientific). La señal se visualizó en un osciloscopio digital (Tektronix TDS210) y en un monitor de ordenador, y se escuchó simultáneamente mediante altavoces (Geniusnet SP-Q06S, Kye Systems Corp., China). La señal filtrada se almacenó en una computadora a una velocidad de 20 KHz utilizando una interfaz CED Micro-1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) y se almacenaron y analizaron con el software Spike 2 v.8.02 (CED).

Solamente se seleccionaron para el análisis los NTIs correspondientes a terminaciones nerviosas sensibles al frío, las cuales se identificaron por su descarga espontánea regular a temperatura basal (34 °C), que aumentaba significativamente durante rampas de enfriamiento de la solución de registro hasta aproximadamente 15 °C (rango considerado inocuo) (figura 6b). Tras la finalización de los registros, las córneas y los restos biológicos fueron desechados siguiendo los protocolos institucionales de bioseguridad para la eliminación de material biológico.

La actividad de NTI en la temperatura basal se registró durante al menos 100 segundos antes de aplicar el protocolo de estimulación lumínica (figura 6c) y los estímulos térmicos.

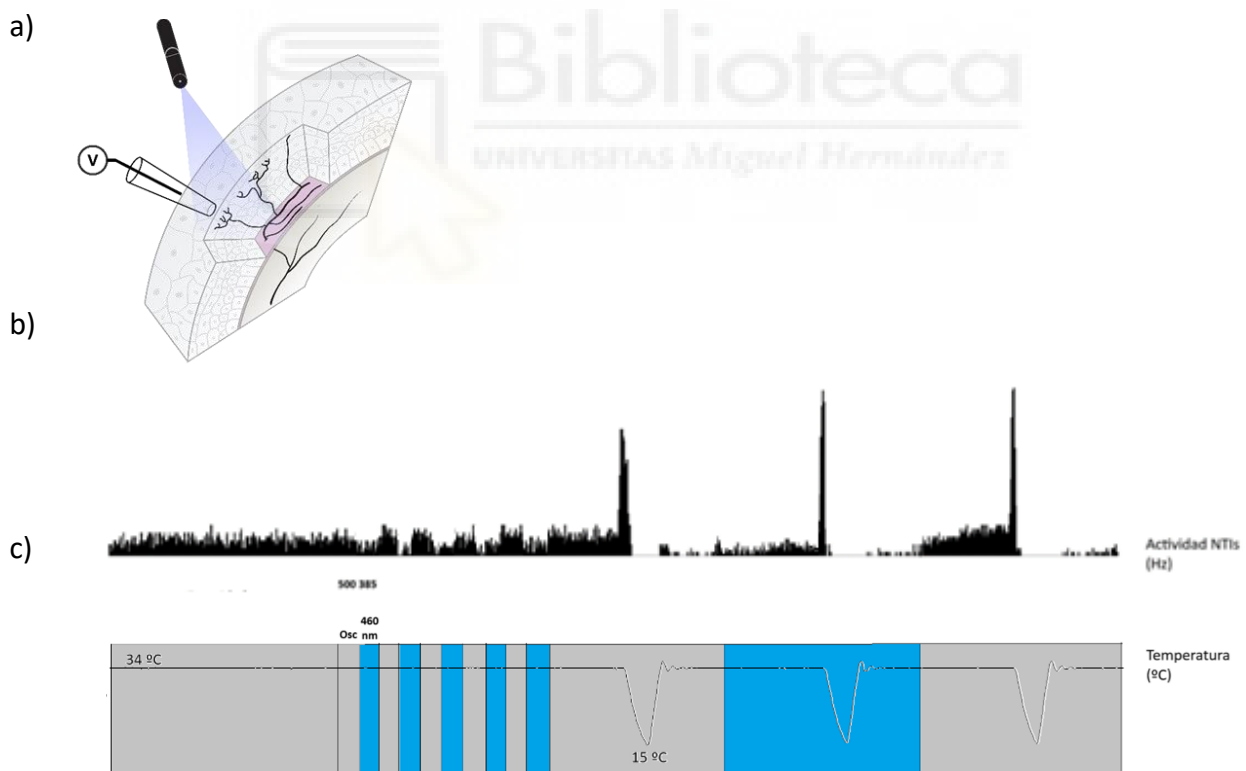
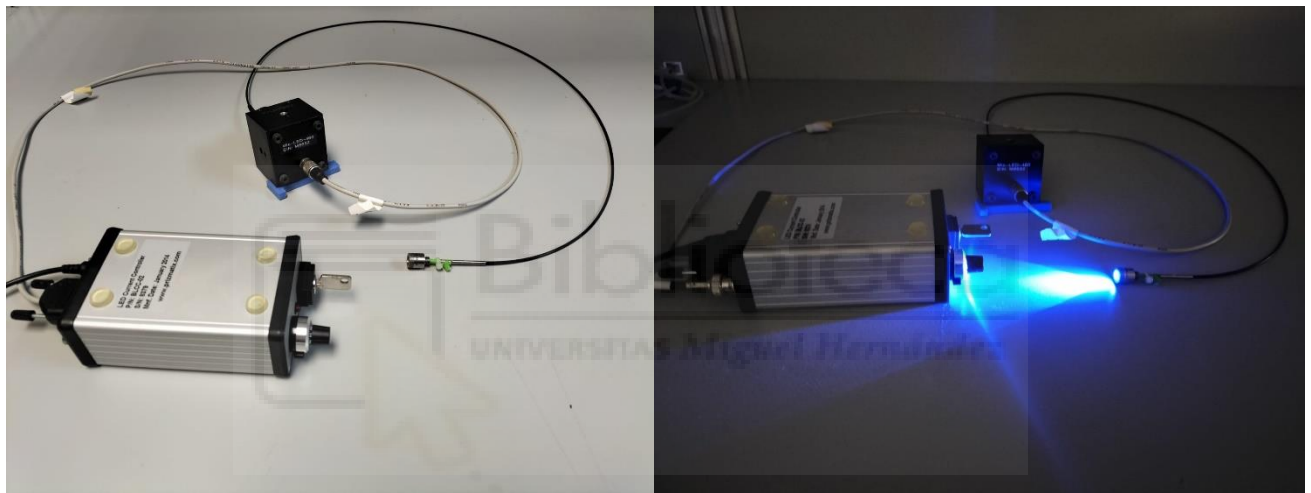


Figura 6. Registro electrofisiológico extracelular en terminaciones nerviosas de la córnea del cobaya tras la administración de DENAQ. a) Esquema de la preparación experimental ilustrando la configuración de la aplicación de luz (LED 460 nm) y el registro electrofisiológico. b) ejemplo de un registro de los impulsos en la terminación nerviosa (NTI) de un termorreceptor de frío de la córnea. Obsérvese la actividad

espontánea antes de la estimulación por frío y la posterior actividad evocada por el enfriamiento de la solución de registro.c) Protocolo de estimulación térmica y por luz. Se aplican 5 pulsos de luz de 15 segundos de duración cada uno, a 34°C, y a continuación 3 rampas de enfriamiento desde 34°C hasta los 15 °C.La primera rampa y la tercera se aplican en oscuridad, mientras que la segunda rampa se aplica en presencia de luz azul (LED 460 nm). Obsérvese el descenso de la frecuencia de NTIs de la actividad espontánea durante la aplicación de pulsos de luz a 34°C.

3.4. Estimulación lumínica del compuesto DENAQ.

Para inducir la foto-isomerización del DENAQ, se utilizó un LED (diodo emisor de luz) con una longitud de onda de 460 nm (Prizmatix Ltd., Holon, Israel) (Figura 7).



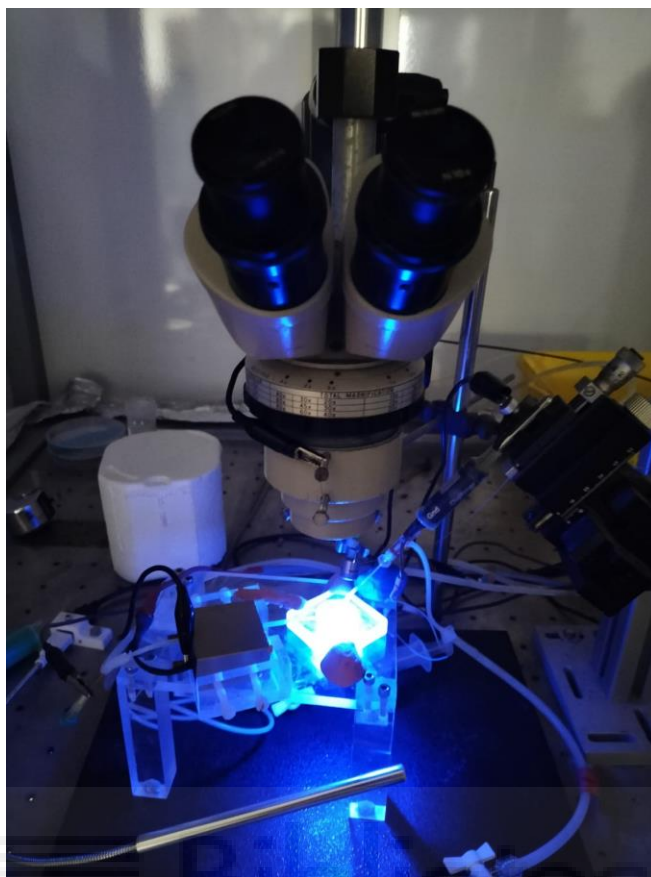


Figura 7. Configuración experimental de estimulación optofarmacológica. Se muestran los componentes del dispositivo LED de 460 nm (arriba izquierda) y la emisión de luz azul (arriba derecha). En la parte inferior, se observa el montaje en microscopio estereoscópico para la iluminación dirigida a la superficie corneal durante los registros electrofisiológicos.

La intensidad de luz incidente en la córnea fue de 60 mW/cm^2 . El protocolo lumínico consistió en 5 ciclos de pulsos alternos de oscuridad/luz de 15 segundos cada uno, seguidos de 3 descensos de temperatura consecutivos desde $34 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $15 \text{ }^\circ\text{C}$, con una duración de 30 segundos y una tasa de enfriamiento promedio de $-0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ por segundo. El primer y tercer descenso se realizaron en condiciones de oscuridad, mientras que el segundo se llevó a cabo bajo irradiación lumínica (Figura 6c).

El cambio inducido por la luz en la frecuencia de los NTIs de las terminaciones nerviosas de frío, previamente incubadas con DENAQ, se denominó “photoswitch” (PS) y se calculó de la siguiente manera:

$$PS = \frac{\text{frecuencia NTI en oscuridad} - \text{frecuencia NTI en luz}}{\text{frecuencia NTI en oscuridad}} \times 100$$

Para todos los registros electrofisiológicos en cobayas, se consideró que debía producirse un cambio en la misma dirección cinco veces para considerar que se había producido “photoswitching”.

3.5. Reactivos químicos.

El DENAQ fue sintetizado según (Mourot et al., 2011) y obtenido de Jubilant Chemsys, Ltd. (Uttar Pradesh, India). Se disolvió en DMSO (dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una concentración inicial de 200 mM. El pico máximo del espectro de absorción de luz del DENAQ es de 470nm. En la figura 8 se muestra el espectro de absorción del DENAQ en comparación al de otros compuestos foto-conmutables bloqueantes de canales iónicos de potasio.

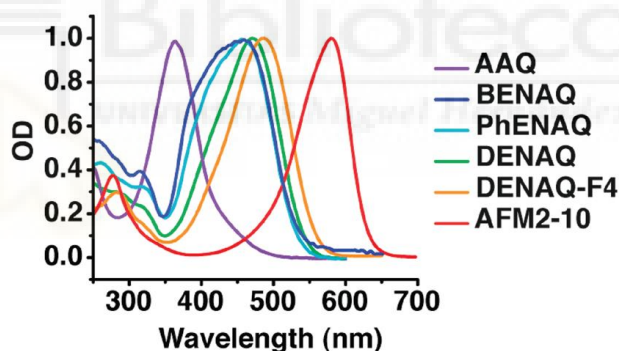


Figura 8. Espectros de absorción de luz ultravioleta y visible de distintos azobencenos. Los espectros se registraron a temperatura ambiente en una solución salina tamponada con fosfato a un pH de 7.4. Adaptado de Mourot et al., 2011.

Las soluciones “stock” de los demás compuestos se prepararon disolviendo los fármacos en agua destilada a las siguientes concentraciones: Cilobradina (24,01 mM; Sigma-Aldrich), Capsazepina (100 mM; Tocris Bioscience, Bristol, UK), sal de hexasodio de Suramina (50 mM; Tocris Bioscience), sal de trietilamonio de TNP-ATP (10 mM; Tocris Bioscience), y Purotoxina-1 (0,1 mM; Smartox Biotechnology, Saint-Egrève, France). Además, se preparó una solución “stock” de A740003 disuelta en etanol a una concentración de 20 mM (Sigma-Aldrich). Todos los compuestos químicos se diluyeron a sus concentraciones de trabajo con la solución fisiológica.

En la tabla 1 se muestran las dianas farmacológicas de los antagonistas de canales iónicos empleados en este trabajo de tesis doctoral.

Antagonista	Diana molecular
Cilobradina	Canales iónicos HCN
Capsazepina	Canal iónico TRPV1
Sal hexasódica de Suramina	Receptores purinérgicos P2
Sal de trietilamonio de TNP-ATP	Canales iónicos P2X
Purotoxina-1	Canal iónico P2X3
A-740003	Canal iónico P2X7

Tabla 1. Lista de antagonistas farmacológicos y sus dianas moleculares, utilizados para el estudio funcional de las terminaciones nerviosas de frío del cobaya.

3.6. Inmunohistoquímica.

Ratones de la línea TRPM8^{BAC}-EYFP fueron sacrificados con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol, Lure, France), seguida de dislocación cervical. Los ojos se enuclearon y se fijaron en metanol y DMSO (4:1) durante 2 horas a temperatura ambiente (22 °C). Posteriormente, se incubaron por 5 minutos a -20 °C en metanol al 100%, se rehidrataron y se lavaron cinco veces en PBS (5 x 15 min).

Las córneas se aislaron, se cortaron en cuadrantes y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución de bloqueo que contenía suero de cabra al 5% (Vector Laboratories, Burlingame, CA), albúmina de suero bovino al 1% (Vector Laboratories), y Triton X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich). A continuación, las córneas se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante cuatro días a 4 °C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-P2X2 de conejo (1:50; Alomone Labs Cat# APR-016, RRID:AB_2313760), anti-P2X3 de conejo (1:50; Alomone Labs Cat# APR-003, RRID:AB_2040054), anti- β -tubulina de clase III neuronal de ratón (1:500; Covance Cat# MMS-435P, RRID:AB_2313773) y anti-GFP de pollo (1:500; Abcam Cat# ab13970, RRID:AB_300798).

Después de enjuagar con PBS, las córneas se incubaron con anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 cabra anti-IgG de pollo (1:500; Molecular Probes Cat# A-11039, RRID:AB_142924), Alexa Fluor 555 cabra anti-IgG de ratón (1:500; Thermo Fisher Scientific Cat# A32727,

RRID:AB_2633276) y Alexa Fluor 647 cabra anti-IgG de conejo (1:500; Thermo Fisher Scientific Cat# A32733, RRID:AB_2633282) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con Hoechst 33342 a 10 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, después de enjuagar con PBS, las córneas se montaron con Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific).

Las imágenes de fluorescencia se capturaron con un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 880 con un objetivo LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr DIC M27 (Carl Zeiss AG). Las imágenes se analizaron usando el software Fiji (ImageJ 1.4, NIH).

3.7. Registro de la actividad electromiográfica del músculo orbicular del ojo (OOemg) de rata.

Bajo anestesia de isoflurano, se colocaron ratas Wistar (2 hembras/1 macho) en un marco estereotáxico. Se implantaron un par de cables de acero recubiertos de teflón (0.002 pulgadas de diámetro) con 1 mm expuesto en la punta, cerca de las porciones temporal y frontal del músculo Orbicularis Oculi para el registro de la señal OOemg. Los cables de registro se conectaron a un conector adherido al cráneo con resina dental acrílica (Duralay®, Reliance, IL, USA) y cuatro tornillos de acero inoxidable. Un cable de plata (0.005 pulgadas de diámetro) conectado a uno de los tornillos sirvió como tierra.

Los animales recibieron tratamiento analgésico (0,05 mg/kg de buprenorfina, Buprecare® 0,3 mg/ml, DFV, España) durante tres días después de la cirugía y se mantuvieron aislados. Se les permitió recuperarse durante diez días antes de la sesión de registro. Se amplificaron, filtraron con paso de banda (300Hz-3000Hz), digitalizaron y almacenaron las señales eléctricas OOemg, evocadas por estímulos fríos y calientes, usando una interfaz (Micro 3-1401, CED, Cambridge, UK) y el software Spike2 v7.0 (CED, Cambridge, UK) para su análisis offline. Se analizaron el número de parpadeos, la duración y el área bajo la curva (AUC) de la respuesta evocada.

La estimulación térmica de la superficie ocular se realizó instilando en la córnea 20 µL de gotas de solución salina a diferentes temperaturas. Los estímulos fríos produjeron un descenso de la temperatura de la superficie ocular (OS) de 32-30 °C a 15 °C. Para la estimulación con calor nocivo, se utilizaron gotas de solución salina que aumentaban la temperatura hasta 40-42 °C. La temperatura de la superficie ocular se registró continuamente con una sonda térmica de alta velocidad (IT – 24P, Physitemp, Bat – 12, Clifton, NJ, USA). Los estímulos se aplicaron con un

intervalo de al menos 30 segundos para permitir que la temperatura volviera a su valor basal. Las condiciones de oscuridad/luz se alternaron bajo condiciones basales. Después, los animales fueron tratados tópicamente con DENAQ. Para ello, se instilaron 10 μ L de gotas de 20 mM de DENAQ en la superficie ocular a intervalos regulares de 30 segundos durante 40 minutos.

3.8. Análisis estadístico.

Los datos se recopilaron y procesaron para el análisis estadístico usando el software GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Inicialmente, se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los datos con una distribución no paramétrica se presentan como mediana y rango intercuartil (IQR = 25% a 75%), mientras que los datos con distribución normal se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Un valor de p de 0,05 o menos se consideró estadísticamente significativo.

Para la comparación de dos muestras, se aplicó una prueba t de Student o su equivalente no paramétrico. Para comparar múltiples muestras, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) o su contraparte no paramétrica. Las pruebas específicas utilizadas se indican en el texto y en los títulos de las figuras.

4. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo de tesis, se muestra que la molécula fotoisomerizable DENAQ confiere sensibilidad a la luz a las terminaciones nerviosas sensoriales de frío de cobayas en córneas *ex vivo*. Investigaciones anteriores han demostrado que el DENAQ fotosensibiliza la actividad de las células ganglionares de la retina en un modelo murino de *retinitis pigmentosa*, así como la actividad de neuronas auditivas binaurales de jerbos (Ko et al., 2016; Tochitsky et al., 2016). Los datos de esta memoria de tesis muestran además que el DENAQ modula la actividad eléctrica de los axones sensoriales periféricos de forma dependiente de la luz, tras ser administrado directamente en terminaciones nerviosas corneales, previamente separadas del soma. Esto se suma al conjunto de pruebas que demuestran que las moléculas basadas en azobenceno, pueden dotar de sensibilidad a la luz a los nociceptores, directamente en sus terminales nerviosas (Frank et al., 2015; Landra-Willm et al., 2023; Mourot et al., 2012).

El DENAQ es un compuesto antagonista de los canales iónicos Kv y HCN en su configuración *trans*, la cuál es adquirida en condiciones de oscuridad, mientras que la luz visible de alta intensidad convierte el DENAQ en su isómero *cis*, liberando a estos canales iónicos del bloqueo (Mourot et al., 2011; Tochitsky et al., 2014). Por lo tanto, se espera que el efecto del DENAQ sobre la excitabilidad de las terminaciones nerviosas de frío corneales, resulte del balance neto entre las contribuciones hiperpolarizantes o despolarizantes al potencial de membrana, como consecuencia de la actividad de estos canales iónicos en las terminaciones nerviosas.

Así, en la oscuridad, se observó una disminución de la actividad espontánea de las terminaciones nerviosas de frío, lo que sugiere que el efecto hiperpolarizante sobre el potencial de membrana, como consecuencia del bloqueo farmacológico de los canales iónicos HCN por DENAQ, predomina sobre el efecto despolarizante sobre el potencial de membrana, como consecuencia de la inhibición farmacológica de los canales iónicos Kv por DENAQ. En apoyo a la hipótesis de que la inhibición de los canales iónicos HCN por DENAQ en la oscuridad, reduce la actividad espontánea, datos previos muestran que los antagonistas químicos de los canales iónicos HCN, la ivabradina y sus derivados estructurales cilobradina y zetabradina, reducen la actividad espontánea de las terminaciones nerviosas de frío en corneas de cobaya (Quirce Vázquez, 2020). La exposición a la luz, sin embargo, reduce la actividad espontánea (photoswitching) en mayor medida que el pretratamiento con DENAQ por sí solo. Esto sugiere un efecto hiperpolarizante sobre el potencial de membrana de la terminación nerviosa de frío corneal, presumiblemente debido a la fotoliberación de la conductancia de los canales Kv, que superaría el efecto despolarizante resultante de la fotoliberación de la actividad de los canales iónicos HCN. Este mecanismo es consistente con los resultados que muestran la persistencia de la fotoconmutación mediada por DENAQ, incluso en presencia del compuesto bloqueante de canales iónicos HCN, cilobradina. Además, esta conclusión es consistente con estudios previos que han demostrado que varios subtipos de canales iónicos de potasio dependientes de voltaje, incluidos Kv2.1, Kv3.1 y Kv4.2, que están presentes en neuronas sensoriales primarias de roedores (Bocksteins et al., 2012), son fotomodulados por DENAQ cuando se expresan en sistemas de expresión heteróloga, como las células HEK293 (Mourot et al., 2013).

El análisis de la forma del impulso en la terminal nerviosa (NTI), proporcionó evidencias adicionales que respaldan la contribución de los canales iónicos Kv a la fotorreducción mediada por DENAQ de la actividad espontánea de la terminación nerviosa de frío en cobayas. Los NTI de

las terminaciones nerviosas de frío registrados extracelularmente, muestran una forma bifásica (positiva-negativa). La configuración del NTI corresponde a la primera derivada del potencial de membrana de la terminación nerviosa. La deflexión positiva se asocia a la despolarización de la membrana, mientras que la deflexión negativa se asocia a la repolarización de la membrana resultante de la apertura de canales iónicos Kv (Brock et al., 2001, 2006). En este trabajo se muestra que los NTI generados espontáneamente en las terminales nerviosas sensoriales de frío corneales, previamente incubadas con DENAQ, mostraban una fase negativa más prolongada, del 53 % de su anchura media en la oscuridad (isómero *trans*), que se acortaba rápidamente con la irradiación LED (isómero *cis*) hasta un 41 %. Esto sugiere que, de los canales iónicos Kv bloqueados por DENAQ en oscuridad, la exposición a la luz desbloqueó parcialmente el 22,6 % de su actividad, lo que sería consistente con la fotorreducción parcial de la actividad espontánea observada en las terminaciones nerviosas de frío en presencia del DENAQ. En apoyo a esto, estudios previos muestran que la fotoconmutación de la actividad de canales iónicos Kv3.1 recombinantes, expresados en células HEK293, es parcial (Mourot et al., 2011). Esto sugiere que los Kvs nativos en las terminaciones nerviosas de frío de la córnea también podrían experimentar una fotoconmutación parcial. Sin embargo, sería necesaria una investigación exhaustiva para dilucidar si esta liberación parcial de la actividad de los canales iónicos Kv, es suficiente para explicar el total de la fotorreducción mediada por DENAQ de la actividad espontánea en el termorreceptor de frío. Por otro lado, la molécula DENAQ termina en un ion de amonio cuaternario en un extremo del azobenceno, que interactúa con el sitio de unión del tetraetilamonio (TEA) en la luz interna de los canales iónicos de potasio (Mourot et al., 2011). En consonancia con los hallazgos de este trabajo, el TEA prolonga la duración de la fase negativa del NTI en los receptores del frío de la córnea de cobayas (Brock et al., 2006). Además, el TEA no afecta a la respuesta de los receptores del frío de la córnea de cobayas al enfriamiento (Brock et al., 2006). De manera similar, este trabajo muestra que el DENAQ no fotomodula las respuestas provocadas por el frío en las terminaciones nerviosas sensibles a frío de la córnea.

Cabe destacar que la actividad espontánea de las terminaciones nerviosas de frío en la oscuridad aumentó después de cada aplicación de luz en comparación con el valor inicial. Este fenómeno podría explicarse por un tiempo insuficiente para que el DENAQ vuelva a bloquear completamente los canales iónicos HCN antes del siguiente pulso de luz, debido a que, si bien la

conversión de *trans* a *cis* ocurre en milisegundos, la conversión termodinámica de regreso al estado *trans* es un proceso más lento que tarda segundos (Mouroto et al., 2011).

Debido a que el antagonismo de los canales iónicos Kv y HCN se ha reportado que ocurre desde el interior celular (Mouroto et al., 2013), el transporte de DENAQ a través de la membrana plasmática sería crucial para su función. Al ser una molécula con carga eléctrica positiva permanente, y por tanto de naturaleza anfifílica, su entrada al interior de las neuronas sería limitada. Sin embargo, se ha demostrado que el DENAQ puede ingresar a las células ganglionares de la retina a través de los canales iónicos P2X7 (Tochitsky et al., 2016). En el presente trabajo, se muestra que el uso de Purotoxina-1, un antagonista selectivo de los receptores P2X3, previene parcialmente la fotorreducción mediada por DENAQ de la actividad espontánea de los termorreceptores de frío de cobaya, indicando así expresión de canales iónicos P2X3 en las terminaciones nerviosas de frío de la córnea. Además, se realizó la inmunotinción de los receptores P2X y P2X3 y se observó la expresión de las subunidades P2X2 y P2X3 en terminaciones nerviosas corneales TRPM8-EYFP positivas en ratones adultos. Consistentemente con trabajos previos que muestran la expresión inmunoquímica de los marcadores nociceptivos P2X3 y de la proteína CGRP en pequeños subconjuntos de cuerpos celulares de los ganglios raquídeos de ratones que expresan TRPM8 (Takashima et al., 2010), los resultados de este trabajo indican que una fracción de las terminaciones nerviosas que expresan el receptor molecular de frío TRPM8, también expresan los canales iónicos P2X2 y P2X3.

Además, estudios previos han mostrado que las neuronas sensoriales primarias expresan la proteína del receptor P2X3 en un nivel más alto que el resto de subunidades, abarcando de P2X1 a P2X6, mientras que la proteína del receptor P2X7 aún no se ha identificado en estas neuronas (Dunn et al., 2001; Flegel et al., 2015; Staikopoulos et al., 2007). Estudios previos también muestran que el ARNm y la proteína P2X3 se han encontrado principalmente en cuerpos celulares no peptidérgicos de pequeño diámetro de neuronas sensoriales primarias (Chen et al., 1995; Eriksson et al., 1998; Lewis et al., 1995). Además, una fracción de las proyecciones periféricas de las neuronas sensoriales de la piel, la lengua y la pulpa dental son inmunopositivas para P2X3 en roedores (Bo et al., 1999; Burnstock, 2000).

La funcionalidad de los canales iónicos P2X en las terminales nerviosas sensoriales de la córnea sigue siendo incierta. Si bien se ha demostrado que los agonistas del receptor purinérgico P2X excitan los nociceptores articulares de las ratas (Dowd et al., 1998), intentos de estimular las aferencias de la pulpa dental en gato (Down et al., 1997) o los nociceptores de la córnea en gato (Matthews et al., 1997) no han tenido éxito. Además de las diferencias entre especies, estas discrepancias podrían explicarse por limitaciones farmacológicas específicas asociadas a los diferentes modelos experimentales utilizados (Dowd et al., 1998). Los datos de este trabajo sugieren que el DENAQ entra en las terminaciones nerviosas de frío a través de los canales iónicos P2X, principalmente de los canales iónicos P2X3 (Figura 9). En conjunto, estos resultados sugieren la expresión funcional de los canales iónicos P2X en las terminaciones nerviosas de frío en la córnea de cobaya.

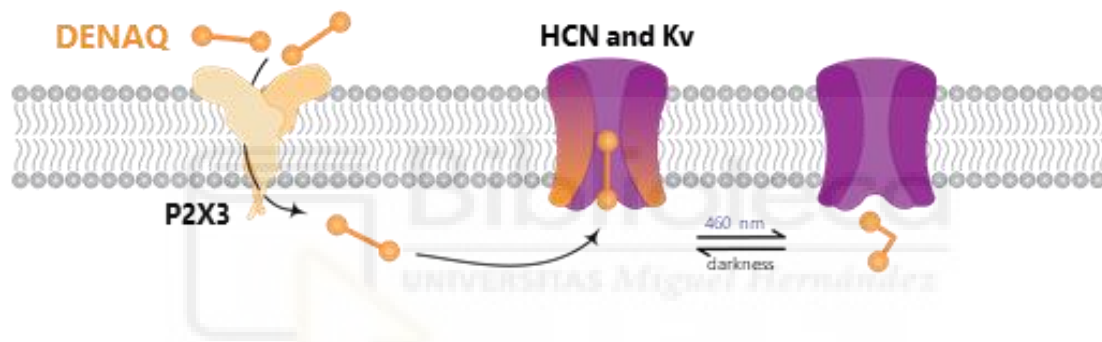


Figura 9. Esquema ilustrando el mecanismo de acción de DENAQ en la terminación nerviosa de frío corneal. El DENAQ atravesaría la bicapa lipídica de la terminal nerviosa a través de canales iónicos P2X3 y, en condiciones de oscuridad, ingresaría en los poros de los canales iónicos HCN y Kv, bloqueando el trasiego de iones a través de los mismos. La irradiación con luz azul (460 nm) provocaría un cambio conformacional de *trans* a *cis* en la molécula, que liberaría a estos canales iónicos del bloqueo.

En sujetos con ojo seco, la actividad ectópica en las terminaciones nerviosas de frío de la córnea estaría detrás de las molestias, dolor, alteración del parpadeo y sensación de sequedad (Belmonte et al., 2017). En este trabajo se muestra que el DENAQ reduce la actividad espontánea en las terminaciones nerviosas de frío en córneas de cobaya con deficiencia lagrimal inducida quirúrgicamente, cuando son irradiadas con luz azul de alta intensidad. Sin embargo, las respuestas provocadas por el frío no resultan fotomoduladas. Este hallazgo sugiere que el DENAQ podría ser un tratamiento beneficioso para la enfermedad de ojo seco, debido a presumiblemente podría aliviar las molestias oculares o el dolor sin comprometer tanto la

sensación de frío como los reflejos provocados por el frío, esenciales para mantener la integridad de la superficie ocular. Además, los fotoconmutadores basados en azobenceno ofrecerían un nuevo enfoque terapéutico al aprovechar su propiedad de atravesar los poros grandes de los receptores P2X. Esto favorecería la acción de estos fotofármacos impermeables a la membrana, preferentemente en las células con una mayor expresión de receptores P2X (Tochitsky et al., 2016). De hecho, un estudio reciente de (Fakih et al., 2021) demostró la sobreexpresión del ARNm del receptor P2X3 en las neuronas TG de un modelo murino de ojo seco. Este hallazgo indica que la fotomodulación mediada por DENAQ podría dirigirse selectivamente a las terminaciones nerviosas de frío alteradas sobre el tejido sano.

Finalmente, en este trabajo se exploró el efecto *in vivo* del DENAQ cuando se administra por vía tópica en el ojo de ratas anestesiadas. De esta manera se mostró que el DENAQ potencia la actividad electromiográfica inducida por frío del músculo implicado en parpadeo, Orbicularis Oculi, en presencia de luz azul de alta intensidad. Este resultado contrasta con la ausencia de fotomodulación de las repuestas evocadas por frío en los termorreceptores de cobaya. La discrepancia observada podría atribuirse al diferente modelo animal utilizado, a la mayor concentración de DENAQ adaptada a las condiciones *in vivo* y a la administración del DENAQ más allá de la córnea (incluyendo la conjuntiva y el borde del párpado), en el paradigma del reflejo de parpadeo. Sin embargo, un trabajo reciente indica que los nociceptores polimodales de la córnea podrían contribuir a mediar el reflejo de parpadeo provocado por el frío en ratones (Frutos-Rincón et al., 2023). Por consiguiente, es plausible que distintas clases funcionales de terminales nerviosas sensoriales corneales, que no están clasificadas como termorreceptores del frío, puedan estar sujetas a fotomodulación por DENAQ en el reflejo de parpadeo inducido por el frío. Se necesitarían más estudios para esclarecer esta cuestión.

5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.

Las conclusiones principales de este trabajo de tesis son:

1. El compuesto fotoisomerizable DENAQ confiere sensibilidad a la luz a la actividad espontánea de los termorreceptores de frío de la córnea de cobaya. Un aspecto crucial es que este efecto se produce sin alterar las respuestas evocadas por la estimulación por frío, lo que lo convierte en un candidato para modular farmacológicamente la actividad patológica sin comprometer la función sensorial esencial.
2. Los receptores purinérgicos P2X2 y P2X3 se expresan en las terminaciones nerviosas sensibles al frío de la córnea del ratón.
3. Se ha determinado que la entrada principal del DENAQ a las terminaciones nerviosas de frío de cobaya se produce a través de canales iónicos P2X. Este hallazgo revela el mecanismo de transporte de la molécula y sugiere que los canales iónicos P2X, en particular el subtipo P2X3, tienen una expresión funcional en estas terminales nerviosas.
4. El mecanismo de fotoconmutación mediado por DENAQ, se debe fundamentalmente a la modulación de los canales iónicos de potasio dependientes de voltaje (Kv). La luz visible de alta intensidad induce una liberación del bloqueo de estos canales iónicos por la molécula, lo que produciría un efecto hiperpolarizante que reduce la actividad espontánea de los termorreceptores de frío del cobaya.
5. En un modelo de cobaya con deficiencia de lagrimación (ojo seco), se demostró que DENAQ reduce la actividad espontánea patológicamente aumentada en las terminaciones nerviosas de frío. Este efecto es específico para la actividad espontánea y no afecta la respuesta a la estimulación por frío, lo que refuerza su potencial terapéutico para aliviar el dolor y la incomodidad asociados con la enfermedad del ojo seco.
6. Los experimentos desarrollados *in vivo* en ratas mostraron que la aplicación tópica de DENAQ en el ojo, fotomodula el reflejo de parpadeo evocado por el frío, pero no así el reflejo de parpadeo evocado por el calor nocivo. Este hallazgo sugiere que el efecto de la molécula no se limita a la actividad espontánea de un tipo de la terminación nerviosa, sino que puede influir en reflejos fisiológicos.

En resumen, los resultados de este trabajo apoyan el uso de fotoconmutadores de azobenceno como una potencial estrategia terapéutica para el manejo del dolor y la molestia ocular en la enfermedad del ojo seco. La capacidad del DENAQ para reducir la actividad nerviosa ectópica de

manera selectiva, sin afectar las respuestas funcionales normales, presentaría una ventaja significativa sobre los tratamientos farmacológicos tradicionales.

5.1. Perspectivas futuras.

A partir de los hallazgos de esta tesis, se proponen las siguientes líneas de investigación:

1. Profundizar en la caracterización de los canales iónicos que contribuyen al bloqueo y desbloqueo mediado por DENAQ, lo que podría permitir el diseño de moléculas más selectivas y potentes.
2. Investigar si el DENAQ y otros fotoconmutadores similares pueden dirigirse de manera más específica a las neuronas sensoriales alteradas que sobreexpresan los canales iónicos P2X, minimizando así los efectos fuera de diana en el tejido sano.
3. Realizar estudios *in vivo* crónicos para evaluar la seguridad, la eficacia y la toxicidad de la aplicación tópica de DENAQ en modelos animales de ojo seco.
4. Determinar el efecto del DENAQ y otros fotoconmutadores similares en la actividad de los distintos tipos funcionales de la córnea de ratón, lo que permitiría el uso de animales modificados genéticamente en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la fotomodulación.
5. Determinar el efecto del DENAQ y otros fotoconmutadores similares en la actividad de los distintos tipos funcionales de receptores sensoriales, en modelos animales de inflamación y lesión nerviosa corneal.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdo, H., Calvo-Enrique, L., Martinez Lopez, J., Song, J., Zhang, M.-D., Usoskin, D., Manira, A. El, Adameyko, I., Hjerling-Leffler, J., & Ernfors, P. (2019). Specialized cutaneous Schwann cells initiate pain sensation. In *Science* (Vol. 365). <https://www.science.org>
- Acosta, M. C., Luna, C., Quirce, S., Belmonte, C., & Gallar, J. (2013). Changes in sensory activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain*, *154*(11), 2353–2362. <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2013.07.012>
- Alamri, A. S., Wood, R. J., Ivanusic, J. J., & Brock, J. A. (2018). The neurochemistry and morphology of functionally identified corneal polymodal nociceptors and cold thermoreceptors. *PLoS ONE*, *13*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195108>
- Aleixandre-Carrera, F., Engelmayer, N., Ares-Suárez, D., Acosta, M. del C., Belmonte, C., Gallar, J., Meseguer, V., & Binshtok, A. M. (2021). Optical assessment of nociceptive TRP channel function at the peripheral nerve terminal. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 2, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22020481>
- Armstrong, C. M., & Hille, B. (1998). Voltage-Gated Ion Channels Review and Electrical Excitability. In *Neuron* (Vol. 20).
- Aronson, J. K. (1992). POTASSIUM CHANNELS IN NERVOUS TISSUE. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 43, Issue 1).
- Bargagna-Mohan, P., Schultz, G., Rheume, B., Trakhtenberg, E. F., Robson, P., Pal-Ghosh, S., Stepp, M. A., Given, K. S., Macklin, W. B., & Mohan, R. (2021). Corneal nonmyelinating Schwann cells illuminated by single-cell transcriptomics and visualized by protein biomarkers. *Journal of Neuroscience Research*, *99*(3), 731–749. <https://doi.org/10.1002/jnr.24757>
- Belmonte, C., Acosta, M. C., & Gallar, J. (2004). Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Experimental Eye Research*, *78*(3), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.023>
- Belmonte, C., Acosta, M. C., Merayo-Llodes, J., & Gallar, J. (2015). What Causes Eye Pain? *Current Ophthalmology Reports*, *3*(2), 111–121. <https://doi.org/10.1007/s40135-015-0073-9>
- Belmonte, C., Aracil, A., Acosta, M. C., Luna, C., Gallar, J., & Foulks, G. N. (2004). Nerves and Sensations from the Eye Surface Clinical Science. In *THE OCULAR SURFACE* (Vol. 2, Issue 4).
- Belmonte, C., Nichols, J. J., Cox, S. M., Brock, J. A., Begley, C. G., Bereiter, D. A., Dartt, D. A., Galor, A., Hamrah, P., Ivanusic, J. J., Jacobs, D. S., McNamara, N. A., Rosenblatt, M. I., Stapleton, F., & Wolffsohn, J. S. (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. In *Ocular Surface* (Vol. 15, Issue 3, pp. 404–437). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.002>
- Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A., & Burnstock, G. (1999). Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *NeuroReport*, *10*(5), 1107–1111. <https://doi.org/10.1097/00001756-199904060-00037>,

- Bocksteins, E., Labro, A. J., Snyders, D. J., & Mohapatra, D. P. (2012). The electrically silent Kv6.4 subunit confers hyperpolarized gating charge movement in Kv2.1/Kv6.4 heterotetrameric channels. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037143>
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Brock, J., Acosta, M. C., Al Abed, A., Pianova, S., & Belmonte, C. (2006). Barium ions inhibit the dynamic response of guinea-pig corneal cold receptors to heating but not to cooling. *Journal of Physiology*, 575(2), 573–581. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.110130>
- Brock, J., Pianova, S., & Belmonte, C. (2001). Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *J Physiol.*, 1;533(Pt 2):493–501.
- Bron, A. J., de Paiva, C. S., Chauhan, S. K., Bonini, S., Gabison, E. E., Jain, S., Knop, E., Markoulli, M., Ogawa, Y., Perez, V., Uchino, Y., Yokoi, N., Zoukhri, D., & Sullivan, D. A. (2017). TFOS DEWS II pathophysiology report. In *Ocular Surface* (Vol. 15, Issue 3, pp. 438–510). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.011>
- Bryant, S. H. (1995). *Ion Channels as Targets for Genetic Disease*.
- Burnstock, G. (2000). P2X receptors in sensory neurones. In *British Journal of Anaesthesia* (Vol. 84, Issue 4).
- Carmen Acosta, M., Luna, C., Quirce, S., Belmonte, C., & Gallar, J. (2014). Corneal sensory nerve activity in an experimental model of UV keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(6), 3403–3412. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13774>
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., & Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, 377(6548), 428–431. <https://doi.org/10.1038/377428A0>,
- Curcic, S., Tiapko, O., & Groschner, K. (2019). Photopharmacology and opto-chemogenetics of TRPC channels-some therapeutic visions. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 200, pp. 13–26). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.003>
- DelMonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 37(3), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
- Dowd, E., McQueen, D. S., Chessell, I. P., & Humphrey, P. P. A. (1998). P2X receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the normal and arthritic rat knee joint. *British Journal of Pharmacology*, 125(2), 341–346. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0702080>
- Down, E., Gallar, J., McQueen, D., Chessell, I., Humphrey, P., & Belmonte, C. (1997). Nociceptors of the cat and rat cornea are not excited by P2X purinoceptor agonist. In *British Journal of Pharmacology - Proceeding Supplement* (pp. 348–348).

- Dunn, P. M., Zhong, Y., & Burnstock, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 65). www.elsevier.com/locate/pneurobio
- Eriksson, J., Bongehiell, U., Kidd, E., Matthews, B., & Fried, K. (1998). *Distribution of P2X 3 receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury*.
- Fakih, D., Baudouin, C., Goazigo, A. R. Le, & Parsadaniantz, S. M. (2020). TRPM8: A therapeutic target for neuroinflammatory symptoms induced by severe dry eye disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21228756>
- Fakih, D., Guerrero-Moreno, A., Baudouin, C., Goazigo, A. R. Le, & Parsadaniantz, S. M. (2021). Capsazepine decreases corneal pain syndrome in severe dry eye disease. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02162-7>
- Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., & Gisselmann, G. (2015). RNA-Seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors. *PLoS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128951>
- Flynn, G. E., & Zagotta, W. N. (2018). Insights into the molecular mechanism for hyperpolarization-dependent activation of HCN channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(34), E8086–E8095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805596115>
- Frank, J. A., Antonini, M. J., Chiang, P. H., Canales, A., Konrad, D. B., Garwood, I. C., Rajic, G., Koehler, F., Fink, Y., & Anikeeva, P. (2020). In Vivo Photopharmacology Enabled by Multifunctional Fibers. *ACS Chemical Neuroscience*, *11*(22), 3802–3813. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00577>
- Frank, J. A., Moroni, M., Moshourab, R., Sumser, M., Lewin, G. R., & Trauner, D. (2015). Photoswitchable fatty acids enable optical control of TRPV1. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8118>
- Frutos-rincón, L., Gómez-sánchez, J. A., Íñigo-portugués, A., Carmen Acosta, M., & Gallar, J. (2022). An Experimental Model of Neuro–Immune Interactions in the Eye: Corneal Sensory Nerves and Resident Dendritic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms23062997>
- Frutos-Rincón, L., Luna, C., Aleixandre-Carrera, F., Velasco, E., Diaz-Tahoces, A., Meseguer, V., Gallar, J., & Acosta, M. C. (2023). The Contribution of TRPA1 to Corneal Thermosensitivity and Blink Regulation in Young and Aged Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(16). <https://doi.org/10.3390/ijms241612620>
- Galor, A., Gallar, J., Acosta, M. C., Meseguer, V., Benítez-Del-Castillo, J. M., Stachs, O., Szentmáry, N., Versura, P., Müller-Lierheim, W. G. K., Belmonte, C., & Pujol-Martí, J. (2025). CORONIS symposium 2023: Scientific and clinical frontiers in ocular surface innervation. *Acta Ophthalmologica*, *103*(4), e240–e255. <https://doi.org/10.1111/aos.17450>

- Gataulina, E. D., Nikolaev, M. V., & Tikhonov, D. B. (2024). Design of Soluble Compounds for Optical Control of Tetrameric P-Loop Ion Channels. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 60(6), 2241–2254. <https://doi.org/10.1134/S0022093024060061>
- Gayton, J. L. (2009). Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. In *Clinical Ophthalmology* (Vol. 3, Issue 1, pp. 405–412). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/opth.s5555>
- Gazerani, P. (2017). Shedding light on photo-switchable analgesics for pain. In *Pain management* (Vol. 7, Issue 2, pp. 71–74). <https://doi.org/10.2217/pmt-2016-0039>
- González-González, O., Bech, F., Gallar, J., Merayo-Llodes, J., & Belmonte, C. (2017). Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(1), 404–415. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20033>
- Guerrero-Moreno, A., Baudouin, C., Melik Parsadaniantz, S., & Réaux-Le Goazigo, A. (2020). Morphological and Functional Changes of Corneal Nerves and Their Contribution to Peripheral and Central Sensory Abnormalities. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.610342>
- Hüll, K., Morstein, J., & Trauner, D. (2018). In Vivo Photopharmacology. In *Chemical Reviews* (Vol. 118, Issue 21, pp. 10710–10747). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00037>
- Ivanusic, J. J., Wood, R. J., & Brock, J. A. (2013). Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 521(4), 877–893. <https://doi.org/10.1002/cne.23207>
- James A Brock, Elspeth M McLachlan, & Carlos Belmonte. (1998). *Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.211bf.x>
- Jin, T., Liu, X., Li, Y., Li, P. C., Wan, M. M., Li, L. J., Shi, L., Fu, Z. Y., & Gao, W. P. (2023). Electroacupuncture Reduces Ocular Surface Neuralgia in Dry-Eyed Guinea Pigs by Inhibiting the Trigeminal Ganglion and Spinal Trigeminal Nucleus Caudalis P2X3R-PKC Signaling Pathway. *Current Eye Research*, 48(6), 546–556. <https://doi.org/10.1080/02713683.2023.2176886>
- JJ Ivanusic, RJ Wood, & JA Brock. (2013). A comparative gene expression profile of the whole eye from human, mouse, and guinea pig. *Journal of Comparative Neurology*, 521.4, 877–893.
- Jones, L., Craig, J. P., Markoulli, M., Karpecki, P., Akpek, E. K., Basu, S., Bitton, E., Chen, W., Dhaliwal, D. K., Dogru, M., Gomes, J. A. P., Koehler, M., Mehta, J. S., Perez, V. L., Stapleton, F., Sullivan, D. A., Tauber, J., Tong, L., Travé-Huarte, S., ... Yoon, K. C. (2025). TFOS DEWS III: Management and Therapy. *American Journal of Ophthalmology*, 279, 289–386. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2025.05.039>
- Kase, D., & Imoto, K. (2012). The Role of HCN Channels on Membrane Excitability in the Nervous System. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/619747>

- Kaufman, P. L., & Alm, A. (2011). *Adler's Physiology of the Eye: Expert Consult - Online and Print* (11th ed).
- King, C. H., Lancaster, E., Salomon, D., Peles, E., & Scherer, S. S. (2014). Kv7.2 regulates the function of peripheral sensory neurons. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(14), 3262–3280. <https://doi.org/10.1002/cne.23595>
- Kiyoi, T., He, Q., Liu, L., Zheng, S., Nakazawa, H., Uwada, J., & Masuoka, T. (2024). Morphological aberration of corneal nerves in hyposecretory dry eye guinea pigs. *Medical Molecular Morphology*. <https://doi.org/10.1007/s00795-024-00407-x>
- Ko, K. W., Rasband, M. N., Meseguer, V., Kramer, R. H., & Golding, N. L. (2016). Serotonin modulates spike probability in the axon initial segment through HCN channels. *Nature Neuroscience*, *19*(6), 823–834. <https://doi.org/10.1038/nn.4293>
- Kovács, I., Luna, C., Quirce, S., Mizerska, K., Callejo, G., Riestra, A., Fernández-Sánchez, L., Meseguer, V. M., Cuenca, N., Merayo-Llodes, J., Acosta, M. C., Gasull, X., Belmonte, C., & Gallar, J. (2016). Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain*, *157*(2), 399–417. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000455>
- Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 72, Issue 19, pp. 3677–3693). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1948-5>
- Lai, H. C., & Jan, L. Y. (2006). The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 7, Issue 7, pp. 548–562). <https://doi.org/10.1038/nrn1938>
- Lainez, S., Tsantoulas, C., Biel, M., & McNaughton, P. A. (2019). HCN3 ion channels: roles in sensory neuronal excitability and pain. *Journal of Physiology*, *597*(17), 4661–4675. <https://doi.org/10.1113/JP278211>
- Landra-Willm, A., Karapurkar, A., Duvéau, A., Chassot, A. A., Esnault, L., Callejo, G., Bied, M., Häfner, S., Lesage, F., Wdziekonski, B., Baron, A., Fossat, P., Marsollier, L., Gasull, X., Boué-Grabot, E., Kienzler, M. A., & Sandoz, G. (2023). A photoswitchable inhibitor of TREK channels controls pain in wild-type intact freely moving animals. *Nature Communications*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36806-4>
- Lerch, M. M., Hansen, M. J., van Dam, G. M., Szymanski, W., & Feringa, B. L. (2016). Neue Ziele für die Photopharmakologie. *Angewandte Chemie*, *128*(37), 11140–11163. <https://doi.org/10.1002/ange.201601931>
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, *377*(6548), 432–435. <https://doi.org/10.1038/377432A0;KWRD=SCIENCE>

- Lum, E., Corbett, M. C., & Murphy, P. J. (2019). Corneal Sensitivity after Ocular Surgery. In *Eye and Contact Lens* (Vol. 45, Issue 4, pp. 226–237). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000543>
- Luo, L., Chang, L., Brown, S. M., Ao, H., Lee, D. H., Higuera, E. S., Dubin, A. E., & Chaplan, S. R. (2007). Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience*, *144*(4), 1477–1485. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.048>
- Martynyuk, N. Y., Maslov, V. Y., Purnyn, H., Fedulova, S. A., & Veselovsky, N. S. (2016). Peculiarities of tetraethylammonium-induced blocking of potassium currents in rat retinal ganglion cells. *Neurophysiology*, *48*(3), 166–170. <https://doi.org/10.1007/s11062-016-9584-8>
- Matthews, B., Li, F., Khakh, B., & Vongsavan, N. (1997). Effects of ATP on sensory receptors in the dental pulp of cats. In *Journal of Physiology-London* (Vol. 504, pp. 128–128).
- Matzner, O., & Devor, M. (1994). Hyperexcitability at Sites of Nerve Injury Depends on Voltage-Sensitive Na⁺ Channels. In *JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY* (Vol. 72, Issue 1).
- Meng, I. D., & Kurose, M. (2013). The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. In *Experimental Eye Research* (Vol. 117, pp. 79–87). <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.08.011>
- Miller, C. (2000). An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, *1*(13). <http://genomebiology.com/2000/1/4/reviews/0004>. <http://genomebiology.com/2000/1/4/reviews/0004>
- Mirmoeini, K., Tajdaran, K., Zhang, J., Gordon, T., Ali, A., Kaplan, D. R., Feinberg, K., & Borschel, G. H. (2023). Schwann Cells Are Key Regulators of Corneal Epithelial Renewal. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *64*(4). <https://doi.org/10.1167/iovs.64.4.7>
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J. L., Bayliss, D. A., & Viana, F. (2014). Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation. *Cell Reports*, *8*(5), 1571–1582. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.003>
- Morstein, J., Impastato, A. C., & Trauner, D. (2021). Photoswitchable Lipids. In *ChemBioChem* (Vol. 22, Issue 1, pp. 73–83). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000449>
- Mourot, A., Fehrentz, T., Le Feuvre, Y., Smith, C. M., Herold, C., Dalkara, D., Nagy, F., Trauner, D., & Kramer, R. H. (2012). Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nature Methods*, *9*(4), 396–402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1897>
- Mourot, A., Herold, C., Kienzler, M. A., & Kramer, R. H. (2018). Understanding and improving photo-control of ion channels in nociceptors with azobenzene photo-switches. *British Journal of Pharmacology*, *175*, 2296. <https://doi.org/10.1111/bph.v175.12/issuetoc>

- Mourot, A., Kienzler, M. A., Banghart, M. R., Fehrentz, T., Huber, F. M. E., Stein, M., Kramer, R. H., & Trauner, D. (2011). Tuning photochromic ion channel blockers. *ACS Chemical Neuroscience*, 2(9), 536–543. <https://doi.org/10.1021/cn200037p>
- Mourot, A., Tochitsky, I., & Kramer, R. H. (2013). Light at the end of the channel: Optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Issue MARCH 2013). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00005>
- Müller, M., Niemeyer, K., Urban, N., Ojha, N. K., Zufall, F., Leinders-Zufall, T., Schaefer, M., & Thorn-Seshold, O. (2022). *BTDAzo - a photoswitchable TRPC5 channel activator*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-hvh6b>
- Na Phuket, T. R., & Covarrubias, M. (2009). Kv4 channels underlie the subthreshold-operating A-type K⁺-current in nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2(JUL). <https://doi.org/10.3389/neuro.02.003.2009>
- Nazempour, R., Zhang, B., Ye, Z., Yin, L., Lv, X., & Sheng, X. (2022). Emerging Applications of Optical Fiber-Based Devices for Brain Research. In *Advanced Fiber Materials* (Vol. 4, Issue 1, pp. 24–42). Springer. <https://doi.org/10.1007/s42765-021-00092-w>
- Nikolaev, M., & Tikhonov, D. (2023). Light-Sensitive Open Channel Block of Ionotropic Glutamate Receptors by Quaternary Ammonium Azobenzene Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/ijms241813773>
- Nikolaev, M. V., Strashkov, D. M., Ryazantsev, M. N., & Tikhonov, D. B. (2021). Optical Control of N-Methyl-d-aspartate Receptors by Azobenzene Quaternary Ammonium Compounds. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(18), 3347–3357. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00310>
- Nikonov, S., Dolgova, N., Sudharsan, R., Tochitsky, I., Iwabe, S., Guzman, J. M., Van Gelder, R. N., Kramer, R. H., Aguirre, G. D., & Beltran, W. A. (2022). Photochemical Restoration of Light Sensitivity in the Degenerated Canine Retina. *Pharmaceutics*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122711>
- Ojeda-Alonso, J., Calvo-Enrique, L., Paricio-Montesinos, R., Kumar, R., Zhang, M. D., Poulet, J. F. A., Ernfors, P., & Lewin, G. R. (2024). Sensory Schwann cells set perceptual thresholds for touch and selectively regulate mechanical nociception. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44845-8>
- Orio, P., Madrid, R., De La Peña, E., Parra, A., Meseguer, V., Bayliss, D. A., Belmonte, C., & Viana, F. (2009). Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *Journal of Physiology*, 587(9), 1961–1976. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165738>
- Palchevskiy, S., Czarnocki-Cieciura, M., Vistoli, G., Gervasoni, S., Nowak, E., Beccari, A. R., Nowotny, M., & Talarico, C. (2023). Structure of human TRPM8 channel. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05425-6>
- Park, R., Spritz, S., Zeng, A. Y., Erukulla, R., Zavala, D., Merchant, T., Gascon, A., Jung, R., Bigit, B., Azar, D. T., Chang, J. H., Jalilian, E., Djalilian, A. R., Guaiquil, V. H., & Rosenblatt, M. I. (2025).

Corneal Sensory Receptors and Pharmacological Therapies to Modulate Ocular Pain. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 26, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms26104663>

- Parra, A., Gonzalez-Gonzalez, O., Gallar, J., & Belmonte, C. (2014). Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain*, *155*(8), 1481–1491. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.04.025>
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., Del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M. C., Gallar, J., Dhaka, A., Viana, F., & Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature Medicine*, *16*(12), 1396–1399. <https://doi.org/10.1038/nm.2264>
- Peng, J., Yang, N., Qiao, Z., Wei, N., Wang, K., & Zhang, Y. (2025). Photochemical control of cold-sensitive TRPA1 ion channel gating for modulation of pain sensation. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.70038>
- Perez, V. L., Chen, W., Craig, J. P., Dogru, M., Jones, L., Stapleton, F., Wolffsohn, J. S., & Sullivan, D. A. (2025). TFOS DEWS III: Executive Summary. *American Journal of Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2025.09.035>
- Pflugfelder, S. C., & de Paiva, C. S. (2017). The Pathophysiology of Dry Eye Disease: What We Know and Future Directions for Research. *Ophthalmology*, *124*(11), S4–S13. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.07.010>
- Pina, R., Ugarte, G., Campos, M., Inigo-Portugues, A., Olivares, E., Orio, P., Belmonte, C., Bacigalupo, J., & Madrid, R. (2019). Role of trpm8 channels in altered cold sensitivity of corneal primary sensory neurons induced by axonal damage. *Journal of Neuroscience*, *39*(41), 8177–8192. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0654-19.2019>
- Quallo, T., Vastani, N., Horridge, E., Gentry, C., Parra, A., Moss, S., Viana, F., Belmonte, C., Andersson, D. A., & Bevan, S. (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8150>
- Quirce Vázquez, S. (2020). *Actividad de los nervios sensoriales de la córnea durante la deficiencia lagrimal crónica y su modulación farmacológica*. <http://dspace.umh.es/handle/11000/25635>
- Ramentol, R., Perez, M. E., & Larsson, H. P. (2020). Gating mechanism of hyperpolarization-activated HCN pacemaker channels. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15233-9>
- Ramírez, D., Zúñiga, R., Concha, G., & Zúñiga, L. (2018). HCN Channels: New therapeutic targets for pain treatment. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23092094>
- Rinwa, P., Calvo-Enrique, L., Zhang, M. D., Nyengaard, J. R., Karlsson, P., & Ernfors, P. (2021). Demise of nociceptive Schwann cells causes nerve retraction and pain hyperalgesia. *Pain*, *162*(6), 1816–1827. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002169>

- Sartiani, L., Mannaioni, G., Masi, A., Romanelli, M. N., & Cerbai, E. (2017). The hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels: From biophysics to pharmacology of a unique family of ion channels. *Pharmacological Reviews*, *69*(4), 354–395.
<https://doi.org/10.1124/pr.117.014035>
- Shaheen, B. S., Bakir, M., & Jain, S. (2014). Corneal nerves in health and disease. In *Survey of Ophthalmology* (Vol. 59, Issue 3, pp. 263–285). Elsevier USA.
<https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.09.002>
- Shiratori-Hayashi, M., Hasegawa, A., Toyonaga, H., Andoh, T., Nakahara, T., Kido-Nakahara, M., Furue, M., Kuraishi, Y., Inoue, K., Dong, X., & Tsuda, M. (2019). Role of P2X3 receptors in scratching behavior in mouse models. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *143*(3), 1252-1254.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.053>
- Staikopoulos, V., Sessle, B. J., Furness, J. B., & Jennings, E. A. (2007). Localization of P2X2 and P2X3 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience*, *144*(1), 208–216.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.035>
- Stapleton, F., Argüeso, P., Asbell, P., Azar, D., Bosworth, C., Chen, W., Ciolino, J. B., Craig, J. P., Gallar, J., Galor, A., Gomes, J. A. P., Jalbert, I., Jie, Y., Jones, L., Konomi, K., Liu, Y., Merayo-Llloves, J., Oliveira, F. R., Perez, V. L., ... Dogru, M. (2025). TFOS DEWS III: Digest. In *American Journal of Ophthalmology* (Vol. 279, pp. 451–553). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2025.05.040>
- Stewart, R. G., Camacena, M., Copits, B. A., & Sack, J. T. (2024). Distinct cellular expression and subcellular localization of Kv2 voltage-gated K⁺ channel subtypes in dorsal root ganglion neurons conserved between mice and humans. *Journal of Comparative Neurology*, *532*(2).
<https://doi.org/10.1002/cne.25575>
- Stillwell, W. (2013). Membrane Transport. In *An Introduction to Biological Membranes* (pp. 305–337). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52153-8.00014-3>
- Takashima, Y., Ma, L., & McKemy, D. D. (2010). The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience*, *169*(2), 828–842.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.039>
- Tochitsky, I., Helft, Z., Meseguer, V., Fletcher, R. B., Vessey, K. A., Telias, M., Denlinger, B., Malis, J., Fletcher, E. L., & Kramer, R. H. (2016). How Azobenzene Photoswitches Restore Visual Responses to the Blind Retina. *Neuron*, *92*(1), 100–113.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.038>
- Tochitsky, I., Kienzler, M. A., Isacoff, E., & Kramer, R. H. (2018). Restoring Vision to the Blind with Chemical Photoswitches. In *Chemical Reviews* (Vol. 118, Issue 21, pp. 10748–10773). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00723>
- Tochitsky, I., Polosukhina, A., Degtyar, V. E., Gallerani, N., Smith, C. M., Friedman, A., Van Gelder, R. N., Trauner, D., Kaufer, D., & Kramer, R. H. (2014). Restoring visual function to blind mice with

a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells. *Neuron*, 81(4), 800–813. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.003>

Tochitsky, I., Trautman, J., Gallerani, N., Malis, J. G., & Kramer, R. H. (2017). Restoring visual function to the blind retina with a potent, safe and long-lasting photoswitch. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep45487>

Tsantoulas, C., Zhu, L., Yip, P., Grist, J., Michael, G. J., & McMahon, S. B. (2014). Kv2 dysfunction after peripheral axotomy enhances sensory neuron responsiveness to sustained input. *Experimental Neurology*, 251, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.11.011>

Vetter, I., Hein, A., Sattler, S., Hessler, S., Touska, F., Bressan, E., Parra, A., Hager, U., Leffler, A., Boukalova, S., Nissen, M., Lewis, R. J., Belmonte, C., Alzheimer, C., Huth, T., Vlachova, V., Reeh, P. W., & Zimmermann, K. (2013). Amplified cold transduction in native nociceptors by M-channel inhibition. *Journal of Neuroscience*, 33(42), 16627–16641. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1473-13.2013>

Viana, F., & Belmonte, C. (2008). Funny currents are becoming serious players in nociceptor's sensitization. In *Journal of Physiology* (Vol. 586, Issue 24, pp. 5841–5842). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165852>

Wolffsohn, J. S., Benítez-Del-Castillo, J. M., Loya-Garcia, D., Inomata, T., Iyer, G., Liang, L., Pult, H., Sabater, A. L., Starr, C. E., Vehof, J., Wang, M. T. M., Chen, W., Craig, J. P., Dogru, M., Perez, V. L., Stapleton, F., Sullivan, D. A., & Jones, L. (2025). TFOS DEWS III: Diagnostic Methodology. In *American Journal of Ophthalmology* (Vol. 279, pp. 387–450). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2025.05.033>

Young, G. T., Emery, E. C., Mooney, E. R., Tsantoulas, C., & McNaughton, P. A. (2014). Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. *Pain*, 155(9), 1708–1719. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.05.021>

Zeiss, C. J., Tu, D. C., Phan, I., Wong, R., & Treuting, P. M. (2017). Special Senses: Eye. In *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition* (pp. 445–470). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00021-X>

Zheng, Y., Liu, P., Bai, L., Trimmer, J. S., Bean, B. P., & Ginty, D. D. (2019). Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties. *Neuron*, 103(4), 598–616.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.039>

RESEARCH ARTICLE



Optochemical modulation of corneal cold nerve terminal impulse activity with a photochromic ion channel blocker

David Ares-Suárez^{1,2} | Almudena Iñigo-Portugués¹ | Enrique Velasco¹ |
 Susana Quirce¹ | Fernando Aleixandre-Carrera¹ | Ariadna Díaz-Tahoces¹ |
 M. Carmen Acosta¹ | Wan-Chen Lin³ | Richard H. Kramer³ |
 Carlos Belmonte¹ | Juana Gallar^{1,2} | Victor Meseguer¹

¹Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Sant Joan d'Alacant, Spain

²Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante, Alicante, Spain

³Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley, California, USA

Correspondence

Victor Meseguer, Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Sant Joan d'Alacant, Spain.
 Email: vmeseguer@umh.es

Funding information

MICIU/AEI, Grant/Award Numbers: RTI2018-100994-AI00, PID2021-124460OB-I00, PID2023-147915OB-I00; Conselleria de Cultura, Educación y Ciencia, Generalitat Valenciana, Grant/Award Number: CIPROM/2021/48

Background and Purpose: The functional organization of corneal cold nerve endings, critical structures in maintaining the ocular surface, remains poorly understood. Here, the photoisomerizable small-molecule diethylamine-azobenzene-quaternary ammonium (DENAQ) was used to photomodulate activity of cold-sensing nerve terminals in control and chronic tear-deficient corneas. Furthermore, DENAQ was used for in vivo photochemical regulation of the thermally induced blink reflex.

Experimental Approach: Extracellular nerve terminal impulse activity was recorded on cold terminals in excised corneas of naïve and tear-deficient guinea pigs pre-incubated with DENAQ. Pulses of light at a wavelength of 460 nm were delivered to the perfused corneas. The thermally induced blink reflex was assessed using orbicularis oculi electromyography in anaesthetised rats after topical administration of DENAQ to the eye under blue light and darkness conditions.

Key Results: Exposure to blue light robustly reduced spontaneous activity of both naïve and tear-deficient cold nerve terminals pre-incubated with DENAQ, while cold-evoked responses remained unaffected. Pre-incubation of excised corneas with DENAQ, along with pharmacological P2X receptor antagonists, prevented the DENAQ-mediated photoreduction of the cold nerve terminal spontaneous activity. In addition, blue light increased cold-evoked reflex blink in eyes pre-treated with DENAQ.

Conclusion and Implications: DENAQ enters guinea pig cold sensory nerve endings primarily through P2X channels in excised corneas. Subsequently, DENAQ decreases the spontaneous nerve terminal impulse activity upon light irradiation by modulating voltage-gated potassium (K_v) channel activity. Furthermore, the cold-evoked blink reflex is modulated by light in DENAQ-treated eyes. Chemical photoswitches like

Abbreviations: AUC, area under the curve; DENAQ, diethylamine-azobenzene-quaternary ammonium; DRG, dorsal root ganglion; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; HCN, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (channels); K_v , voltage-gated potassium (channels); NTI, nerve terminal impulse; OOemg, orbicularis oculi electromyography; TEA, tetraethylammonium; TG, trigeminal ganglion.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2025 The Author(s). *British Journal of Pharmacology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Pharmacological Society.

DENAQ might be potential new treatments for ocular discomfort and pain in dry eye disease.

KEYWORDS

chemical photoswitches, cornea cold nerve endings, DENAQ, dry eye, ocular discomfort, P2X channels, voltage-gated potassium channels

1 | INTRODUCTION

Corneal cold receptors are peripheral axons of trigeminal ganglion (TG) neurons that are specialized for the sensory transduction of cold temperatures. Their ability to detect cooling of the ocular surface relies on the expression of **TRPM8** ion channels, which are activated by small temperature drops and osmolarity changes (González-González et al., 2017; Parra et al., 2010, 2014; Quallo et al., 2015). Both stimuli occur naturally under dry environments due to tear evaporation (Hirata & Meng, 2010; Purslow & Wolffsohn, 2007). Subsequently, action potentials from stimulated cold thermoreceptors propagate to higher order brainstem neurons (Belmonte et al., 2017; Marfurt, 1981; Pozo & Cervero, 1993). These neurons reflexively regulate tear flow and blinking rate (Parra et al., 2010; Quallo et al., 2015). Additionally, the information transmitted to the somatosensory cortex elicits conscious sensations of cooling or dryness, depending on the extent of the temperature reduction (Belmonte et al., 2017; Moulton et al., 2012). Dry eye, a common ocular disease associated with ageing, causes discomfort and unpleasant sensations of dryness as its primary symptoms (Vehof et al., 2013). In a chronic tear-deficient guinea pig model, corneal cold sensory endings exhibit increased excitability due to functional changes in sodium and potassium voltage-gated channels (Kovács et al., 2016).

Photoisomerizable small molecules, also known as photoswitches, can modulate neural activity by interacting with native ion channels without requiring exogenous gene expression. DENAQ, a synthetic photochromic blocker of ion channel (Mourot et al., 2011), confers light sensitivity to mouse retinal ganglion cells as well as binaural auditory gerbil neurons (Ko et al., 2016; Tochitsky et al., 2014, 2016). However, it remains unknown whether DENAQ can modulate the electrical activity of neural structures located far from the neuron cell body, such as corneal sensory nerve endings.

The cornea is a transparent and structurally simple tissue. Its nerve axons end a few μm below the epithelial surface, allowing for direct electrophysiological recording of identified nerve endings. This activity can be remotely controlled with light (Aleixandre-Carrera et al., 2021). Therefore, we selected this tissue as a model for combining treatment with DENAQ and electrophysiological approaches in guinea pig corneal cold sensory nerve endings.

A better understanding of the functional organization of the membrane channels of cold sensory nerve endings is necessary due to the crucial role that cold thermoreceptors play in the physiological and pathological states of the ocular surface. Previous studies have

What is already known

- The activity of corneal cold nerve endings is essential for maintaining ocular surface health.
- Photoisomerizable molecule DENAQ permeates P2X7 ion channels, conferring light sensitivity to mouse retinal ganglion cells.

What does this study add

- DENAQ enters the cold-sensitive nerve endings of guinea pig corneas primarily through P2X3 ion channels.
- DENAQ photomodulates corneal cold nerve activity under blue light in guinea pig and rat models.

What is the clinical significance

- Topical DENAQ may help reduce the increased activity of corneal sensory nerve terminals following injury.
- Photoswitches such as DENAQ might be potential new treatments for dry eye disease.

shown that **P2X** receptors mediate photoswitch entry to degenerated retinal ganglion cells in a mouse model of retinitis pigmentosa. Once inside the cell, DENAQ targets voltage-gated potassium (**K_v**) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (**HCN**) ion channels, which allows light to control the firing of action potentials in these cells (Tochitsky et al., 2014, 2016). Based on this, we hypothesized that DENAQ-mediated photosensitivity could act as a highly sensitive reporter for the functional expression of P2X ion channels in peripheral nerve endings, including corneal cold sensory endings.

Here, using animal models, we have found that DENAQ primarily enters corneal cold sensory nerve endings through P2X ion channels. This compound produced, in the presence of light, a robust decrease of the spontaneous electrical activity of the cold nerve terminals, in both control and pathological conditions such as chronic tear deficiency. Also, we demonstrated the ability of DENAQ to photomodulate the cold-evoked blink reflex after its topical instillation onto the eye.

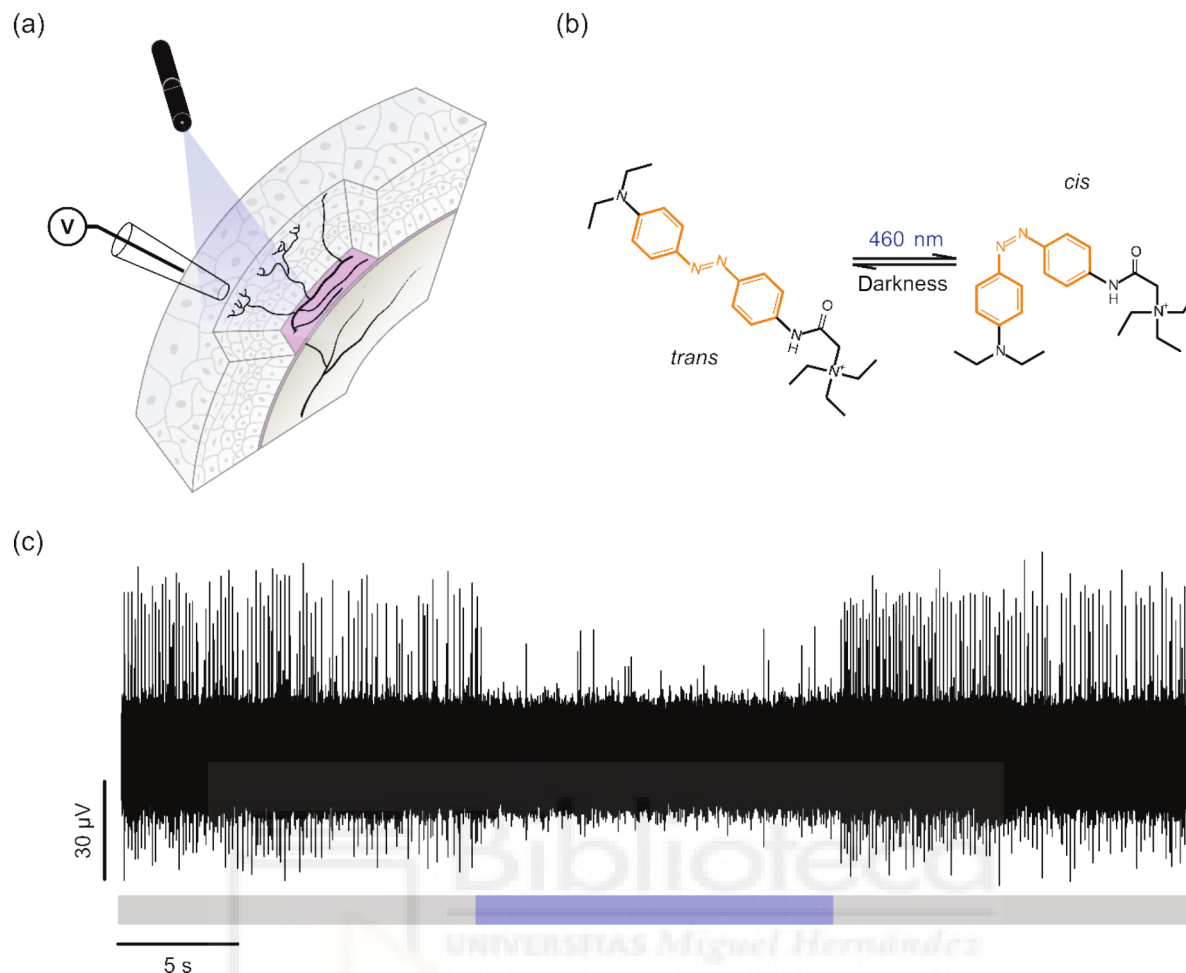


FIGURE 1 (a) Illustration of the electrophysiological extracellular recording of nerve terminal impulses (NTIs) at excised guinea pig corneas. An LED-emitting light of 460 nm of wavelength was applied. (b) Chemical structure of DENAQ in *trans* (darkness) and *cis* conformation (light). The light-sensitive component of DENAQ, azobenzene, is highlighted in orange. (c) Example of the spontaneous NTI activity recorded at a constant temperature of 34°C in a guinea pig corneal cold-sensitive nerve terminal in darkness (grey bars) and under light irradiation (blue bar).

2 | METHODS

2.1 | Experimental animals

All animal care and experimental procedures followed the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the European Union Directive (2010/63/EU), and the Spanish regulations on the protection of animals used for experimentation and scientific purposes. The protocol was approved by the Committee on Ethics and Integrity in Research of the University Miguel Hernández. All animals were randomly assigned to the experimental groups. Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology* (Lilley et al., 2020).

Dunkin Hartley guinea pigs (Envigo RMS Spain SL, Barcelona, Spain) of both sexes were used at 2–3 months, transgenic TRPM8^{BAC}-EYFP mice of both sexes (institutional animal facility, Instituto de Neurociencias, San Juan de Alicante, Spain) (Morenilla-Palao et al., 2014) were used at 3–6 months, and Wistar rats (Harlan Laboratories SA,

Barcelona, Spain) were used at the age of 4 months old (2 female/1 male; not intended to compare by sexes). The animals were kept in individual cages, maintained in a 12-h light/dark cycle, and housed in a temperature-controlled (23 ± 2 °C) and humidity-controlled (55 ± 10 %) facility with food and water available ad libitum.

2.2 | Corneal nerve terminal electrophysiological recordings

Corneas were prepared for electrophysiological recordings following the protocol described by Acosta et al. (2013). The corneas were cut circularly at the limbus using iris scissors and then gently placed in a beaker with a physiological solution. The solution had a composition of 133.4-mM NaCl, 4.7-mM KCl, 2-mM CaCl₂, 1.2-mM MgCl₂, 16.3-mM NaHCO₃, 1.3-mM NaH₂PO₄ and 9.8-mM glucose, with an osmolarity of 310 mOsm·L⁻¹, and bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) for 60 min to maintain pH at 7.4. The corneas were cut into two equal pieces and then incubated with DENAQ at 200 μM or

2 mM for 40 min at 34°C. Next, each piece of cornea was placed in a perfusion chamber, fixed and secured with insect pins to the silicone at the bottom of the chamber (Sylgard 184; Dow Corning, Midland, MI, USA). Extracellular recording of nerve terminal impulses (NTIs) was used to detect the activity of corneal cold thermoreceptors. This was achieved by applying a 50- μ m-diameter glass micropipette onto the corneal surface under gentle suction, as described by Brock et al. (1998) (Figure 1a). A maximum of one nerve terminal was recorded from each piece of cornea. The corneas were continuously superfused with the physiological solution at a 2.5-ml·min⁻¹ flow during the electrophysiological recording. The bath solution temperature was kept at 34°C (basal temperature) using a feedback-regulated, homemade Peltier device. Cold ramps were applied to 15°C using a Peltier device. The recording electrode, made of Ag, was placed inside the glass micropipette. Electrical signals were recorded relative to an Ag/AgCl pellet placed in the chamber. The electrical activity was amplified by a factor of 100 using the NL 103 AC amplifier (Digitimer, Welwyn, UK). The signal was then filtered using the NL 125/NL 126 filter from Digitimer, with a high-pass filter of 5 Hz and a low-pass filter of 5 kHz. The filtered signal was stored in a computer at a 20-kHz rate using a CED interface and Spike2 software. Only NTIs originating from single cold-sensitive terminals were selected for further study. They were identified by their relatively high level of regular spontaneous discharge, occasionally in bursts, that increased prominently with cooling. The ongoing NTI activity at the basal temperature was recorded for at least 100 s before applying the light stimulation protocol.

2.3 | Chronic tear-deficiency model

Chronic tear deficiency is commonly used as an animal model of dry eye disease. Tear deficiency is induced by excising the main lacrimal gland on the left and right sides (Kovács et al., 2016). Guinea pigs were anaesthetised with ketamine (90 mg·kg⁻¹ i.p.) and xylazine (5 mg·kg⁻¹ i.p.). An 8-mm skin incision was then made on the temporal side, posterior to the lateral canthus, over the fibrous capsule of the exorbital gland to access the main lacrimal gland, which was then gently excised. The surgical site was inspected to confirm the complete removal of all remaining glandular tissue. An antibiotic drop (tobramycin, 3 mg·ml⁻¹) was applied to the surgical site to prevent infection and promote animal welfare. Finally, the skin incision was sutured with a 6.0 braided silk suture. Animals were individually housed for 1 month, and signs of conjunctival, corneal and systemic inflammation were periodically checked. To ascertain the effectiveness of the surgery, tear volume was measured using a phenol red thread (Zone-Quick, Menicon, Nagoya, Japan) before the surgery (at 2 months of age) and on the day of electrophysiological recording 4 weeks later (at 3 months of age).

2.4 | Light stimulation

To induce photoisomerization of DENAQ, an LED emitting at a wavelength of 460 nm (Prizmatix Ltd., Holon, Israel) was used (Figure 1a,c).

The incident light intensity at the cornea was 60 mW·cm⁻². The light protocol consisted of five cycles of alternating dark/light pulses (photocycles) of 15 s each, followed by three consecutive cooling ramps from 34°C to 15°C of 30-s duration at an average cooling rate of -0.5°C·s⁻¹. The first and third cooling ramps were conducted under dark conditions, whereas the second was performed under light irradiation (Figure 3a). The light-induced change in the NTI frequency of cold nerve terminals that were pre-incubated with DENAQ was referred to as photoswitching (PS) and was calculated as follows:

$$\frac{\text{NTI frequency in dark} - \text{NTI frequency in light}}{\text{NTI frequency in dark}} \times 100$$

For all electrophysiological recordings in guinea pigs, it was considered that a change in the same direction should occur five times because five photocycles were applied to each nerve terminal to evaluate photoswitching.

2.5 | Immunohistochemistry

The immuno-related procedures used comply with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology* (Alexander et al., 2018). TRPM8^{BAC}-EYFP mice were humanely killed with an intraperitoneal overdose of sodium pentobarbital (Dolethal, Vetoquinol, Lure, France), followed by cervical dislocation. The eyes were then carefully enucleated and fixed in methanol and DMSO (4:1) for 2 h at room temperature (22°C). Afterward, the eyes were incubated for 5 min at -20°C in 100% methanol, rehydrated and washed five times in phosphate-buffered saline (PBS) (5 × 15 min). The corneas were isolated, cut into quadrants and incubated for 2 h at room temperature in a blocking solution containing 5% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 1% bovine serum albumin (Vector Laboratories) and 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) at room temperature for 2 h. Subsequently, the corneas were incubated with primary antibodies diluted in the blocking solution for 4 days at 4°C. Rabbit anti-P2X2 (1:50; Alomone Labs Cat# APR-016, RRID:AB_2313760) and anti-P2X3 (1:50; Alomone Labs Cat# APR-003, RRID:AB_2040054), mouse anti-neuronal class III β -tubulin (1:500; Covance Cat# MMS-435P, RRID:AB_2313773) and chicken anti-GFP (1:500; Abcam Cat# ab13970, RRID:AB_300798) were utilized. After rinsing with PBS, corneas were incubated with secondary antibodies Alexa Fluor 488 goat anti-chicken IgG (1:500; Molecular Probes Cat# A-11039, RRID:AB_142924), Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (1:500; Thermo Fisher Scientific Cat# A32727, RRID:AB_2633276) and Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (1:500; Thermo Fisher Scientific Cat# A32733, RRID:AB_2633282) in PBS for 2 h at room temperature, followed by incubation with Hoechst 33342 at 10 μ g·ml⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 10 min at room temperature. After rinsing with PBS, corneas were mounted with Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific).

Fluorescence images were captured with a Zeiss LSM 880 laser scanning confocal microscope equipped with an LD LCI Plan-Apochromat 25×/0.8 Imm Korr DIC M27 objective (Carl Zeiss AG). The images were analysed using Fiji software (ImageJ 1.4, NIH).

2.6 | Orbicularis oculi electromyography (OOemg) recording

Under isoflurane anaesthesia, Wistar rats (two female/one male) were placed in a stereotaxic frame, and vital constants were monitored and maintained within physiological values. A pair of Teflon-coated steel wires (0.002-in. bare diameter, 0.0045-in. coated diameter; A-M Systems, WA, USA) with 1 mm exposed at the tip was implanted near the temporal and frontal portions of the orbicularis oculi muscle for chronic recording of OOemg signals. The recording wires were led to a connector that was firmly adhered to the skull using acrylic dental resin (DuraLay[®], Reliance, IL, USA) and four stainless steel screws. A silver wire (0.005-in. bare diameter, 0.007-in. coated diameter; A-M Systems) connected to one of the screws served as ground. The animals received analgesic treatment (0.05-mg·kg⁻¹ buprenorphine, Buprecare[®] 0.3 mg·ml⁻¹, DVF, Spain) for 3 days following surgery and were kept isolated to prevent any implant damage. Rats were allowed to recover for 10 days before the recording session. Then, the rats were anaesthetised again, and the electrical OOemg signals evoked by cold and heat stimuli were recorded. OOemg activity was amplified, band-pass filtered (300–3000 Hz), digitized and stored using an interface (Micro3 1401, CED, Cambridge, UK) and specific software (Spike2 v7.0, CED, Cambridge, UK) for offline analysis. The number of blinks elicited by each stimulus, as well as the duration, and the area under the curve (AUC) of the evoked response were analysed.

The ocular surface thermal stimulation was performed by instilling on the cornea 20- μ l saline drops at different temperatures. Cold stimuli induced a decrease in ocular surface temperature from the basal temperature (32°C to 30°C) down to 15°C. Saline drops producing temperature increases up to 40°C to 42°C were used for noxious heat stimulation. The temperature of the ocular surface was continuously recorded with a high-speed thermal probe (IT-24P, Physitemp, BAT-12, Clifton, NJ, USA) placed in close contact with the cornea. Stimuli were spaced at least 30 s apart to allow the ocular surface temperature to return to its basal value after each stimulus. The dark/light conditions were alternated under basal conditions. Then animals were treated topically with DENAQ. For this purpose, 10- μ l drops of 20-mM DENAQ were instilled onto the ocular surface at regular intervals of 30 s, for 40 min.

2.7 | Data and statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations of the *British Journal of Pharmacology* on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2025). Data were collected

and processed for statistical analysis using a free trial of GraphPad Prism 9 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The Shapiro–Wilk normality test was initially applied to data samples. Non-normally distributed data are presented as median and interquartile range (IQR = 25% quartile to 75% quartile), while normally distributed data are expressed as mean \pm SEM. A *P* value of 0.05 or less was considered significant. When comparing two samples, either a *t* test or a non-parametric equivalent was applied. For comparing multiple samples, either ANOVA or a non-parametric counterpart was used. The specific tests are indicated in the text and figure captions.

2.8 | Materials

DENAQ was synthesized according to Mourot et al. (2011) and obtained from Jubilant Chemsys, Ltd. (Noida, UP, India). It was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a stock concentration of 200 mM. Stock solutions were prepared by dissolving the drug in distilled water at the following concentrations: cilobradine (24.01 mM; Sigma-Aldrich), capsazepine (100 mM; Tocris Bioscience, Bristol, UK), suramin hexasodium salt (50 mM; Tocris Bioscience), TNP-ATP triethylammonium salt (10 mM; Tocris Bioscience) and purotoxin-1 (0.1 mM; Smartox Biotechnology, Saint-Égrève, France). A stock solution of A740003 from Sigma-Aldrich dissolved in ethanol at a concentration of 20 mM was also prepared. All chemicals were then diluted to their respective working concentrations with the physiological solution.

2.9 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org> and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24 (Alexander, Fabbro, Kelly, Mathie, Peters, Veale, Armstrong, Faccenda, Harding, Davies, Amarosi, et al., 2023; Alexander, Fabbro, Kelly, Mathie, Peters, Veale, Armstrong, Faccenda, Harding, Davies, Annett, et al., 2023; Alexander, Mathie, Peters, Veale, Striessnig, Kelly, Armstrong, Faccenda, Harding, Davies, Aldrich, et al., 2023).

3 | RESULTS

3.1 | DENAQ confers light sensitivity to the spontaneous activity of corneal cold nerve terminals

Nerve terminal impulse (NTI) activity was measured in cold nerve terminals of excised guinea pig corneas pre-incubated with DENAQ. Cold thermoreceptor terminals fired spontaneous NTIs at 34°C. The frequency markedly increased in response to a cooling ramp down to 15°C, allowing their identification and characterization (Figure 2a,b).

Before being exposed to light, cold nerve terminals that were treated with 200- μ M DENAQ showed a lower frequency of spontaneous NTI, compared to untreated terminals (Figure 2c,d).

DENAQ is a red-shifted photochemical that undergoes a rapid *trans-to-cis* conversion upon exposure to light in the visible spectrum, with a peak at 470 nm (Mouro et al., 2011). It returns to its *trans* form in the dark (Figure 1b). To determine the effect of DENAQ photoisomerization on the electrical activity of peripheral sensory nerve terminals isolated from their cell bodies, an LED was used to deliver light at 460 nm in five photocycles, as shown in Figure 2a,b. We first observed that light exposure did not affect spontaneous activity in untreated corneas (Figure 2c). In contrast, the mean spontaneous activity of cold thermoreceptors pre-incubated with DENAQ was significantly lower upon light irradiation compared to the activity displayed in the dark in 9 out of 15 cold nerve terminals (Figure 2d). Notably, spontaneous activity increased in the dark after each light pulse along the five photocycles in corneas pre-incubated with DENAQ (Figure 2b,d).

Together, these results demonstrate that DENAQ, in addition to pharmacologically blocking the spontaneous activity of cold nerve terminals, allows its photoreduction on the guinea pig cornea.

3.2 | DENAQ does not affect cold-evoked responses of corneal sensory nerve terminals

We next investigated whether DENAQ could photomodulate responses to cold at the nerve terminal. Cooling ramps were applied to corneas pre-treated with 200- μ M DENAQ in the dark or during LED irradiation (Figure 3a). The first cooling in the dark ramp evoked a median peak frequency of NTIs at cold thermoreceptors which was not significantly different from the frequency under LED irradiation (Figure 3b). Furthermore, the cooling threshold in the dark did not significantly differ from that in the light (Figure 3c). These results show that DENAQ does not photomodulate the cold-evoked nerve activity on the guinea pig cornea.

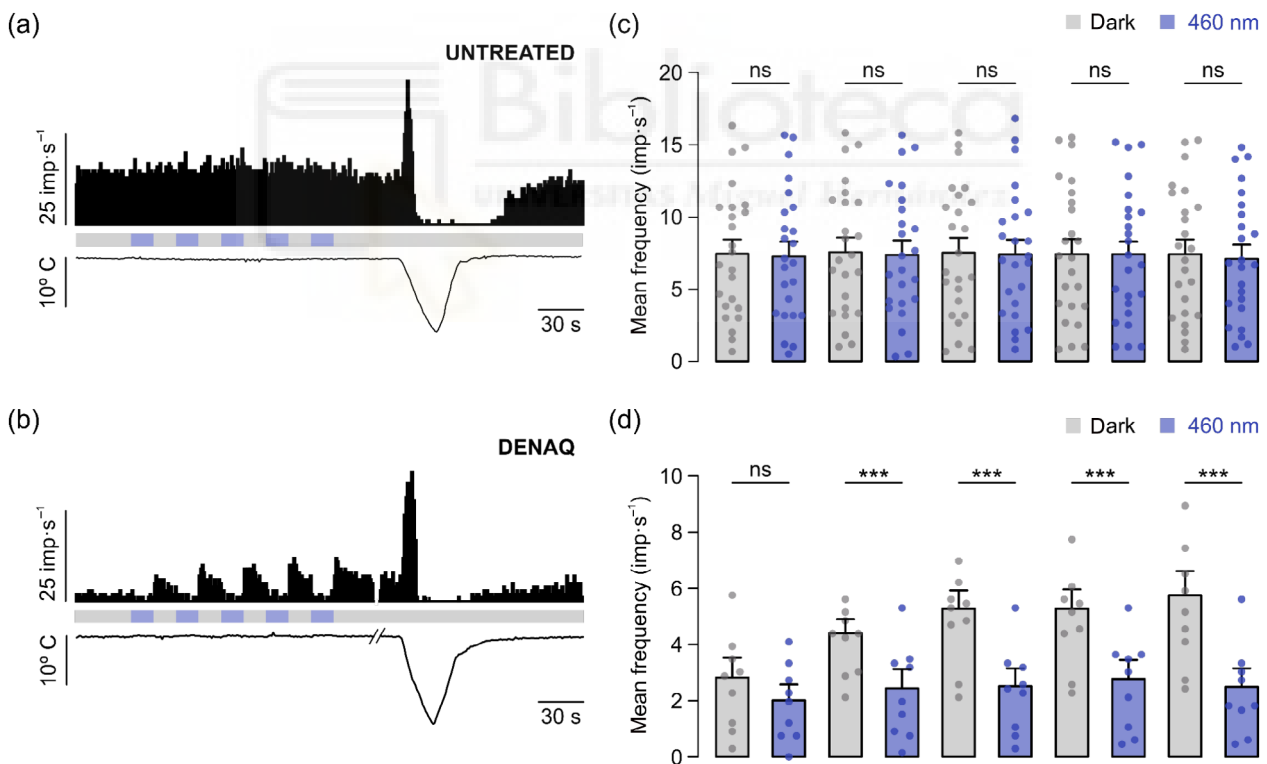


FIGURE 2 Photomodulation of the spontaneous activity of cold nerve terminals in excised guinea pig corneas pre-incubated with DENAQ. Spontaneous activity rate histogram during a recording period that includes five photocycles of darkness/460-nm LED illumination in an untreated cornea (a) and a cornea pre-incubated with 200- μ M DENAQ (b). Mean frequency recorded during light application (in blue) and dark (in grey) from non-incubated ($n = 24$ nerve terminals, 12 animals) (c) and DENAQ pre-incubated corneal cold nerve terminals ($n = 9$ nerve terminals, 3 animals) (d). Note that the mean NTI frequency was lower ($P < 0.001$; Student *t*-test) in DENAQ pre-incubated (first bar in grey) in comparison to non-incubated corneas (first bar in grey). The percentage of spontaneous NTI frequency reduction in response to light irradiation compared to dark conditions was statistically significant in DENAQ-preincubated corneal cold nerve terminals ($PS = 46.0 \pm 2.3\%$, $n = 45$ photocycles, $P < 0.001$, one-sample *t*-test) (c), in contrast to untreated DENAQ nerve terminals ($PS = -1.3 \pm 2.3\%$, $n = 120$ photocycles, one-sample *t*-test) (d). Differences in NTI mean frequency between light and dark conditions within each photocycle were compared using one-way repeated measures ANOVA. *** $P \leq 0.001$, significantly different as indicated, ns, not significant; Holm-Šidák method.

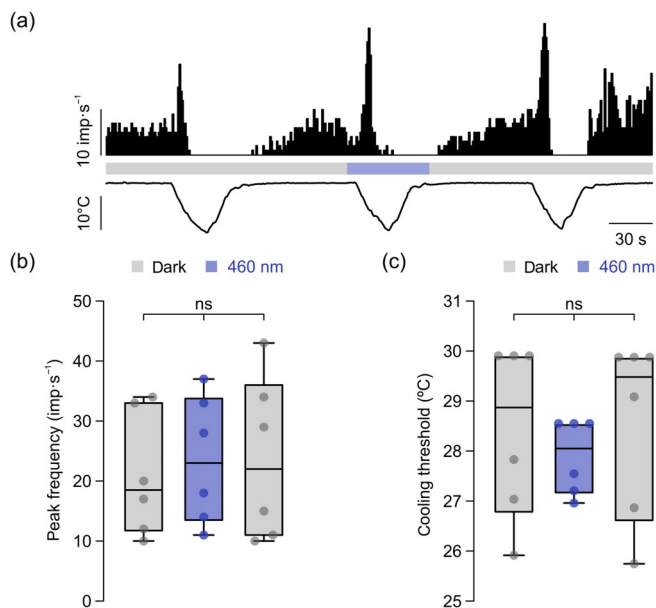


FIGURE 3 Effects of light on cold-evoked responses of nerve terminals in excised corneas pre-incubated with DENAQ. (a) Sample rate histogram of the nerve terminal impulses (NTIs) at corneal nerve terminals pre-incubated with DENAQ (200 μ M) in response to cooling ramps in darkness (grey bar) and upon LED illumination (blue bar). (b) Box plot showing the frequency of NTIs at the peak response reached under cold stimulation and (c) cooling threshold temperature in darkness (grey boxes) and light conditions (blue box). Each dot represents the corresponding value from a single cold nerve terminal. Data shown are medians with interquartile ranges (from first to third quartile) ($n = 6$ nerve terminals, 3 animals). Friedman one-way repeated measures ANOVA on ranks; all pairwise multiple comparison procedures by Dunn's method. ns, not significant.

3.3 | Mechanistic insights into the interaction of DENAQ and potassium channels at the corneal nerve terminal

The shape of NTIs in corneal cold nerve terminals pre-incubated with 200- μ M DENAQ was then analysed (Figure 4). In corneas pre-incubated with DENAQ (three animals), the half-width of the negative component of the NTI was significantly shorter under LED light irradiation than in darkness (Figure 4a,b). Consistent with the previously described *trans* blocker effect of DENAQ on K_V channels (Tochitsky et al., 2014, 2016), these results suggest that DENAQ blocks K_V channels in the *trans* configuration (dark) and partly releases inhibition in the *cis* configuration (light).

In addition to K_V channels, DENAQ also blocked HCN channels in the *trans* configuration (Ko et al., 2016; Tochitsky et al., 2014, 2016). To explore the potential role of HCN channels in the photoswitching of the cold terminal spontaneous activity, corneas were pre-incubated with 2-mM DENAQ (two animals) and subjected to five photocycles of light at 460 nm. Then, the HCN channel blocker **cilobradine** (Stieber et al., 2006) was perfused at a concentration of 100 μ M for 1 min before and during the light protocol application. In three cold

terminals pre-incubated with DENAQ, the photoswitching effect was not significantly changed by cilobradine ($37.0 \pm 3.6\%$, $n = 15$ photocycles before; and $42.0 \pm 6.5\%$, $n = 15$ photocycles during cilobradine perfusion). These results suggest that K_V channels, but not HCN channels, are primarily responsible for the DENAQ-mediated photoswitching effect on the ongoing activity of corneal cold sensory nerve terminals.

3.4 | P2X channel blockers prevent DENAQ-mediated photomodulation in corneal cold nerve terminals

P2X2 and **P2X3** channels have previously been identified in the soma of trigeminal neurons (Staikopoulos et al., 2007). However, it remains unclear whether they are present and functional at their nerve terminals (Dowd et al., 1997; Matthews et al., 1997). Interestingly, the membrane-impermeant compound DENAQ can be used as an ultrasensitive reporter of the functional expression of P2X receptors in retinal ganglion cells due to its ability to permeate these large-pore channels (Tochitsky et al., 2016). Here, the potential role of **ATP-gated purinergic receptors** and transient receptor potential (TRP) channels in the entry of DENAQ into the cold nerve ending was investigated. Excised corneas were pre-incubated with 2-mM DENAQ plus a pharmacological antagonist of the P2X receptor or transient receptor potential vanilloid 1 (**TRPV1**) and TRPM8 channels. As shown in Figure 5, cold nerve terminals co-incubated with DENAQ and **suramin**, a non-selective antagonist of **purinergic P2 receptors** (Dunn & Blakeley, 1988; Hoyle et al., 1990), or DENAQ with the P2X receptor inhibitor **TNP-ATP** (Virginio et al., 1998), or DENAQ with the selective **P2X3 receptor** blocker picrotoxin-1 (Grishin et al., 2010; Kabanova et al., 2012) showed a significantly smaller DENAQ-mediated photoswitching than those cold nerve terminals pre-incubated with DENAQ alone. However, no statistical differences were observed when comparing the photoswitching in cold nerve terminals pre-incubated with DENAQ alone and those pre-incubated with DENAQ together with A740003, a selective antagonist of the **P2X7** receptor (Honore et al., 2006) or the TRPV1 and TRPM8 antagonist **capsazepine** (Behrendt et al., 2004; Bevan et al., 1992). In the latter case, a reduced photoswitching was observed in 7 out of 12 terminals, so a TRPV1- or TRPM8-mediated permeation of DENAQ into the cold-sensing nerve endings cannot be ruled out.

An immunoreactivity assay identified the immunohistochemical expression of P2X2 and P2X3 receptors in mouse corneal cold terminals. To achieve this, we utilized a genetically modified mouse that expresses EYFP under the promoter of the cold-sensing ion channel TRPM8. Additionally, sub-basal nerve fibres (Figure 6a-d) and nerve terminals (Figure 6e-h) located at the corneal epithelium were immunolabelled with anti- β -III-tubulin, anti-GFP, anti-P2X2 and anti-P2X3. As shown in Figure 6, staining for P2X2/P2X3 receptors was present in both the corneal cold sensory nerve fibres and their nerve terminals.

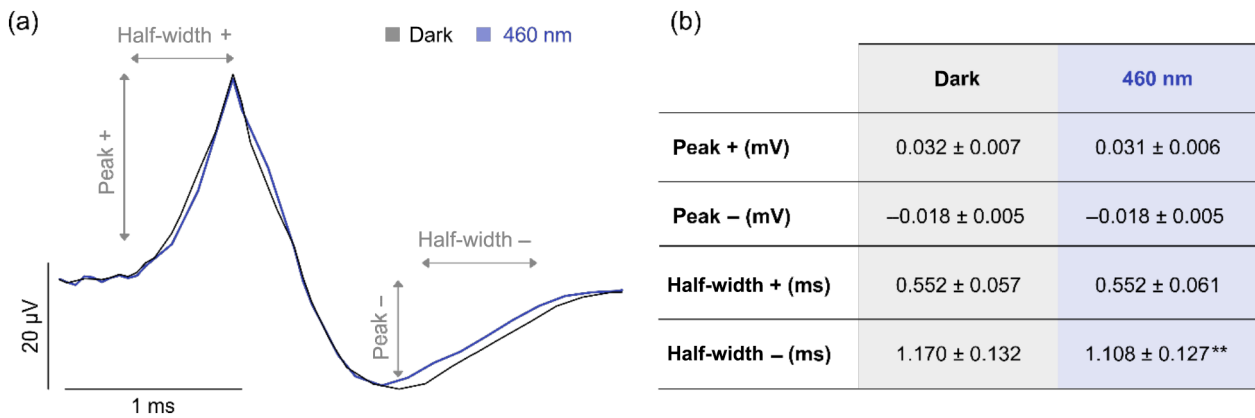


FIGURE 4 Effects of light on the nerve terminal impulse (NTI) shape in corneas pre-treated with DENAQ. (a) NTI waveform under darkness and 460-nm light. The average shape of 200 NTIs recorded under each condition in nine cold sensory nerve terminals is shown. (b) Table summarizing mean ± SEM of the different parameters analysed to quantify the NTI shape. * $P < 0.05$, significant difference between dark and light conditions; paired t test.

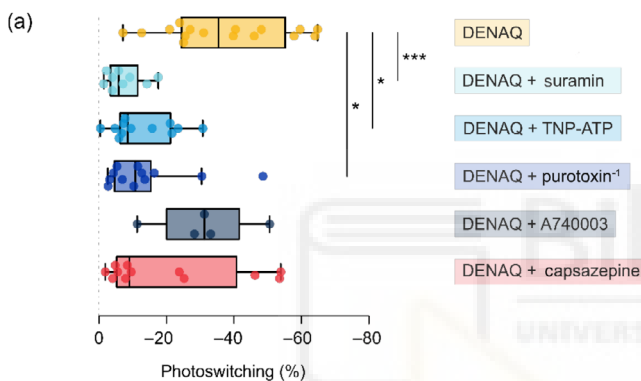


FIGURE 5 Photoswitching effect of DENAQ on the spontaneous activity of guinea pig corneal cold thermoreceptor nerve terminals in the presence of P2X receptor antagonists and TRPV1 channel antagonists. Data shown are the photoswitching value calculated for each cold nerve terminal shown as individual values with medians and interquartile ranges (from first to third quartile). Samples sizes as follows: DENAQ, $n = 16$ terminals, 7 animals; DENAQ + suramin, $n = 9$ terminals, 3 animals; DENAQ + TNP-ATP, $n = 12$ terminals, 3 animals; DENAQ + purotoxin 1, $n = 12$ terminals, 6 animals; DENAQ + A740003, $n = 5$ terminals, 5 animals; DENAQ + capsazepine, $n = 12$ terminals, 5 animals. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, significantly different as indicated; Kruskal-Wallis ANOVA on ranks; all pairwise multiple comparison procedures by Dunn's method.

These results indicate that DENAQ primarily enters corneal cold sensory nerve endings through P2X channels, suggesting the functional expression of P2X3 channels at corneal cold sensory terminals.

3.5 | DENAQ photoreduces the spontaneous activity of cold nerve endings in tear-deficient corneas

Excised guinea pig corneas with surgically induced eye surface dry condition were pre-treated with 200- μ M DENAQ. Consistent with earlier research (Kovács et al., 2016), the spontaneous activity of

tear-deficient cold nerve terminals showed a higher NTI frequency, compared with that of naïve corneas (Figure 7b). As observed with the naïve cold nerve terminals, blue light irradiation reduced the spontaneous activity in cold nerve terminals of tear-deficient animals, compared to dark conditions (Figure 7a,b).

However, LED irradiation did not affect the cold-evoked response in DENAQ-pre-treated nerve terminals of tear-deficient guinea pigs. The median of the peak frequency of NTIs cold thermoreceptors evoked by the first cooling ramp in the dark was not significantly different from that during LED irradiation (Figure 7c). Furthermore, the cooling threshold, in the dark was not significantly different from that in the light (Figure 7d).

These results indicate that DENAQ allows the photoreduction of the pathologically enhanced spontaneous cold nerve terminal activity in a guinea pig model of tear-deficient DE without affecting the response to cold.

3.6 | DENAQ photosensitizes cold-induced electromyography activity of the orbicularis oculi muscle

Corneal sensory receptors have been reported to modulate blink rate in rodents and humans (see Acosta et al., 1999; Quallo et al., 2015). Therefore, we asked whether DENAQ could mediate in vivo photomodulation of thermally-induced blink reflexes. To this end, 20-mM DENAQ was applied to the ocular surface of three anaesthetized adult rats, and the cold-evoked OOemg activity was measured in the dark and under blue light illumination (Figure 8a). Prior to the treatment with DENAQ, the number of cold-evoked blinks under light irradiation was lower, the AUC of the cold-evoked OOemg signal was diminished and its duration was reduced upon illumination, relative to dark conditions (Figure 8b-d). After DENAQ application, the number of cold-evoked blinks was higher under blue light, the AUC was greater and the OOemg activity duration was longer upon

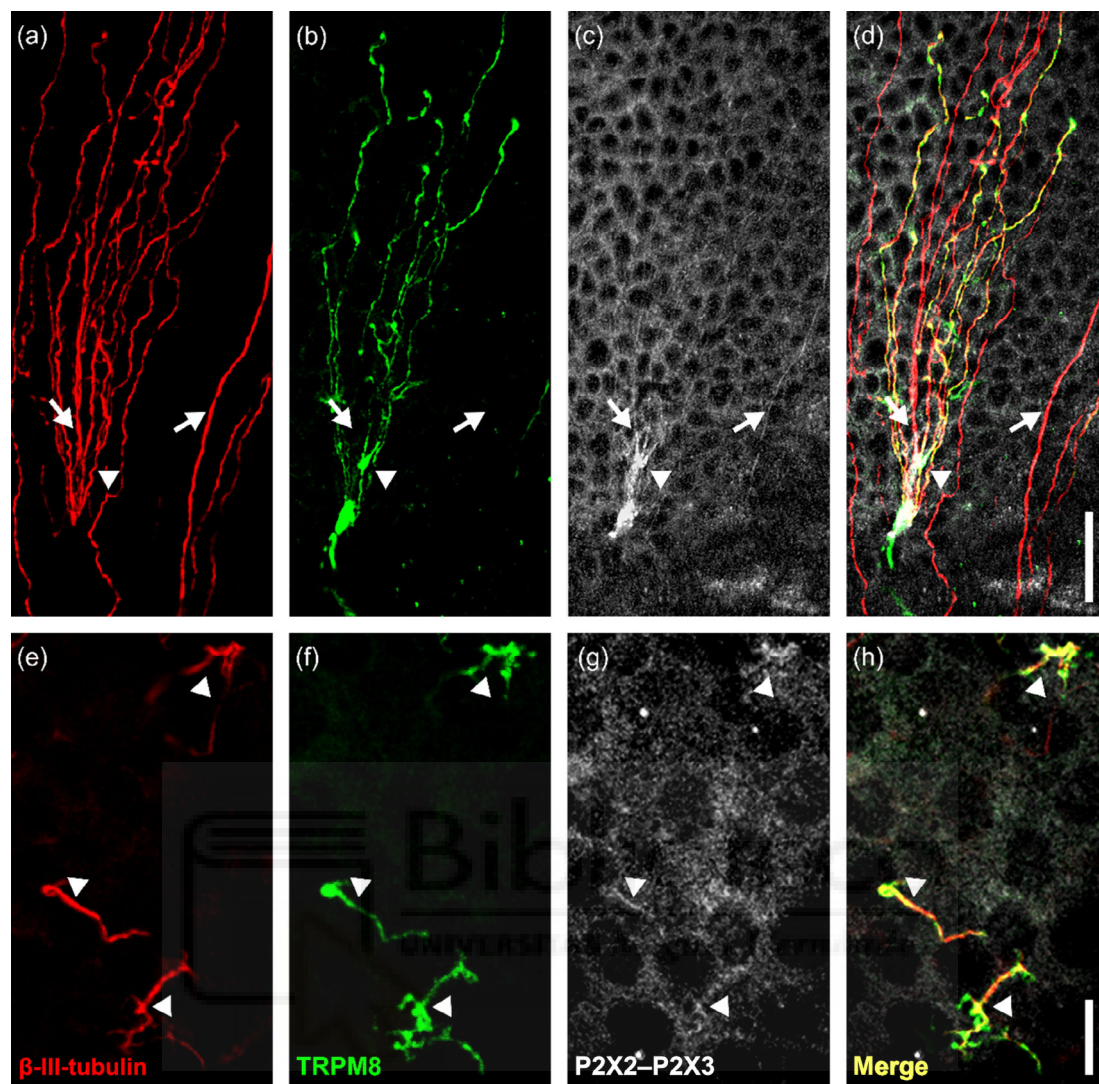


FIGURE 6 Immunohistochemical identification of P2X2 and P2X3 receptors in TRPM8-expressing corneal nerve terminals. Maximal projection of z-stacked confocal images of corneal cold nerves in a whole-mounted cornea from a TRPM8^{BAC}-EYFP mouse is shown. Sub-basal nerve fibres (a–d) and their intraepithelial nerve endings (e–h) were immunolabelled with anti- β -III-tubulin (red), anti-GFP (green), and anti-P2X2 and anti-P2X3 (grey). Arrowheads indicate positive sub-basal nerve fibres and positive nerve endings for TRPM8, P2X2 and P2X3. Arrows indicate positive sub-basal nerve fibres only for P2X2 and P2X3. Scale bars: (a–d) 30 μ m; (e–h) 15 μ m.

illumination, compared to values under dark conditions (Figure 8a–d). Notably, no significant differences in the heat-evoked blink reflex were observed when comparing blue light and dark conditions (Figure 8e–h).

The results indicate the presence of *in vivo* DENAQ photomodulation of the cold-evoked but not the heat-evoked blink reflex in anaesthetized rats, thereby supporting the involvement of corneal sensory receptors, particularly those sensitive to moderate and intense cold, such as cold thermoreceptors and polymodal nociceptors.

4 | DISCUSSION

We have demonstrated that the photoisomerizable small-molecule DENAQ confers light sensitivity to guinea pig cold sensory nerve

endings on excised corneas. Previous research has shown that DENAQ photosensitizes retinal ganglion cell activity in a mouse model of *retinitis pigmentosa*, as well as binaural auditory gerbil neurons (Ko et al., 2016; Tochitsky et al., 2016). Our data further demonstrate that DENAQ modulates the electrical activity of peripheral sensory axons separated from their soma in a light-dependent manner. This adds to the body of evidence that azobenzene-based small molecules can make nociceptors sensitive to light directly at their nerve terminals (Frank et al., 2015; Landra-Willm et al., 2023; Mourou et al., 2012).

DENAQ is a *trans*-blocker of both K_V and HCN channels in the dark, whereas high-intensity visible light converts DENAQ to its *cis*-isomer, thereby releasing them from blocking (Mourou et al., 2011; Tochitsky et al., 2014). Therefore, DENAQ's effect on cold nerve terminal excitability is expected to be a balance of the hyperpolarizing or depolarizing contributions of these ion channels to the nerve terminal

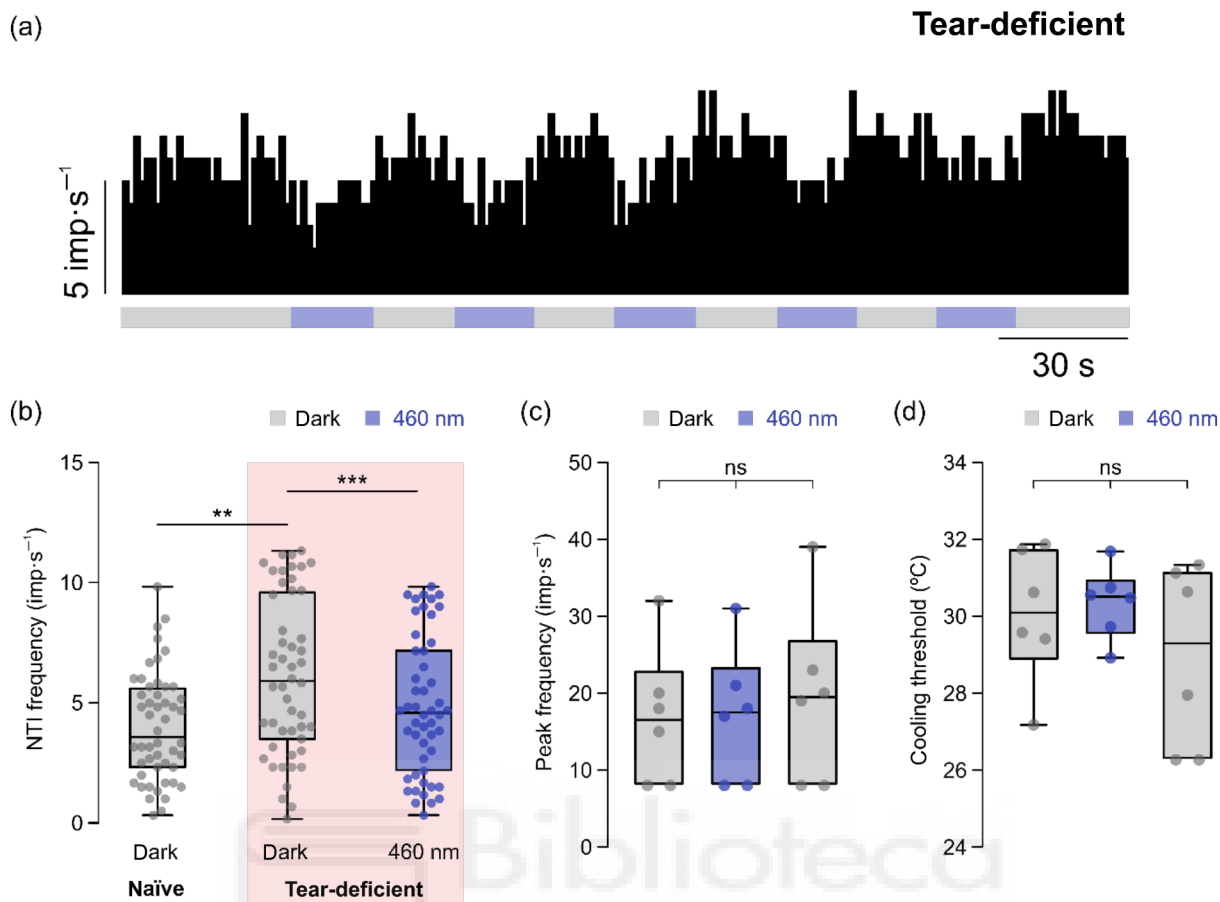


FIGURE 7 Photomodulation of the spontaneous activity of cold nerve endings in tear-deficient and naïve corneas pre-treated with DENAQ. (a) Spontaneous activity rate histogram along the five cycles of darkness/460-nm LED illumination in tear-deficient corneas pre-incubated with DENAQ at $200\ \mu\text{M}$. (b) Corneal cold nerve terminal spontaneous NTI frequency recorded during blue light application (box plot in blue) and in dark conditions (box plots in grey) in DENAQ-treated naïve and tear-deficient corneas (red shading). Every dot represents the NTI frequency value corresponding to a photocycle under the above-described conditions (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). (c) Maximum firing frequency during the response to cold stimulation. (d) Cooling threshold temperature (absolute value). Each dot represents the corresponding value from a cold nerve terminal. The centre line is the median, and the bounds of the box are interquartile ranges (first to third). Friedman one-way repeated measures ANOVA on ranks; all pairwise multiple comparison procedures by Dunn's method. ns, not significant.

membrane potential. In the dark, the ongoing cold nerve terminal activity decreased, suggesting that the hyperpolarizing effect of pharmacological blockade of HCN channels predominated over the depolarizing effect of pharmacological inhibition of K_V channels by DENAQ. In support of the proposal that inhibition of HCN channels by DENAQ in the dark reduced the spontaneous activity, previous data from our laboratory have shown that the HCN channel chemical antagonists **ivabradine** and their structural derivatives cilobradine and zetabradine reduced the spontaneous activity of corneal cold nerve terminals (Quirce, 2020).

Light irradiation decreased ongoing cold nerve terminal activity to a greater extent than pretreatment with DENAQ alone, suggesting a hyperpolarizing effect through the photo-release of K_V channel conductance from blocking, which overcomes the depolarizing effect of photo-release on HCN channel activity. This is supported by the persistence of DENAQ-mediated photoswitching in the presence of the HCN blocker cilobradine. In line with this, several K_V channel

subtypes, including $K_V\ 2.1$, $K_V\ 3.1$ and $K_V\ 4.2$ (Mourout et al., 2013), which are present in rodent primary sensory neurons (Bocksteins et al., 2012), are photomodulated by DENAQ when heterogeneously expressed in HEK293 cells. Additional evidence supporting the contribution of K_V channels to DENAQ-mediated photoswitching in the cold nerve terminal is derived from the NTI shape analysis. Cold nerve terminals recorded extracellularly exhibit a biphasic (positive-negative) shape in NTIs. The configuration of NTI corresponds to the first derivative of the voltage membrane of the nerve terminal. The positive deflection is associated with membrane depolarization, while the negative deflection is associated with membrane repolarization mediated by K_V channel openings (Brock et al., 2001, 2006). We found that spontaneous NTIs generated at cold sensory nerve terminals in corneas pre-incubated with DENAQ exhibited a more prolonged negative phase of 53% of its half-width in the dark (*trans* isomer), rapidly shortened by LED irradiation (*cis* isomer) up to 41%. This suggests that light exposure partly unblocks the 22.6% of the K_V

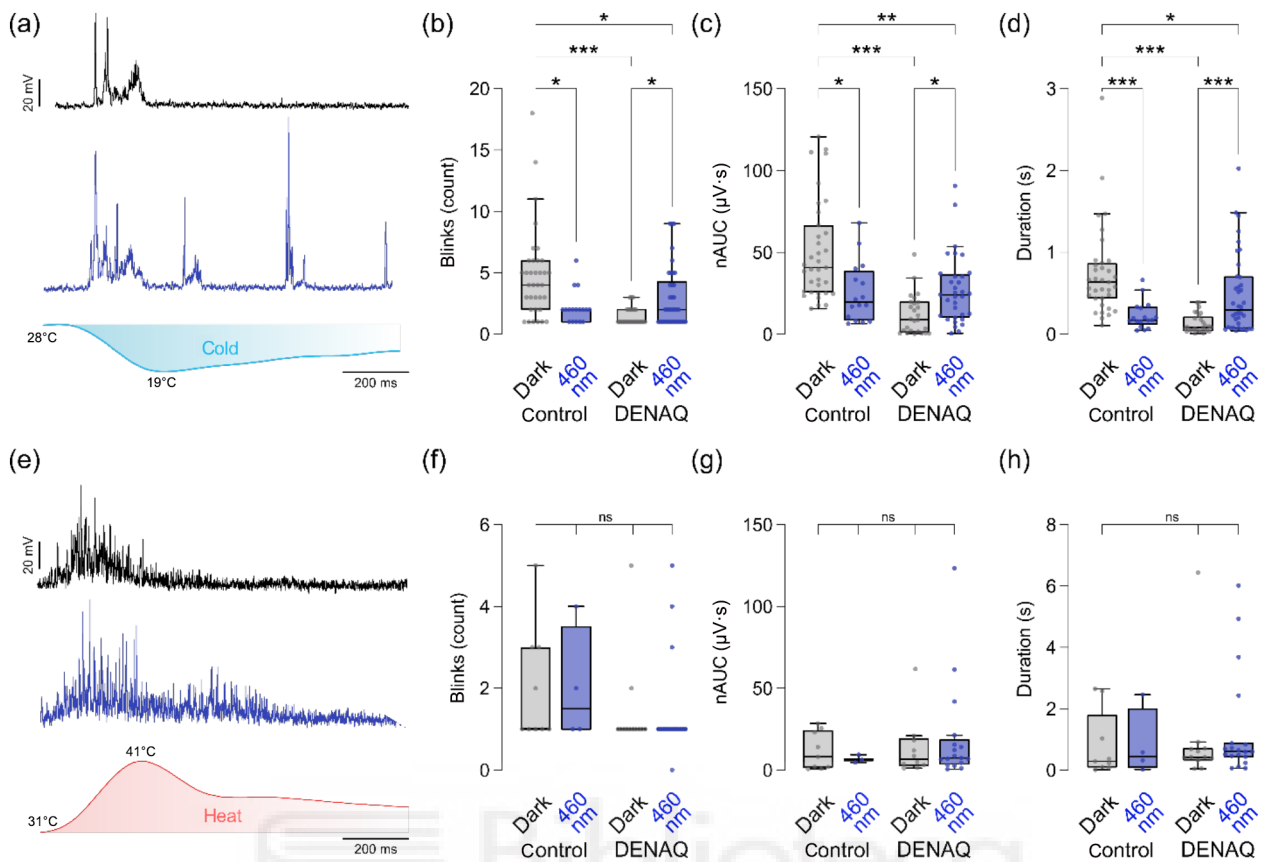


FIGURE 8 Photomodulation of the thermal reflex blink with DENAQ. Typical recordings of evoked OOemg activity in response to ocular surface cooling up to 18°C (blue) (a) and heating up to 41°C (red) (e) after topical administration of DENAQ to the eyes of anaesthetised rats. OOemg recordings under 460-nm LED irradiation are highlighted in blue and grey under dark conditions. The number of blinks induced by cooling is shown in (b) or heating in (f). The net area under the curve (nAUC) of the OOemg signal in response to cold is shown in (c) and heat in (g). The duration of the OOemg signal evoked by ocular surface cooling is presented in (d) and heat in (h). The box plots in blue correspond to blue light application, and the box plots in grey correspond to dark conditions. Data shown are individual values with medians and interquartile ranges (from first to third quartile). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; significantly different as indicated; ns, not significant; Kruskal–Wallis ANOVA on ranks, followed by all pairwise multiple comparison procedures using Dunn's method.

channel activity blocked by DENAQ in the dark, which is consistent with the partial photoreduction of spontaneous activity of cold nerve terminals pre-incubated with DENAQ. In support of this, the photo-switching of the activity of recombinant $K_v3.1$ channels expressed in HEK293 cells has been revealed to be partial (Mourou et al., 2011). This suggests that native K_v channels at the corneal nerve terminals may also undergo partial photoswitching. However, a comprehensive investigation would be necessary to elucidate whether this partial release of K_v activity is entirely responsible for the photoswitching of the cold nerve terminal. The DENAQ molecule terminates in a quaternary ammonium ion on one side of the azobenzene, which interacts with the tetraethylammonium (TEA) binding site in the inner lumen of the channel (Mourou et al., 2011). Consistent with our findings, TEA prolongs the duration of the NTI-negative phase in guinea pig corneal cold receptors (Brock et al., 2006). Additionally, TEA does not affect the response of guinea pig corneal cold receptors to cooling (Brock et al., 2006). Similarly, our study demonstrates that DENAQ does not photomodulate cold-evoked responses in corneal nerve endings.

Of note, we observed that the ongoing cold nerve terminal activity in the dark after each light application increased compared to the value before the light application. This may indicate insufficient time for DENAQ to re-block the HCN channels before the following light irradiation pulse. It is worth noting that DENAQ converts from the *trans* to *cis* state rapidly within milliseconds upon light exposure, but it takes seconds for DENAQ to thermally convert back to its default *trans* state (Mourou et al., 2011).

P2X channels have been implicated in central and peripheral pain mechanisms (Burnstock, 2000; Inoue, 2022). P2X3 mRNA and protein have been found primarily in small-diameter non-peptidergic cell bodies of primary sensory neurons (Chen et al., 1995; Eriksson et al., 1998; Lewis et al., 1995). The channels either form homo-oligomeric channels or assemble with P2X2 subunits to form hetero-oligomers (North, 2004). Additionally, a fraction of peripheral projections of sensory neurons in the skin, tongue and dental pulp are immunopositive for P2X3 in rodents (Bo et al., 1999; Burnstock, 2000). This study investigated the expression of P2X2 and P2X3 subunits in TRPM8–EYFP-positive corneal nerve terminals in

adult mice. We observed P2X and P2X3 receptor staining at identified cold sensory nerve terminals. Consistent with the immunochemical expression of the nociceptive markers P2X3 receptor and CGRP protein in small subsets of mouse dorsal root ganglion cell bodies expressing TRPM8 (Takashima et al., 2010), our results indicate that a fraction of TRPM8 nerve terminals also express P2X2 and P2X3 receptors.

The functionality of P2X channels at corneal sensory nerve terminals remains uncertain. While purinergic P2X receptor agonists have been shown to excite rat joint nociceptors (Dowd et al., 1998), attempts to stimulate cat dental pulp afferents (Dowd et al., 1997) or cat corneal nociceptors (Matthews et al., 1997) have been unsuccessful. In addition to species differences, these discrepancies may be explained by specific pharmacological limitations associated with the different experimental models (Dowd et al., 1998). The compound DENAQ is permanently charged, making it relatively impermeable through the cell membrane. A previous study has shown that DENAQ enters neurons through the large-pore P2X channels in retinal ganglion cells from a mouse model of retinitis pigmentosa (Tochitsky et al., 2016). In this work, we demonstrate that the use of purotoxin-1 to selectively block P2X3 receptors partly prevents DENAQ-mediated photoswitching. Notably, primary sensory neurons express the P2X3 receptor protein at a higher level than the other P2X1–6 receptor subunits, while the P2X7 receptor protein has not yet been identified (Dunn et al., 2001; Flegel et al., 2015; Staikopoulos et al., 2007). Our data suggest that, in guinea pigs, DENAQ enters cold sensory nerve terminals in the cornea, through P2X channels, primarily P2X3 channels. This indicates functional expression of P2X channels at the nerve terminal.

In patients with dry eye disease, ectopic activity at corneal cold nerve endings can cause discomfort, pain, altered blinking and a sensation of dryness (Belmonte et al., 2017). Here, we show that DENAQ reduces spontaneous activity in corneal cold nerve endings in guinea pig tear-deficient corneas in response to light but not cold-evoked responses. This finding suggests that DENAQ may be a beneficial treatment in patients with dry eye, as it can alleviate ocular discomfort or pain without compromising the cold sensation and cold-evoked reflexes essential for maintaining ocular surface integrity. Furthermore, azobenzene-based photoswitches offer a new therapeutic approach that takes advantage of the large-pore characteristic of P2X receptors. This allows for delivering membrane-impermeable drugs specifically to cells with increased P2X receptor expression (Tochitsky et al., 2016). A recent study by Fakhri et al. (2021) demonstrated the overexpression of P2X3 receptor mRNA in TG neurons from a mouse model of dry eye. This finding indicates that DENAQ-mediated photomodulation may selectively target altered cold nerve endings over healthy tissue.

In this study, we further provide evidence of the *in vivo* effect of DENAQ when administered topically in the eye of anaesthetised rats. DENAQ enhanced cold-evoked OOemg activity under blue light, although it did not significantly affect the cold-evoked activity in cold thermoreceptors of guinea pig excised corneas. The observed discrepancy may be attributed to the different animal model used, the higher

concentration of DENAQ adapted to *in vivo* conditions and its delivery beyond the cornea (including the conjunctiva and eyelid border) in the blink reflex paradigm. However, recent work has indicated that corneal polymodal nociceptors may contribute to the mediation of the cold-evoked blink reflex in mice (Frutos-Rincón et al., 2023). Consequently, it is possible that distinct functional classes of corneal sensory nerve terminals, which are not classified as cold thermoreceptors, may be subject to photomodulation by DENAQ in the cold-evoked blink reflex. Further studies are required to elucidate this observation.

In conclusion, the photoisomerizable compound DENAQ confers light sensitivity to the spontaneous activity, but not the cold-evoked responses, of guinea pig corneal cold thermoreceptors. DENAQ primarily enters the corneal cold nerve terminal through P2X channels, whereas K_V channels appear responsible for the DENAQ-mediated photoswitching of its spontaneous activity. DENAQ photoreduces the pathologically enhanced spontaneous cold nerve terminal activity in a guinea pig model of dry eye without affecting the response to cold. Furthermore, DENAQ photomodulated the cold-evoked blink reflex *in vivo* after topical eye application in rats. Our results support the use of small azobenzene photoswitches as a potential therapeutic strategy for managing ectopic corneal nerve activity. This approach might offer a potential treatment for ocular discomfort and pain in dry eye disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

David Ares-Suárez: Formal analysis (lead); investigation (lead); methodology (supporting); visualization (lead); writing—original draft (supporting); writing—review and editing (supporting). **Almudena Iñigo-Portugués:** Formal analysis (supporting); investigation (supporting); methodology (supporting); visualization (supporting); writing—original draft (supporting); writing—review and editing (supporting). **Enrique Velasco:** Formal analysis (supporting); investigation (supporting); visualization (supporting); writing—original draft (supporting); writing—review and editing (supporting). **Susana Quirce:** Formal analysis (supporting); investigation (supporting); methodology (supporting); writing—review and editing (supporting). **Fernando Aleixandre-Carrera:** Formal analysis (supporting); investigation (supporting); visualization (supporting); writing—original draft (supporting); writing—review and editing (supporting). **Ariadna Díaz-Tahoces:** Formal analysis (supporting); investigation (supporting); visualization (supporting); writing—original draft (supporting); writing—review and editing (supporting). **M. Carmen Acosta:** Resources (supporting); validation (supporting); writing—review and editing (supporting). **Wan-Chen Lin:** Investigation (supporting); resources (supporting); writing—review and editing (supporting). **Richard H. Kramer:** Conceptualization (supporting); resources (supporting); writing—review and editing (supporting). **Carlos Belmonte:** Conceptualization (supporting); writing—review and editing (supporting). **Juana Gallar:** Conceptualization (supporting); funding acquisition (lead); resources (supporting); supervision (supporting); validation (supporting); writing—original draft (supporting); writing—review and editing (supporting). **Victor Meseguer:** Conceptualization

(lead); data curation (lead); formal analysis (supporting); funding acquisition (lead); investigation (supporting); methodology (supporting); project administration (lead); resources (supporting); supervision (lead); validation (lead); visualization (lead); writing—original draft (lead); writing—review and editing (lead).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Grants RTI2018-100994-AI00, PID2021-124460OB-I00 (V.M.) and PID2023-147915OB-I00 (J.G. and M.C.A.) funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and by ‘‘ERDF A way of making Europe’’. Grant CIPROM/2021/48 from the Conselleria de Cultura, Educaci3n y Ciencia, Generalitat Valenciana, Spain, is also acknowledged.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Some data may not be made available because of privacy or ethical restrictions.

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for [Design and Analysis](#), [Immunoblotting and Immunohistochemistry](#), and [Animal Experimentation](#) and as recommended by funding agencies, publishers and other organizations engaged with supporting research.

ORCID

David Ares-Suárez  <https://orcid.org/0000-0002-9222-4268>
 Almudena Iñigo-Portugués  <https://orcid.org/0000-0003-4368-5495>
 Enrique Velasco  <https://orcid.org/0000-0001-7299-0750>
 Susana Quirce  <https://orcid.org/0000-0001-9977-357X>
 Fernando Aleixandre-Carrera  <https://orcid.org/0000-0002-4739-5033>
 Ariadna Díaz-Tahoces  <https://orcid.org/0000-0003-1163-5987>
 Wan-Chen Lin  <https://orcid.org/0000-0001-7842-3036>
 Richard H. Kramer  <https://orcid.org/0000-0002-8755-9389>
 Carlos Belmonte  <https://orcid.org/0000-0001-6891-5942>
 Juana Gallar  <https://orcid.org/0000-0002-3559-3649>
 Victor Meseguer  <https://orcid.org/0000-0002-7686-6228>

REFERENCES

- Acosta, M. C., Gallar, J., & Belmonte, C. (1999). The influence of eye solutions on blinking and ocular comfort at rest and during work at video display terminals. *Experimental Eye Research*, 68(6), 663–669. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0656>
- Acosta, M. C., Luna, C., Quirce, S., Belmonte, C., & Gallar, J. (2013). Changes in sensory activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain*, 154(11), 2353–2362. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.037>
- Aleixandre-Carrera, F., Engelmayer, N., Ares-Suárez, D., Acosta, M. D. C., Belmonte, C., Gallar, J., Meseguer, V., & Binshtok, A. M. (2021). Optical assessment of nociceptive TRP channel function at the peripheral nerve terminal. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 481. <https://doi.org/10.3390/ijms22020481>
- Alexander, S. P. H., Fabbro, D., Kelly, E., Mathie, A. A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Davies, J. A., Amarosi, L., Anderson, C. M. H., Beart, P. M., Broer, S., Dawson, P. A., Gyimesi, G., Hagenbuch, B., Hammond, J. R., Hancox, J. C., ... Verri, T. (2023). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: Transporters. *British Journal of Pharmacology*, 180(Suppl 2), S374–S469. <https://doi.org/10.1111/bph.16182>
- Alexander, S. P. H., Fabbro, D., Kelly, E., Mathie, A. A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Davies, J. A., Annett, S., Boison, D., Burns, K. E., Dessauer, C., Gertsch, J., Helsby, N. A., Izzo, A. A., Ostrom, R., Papapetropoulos, A., ... Wong, S. S. (2023). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: Enzymes. *British Journal of Pharmacology*, 180(Suppl 2), S289–S373. <https://doi.org/10.1111/bph.16181>
- Alexander, S. P. H., Mathie, A. A., Peters, J. A., Veale, E. L., Striessnig, J., Kelly, E., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Davies, J. A., Aldrich, R. W., Attali, B., Baggetta, A. M., Becirovic, E., Biel, M., Bill, R. M., Caceres, A. I., Catterall, W. A., Conner, A. C., ... Zhu, M. (2023). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2023/24: Ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 180(Suppl 2), S145–S222. <https://doi.org/10.1111/bph.16178>
- Alexander, S. P. H., Roberts, R. E., Broughton, B. R. S., Sobey, C. G., George, C. H., Stanford, S. C., Cirino, G., Docherty, J. R., Giembycz, M. A., Hoyer, D., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., MacEwan, D. J., Mangum, J., Wonnacott, S., & Ahluwalia, A. (2018). Goals and practicalities of immunoblotting and immunohistochemistry: A guide for submission to the British Journal of Pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 175, 407–411. <https://doi.org/10.1111/bph.14112>
- Behrendt, H. J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H., & Jostock, R. (2004). Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British Journal of Pharmacology*, 141, 737–745. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705652>
- Belmonte, C., Nichols, J. J., Cox, S. M., Brock, J. A., Begley, C. G., Bereiter, D. A., Dartt, D. A., Galor, A., Hamrah, P., Ivanusic, J. J., Jacobs, D. S., McNamara, N. A., Rosenblatt, M. I., Stapleton, F., & Wolffsohn, J. S. (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. *The Ocular Surface*, 15(3), 404–437. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.002>
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S. J., & Yeats, J. C. (1992). Capsazepine: A competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology*, 107(2), 544–552. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb12781.x>
- Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A., & Burnstock, G. (1999). Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport*, 10(5), 1107–1111. <https://doi.org/10.1097/00001756-199904060-00037>
- Bocksteins, E., Van de Vijver, G., Van Bogaert, P., & Snyders, D. (2012). K_v3 channels contribute to the delayed rectifier current in small cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(4), 406–415. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00343.2011>
- Brock, J. A., Pianova, S., & Belmonte, C. (2001). Differences between nerve terminal impulses of polymodal nociceptors and cold sensory receptors of the guinea-pig cornea. *The Journal of Physiology*, 533(Pt 2), 493–501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0493a.x>
- Brock, J., Acosta, M. C., Al Abed, A., Pianova, S., & Belmonte, C. (2006). Barium ions inhibit the dynamic response of guinea-pig corneal cold

- receptors to heating but not to cooling. *Journal of Physiology*, 575(2), 573–581. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.110130>
- Brock, J., McLachlan, E., & Belmonte, C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *The Journal of Physiology*, 512, 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.211bf.x>
- Burnstock, G. (2000). P2X receptors in sensory neurones. *British Journal of Anaesthesia*, 84(4), 476–488. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bja.a013473>
- Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilottit, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., & Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, 377(6548), 428–431. <https://doi.org/10.1038/377428a0>
- Curtis, M. J., Alexander, S. P. H., Cortese-Krott, M., Kendall, D. A., Martemyanov, K. A., Mauro, C., Panettieri, R. A. Jr., Papapetropoulos, A., Patel, H. H., Santo, E. E., Schulz, R., Stefanska, B., Stephens, G. J., Teixeira, M. M., Vergnolle, N., Wang, X., & Ferdinandy, P. (2025). Guidance on the planning and reporting of experimental design and analysis. *Br J Pharmacol.*, 182, 1413–1415. <https://doi.org/10.1111/bph.17441>
- Dowd, E., Gallar, J., McQueen, D., Chessell, I., Humphrey, P., & Belmonte, C. (1997). Nociceptors of the cat and rat cornea are not excited by P2X purinoceptor agonists. *British Journal of Pharmacology - Proceedings Supplement*, 122, 348.
- Dowd, E., McQueen, D. S., Chessell, I. P., & Humphrey, P. P. (1998). P2X receptor-mediated excitation of nociceptive afferents in the normal and arthritic rat knee joint. *British Journal of Pharmacology*, 125(2), 341–346. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702080>
- Dunn, P. M., & Blakeley, A. G. H. (1988). Suramin: A reversible P₂-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *British Journal of Pharmacology*, 93(2), 243–245. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11427.x>
- Dunn, P. M., Zhong, Y., & Burnstock, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Progress in Neurobiology*, 65(2), 107–134. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(01\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(01)00005-3)
- Eriksson, J., Bongenhielm, U., Kidd, E., Matthews, B., & Fried, K. (1998). Distribution of P2X3 receptors in the rat trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury. *Neuroscience Letters*, 254(1), 37–40. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00656-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00656-9)
- Fakih, D., Guerrero-Moreno, A., Baudouin, C., Réaux-Le Goazigo, A., & Parsadaniantz, S. M. (2021). Capsazepine decreases corneal pain syndrome in severe dry eye disease. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02162-7>
- Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., & Gisselmann, G. (2015). RNA-Seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors. *PLoS ONE*, 10(6), e0128951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128951>
- Frank, J. A., Moroni, M., Moshourab, R., Sumser, M., Lewin, G. R., & Trauner, D. (2015). Photoswitchable fatty acids enable optical control of TRPV1. *Nature Communications*, 6(1), 7118. <https://doi.org/10.1038/ncomms8118>
- Frutos-Rincón, L., Luna, C., Aleixandre-Carrera, F., Velasco, E., Diaz-Tahoces, A., Meseguer, V., Gallar, J., & Acosta, M. C. (2023). The contribution of TRPA1 to corneal thermosensitivity and blink regulation in young and aged mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12620. <https://doi.org/10.3390/ijms241612620>
- González-González, O., Bech, F., Gallar, J., Merayo-Llaves, J., & Belmonte, C. (2017). Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(1), 404–415. <https://doi.org/10.1167/iov.16-20033>
- Grishin, E. V., Savchenko, G. A., Vassilevski, A. A., Korolkova, Y. V., Boychuk, Y. A., Viatchenko-Karpinski, V. Y., Nadezhdin, K. D., Arseniev, A. S., Pluzhnikov, K. A., Kulyk, V. B., Voitenko, N. V., & Krishtal, O. O. (2010). Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain. *Annals of Neurology*, 67(5), 680–683. <https://doi.org/10.1002/ana.21949>
- Hirata, H., & Meng, I. D. (2010). Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: Implications for dry eye disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(8), 3969–3976. <https://doi.org/10.1167/iov.09-4744>
- Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M. T., Hsieh, G., Zhu, C. Z., Mikusa, J. P., Hernandez, G., Zhong, C., Gauvin, D. M., Chandran, P., Harris, R., Medrano, A. P., Carroll, W., Marsh, K., Sullivan, J. P., Faltynek, C. R., & Jarvis, M. F. (2006). A-740003 [N-(1-((cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(3), 1376–1385. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111559>
- Hoyle, C. H. V., Knight, G. E., & Burnstock, G. (1990). Suramin antagonizes responses to P₂-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *British Journal of Pharmacology*, 99(3), 617–621. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb12979.x>
- Inoue, K. (2022). The role of ATP receptors in pain signaling. *Neurochemical Research*, 47(9), 2454–2468. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03516-6>
- Kabanova, N. V., Vassilevski, A. A., Rogachevskaja, O. A., Bystrova, M. F., Korolkova, Y. V., Pluzhnikov, K. A., Romanov, R. A., Grishin, E. V., & Kolesnikov, S. S. (2012). Modulation of P2X3 receptors by spider toxins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1818(11), 2868–2875. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.07.016>
- Ko, K. W., Rasband, M. N., Meseguer, V., Kramer, R. H., & Golding, N. L. (2016). Serotonin modulates spike probability in the axon initial segment through HCN channels. *Nature Neuroscience*, 19(6), 823–834. <https://doi.org/10.1038/nn.4293>
- Kovács, I., Luna, C., Quirce, S., Mizerska, K., Callejo, G., Riestra, A., Fernández-Sánchez, L., Meseguer, V. M., Cuenca, N., Merayo-Llaves, J., Acosta, M. C., Gasull, X., Belmonte, C., & Gallar, J. (2016). Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain*, 157(2), 399–417. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000455>
- Landra-Willm, A., Karapurkar, A., Duveau, A., Chassot, A. A., Esnault, L., Callejo, G., Bied, M., Häfner, S., Lesage, F., Wdziekonski, B., Baron, A., Fossat, P., Marsollier, L., Gasull, X., Boué-Grabot, E., Kienzler, M. A., & Sandoz, G. (2023). A photoswitchable inhibitor of TREK channels controls pain in wild-type intact freely moving animals. *Nature Communications*, 14(1), 1160. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36806-4>
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, 377(6548), 432–435. <https://doi.org/10.1038/377432a0>
- Lilley, E., Stanford, S. C., Kendall, D. E., Alexander, S. P. H., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Insel, P. A., Izzo, A. A., Ji, Y., Panettieri, R. A., Sobey, C. G., Stefanska, B., Stephens, G., Teixeira, M., & Ahluwalia, A. (2020). ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. *British Journal of Pharmacology*, 177, 3611–3616. <https://doi.org/10.1111/bph.15178>
- Marfurt, C. F. (1981). The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*, 203(4), 785–798. <https://doi.org/10.1002/cne.902030414>
- Matthews, B., Li, F., Khakh, B., & Vongsavan, N. (1997). Effects of ATP on sensory receptors in the dental pulp of cats. *Journal of Physiology (London)*, 504, 128.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J. L., Bayliss, D. A., & Viana, F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in

- thermosensation. *Cell Reports*, 8(5), 1571–1582. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.003>
- Moulton, E. A., Becerra, L., Rosenthal, P., & Borsook, D. (2012). An approach to localizing corneal pain representation in human primary somatosensory cortex. *PLoS ONE*, 7(9), e44643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044643>
- Mouroto, A., Fehrentz, T., Le Feuvre, Y., Smith, C. M., Herold, C., Dalkara, D., Nagy, F., Trauner, D., & Kramer, R. H. (2012). Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nature Methods*, 9(4), 396–402. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1897>
- Mouroto, A., Kienzler, M. A., Banghart, M. R., Fehrentz, T., Huber, F. M. E., Stein, M., Kramer, R. H., & Trauner, D. (2011). Tuning photochromic ion channel blockers. *ACS Chemical Neuroscience*, 2(9), 536–543. <https://doi.org/10.1021/cn200037p>
- Mouroto, A., Tochitsky, I., & Kramer, R. H. (2013). Light at the end of the channel: Optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6, 5.
- North, R. A. (2004). P2X₃ receptors and peripheral pain mechanisms. *The Journal of Physiology*, 554(2), 301–308. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.048587>
- Parra, A., Gonzalez-Gonzalez, O., Gallar, J., & Belmonte, C. (2014). Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain*, 155(8), 1481–1491. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.04.025>
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., Del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M. C., Gallar, J., Dhaka, A., Viana, F., & Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature Medicine*, 16(12), 1396–1399. <https://doi.org/10.1038/nm.2264>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Pozo, M. A., & Cervero, F. (1993). Neurons in the rat spinal trigeminal complex driven by corneal nociceptors: Receptive-field properties and effects of noxious stimulation of the cornea. *Journal of Neurophysiology*, 70(6), 2370–2378. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.6.2370>
- Purslow, C., & Wolffsohn, J. (2007). The relation between physical properties of the anterior eye and ocular surface temperature. *Optometry and Vision Science*, 84(3), 197–201. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3180339f6e>
- Quallo, T., Vastani, N., Horridge, E., Gentry, C., Parra, A., Moss, S., Viana, F., Belmonte, C., Andersson, D. A., & Bevan, S. (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature Communications*, 6(1), 7150. <https://doi.org/10.1038/ncomms8150>
- Quirce, S. (2020). Actividad de los nervios sensoriales de la córnea durante la deficiencia lagrimal crónica y su modulación farmacológica. <https://dspace.umh.es/>
- Staikopoulos, V., Sessle, B. J., Furness, J. B., & Jennings, E. A. (2007). Localization of P2X2 and P2X3 receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience*, 144(1), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.035>
- Stieber, J., Wieland, K., Stöckl, G., Ludwig, A., & Hofmann, F. (2006). Bradyarrhythmic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. *Molecular Pharmacology*, 69(4), 1328–1337. <https://doi.org/10.1124/mol.105.020701>
- Takashima, Y., Ma, L., & McKemy, D. D. (2010). The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience*, 169(2), 828–842. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.039>
- Tochitsky, I., Helft, Z., Meseguer, V., Fletcher, R. B., Vessey, K. A., Teliás, M., Denlinger, B., Malis, J., Fletcher, E. L., & Kramer, R. H. (2016). How azobenzene photoswitches restore visual responses to the blind retina. *Neuron*, 92(1), 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.038>
- Tochitsky, I., Polosukhina, A., Degtyar, V. E., Gallerani, N., Smith, C. M., Friedman, A., Van Gelder, R. N., Trauner, D., Kaufer, D., & Kramer, R. H. (2014). Restoring visual function to blind mice with a photoswitch that exploits electrophysiological remodeling of retinal ganglion cells. *Neuron*, 81(4), 800–813. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.003>
- Vehof, J., Kozareva, D., Hysi, P. G., Harris, J., Nessa, A., Williams, F. K., Bennett, D. L. H., McMahon, S. B., Fahy, S. J., Direk, K., Spector, T. D., & Hammond, C. J. (2013). Relationship between dry eye symptoms and pain sensitivity. *JAMA Ophthalmology*, 131(10), 1304–1308. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.4399>
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A., & North, R. A. (1998). Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Molecular Pharmacology*, 53(6), 969–973. [https://doi.org/10.1016/S0026-895X\(24\)13265-8](https://doi.org/10.1016/S0026-895X(24)13265-8)

How to cite this article: Ares-Suárez, D., Iñigo-Portugués, A., Velasco, E., Quirce, S., Aleixandre-Carrera, F., Díaz-Tahoces, A., Acosta, M. C., Lin, W.-C., Kramer, R. H., Belmonte, C., Gallar, J., & Meseguer, V. (2025). Optochemical modulation of corneal cold nerve terminal impulse activity with a photochromic ion channel blocker. *British Journal of Pharmacology*, 1–15. <https://doi.org/10.1111/bph.70189>

8. AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin la inestimable ayuda de cada una de las personas que mencionaré a continuación. Muchas de ellas han sido un pilar firme y constante, brindándome un apoyo inquebrantable.

A mis padres, Josefina Suárez y Antonio Ares, cuyo ejemplo de esfuerzo, perseverancia, cariño, e incluso resignación, ha influido en mi educación, en mi corazón y en mis pensamientos. No hay palabras suficientes para expresar mi gratitud por vuestra generosidad, entrega, cariño, sabios consejos y apoyo incondicional. Este agradecimiento, por grande que parezca, siempre será insuficiente frente a todo lo que me habéis dado.

A mis hermanos, Jose L. Ares y Javier Ares, compañeros incondicionales en cada paso del camino. Vuestro apoyo, comprensión y constante ánimo han sido pilares fundamentales en mi vida. Os agradezco profundamente por estar siempre a mi lado, compartiendo alegrías, desafíos y sueños. Vuestra presencia ha sido un faro de luz en los momentos más oscuros, por ello, os estoy eternamente agradecido.

Mi más sincero agradecimiento a mi Director de tesis, Víctor M. Meseguer. Ha sido un privilegio poder trabajar bajo tu guía en este proyecto. Desde el principio, depositaste tu confianza en mí, lo que valoro profundamente. Con el paso de los años, he observado tu estoica dedicación y el entusiasmo que siempre has compartido. Más que un mentor, has sido un amigo. Este camino ha sido, sin duda, mucho más fácil gracias a ti. Siempre has tenido un momento y una sonrisa para todo, y por eso, te estoy eternamente agradecido.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Juana Gallar, líder indiscutible del laboratorio y, sin duda, la persona más trabajadora, organizada y responsable que he conocido. Su compromiso con el servicio público es incondicional, y su excelencia como investigadora y persona es inspiradora. Juana, aunque no lo imagines, has sido una figura de apoyo fundamental para mí, y sé que brindas ese mismo cuidado a tod@s nuestro@s compañer@s de laboratorio y a la gente que te rodea. Tu comprensión, carisma y cercanía han creado un ambiente de trabajo envidiable, donde todos nos sentimos valorados y apoyados. Nos cuidas tanto que, al pensar en el momento de buscar nuevos objetivos, me invade una profunda tristeza y cierta ansiedad, ya que sé que no es fácil encontrar otro hogar como este laboratorio. Gracias Juana, por ser el corazón de este equipo y por todo lo que me has dado, pues acabé en el Instituto de Neurociencias de Alicante porque me ofreciste la oportunidad. Siempre tendrás una mirada de admiración por mi parte.

A Mari Carmen Acosta, quiero expresarte mi más sincero agradecimiento. Siempre me has recibido con una sonrisa y has estado ahí para resolver mis dudas científicas y personales. Tu amabilidad y disposición han sido invaluable en este camino. Gracias por tu apoyo constante y por hacer que cada día el laboratorio sea alegría y buen ambiente.

A Carlos Belmonte, figura referente del laboratorio, del Instituto de Neurociencias, de la Universidad Miguel Hernández de Elche, de la investigación de España y del ámbito internacional.

Estoy en el laboratorio también gracias a ti, y no puedo evitar admirarte. Aunque quizás no lo parezca, has sido una gran influencia en mi formación académica y personal. Te debo más de lo que nunca has sospechado. Eres el equilibrio perfecto entre un gran investigador, un excelente gestor y una gran persona. Tu legado va a perdurar para siempre.

En estos agradecimientos quiero recordar a Raquel E. Rodríguez, de la Universidad de Salamanca. Por ti comenzó mi amor por las neurociencias. Pocos lo saben, pero tú fuiste quién me apoyó, quién me impulsó y fuiste el origen de todo. Hoy no estaría escribiendo estos párrafos si no fuera por tu inestimable ayuda y constante apoyo. Sé que ayudaste a más, pero no se podría esperar otra actitud de una persona tan buena y cálida. Siempre te recordaré con respeto, con cariño y con mucho amor.

A todos mis compañeros de laboratorio e Instituto, con quienes he compartido este camino y que me han ayudado y aportado de alguna u otra forma: Hugo Cabedo, Carolina L. Luna, Susana Quirce, Fito Aracil, Ariadna R. Díaz, José A. Gómez, Almudena Íñigo, Laura Frutos, Fernando Aleixandre, Miguel Delicado, Vicente Miralles, Anna Olle, María F. Climent, Saray Rabasco, Omar González, Fede Bech, José A. Pastor, Mireille Tora, Enrique Velasco, Ana Miralles, Elvira de la Peña, Félix Viana, Ana Gomis, Jorge Fernández, Raquel Murcia y al resto, pues de una forma u otra habéis contribuido en mi desarrollo personal y profesional.

A María Dolores Martínez, para los que la queremos, simplemente "Loli", y a su familia, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por haberme acogido en Alicante como si fuera uno más de la familia. Orgullosa "alicantina" y buena persona, de esas que ya casi no quedan. Salir de casa siempre es difícil, pero con vosotros ha sido mucho más fácil y llevadero. Os quiero de forma sincera y siempre estaré agradecido por vuestra calidez y generosidad. Me has cuidado como a un hijo más, y eso es algo que llevaré siempre en el corazón.

A Álvaro X. Valcárcel, amigo, compañero de estudios y viajes. Siempre has estado ahí cuando te necesitaba, ayudando, dando consejos sabios y compartiendo este camino y al resto de mis amigos; Jenni, Jorge, Sofía, David, Sergio, Yolanda, Miguel Ángel, María de los Ángeles, Ángel, Fini, Sandra, Soraya, María del Carmen y al resto que han estado a mi lado en cada etapa, brindando apoyo, compañía y alegría. Vuestra presencia ha sido fundamental y ha enriquecido cada experiencia.

Gracias a tod@s por vuestra grandeza, pues como dijo Isaac Newton: "*Si he visto más lejos, ha sido subido a hombros de gigantes*". Todo lo que soy es gracias a lo gigantes que habéis sido. Esta tesis os la dedico a tod@s y cada un@ de vosotr@s.

Con cariño,

David.